



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA – UNEB**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS HUMANAS – DCH – *CAMPUS IX***  
**COLEGIADO DE LICENCIATURA CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**DÁVILA CAROLINE GUEDES SOBRINHO**

**ANÁLISE QUALITATIVA DAS ENZIMAS QUITINASE,  
LIPASE E PROTEASE ASSOCIADAS A FUNGOS  
ENTOMOPATOGÊNICOS**

BARREIRAS - BA  
2020

DÁVILA CAROLINE GUEDES SOBRINHO

**ANÁLISE QUALITATIVA DAS ENZIMAS QUITINA,  
LIPASE E PROTEASE ASSOCIADAS A FUNGOS  
ENTOMOPATOGÊNICOS**

Monografia apresentada a Universidade do Estado da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Licenciada em Ciências Biológicas como pré-requisito para obtenção do Grau de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Daniela Rossato Stefanelo  
Coorientadores: Dra. Flavia Arruda  
Dr. Diego Guedes Sobrinho

2020

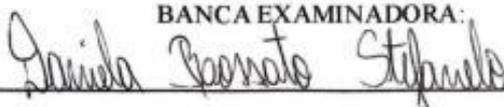
DÁVILA CAROLINE GUEDES SOBRINHO

ANÁLISE QUALITATIVA DAS ENZIMAS QUITINA, LIPASE E PROTEASE  
ASSOCIADAS A FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Monografia aprovada pela Universidade  
do Estado da Bahia, como um dos pré-  
requisitos, para obtenção do grau de  
Licenciada em Ciências Biológicas.

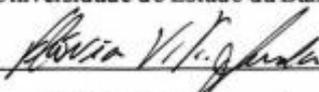
Aprovada em: 17 de 02 de 2020

BANCA EXAMINADORA:



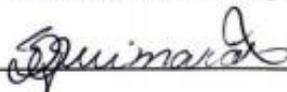
**Profa. Dra. Daniela Rossato Stefanelo**

Doutora em Fitopatologia pela Universidade de Brasília - UnB  
Professora da Universidade do Estado da Bahia - UNEB - *Campus IX*.



**Dra. Flávia Virgínia Ferreira de Arruda**

Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco - UFP  
Chefe do laboratório de Microbiologia da Empresa JCO Fertilizantes



**Profa. Dra. Sandra Elza Guimarães**

Doutora em Biotecnologia Vegetal pela Universidade Federal de Lavras - UFL  
Professora da Universidade do Estado da Bahia - UNEB - *Campus IX*

S677

Sobrinho, Dávila Caroline Guedes

Análise qualitativa das enzimas quitina, lipase e protease associadas a fungos entomopatogênicos. / Dávila Caroline Guedes Sobrinho.-- Barreiras, 2020.

25 fls.

Orientador(a): Prof. Dr. Daniela Rossato Stefanelo. Coorientador(a):  
Dr. Flávia Virgínia Ferreira de Arruda. Inclui Referências

TCC (Graduação - Ciências Biológicas) - Universidade do Estado da Bahia.

Departamento de Ciências Humanas. Câmpus IX. 2020.

1.Produção enzimática. 2.Sistema metabólico. 3.Microrganismos.

CDD: 579

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente agradeço a Deus pela proteção, por não me fazer desistir nos momentos de fraqueza, e por vencer todos os desafios.

Agradeço a Universidade do Estado da Bahia-UNEB *Campus IX*, pela oportunidade e apoio no decorrer da minha graduação, bem como ao Sr. José Claudio Oliveira, Luciane Oliveira Muller proprietários da empresa JCO, pelo acesso ao Laboratório de Microbiologia para a realização dos experimentos, assim como os colaboradores Aline Santos Silva e Valmir de Souza Rosário.

A minha orientadora Daniela Rossato Stefanelo.

Aos meus coorientadores Flávia Arruda e Diego Guedes Sobrinho pelo incentivo, empenho, conselhos e dedicação ao longo dessa difícil caminhada.

A todos os professores que contribuíram com meu processo de formação acadêmica.

A minha família, pelo apoio e incentivo, em especial a minha mãe Rosineide Guedes Sobrinho, por estar sempre ao meu lado nos momentos difíceis, me fazendo acreditar que nada é tão grande quanto a minha fé. Ao meu pai Ivanilton de Carvalho Sobrinho por toda dedicação e esforço para que eu pudesse ter uma boa educação e assim podendo chegar até a minha sonhada graduação. Ao meu irmão Diego Guedes Sobrinho pelos “puxões de orelha” e por ser meu maior exemplo e inspiração. A minha cunhada Roberta Pereira Guimarães por sempre me incentivar e ajudar quando preciso.

A turma de Ciências Biológicas 2013.1 pelo acolhimento durante esses anos e as minhas colegas Adriana Maria, Danila Lima, Érika Queiroz e Patrícia Santana por toda ajuda no processo acadêmico.

Agradeço Alailton Silva, Thaynã Nascimento, Amanda Porto, Madslene Moreira, Sheila Rocha, Círio Felipe, Daiana Rocha, Felipe Brasileiro, Gustavo Gonçalves, Cauana Michele Araújo por toda ajuda, conselhos e força que pude ter de cada um.

Por fim, agradeço aos meus amigos Janderson Guimarães, Juliana Santos e Camila de Carvalho por terem sido “meu braço direito” durante esses anos de vida acadêmica, vocês fazem parte da minha história.

## RESUMO

Os fungos têm sido de grande importância no estudo da produção enzimática e obtenção de técnicas bioquímicas em procedimentos laboratoriais. As enzimas produzidas possuem um papel fundamental na degradação da matéria orgânica. Neste sentido, este estudo tem como objetivo principal avaliar qualitativamente a produção das enzimas quitina, lipase e protease (produzidas) em testes laboratoriais por fungos entomopatogênicos. A metodologia utilizada neste trabalho pautou-se no laboratorial de três espécies de fungos entomopatogênicos (*Beauveria bassiana*, *Isaria* e *Paecilomyces lilacinum*) no intervalo de 7 e 10 dias para obtenção dos resultados. Os resultados concluíram que o isolado *B. bassiana* 2 foi a espécie de fungo que produziu mais eficientemente atividade enzimática, em contrapartida os isolados *P. lilacinum* 2, 3 e 4 obtiveram os melhores resultados para as enzimas testadas.

**Palavras-chave:** Produção enzimática; Sistema metabólico; Microrganismos.

## **ABSTRACT**

Fungi have been of great importance in the study of enzymatic production and have been evaluated for biochemical techniques in laboratory procedures. As the enzymes produced being essential for the metabolic system of all living organisms, they play a fundamental role in the degradation of organic matter. In this sense, this study has as main objective to qualitatively evaluate the production of closed enzymes, lipase and protease (produced) in laboratory tests for entomopathogenic fungi. The methodology used in this work is not laboratory for three species of entomopathogenic fungi (*Beauveria bassiana*, *Isaria* and *Paecilomyces lilacinum*) without interval of 7 and 10 days to test the results. The results concluded that the isolate *B. bassiana* 2 of the fungus was a species of fungus that produced more efficiency of the enzymatic activity, in contrast to the students *P. lilacinum* 2,3 and 4, obtaining the best results for the tested enzymes.

**Keywords:** Enzymatic production; Metabolic system; Microorganisms.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: Montagem do experimento .....	18
Figura 2: Gráficos com porcentagens do índice enzimático para protease e lípase .....	20
Figura 3: Resultados qualitativos aos sete dias de crescimento fúngico .....	21
Figura 4: Resultados qualitativos aos dez dias de crescimento fúngico.....	22
Figura 5: Crescimento do halo nas placas de Petri .....	23

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.2 Enzimas produzidas por fungos.....	11
2.2 Fungos Entomopatogênicos.....	12
2.3 Uso de fungos entomopatogênicos.....	14
3 METODOLOGIA.....	17
3.1 Área de estudo.....	17
3.2 Procedimentos.....	17
3.3 Obtenção dos fungos.....	17
3.4 Obtenção do meio de cultura – Quitinase.....	17
3.5 Obtenção do meio de cultura – Lipase.....	17
3.6 Obtenção do meio de cultura-Protease.....	18
3.7 Montagem de experimentos.....	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5 CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS.....	25

## 1 INTRODUÇÃO

Os fungos têm sido de grande importância no estudo da produção enzimática e obtenção de técnicas bioquímicas em procedimentos laboratoriais com agentes entomopatogênicos. Esse grupo de microrganismos, como os micorrízicos vem contribuindo na implementação de tecnologias positivas aplicadas, principalmente em meios agropecuários no que diz respeito ao crescimento das plantas (FERREIRA, 2018). Os fungos dos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Nomuraea*, *Aschersonia* e *Entomophthora* têm sido largamente utilizados na produção de enzimas do tipo lipase, quitina e protease para ação microbiológica contra insetos ou pragas de plantação.

Desse modo, técnicas biotecnológicas em larga escala agropecuária se colocam como alternativas econômicas promissoras para o melhoramento da produção, o que requer estudos relativos a controle, monitoramento e desempenho metabólico. Portanto, considerando esse elencado de características para diferentes culturas de fungos, sua aplicação pode ser ampliada tendo em vista o tratamento mais adequado diante da necessidade do campo.

As enzimas são proteínas que atuam nas reações químicas, sendo essenciais para o sistema metabólico de todos os organismos vivos, possuem um papel fundamental na degradação da matéria orgânica (LEHNINGER, 1995).

Com relação à utilização de fungos com poder entomopatogênico e as enzimas por eles produzidas, considera-se uma boa alternativa para o combate às pragas e cuidado ao ambiente que esteja em grande desordem, ou acometidos por doenças fitopatológicas. Além disso, por serem microrganismos patógenos aos insetos, os fungos entomopatogênicos são utilizados com mais abundância para controle de pragas e insetos (ARAGÃO *et al.*; 2017).

Neste sentido, este estudo tem como objetivo principal avaliar qualitativamente a produção das enzimas quitina, lipase e protease (produzidas) em testes laboratoriais por fungos entomopatogênicos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.2 Enzimas produzidas por fungos

As enzimas são um grupo de substâncias proteicas, que apresentam atividades tanto intra quanto extracelular. Essas proteínas agem como catalisadoras de reações químicas e são de fundamental importância no sistema metabólico dos seres vivos. Devido a sua capacidade de catalisação, elas se tornam adequadas na aplicação industrial (ORLANDELLI *et al.* 2012).

Segundo Silva *et al.*, (2018) as enzimas extracelulares como protease e quitinases são pouco utilizadas, como se observa na literatura nos ambientes industriais, e são preteridas no que se refere aos outros tipos de enzimas como celulose, hemicelulose e lignina em processos biotecnológicos.

Para Nelson e Cox (2014) as enzimas aumentam a velocidade das reações diminuindo a energia de ativação sem alterarem o equilíbrio químico; são específicas, atuam por meio de sítio ativo; apenas em determinado substrato, são sensíveis a mudanças de pH e temperatura do meio, havendo assim um limiar ótimo no qual ocorre máxima atividade.

De acordo com Cuzzi *et al.*, (2011) os estudos sobre o potencial dos fungos e a produção de enzimas por estes, é de grande importância, visto que, a ampla utilização desse material enzimático tem contribuído em grande escala, principalmente como biocatalizadores, destacando as proteases e lipase que além de poder catalisador, tem grande variedade bioquímica.

A atividade enzimática produzida por fungos ou por sua associação são condições favoráveis, está diretamente ligada ao potencial industrial, recuperação ambiental, ou na biodegradação de matérias com função econômica, social e ambiental (SILVA, MALTA 2016).

É enorme a lista de enzimas produzidas por fungos, entre elas estão as amilases, proteases, quitinases, celulasas, lipases e muitas outras que possuem potencial para serem empregadas em diferentes funções. Levando o Brasil a ser um dos países de maior potencial de matéria orgânica, considerado autossuficiente, que poderia ser utilizada como substrato de baixo custo para fermentações (DABAJA *et al.*, 2019).

Estudos feitos por Costa (2017) indicam, que as enzimas produzidas por fungos podem ser consideradas essenciais para compreender uma série de atividades ou reações químicas, ou na decomposição de organismos do solo, como a degradação dos polímeros, ou nos estágios finais de enzimas, principalmente extracelulares.

Para Guimarães *et al.*, (2017), muitas enzimas produzidas por fungos têm relevantes aplicações em diferentes áreas, por isso se torna importante o isolamento de fungos, visto que, essas estruturas fornecem informações adicionais para pesquisas futuras, sobre o potencial desses microrganismos.

Segundo Crepaldi (2013) o gênero *Paecilomyces sp.* produz enzimas queratinolíticas para biodegradação de resíduos sólidos da indústria do couro, protease e enzimas fibrinolíticas, tem sido as principais enzimas produzidas por este fungo. Para Silva (2018), fungos como os da espécie *Paecilomyces lilacinus* são usados para obtenção de meios de cultura que proporcionam uma identificação favorável de enzimas, entre elas, protease e lipase se destacam.

Para Alves (2018) os fungos do gênero *Beauveria* são amplamente utilizados na obtenção de enzimas hidrolíticas (quitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, endocelulase e exocelulase), extremamente importantes no trato com insetos, eficiente para degradar a parede celular destes, trazendo resultados promissores àqueles que utilizam deste meio na agroindústria.

Enzimas extracelulares são mais comuns em fungos das espécies *Paecilomyces sp*, *Beauveria sp* e *Isaria sp*, que são responsáveis, em questões agroecológicas, responsáveis pela degradação do inseto ou da praga, com a capacidade de propagar e infectar seu hospedeiro (MORA; CASTILHO; FRAGA, 2016).

Acredita-se que as proteases produzidas por *Beauveria bassiana* exerçam papel chave para a hidrólise da cutícula na penetração do fungo pelo exoesqueleto de insetos, isso porque, é um dos entomopatogênicos mais abundantes na natureza e dos grandes produtores de enzimas como quitina e lipase (STURMER *et al.*, 2004).

## **2.2 Fungos Entomopatogênicos**

Os fungos apresentam características distintas de outros seres vivos, e por isso são classificados em um reino próprio, o Reino Fungi. Apesar de existirem formas unicelulares como o levedo, são organismos eucariontes e heterotróficos, que precisam de alimento e condições favoráveis para sobreviver (MORAES, 2016).

Os que atuam na produção das enzimas quitinases, proteases e lipases são considerados como entomopatogênicos. Tais enzimas são as mais comuns neste grupo, sendo mais utilizadas nos meios industriais como fonte de nutrientes e é facilmente aplicável em uma escala industrial (ARAGÃO *et al.*, 2018).

Os entomopatogênicos são utilizados principalmente no controle de insetos-praga. As atividades em condições compatíveis são bastante variáveis e os efeitos sobre as populações desses fungos em ambientes com determinado fator abiótico, como temperatura e intensidade de radiação, necessitam ser bem conhecidos, pois dependem desses aspectos para sua sobrevivência (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

A conservação de fungos entomopatogênicos no agroecossistema é considerada a estratégia mais simples e econômica de utilização desses microrganismos. Assim, produtos fitossanitários seletivos aos entomopatogênicos são necessários, diminuindo o impacto entre pragas e seus predadores, parasitoides e patógenos responsáveis pelo controle biológico natural (SOUZA; RIBEIRO; SILVA, 2019).

Para Mora *et al.*, (2015) o conhecimento da composição de espécies indígenas e distribuição de fungos patógenos de insetos são essenciais para avaliar o potencial do controle biológico em um ecossistema específico, e a presença dessas espécies pode ser considerada como um indicador da sua capacidade de sobreviver nesse ambiente.

Existem vários relatos sobre fungos entomopatogênicos que atacam insetos na agricultura, os considerados mais importantes para o controle biológico de pragas são pertencentes aos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Nomuraea*, *Aschersonia* e *Entomophthora* (MEDEIROS *et al.*, 2016). Lopes *et al.*, (2017) destacam o uso de fungos entomopatogênicos como *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* os mais utilizados no combate aos insetos, conhecidos mundialmente.

Moreira *et al.*, (2017) relatam que o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* tem sido utilizado no controle biológico de cigarrinhas que atacam pastagens e cana de açúcar, sendo este um dos programas mais antigos, no qual foram realizados estudos de coleta e seleção de isolados com diferentes graus de virulência, de especificidade para cada praga visada e de adaptação a condições ambientais diversas, já o outro fungo mais utilizado é da espécie *Beauveria bassiana* é comumente encontrado no solo, uma das mais estudadas, provavelmente por sua alta distribuição geográfica e da variedade de seus hospedeiros.

### 2.3 Uso de fungos entomopatogênicos

Segundo Araújo (2018) os fungos entomopatogênicos são microrganismos aptos a colonizar insetos e promover sua infecção em ambiente natural, sendo um eficiente agente no controle de insetos-praga. No entanto, sua utilização ainda é pouco explorada, quando comparado aos inseticidas químicos.

Para Chagas *et al.*, (2016) o novo direcionamento da produção agrícola é a produção de técnicas de menor impacto ambiental no combate de pragas, onde por meio de métodos alternativos como a utilização de fungos entomopatogênicos, garantem o uso sustentável da biodiversidade.

De acordo com Brito (2019) os fungos entomopatogênicos associados a plantas como o NIM (*Azadirachta indica*) pelo fato de não serem prejudiciais ao alimento e nem ao ambiente são boas estratégias para o afastamento de insetos invasores e substitutos naturais para a opção dos agrotóxicos.

Os fungos entomopatogênicos são agentes casuais de doenças de inúmeros artrópodes e apresentam uma grande importância na regulação natural de populações de insetos e ácaros pragas. O emprego desses fungos na agricultura é crescente, principalmente em virtude da expansão da agricultura orgânica e aumento da demanda por alimentos isentos de resíduos de agrotóxicos (MASCARIN; QUINTELA, 2013).

Damim *et al.*, (2011) apontam que o controle biológico de um produto agrícola está numa perspectiva sustentável da utilização de fungos entomopatogênicos através de um fenômeno que acontece na natureza de forma natural, e que consiste na regulação do número de plantas e animais por inimigos naturais.

Conforme Magalhães (2016) esses organismos são ótimas alternativas para a agricultura, tendo em vista seu amplo uso e eficiência no controle de pragas agrícolas, isso porque são patógenos causadores de doenças nos insetos e consequentemente, responsáveis por sua mortalidade.

Segundo Ribeiro *et al.*, (2019) a principal dificuldade para o uso desses microrganismos em algumas regiões do país são as altas temperaturas e baixos índices de pluviosidade em algumas épocas do ano, sendo que estas condições climáticas podem causar a morte do conídios (estrutura de dispersão do fungo), antes mesmo da germinação. Este fator restringe o uso dos patógenos apenas em períodos com irrigação ou cultivo protegido.

Outro fator importante que afeta a sobrevivência dos fungos, é a condição climática, pois, ambientes com altas temperaturas, podem prejudicar a reprodução dos mesmos, ao passo que baixas temperaturas aumentam sua persistência. Sendo assim, a eficiência das atividades se caracteriza por meio das condições compatíveis (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

O uso dos fungos entomopatogênicos no controle biológico é uma alternativa principalmente no controle de pragas da fruticultura, pois controlam a população de ácaros que podem causar danos, como, desfolhamento, atrofiamento e a até a morte das plantas (VENZON *et al.* 2016). Pode ser utilizado no solo para o controle de pupa das moscas-das-frutas, também por ser inofensivo para o meio ambiente e o homem (SILVA *et al.*, 2016).

Estudos feitos por Almeida *et al.*, (2016) apontam que os fungos da espécie *P. lilacinus* são importantes para controle de insetos, no tratamento de sementes de café, associados também no sistema radicular. Para Lopes *et al.* (2018) a utilização de fungos entomopatogênicos como o da espécie *Isaria farinosa*, permite que seus conídios em contato com os insetos invasores de plantações, interfira em suas ações que, em associação com enzimas específicas, possam degradar o corpo do hospedeiro.

Para Orlandelli (2011) a eficácia dos fungos entomopatogênicos depende da aplicação e da quantidade aplicada, onde o ideal é que seja aplicado na parte da tarde, quando há menos incidência de raios ultravioleta, e, preferencialmente, logo após as chuvas. Tonando-se vantajosa no que diz respeito a facilidade de aplicação em condições de campo, o baixo custo decorrido de sua utilização, e, principalmente reduzindo o impacto ambiental.

Martins *et al.*, (2017) destacam que *Beauveria bassiana* tem eficiência comprovada no que se refere a associação com enzimas e sua efetividade no controle de pragas e insetos, e sua utilização pode ser uma ótima alternativa para a substituição de agrotóxicos ou produtos lesivos aos seres humanos.

Os entomopatogênicos tem sido utilizados de forma eficiente na indústria agrícola, pode-se destacar exemplos como *Isaria sp.*, *Paecilomyces sp.*, e *Beauveria sp.*, pois seu isolamento e manejo estratégico impõe condições virulentas para pragas que venham acometer plantações (MEDEIROS, 2016).

O potencial epizootico de alguns fungos como *Isaria sp.* limita o crescimento populacional de algumas pragas como a mosca-branca, são capazes de infectar ativamente

pela cutícula de seus hospedeiros, uma vantagem para o controle de insetos sugadores, são responsáveis pela paralisia desses insetos (FIGUEIREDO, 2018).

Segundo Paula *et al.*, (2017) os fungos entomopatogênicos podem até combater endemias como a dengue, o fato é que os mesmos são virulentos contra larvas do mosquito *Aedes. aegypti*, principalmente os da espécie *Metarhizium anisopliae*, onde a aplicação de fungos para infecção de mosquitos adultos precisa ocorrer em superfícies atrativas para o pouso dos mosquitos, promovendo a adesão dos conídios no tegumento. essas superfícies impregnadas com fungo têm que ser colocadas em pontos estratégicos, por exemplo, em residências, com aceite do chefe da casa e em locais que não incomode o morador.

Para Bastos *et al.*, (2017) o uso de entomopatogênicos tem sido uma alternativa viável no controle de insetos-praga, na cidade de Vitória da Conquista no Estado da Bahia o fungo da espécie *Beauveria bassiana* vem sendo utilizado para o controle biológico de cupins, isso porque, tem mostrado a sua eficiência no contato direto com o inseto, uma vez que os seus conídios (esporo assexua) germinam e penetram na sua cutícula, colonizando os órgãos internos do mesmo. Além disso, durante o processo de infecção ocorre liberação de toxinas no interior do inseto, levando-o a morte.

A forma de infecção dos fungos entomopatogênicos apresenta-se diferente de outros bioinseticidas microbianos, como bactéria e vírus, que necessitam ser ingeridos pelo inseto para seu desenvolvimento. Os fungos atravessam o exoesqueleto protetor e alcançam a hemolinfa onde se multiplicam causando infecção e morte do hospedeiro. Os conídios germinam e aderem à cutícula desenvolvendo apressórios infectantes que produzem e liberam enzimas extracelulares como proteases, lipases e quitinases (BIDOCHKA *et al.*, 1997). A cutícula dos insetos é constituída por uma barreira muito eficiente contra a penetração de muitos microrganismos entomopatogênicos. Essa barreira é formada basicamente por 95% de lipídeos, aminoácidos e aminoaçúcares, que servem como fonte de nutrientes e para o crescimento do fungo. Na procutícula os principais componentes são proteínas (61%), quitina (30%), e de lipídeos (7%) (FERNANDES, 2010).

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 Área de estudo**

Para o desenvolvimento deste estudo foi utilizado o Laboratório de Microbiologia da JCO Sustentabilidade no Campo, situado no endereço Rua Sergipe, Bairro Morada Nobre, nº1323, na Cidade de Barreiras-BA. A sede do município fica a uma altitude de 430 m, o clima divide-se em duas estações bem estabelecidas, secas e abafadas, e com precipitação, temperaturas que variam de 18° C a 36° C (IBGE CIDADES, 2017).

#### **3.2 Procedimentos**

#### **3.3 Obtenção dos fungos**

Foram utilizados os fungos entomopatogênicos, das espécies *Paecilomyces lilacinus*, *Beauveria bassiana* e do gênero *Isaria*, todos pertencentes à coleção de cultura da empresa JCO Fertilizantes para quantificação das enzimas Quitina, Lipase e Protease produzida pelos mesmos. Os fungos foram mantidos em meio BDA (batata + dextrose + ágar), por dez (10) dias.

#### **3.4 Obtenção do meio de cultura – Quitinase**

Para obtenção do meio de cultura quitina, foram utilizados os seguintes reagentes: [600 mg Fosfato de potássio (KHPO<sub>4</sub>), 400mg de fosfato de Potássio (PO<sub>4</sub>), Fosfato de monobásico (Na H<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>), 7,5 (mg MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O), 7,5 mg de Zinco (Zn), 3.000 mg de Quitina, 18.000 mg Ágar, 1000 ml de água destilada.

O tempo de esterilização do meio de cultura foi de 20 minutos e a temperatura de 121 C °.

#### **3.5 Obtenção do meio de cultura – Lipase**

A enzima Lipase foi isolada utilizando 10.000 mg Peptona, 5.000 mg de Cloreto de sódio (NaCl), 20.000 mg- Ágar, 100 mg- de Cloreto de Cálcio (CaCl<sub>2</sub>) água (H<sub>2</sub>O) ou Carbonato de Cálcio (CaCO<sub>2</sub>), 1L de água destilada. Foi realizada a calibragem do pH para

7,2 (próximo da escala de neutralidade), com auxílio de pHmetro. O meio de cultura foi nas mesmas condições citadas anteriormente.

### 3.6 Obtenção do meio de cultura - Protease

O procedimento da enzima Protease contou com 7.500 mg de ágar meio de cultura e 8.000 mg de leite em pó desidratado. No meio para protease o Ágar-ágar foi esterilizado separadamente do leite, evitando assim a sua caramelização. Posteriormente, o leite desnatado foi adicionado ao meio (quanto se encontrava em temperatura de 40°C aproximadamente) em condição asséptica. Após completa homogeneização o meio foi vertido em placas de Petri.

Todos os fungos foram crescidos em meio BDA (Batata + Dextrose + Ágar). Esse método foi estabelecido por Riker e Riker (1936), e é frequentemente utilizado para comprovar a eficiência no cultivo de fungos. Este meio é bastante utilizado com a finalidade de auxiliar na contagem de fungos e leveduras.

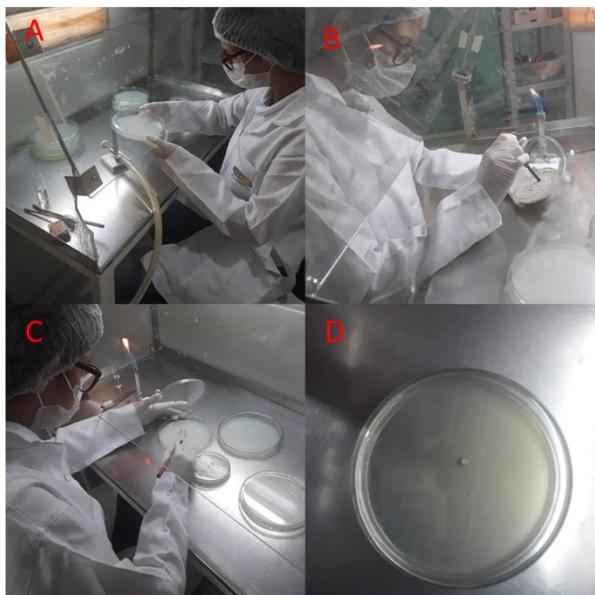
### 3.7 Montagem do experimentos

Para a avaliação da produção de enzimas pelos fungos entomopatogênicos, foi realizado o seguinte procedimento: utilizou-se uma placa de cada fungo (*P. lilacinus*, *Beauveria e Isaria*) para cada enzima testada (Quitina, Lipase e Protease) em três repetições. Em seguida, o disco com meio de cultura contendo a cultura fúngica foi removido e colocado no interior da placa contendo os meios específico para cada enzima. Após a montagem do experimento as placas foram flambadas e fechadas com papel filme para evitar possíveis contaminações. Todo processo foi realizado dentro da capela (Figura 1). O material permaneceu em sala de crescimento durante 10 dias. A determinação da atividade enzimática foi feita medido o diâmetro (mm) do halo no reverso da placa, com auxílio de uma régua. O Índice enzimático (IE) foi determinado seguindo a metodologia de Lima (2006), dado pela forma:

$$(IE) = \frac{\text{Diâmetro enzimático}}{\text{Diâmetro do disco}}$$

Um microrganismo para ser considerado produtor tem que ter o IE maior ou igual 2,0 (Soares *et al.*, 2010).

**Figura 1:** Montagem do experimento. A) placas com meios específicos para cada enzima; B) fungos entomopatogênicos utilizados; C) adição dos discos ao centro das placas; D) placa com o disco contendo o fungo.



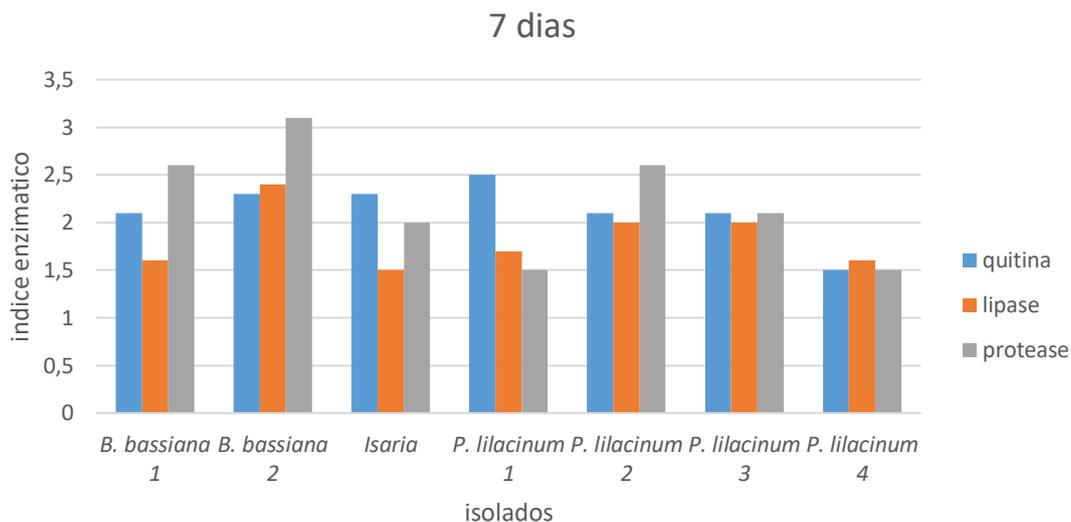
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o crescimento máximo dos fungos, 10 dias, associados às enzimas, observou-se resultados positivos para as três enzimas testadas, sendo os melhores resultados para quitina (100%) seguido por protease (86%) e lipase (57%) figura 2. O mesmo ocorre nos estudos de Colen, Junqueira e Moraes (2006), que avaliaram a produção de lipases como este trabalho, onde das 25 cepas fúngicas isoladas, 84% (21), apresentaram resultados satisfatórios, assim como os estudos de Da Silva *et al.*, (2016), que dos 16 fungos testados quanto a presença de lipases, 12 (75% dos isolados) apresentaram resultados positivos.

**Figura 2:** gráficos com porcentagens do Índice Enzimático para protease e lipase.



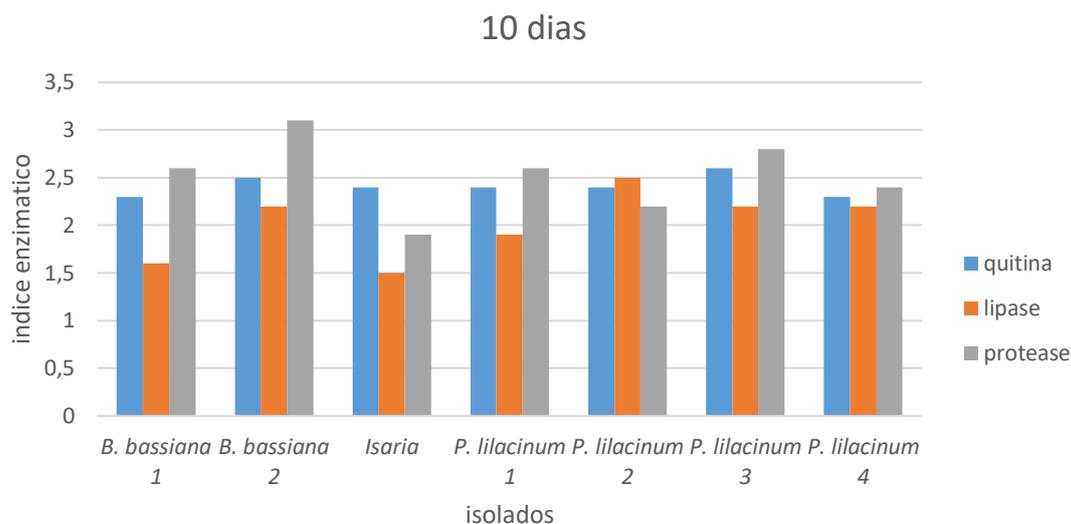
Verificou-se que no período experimental de 7 dias entre os 10 dias de crescimento, os fungos obtiveram resultados positivos com destaque para o isolado *B.bassiana* 2 associado as enzimas testadas, desempenhou os melhores resultados atingindo valores de 2,3mm; 2,4mm e 3,1mm para quitina, lipase e protease respectivamente.

**Figura 3:** Resultados qualitativos aos 7 dias de crescimento fúngico.

Os resultados corroboram com os dos experimentos de Chamy (2017), onde das 14 amostras, 13 alcançaram resultados eficientes, para produtores de enzimas extracelulares de interesse biotecnológico.

Costa (2014) em seus estudos, avaliou a produção de enzimas por fungos, e dos 235 fungos testados, em seu experimento, 94% produziu pelo menos uma das enzimas testadas, sendo amilase, celulase, polimetilgalacturonase e xilanase. Deste percentual, 72% deram resultados positivos para a enzima celulase.

Quantos aos experimentos realizados no período corrente de 10 dias, os resultados se assemelharam ao teste anterior, de modo que o isolado *B. bassiana* 2 alcançou os melhores índices de produção de enzimas, sendo a enzima protease a mais produzida, alcançando a quantidade 3,1mm na escala enzimática. Os isolados de *P. lilacinum* 2, 3 e 4 atingiram índices enzimáticos acima de 2,0 mm, indicando serem bons produtores para as três enzimas. Para o isolado do fungo *Isária*, não houve diferença nos índices enzimáticos entre os dois períodos de dias avaliados.

**Figura 4:** Resultados qualitativos aos 10 dias de crescimento fúngico.

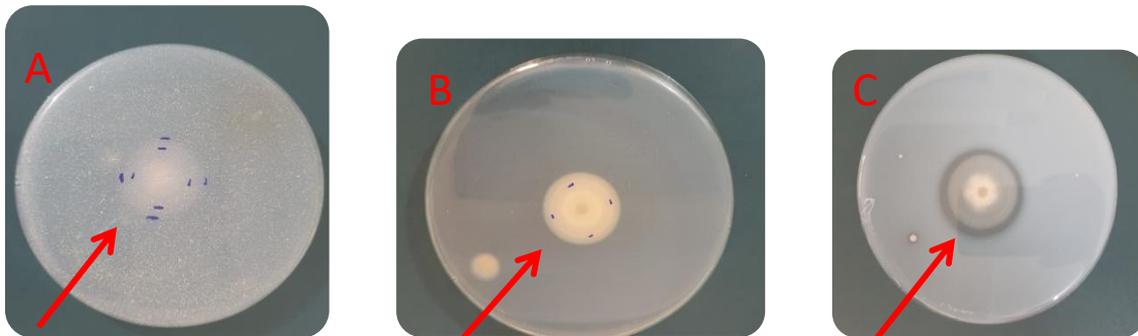
Estes resultados divergem com os estudos de Coelho *et al.*, (2016) onde aponta que dos 14 fungos isolados, apenas 3 foram positivo para a produção de enzima protease. Werneck (2016) entende que analisar qualitativamente a produção enzimática de fungos se faz necessário, pelo fato de que a grande maioria apresenta alguma atividade, tendo em vista a grande maioria dos resultados encontrados em bibliografias pesquisadas.

Segundo Quirós; Langer; López-Otín, (2015) o estudo da produção de enzimas por fungos é importante, pois são funções de grande valia, com o papel de catalizadores biológicos em grandes processos biotecnológicos e industriais.

Os biomas brasileiros são responsáveis por uma grande variedade de microrganismos, devido a esse potencial microbiológico imensurável, essa aplicabilidade torna-se viável os experimentos e a seleção de novas linhagens de interesse enzimático (CHAMY, 2017).

Em relação a apresentação de halos anéis brancos nos experimentos, foi constatado de acordo as imagens abaixo o crescimento desse material, onde demonstra os diversos estágios do material em crescimento até sua degradação.

**Figura 5-** Crescimento do halo nas placas de petri. A) Placa de Petri com crescimento inicial do halo. B) Placa de Petri, primeira esporulação. C) Placa de Petri com crescimento do halo evidente.



Segundo Silva (2018) para uma boa identificação de isolados fúngicos e das reações enzimáticas, é necessária a formação de halo translúcido ou esbranquiçado, sem a necessidade de adição de nenhum revelador.

Para Junior (2018) a homogeneização e a limiarização são processos responsáveis pela observação de halos sejam eles miceliais ou pigmentares, e que dependam da identificação de regiões contíguas e inteiras com padrões de propagação já definidos, bem como a propagação do micélio reprodutivo ou aéreo, composto por esporos que ficam geralmente na superfície da placa.

## 5 CONCLUSÃO

Dos ensaios realizados com os fungos entomopatogênicos das espécies *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces lilacinum* e do gênero *Isaria* todos mostraram-se eficientes na produção de enzimas extracelulares, quitina, lipase e protease. Esses resultados indicam a aplicação desses fungos no controle biológico uma vez que essas enzimas se encontram presentes no exoesqueleto dos insetos-pragas.

## REFERÊNCIAS

- ACOSTA, R. *et al.* Enzimas hidrolíticas (DNAses, lipases e proteases) secretadas por *Cladosporium cladosporioides* isolado de solo e seu potencial de aplicação em biotecnologia. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v.3, p.61-65, 2017.
- ALMEIDA, J. A. SOUZA, J. C.; ARAUJO, F. G.; Tratamento de sementes com abamectina e *Paecilomyces lilacinus* no manejo de *Heterodera glycines* na cultura da soja. **Multi-Science Journal**. v. 1, p. 62-65, 2016.
- ALVES, E. A.; **Produção e concentração de enzimas hidrolíticas a partir de *Beauveria bassiana***. 2018. 128f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Maria, 2018.
- ARAGÃO, T. M. S.; Produção de enzimas por fungos entomopatogênicos em fermentação submersa utilizando resíduo agroindustrial e sua aplicação como bioinseticida. *In*: SEMANA DE PESQUISA DA UNIVERSIDADE TIRADENTES, 19. 2016. **Anais...** Aracajú, SE. 2016.
- ASSIS, J. M. F.; COSTA, P. H. F.; Ação do fungo metarhizium anisopliae sorokin, no controle das cigarrinhas-das-pastagens: *Deoisflavopictastal*. **Revista Intercursos**, v. 9, n.1, 2010.
- BASTOS, T. R. S. *et al.* Ação do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* contra o cupim arbóreo *Nasutitermes sp.* **Cadernos de Agroecologia**, v. 13, n. 1, 2017.
- BRITO, E.G. *et al.*; Efeito da atividade inseticida de *Azadirachta indica* e do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* no controle de *Tenebriomolitor*. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOSSANIDADE, 5. 2019. **Anais...** Belém, PA.
- CHAGAS, F. *et al.* Controle biológico em sistema orgânico de produção por agricultores da cidade de Maringá (Paraná, Brasil). **Ciência e Natura** v. 38, n. 2, p. 637- 647. 2016.
- CHAMY, M. N. C. L.; **Identificação de fungos produtores de enzimas extracelulares de interesse biotecnológico associado às formigas cortadeiras *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758)**. 2017. 73f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia). Universidade do Amazonas. Manaus, 2017.
- COELHO, D. F. *et al.* Azocasein Substrate for Determination of Proteolytic Activity: proteases in health, ageing and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology International**, v. 2016, p. 1-7. 2016.
- COLEN, G.; **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. 2006. 207f. Tese (Doutorado em Ciências de alimentos) Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte. 2006.
- COSTA, R. R. ; **Perfil enzimático e potencial biotecnológico de fungos isolados de jardins das formigas cortadeiras**. 2014. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Universidade Estadual Paulista. Rio Claro. 2014.
- CREPALDI, A. U. *et al.*; Degradação de escamas de peixe por fungos do gênero *Paecilomyces*. **Revista Magistra**, v.29, p.346-355, 2013.
- DABAJA, M. Z.; *et al.* Avaliação da atividade enzimática de fungo endofítico isolado de *annona crassiflora* (marolo) com interesse biotecnológico. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**. v. 17 , n. 1, 2019.
- DAMIN, S.; *et al.* Ação de fungicidas sobre o crescimento do fungo entomopatogênico *Metarhizium sp.* **Revista Acadêmica Ciências Agrárias Ambiental**. v. 9, n. 1, p. 41-49, 2011.
- FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P.; O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. n. 22, 2001.

- FERREIRA, A. L. Uso de fungos e bactérias em culturas agrícolas é tema de evento internacional em Foz do Iguaçu. Embrapa, 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/36931285/uso-de-fungos-e-bacterias-em-culturas-agricolas-e-tema-de-evento--internacional-em-foz-do-iguacu>. Acesso em: 06/ mar. /2020.
- GOMES, V. D. S. *et al.* Utilização de enzimas exógenas na nutrição de peixes -revisão de literatura. **Arquivos Ciências Veterinária Zoologia**. v. 19, n. 4, p. 259-264, 2016.
- GUIMARÃES, L. H. S. *et al.*; Seleção de fungos filamentosos para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 37, n. 4, 2006.
- JUNIOR, M. M. S.; **Aplicação de técnicas de processamento e análise digital de imagens para a caracterização fisio-mortológica do fungo *Monascus ruber***. 2018. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.
- LIMA, A. R. S.; **Produção de pectinases por *Aspergillus* e classificação de suco de camu-camu com poligalacturonases e pectinesterases**. 2006. 85f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2006.
- LIMA, E. E. **Produção, Caracterização Bioquímica de Proteases Produzida por Fungos Filamentosos e Aplicação Biotecnológica**. 2016. 92f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, 2016.
- LOPES, R. S. *et al.* Controle biológico e alternativo de *Dactylopius opuntiae* por fungo entomopatogênico e extratos vegetais em plantação de *Opuntia ficus-indica* (Pernambuco-Brasil). **Revista Pesquisa Agropecuária**. v. 23, n. 21, p. 1-4. 2018.
- MASCARIN, G. B.; **Técnica de produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* para uso em controle biológico**. Ed. 21. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, p. 18. 2013.
- MEDEIROS, F. R. **Patogenicidade de fungos a mosca-negra-dos-citros e compatibilidade entre agrotóxicos e *purpureocillium lilacinum***. 2016. 86f. Tese (Doutorado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2016.
- MEDEIROS, G. D. *et al.* Identificação e controle de fungos entomopatogênicos presentes em uma coleção entomológica. **Revista Mutivelemas**. n. 35, p.179-188, 2007.
- MENEZES, C. P.; DE LIMA PEREZ, A. L. A.; OLIVEIRA, E. L.; *Cladosporium spp*: Morfologia, infecções e espécies patogênicas. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 1, p. 23-27, 2017.
- MORA, M. A. E.; CASTILHO, A. M. C.; FRAGA, M. E.; Fungos entomopatogênicos: enzimas, toxinas e fatores que afetam a diversidade. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. v. 18, n. 3, p. 335-349, 2016.
- MOREIRA, F. J. C. *et al.* Controle de *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera Curculionidae) com os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em banana. **Revista Verde**. v. 12, n.3, p.366-373, 2017.
- OLIVEIRA, M. T. *et al.* Sensibilidade de isolados de fungos entomopatogênicos às radiações solar, ultravioleta e à temperatura. **Arquivos Instituto Biológico**. v. 83, p. 1-7. 2016.
- ORLANDELLI, R. C. *et al.* Enzimas de Interesse Industrial: Produção por Fungos e Aplicações. **Revista Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p. 97-109. 2012.
- ORLANDELLI, R. C. Fungo entomopatogênico *metarhizium anisopliae* como agente de controle biológico de insetos pragas. **Revista Saúde e Biologia**. v. 6, n. 2, p.79-82, ago, 2011.
- PAULA, A. R.; Uso de fungo entomopatogênico para controle de *aedes aegypti* no condomínio mondrian life, Campos dos Goytacazes – RJ. In: ENCONTRO LATINO

- AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10, 2018. **Anais...** Campos dos Goytacazes, RJ. 2017.
- QUIROS, P. M.; LANGER, T.; LOPEZ-OTIN, C. New roles for mitochondrial Reexamining a Traditional Method Using Bromelain Samples. **Bio Med Research**
- RIBEIRO, P. F. F.; Biotecnologia na agricultura: uso de inerte para aumentar a persistência de microrganismo benéfico em condições hostis de campo. *In*: SIMPÓSIO NACIONAL DE TECNOLOGIA EM AGRONEGÓCIO, 11. **Anais...** Ourinhos-SP. 2019.
- SIA, E. S. **Meios de cultura alternativos para fungos utilizando diferentes substratos, especialmente de mandioca (*Manihotesculenta*)**. 2012. 88f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012.
- SILVA, C. J. A.; MALTA, D. J. N.; A importância dos fungos na biotecnologia. **Ciências biológicas e da saúde**. v. 2, n. 3, p. 49-66, 2016.
- SILVA, C. S. *et al.* Aplicando cepas de fungos entomopatogênicos em solo natural para o controle de *Ceratitits capitata*. *In*: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMIÁRIDO. 13, 2017. **Anais...** Feira de Santana, BA.
- SILVA, C. T. A. *et al.* Fungos filamentosos entomopatogênicos com potencial para produção de enzimas hidrolíticas extracelulares. *In*: CONGRESSO NACIONAL DE BIÓLOGOS. 2018. **Anais...** João Pessoa, PB.
- SILVA, M. A. **Quantificação, identificação e bioprospecção de fungos cultiváveis, de solo em recuperação, no semiárido Pernambucano**. 2018, 56f. Monografia apresentada como pré-requisito para conclusão do curso Bacharel em Ciências Biológicas, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Serra Talhada, 2018.
- SOARES, I. *et al.*; Identificacao do potencial aminolíticos de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. *Ciencias e Tecnologia de Alimentos*. v. 30, n. 3, p. 700-705. 2010.
- SOLINO, A. J. S. Potencial antagonista e controle *in vitro* de *Alternaria solanipor* fungos sapróbios. **Summa Phytopathol.** v. 43, n. 3, p. 199-204, 2017.
- SOUZA, H. N.; RIBEIRO, M. F. SILVA, R.Z.; Compatibilidade entre defensivos naturais e o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (*bals.*). *Vuill. Revista Magistra*, v.30, p. 60-67, 2019.
- SOUZA, J. B. *et al.* Atividade enzimática de fungos endofíticos isolados de plantas medicinais e aromáticas. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental** . v. 13, p. 05-22, 2019.
- STURMER, A. T. *et al.* Estabilidade de proteases produzidas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. **Ciências Biológicas da Saúde**. v. 6, n. 1, p. 85-88, 2004.
- WERNECK, G. C.; **Produção de proteases por fungos endofíticos isolados de plantas do cerrado**. 2016. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade de Brasília. 2016.