

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

Silvana Schmaltz

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS POR *Beauveria
bassiana* EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA ASSISTIDA POR
ULTRASSOM**

**Santa Maria, RS
2020**

Silvana Schmaltz

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS POR *Beauveria bassiana* EM
FERMENTAÇÃO SUBMERSA ASSISTIDA POR ULTRASSOM**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti

**Santa Maria, RS
2020**

Schmaltz, Silvana
PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS POR Beauveria
bassiana EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA ASSISTIDA POR ULTRASSOM
/ Silvana Schmaltz.- 2020.
73 p.; 30 cm

Orientador: Marcio Antonio Mazutti
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química, RS, 2020

1. Fermentação Submersa 2. Quitinase 3. ?-1,3-glucanase
4. Intensificação de processos 5. Estimulação por
ultrassom I. Mazutti, Marcio Antonio II. Título.

Silvana Schmaltz

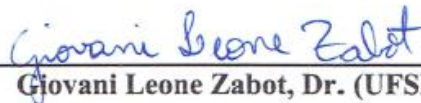
**PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS POR *Beauveria bassiana* EM
FERMENTAÇÃO SUBMERSA ASSISTIDA POR ULTRASSOM**

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

Aprovado em 19 de fevereiro de 2020:



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



Giovani Leone Zabet, Dr. (UFSM)



Helen Treichel, Dra. (UFFS)

Santa Maria, RS
2020

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e minha irmã. A base de tudo na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder a oportunidade de estar aqui agradecendo.

Ao meu orientador, professor Marcio Mazutti pelas orientações, conselhos e por nunca duvidar da minha capacidade.

Ao colega Bruno Aita pela parceria e companheirismo no laboratório. O trabalho não estaria completo se não fosse sua ajuda.

Aos meus pais, Elenor e Maria, por terem feito um esforço extremo para que eu chegasse até aqui. Sem eles, nada disso faria sentido.

À minha irmã, Simone, pelo companheirismo, pelas palavras de força nas horas difíceis e por toda a parceria desde sempre.

Ao meu namorado, Lucas, pelo aconchego depois de extensas horas de trabalho, pelo companheirismo e até mesmo suporte técnico em alguns casos!

Aos alunos de IC Alex e Vinícius, pela ajuda prestada ao longo da realização dos experimentos.

Aos colegas do PPGEQ e do PPGEA pela parceria, risadas, conselhos e palavras de conforto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e à Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade.

À FAPERGS pelo suporte financeiro dado ao projeto.

À CAPES pelo auxílio financeiro indispensável.

Mesmo que você tenha apenas um sonho simples, não o guarde para si. Fale aos outros sobre ele. Quando você tiver dito a dez pessoas, ele já estará mais perto de se realizar.

(Haemin Sunim)

RESUMO

PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS POR *Beauveria bassiana* EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA ASSISTIDA POR ULTRASSOM

AUTORA: Silvana Schmaltz

ORIENTADOR: Marcio Antonio Mazutti

Há muitos anos é conhecida a capacidade do fungo *Beauveria bassiana* de produzir enzimas hidrolíticas em meio nutritivo, bem como o papel dessas enzimas no processo infeccioso do fungo. Este trabalho traz a definição de um meio nutritivo para produção submersa de enzimas hidrolíticas (β -1,3-glucanase e quitinase) e esporos de *Beauveria bassiana*. O uso de produtos e resíduos agroindustriais foi abordado, mostrando capacidade de estímulo de produção de enzimas e esporos. O meio mais adequado para a produção combinada foi composto por farelo de arroz (35 g.L⁻¹), sacarose (50 g.L⁻¹) e farelo de soja (5 g.L⁻¹), além dos minerais essenciais para o crescimento. A fim de obter uma maior produção de enzimas foi estudada a aplicação de Ultrassom (US) durante o processo fermentativo, uma vez que esta tecnologia vem sendo cada vez mais empregada para estimulação de bioprocessos. Foram estudados diferentes momentos de aplicação de US no cultivo, diferentes tempos de sonicação, bem como diversas potências de aplicação e ciclos de trabalho. Além disso, sonicações múltiplas foram testadas. A melhor condição entre as testadas resultou em aumentos de 51% na produção de β -1,3-glucanase e 60% na de quitinase, sendo a aplicação realizada a 24h de cultivo com potência de 195 W, por 5 min e ciclo de trabalho de 0,5 s.s⁻¹.

A fim de identificar possíveis mecanismos de ação do US sobre a biomassa microbiana, análises de MEV foram realizadas comparando biomassas do cultivo controle -sem sonicação- com biomassa sonicada na melhor condição encontrada para a aplicação do US. As fotografias obtidas permitiram identificar diferenças estruturais na biomassa sonicada e na não sonicada. O US foi capaz de aumentar a formação de poros na biomassa, influenciando, desta forma, nas trocas de nutrientes e produtos entre célula e meio de cultivo, favorecendo maior produção e secreção enzimática. Experimentos avaliando a influência do US na secreção de nitrogênio pela biomassa microbiana liofilizada também foram conduzidos. Foi perceptível o estímulo gerado pela sonicação na liberação de nitrogênio total pela biomassa (47% comparado com o teor anterior à sonicação), além de aumento de 21% e 60% nas atividades enzimáticas de β -1,3-glucanase e quitinase, respectivamente, logo após a aplicação do US. A aplicação de US durante o cultivo de *Beauveria bassiana* mostrou-se como opção muito interessante para aumentar a produção e/ou secreção de enzimas hidrolíticas como β -1,3-glucanase e quitinase, reduzindo, desta forma, o tempo de cultivo.

Palavras-chave: Fermentação Submersa. Quitinase. β -1,3-glucanase. Intensificação de processos. Estimulação por ultrassom.

ABSTRACT

HYDROLYTIC ENZYMES PRODUCTION BY *Beauveria bassiana* IN ULTRASOUND-ASSISTED LIQUID FERMENTATION

AUTHOR: Silvana Schmaltz

ADVISOR: Marcio Antonio Mazutti

The ability of the fungus *Beauveria bassiana* to produce hydrolytic enzymes in nutritious media has been known for many years, as well as the role of these enzymes in the fungal infectious process. This work defines a nutrient medium for the submerged production of hydrolytic enzymes (β -1,3-glucanase and chitinase) and spores of *Beauveria bassiana*. The use of agro-industrial products and residues was approached, showing the ability to stimulate the production of enzymes and spores. The most suitable medium for combined production was composed of rice bran (35 g.L⁻¹), sucrose (50 g.L⁻¹) and soybean bran (5 g.L⁻¹), in addition to the essential minerals for growth. In order to obtain a higher production of enzymes, the application of Ultrasound (US) during the fermentation process was studied, since this technology has been increasingly used to stimulate bioprocesses. Different moments of application of US in the culture, different sonication times, as well as different application powers and work cycles were studied. In addition, multiple US treatments were tested. The best condition among those tested resulted in increases of 51% in the production of β -1,3-glucanase and 60% in the chitinase, with the application being carried out at 24 hours of cultivation with a power of 195 W, for 5 min and working cycle 0.5 s.s⁻¹. In order to identify possible mechanisms of action of the US on microbial biomass, SEM analyzes were performed comparing biomasses from the control culture - without sonication - with sonicated biomass in the best condition found for the application of the US. The photographs obtained allowed to identify structural differences in sonicated and non-sonicated biomass. The US was able to increase the formation of pores in the sonicated biomass, thus influencing the exchange of nutrients and products between cell and culture medium, favoring greater production and enzymatic secretion. Experiments evaluating the influence of US on nitrogen secretion by lyophilized microbial biomass were also conducted. The stimulus generated by sonication in the release of total nitrogen by biomass (47% compared to the content prior to sonication) was noticeable, in addition to an increase of 21% and 60% in the enzymatic activities of β -1,3-glucanase and chitinase, respectively, right after the application of the US. The application of US during the cultivation of *Beauveria bassiana* proved to be a very interesting option to increase the production and/or secretion of hydrolytic enzymes such as β -1,3-glucanase and chitinase, thus reducing the culture time.

Keywords: Submerged fermentation. Chitinase. β -1,3-glucanase. Process intensification. Ultrasound stimulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Resumo dos biopesticidas de origem microbiana registrados no Brasil	17
Figura 2 – Diferentes fungos entomopatogênicos colonizando diferentes tipos de pragas: (A) <i>Aschersonia</i> sp. em <i>Bemisia tabaci</i> , (B) <i>Lecanicillium longisporum</i> em <i>Orthezia praelonga</i> , (C) <i>Isaria fumosorosea</i> em <i>B. tabaci</i> , (D) <i>Metarhizium anisopliae</i> em <i>Mahanarva fimbriolata</i> , (E) <i>Lecanicillium</i> em <i>Coccus viridis</i> , (F) <i>Beauveria bassiana</i> em <i>Sphenophorus levis</i> , (G) <i>B. bassiana</i> em <i>Hypothenemus hampei</i> , (H) <i>B. bassiana</i> em <i>Anastrepha</i> sp.....	18
Figura 3 – Processo de infecção de um esporo de um fungo entomopatogênico na cutícula de um hospedeiro.....	19
Figura 4 – Fungo <i>Beauveria bassiana</i> (IBCB 66) em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA)	22
Figura 5 – Modo de ação de uma quitinase	24
Figura 6 – Hidrólise de uma β -1,3-glucana por uma β -1,3-glucanase	25
Figura 7 – Sonobiorreatores com diferentes configurações para aplicação de US. (a) Uso de sonotrodo para aplicação direta de US. (b) Sonobiorreator com transdutor acoplado para sonicação direta. (c) Biorreator imerso em banho ultrassônico para sonicação indireta	27
Figura 8 – Fluxograma dos experimentos realizados	31
Figura 9 – Aparato experimental utilizado para sonicação durante a fermentação.....	38
Figura 10 – Gráfico de Pareto das variáveis respostas do PB12: (A) β -1,3-glucanase; (B) Quitinase; (C) Esporos.....	44
Figura 11 – Curva de contorno para otimização da atividade enzimática de β -1,3-glucanase por <i>Beauveria bassiana</i>	48
Figura 12 – Cinética enzimática das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase. As barras de erros representam os desvios padrões de cada ponto.....	50
Figura 13 – Efeito da sonicação em diferentes estágios de crescimentos: (A – F): β -1,3-glucanase; (G – L): quitinase.....	52
Figura 14 – Efeito do tempo de sonicação nas atividades enzimáticas de (A) β -1,3-glucanase e (B) quitinase.....	53
Figura 15 – Efeito da potência de sonicação nas atividades enzimáticas de (A) β -1,3-glucanase e (B) quitinase	55
Figura 16 – Efeito do ciclo de trabalho do US nas atividades enzimáticas de (A) β -1,3-glucanase e (B) quitinase	57
Figura 17 – Efeito de múltiplos tratamentos com US nas atividades enzimáticas de (A) β -1,3-glucanase e (B) quitinase	59
Figura 18 – Cinética de crescimento microbiano com ou sem tratamento com US.....	61
Figura 19 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da biomassa fúngica liofilizada: (A) C24; (B) C36; (C) C48; (D) US24; (E) US36; (E) US48. Aumento de 1000 x	62
Figura 20 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da biomassa fúngica liofilizada: (A) C24; (B) C36; (C) C48; (D) US24; (E) US36; (E) US48. Aumento de 5000 x	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Trabalhos da literatura aplicando US na produção de enzimas	29
Tabela 2 – Matriz do Plackett-Burman com variáveis codificadas e reais (entre parêntesis) ..	34
Tabela 3 – Matriz do DCCR com variáveis codificadas e reais (entre parêntesis)	35
Tabela 4 – Matriz do PB12 (valores reais e codificados) com as respostas de atividades enzimáticas de β -1,3-glucanase e quitinase e produção de esporos	43
Tabela 5 – Matriz do DCCR (valores reais e codificados) e respostas atividades enzimáticas de β -1,3-glucanase e quitinase e produção de esporos	46
Tabela 6 – Análise estatística dos efeitos das variáveis independentes sobre as variáveis dependentes do DCCR.....	46
Tabela 7 – ANOVA das variáveis resposta do DCCR	48
Tabela 8 – Atividades enzimáticas e produção de esporos variando a concentração de FA no meio de cultivo	49
Tabela 9 – Teor de nitrogênio total (NT), carbono orgânico total (COT) e atividades enzimáticas obtidos antes e após sonicação da biomassa liofilizada.....	64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.1.1 Objetivos específicos	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 CONTROLE BIOLÓGICO.....	16
3.2 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E SUAS APLICAÇÕES NO CONTROLE BIOLÓGICO	18
3.2.1 O fungo <i>Beauveria bassiana</i> e sua aplicação no Controle Biológico	21
3.3 PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS	23
3.3.1 Quitinases	23
3.3.2 β-1,3-glucanases	24
3.4 INTENSIFICAÇÃO DE BIOPROCESSOS POR ULTRASSOM	25
3.4.1 Efeito do Ultrassom em enzimas	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 ARMAZENAMENTO E MANUTENÇÃO DO FUNGO.....	32
4.2 PREPARO DO INÓCULO	32
4.3 INOCULAÇÃO E FERMENTAÇÃO	32
4.4 PRODUÇÃO DE β -1,3-GLUCANASE E QUITINASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	33
4.4.1 Planejamento Plackett-Burman	33
4.4.2 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)	34
4.5 CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	35
4.6 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	35
4.6.1 Determinação da atividade enzimática da β-1,3-glucanase	35
4.6.2 Determinação da atividade enzimática da quitinase	36
4.6.3 Quantificação de açúcares redutores pelo método DNS	37
4.7 CONTAGEM DE ESPOROS.....	37
4.8 APLICAÇÃO DE ULTRASSOM.....	37
4.8.1 Estudo do momento de aplicação de ultrassom	39
4.8.2 Estudo do tempo de aplicação de ultrassom	39
4.8.3 Estudo da potência de aplicação de ultrassom	39
4.8.4 Estudo do ciclo de trabalho do ultrassom	39
4.8.5 Estudo de múltiplas aplicações de ultrassom	40
4.9 ANÁLISES PARA AVALIAÇÃO DAS CONSEQUÊNCIAS DO ULTRASSOM NA BIOMASSA	40

4.9.1 Cinética de crescimento microbiano	40
4.9.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	40
4.9.3 Estudo do estímulo de liberação de nitrogênio total (NT) e carbono orgânico total (TOC) pela biomassa por sonicação	41
4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
5.1 SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO	42
5.2 CINÉTICA ENZIMÁTICA	49
5.3 EFEITOS DA APLICAÇÃO DE US DURANTE A FERMENTAÇÃO	50
5.3.1 Efeito do US em diferentes estágios de crescimento	50
5.3.2 Efeito do tempo de sonicação	53
5.3.3 Efeito da potência de aplicação	54
5.3.4 Efeito do ciclo de trabalho do US	56
5.3.5 Efeito de múltiplos tratamentos com US	58
5.4 ANÁLISES DA BIOMASSA COM E SEM TRATAMENTO ULTRASSÔNICO	60
5.4.1 Cinética de crescimento microbiano	60
5.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	61
5.4.3 Determinação de nitrogênio total, carbono orgânico total e atividades enzimáticas após sonicação da biomassa	64
6. CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

Beauveria bassiana é um fungo entomopatogênico amplamente utilizado na formulação de biopesticidas de primeira geração (produtos baseados em células vivas e/ou esporos). É aplicado contra patógenos de plantas, como insetos, fungos e nematoides, sendo uma alternativa potente aos pesticidas químicos (SARANRAJ; JAYAPARAKASH, 2017). É um dos entomopatógenos fúngicos mais estudados e utilizados em todo o mundo (MASCARIN; JARONSKI, 2016). O processo infeccioso ocorre diretamente através da cutícula do hospedeiro, devido à pressão mecânica aliada à secreção de enzimas hidrolíticas (FENG; POPRAWSKI; KHACHATOURIANS, 1994).

A capacidade do fungo *Beauveria bassiana* de produzir enzimas hidrolíticas em meio nutritivo é conhecida há muitos anos, bem como o papel dessas enzimas no processo infeccioso (SAMŠIŇÁKOVÁ; MIŠÍKOVÁ; LEOPOLD, 1971). Quitinases e β -1,3-glucanases estão entre as principais enzimas secretadas por fungos entomopatogênicos durante o processo de infecção. Essas enzimas atuam de forma sinérgica com outras, como glucanases e proteinases, ambas envolvidas na degradação da cutícula de insetos e parede celular de fungos durante os processos infecciosos (PEREIRA et al., 2007). Quitinases e β -1,3-glucanases são capazes de degradar membranas peritróficas de insetos e paredes celulares de fungos, respectivamente, causando perda de fluido celular e, conseqüentemente, morte por desidratação (BISHOP; DEAN; MITCHELL-OLDS, 2000).

Alguns estudos demonstraram a eficácia de enzimas degradadoras de parede celular no controle de insetos (BERINI et al., 2018; DI MARO et al., 2010; LIU et al., 2010; SUBBANNA et al., 2018) e fungos (BERINI et al., 2018; BLAETH DE LIMA et al., 2017; DENG et al., 2018; DI MARO et al., 2010; GHASEMI et al., 2011; LIU et al., 2010; SOUSA et al., 2019; SUBBANNA et al., 2018). Essas enzimas são consideradas biopesticidas de segunda geração, que são uma categoria de produtos microbianos que compreende compostos de ocorrência natural excretados por microrganismos ou seus análogos sintéticos, e apresentam-se como um campo de pesquisa interessante (SUBBANNA et al., 2018).

Apesar do uso potencial das enzimas quitinase e β -1,3-glucanase como biopesticidas, pouco progresso foi observado no desenvolvimento de produtos. No Brasil, atualmente, não existe produto à base de enzimas registrado para controle de doenças e pragas na agricultura. Uma razão para isso é a dificuldade em encontrar quitinases e β -1,3 glucanases comerciais a um preço competitivo, como é o caso de outras enzimas como lipases, proteases e amilases. O alto preço das quitinases e das β -1,3 glucanases está associado à baixa produção, mesmo com

o uso de microrganismos recombinantes (STOYKOV; PAVLOV; KRASTANOV, 2015). As várias etapas de purificação também contribuem para aumentar o preço de venda dessas enzimas (SENA et al., 2011).

Uma estratégia que tem sido usada com sucesso para intensificar processos de extração de compostos bioativos, estímulo de produção destes compostos e reações enzimáticas em geral é a tecnologia de ultrassom (US). Esta tecnologia pode ser utilizada como um método para melhorar o desempenho de processos envolvendo organismos vivos (CHISTI, 2003). O princípio primário da tecnologia de US é a conversão de energia elétrica em vibração física. O efeito sobre o meio aplicado é devido a um fenômeno cavitacional que libera grandes quantidades de energia localmente (AVHAD; RATHOD, 2014; PAWAR; RATHOD, 2018). Os tratamentos com US podem ser aplicados para aumentar o rendimento de produtos e a extração de componentes específicos (LUO; FANG; SMITH, 2014; PAWAR; RATHOD, 2018).

Quando aplicados de forma intermitente e de curta duração, o US pode aumentar a produtividade de processos biológicos (CHISTI, 2003). Os fatores responsáveis por essa melhoria na produtividade não são muito claros, embora as transferências de massa gás-líquido e líquido-sólido possam ter um papel importante (HERRÁN et al., 2008). Alguns mecanismos de ação sugeridos para o US são: aumento da permeabilidade da membrana celular, aumento da solubilidade de compostos pouco solúveis e melhoria da transferência de massa de através da parede celular (KWIATKOWSKA et al., 2011). Quando o transporte de nutrientes através da parede celular é melhorado, a produção de metabólitos também é favorecida (SUN; MA; WANG, 2017).

Embora o uso de US esteja bem estabelecido para reações enzimáticas (LI et al., 2019; PATIL; JOSHI; GOGATE, 2019; PELLIS et al., 2016; SOUZA et al., 2013; WU et al., 2017; XIAO et al., 2005; YU; YANG, 2019), ainda há pouco progresso em relação ao seu uso em processos de fermentação como estratégia para aumentar a liberação de enzimas extracelulares no meio (AVHAD; RATHOD, 2014, 2015; PAWAR; RATHOD, 2018; VARGAS et al., 2004; WANG et al., 2013), especialmente para quitinase e β -1,3-glucanase. Com base nesses aspectos, este trabalho traz uma forma eficiente de produção destas enzimas e avalia os efeitos do estímulo com US na produção e/ou secreção de quitinase e β -1,3-glucanase de *Beauveria bassiana* cultivado em meio líquido.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial do fungo *Beauveria bassiana* (IBCB 66) na produção de enzimas hidrolíticas, como β -1,3-glucanase e quitinase, em cultivo submerso utilizando ultrassom como tecnologia associada ao processo fermentativo.

2.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar o uso de diferentes fontes de suplementação ao meio de cultivo (farelo de arroz, farelo de soja e resíduo de malte) na produção das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase e esporos do fungo *Beauveria bassiana* em fermentação submersa;
- Realizar um estudo cinético da produção das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase;
- Avaliar o impacto da aplicação de US na produção de β -1,3-glucanase e quitinase e investigar possíveis formas de ação da sonicação na biomassa;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CONTROLE BIOLÓGICO

A utilização de compostos químicos organoclorados e organofosforados como pesticidas gera enormes prejuízos para o meio ambiente e para a saúde humana, além do crescente aumento de espécies de insetos resistentes a estes compostos (PEREIRA; MARTINS, 2016). Pesticidas químicos vêm sendo utilizados há muitos anos para combater pragas na agricultura, no entanto, são considerados mundialmente prejudiciais ao meio ambiente, além de terem efeitos maléficos sobre seres vivos e contaminarem solos e águas (LENGAI; MUTHOMI, 2018). Outro aspecto que merece atenção é a perda de eficiência de alguns destes pesticidas, visto que certas espécies de pragas acabam adquirindo resistência a estes compostos (HUSSAIN et al., 2012; MAZID, 2011; PEREIRA; MARTINS, 2016). É neste contexto que surge a necessidade de utilização de uma alternativa ambientalmente correta para este controle, como o uso de biopesticidas para combate de pragas.

Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USA, 2019), biopesticidas são tipos de pesticidas oriundos da natureza, podendo ser de origem animal, vegetal ou microbiana. Por agentes microbiológicos de controle entende-se, de acordo com a Instrução Normativa Conjunta Nº 3 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, de 10 de março de 2006, organismos vivos de ocorrência natural ou que sofreram alguma adição natural de material hereditário, exceto os organismos submetidos a técnicas de modificação genética (BRASIL, 2019a). Agentes de controle biológico de origem microbiana podem ser fungos, bactérias, nematoides, vírus ou protozoários. Biopesticidas microbianos incluem as espécies de bactérias *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Xanthomonas*, *Rhanelia* e *Serratia* e fungos como *Trichoderma*, *Verticillium* e espécies dos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium* (KACHHAWA, 2017; LENGAI; MUTHOMI, 2018)

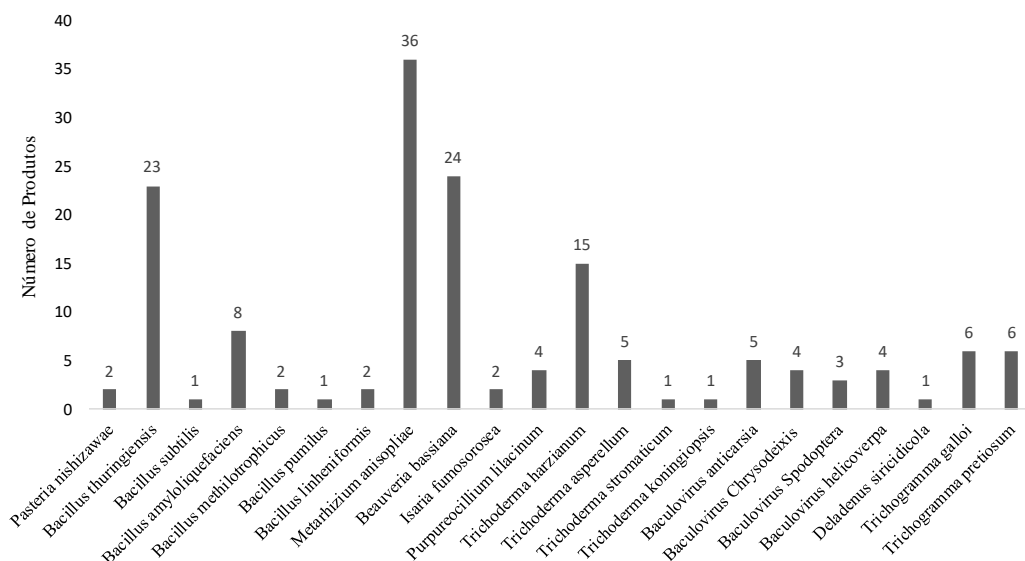
A utilização de biopesticidas apresenta-se como uma alternativa eficiente e ecologicamente correta, quando comparada aos pesticidas convencionas, já que faz uso de inimigos naturais para o combate de pragas na agricultura (MAZID, 2011). O combate de populações por inimigos naturais (patógenos) proporciona benefícios ambientais e econômicos sem as consequências negativas resultantes do uso de pesticidas químicos (BIANCHI; BOOIJ; TSCHARNTKE, 2006; LENGAI; MUTHOMI, 2018).

Entre as inúmeras vantagens da utilização de patógenos para o combate de pragas está a eficiência deste método, além da competitividade com outras formas de controle, pois

causam pequeno ou até mesmo nenhum dano em organismos que não apresentam risco para a agricultura, já que existe uma relação específica entre patógeno e hospedeiro (LI et al., 2009). Além das vantagens já citadas, a ocorrência natural desses patógenos faz com que não causem poluição no meio ambiente, somando ao fato de pragas não conseguirem desenvolver resistência a este tipo de controle (JAQUES, 1983; MOAZAMI, 2017).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (BRASIL, 2019b), o mercado de produtos biológicos cresceu mais de 70% no ano de 2018, quando comparado com o ano anterior. Em termos globais, o setor apresentou crescimento de 17%. Uma estimativa realizada pela consultoria Dunham Trimmer - International Bio Intelligence mostra que o setor de biológicos faturará US\$ 5 bilhões em 2020, podendo chegar a US\$ 11 bilhões em 2025 (BRASIL, 2019b). A Figura 1 mostra em resumo os biopesticidas microbianos registrados no Brasil até metade do ano de 2019, segundo consulta no site do Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários brasileiro (Agrofit).

Figura 1 – Resumo dos biopesticidas de origem microbiana registrados no Brasil



Fonte: Brasil, 2019c.

Entre os microrganismos utilizados no controle biológico, os fungos constituem o maior grupo com espécies entomopatogênicas (HUSSAIN et al., 2012). Além disso, são os melhores candidatos para combate de pragas, pois sua infecção ocorre diretamente através do tegumento corporal do inseto (MOORE; ROBSON; TRINCI, 2011). Entre os principais

exemplares de fungos utilizados para combate de pragas estão os dos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria* e *Trichoderma* (KACHHAWA, 2017).

3.2 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E SUAS APLICAÇÕES NO CONTROLE BIOLÓGICO

O termo entomopatogênico é usualmente empregado para descrever fungos filamentosos capazes de penetrar em insetos hospedeiros diretamente através da cutícula e causar doenças que levam estes insetos à morte (MOORE; ROBSON; TRINCI, 2011). Estes fungos possuem um amplo espectro de ação, sendo capazes de colonizar várias espécies de insetos e ácaros, além de causar, com frequência, epizootias em condições naturais (MASCARIN; JARONSKI, 2016). A Figura 2 apresenta o ataque de diferentes fungos entomopatogênicos em pragas.

Figura 2 – Diferentes fungos entomopatogênicos colonizando diferentes tipos de pragas: (A) *Aschersonia* sp. em *Bemisia tabaci*, (B) *Lecanicillium longisporum* em *Orthezia praelonga*, (C) *Isaria fumosorosea* em *B. tabaci*, (D) *Metarhizium anisopliae* em *Mahanarva fimbriolata*, (E) *Lecanicillium* em *Coccus viridis*, (F) *Beauveria bassiana* em *Sphenophorus levis*, (G) *B. bassiana* em *Hypothenemus hampei*, (H) *B. bassiana* em *Anastrepha* sp.



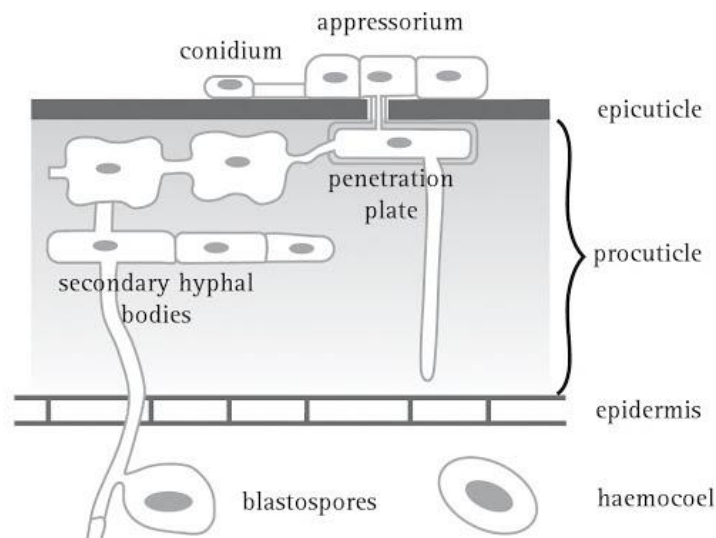
Fonte: Mascarin e Pauli (2010).

O potencial de aplicação de fungos patogênicos para o controle de insetos praga é reconhecido desde o final do século XIX, quando *Metarhizium anisopliae* foi testado contra o besouro *Anisoplia austriaca* e o curculionídeo *Cleonus punctiventris* (MOAZAMI, 2017). Atualmente, diversos exemplares de fungos têm sido estudados e aplicados no controle de

pragas, como exemplo, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Verticillium lecanii*, *Isaria fumosorosea*, *Beauveria brongniartii* e *Metarhizium brunneum* (MASCARIN, 2015; MOAZAMI, 2017). No Brasil, mais de 50% dos pesticidas de origem microbiana registrados (Figura 1) são baseados em fungos da ordem Hypocreales, à qual pertence a maioria dos fungos entomopatogênicos conhecidos (MASCARIN et al., 2018).

O ciclo de infecção, em termos gerais, inicia com a aderência de um esporo fúngico (unidade de reprodução assexuada) na cutícula do hospedeiro e sua posterior germinação, quando as condições se mostrarem favoráveis (Figura 3). O tubo de germinação do esporo penetra a cutícula através de uma combinação de forças mecânicas e ação enzimática, atingindo, desta forma, a cavidade corpórea do hospedeiro. A ação de enzimas degradadoras de cutícula como lipases, quitinases, proteases e glucanases provou-se ser influente no processo de infecção de vários fungos (CHARNLEY, 1984; DEAN; DOMNAS, 1983; HUSSAIN et al., 2010; MAZID, 2011; SAMŠIŇÁKOVÁ; MIŠÍKOVÁ; LEOPOLD, 1971).

Figura 3 – Processo de infecção de um esporo de um fungo entomopatogênico na cutícula de um hospedeiro



Fonte: Hajek e St. Leger (1994).

Uma vez dentro do corpo do hospedeiro, o fungo inicia o processo de propagação na forma de hifas, infestando os tecidos. Como resultado, os nutrientes presentes nos tecidos são consumidos, levando o hospedeiro à morte. Além disso, o fungo pode secretar toxinas capazes de paralisar o corpo do hospedeiro, resultando, também, em morte (MOORE; ROBSON;

TRINCI, 2011). Após a morte, a cutícula do inseto rompe e o fungo se alastra por toda a superfície corporal deste, crescendo de forma saprofítica, formando micélios que dão origem a esporos infecciosos, capazes de serem transportados por manifestações climáticas e infectarem novos hospedeiros (CASTRILLO; ROBERTS; VANDENBERG, 2005).

Apesar de todas as vantagens apresentadas pelos biopesticidas de origem microbiana, eles apresentam uma desvantagem que pode causar redução de sua eficiência no controle de pragas. A presença de microrganismo nativos nos locais de aplicação pode gerar dificuldades de ação do biopesticida. Além disso, condições climáticas também interferem no sucesso de uma aplicação. Umidade, temperatura, vento, radiação ultravioleta, solo, entre outros fatores influenciam diretamente na ação do biopesticida (BERINI et al., 2018; PARNELL et al., 2016).

A aplicação de metabólitos secundários e produtos - como enzimas hidrolíticas - produzidos por fungos entomopatogênicos apresenta-se como estratégia interessante para contornar problemas enfrentados pelos biopesticidas no campo. Enzimas fúngicas como proteases, quitinases e β -glucanases possuem potencial biotecnológico para desenvolvimento de novas ferramentas para controle de pestes e patógenos (PEREIRA et al., 2007). A formulação de coquetéis de enzimas e metabólitos secundários traz mais flexibilidade para os processos de aplicação e armazenamento do que a manipulação de microrganismos vivos (BERINI et al., 2018). A possibilidade de adaptar as concentrações de cada ingrediente ativo na formulação é outra grande vantagem da utilização de enzimas hidrolíticas e demais metabólitos em aplicações de controle biológico (BERINI et al., 2018).

Diversos estudos têm mostrado possibilidades de aplicação de enzimas produzidas por fungos entomopatogênicos no controle biológico. Mauch et al. (1988) testaram caldos enzimáticos contendo quitinases e β -1,3-glucanases obtidos de vagens de ervilhas infectadas com *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* na inibição de fungos fitopatogênicos, como *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*; *M. fructigena*; *T. basicola*; *A. solani*; *A. bombacina* e *A. niger*, obtendo bons resultados para a combinação das duas enzimas. Khan et al. (2004) estudaram a aplicação de quitinases e proteases de *Paecilomyces lilacinus* contra ovos do nematoide patógeno de plantas *Meloidogyne javanica*, obtendo destruição dos ovos pela ação das enzimas, demonstrando potencial de utilização de caldos enzimáticos no controle de nematoides. Quitinases purificadas e extrato bruto de *Gliocladium catenulatum* inibiram o crescimento de hifas e germinação de conídios de fungos patogênicos de plantas, como *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium gramineicola* (MA et al., 2012), sendo os melhores resultados obtidos quando o extrato bruto foi aplicado. Binod et al. (2007)

verificaram que o caldo fermentativo contendo quitinases do fungo *Trichoderma harzianum* afetou negativamente o crescimento e metamorfose de larvas de *Helicoverpa armigera*, importante praga da cultura do algodão. Kim e Je (2010) e Kim et al. (2011) purificaram quitinases do meio de cultura do fungo *Beauveria bassiana* e aplicaram contra pulgões de algodão, verificando alta atividade inseticida.

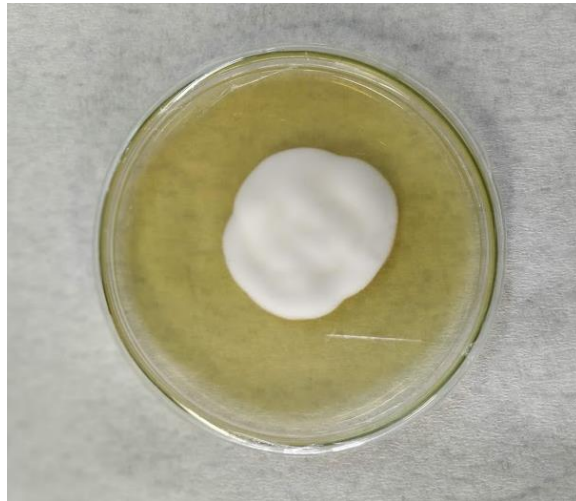
Vidhate et al. (2015) testaram a aplicação de enzimas degradadoras de cutículas e micolíticas (quitinases, proteases, lipases, β -1,3-glucanases e celulases) produzidas por *Myrothecium verrucaria* juntamente com conídios de *Metarhizium anisopliae* no controle de cochonilhas da cultura de uva (*Maconellicoccus hirsutus*), obtendo em torno de 80% de morte da praga, valor este equivalente ao obtido por tratamentos com pesticidas químicos. Em um estudo similar, Thongkaewyuan e Chairin (2018) utilizaram uma combinação de esporos de *Metarhizium guizhouense* e seu caldo enzimático contendo atividade proteolítica no controle do nematoide *Meloidogyne incognita*, inibindo a eclosão de ovos em 24h e atingindo mortalidade de 100% dos juvenis em 48 h.

3.2.1 O fungo *Beauveria bassiana* e sua aplicação no Controle Biológico

Segundo Zimmermann (2007), o fungo *Beauveria bassiana* foi descrito pela primeira vez há mais de 180 anos, sendo considerado, desde então, como potencial para controle de pragas. Em 1835, o italiano Agostino Bassi identificou uma doença em bichos-da-seda e a chamou de Muscardina branca. Anos mais tarde, em torno de 1912 o nome *Beauveria bassiana* foi criado em sua homenagem (ZIMMERMANN, 2007).

B. bassiana é um fungo ascomiceto pertencente à ordem dos Hypocreales. É comumente encontrado na natureza, tanto em plantas quanto no solo. Atua como entomopatógeno, sendo largamente utilizado em técnicas de controle biológico (SARANRAJ; JAYAPARAKASH, 2017). Apesar do conhecimento de uma forma de reprodução sexuada (LI et al., 2001), o fungo é majoritariamente disseminado pela liberação de estruturas de reprodução assexuada, denominadas conídios (AKDI et al., 2009). A Figura 4 apresenta uma foto do fungo crescido em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA).

Figura 4 – Fungo *Beauveria bassiana* (IBCB 66) em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA)



Fonte: Autora.

B. bassiana é conhecido como patógeno de insetos. É utilizado como micoinseticida para controle de diversos insetos-praga, apresentando-se como alternativa ao uso de pesticidas químicos sintéticos (HAJEK; WRAIGHT; VANDENBERG, 2001). É um dos fungos entomopatogênicos mais estudados, sendo conhecidos mais de 1.000 isolados de diferentes partes do mundo (MASCARIN; JARONSKI, 2016; REHNER et al., 2011). Dentre os principais tipos de artrópodes atacados estão os coleópteros (joaninhas, besouros), lepidópteros (borboletas, mariposas) e hemípteros (cigarras, percevejos) (LI et al., 2001).

O modo de infecção de *B. bassiana*, assim como da maioria dos fungos entomopatogênicos, é pelo contato e germinação do esporo na superfície corporal do hospedeiro (HAJEK; ST. LEGER, 1994). Este fungo é capaz de infectar mais de 300 espécies de artrópodes, incluindo importantes pragas para agricultura e pecuária (ALVES, 1998). Além da ação mecânica dos propágulos do fungo, uma infecção bem-sucedida depende da atuação de enzimas capazes de degradar as proteínas presentes no tegumento do inseto (FENG; POPRAWSKI; KHACHATOURIANS, 1994).

Beauveria bassiana possui capacidade de produzir diferentes tipos de metabólitos secundários, principalmente toxinas e enzimas hidrolíticas. Entre os compostos produzidos, um grande grupo é formado por orgânicos voláteis, como alcaloides (tenelina, bassianina, pyridovericina, pyridomacrodilina), pigmentos (oosporeina), peptídeos não-ribossômicos (beauvericina, bassianolide) e ciclopeptídeos (beauveriolides) (PATOČKA, 2016). A produção de enzimas está diretamente relacionada com a patogenicidade do fungo, uma vez

que estes metabólitos auxiliam no processo de infestação e desenvolvimento uma vez dentro do hospedeiro (KACHHAWA, 2017). Além da capacidade de atuar diretamente contra insetos praga, *Beauveria bassiana* também tem sido estudada e aplicada como endófito em plantas, o que pode vir a colaborar de forma positiva contra o ataque das pragas, aumentando, desta forma, a resistência da planta (KASAMBALA DONGA; VEGA; KLINGEN, 2018).

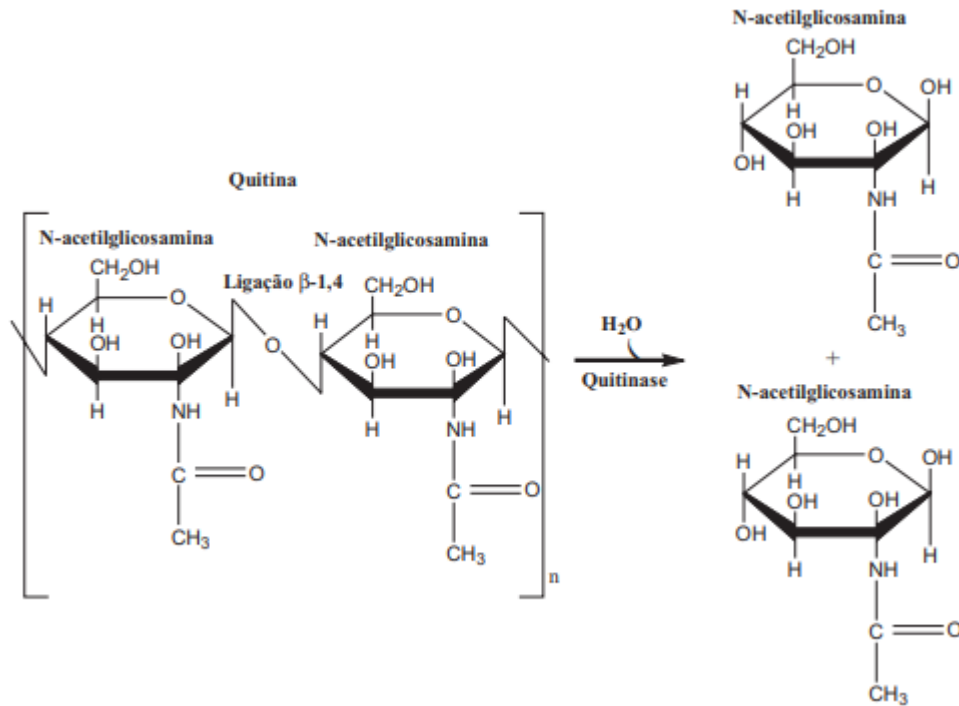
3.3 PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS

A capacidade do fungo *Beauveria bassiana* de produzir enzimas hidrolíticas em meios nutritivos é conhecida há muitos anos, bem como a atuação destas enzimas no processo infeccioso (SAMŠIŇÁKOVÁ; MIŠÍKOVÁ; LEOPOLD, 1971). Dentre as principais enzimas envolvidas na penetração do fungo no hospedeiro estão as proteases, quitinases e lipases (MANCILLAS-PAREDES et al., 2019). Além das enzimas já citadas, as β -1,3-glicanases, também produzidas por *Beauveria bassiana*, têm papel importante na degradação de paredes celulares fúngicas de alguns fitopatógenos (ESPINOZA et al., 2016).

3.3.1 Quitinases

A quitina é o segundo biopolímero mais abundante da Terra (THADATHIL et al., 2014). É o principal componente de exoesqueletos e tecidos conectivos de artrópodes e paredes celulares fúngicas, sendo também encontrada em alguns organismos marinhos (KARTHIK et al., 2014). As quitinases são enzimas responsáveis pela hidrólise da quitina, a qual é formada por ligações β -1,4-glicosídicas (ligações β -1,4 de N-acetilglucosamina) (Figura 5) e são insolúveis em água (BERINI et al., 2018). A clivagem enzimática causada pelas quitinases normalmente ocorre randomicamente na cadeia da quitina, formando produtos solúveis e de baixa massa molecular, sendo estes multímeros de N-acetilglucosamina: quitotetraose, quitotriose e quitobiose (BINOD et al., 2007). Dependendo do modo de ação das quitinases elas podem ser classificadas como Endoquitinases ou Quitodextrinases (EC 3:2:1:14) e Exoquitinases ou N-acetil- β -glucosaminidase (EC 3.2.1.52). Estes dois tipos de quitinases atuam de forma sinérgica e consecutiva (THADATHIL et al., 2014).

Figura 5 – Modo de ação de uma quitinase



Fonte: Fleuri e Sato (2005).

Quitinases são produzidas por diversos grupos de microrganismos incluindo bactérias e fungos. Suas aplicações variam com o microrganismo produtor (THADATHIL et al., 2014). A melhoria da produção de quitinases fúngicas extracelulares tem recebido maior atenção nos últimos anos devido às suas relevantes aplicações (BERINI et al., 2018). Estas enzimas possuem importantes papéis no controle biológico de pragas e doenças, na alimentação, medicina e manejo de resíduos (KUMAR et al., 2012).

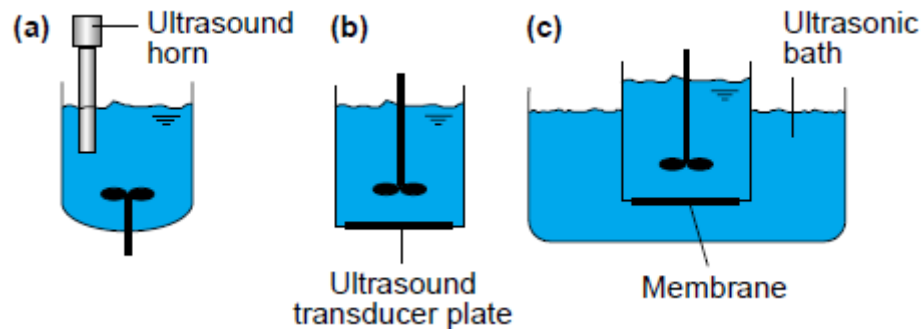
3.3.2 β -1,3-glucanases

As β -1,3-glucanases são enzimas capazes de hidrolisar β -1,3-glucanas (Figura 6), polímero presente na parede celular de fungos e em algumas células de plantas. Por este fato, as β -1,3-glucanases são conhecidas como exemplares de enzimas líticas, capazes de causarem a lise de paredes celulares fúngicas (FLEURI; SATO, 2005; PEREIRA; MARTINS, 2016). As β -1,3-glucanases estão distribuídas entre fungos e leveduras, apresentando importantes papéis fisiológicos em processos de diferenciação de parede celular (Giese et al., 2011). De acordo com o modo de ação, as β -1,3-glucanases podem ser classificadas como endoglucanases (EC 3.2.1.39) ou exoglucanases (EC 3.2.1.58) (Viterbo et al., 2004; Pereira et al.,

cavitação, a formação de radicais livres, além de outros efeitos mecânicos e químicos (CHISTI, 2003). A cavitação está relacionada com a conversão de energia elétrica em vibração física, o que diretamente influencia o meio no qual o US está sendo aplicado, liberando alta quantidade de energia neste meio (NAVEENA; ARMSHAW; PEMBROKE, 2015). Durante a cavitação, microbolhas se formam em diferentes sítios de nucleação dentro do fluido e crescem durante a fase de rarefação da onda sonora. Quando a onda atinge a fase de descompressão, estas bolhas colapsam e implodem, liberando uma violenta onda de choque que se propaga através do meio (CHISTI, 2003).

A aplicação de US pode ocorrer de duas formas, isto é, diretamente ou indiretamente. No caso de aplicação direta, o transdutor está em contato direto com o meio de reação, enquanto que na aplicação indireta o transdutor não transfere a onda diretamente ao meio, tendo esta que percorrer um primeiro meio (água ou até mesmo a parede do reator) antes de atingir a amostra ou meio de reação (SANCHETI; GOGATE, 2017). Banhos ultrassônicos costumam ser utilizados como configuração de aplicação indireta de US, uma vez que os transdutores estão fixados na parede ou no fundo do banho (SANCHETI; GOGATE, 2017). Neste caso a amostra é colocada em um recipiente e este imerso no banho preenchido com água. Biorreatores com configuração de sonicação indireta e direta (Sonobiorreatores) já foram descritos por alguns autores (CHISTI, 2003; SANCHETI; GOGATE, 2017). A aplicação de US direta é feita através da utilização de sondas, os chamados sonotrodos. Nesta configuração, o sonotrodo é imerso no meio reacional e a sonicação aplicada através da ponta deste. O formato e a área superficial da ponta do sonotrodo podem modificar a atividade cavitacional e a quantidade de energia transferida ao meio (SANCHETI; GOGATE, 2017). A Figura 7 traz representações de sono biorreatores com aplicação direta e indireta de US.

Figura 7 – Sonobiorreatores com diferentes configurações para aplicação de US. (a) Uso de sonotrodo para aplicação direta de US. (b) Sonobiorreator com transdutor acoplado para sonicação direta. (c) Biorreator imerso em banho ultrassônico para sonicação indireta



Fonte: Adaptado de Chisti (2003).

O US vem sendo utilizado há anos em diferentes aplicações biotecnológicas (ROKHINA; LENS; VIRKUTYTE, 2009). Ele pode ser utilizado com o propósito de extração de compostos intracelulares, uma vez que pode promover o rompimento das células microbianas ou até mesmo a permeabilização da parede celular (NAVEENA; ARMSHAW; PEMBROKE, 2015). Também pode ser aplicado na produção de biocombustíveis, acelerando o processo de transesterificação durante a produção de biodiesel (KALVA; SIVASANKAR; MOHOLKAR, 2009). O uso de US também mostrou influenciar a cinética e tempo de reação de reações de esterificação (DESHMANE; GOGATE; PANDIT, 2008). Durante reações enzimáticas, esta tecnologia mostrou a capacidade de aumentar a atividade da enzima em uso, reduzindo, desta forma, o tempo total do processo (SOUZA et al., 2013). US também pode ser utilizado para aumentar a produtividade de alguns processos fermentativos, como já mostrado por alguns autores (SUN; MA; WANG, 2017; TIZAZU; ROY; MOHOLKAR, 2018; YAO et al., 2014). Além do já citado, o uso de US pode alterar a morfologia e produção metabólica de fungos filamentosos (HERRÁN et al., 2008).

Os fatores responsáveis por estes resultados obtidos da aplicação de US em bioprocessos ainda não são muito claros, embora a transferência de massa gás-líquido e líquido-sólido aprimorada possa ter um papel importante (HERRÁN et al., 2008). Alguns mecanismos de ação sugeridos para o US são: aumento da permeabilidade da membrana celular, aumento da solubilidade de compostos pouco solúveis e melhoria da transferência de massa de através da parede celular (KWIATKOWSKA et al., 2011). Quando o transporte de

nutrientes através da parede celular é melhorado, a produção de metabólitos também é favorecida (SUN; MA; WANG, 2017).

3.4.1 Efeito do Ultrassom em enzimas

A crescente importância que as enzimas vêm tendo nos mais diversos processos industriais tem instigado a busca por formas mais rentáveis de produção destes biocatalisadores (ROKHINA; LENS; VIRKUTYTE, 2009). Alguns trabalhos mostram aplicação de US a fim de estimular a produção de enzimas microbianas (AVHAD; RATHOD, 2014, 2015; PAWAR; RATHOD, 2018; WANG et al., 2013). De acordo com Hoshino, Kawasaki e Okahata (2006), a sonicação pode perturbar ciclos e regiões de domínio das enzimas, afetando, desta forma, sua atividade. Esta alteração ocorre devido à perturbação dinâmica causada pela onda sonora (HOSHINO; KAWASAKI; OKAHATA, 2006). A tolerância das enzimas ao US pode depender da localização destas dentro da célula onde são produzidas e do seu peso molecular (ROKHINA; LENS; VIRKUTYTE, 2009).

Apesar dos estudos já existentes, pouco se sabe a respeito do real efeito do US sobre as enzimas, uma vez que resultados contraditórios de ativação e desativação de enzimas foram obtidos em diferentes trabalhos citados por Rokhina, Lens e Virkutyte (2009). Nos casos de desativação, algumas explicações são: a rápida formação e colapso das bolhas de cavitação pode causar inativação parcial ou total da atividade enzimática (SHIFERAW TEREFE; BUCKOW; VERSTEEG, 2015). Além disso, os radicais livres formados através da sonólise da água podem reagir com os aminoácidos da estrutura enzimática e afetar sua atividade e função catalítica (BARTERI et al., 2004; SHIFERAW TEREFE; BUCKOW; VERSTEEG, 2015). Contrariamente, em certos casos o US pode aumentar a atividade de uma certa enzima, dependendo dos parâmetros (intensidade, tempo de processo, etc.) aplicados (SOUZA et al., 2013). Vários trabalhos trazem o aumento da produção enzimática obtido com a aplicação de US durante a fermentação, tanto de forma direta quanto indireta (Tabela 1).

Tabela 1 – Trabalhos da literatura aplicando US na produção de enzimas

Enzima	Modo de aplicação	Parâmetros do US				Atividade controle (sem US)	Atividade tratamento (com US)	Referência
		Potência (W)	Frequência (kHz)	Tempo	Ciclo (%)			
Invertase	Direto	Abaixo de 40	20	8 min	100	84,05 U	179,17 U	Vargas et al., 2004
Lacase	Indireto	120	40	5 min 12h de intervalo	50	527,16 U.mL ⁻¹	588,9 U.mL ⁻¹	Wang et al., 2013
Protease	Indireto	160	25	5 min	20	110 U.mL ⁻¹	201 U.mL ⁻¹	Avhad e Rathod, 2014
Uricase e Protease	Indireto	60	25	15 min	40	0,434 U.mL ⁻¹ 0,308 U.mL ⁻¹	0,825 U.mL ⁻¹ 0,646 U.mL ⁻¹	Pawar e Rathod, 2018

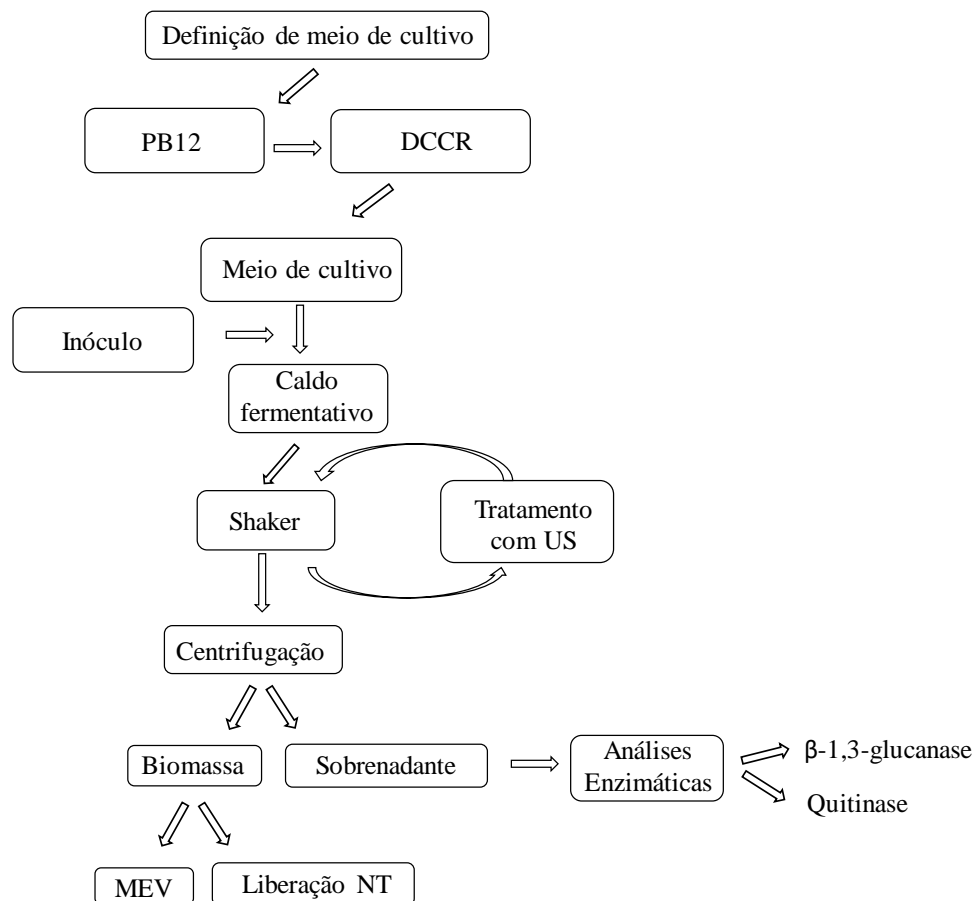
Apesar de o processo de estímulo de atividade enzimática pelo US ainda não ser bem entendido, um aumento na taxa de transferência de massa dos reagentes para os sítios ativos da enzima parece ser um fator importante (GALVÁN-D'ALESSANDRO; CARCIOCHI, 2018). Pelo previamente exposto, percebe-se que o efeito do US é específico para cada enzima, sendo a ativação ou desativação enzimática dependente dos parâmetros utilizados para a aplicação do US, como, por exemplo, a potência, duração do processo, temperatura, pressão, entre outras variáveis do meio.

Desta forma, a investigação dos efeitos da sonicação sobre a produção de enzimas como β -1,3-glucanase e quitinase torna-se importante na busca de obtenção de maiores atividades enzimáticas. A obtenção de caldos com atividades enzimáticas competitivas em menor tempo de cultivo favorece o desenvolvimento de bioprodutos baseados nestes compostos. No Brasil, atualmente, não existe produto à base de enzimas registrado para controle de doenças e pragas na agricultura. Uma razão para isso é a dificuldade em encontrar quitinases e β -1,3 glucanases comerciais a um preço competitivo, como é o caso de outras enzimas como lipases, proteases e amilases. O alto preço das quitinases e das β -1,3 glucanases está associado à baixa produção, mesmo com o uso de microrganismos recombinantes (STOYKOV; PAVLOV; KRASTANOV, 2015). As várias etapas de purificação também contribuem para aumentar o preço de venda dessas enzimas (SENA et al., 2011). Considerando o citado, desenvolver uma metodologia para obtenção de β -1,3 glucanases e quitinases com atividades enzimáticas competitivas é de suma importância para o desenvolvimento de produtos de controle biológico. É neste cenário que a intensificação da produção enzimática estimulada por US torna-se interessante.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção é apresentada a metodologia experimental empregada nos experimentos, bem como os materiais e reagentes utilizados ao longo do processo. Os experimentos foram conduzidos nas dependências do Laboratório de Bioprocessos do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria. A Figura 8 apresenta um fluxograma resumo dos experimentos realizados.

Figura 8 – Fluxograma dos experimentos realizados



PB12: Plackett-Burmann de 12 ensaios; DCCR: Delineamento Composto Central Rotacional; MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura; NT: Nitrogênio Total.

Fonte: Autora.

4.1 ARMAZENAMENTO E MANUTENÇÃO DO FUNGO

O microrganismo *Beauveria bassiana* IBCB 66 foi cedido pelo Instituto Biológico do Estado de São Paulo e, inicialmente, mantido em placas de Petri com meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA). Posteriormente, o microrganismo foi repicado para tubos com meio BDA inclinado. Os tubos foram armazenados em estufa B.O.D. a 28°C por 10 dias, seguindo para a geladeira até o momento de uso. Todos os materiais e meios de cultura utilizados nesta etapa de propagação do microrganismo foram devidamente esterilizados em autoclave a 120 °C e 1,1 atm por 20 min.

4.2 PREPARO DO INÓCULO

Para o preparo do inóculo, um tubo contendo o fungo foi transferido para a estufa B.O.D. a 28 °C por 24h, a fim de reativar o microrganismo. Após este período, os esporos do fungo foram raspados com o auxílio de uma alça de platina para um erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio Batata-Dextrose (BD) previamente esterilizado a 120 °C e 1 atm por 20 min. O caldo obtido foi suplementado com 2 g de dextrose anidra. O conjunto de esporos e meio BD foi incubado em um agitador orbital (New Brunswick, modelo Innova 44) por 72h a 28°C e 150 rpm. Todos os materiais utilizados nestas etapas foram esterilizados em autoclave a 120 °C e 1,1 atm por 20 min.

4.3 INOCULAÇÃO E FERMENTAÇÃO

Após o crescimento do inóculo, 90 mL de meio de cultura já esterilizados foram inoculados com 10 mL de inóculo a uma concentração de 1.10^7 esporos.mL⁻¹, totalizando uma concentração inicial de 1.10^6 esporos.mL⁻¹ no meio de fermentação. O processo fermentativo foi conduzido em agitador orbital (New Brunswick, modelo Innova 44) a 28 °C e 150 rpm. O caldo obtido da fermentação foi separado da biomassa por centrifugação a 4000 rpm por 10 min.

4.4 PRODUÇÃO DE β -1,3-GLUCANASE E QUITINASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

O processo escolhido para a produção das enzimas de interesse foi a fermentação submersa. Foram testadas diferentes fontes de carbono (produtos agroindustriais) para enriquecer o meio de cultivo, além de sacarose. Os experimentos para suplementação do meio são descritos a seguir.

O meio de cultivo utilizado foi composto por $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), KH_2PO_4 (2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), KCl (0,5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). Foram realizados dois planejamentos de experimentos a fim de suplementar o meio de cultivo com diferentes fontes de carbono.

4.4.1 Planejamento Plackett-Burman

O primeiro planejamento realizado foi do tipo Plackett-Burman com doze ensaios (PB12) mais três pontos centrais. O objetivo deste planejamento foi estudar a influência de 5 variáveis no processo de produção de quitinase, β -1,3-glucanase e esporos. As variáveis estudadas foram: Concentração de Sacarose (S), Farelo de Soja (FS), Farelo de Arroz (FA), Resíduo de Malte (M) e pH do meio de cultivo. A matriz do planejamento está apresentada na Tabela 2. As respostas analisadas foram atividade enzimática de β -1,3-glucanase e quitinase ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$) e número de esporos por mililitro obtidos após 3 dias de cultivo.

Tabela 2 – Matriz do Plackett-Burman com variáveis codificadas e reais (entre parêntesis)

Ensaio	S (g.L ⁻¹)	FS (g.L ⁻¹)	FA (g.L ⁻¹)	M (g.L ⁻¹)	pH
1	1 (30)	-1 (0)	1 (10)	-1 (0)	-1 (5,5)
2	1 (30)	1 (10)	-1 (0)	1 (10)	-1 (5,5)
3	-1 (10)	1 (10)	1 (10)	-1 (0)	1 (7,5)
4	1 (30)	-1 (0)	1 (10)	1 (10)	-1 (5,5)
5	1 (30)	1 (10)	-1 (0)	1 (10)	1 (7,5)
6	1 (30)	1 (10)	1 (10)	-1 (0)	1 (7,5)
7	-1 (10)	1 (10)	1 (10)	1 (10)	-1 (5,5)
8	-1 (10)	-1 (0)	1 (10)	1 (10)	1 (7,5)
9	-1 (10)	-1 (0)	-1 (0)	1 (10)	1 (7,5)
10	1 (30)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (7,5)
11	-1 (10)	1 (10)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (5,5)
12	-1 (10)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (5,5)
13	0 (20)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (6,5)
14	0 (20)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (6,5)
15	0 (20)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (6,5)

S: Sacarose; FS: Farelo de Soja; FA: Farelo de Arroz; M: Resíduo de Malte.

4.4.2 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

A partir da análise dos efeitos das variáveis pelo planejamento Plackett-Burman, optou-se por realizar um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) do tipo 2² a fim de otimizar o meio de cultivo. Fixou-se a concentração de FS em 5 g.L⁻¹, pH em 5,5 e eliminou-se o resíduo de malte do processo. As variáveis analisadas foram as concentrações de S e de FA. A Tabela 3 mostra a matriz do planejamento DCCR com as variáveis reais e codificadas. As variáveis resposta novamente foram as atividades enzimáticas de β -1,3-glucanase e quitinase (U.mL⁻¹) e número de esporos por mililitro obtidos após 3 dias de cultivo.

Tabela 3 – Matriz do DCCR com variáveis codificadas e reais (entre parêntesis)

Ensaio	S (g.L ⁻¹)	FA (g.L ⁻¹)
1	-1 (20)	-1 (5)
2	1 (50)	-1 (5)
3	-1 (20)	1 (15)
4	1 (50)	1 (15)
5	-1,41 (13,85)	0 (10)
6	1,41 (56,15)	0 (10)
7	0 (35)	-1,41 (2,95)
8	0 (35)	1,41 (17,05)
9	0 (35)	0 (10)
10	0 (35)	0 (10)
11	0 (35)	0 (10)

S: Sacarose; FA: Farelo de Arroz.

Após a análise das atividades enzimáticas e concentração de esporos obtidos nos ensaios do DCCR, realizaram-se experimentos estudando diferentes concentrações de FA no meio, mantendo-se fixa a concentração de S em 50 g.L⁻¹, FS em 5 g.L⁻¹, e pH em 5,5. As concentrações de FA variaram de 5 a 55 g.L⁻¹. Nesta etapa todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.5 CINÉTICA ENZIMÁTICA

A fim de verificar o tempo ideal de cultivo para obter as melhores atividades enzimáticas foi realizada uma cinética enzimática por 72h. A cinética foi realizada com amostras não-destrutivas, com todos os pontos em duplicata. Foram avaliadas as atividades enzimáticas com 8, 12, 16, 20, 24, 36, 48, 60 e 72h de cultivo. O volume inicial dos Erlenmeyers foi de 100 mL, sendo retirados 2 mL de amostra em cada amostragem.

4.6 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

4.6.1 Determinação da atividade enzimática da β -1,3-glucanase

A determinação da atividade enzimática da β -1,3-glucanase foi realizada de acordo com a metodologia adaptada de Saeki et al., (1994). Solução de Laminarina (Sigma Aldrich,

São Paulo, Brasil) a 1% (m/v) em tampão acetato 50 mM, pH 5,0 foi utilizada como substrato para a determinação da atividade enzimática da β -1,3-glucanase. Para a reação, 250 μ L de solução de substrato foram misturados 200 μ L de tampão acetato e incubados a 45 °C até aclimatação. A seguir, 50 μ L de amostra foram adicionados e a reação foi incubada por 30 min, sendo interrompida por imersão dos tubos em banho de gelo. A quantificação da glicose resultante da reação enzimática foi realizada através do método do ácido dinitrosalicílico (DNS), segundo Miller (1959), utilizando uma curva de glicose (0 a 1,0 g.L⁻¹) como padrão. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de glicose por mililitro de amostra, por minuto de reação.

Para cada amostra foi realizado um tubo de branco, em que o substrato foi substituído por tampão, a fim de identificar a quantidade de açúcar redutor previamente presente na amostra. Para cada enzima foi realizado um tubo de branco do substrato, em que a amostra foi substituída por tampão acetato, a fim de verificar a presença ou liberação de açúcar redutor pelo substrato utilizado. Para o cálculo das atividades enzimáticas, as leituras dos brancos eram descontadas da leitura da amostra.

4.6.2 Determinação da atividade enzimática da quitinase

A determinação da atividade enzimática da quitinase foi realizada conforme à metodologia de Kim, Yang e Kim (2003). A quitina coloidal foi preparada a partir da dissolução de 20 g de quitina de caranguejo em 200 mL de HCl concentrado, sob agitação por 15 min a 40 °C (KANG; PARK; LEE, 1999). A quitina foi precipitada como suspensão coloidal com a adição lenta de 2 L de água gelada. A recuperação do produto foi realizada a partir da filtração a vácuo da suspensão em papel filtro qualitativo. O material obtido foi lavado com água destilada até que o filtrado atingisse pH 5,0. A quitina foi submetida a secagem a 60 °C por 24h e, em seguida, armazenada a 4 °C.

Para a reação enzimática, em tubos falcon de 15 mL, 500 μ L de solução 1% de quitina coloidal em tampão acetato 50 mM pH 5,0 foram misturados com 400 μ L de tampão acetato e incubados a 37 °C até aclimatação. Em seguida, 100 μ L de caldo fermentativo foram adicionados. A reação foi incubada por 30 min e interrompida em banho de gelo. Para a quantificação do teor de açúcar redutor liberado na reação, uma alíquota de 500 μ L foi retirada do tubo e submetida ao método do DNS (MILLER, 1959) utilizando uma curva de N-acetilglucosamina (0 a 1,0 g.L⁻¹) como padrão. Uma unidade de atividade enzimática foi

definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de N-acetilglucosamina por mililitro de amostra, por minuto de reação.

Para cada amostra foi realizado um tubo de branco, em que o substrato foi substituído por tampão, a fim de identificar a quantidade de açúcar redutor previamente presente na amostra. Para cada enzima foi realizado um tubo de branco do substrato, em que a amostra foi substituída por tampão acetato, a fim de verificar a presença ou liberação de açúcar redutor pelo substrato utilizado. Para o cálculo das atividades enzimáticas, as leituras dos brancos eram descontadas da leitura da amostra.

4.6.3 Quantificação de açúcares redutores pelo método DNS

Para a quantificação de açúcares redutores liberados nas reações enzimáticas, seguiu-se a metodologia proposta por Maldonado, Carvalho e Ferreira (2013). Para tal, 500 μL de meio reacional foram misturados a 500 μL de reagente DNS e levados a 100 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min. A reação foi finalizada por imersão dos tubos em banho de gelo. A cada tubo foram acrescentados 8 mL de solução 1,51% (m/v) de Tartarato duplo de Sódio e Potássio. Os tubos foram submetidos a leitura em espectrofotômetro (Shimadzu UV-2600) a 540 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de açúcar redutor (g.L^{-1}) liberado a partir de curvas padrão construídas de 0-1,0 g.L^{-1} de açúcar redutor (glicose ou n-acetilglucosamina).

4.7 CONTAGEM DE ESPOROS

As contagens dos esporos produzidos foram realizadas em Câmara de Neubauer. Para tal, coletou-se 1 mL de amostra de cada tratamento e a isso adicionaram-se 10 μL de Tween 80 (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), seguido de agitação em vortex para desprendimento dos esporos. A amostra foi então passada através de uma gaze a fim de retirar as hifas do meio de contagem. Quando necessário, as amostras foram diluídas com água destilada estéril para facilitar a contagem. Os resultados da produção de esporos são expressos em esporos. mL^{-1} .

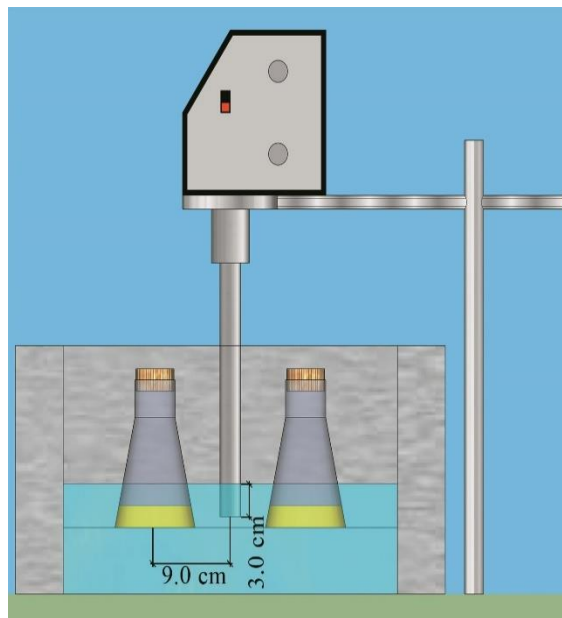
4.8 APLICAÇÃO DE ULTRASSOM

Para a aplicação de US durante as fermentações foi utilizado o processador ultrassônico UP400S (Hielscher Ultrasonics GmbH) com o sonotrodo H22 (Hielscher

Ultrasonics GmbH), cujo diâmetro é de 22 mm. A potência máxima fornecida pelo processador com este sonotrodo em meio aquoso é de 300 W, com frequência de funcionamento de 24 kHz.

A sonicação foi realizada dispondo os erlenmeyers de forma equidistante (9 cm) da sonda ultrassônica em um banho agitado (NewBrunswick, modelo Innova 3100) a 150 rpm com temperatura controlada e mantida em 28 °C. O banho foi preenchido com 16 L de água destilada e a sonda teve 3 cm de sua extremidade submersa. A Figura 9 mostra o aparato experimental utilizado.

Figura 9 – Aparato experimental utilizado para sonicação durante a fermentação



Fonte: Autora

Optou-se por realizar a estratégia de estudo de uma variável por vez a fim de identificar a melhor condição que estimulasse a produção enzimática. Foram avaliados diferentes momentos de aplicação de US, potências de aplicação, além de diferentes tempos e ciclos de trabalho. O ciclo de trabalho está relacionado com o tempo ON/OFF em que a sonicação é aplicada. Um ciclo de $0,5 \text{ s.s}^{-1}$ resulta em um tempo de sonicação de 0,5 segundos a cada segundo e também pode ser expresso como ciclo de 50%.

Após a sonicação, os erlenmeyers foram devolvidos ao shaker e incubados até 48 h. Amostras de 2 mL foram retiradas nos tempos de 8, 12, 16, 20, 24, 36 e 48h de cultivo e

submetidas a análises enzimáticas. Um cultivo controle – sem aplicação de US – foi realizado a fim de comparações dos resultados.

4.8.1 Estudo do momento de aplicação de ultrassom

Para encontrar o momento ideal de aplicação do US na fermentação, ou seja, o momento em que a produção enzimática fosse maior, foram realizados ensaios aplicando sonicação por 20 min com potência de 195 W e ciclo de trabalho de $0,3 \text{ s.s}^{-1}$ em diferentes momentos de cultivo (8h, 12h, 16h, 20h e 24h). Após a sonicação, os erlenmeyers foram devolvidos ao shaker e incubados até 48h de fermentação. Amostras foram retiradas periodicamente para análises.

4.8.2 Estudo do tempo de aplicação de ultrassom

Para avaliar a influência do tempo de aplicação do US na fermentação foram realizados ensaios aplicando sonicação por 5, 10, 15, 20 e 30 min com potência de 195 W e ciclo de trabalho de $0,3 \text{ s.s}^{-1}$ em 24h de fermentação. Após a sonicação, os erlenmeyers foram devolvidos ao shaker e incubados até 48h de fermentação, sendo retiradas amostras com 36h e 48h para análises enzimáticas.

4.8.3 Estudo da potência de aplicação de ultrassom

A fim de encontrar a potência que melhor estimulasse a produção enzimática, foram conduzidos ensaios aplicando sonicação por 5 min com potência de 135, 165, 195 e 225 W e ciclo de trabalho de $0,3 \text{ s.s}^{-1}$ em 24h de fermentação. Após a sonicação, os erlenmeyers foram devolvidos ao shaker e incubados até 48h de fermentação, sendo retiradas amostras com 36h e 48h para análises enzimáticas.

4.8.4 Estudo do ciclo de trabalho do ultrassom

Para avaliar o ciclo de trabalho, foram realizados ensaios aplicando sonicação por 5 min com potência de 195 W e ciclo de trabalho de 0,2; 0,3; 0,4 e $0,5 \text{ s.s}^{-1}$ em 24h de fermentação. Após a sonicação, os erlenmeyers foram devolvidos ao shaker e incubados até 48h de fermentação, sendo retiradas amostras com 36h e 48h para análises enzimáticas.

4.8.5 Estudo de múltiplas aplicações de ultrassom

A fim de avaliar os efeitos de múltiplos tratamentos com ultrassom na produção de quitinase e β -1,3-glucanase foram aplicados tratamentos em intervalos de 12 ou 24h nas condições de potência de 195 W, tempo de 5 min e ciclo de 0,5 s.s⁻¹. Amostras foram retiradas e avaliadas no tempo de 60h.

4.9 ANÁLISES PARA AVALIAÇÃO DAS CONSEQUÊNCIAS DO ULTRASSOM NA BIOMASSA

Para os experimentos envolvendo a utilização da biomassa especificamente, o preparo do meio foi realizado utilizando caldo de FA e FS presentes na constituição do mesmo. A utilização dos farelos ocasionaria problemas na quantificação da biomassa e possíveis interferências nas análises seguintes. Para o preparo dos caldos, 35 g de FA e 5 g de FS foram autoclavados em água a 121 °C e 1,1 atm por 10 min. Posteriormente, foram filtrados a vácuo utilizando algodão como meio filtrante. Estes caldos serviram de base para o preparo do meio de cultivo.

4.9.1 Cinética de crescimento microbiano

A cinética de crescimento foi realizada coletando-se amostras tanto do meio de cultivo da fermentação convencional quanto da melhor condição de US encontrada. As amostras foram retiradas nos tempos de 24, 36 e 48h de cultivo, submetidas a centrifugação a 4000 rpm por 10 min e então colocadas em estufa a 105 °C por 24h para determinação da massa seca.

4.9.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras de biomassa obtidas a partir da fermentação convencional e da melhor condição de sonicação foram separadas do meio de cultivo por filtração a vácuo em papel filtro qualitativo, congeladas e liofilizadas. Foram coletadas amostras nos tempos de 24, 36 e 48h de cultivo. As amostras liofilizadas foram submetidas a análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (VEGA-3G, TESCAN, República Tcheca) a fim de encontrar possíveis consequências da atuação do US na biomassa microbiana. Antes da análise, as

amostras foram metalizadas com revestimento de ouro (metalização por pulverização em atmosfera de argônio, usando uma corrente elétrica de 20 mA por 90 segundos).

4.9.3 Estudo do estímulo de liberação de nitrogênio total (NT) e carbono orgânico total (TOC) pela biomassa por sonicação

A fim de investigar se a aplicação de US causa ou não influência na liberação de proteínas (neste caso, enzimas) pela célula para o meio externo, experimentos foram conduzidos utilizando a biomassa liofilizada de um cultivo controle (sem aplicação de US). Para tal, foi pesado 1 g de biomassa liofilizada e adicionado em um erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de água destilada estéril. Este conjunto de água + biomassa foi submetido ao tratamento de US por 5 min, com potência de 195 W e ciclo de trabalho de 0,5 s.s⁻¹ em banho termostático agitado a 150 rpm e 28 °C. Após a sonicação, os erlenmeyers foram mantidos em agitação a temperatura controlada. Amostras foram retiradas antes da sonicação, imediatamente após e 1h após a sonicação. Foram avaliados os teores de nitrogênio total, carbono orgânico total e atividades enzimáticas no sobrenadante.

Para a quantificação do teor de nitrogênio e carbono presente no sobrenadante, as amostras foram centrifugadas e filtradas em membrana de nylon com poro de 0,22 µm (Durapore Membrane Filters) e submetidas às análises em equipamento medidor de TOC e TN (Shimadzu TOC TNM-L ROHS).

Além dos teores de nitrogênio e carbono orgânico totais, foram avaliadas as atividades enzimáticas (β-1,3-glucanase e quitinase) dos sobrenadantes das amostras, a fim de verificar se o teor de nitrogênio e carbono liberados poderiam, de fato, ser associados à liberação de enzimas pela célula.

4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados dos experimentos do PB12 e DCCR foram submetidos à ANOVA com nível de significância de 90% e 95%, respectivamente, utilizando o software Statistica (Statsoft 8.0). Os resultados obtidos nos ensaios com US foram submetidos ao teste de Tukey a um nível de significância de 95% utilizando o software Statistica (Statsoft 8.0).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO

A Tabela 4 mostra os resultados do PB12 para as atividades enzimáticas de β -1,3-glucanase e quitinase (U.mL^{-1}) e produção de esporos (esporos.mL^{-1}). O fungo foi capaz de produzir as enzimas de interesse na maioria dos ensaios (exceto nos ensaios 11 e 12, onde não houve produção de quitinase e β -1,3-glucanase, respectivamente). Também é notável que a composição do meio de fermentação afeta diretamente as atividades enzimáticas e a produção de esporos. A atividade da β -1,3-glucanase variou de 0 U.mL^{-1} (ensaio 12) a $2,24 \text{ U.mL}^{-1}$ (ensaio 3). A atividade da quitinase variou de 0 U.mL^{-1} (ensaio 11) a $1,43 \text{ U.mL}^{-1}$ (ensaio 10), enquanto a produção de esporos variou de $0,05 \times 10^7 \text{ esporos.mL}^{-1}$ (ensaio 10) a $4,65 \times 10^7 \text{ esporos.mL}^{-1}$ (ensaio 2).

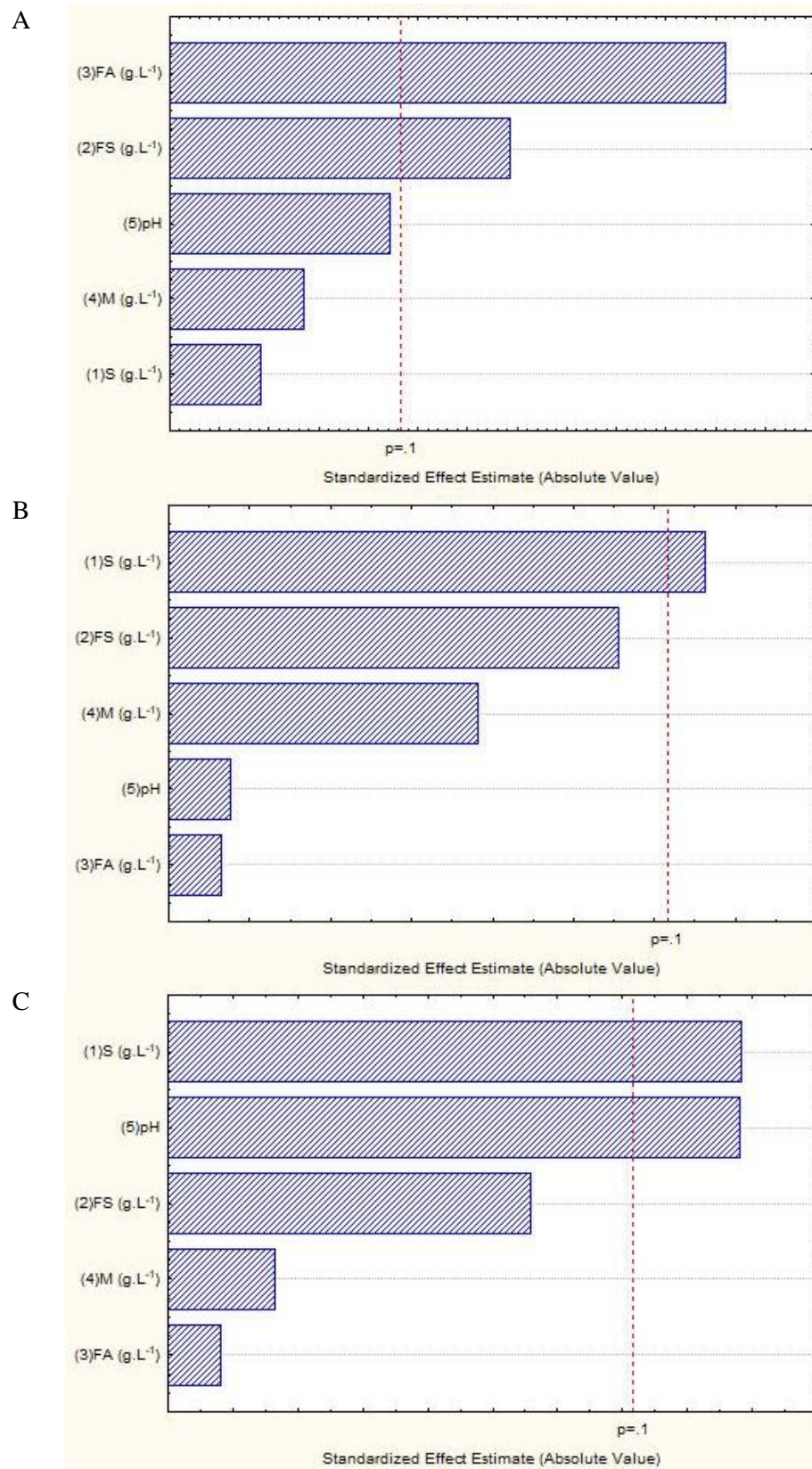
Os resultados obtidos no delineamento experimental PB12 foram submetidos à análise estatística ao nível de significância de 90%. Os efeitos estimados das variáveis independentes sobre as atividades enzimáticas de β -1,3-glucanase e quitinase e produção de esporos são apresentados na Figura 10. Para a atividade enzimática da β -1,3-glucanase, o FS e o FA tiveram efeito positivo significativo ($p < 0,1$), que significa que um aumento na quantidade desses componentes no meio de fermentação leva a uma maior atividade enzimática da β -1,3-glucanase. Apesar de serem fontes de carbono, o FS e o FA são resíduos agroindustriais ricos em nitrogênio, sendo interessantes para a suplementação de meios fermentativos (RAVINDRAN et al., 2018). O uso de resíduos agroindustriais em processos fermentativos para produção de enzimas tem sido relatado em vários trabalhos (AITA et al., 2019; IRSHAD; ANWAR; AFROZ, 2012; LEITE et al., 2019; ONG; RANJANDAS; CHEW, 2015; RAVINDRAN et al., 2018; SALSABILLA et al., 2018; YANG et al., 2015). A influência do nitrogênio na produção de β -1,3-glucanase fúngica foi previamente avaliada por Copa-Patiño et al., (1987), Helmy et al., (2010), Salsabilla et al., (2018), Tweddell, Jabaji-Hare e Charest (1994) e Yang et al., (2015) e mostrou-se relevante para o processo. Além disso, alguns trabalhos estudaram a aplicação de resíduos agroindustriais nos processos de fermentação em estado sólido (AITA et al., 2019; ALVES et al., 2020; IRSHAD; ANWAR; AFROZ, 2012; YANG et al., 2015) e líquido (TANG et al., 2004) para a produção de β -1,3-glucanase. Neste estudo, os resultados indicam que faixas com maiores valores de concentração de FS e FA levam a maior produção de β -1,3-glucanase, indicando que um maior teor de nitrogênio seria mais adequado ao processo.

Tabela 4 – Matriz do PB12 (valores reais e codificados) com as respostas de atividades enzimáticas de β -1,3-glucanase e quitinase e produção de esporos

Ensaio	S (g.L ⁻¹)	FS (g.L ⁻¹)	FA (g.L ⁻¹)	M (g.L ⁻¹)	pH	β -1,3-glucanase (U.mL ⁻¹)	Quitinase (U.mL ⁻¹)	Esporos.mL ⁻¹ x 10 ⁷
1	1 (30)	-1 (0)	1 (10)	-1 (0)	-1 (5,5)	1,13	0,37	2,37
2	1 (30)	1 (10)	-1 (0)	1 (10)	-1 (5,5)	1,06	0,07	4,65
3	-1 (10)	1 (10)	1 (10)	-1 (0)	1 (7,5)	2,24	0,01	1,30
4	1 (30)	-1 (0)	1 (10)	1 (10)	-1 (5,5)	1,65	0,26	1,85
5	1 (30)	1 (10)	-1 (0)	1 (10)	1 (7,5)	0,98	0,03	0,41
6	1 (30)	1 (10)	1 (10)	-1 (0)	1 (7,5)	1,92	0,08	1,55
7	-1 (10)	1 (10)	1 (10)	1 (10)	-1 (5,5)	1,72	0,04	1,12
8	-1 (10)	-1 (0)	1 (10)	1 (10)	1 (7,5)	1,60	0,01	0,08
9	-1 (10)	-1 (0)	-1 (0)	1 (10)	1 (7,5)	1,08	0,03	0,43
10	1 (30)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (7,5)	0,71	1,43	0,05
11	-1 (10)	1 (10)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (5,5)	1,23	0,00	0,8
12	-1 (10)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (5,5)	0,00	0,03	0,09
13	0 (20)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (6,5)	0,96	0,01	1,29
14	0 (20)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (6,5)	1,08	0,03	1,15
15	0 (20)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (6,5)	1,01	0,01	1,48

S: Sacarose; FS: Farelo de soja; FA: Farelo de arroz; M: Resíduo de malte.

Figura 10 – Gráfico de Pareto das variáveis respostas do PB12: (A) β -1,3-gluconase; (B) Quitinase; (C) Esporos



S: Sacarose; FS: Farelo de Soja; FA: Farelo de Arroz; M: Resíduo de Malte.

Para a atividade enzimática da quitinase, apenas a concentração de S teve efeito significativo ($p < 0,1$), sendo este positivo, ou seja, o aumento da concentração de S no meio de cultura levou a maior atividade enzimática da quitinase. De acordo com o resultado obtido, seria necessária uma quantidade maior de carbono para aumentar a produção de quitinase por *B. bassiana*. Kim et al., (2011) estudaram o uso de diferentes fontes de carbono para a produção de quitinase por *B. bassiana* SFB-205. O amido solúvel proporcionou a melhor produção da enzima, enquanto a sacarose não foi interessante para esse fim. No entanto, no presente estudo, a sacarose aliada a resíduos agroindustriais ricos em carbono e nitrogênio possibilitou resultados interessantes para esta enzima.

Para a produção de esporos, S e pH tiveram efeitos significativos ($p < 0,1$), sendo negativo e positivo, respectivamente. Maior concentração de S favoreceu a produção de esporos, enquanto um pH mais alto teve efeito prejudicial. Lohse et al., (2014) estudaram diferentes fontes de carbono para esporulação de *B. bassiana*. Entre as fontes testadas, o melão de beterraba foi a melhor opção para o objetivo na concentração de 5%, produzindo $1,17 \times 10^9$ esporos.mL⁻¹. Segundo o fabricante, essa fonte complexa de carbono consistia em 50% de sacarose, o que indica que neste estudo sacarose também foi uma fonte de carbono adequada para esporulação de *B. bassiana*. Um estudo de germinação de conídios de *B. bassiana* baseado em composição de meio de cultivo foi conduzido por Afandhi et al., (2012). A taxa de germinação aumentou 42,3% em relação ao controle quando o meio foi suplementado com 5% de sacarose, indicando que a sacarose pode atuar como indutor de esporulação. A sacarose também foi o melhor substrato para esporulação de *B. bassiana* no trabalho de Campbell et al., (1983). O efeito do pH sobre os esporos de *B. bassiana* foi avaliado por Ying e Feng, (2006). Eles concluíram que um pH entre 5-6 permitiu a produção de esporos termotolerantes, enquanto valores mais altos de pH foram prejudiciais.

Com base nos resultados obtidos pelo delineamento experimental PB12, novas faixas foram escolhidas para S e FA (Tabela 3) no DCCR, a fim de melhorar a produção de enzimas e esporos. O FS e o pH foram mantidos fixos em 5 g.L⁻¹ e 5,5, respectivamente. O FS foi fixado porque foi significativo apenas para a β -1,3-glucanase e a magnitude do seu efeito foi menor que do FA. O valor do pH foi fixado no ponto mais baixo com base no efeito negativo sobre a produção de esporos. O M foi excluído do processo, pois não apresentou efeito significativo para nenhuma variável estudada.

Os resultados obtidos no DCCR são apresentados na Tabela 5. Estes dados foram usados para estimar os coeficientes de um modelo quadrático para cada uma das respostas em função das variáveis independentes (Tabela 6). Os valores dos coeficientes podem ser usados

para avaliar o efeito das variáveis independentes sobre as respostas analisadas, uma vez que o valor do coeficiente representa o efeito da variável dividido por 2.

Tabela 5 – Matriz do DCCR (valores reais e codificados) e respostas atividades enzimáticas de β -1,3-glucanase e quitinase e produção de esporos

Ensaio	S (g.L ⁻¹)	FA (g.L ⁻¹)	β -1,3-glucanase (U.mL ⁻¹)	Quitinase (U.mL ⁻¹)	Esporos.mL ⁻¹ x 10 ⁷
1	-1 (20)	-1 (5)	1,60	0,12	1,34
2	1 (50)	-1 (5)	2,41	1,35	1,44
3	-1 (20)	1 (15)	1,65	0,12	2,80
4	1 (50)	1 (15)	2,21	1,22	7,20
5	-1,41 (13,85)	0 (10)	0,84	0,02	3,66
6	1,41 (56,15)	0 (10)	1,53	0,46	2,07
7	0 (35)	-1,41 (2,95)	2,29	0,88	0,57
8	0 (35)	1,41 (17,05)	2,41	0,66	4,81
9	0 (35)	0 (10)	2,21	0,39	1,82
10	0 (35)	0 (10)	2,16	0,56	2,29
11	0 (35)	0 (10)	1,94	0,62	1,92

S: Sacarose; FA: Farelo de Arroz.

Tabela 6 – Análise estatística dos efeitos das variáveis independentes sobre as variáveis dependentes do DCCR

Variáveis independentes.	β -1,3-glucanase (U.mL ⁻¹) R ² 0.93		Quitinase (U.mL ⁻¹) R ² 0.75		Esporos.mL ⁻¹ R ² 0.82	
	Coef.	p	Coef	p	Coef	p
Média	2,10	< 0,01	0,52	0,030	2,00 x 10 ⁷	0,030
S (L)	0,29	0,005	0,37	0,020	2,82 x 10 ⁶	0,510
S (Q)	-0,41	0,003	-0,09	0,510	5,35 x 10 ⁶	0,310
FA (L)	0,003	0,960	-0,05	0,630	1,65 x 10 ⁷	0,009
FA (Q)	0,17	0,070	0,18	0,230	4,46 x 10 ⁶	0,390
S FA	-0,06	0,520	-0,03	0,840	1,07 x 10 ⁷	0,110

S: Sacarose; FA: Farelo de Arroz.

Para a atividade enzimática da β -1,3-glucanase, o valor máximo obtido foi de 2,41 U.mL⁻¹ (ensaios 2 e 8) e o menor valor de 0,84 U.mL⁻¹ (ensaio 5). Para esta variável dependente, apenas S teve efeitos significativos, sendo o efeito linear (S (L)) positivo (valor de p = 0,005) e o efeito quadrático (S (Q)) negativo (valor de p = 0,003). O valor do

coeficiente de regressão (R^2) foi de 0,93, o que significa dizer que aproximadamente 93% da variabilidade pode ser explicada pelo modelo quadrático gerado com os coeficientes apresentados na Tabela 6.

A maior atividade enzimática da β -1,3-glucanase obtida ($2,41 \text{ U.mL}^{-1}$) é superior ao resultado encontrado por Chavan et al., (2017) usando *Myrothecium verrucaria* ($0,19 \text{ U.mL}^{-1}$) cultivado por 7 dias, Giese et al., (2011) com *Botryosphaeria rhodina* ($2,30 \text{ U.mL}^{-1}$) em 8 dias de fermentação e Sena et al., (2011) usando *Moniliophthora perniciosa* em cultivo submerso por 14 dias ($0,2026 \text{ U.mL}^{-1}$).

Para a produção de quitinase, o valor máximo obtido foi de $1,35 \text{ U.mL}^{-1}$ (ensaios 2) e o menor valor foi de $0,02 \text{ U.mL}^{-1}$ (ensaio 5). Para a atividade enzimática da quitinase apenas S (L) teve efeito significativo (valor de $p = 0,02$), sendo este positivo. O coeficiente de regressão (R^2) foi de 0,75, ou seja, aproximadamente 75% da variabilidade pode ser explicada pelo modelo gerado a partir dos coeficientes da Tabela 6.

O maior resultado obtido para a atividade enzimática da quitinase ($1,35 \text{ U.mL}^{-1}$) é promissor quando comparado ao obtido para Dhawan e Joshi, (2017) usando outra cepa de *B. bassiana* em 6 dias de fermentação ($0,65 \text{ U.mL}^{-1}$). Chavan et al., (2017) alcançaram uma atividade enzimática de quitinase de $1,7 \text{ U.mL}^{-1}$ usando *Myrothecium verrucaria* em 7 dias de cultivo.

A produção de esporos variou do maior valor de $7,20 \times 10^7$ (ensaio 4) ao menor de $0,57 \times 10^7$ (ensaio 7). Para a produção de esporos, o FA (L) teve um efeito positivo significativo (valor- $p = 0,009$), o que significa que um aumento na concentração de FA no meio de fermentação levou a uma maior produção de esporos. O coeficiente de regressão (R^2) foi de 0,82, ou seja, aproximadamente 82% da variabilidade pode ser explicada pelo modelo gerado a partir dos coeficientes da Tabela 6.

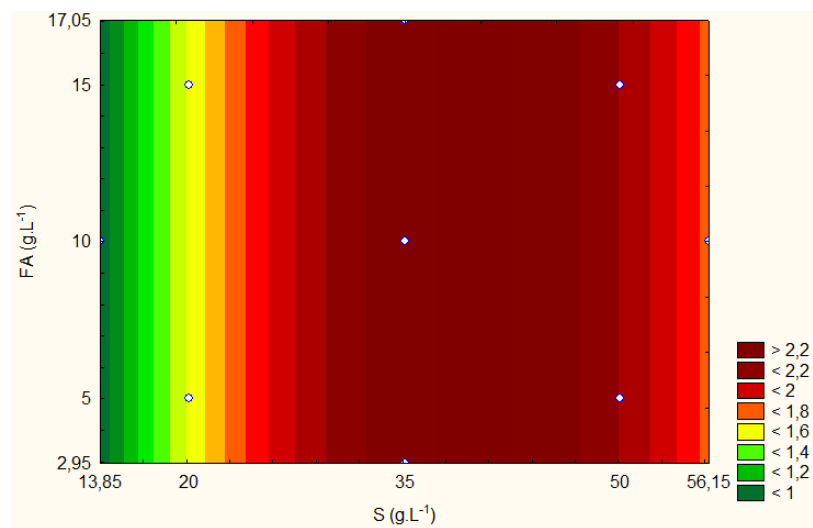
A análise de variância (ANOVA) foi realizada para validar os coeficientes dos modelos apresentados na Tabela 6. A validação permite as representações gráficas das variáveis independentes estudadas. Para a ANOVA, apenas os efeitos significativos foram considerados. A Tabela 7 mostra os resultados da ANOVA. Para todas as respostas, o F calculado (F_{calc}) foi pelo menos 2x maior que o F tabelado (F_{tab}), o que valida os coeficientes obtidos pela metodologia RSM e possibilita as representações gráficas (Figura 11). A construção da curva de contorno foi realizada apenas para a atividade de β -1,3-glucanase, pois nas demais respostas houve apenas uma variável significativa.

Tabela 7 – ANOVA das variáveis resposta do DCCR

		SQ	GL	QM	Fcalc	Ftab
β -1,3-glucanase	Reg.	2,01	2	1,01	23,54	4,46
	Res.	0,34	8	0,04		
	Total	2,36	10			
Quitinase	Reg.	1,09	1	1,09	12,30	5,11
	Res.	0,80	9	0,09		
	Total	1,89	10			
Esporos	Reg.	$2,19 \times 10^{15}$	1	$2,19 \times 10^{15}$	14,34	5,11
	Res.	$1,37 \times 10^{15}$	9	$1,52 \times 10^{14}$		
	Total	$3,56 \times 10^{15}$	10			

Reg: Regressão; Res: Resíduo; SQ: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; QM: Quadrado médio; Fcalc: F calculado; Ftab: F tabelado.

Figura 11 – Curva de contorno para otimização da atividade enzimática de β -1,3-glucanase por *Beauveria bassiana*



Os resultados obtidos pelo DCCR realizado mostram, ainda, um potencial de aumento para a produção de esporos de *B. bassiana* com o aumento da concentração de FA no meio. Os resultados dos experimentos adicionais realizados com diferentes concentrações de FA no meio, mantendo S, FS e pH fixos em 50 g.L^{-1} , $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ e 5,5, respectivamente, estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Atividades enzimáticas e produção de esporos variando a concentração de FA no meio de cultivo

Ensaio	FA (g.L ⁻¹)	β-1,3-glucanase (U.mL ⁻¹)	Quitinase (U.mL ⁻¹)	Esporos.mL ⁻¹ x 10 ⁷
1	5	1,86 ^a ± 0,077	1,83 ^a ± 0,18	4,63 ^b ± 0,53
2	15	1,56 ^b ± 0,049	0,92 ^{bc} ± 0,11	7,20 ^a ± 0,57
3	25	1,47 ^b ± 0,020	1,10 ^b ± 0,24	7,70 ^a ± 0,14
4	35	1,68 ^{ab} ± 0,051	1,47 ^{ab} ± 0,11	6,85 ^a ± 0,21
5	45	1,59 ^b ± 0,076	0,46 ^c ± 0,055	6,45 ^a ± 0,32
6	55	1,56 ^b ± 0,053	1,04 ^b ± 0,096	2,85 ^c ± 0,21

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

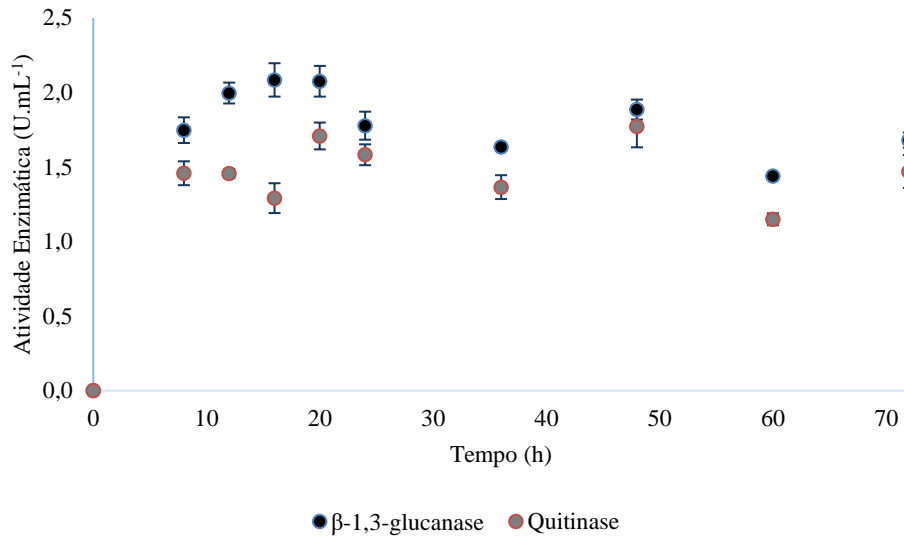
Analisando os resultados obtidos variando as concentrações de FA no meio fermentativo percebe-se que houve diferenças notáveis principalmente na produção de esporos fúngicos. A maior produção foi obtida quando o meio foi suplementado com FA a uma concentração de 25 g.L⁻¹. No entanto, a esta concentração de FA, a produção de β-1,3-glucanase (1,47 U.mL⁻¹) e quitinase (1,10 U.mL⁻¹) não foi tão favorecida. A fim de encontrar um meio termo para a produção enzimática e de esporos, optou-se por continuar os experimentos com a concentração de 35 g.L⁻¹ de FA.

Os experimentos para definição do meio de cultivo a ser utilizado para crescimento e produção enzimática de *B. bassiana* mostraram o quão sensível é o processo fermentativo, principalmente no que tange à produção de enzimas.

5.2 CINÉTICA ENZIMÁTICA

Os resultados obtidos na cinética enzimática realizada estão apresentados na Figura 12. Todos os ensaios foram feitos em duplicata.

Figura 12 – Cinética enzimática das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase. As barras de erros representam os desvios padrões de cada ponto



Os resultados mostram que a produção enzimática pelo fungo *B. bassiana* no meio de cultivo selecionado inicia cedo, sendo registrados valores comparáveis com os da literatura de atividades enzimáticas já em 8h de cultivo. Com base nesta cinética, o tempo de cultivo de 48h foi selecionado para os experimentos seguintes, uma vez que após este tempo ocorrem valores mais baixos para as atividades de ambas as enzimas. Além disso, em tempos de cultivo menores, a concentração de biomassa no meio de cultivo é baixa, o que indica pouco crescimento microbiano, conforme será apresentado na seção 5.4.1.

5.3 EFEITOS DA APLICAÇÃO DE US DURANTE A FERMENTAÇÃO

5.3.1 Efeito do US em diferentes estágios de crescimento

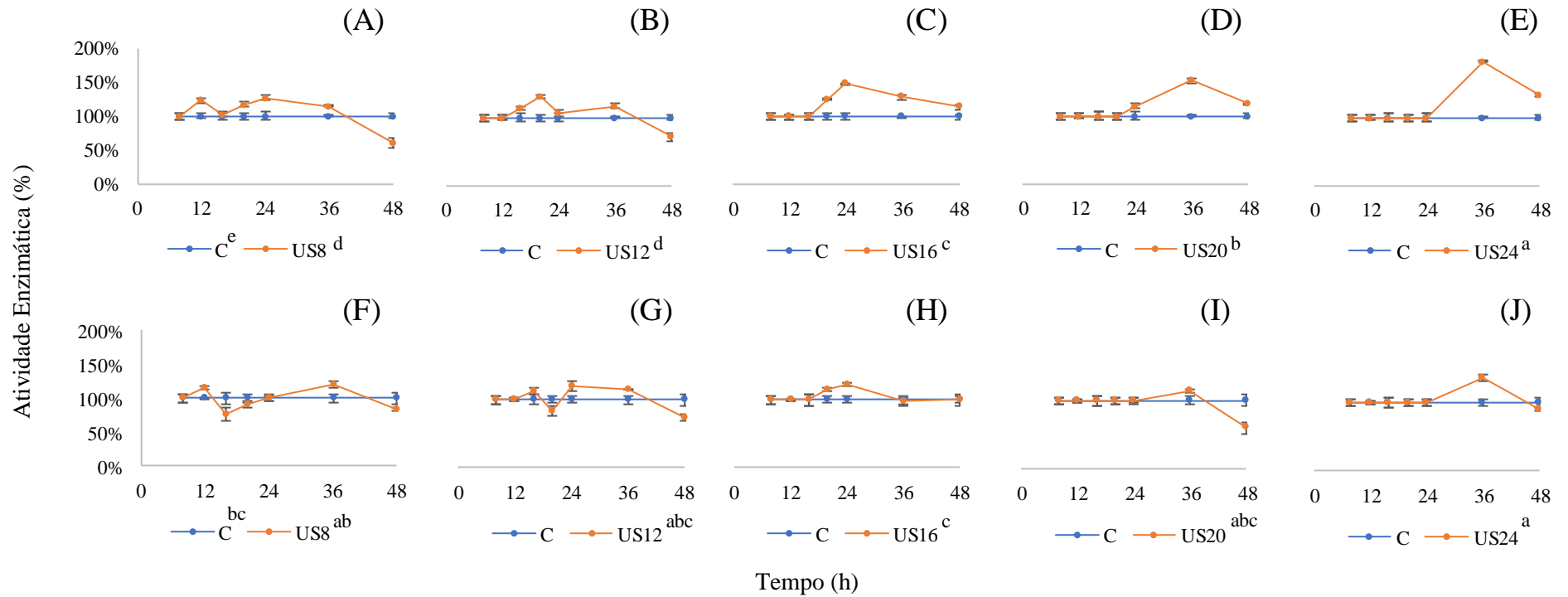
Os perfis de atividade enzimática para as enzimas β -1,3-glucanase e quitinase após sonicação, juntamente com o experimento controle, são mostrados na Figura 13. Para todos os estágios de crescimento, houve um aumento na atividade enzimática extracelular logo após o US (até 36h). Uma razão plausível para esse aumento pode estar relacionada à liberação de enzimas do interior das células (onde são produzidas), uma vez que o tratamento de US pode causar aumento na permeabilidade da parede celular (KWIATKOWSKA et al., 2011). O efeito cavitacional produzido pela implosão das microbolhas reduz a resistência à

transferência de massa de sólido para líquido e gás para líquido (NAVEENA; ARMSHAW; PEMBROKE, 2015), o que facilita o transporte de nutrientes através da parede celular. Trabalhos anteriores relataram que o uso do tratamento de US aumentou a liberação de produtos intracelulares, melhorando a produção metabólica, que também está relacionada a uma melhor absorção de nutrientes (AVHAD; RATHOD, 2014, 2015; PAWAR; RATHOD, 2018; SHEIKH; PAWAR; RATHOD, 2019 ; SHOKRI; SHEKARFOROUSH; HOSSEINZADEH, 2019; SUN; MA; WANG, 2017; VARGAS et al., 2004; WANG et al., 2013; YAO et al., 2014).

Os resultados apresentados nesta etapa mostram dois comportamentos; primeiro, a sonicação nos estágios iniciais (8 e 12h) teve efeito prejudicial na produção de ambas as enzimas. O que pode estar associado a um possível dano causado pelo US às células prematuras (células dos estágios iniciais de crescimento), diminuindo, desta forma, a produção e liberação das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase. Segundo, a aplicação de US no estágio posterior (24h) gerou o maior valor de atividade enzimática para a β -1,3-glucanase (2,98 U.mL⁻¹) em 36h, o que representa 82% de aumento em relação ao controle (sem US) e uma interessante atividade enzimática de quitinase (1,87 U.mL⁻¹), representando um aumento de 37% em comparação ao controle.

Quando o US foi aplicado às 16 e 20h de fermentação, foram observados efeitos positivos nas atividades enzimáticas, mas não duraram até o final do cultivo (48h). Estudos anteriores mostraram que a exposição da cultura microbiana ao US de baixa frequência no momento adequado tem grande influência no aumento da produtividade (AVHAD; RATHOD, 2014; WANG et al., 2013). Neste estudo, o tratamento de US às 24 horas de cultivo mostrou melhoria na produção de β -1,3-glucanase e quitinase quando comparado aos demais momentos de sonicação ou até mesmo com o tratamento controle.

Figura 13 – Efeito da sonicação em diferentes estágios de crescimentos: (A – F): β -1,3-glucanase; (G – L): quitinase

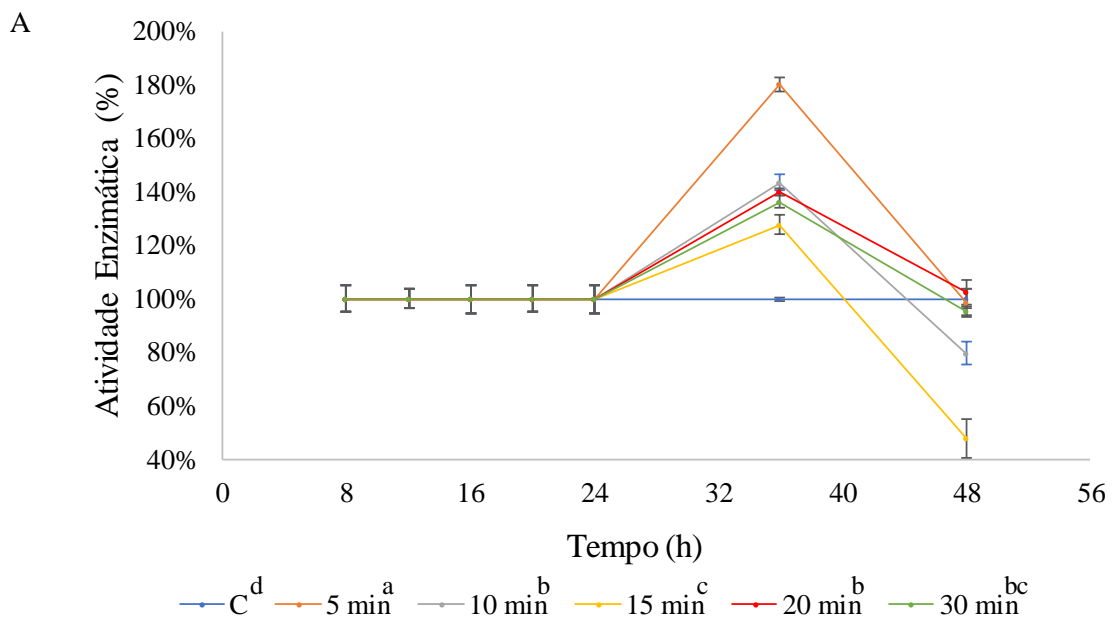


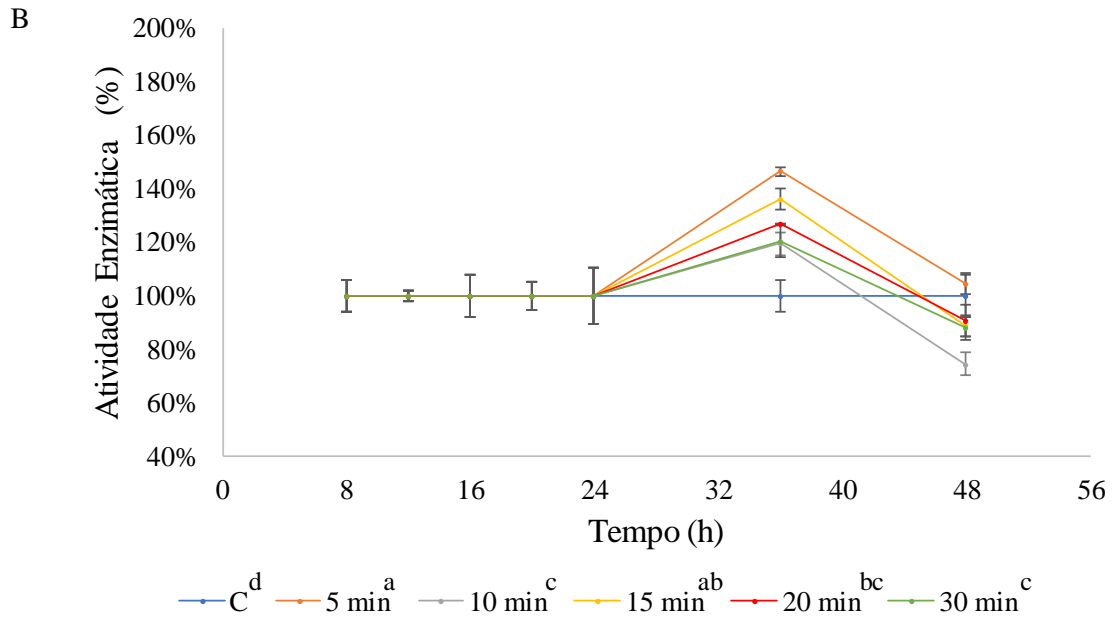
C: Sem sonicação; US8: Sonicação em 8h de cultivo; US12: Sonicação em 12h de cultivo; US16: Sonicação em 16h de cultivo; US20: Sonicação em 20h de cultivo; US24: Sonicação em 24h de cultivo. Tratamento de US aplicado por 20 min a uma potência de 195 W e ciclo de trabalho de 0,3 s.s⁻¹. Letras diferentes nas legendas representam diferença estatística em 36h de cultivo pelo teste de Tukey (p < 0,05).

5.3.2 Efeito do tempo de sonicação

A Figura 14 mostra os perfis de atividade enzimática para β -1,3-glicanase e quitinase obtidos com diferentes tempos de aplicação de US. A exposição da fermentação a 5 minutos de US aumentou significativamente as atividades enzimáticas das duas enzimas em relação à fermentação controle. Para a β -1,3-glicanase, a atividade atingiu $2,95 \text{ U.mL}^{-1}$ contra $1,63 \text{ U.mL}^{-1}$ de controle (aumento de 81%); enquanto para quitinase, a atividade atingiu $2,00 \text{ U.mL}^{-1}$, contra $1,36 \text{ U.mL}^{-1}$ de controle (aumento de 47%). Embora os tempos de tratamento com US mais longos tenham demonstrado menor aumento, após 12 horas de aplicação (36h de crescimento), todas as atividades ainda eram maiores do que o controle. No entanto, em 48 h, houve diminuição nas atividades enzimáticas para todas as condições testadas.

Figura 14 – Efeito do tempo de sonicação nas atividades enzimáticas de (A) β -1,3-glicanase e (B) quitinase





Tratamento de US aplicado em 24h de cultivo, com uma potência de 195 W e ciclo de trabalho de 0,3 s.s⁻¹. Letras diferentes nas legendas representam diferença estatística em 36h de cultivo pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

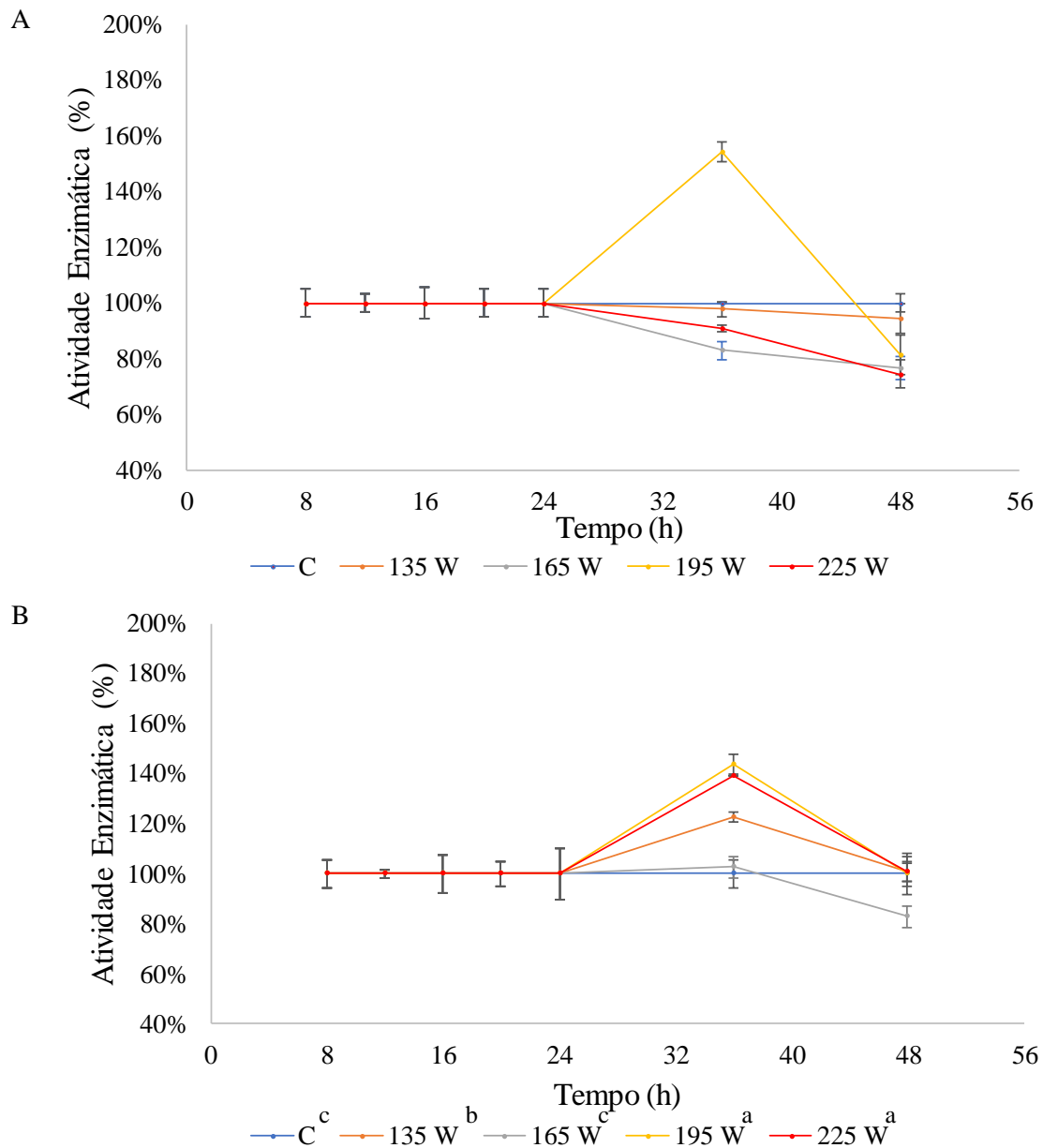
De acordo com Sheikh et al., (2019) a curta exposição à cavitação é mais eficaz para a melhoria da transferência de massa através das células microbianas, uma vez que a exposição à cavitação mais longa pode causar efeitos negativos nas células microbianas e, conseqüentemente, prejudicar o rendimento do produto. Wang et al., (2013) também verificaram que o tratamento prolongado com US (acima de 5 min) resultou em uma diminuição na produção de enzimas (nesse caso, lacase). Cinco minutos de tratamento com US foram a melhor estratégia para aumentar as atividades enzimáticas de β -1,3-glucanase e quitinase no presente estudo, enquanto que tempos mais longos foram desfavoráveis, um possível indicativo de alterações estruturais prejudiciais no microrganismo ou até mesmo danos celulares causados por excesso de estimulação com US (SULAIMAN et al., 2011; WANG et al., 2013).

5.3.3 Efeito da potência de aplicação

A Figura 15 apresenta a influência de diferentes potências de aplicação de US nas atividades enzimáticas das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase. A potência de 195 W teve um efeito positivo na atividade enzimática da β -1,3-glucanase, aumentando sua atividade enzimática de 1,63 U.mL⁻¹ no cultivo controle a 2,52 U.mL⁻¹ (aumento de 54%). Para a quitinase, a mesma potência também apresentou efeito positivo comparado à fermentação não

sonicada, elevando a atividade de $1,36 \text{ U.mL}^{-1}$ a $1,96 \text{ U.mL}^{-1}$ (aumento de 44%), porém esse resultado não foi estatisticamente diferente (segundo teste de Tukey $p < 0,05$) para a atividade enzimática obtida com potência de 225 W.

Figura 15 – Efeito da potência de sonicção nas atividades enzimáticas de (A) β -1,3-glucanase e (B) quitinase



Tratamento de US aplicado em 24h de cultivo, por 5 min e ciclo de trabalho de $0,3 \text{ s.s}^{-1}$. Letras diferentes nas legendas representam diferença estatística em 36h de cultivo pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

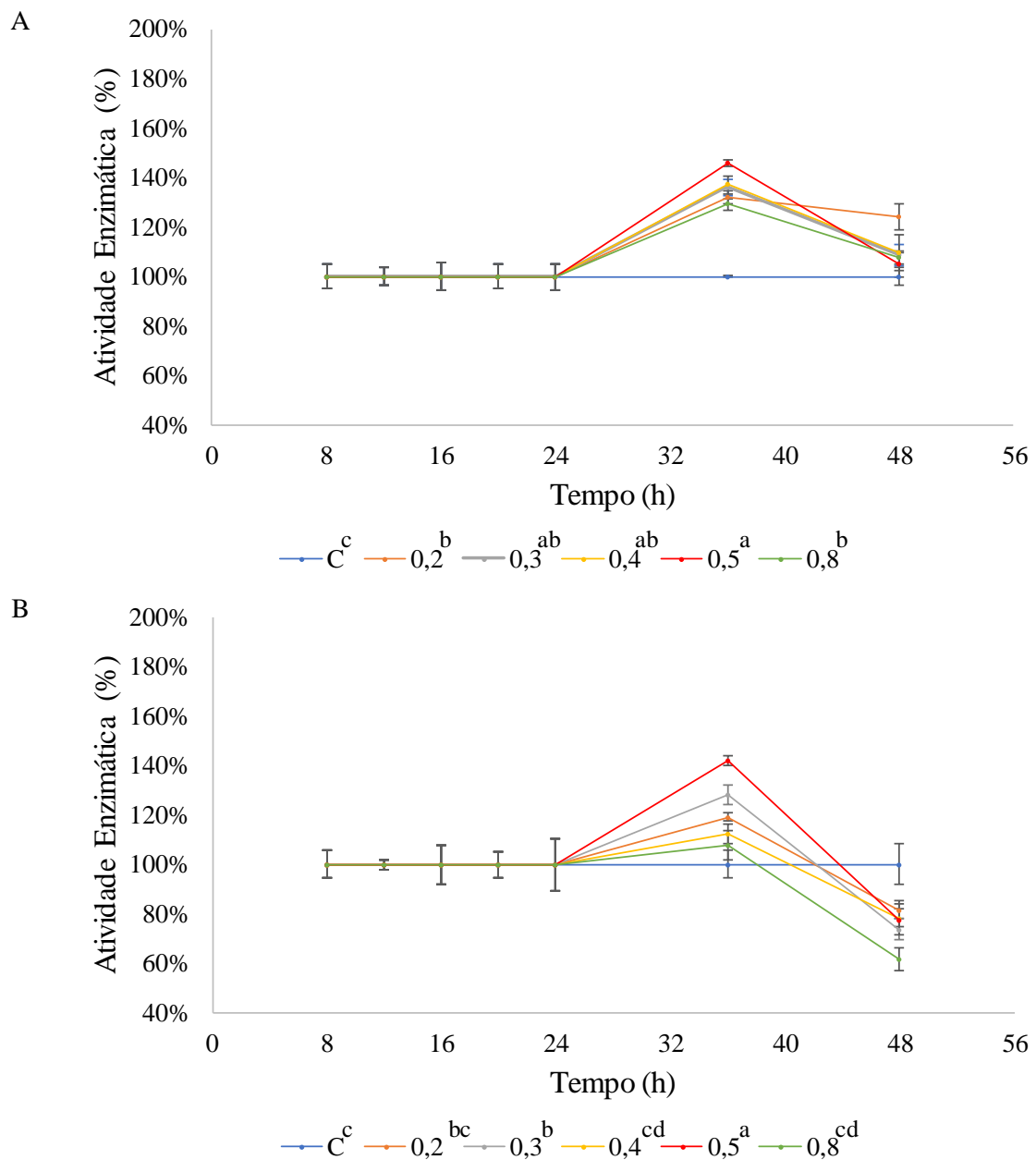
Com o aumento da potência do US, um número maior de bolhas é formado. Essas bolhas implodem energeticamente, gerando uma alta liberação de energia pelo fenômeno cavitacional, que, como mencionado anteriormente, é responsável por aumentar a permeabilidade das paredes celulares e, conseqüentemente, melhorar a captação de nutrientes e o rendimento dos produtos (KWIATKOWSKA et al., 2011; NAVEENA; ARMSHAW; PEMBROKE, 2015). No entanto, altas liberações de energia podem danificar a estrutura das células devido ao intenso choque gerado pela implosão das bolhas, o que pode resultar na morte das células e, portanto, prejudicar o rendimento do produto (AVHAD; RATHOD, 2014; PAWAR; RATHOD, 2018)

Neste trabalho, 195 W de potência resultou na melhor produção de β -1,3-glucanase, enquanto que para a quitinase 195 W e 225 W tiveram estatisticamente o mesmo efeito. Conseqüentemente, foi escolhida a potência de 195 W para os próximos experimentos.

5.3.4 Efeito do ciclo de trabalho do US

A influência de diferentes ciclos de US nas atividades enzimáticas de β -1,3-glucanase e quitinase é apresentada na Figura 16. Para ambas as enzimas, o ciclo de trabalho de $0,5 \text{ s.s}^{-1}$ (0,5 s ON e 0,5 s OFF) permitiu atingir os melhores valores de atividades enzimáticas em 36h de cultivo. A atividade enzimática da β -1,3-glucanase foi de $2,38 \text{ U.mL}^{-1}$ (aumento de 46% em relação ao controle) e da quitinase foi de $1,94 \text{ U.mL}^{-1}$ (aumento de 42% comparado ao controle) em 36 horas de cultivo. O ciclo de trabalho está relacionado ao tempo de exposição real à irradiação do US, ou seja, ao tempo em que a amostra está de fato recebendo a sonicação. Um ciclo de trabalho de 1 s.s^{-1} representa irradiação contínua, enquanto qualquer ciclo abaixo de 1 s.s^{-1} é considerado modo de operação por pulso.

Figura 16 – Efeito do ciclo de trabalho do US nas atividades enzimáticas de (A) β -1,3-glucanase e (B) quitinase



Tratamento de US aplicado em 24h de cultivo, por 5 min e potência de 195 W. Letras diferentes nas legendas representam diferença estatística em 36h de cultivo pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O uso de US contínuo confere alta pressão ao meio, sendo capaz de danificar as células microbianas. A exposição prolongada à irradiação da US pode causar ruptura das células microbianas, diminuindo a produtividade e, conseqüentemente, inviabilizando o processo. Segundo Avhad e Rathod (2014), o modo de operação por pulso também é preferido pelos pesquisadores, porque o modo contínuo de irradiação pode resultar em erosão

do transdutor do US e geração excessiva de calor. Além disso, segundo Lateef et al., (2007) e Özbek e Ülgen (2000), o US intermitente reduz a formação de radicais livres, o que pode ser prejudicial aos compostos intracelulares liberados em culturas de microrganismos. Apesar de todos os ciclos de trabalho testados terem causado um aumento na produção de β -1,3-glucanase e quitinase em comparação com o experimento de controle, o ciclo de trabalho de 0,5 s ONN e 0,5 s OFF ($0,5 \text{ s.s}^{-1}$) foi o mais adequado para produção e liberação de ambas as enzimas.

Wang et al., (2013) estudaram o efeito do tratamento ultrassônico em culturas submersas de *Trametes versicolor* para produção de lacase. Os autores utilizaram um ciclo de trabalho de $0,5 \text{ s.s}^{-1}$ e obtiveram atividade enzimática 1,8 vezes maior quando comparados ao controle sem tratamento com US. Sulaiman et al., (2011) verificaram que o ciclo de 20% (equivalente a $0,2 \text{ s.s}^{-1}$) foi o mais eficaz na produção de etanol e β -galactosidase por *Kluyveromyces marxianus* (ATCC 6537).

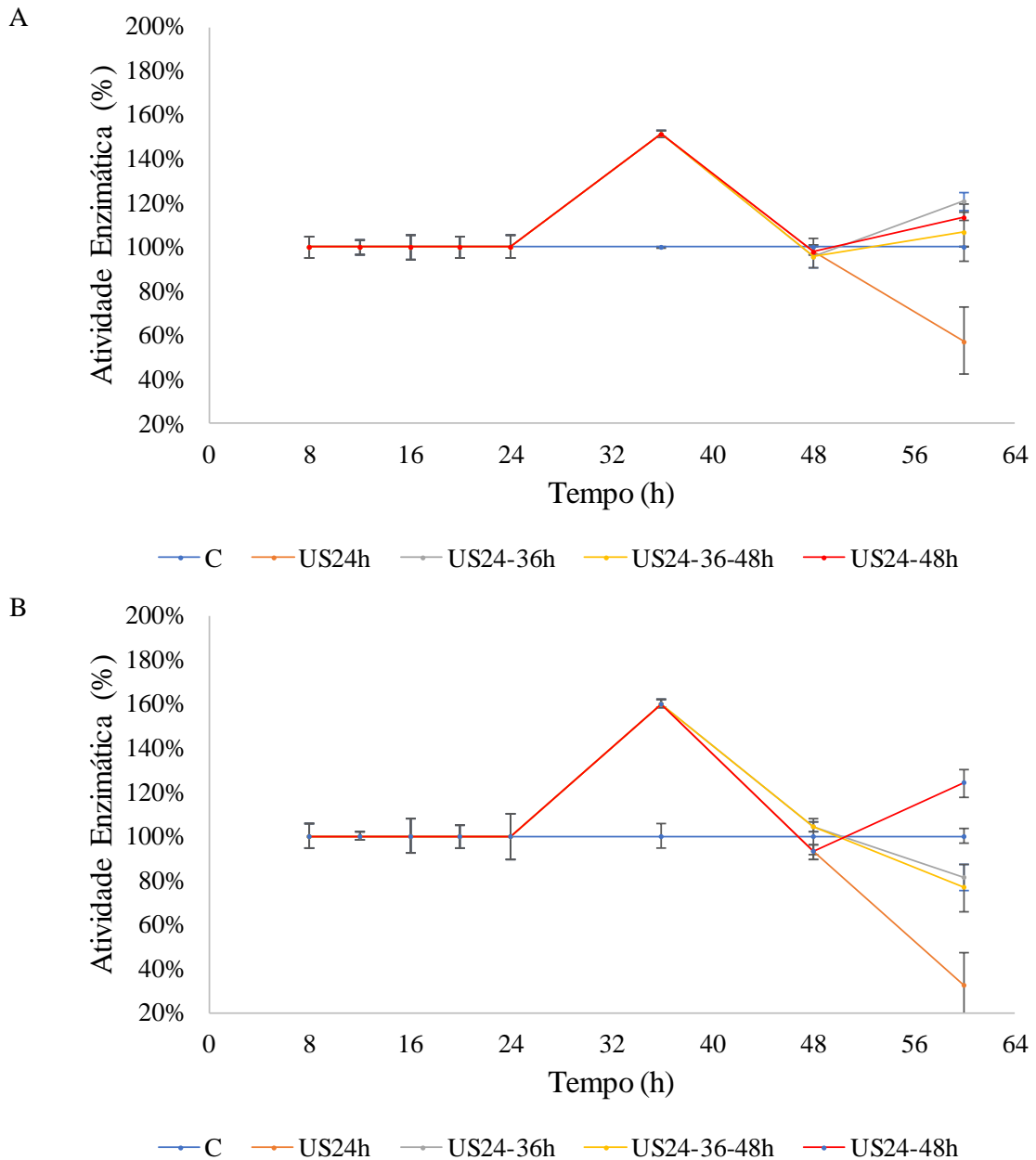
As diferenças entre os ciclos de trabalho ótimos encontrados em cada estudo, além de estarem relacionadas a variáveis de processo, como potência do US, frequência e microrganismo, podem estar associadas à forma de aplicação do US, que pode ser direta ou indireta. Neste trabalho, como em Wang et al., (2013), o tratamento de US foi aplicado indiretamente. As ondas do US foram sonicadas em um banho preenchido com água, onde os frascos de fermentação foram imersos, e não diretamente no meio de fermentação, como no trabalho de Sulaiman et al. (2011).

5.3.5 Efeito de múltiplos tratamentos com US

O efeito de múltiplos tratamentos ultrassônicos nas atividades enzimáticas foi investigado e está apresentado na Figura 17 para β -1,3-glucanase (A) e quitinase (B). O primeiro tratamento foi aplicado às 24 horas de cultivo e os seguintes tratamentos foram aplicados com intervalos de 12 horas ou 24 horas. Em 60h de fermentação, podem ser observadas diferenças nas atividades enzimáticas obtidas em cada tratamento. Observa-se que o tratamento com US com apenas uma aplicação às 24h mostrou a menor atividade enzimática para β -1,3-glucanase e quitinase em comparação com os outros tratamentos (em 60h). Os tratamentos com US às 24 - 36 horas e 24 - 48 horas foram os mais interessantes às 60h de cultivo, no entanto, as maiores atividades enzimáticas para β -1,3-glucanase ($2,47 \text{ U.mL}^{-1}$) e quitinase ($2,18 \text{ U.mL}^{-1}$) foram atingidos às 36h de cultivo, momento onde apenas uma aplicação de US havia sido feita.

O tratamento com US às 24h de fermentação mostrou-se como o mais atrativo para a produção das enzimas estudadas, gerando um aumento de 51% para a atividade enzimática da β -1,3-glucanase e 60% para a quitinase.

Figura 17 – Efeito de múltiplos tratamentos com US nas atividades enzimáticas de (A) β -1,3-glucanase e (B) quitinase



Sonicação por 5 min com potência de 195 W e ciclo de trabalho de 0,5 s.s⁻¹.

Todos os tratamentos realizados apresentaram aumento da atividade enzimática extracelular logo após o US, o que pode estar relacionado à liberação constante de enzima para fora da célula, favorecida pelo estímulo com US.

5.4 ANÁLISES DA BIOMASSA COM E SEM TRATAMENTO ULTRASSÔNICO

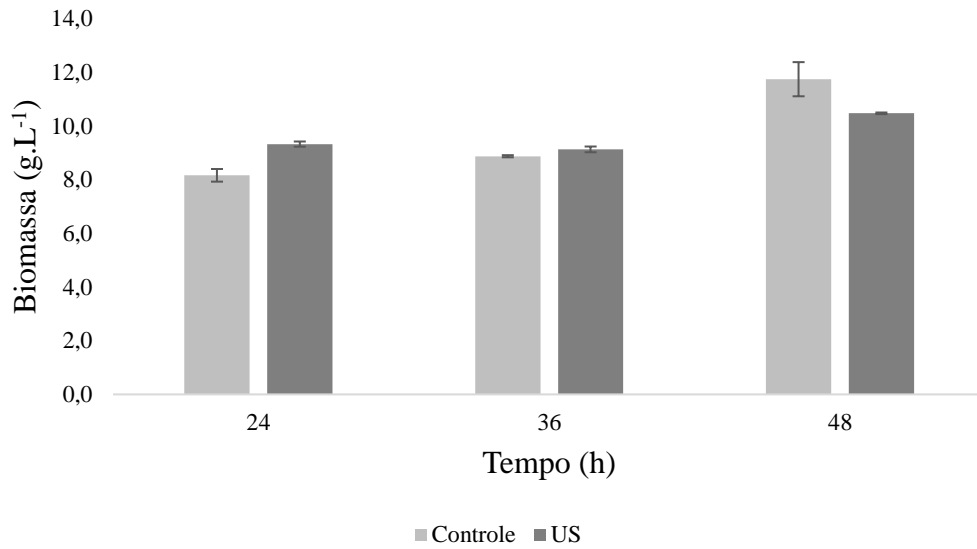
5.4.1 Cinética de crescimento microbiano

A Figura 18 traz as representações de massa seca obtidas nos experimentos de cinética de crescimento microbiano. Neste estudo, foram comparadas as massas secas obtidas ao longo do tempo para o cultivo controle e para o tratamento com US na condição ótima encontrada anteriormente (sonicação em 24h de cultivo por 5 min, potência de 195 W e ciclo de trabalho de $0,5 \text{ s.s}^{-1}$).

Analisando os resultados, percebe-se que imediatamente após a aplicação da sonicação na amostra teste (US 24) houve um aumento de biomassa em relação à amostra controle. No tempo de 36h, praticamente não houve diferença entre a concentração de ambas as biomassas. Porém, em 48h, a concentração de biomassa do cultivo controle mostrou-se maior do que a biomassa do tratamento com US. Esta diferença entre a concentração das biomassas pode estar relacionada ao possível dano causado pelo US na biomassa que passou pelo tratamento. A aplicação do US pode ter retardado o crescimento fúngico.

Com base nos dados obtidos da cinética de crescimento, pode-se concluir que a aplicação do US gera pequeno resultado positivo de crescimento logo após o tratamento, porém, com o passar do tempo, a biomassa do cultivo controle se desenvolve melhor do que a biomassa submetida a US.

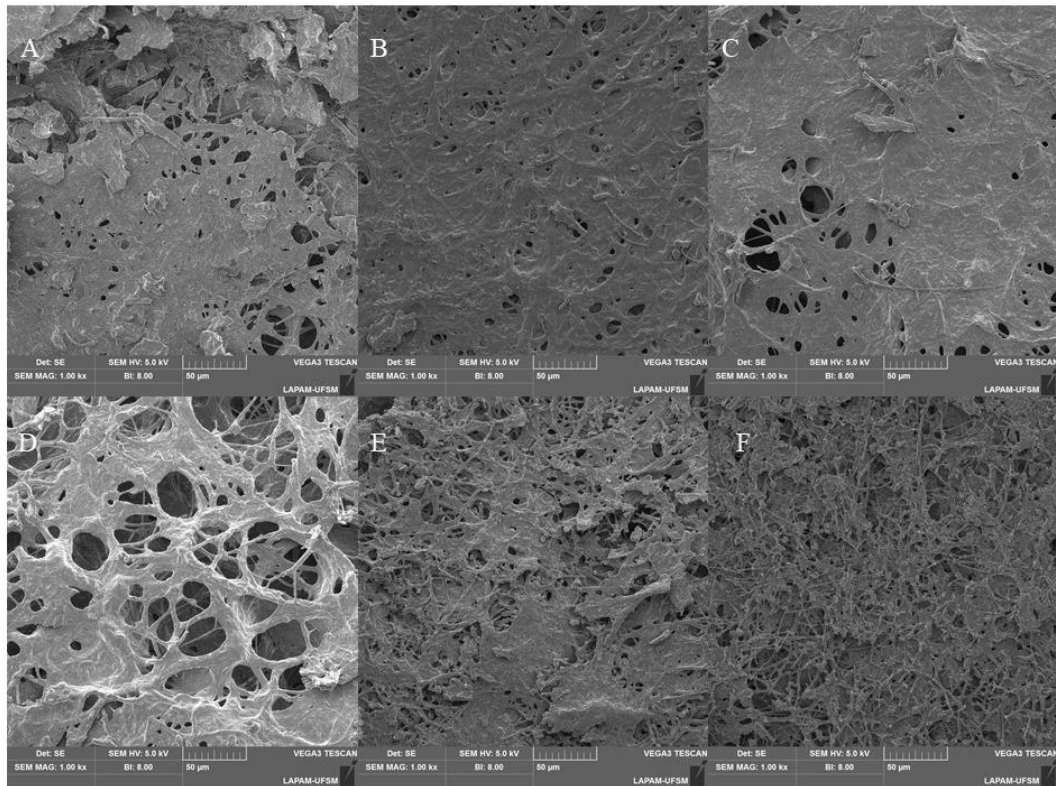
Figura 18 – Cinética de crescimento microbiano com e sem tratamento com US



5.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após separação e liofilização da biomassa fúngica, as amostras foram analisadas por MEV. A Figura 19 traz as fotografias tiradas com aumento de 1000 x. É possível observar que imediatamente após a aplicação do US (Fig. 19 (D)) já surgem diferenças muito pronunciadas entre a amostra controle (Fig. 19 (A)) e o tratamento. É visível a mudança estrutural do micélio fúngico, surgindo mais poros e aumentando a área de contato das células com o meio de cultivo, o que facilita a captação de nutrientes e liberação de produtos para fora da célula.

Figura 19 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da biomassa fúngica liofilizada: (A) C24; (B) C36; (C) C48; (D) US24; (E) US36; (F) US48. Aumento de 1000 x



Fonte: Autora.

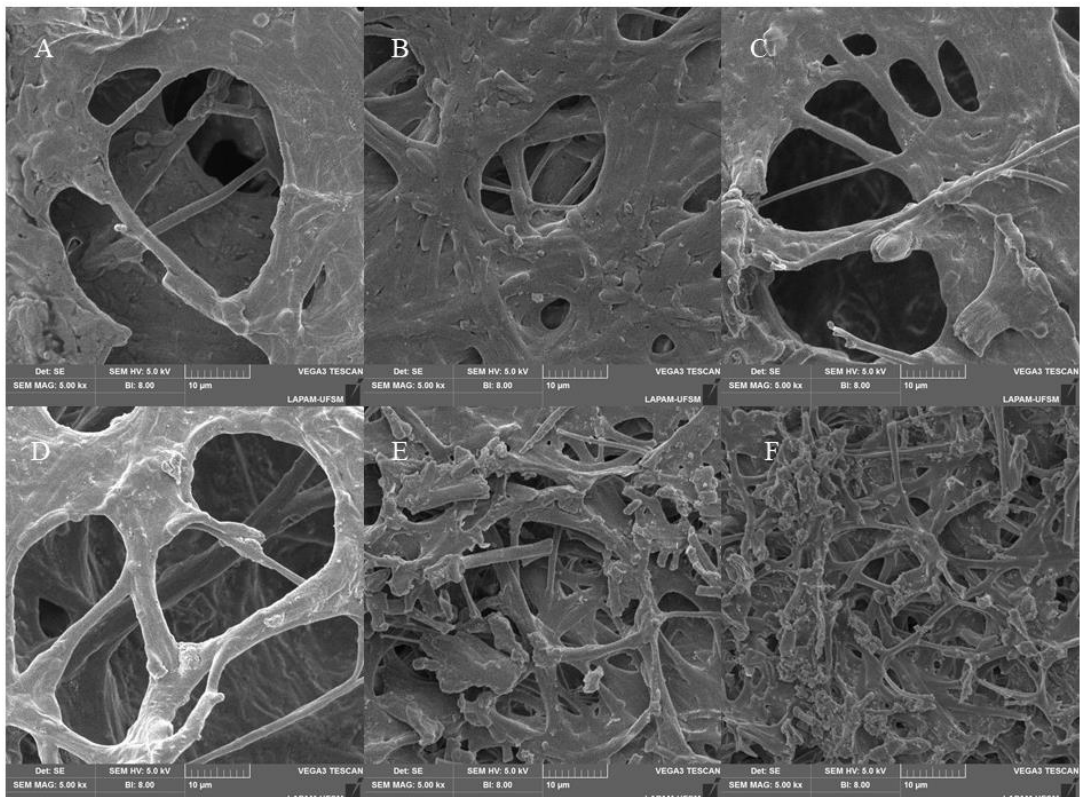
Nos estágios posteriores (36h (Fig. 19 (E)) e 48h (Fig. 19 (F))) observa-se grande fragmentação do micélio nas amostras sonicadas. As amostras controle (C36 (Fig. 19 (B)) e C48 (Fig. 19 (C))) possuem a superfície micelial muito mais uniforme, com quase nenhum fragmento de hifa desprendido do tapete micelial. Esta desestruturação do micélio era um resultado esperado, uma vez que a sonicação pode causar modificações nas estruturas celulares dos microrganismos, por conta da cavitação, conforme já citado anteriormente.

O papel das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase em processos de crescimento, ramificação hifal e morfogênese de fungos filamentosos já foi descrito na literatura (MOUYNA; HARTL; LATGÉ, 2013; VEGA; KALKUM, 2012). Para que o fungo consiga crescer e se desenvolver, estas enzimas precisam atuar sobre a parede celular, amolecendo-a e permitindo o desenvolvimento do microrganismo, uma vez que os principais constituintes da parede celular destes fungos são β -glucanas e quitina.

Além de todos os possíveis mecanismos de atuação do US no aumento da atividade enzimática no meio de cultivo já citados neste trabalho, a necessidade do fungo de sobreviver

e se desenvolver após o tratamento ultrassônico pode ter levado o microrganismo a buscar alternativas de crescimento. As Figuras 19 (E) e 19 (F) retratam grandes quantidades de ramificações em formatos de hifas (ramificações hifais). Este comportamento pode ser resultado de uma estratégia do fungo para se manter em crescimento após ter passado pelo processo de sonicação. Por estar passando por uma alteração estrutural, o papel das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase se torna muito importante. A necessidade das enzimas pode ter feito com que o fungo as produzisse em maior quantidade quando comparado com o cultivo controle, sendo este, um dos possíveis mecanismos de ação do US neste cultivo de *B. bassiana*. A Figura 20 traz as fotografias do micélio com um aumento de 5000 x, permitindo uma visualização mais detalhada. Analisando a biomassa com maior aumento, percebe-se claramente a formação de novos pontos de crescimento hifal, bem como os microporos gerados por conta da sonicação.

Figura 20 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da biomassa fúngica liofilizada: (A) C24; (B) C36; (C) C48; (D) US24; (E) US36; (E) US48. Aumento de 5000 x



Fonte: Autora.

5.4.3 Determinação de nitrogênio total, carbono orgânico total e atividades enzimáticas após sonicação da biomassa

A investigação da liberação de nitrogênio e carbono pela biomassa após aplicação de sonicação na condição ótima mostrou resultados interessantes, os quais estão apresentados na Tabela 9, juntamente com as atividades enzimáticas obtidas nos sobrenadantes analisados.

É possível perceber um considerável aumento em todas as variáveis analisadas logo após a sonicação (US + 0h). Uma hora após o tratamento com US, a quantidade de nitrogênio, carbono e as atividades enzimáticas atingiram os maiores valores entre as amostras testadas. Comparando o teor de nitrogênio antes da sonicação e depois, houve um aumento de 180% uma hora após o tratamento. Para carbono orgânico, o aumento foi de 42%. As atividades enzimáticas aumentaram 53% e 32% para β -1,3-glucanase e quitinase, respectivamente.

Os resultados obtidos mostram que a aplicação do US tem efeito na liberação de produtos de dentro da célula para o exterior. Além de aumentar a área de contato da parede celular com o meio líquido (conforme evidenciado no item 5.4.2), o US pode atuar na permeabilização desta parede, facilitando as trocas de nutrientes e produtos entre os meios.

Este experimento foi muito útil para avaliar a influência da aplicação de US na liberação de proteínas de dentro para fora da célula microbiana. É importante dizer que as condições do experimento não refletem as condições exatas do processo fermentativo onde as enzimas são produzidas, no entanto, o experimento serve como uma ferramenta eficiente para estudo do mecanismo de ação do US em células microbianas.

Tabela 9 – Teor de nitrogênio total (NT), carbono orgânico total (COT) e atividades enzimáticas obtidos antes e após sonicação da biomassa liofilizada

Amostras	NT (mg.L ⁻¹)	COT (mg.L ⁻¹)	β -1,3-glucanase (U.mL ⁻¹)	Quitinase (U.mL ⁻¹)
s/ US	9,2 ± 0,17	37,0 ± 0,67	1,64 ± 0,13	1,06 ± 0,01
US + 0h	13,6 ± 0,36	44,8 ± 0,23	1,98 ± 0,10	1,70 ± 0,08
US + 1h	25,8 ± 0,22	52,8 ± 0,01	2,51 ± 0,03	2,17 ± 0,15

6. CONCLUSÃO

O fungo *Beauveria bassiana* (IBCB 66) mostrou-se capaz de produzir satisfatoriamente as enzimas β -1,3-glucanase e quitinase em cultivo submerso. O meio de cultivo que favoreceu a maior produção combinada de enzimas e esporos foi composto por farelo de arroz (35 g.L⁻¹), sacarose (50 g.L⁻¹) e farelo de soja (5 g.L⁻¹), além dos minerais essenciais para o crescimento. As atividades enzimáticas atingidas com este meio foram de 1,68 U.mL⁻¹ para β -1,3-glucanase e 1,47 U.mL⁻¹ para quitinase, enquanto que a produção de esporos atingiu o valor de $6,7 \times 10^7$ esporos.mL⁻¹.

O estudo cinético conduzido para identificar o tempo de fermentação mais rentável para o processo de produção de enzimas mostrou que 48h de cultivo era o tempo ideal, pois não tornava o processo tão rápido e também não tão demorado. Embora a produção das enzimas começasse cedo (em 8h de cultivo já era possível identificar atividades), trabalhar com tempos muito curtos para fermentações de fungos filamentosos (como é o caso de *B. bassiana*) não é indicado, uma vez que eles necessitam de mais tempo para se adaptar ao meio.

A aplicação de US no processo fermentativo resultou em aumento nas atividades enzimáticas de β -1,3-glucanase e quitinase. A condição de sonicação a 24h de cultivo com potência de 195 W, por 5 min e ciclo de trabalho de 0,5 s.s⁻¹ possibilitou um aumento de 51% de atividade para a β -1,3-glucanase e 60% para a quitinase, resultados estes muito interessantes do ponto de vista produtivo.

Por último, as investigações dos efeitos da aplicação de US a biomassa fúngica mostraram que há, de fato, alterações estruturais no micélio fúngico por conta da sonicação. Fotografias obtidas por MEV permitiram visualizar estas mudanças na morfologia do fungo. O US ocasionou um aumento nas ramificações hifais, além do surgimento de poros na estrutura micelial do fungo. Efeitos estes que contribuíram para um aumento da área superficial do fungo, possibilitando uma maior troca e nutrientes e liberação de produtos para o meio. O estudo da influência da sonicação na liberação de nitrogênio e carbono pela biomassa permitiu concluir que há, de fato, um efeito do US na liberação destes compostos pela célula. Uma hora após a sonicação os teores de nitrogênio, carbono e as atividades enzimáticas de β -1,3-glucanase e quitinase sofreram aumentos de 180%, 42%, 53%, respectivamente, quando comparados com os teores presentes antes do tratamento com US.

REFERÊNCIAS

- AFANDHI, A.; CHAILANI, S. R.; AWATI, A. Evaluation of Sucrose for In Vitro Germination and Growth of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* (BALSAMO) VUILLEMIN and *Paecilomyces* sp. (DEUTEROMYCETES, MONILIALES). **Journal of Tropical Plant Protection**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 39–45, 2012.
- AITA, Bruno C. et al. Production of cell-wall degrading enzymes by solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 103193, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103193>>
- AKDI, K. et al. **BIOLOGICAL CONTROL AGENT AND FORMULATIONS**, EP 1 570 048 B1, 2009.
- ALVES, Eliana A. et al. Process development to obtain a cocktail containing cell-wall degrading enzymes with insecticidal activity from *Beauveria bassiana*. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], p. 107484, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107484>>
- ALVES, S. B. Fungos Entomopatogênicos. In: **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. [s.l: s.n.]. p. 1163.
- AVHAD, Devchand N.; RATHOD, Virendra K. Ultrasound stimulated production of a fibrinolytic enzyme. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 21, p. 182–188, 2014.
- AVHAD, Devchand N.; RATHOD, Virendra K. Ultrasound assisted production of a fibrinolytic enzyme in a bioreactor. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 22, p. 257–264, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.04.020>>
- BARTERI, M. et al. Low frequency ultrasound induces aggregation of porcine fumarase by free radicals production. **Biophysical Chemistry**, [s. l.], v. 111, n. 1, p. 35–42, 2004.
- BERINI, Francesca et al. Microbial and viral chitinases: Attractive biopesticides for integrated pest management. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 818–838, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.01.002>>
- BIANCHI, F. J. J. A.; BOOIJ, C. J. H.; TSCHARNTKE, T. Sustainable pest regulation in agricultural landscapes: A review on landscape composition, biodiversity and natural pest control. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 273, n. 1595, p. 1715–1727, 2006.
- BINOD, P. et al. Evaluation of fungal culture filtrate containing chitinase as a biocontrol agent against *Helicoverpa armigera*. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 103, n. 5, p. 1845–1852, 2007.
- BISHOP, J. G.; DEAN, A. M.; MITCHELL-OLDS, T. Rapid evolution in plant chitinases: Molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. **National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 97, n. 10, p. 5322–5327, 2000.
- BLAETH DE LIMA, Fernanda et al. *Trichoderma harzianum* T1A constitutively secretes proteins involved in the biological control of *Guignardia citricarpa*. **Biological Control**, [s. l.], v. 106, p. 99–109, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.01.003>>
- CAMPBELL, R. K. et al. Growth and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in a basal medium containing various carbohydrate sources. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 117–121, 1983.
- CASTRILLO, Louela A.; ROBERTS, Donald W.; VANDENBERG, John D. The fungal past, present, and future: Germination, ramification, and reproduction. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s. l.], v. 89, n. 1, p. 46–56, 2005.

CHARNLEY, A. K. Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: a speculative review. **Symposium series - British Mycological Society**, [s. l.], 1984. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301469101>>. Acesso em: 11 abr. 2019.

CHAVAN, S. B. et al. Stability studies of cuticle degrading and mycolytic enzymes of *Myrothecium verrucaria* for control of insect pests and fungal phytopathogens. **Indian Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 404–412, 2017.

CHISTI, Yusuf. Sonobioreactors: Using ultrasound for enhanced microbial productivity. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 89–93, 2003.

COPA-PATIÑO, J. L. et al. Characterization of 1, 3- β -glucanases produced during autolysis of *Penicillium oxalicum* in different culture media. **Transactions of the British Mycological Society**, [s. l.], v. 88, n. 3, p. 317–321, 1987.

DAHROUD, Behnaz Dahri et al. Low intensity ultrasound increases the fermentation efficiency of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATTC 39392. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 86, p. 462–467, 2016.

DEAN, David D.; DOMNAS, A. J. The extracellular proteolytic enzymes of the mosquito-parasitizing fungus *Lagenidium giganteum*. **Experimental Mycology**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 31–39, 1983. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0147597583900725>>. Acesso em: 11 abr. 2019.

DENG, Jun Jin et al. Biocontrol activity of recombinant aspartic protease from *Trichoderma harzianum* against pathogenic fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 112, n. December 2017, p. 35–42, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.02.002>>

DESHMANE, Vishwanath G.; GOGATE, Parag R.; PANDIT, Aniruddha B. Process intensification of synthesis process for medium chain glycerides using cavitation. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 145, n. 2, p. 351–354, 2008.

DHAWAN, Manish; JOSHI, Neelam. Enzymatic comparison and mortality of *Beauveria bassiana* against cabbage caterpillar *Pieris brassicae* LINN. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 522–529, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.08.004>>

DI MARO, Antimo et al. Purification and characterization of a viral chitinase active against plant pathogens and herbivores from transgenic tobacco. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 147, n. 1, p. 1–6, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.03.005>>

ESPINOZA, W. Jhoel Montoya et al. β -1,3-glucanases expression of *Beauveria bassiana* in culture with extract of the phytopathogenic *Peronospora variabilis* and *Fusarium oxysporum*. **Scientia Agropecuaria**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 253–257, 2016.

FENG, M. G.; POPRAWSKI, T. J.; KHACHATOURIANS, G. G. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. **Biocontrol Science and Technology**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 3–34, 1994.

FLEURI, Luciana Francisco; SATO, Hélia Harumi. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 871–879, 2005.

GALVÁN-D’ALESSANDRO, Leandro; CARCIOCHI, Ramiro Ariel. Fermentation assisted by pulsed electric field and ultrasound: A review. **Fermentation**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1–12, 2018.

GHASEMI, Seyedhadi et al. First report of a bifunctional chitinase/lysozyme produced by *Bacillus pumilus* SG2. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 225–231, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.11.001>>

GIESE, Ellen C. et al. Comparison of β -1,3-glucanase production by *Botryosphaeria*

rhodina MAMB-05 and *Trichoderma harzianum* Rifai and its optimization using a statistical mixture-design. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 239–243, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2010.10.013>>

HAJEK, A. E.; ST. LEGER, R. J. Interactions Between Fungal Pathogens and Insect Hosts. **Annual Review of Entomology**, [s. l.], n. 39, p. 293–322, 1994.

HAJEK, A. E.; WRAIGHT, S. P.; VANDENBERG, J. D. Control of arthropods using pathogenic fungi. In: POINTING, S. B.; HYDE, K. D. (Eds.). **Bio-Exploitations of Filamentous Fungi**. 1. ed. [s.l.] : Fungal Diversity Research Series, 2001. p. 467.

HELMY, S. M. et al. *Streptomyces nigellus* as a biocontrol agent of tomato damping-off disease caused by *Phytophthora ultimum*. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 1–10, 2010.

HERRÁN, Nuria Sainz et al. Effects of ultrasound on culture of *Aspergillus terreus*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [s. l.], v. 83, p. 593–600, 2008.

HOSHINO, Yu; KAWASAKI, Takayoshi; OKAHATA, Yoshio. Effect of ultrasound on DNA polymerase reactions: Monitoring on a 27-MHz quartz crystal microbalance. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 682–685, 2006.

HUSSAIN, Abid et al. Current Status of entomopathogenic fungi as mycoinsecticides and their inexpensive development in liquid cultures. **Zoology**, [s. l.], p. 103–121, 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/zoology/current-status-of-entomopathogenic-fungi-as-mycoinsecticides-and-their-inexpensive-development-in-liq>>

HUSSAIN, Anwar et al. Rapid Determination of Cytokinins and Auxin in Cyanobacteria. **Current Microbiology**, [s. l.], v. 61, n. 5, p. 361–369, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20339849>>. Acesso em: 11 abr. 2019.

IRSHAD, Muhammad; ANWAR, Zahid; AFROZ, Amber. Characterization of Exo 1, 4- β -D-glucanase produced from *Trichoderma Viridi*; MBL through solid-state bio-processing of orange peel waste. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, [s. l.], v. 03, n. 05, p. 580–584, 2012.

JAQUES, Robert P. The potential of pathogens for pest control. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 101–126, 1983. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0167880983900579>>

KACHHAWA, D. Microorganisms as a biopesticides. **Journal of Entomology and Zoology Studies JEZS**, [s. l.], v. 468, n. 53, p. 468–473, 2017. Disponível em: <<http://www.entomoljournal.com/archives/2017/vol5issue3/PartG/5-3-16-781.pdf>>

KALVA, Abhishek; SIVASANKAR, Thirugnanasambandam; MOHOLKAR, Vijayanand S. Physical mechanism of ultrasound-assisted synthesis of biodiesel. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 534–544, 2009.

KANG, Sun Chul; PARK, Sanggyu; LEE, Dong Gyu. Purification and Characterization of a Novel Chitinase from the Entomopathogenic Fungus, *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s. l.], v. 73, n. 3, p. 276–281, 1999.

KARTHIK, Narayanan et al. Production, purification and properties of fungal chitinases—A review. **Indian Journal of Experimental Biology**, [s. l.], v. 52, n. 11, p. 1025–1035, 2014.

KASAMBALA DONGA, Trust; VEGA, Fernando E.; KLINGEN, Ingeborg. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* as an endophyte in sugarcane, *Saccharum officinarum*. **Fungal Ecology**, [s. l.], v. 35, p. 70–77, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.06.008>>

KHAN, Alamgir; WILLIAMS, Keith L.; NEVALAINEN, Helena K. M. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. **Biological Control**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 346–352, 2004.

KIM, Jae Su; JE, Yeon Ho. A novel biopesticide production: Attagel-mediated

precipitation of chitinase from *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant for thermotolerance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 87, n. 5, p. 1639–1648, 2010.

KIM, Jae Su; JE, Yeon Ho; YU, Yong-Man. Mass production of aphicidal *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant with the parameter of chitinase. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 604–612, 2011.

KIM, Kyoung Ja; YANG, Yong Joon; KIM, Jong Gi. Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces* sp. M-20. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 185–189, 2003.

KUMAR, D. Praveen et al. Studies on Exo-Chitinase Production from *Trichoderma asperellum* UTP-16 and Its Characterization. **Indian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 52, n. 3, p. 388–395, 2012.

KWIATKOWSKA, Barbara et al. Stimulation of bioprocesses by ultrasound. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 768–780, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.06.005>>

LATEEF, A.; OLOKE, J. K.; PRAPULLA, S. G. The effect of ultrasonication on the release of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans* CFR 77. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 40, n. 5, p. 1067–1070, 2007.

LEITE, Paulina et al. Simultaneous production of lignocellulolytic enzymes and extraction of antioxidant compounds by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 137, n. May, p. 315–322, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.044>>

LENGAI, Geraldin M. W.; MUTHOMI, James W. Biopesticides and Their Role in Sustainable Agricultural Production. **Journal of Biosciences and Medicines**, [s. l.], v. 06, n. 06, p. 7–41, 2018.

LI, Xiaotong et al. Ultrasonic pretreatment of food waste to accelerate enzymatic hydrolysis for glucose production. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 53, n. December 2018, p. 77–82, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.12.035>>

LI, Zengzhi et al. Discovery and demonstration of the teleomorph of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., an important entomogenous fungus. **Chinese Science Bulletin**, [s. l.], v. 46, n. 9, p. 751–753, 2001.

LI, Zengzhi et al. Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. **Biocontrol Science and Technology**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 117–136, 2009.

LIU, Dong et al. Purification and partial characterization of a 36-kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri*, and its biocontrol potential. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 46, n. 3–4, p. 252–256, 2010.

LOHSE, Rieke; JAKOBS-SCHÖNWANDT, Desiree; PATEL, Anant V. Screening of liquid media and fermentation of an endophytic *Beauveria bassiana* strain in a bioreactor. **AMB Express**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1–11, 2014.

LUO, Jia; FANG, Zhen; SMITH, Richard L. Ultrasound-enhanced conversion of biomass to biofuels. **Progress in Energy and Combustion Science**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 56–93, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2013.11.001>>

MA, Gui-Zhe et al. Purification and characterization of chitinase from *Gliocladium catenulatum* strain HL-1-1. **African Journal of Microbiology Research**, [s. l.], v. 6, n. 20, p. 4377–4383, 2012.

MANCILLAS-PAREDES, Jesús Manuel et al. Proteases and Chitinases Induced in *Beauveria bassiana* during Infection by *Zabrotes subfasciatus*. **Southwestern Entomologist**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 125, 2019.

MASCARIN, G. M.; PAULI, G. Bioprodutos à base de fungos entomopatogênicos (Fungal biopesticides , in portuguese). **Controle Alternativo de Pragas e Doenças na**

Agricultura Orgânica, [s. l.], n. January 2010, p. 169–195, 2010.

MASCARIN, Gabriel Moura. University of São Paulo " Luiz de Queiroz " College of Agriculture Production by solid-state and liquid fermentation and formulation of virulent strains of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* against whiteflies. [s. l.], 2015.

MASCARIN, Gabriel Moura et al. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s. l.], n. January, p. 0–1, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2018.01.001>>

MASCARIN, Gabriel Moura; JARONSKI, Stefan T. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 32, n. 11, 2016.

MAUCH, Felix; MAUCH-MANI, Brigitte; BOLLER, Thomas. Antifungal Hydrolases in Pea Tissue. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 88, n. 3, p. 936–942, 1988.

MAZID, Salma. A review on the use of biopesticides in insect pest management. **International Journal of Science and Advanced Technology**, [s. l.], v. 1, n. 7, p. 169–178, 2011.

MILLER, Gail Lorenz. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 31, n. III, p. 426–428, 1959.

MOAZAMI, N. Biological Control. **Reference Module in Life Sciences**, [s. l.], v. 3, p. 1–10, 2017.

MOORE, D. (David); ROBSON, G. D. (Geoffrey D. ...); TRINCI, A. P. J. **21st century guidebook to fungi**. [s.l.] : Cambridge University Press, 2011. Disponível em: <http://www.davidmoore.org.uk/21st_Century_Guidebook_to_Fungi_PLATINUM/index.htm>. Acesso em: 11 abr. 2019.

MOUYNA, Isabelle; HARTL, Lukas; LATGÉ, Jean Paul. β -1,3-glucan modifying enzymes in *Aspergillus fumigatus*. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 4, n. APR, p. 1–9, 2013.

NAVEENA, Balakrishnan; ARMSHAW, Patricia; PEMBROKE, Tony J. Ultrasonic intensification as a tool for enhanced microbial biofuel yields. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 8, n. 140, p. 1–13, 2015.

ONG, Lisa G. A.; RANJANDAS, Heera; CHEW, Ai Lan. Solid State Fermentation for Glucanase Production Using Acid / Heat Treated Rice Straw. **International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 106–109, 2015.

ÖZBEK, Belma; ÜLGEN, Kutlu Ö. The stability of enzymes after sonication. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 35, n. 9, p. 1037–1043, 2000.

PARNELL, J. Jacob et al. From the lab to the farm: An industrial perspective of plant beneficial microorganisms. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 7, n. AUG2016, p. 1–12, 2016.

PATIL, Rucha S.; JOSHI, Saurabh M.; GOGATE, Parag R. Intensification of delignification of sawdust and subsequent enzymatic hydrolysis using ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 58, n. April, p. 1–9, 2019.

PATOČKA, Jiří. BIOACTIVE METABOLITES OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI *Beauveria bassiana*. **Military Medical Science Letters**, [s. l.], v. 85, n. 2, p. 80–88, 2016.

PAWAR, Shweta V.; RATHOD, Virendra K. Ultrasound assisted process intensification of uricase and alkaline protease enzyme co-production in *Bacillus licheniformis*. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 45, p. 173–179, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.03.004>>

PELLIS, Alessandro et al. Ultrasound-enhanced enzymatic hydrolysis of

poly(ethylene terephthalate). **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 218, p. 1298–1302, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.106>>

PEREIRA, Erlon Lopes; MARTINS, Bruna Amaral. Processos Biotecnológicos Na Produção De. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, [s. l.], v. 14, p. 714–734, 2016.

PEREIRA, J. L. et al. Novel insights in the use of hydrolytic enzymes secreted by fungi with biotechnological potential. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 44, p. 573–581, 2007.

RAVINDRAN, Rajeev et al. A review on bioconversion of agro-industrial wastes to industrially important enzymes. **Bioengineering**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 1–20, 2018.

REHNER, Stephen A. et al. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. **Mycologia**, [s. l.], v. 103, n. 5, p. 1055–1073, 2011. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3852/10-302>>. Acesso em: 26 abr. 2019.

RICO-RODRÍGUEZ, Fabián et al. Impact of ultrasound on galactooligosaccharides and gluconic acid production throughout a multienzymatic system. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 44, n. February, p. 177–183, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.02.022>>

ROKHINA, Ekaterina V.; LENS, Piet; VIRKUTYTE, Jurate. Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 298–306, 2009.

SAEKI, Kazuo et al. Purification and characterization of a yeast lytic β -1,3-glucanase from *Oerskovia xanthineolytica* TK-1. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, [s. l.], v. 78, n. 6, p. 407–412, 1994.

SALSABILLA, Khairul Asma et al. Enhancement of β -1,3-Glucanase Production from *Penicillium oxalicum* T3.3. **International Journal of Environmental & Agriculture Research**, [s. l.], v. 4, n. 12, p. 22–31, 2018.

SAMŠINÁKOVÁ, A.; MIŠÍKOVÁ, S.; LEOPOLD, J. Action of enzymatic systems of *Beauveria bassiana* on the cuticle of the greater wax moth larvae (*Galleria mellonella*). **Journal of Invertebrate Pathology**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 322–330, 1971. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022201171900334>>. Acesso em: 11 abr. 2019.

SANCHETI, Sonam V.; GOGATE, Parag R. A review of engineering aspects of intensification of chemical synthesis using ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 36, p. 527–543, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.08.009>>

SARANRAJ, P.; JAYAPARAKASH, A. AGROBENEFICIAL ENTOMOPATHOGENIC FUNGI – *Beauveria bassiana*: A REVIEW. **Asian Journal of Multidisciplinary Research (IAJMR)**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 1051–1087, 2017.

SENA, Amanda R. et al. Production, purification and characterization of a thermostable β -1,3-glucanase (laminarinase) produced by *moniliophthora perniciosa*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 83, n. 2, p. 599–609, 2011.

SHEIKH, Zulkif; PAWAR, Shweta; RATHOD, Virendra K. Enhancement of rhamnolipid production through ultrasound application and response surface methodology. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 85, n. June, p. 29–34, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.06.023>>

SHIFERAW TEREFE, Netsanet; BUCKOW, Roman; VERSTEEG, Cornelis. Quality-Related Enzymes in Plant-Based Products: Effects of Novel Food-Processing Technologies Part 3: Ultrasonic Processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 147–158, 2015.

SOUSA, Antônio J. S. et al. A thermostable chitinase from the antagonistic *Chromobacterium violaceum* that inhibits the development of phytopathogenic fungi.

Enzyme and Microbial Technology, [s. l.], v. 126, n. March, p. 50–61, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.enzymictec.2019.03.009>>

SOUZA, Matheus et al. Evaluation of activity of a commercial amylase under ultrasound-assisted irradiation. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 89–94, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.05.012>>

STOYKOV, Yuriy Mihaylov; PAVLOV, Atanas Ivanov; KRASTANOV, Albert Ivanov. Chitinase biotechnology: Production, purification, and application. **Engineering in Life Sciences**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 30–38, 2015.

SUBBANNA, A. R. N. S. et al. Pesticidal prospectives of chitinolytic bacteria in agricultural pest management. **Soil Biology and Biochemistry**, [s. l.], v. 116, p. 52–66, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.09.019>>

SULAIMAN, Ahmad Ziad et al. Ultrasound-assisted fermentation enhances bioethanol productivity. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 141–150, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2011.01.006>>

SUN, Chun Xiao; MA, Yan Jun; WANG, Jian Wen. Enhanced production of hypocrellin A by ultrasound stimulation in submerged cultures of *Shiraia bambusicola*. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 38, p. 214–224, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.03.020>>

TANG, Xing Jun et al. Medium optimization for the production of thermal stable β -glucanase by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 using response surface methodology. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 93, n. 2, p. 175–181, 2004.

THADATHIL, Nidheesh et al. Statistical optimization of solid state fermentation conditions for the enhanced production of thermoactive chitinases by mesophilic soil fungi using response surface methodology and their application in the reclamation of shrimp processing by-products. **Annals of Microbiology**, [s. l.], v. 64, n. 2, p. 671–681, 2014.

THONGKAEWYUAN, Apivit; CHAIRIN, Thanunchanok. Biocontrol of *Meloidogyne incognita* by *Metarhizium guizhouense* and its protease. **Biological Control**, [s. l.], v. 126, n. August, p. 142–146, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.08.005>>

TIZAZU, Belachew Zegale; ROY, Kuldeep; MOHOLKAR, Vijayanand S. Mechanistic investigations in ultrasound-assisted xylitol fermentation. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 48, n. June, p. 321–328, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.06.014>>

TWEDDELL, R. J.; JABAJI-HARE, S. H.; CHAREST, P. M. Production of chitinases and beta-1,3-glucanases by *Stachybotrys elegans*, a mycoparasite of *Rhizoctonia solani*. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 489–495, 1994.

VARGAS, L. H. M. et al. Ultrasound effects on invertase from *Aspergillus niger*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 20, p. 137–142, 2004.

VEGA, Karina; KALKUM, Markus. Chitin, chitinase responses, and invasive fungal infections. **International Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 2012, 2012.

VIDHATE, Ravindra et al. Use of Hydrolytic Enzymes of *Myrothecium verrucaria* and *Conidia* of *Metarhizium anisopliae*, Singly and Sequentially to Control Pest and Pathogens in Grapes and their Compatibility w ... **Biopesticide International**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 48–60, 2015.

WANG, Feng et al. Ultrasound-intensified laccase production from *Trametes versicolor*. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 20, p. 118–124, 2013.

WU, Han et al. Ultrasound-assisted alkaline pretreatment for enhancing the enzymatic hydrolysis of rice straw by using the heat energy dissipated from ultrasonication. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 241, p. 70–74, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.090>>

XIAO, Yong Mei et al. Ultrasound-accelerated enzymatic synthesis of sugar esters in nonaqueous solvents. **Carbohydrate Research**, [s. l.], v. 340, n. 13, p. 2097–2103, 2005.

YANG, S. Q. et al. High-level production of β -1,3-1,4-glucanase by *Rhizomucor miehei* under solid-state fermentation and its potential application in the brewing industry. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 118, n. 1, p. 84–91, 2015.

YAO, Ling Yun et al. Enhanced production of fumigaclavine C by ultrasound stimulation in a two-stage culture of *Aspergillus fumigatus* CY018. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 159, p. 112–117, 2014.

YING, S. H.; FENG, M. G. Medium components and culture conditions affect the thermotolerance of aerial conidia of fungal biocontrol agent *Beauveria bassiana*. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 331–335, 2006.

YU, Cheng An; YANG, Chun Yao. Bio-ionic liquid pretreatment and ultrasound-promoted enzymatic hydrolysis of black soybean okara. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 127, n. 6, p. 767–773, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.12.007>>

ZIMMERMANN, Gisbert. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 553–596, 2007.