

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

Geisi Maria Henrique da Silva

**FIBRA DA ALGAROBA: UM SUBSTRATO ALTERNATIVO PARA A PRODUÇÃO
DE CONÍDIOS E ENZIMAS HIDROLÍTICAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS**

JOÃO PESSOA
2017

Geisi Maria Henrique da Silva

**FIBRA DA ALGAROBA: UM SUBSTRATO ALTERNATIVO PARA A PRODUÇÃO
DE CONÍDIOS E ENZIMAS HIDROLÍTIICAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso, do Curso Superior em Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, como requisito parcial para obtenção do Título de Biotecnologista.

Orientadora:

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

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Andréa Farias de Almeida

JOÃO PESSOA/PB

2017

Catálogo na publicação
Biblioteca Setorial do CCEN/UFPB
Josélia M.O. Silva – CRB-15/113

S586f Silva, Geisi Maria Henrique da.
Fibra da algaroba: um substrato alternativo para a produção de conídios e enzimas hidrolíticas por fungos filamentosos / Geisi Maria Henrique da Silva. – João Pessoa, 2017.
63 p. : il. color.

Monografia (Bacharelado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Paraíba.
Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Adna Cristina Barbosa de Sousa.
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Andréa Farias de Almeida.

1. Hidrolases. 2. Fermentações hidrolíticas. 3. Fibra da algaroba – controle biológico. 4. *Metarhizium anisopliae*. 5. Enzimas extracelulares. 6. Fungos filamentosos. I. Título.

UFPB/BS-CCEN

CDU 577.152.3(043.2)

Geisi Maria Henrique da Silva

**FIBRA DA ALGAROBA: UM SUBSTRATO ALTERNATIVO PARA A PRODUÇÃO
DE CONÍDIOS E ENZIMAS HIDROLÍTIICAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) submetido ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovado em: 02 de junho de 17.

BANCA EXAMINADORA

Adna Cristina Barbosa de Sousa
Prof.^a Dr.^a Adna Cristina Barbosa de Sousa (UFPB – Centro de Biotecnologia)

(Orientadora)

Sharline Florentino de Melo Santos
Prof.^a Dr.^a Sharline Florentino de Melo Santos (UFPB – Centro de Tecnologia)
(Examinadora)

Kristerson R. de Luna Freire
Prof. Dr. Kristerson Reinaldo de Luna Freire (UFPB – Centro de Biotecnologia)
(Examinador)

Dedico este trabalho a DEUS, que me fez e à quem tributo todo o meu ser, e a minha família, que com amor indelével me incentivaram e impulsionaram à alcançar essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Manifesto minha gratidão ao **Deus** sempiterno, pela sua misericórdia e graça que me alcança de modo admirável, de tal modo que me fez poder ter essa oportunidade de ingressar e concluir um curso superior.

Agradeço à instituição, **Universidade Federal da Paraíba** pelo espaço e a estrutura indispensável para realização deste trabalho.

Agradeço de modo especial à minha orientadora, **Dr^a Adna Cristina Barbosa de Sousa**, a qual desde o início dessa minha jornada acreditou em mim e me proporcionou várias oportunidades de crescimento no curso, que foram de fundamental importância.

À minha co-orientadora **Prof^a. Dr^a. Andréa Farias de Almeida**. Muito obrigada por suas ricas instruções e direcionamentos que foram cruciais para esse trabalho.

À **minha família** pelos seus incentivos e apoios incomparáveis, que me deu forças para chegar até o fim dessa etapa na minha vida, e que dá sentido a todo esse meu empenho em continuar a alcançar os meus objetivos. São esses, minha mãe, **Geísa**, meu Pai, **Juscelino** e meus Avós, **Geraldo e Maria**.

Ao meu amado esposo **Izaías Henrique da Silva Júnior** pelo seu companheirismo, cuidado e encorajamento que foram cruciais nos momentos difíceis dessa caminhada. Mas também pela sua atenção e regozijo junto a mim nas minhas conquistas e momentos felizes.

À banca avaliadora, **Prof^a. Dr^a. Sharline Florentino de Melo Santos e Prof. Dr. Kristerson Reinaldo de Luna Freire** por atender ao convite de contribuir com esse trabalho através das avaliações.

Aos meus colegas do Laboratório LAGEMOL: **Tarcísio, Nathália, Hércules, Laísa, Gillana, Caroline, Rafael, Ray**; como também aos do laboratório LEBp: **Arauana, Jefferson, Emanuela, Débora, Brena**. Pelo ambiente laboratorial ter se tornado um espaço agradável e de cumplicidade, em razão do sentimento de cooperação compartilhado por todos.

Aos **professores do Centro de Biotecnologia** que impactaram a minha vida de forma individual e singular. Em especial sou grata ao **Prof. Dr. Kristerson Reinaldo de Luna Freire**, por ter dado a mim a oportunidade de realizar o projeto de iniciação científica, mas também pelo seu auxílio e conselhos, talvez até inintencional, num momento difícil de minha vida.

Ao meu grupo de amigos: **Rebeca, Jéssica, Anderson, Rayanne, Benjamim, Cleiciany, Fábio, Jaqueline, Carol, Danilo, Sérgio e Rafael**. Esse grupo que desde a infância juntam conquistas, desafios, alegrias, sonhos realizados, e sou grata por este momento ser mais um que compartilho com vocês.

À **MAXIMIZE**, empresa Júnior de Biotecnologia, em especial à **Albanísia, Anna Julyana, Cely, Tereza, Rafael Xavier**, pela grande e única oportunidade de conhecer o empreendedorismo e o trabalho coletivo na prática, e de poder ter contribuído, mesmo que minimamente, na construção desse sonho que hoje é realidade.

Por fim, e não menos importante, aos **amigos** que ganhei ao longo desses quatro anos, período marcante em minha vida. Em especial as amizades que floresceram, onde desejo levar para toda vida.

“O conhecimento traz consigo a solene
responsabilidade de nos fazer agir com base no
saber que temos”.

John Stott

RESUMO

Metarhizium anisopliae é um fungo entomopatogênico amplamente utilizado no controle biológico de insetos-praga da agropecuária. Seu processo de infecção compõe uma sequência de eventos mecânicos e bioquímicos, dos quais há a produção de enzimas e toxinas de alta importância para o processo de colonização do hospedeiro. Sabendo disso, é de grande relevância os estudos que demonstrem a produção em larga escala de *M. anisopliae* tanto visando o controle biológico de pragas como da produção de enzimas importantes para processos biotecnológicos. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo analisar o potencial de utilização da algaroba para conidiogênese e para produção de enzimas hidrolíticas (celulases, proteases, invertases e amilases) a partir do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, por fermentação em estado sólido. Os experimentos para produção e viabilidade dos conídios foram realizados em triplicata, em erlernmeyer (250 mL) contendo 30 g de cada substrato, 0,3 mL da suspensão de conídios (1×10^8 conídios/mL), umidade de $70 \pm 10\%$ e temperatura ($T = 29 \pm 1^\circ \text{C}$). Após 10 dias de inoculação, houve uma alta produção de conídios viáveis. A patogenicidade destes conídios foi avaliada nas formigas cortadeiras, que demonstrou uma alta taxa de mortalidade (100%) no quinto dia. A atividade celulolítica, amilolítica, invertase foi determinada pelo método DNS (ácido dinitrosalicílico). A atividade proteolítica foi determinada pelo método utilizando azocazeína e ácido tricloacético (TCA). Os extratos brutos do processo fermentativo mostrou atividade amilolítica (6,627 U/g às 72 horas de produção); exoglucanase (46,20 U/g às 72 horas); endoglucanase (97,74 U/g às 96 horas); invertase (37,2 U/g às 240 horas) e proteolítica (175,8 U/g às 240 horas). Além disso as proteínas totais solúveis comprovaram a alta produção enzimática, por demonstrar um aumento quantitativo ao longo da fermentação. As enzimas amilolíticas, endoglucanase e exoglucanase foram submetidas a variações de temperaturas em busca da temperatura ótima e análise da estabilidade térmica. As amilases mostraram uma melhor atividade enzimática na temperatura de produção (30°C), porém não mostraram termoestabilidade. Já as enzimas celulolíticas CMCase e FPase demonstraram uma melhor atividade a 50° e 65°C , respectivamente. Além disso, mostraram-se estáveis nessas condições, ao longo de 60 minutos. A algaroba mostrou-se ser um substrato alternativo para o crescimento e esporulação de *M. anisopliae* visando à produção de conídios para controle biológico de formigas cortadeiras. Além disso, é um substrato potencial para a produção de enzimas hidrolíticas microbianas com vasta aplicação em diversos processos biotecnológicos.

Palavras chave: controle biológico, *Metarhizium anisopliae*, enzimas extracelulares, fermentação.

ABSTRACT

Metarhizium anisopliae is an entomopathogenic fungus widely used in the biological control of agricultural insect pests. Its infection process comprises a sequence of mechanical and biochemical events, of which there is the production of enzymes and toxins of high importance for the process of colonization of the host. Knowing this, studies showing the large-scale production of *M. anisopliae* for both the biological control of pests and the production of enzymes important for biotechnological processes are of great relevance. In this context, the present work had the objective of analyzing the potential for the use of the algaroba for conidiogenesis and for the production of hydrolytic enzymes (cellulases, proteases, invertases and amylases) from the entomopathogenic fungus *M. anisopliae* by solid state fermentation. The experiments for the production and viability of the conidia were carried out in triplicate, in erlernmeyer (250 mL) containing 30 g of each substrate, 0.3 mL of the conidial suspension (1×10^8 conidia/mL), humidity of 70 ± 10 % and temperature ($T = 29 \pm 1$ ° C). After 10 days of inoculation, there was a high production of viable conidia. The pathogenicity of these conidia was evaluated in leaf-cutting ants, which demonstrated a high mortality rate (100%) on the fifth day. The cellulolytic activity, amylolytic, invertase was determined by the DNS method (dinitrosalicylic acid). The proteolytic activity was determined by the azocazeine and trichloroacetic acid (TCA) method. The crude extracts of the fermentation process showed amylolytic activity (6.627 U/g at 72 hours of production); exoglucanase (46.20 U/g at 72 hours); endoglucanase (97.74 U/g at 96 hours); invertase (0.74 U/g at 240 hours) and proteolytic (175.8 U/g at 240 hours). In addition, the total soluble proteins proved the high enzymatic production, since it showed a quantitative increase throughout the fermentation. The amylolytic enzymes, endoglucanase and exoglucanase were subjected to temperature variations in search of optimum temperature and thermal stability analysis. The amylases showed better enzymatic activity at the production temperature (30° C), but did not show thermostability. Cellulolytic enzymes CMCase and FPase showed an activity improvement at 50 ° and 65° C, respectively. In addition, they were stable under these conditions over 60 minutes. The algaroba was shown to be an alternative substrate for the growth and sporulation of *M. anisopliae* aiming at the production of conidia for biological control of leaf-cutting ants. In addition, it is a potential substrate for the production of microbial hydrolytic enzymes with wide application in various biotechnological processes.

Key words: biological control, *Metarhizium anisopliae*, extracellular enzymes, fermentation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Aspectos morfológicos de <i>Metarhizium anisopliae</i>	19
Figura 2. Fases da infecção no carrapato por <i>Metarhizium anisopliae</i>	20
Figura 3. Formiga cortadeira	21
Figura 4. 1) Algarobeira; 2) Vagens da algarobeira.....	24
Figura 5. Reações catalisadas pelas celulases.....	27
Figura 6. Experimento de controle biológico da formiga cortadeira.....	32
Figura 7. Aspecto macroscópico da colonização de <i>Metarhizium anisopliae</i> na fibra da algaroba.....	40
Figura 8. Análise da viabilidade dos conídios em meio BDA dos conídios produzidos na fibra da algaroba.....	41
Figura 9. Análise da mortalidade das formigas do gênero <i>Atta</i> utilizando <i>Metarhizium anisopliae</i> para o controle biológico.....	42
Figura 10. Cadáveres de formigas cortadeiras colonizadas pelo fungo entomopatogênico <i>Metarhizium anisopliae</i>	42
Figura 11. Aspecto macroscópico da fermentação em estado sólido de <i>Metarhizium anisopliae</i> em vagens de algaroba.....	44
Figura 12. Valores de pH ao longo das 240 horas de fermentação.....	44
Figura 13. Produção de proteínas totais solúveis dos extratos bruto correspondente às 240 horas de fermentação.....	45
Figura 14. Análise da atividade amilolítica sacarificante de <i>Metarhizium anisopliae</i> utilizando algaroba como substrato em fermentação no estado sólido.....	46
Figura 15. Análise da atividade proteolítica de <i>Metarhizium anisopliae</i> cultivado em meio sólido de fibras de algaroba.....	47
Figura 16. Análise da produção celulolítica exoglucanase por <i>Metarhizium anisopliae</i> através de fermentação em estado sólido na fibra da algaroba.....	48
Figura 17. Análise da produção celulolítica endoglucanase por <i>Metarhizium anisopliae</i> através de fermentação em estado sólido na fibra da algaroba.....	49
Figura 18. Perfil de produção da invertase por <i>Metarhizium anisopliae</i> , analisado a partir unidade da atividade enzimática por gramas de substrato (U/g).....	49
Figura 19. Avaliação da termoestabilidade enzimática das enzimas: amilase, CMCase e Fpase, nas temperaturas ótimas.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação taxonômica da formiga cortadeira.....	22
Tabela 2. Origem da linhagem.....	29
Tabela 3. Origem das formigas cortadeiras.....	29
Tabela 4. Caracterização da fibra da algaroba.....	43
Tabela 5. Perfil de produção enzimática em diferentes variações de temperatura.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μm	micrômetro
ART	Açúcar redutor total
BDA	Batata-ágar-dextrose
CMCase	Atividade da endoglucanase
DNS	Ácido dinitrosalicílico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FES	Fermentação em estado sólido
FPase	Atividade da exoglucanase
M	Molar
nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
PVC	Policloreto de polivinila
rpm	Rotação por minuto
μm	Micrômetro
μmol	Micromol

GLOSSÁRIO

Conídio- Estrutura celular haploide capaz de gerar um novo organismo.

Micélio – Corpo vegetativo da maioria das espécies de fungos, composto de hifas agrupadas ou emaranhadas.

Extrusão da hifas – Passagem forçada das hifas através da cutícula do hospedeiro.

Termoestabilidade – Qualidade de estabilidade a variações de temperatura.

Silvicultura – É a arte e a ciência que estuda as maneiras naturais e artificiais de restaurar e melhorar o povoamento nas florestas, para atender às exigências do mercado.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1 Aspectos biológicos do fungo filamentosso <i>Metarhizium anisopliae</i>	18
3.2 Formigas cortadeiras do gênero <i>Atta</i>	21
3.3 Importância dos fungos em processos biotecnológicos	22
3.4 Algaroba [<i>Prosopis juliflora</i> (Sw.) DC] como substrato alternativo para o cultivo de <i>Metarhizium anisopliae</i>	23
3.5 Processo de produção das enzimas	25
3.5.1 Fermentação em estado sólido	25
3.5.1.1 Amilase.....	25
3.5.1.2 Celulase	26
3.5.1.3 Protease	27
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Linhagem fúngica	29
4.2 Origem dos insetos.....	29
4.3 Origem do substrato.....	29
4.4 Prensagem da algaroba	29
4.5 Meio de manutenção da linhagem fúngica	30
4.6 Produção e viabilidade dos conídios.....	30
4.6.1 Produção de conídios	30
4.6.2 Teste preliminar para ajustar a umidade do substrato para 70 %	30
4.6.3 Avaliação da produção de <i>Metarhizium anisopliae</i> na algaroba.....	31
4.6.4 Avaliação da viabilidade dos conídios	31
4.6.5 Bioensaio.....	31
4.7 Atividade e produção das enzimas hidrolíticas.....	32
4.7.1 Caracterização do substrato.....	32
4.7.1.1 pH	32
4.7.1.2 Teor de açúcares redutores	33
4.7.1.3 Determinação das proteínas totais solúveis	33
4.7.1.4 Teor percentual de umidade	34
4.7.1.5 Teor de sólidos solúveis (°brix).....	34
4.7.1.6 Densidade aparente.....	34
4.8 Atividade das enzimas hidrolíticas	35
4.8.1 Produção enzimática em fermentação em estado sólido.....	35
4.9 Testes analíticos	35
4.9.1 Obtenção do extrato enzimático bruto	35
4.9.2 pH dos extratos enzimáticos.....	35
4.9.3 Determinação de proteínas totais solúveis	35

4.9.4 Atividade amilolítica sacarificante.....	35
4.9.5 Determinação da atividade da exoglucanase (Fpase).....	36
4.9.6 Determinação da atividade da endoglucanase (CMCase).....	37
4.9.7 Atividade proteolítica	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Produção e viabilidade dos conídios.....	40
5.1.1 Avaliação da patogenicidade de <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre a formiga cortadeira..	41
5.2 Produção e atividade enzimática.....	42
5.2.1 Caracterização do substrato.....	42
5.4 Fermentação em estado sólido	43
5.4.1 pH.....	44
5.4.2 Proteínas totais solúveis (PTS) do extrato bruto	45
5.4.3 Atividade amilolítica sacarificante.....	45
5.4.4 Atividade proteolítica.....	46
5.4.5 Atividade da exoglucanase (FPase).....	47
5.4.6 Atividade da endoglucanase (CMCase)	48
5.4.7 Atividade de Invertase.....	49
5.4.8 Temperatura ótima	50
5.4.9 Termoestabilidade	50
6 CONCLUSÕES	52
7 REFERÊNCIAS	53
APÊNDICE A	59
APÊNDICE B.....	60
APÊNDICE C.....	61
APÊNDICE D	62
APÊNDICE E.....	63

1 INTRODUÇÃO

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin é um importante agente microbiano utilizado no controle biológico de pragas. Este fungo naturalmente parasita mais de 300 espécies de diversas Ordens, incluindo pragas da agricultura e da pecuária, sendo os principais: cupins, formigas, gafanhotos, cigarrinhas e besouros (CZECZOT, 2016; VEEN, 1968).

O processo de infecção do *M. anisopliae* sobre os hospedeiros depende de uma sequência de eventos de ordem mecânica e bioquímica, ocorrendo de forma sincronizada pela deposição do conídio sobre a cutícula do hospedeiro, seguida pela germinação, penetração cuticular por ação mecânico-enzimática, invasão, colonização do corpo do inseto, produção de toxinas, exteriorização das estruturas fúngicas e a disseminação (OLIVEIRA, 2008).

Para a utilização do *Metarhizium* no controle biológico é necessário à produção de conídios em larga escala, que atualmente é realizada utilizando arroz como substrato padrão. No entanto é um processo oneroso, além deste possuir uma importância nutricional para os seres humanos. Deste modo vê-se necessário estudos que demonstrem a produção de conídios em substratos alternativos que possuam grande disponibilidade e baixo custo de produção.

M. anisopliae produz exoenzimas que estão envolvidas no processo de penetração do tegumento do hospedeiro. Sabe-se que a capacidade de virulência está pautada na produção de enzimas extracelulares como proteases e quitinases, e pouco é observado na literatura sobre a sua utilização para produção dessas e de outras enzimas de interesse industrial (ALVES, 1998b; OLIVEIRA, 2008; LEEMON; JONSSON, 2012). Na perspectiva de aproveitamento de substratos alternativos constituídos majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina tem-se desenvolvido processos biotecnológicos que permitem a utilização dessa biomassa bruta tanto para a produção de enzimas, quanto em processo de hidrólise enzimática, uma vez que moléculas como a celulose e a hemicelulose podem ser hidrolisadas em açúcares fermentescíveis.

A algaroba é uma leguminosa do gênero *Prosopis* que foi introduzida e adaptada no semiárido, em razão da sua alta capacidade de desenvolvimento em lugares secos, onde dificilmente outras plantas sobrevivem. Possui alto teor de açúcares e fibras, mas precisamente a sacarose, como também proteínas e alguns minerais importantes para o desenvolvimento humano (PERES; MORAIS, 1991). Devido as suas características adaptativas e propriedades, a algaroba pode ser um substrato alternativo, tanto para a

produção de conídios visando o controle biológico, como para a produção de enzimas de interesse industrial e biotecnológico.

As proteases, celulasas e amilases são exemplos de enzimas produzidas por fungos filamentosos que estão disponíveis comercialmente. Processos industriais geralmente exigem enzimas robustas, capazes de atuar em diferentes condições de pH, temperatura, pressão, entre outros. Além disso, é esperado que as enzimas sejam produzidas com alto rendimento, por processos de fermentação simples e de baixo custo, proporcionando a geração de um produto com alto valor agregado.

Nos últimos anos, a perspectiva da utilização de processos fermentativos em estado sólido tem aumentado para produção de enzimas de interesse industrial. O alto custo das enzimas celulasas, proteases e amilases é um dos fatores limitantes no processo de hidrólise enzimática para a sua produção ou utilização. Entretanto, o impacto do custo dessas enzimas pode ser reduzido a partir da seleção de micro-organismos produtores de celulasas, proteases e amilases, pela utilização de matéria-prima mais barata e estratégias de fermentação a um custo efetivo, como fermentação em estado sólido e tecnologias mais eficientes para as etapas de sacarificação e fermentação.

Neste contexto, o presente trabalho teve como intuito de analisar o potencial de utilização da algaroba para conidiogênese e para produção de enzimas hidrolíticas (celulasas, proteases e amilases) a partir do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, por fermentação em estado sólido.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar o potencial de utilização da algaroba para conidiogênese e para produção de enzimas hidrolíticas a partir do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, por fermentação em estado sólido.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento e a esporulação de *M. anisopliae* em meio de cultura a base de algaroba;
- Avaliar a viabilidade dos conídios produzidos;
- Analisar a capacidade bioinseticida e o processo de infecção de *M. anisopliae* sobre a formiga cortadeira;
- Avaliar o potencial de produção enzimática através do processo fermentativo em estado sólido;
- Caracterizar as enzimas extracelulares (celulases, proteases e amilases) produzidas em processos fermentativos em estado sólido.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

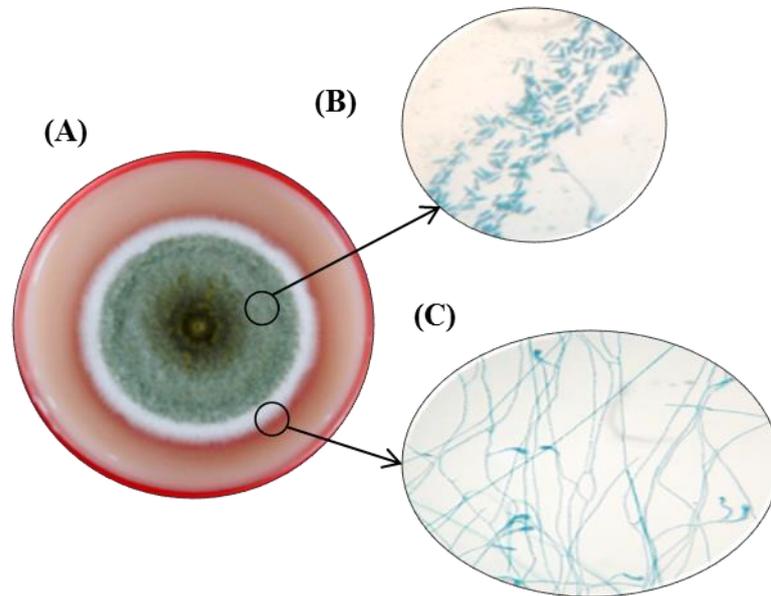
3.1 Aspectos biológicos do fungo filamentosso *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium anisopliae é um fungo entomopatogênico, pertencente à subdivisão Deuteromycotina, ordem Moniliales, família Moniliaceae (KAVA-CORDEIRO, 1993). É considerado um Deuteromiceto por possuir apenas a reprodução assexuada. É encontrado em toda a superfície do globo terrestre, com exceção da Antártida, principalmente em insetos infectados e no solo (ROBERTS; ST LEGER, 2004). Sendo este encontrado em ambientes naturais, e não apenas parasitando, pode ser enquadrado na categoria de parasita facultativo (FARGUES; REMAUDIERE, 1977).

A primeira descrição conhecida do gênero *Metarhizium* Sorokin foi um isolado de insetos infectados na Ucrânia no final da década de 1870. Foi inicialmente denominado de *Entomophthora anisopliae* baseado no nome genérico de seu hospedeiro, um escaravelho, *Anisoplia austriaca* (METSCHNIKOFF, 1879). No ano seguinte foi renomeado *Isaria destructor* (METSCHNIKOFF, 1880). Entretanto, em 1883 Sorokin propôs definitivamente o nome de *Metarhizium* como gênero deste fungo entomopatogênico, e mantendo o nome específico original de *anisopliae*. As várias espécies de *Metarhizium* catalogadas antes do ano 1976 foram descritas como variedades por Tulloch (1976). Permaneceram apenas *M. anisopliae* e *M. flavoviride* como espécies do gênero *Metarhizium* Sorokin. Tulloch (1976) dividiu o *M. anisopliae* em isolados de conídios curtos e longos. Os curtos são aqueles que possuíam conídios de até 8 µm de comprimento, e os chamou de variedade *anisopliae*. Os isolados que possuíam conídios longos, com comprimento de 10 µm até 14 µm, chamou-os de variedade *major*, posteriormente alterado para *majus* (ROMBACH et al., 1986).

M. anisopliae possuem conídios verdes, cilíndricos com as pontas arredondadas e estreitos no meio (ZIMMERMANN, 1993). São formados a partir de conidióforos originados diretamente das hifas hialinas e são geralmente uninucleados (TINLINE, 1971), possuindo uma pequena parcela de binucleados (MESSIAS; AZEVEDO, 1980) ou até multinucleados em algumas linhagens. As hifas que apresentam dois ou mais núcleos geralmente são as hifas das extremidades (LUNA, 1985) (**Figura 1**).

Figura 1. Aspectos morfológicos de *Metarhizium anisopliae*. Colônia após 6 dias de cultivo em meio ágar-leite a 28° C. (A) Micélio hialino de coloração branca na extremidade da colônia de onde emergem os conidióforos. B) Numerosos conídios cilíndricos. C) Micélio com apressórios em estágio avançado de desenvolvimento.



Fonte: Autora

Quanto ao crescimento, este fungo apresenta crescimento ótimo em temperaturas entre 25°C e 30°C (VILACORTA, 1978). Já uma exposição de 24 horas à 40°C é capaz de gerar a perda da viabilidade (ALVES; NOGUEIRA, 1984). Deste modo, para garantir a rapidez na evolução da infecção, pelo alto desenvolvimento micelial, só é conseguido através de uma temperatura ideal de crescimento, estimada entre 27° C e 28° C (FERRON, 1978).

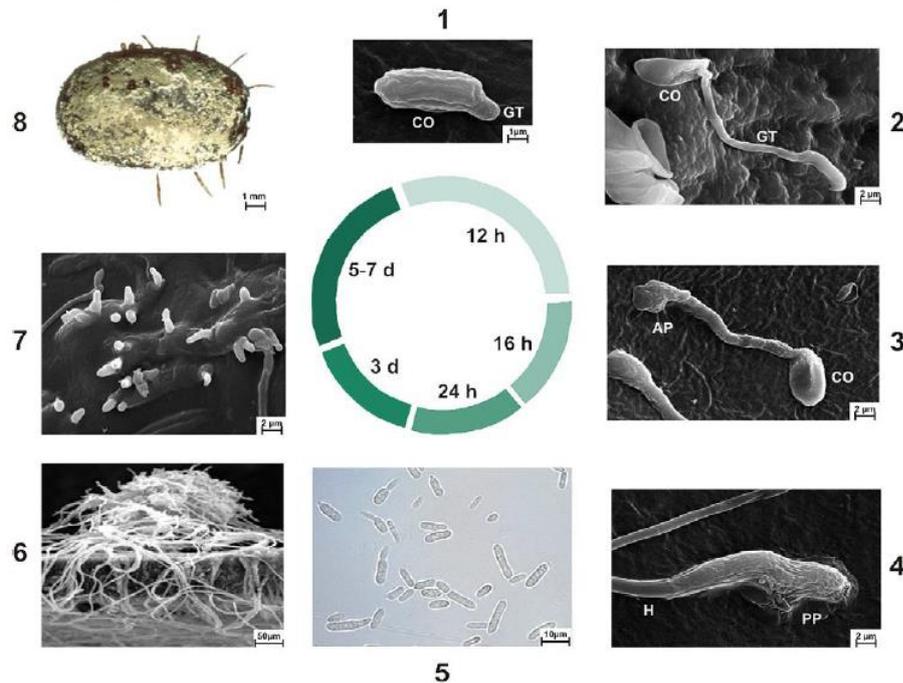
É um importante fungo entomopatogênico de alta virulência que parasita mais de 300 espécies de hospedeiros artrópodes de pelo menos sete ordens distintas (CZECZOT, 2016; VEEN, 1968). Causador da doença descrita como “*muscardina verde*”, por gerar incrustação de cadáveres de insetos com conídios verdes.

Diferente das bactérias e vírus, os fungos não necessitam de ser ingeridos por seus hospedeiros, pois seu mecanismo de infecção é um processo multifatorial que se baseia na combinação de ação mecânica, produção e ação de enzimas e toxinas, que resulta no rompimento e penetração do tegumento, e consequente morte do animal (ALVES,1998b; OLIVEIRA, 2008; LEEMON; JONSSON, 2012).

Inicialmente, no processo de infecção é visto a ambientação do fungo em busca das condições favoráveis de umidade e temperatura, quando isso ocorre segue-se os passos inerentes ao mecanismo de infecção (**Figura 2**), que consiste nas fases de adesão,

germinação, diferenciação, penetração, colonização, reprodução e disseminação (OLIVEIRA, 2008).

Figura 2. Fases da infecção no carrapato por *Metarhizium anisopliae*. (1) Adesão do conídio a cutícula do hospedeiro; (2) Germinação do conídio; (3) Diferenciação do tubo germinativo em apressório; (4) Penetração na cutícula do hospedeiro; (5) Diferenciação das hifas em blastoporos; (6) Colonização; (7) Extrusão das hifas no cadáver do hospedeiro; (8) Disseminação – presença de conídios e conidióforos sobre a superfície do cadáver. CO- conídio, GT- tubo germinativo, AP- apressório, H- hifa, PP- penetração.



Fonte: SCHRANK; VAINSTEIN, 2010.

Primeiramente, *M. anisopliae* transpõe a barreira inicial que é a cutícula do inseto (DUBOVSKIY et al., 2013). Esta cutícula é composta por duas camadas, a epicutícula e a procutícula. Estas são compostas por pequenas fibras de quitinas imersas em uma matriz proteica com lipídios e quinonas (CLARKSON; CHARNLEY, 1996). Para essa etapa, enzimas como as lipases são cruciais para o sucesso da adesão do fungo.

Posteriormente ocorre a germinação e diferenciação. As hifas diferenciam a região apical extrema em apressório, uma estrutura fundamentalmente especializada na penetração do hospedeiro. A penetração consiste em um evento integrado de pressão mecânica combinada com secreção de enzimas hidrolíticas, são estas: as quitinases, lipases e proteases. Com objetivo de degradar os componentes quitinosos, lipídicos e proteicos presentes na superfície do inseto (CZECZOT, 2016). Mais uma diferenciação celular ocorre nas hifas, há a

mudança para blastoporos, que são as estruturas levedureiformes responsáveis pela nutrição, combate ao sistema imune do hospedeiro, colonização e morte do inseto (ZHANG; XIA, 2009). Há também a etapa da colonização, onde o fungo produz metabólitos secundários, dentre alguns tem-se a dextrina. Uma toxina importante no processo de virulência. Responsável pela aceleração da morte do hospedeiro, pois estão envolvidas no enfraquecimento das defesas do hospedeiro e fragilidade da mobilidade, como também na dificuldade na alimentação (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). Por fim a extrusão das hifas e a formação de conídios, permitindo a propagação fúngica para um novo ciclo de infecção (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010).

3.2 Formigas cortadeiras do gênero *Atta*

As formigas cortadeiras do gênero *Atta* (**Tabela 1**) (**Figura 3**) são conhecidas como insetos sociais, que habitam ninhos subterrâneos, onde cultivam fungos (*Leucoagaricus gongylophorus*), dos quais se alimentam. Para isso esses insetos cortam e carregam fragmentos de plantas para o interior do ninho para serem usados como substratos pelo fungo que são cultivados por elas (AUTUORI, 2010). São consideradas pragas agrícolas severas no Brasil, como também para a silvicultura. Além dos danos às plantas, os ninhos dessas formigas podem reduzir o acesso às plantações, dentre outros danos (SANTOS, 2007).

Figura 3. Formiga cortadeira.



Fonte: <https://cptstatic.s3.amazonaws.com/imagens/enviadas/materias/materia10064/9formigas-cortadeiras-cursos-cpt.jpg>

Tabela 1. Classificação taxonômica da formiga cortadeira.

Classificação Taxonômica	
Reino	<i>Animalia</i>
Filo	<i>Arthropoda</i>
Classe	<i>Insecta</i>
Ordem	<i>Hymenoptera</i>
Família	<i>Formicidae</i>
Subfamília	<i>Myrmicinae</i>
Tribo	<i>Attini</i>
Gênero	<i>Atta</i>

Fonte: *Integrated Taxonomic Information System (ITIS)*.

O combate a essa praga pelas empresas de reflorestamento, por exemplo, é feito, normalmente pelo emprego do controle químico, através da utilização de inseticidas clorados ou fluorados. No entanto o uso destes inseticidas tem certas limitações, como a não atuação no alvo, rejeição e restabelecimento da colônia após a aplicação. Assim também as implicações inerentes à saúde animal, humana e a acumulação destes compostos no meio ambiente, sendo esses pontos muito importantes já que são substâncias altamente tóxicas e bioacumulativas (PORTO; MILANEZ, 2009).

O controle biológico de pragas de insetos usando micro-organismos é altamente específico, de custo relativamente baixo e possui baixo impacto no ecossistema (DEBACH, 1991). O controle biológico para essa praga utilizando fungos entomopatogênicos é especialmente promissor, pois esses micro-organismos apresentam mecanismos já anteriormente descritos. Outro fator importante é a ausência de relatos de resistência. No entanto o maior embate para o uso de micro-organismos, para o controle de formigas cortadeiras é a necessidade desses organismos em superar a estrutura e organização social característico desses insetos (SANTOS, 2007).

3.3 Importância dos fungos em processos biotecnológicos

A biotecnologia consiste no uso de sistemas celulares com intuito de desenvolver processos e produtos de interesse econômico e social. Entre esses sistemas celulares os fungos possuem uma notável importância. Dentre os seres vivos, os fungos são os que mais tem contribuído com produtos e processos fundamentais para a vida humana (AZEVEDO, 2011).

A relevância dos fungos se encontra no seu potencial em processos biotecnológicos, sendo estes utilizados na produção de alimentos como os produtos fermentados e bebidas alcoólicas, contribuem na indústria farmacêutica, estão presentes no processo de biodegradação e tratamento biológico de efluentes, atuam na atividade enzimática, ou seja, na produção de enzimas de interesse industrial e na biotransformação. Eles também são de grande importância agrícola e ecológica, pois mantêm o equilíbrio do ambiente, decompondo restos vegetais, degradando substâncias tóxicas, auxiliando as plantas a crescerem e se protegerem contra inimigos, como outros micro-organismos patogênicos (ABREU et al., 2015).

Dentre os diversos tipos de fungos encontramos os fungos filamentosos, que são um importante grupo de micro-organismos, pois são os de maior quantidade dentre os micro-organismos vistos na biosfera (DA SILVA; MALTA, 2017).

Diante desse cenário a busca de conhecimento acerca de meios que favoreçam o crescimento e a produção celular com o interesse sustentável, de baixo custo, eficiente e que potencialize a produção dos produtos desejáveis é de grande relevância às diversas áreas da biotecnologia. Como exemplo da biotecnologia ambiental com a utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de pragas agropecuárias.

3.4 Algaroba [*Prosopis juliflora* (Sw.) DC] como substrato alternativo para o cultivo de *Metarhizium anisopliae*

A algaroba pertence ao gênero *Prosopis* da família *Leguminosae*, subfamília *Mimosoideae* contendo 44 espécies. Árvore de grande porte, atingindo em alguns casos 20 metros de altura, mas também podem ser visto arbustos de tamanho médio (**Figura 4**). É um legume com elevados teores de açúcares e proteínas. Também possui alta capacidade de fixação de nitrogênio ao solo, muito relevante para ecossistemas como o semiárido nordestino. Diferentes espécies de *Prosopis*, mesmo crescendo próxima a água, podem se desenvolver em lugares secos, onde dificilmente outras plantas sobrevivam. Toleram e possuem crescimento rápido em solos salinos, ácidos e com baixa fertilidade (PERES; MORAIS, 1991). Esses aspectos foram importantes para sua adaptação quando introduzidas no Brasil, na região Nordeste, na localidade de Serra Talhada em Pernambuco, há quase 80 anos (EL HAG et al., 2000). Sua implantação teve como objetivo aumentar a disponibilidade de recursos naturais das áreas semiáridas, transformando-a em uma alternativa para o

reflorestamento em áreas de desmate da Caatinga, já que como vista, possuía resistência à seca. Essa xerófita é uma espécie utilizada com vários fins: produtora de lenha, madeira, forragem entre outros (PEGADO, 2006). Além dessas finalidades, a algaroba tem potencialidade de ser uma fonte de alimento funcional ao homem (LIMA et al., 1983), pois suas numerosas vagens contém boa palatabilidade e digestibilidade. Sua composição química varia de acordo com as condições de plantio (MENDES, 1982). Corroborando a ideia de utilização da algaroba como alimento nutricional, Silva e colaboradores (2007) demonstraram que a maior composição da algaroba é de açúcar, mas especificamente sacarose e fibras. Há também proteínas e minerais de grande importância para o desenvolvimento humano e animal.

Figura 4. 1) Algarobeira; 2) Vagens da algarobeira.



Fonte: <http://focadoemvoce.com/noticias-fotos/caatinga/algaroba-linda.jpg>;
<http://www.ct.ufpb.br/lpfd/contents/imagens-1/recursos-naturais/vagens.jpg>.

No entanto a falta de manejo adequado, a boa adaptação regional da espécie, a facilidade de dispersão promovida pelos rebanhos, dentre outros fatores, transformaram em problema o que antes pretendia ser uma solução. A espécie foi sendo disseminada e se estabeleceu em determinados sítios da Caatinga, ocupando grandes extensões de terras em praticamente todos os estados do Nordeste. Outra limitação também é que estudos sugerem que alcaloides presentes nas vagens de *P. juliflora* desenvolve doença de caráter neurotóxico em animais de reprodução (HUGHES, 2005).

Os sítios preferenciais da algaroba são as áreas de matas ciliares, as manchas de neossolos flúvicos e as baixadas sedimentares, onde se formam maciços populacionais de alta densidade (PEGADO, 2006). Deste modo, o manejo ideal e a busca de novas alternativas de utilização para essa cultura mostram-se relevantes, a exemplo de sua utilização como substrato alternativo em processos biotecnológicos.

3.5 Processo de produção das enzimas

3.5.1 Fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido (FES) ou fermentação semi-sólida, ou fermentação em meio semi-sólido compreende ao processo de crescimento microbiano sobre substratos sólidos sem a presença de água livre. A água está presente apenas ligada à fase sólida, formando uma camada fina na área das partículas (RAIMBAULT, 1998). De acordo com Aidoo et al. (1982), vários micro-organismos podem ser capazes de crescer em FES, são estes: bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Os fungos filamentosos são os mais adaptáveis a esse tipo de processo, em razão da eficiência de crescimento em condições de pouca água e muitos sólidos presentes. Além de possuírem o crescimento em forma de hifas que promove a colonização do meio por completo (DURAND, 2003).

As características de uma FES são: fase sólida atuando como fonte de carbono, nitrogênio entre outros componentes; o ar deve transportar os espaços vazios e possuir a pressão relativamente baixa; o crescimento microbiano ocorre em condições mais próximas às do ambiente natural; e o meio apresenta alta heterogeneidade e os subprodutos não são completamente acessíveis ao micro-organismo (PINTO, 2005).

A FES é uma boa alternativa para o reaproveitamento de resíduos agroindustriais. Já que no Brasil possui uma grande produção agrícola, esses subprodutos podem ser utilizados para crescimento de micro-organismos e síntese de diversos compostos de interesse industrial, como enzimas, hormônios, ácidos orgânicos, aromas, pigmentos entre outros, gerando um alto valor agregado. Ainda, a reutilização desses subprodutos podem minimizar possíveis problemas ambientais (PINTO, 2005).

3.5.1 Amilase

O amido é composto por dois tipos de polímeros, a amilose e a amilopectina, ambas aglutinações de moléculas de glicose. A amilose consiste de cadeias lineares longas de D-glicose, unidas por ligações do tipo α -1,4. Enquanto que a amilopectina corresponde a uma cadeia altamente ramificada, com ligações do tipo α -1,4 na parte linear e ligações α -1,6 nos pontos de ramificação (NELSON; COX, 2006).

As amilases são enzimas pertencentes à classe das hidrolases, pois catalisam a hidrólise de moléculas de amido, liberando vários polímeros compostos de unidades de glicose, incluindo dextrinas (PANDEY et al., 2005; GUANDALINI, 2007). Das enzimas

industriais, as amilases estão entre as mais importantes, por apresentar alta relevância em processos biotecnológicos, representando 25 % do mercado mundial de enzimas (KUMAR, SAHAI; BISARIA, 2012).

As principais amilases podem ser divididas em três grupos: endoamilases ou α -amilases (α -1,4-glicano-4-glicanohidrolase, EC 3.2.1.1), as quais rompem as ligações α -D-1,4 no interior a molécula de amido; as exoamilases ou β -amilases (α -1,4 glicano-maltohidrolase, E.C. 3.2.1.2), que hidrolisam ligações α -1,4 nas extremidades não redutoras de amilose e amilopectina; e as enzimas de desramificação (glucoamilases ou amiloglicosidases), que agem hidrolisando apenas ligações glicosídicas do tipo α -1,6 do terminal não redutor a (VAN DER MAAREL et al., 2002).

Vários organismos possuem a capacidade de sintetizar amilase. As plantas utilizam para degradar o amido que é acumulado em raízes; os animais, para a digestão do amido que é encontrado na maioria dos alimentos e; os migro-organismos procariotos e eucariotos usam o amido como fonte de carbono (GONÇALVES, 2016). No entanto as amilases derivadas de micro-organismos, normalmente possuem grande demanda industrial, pois favorecem a realização de diversos processos biotecnológicos, vistos na indústria de alimentos, fermentação, têxtil e de papel (PANDEY et al., 2005).

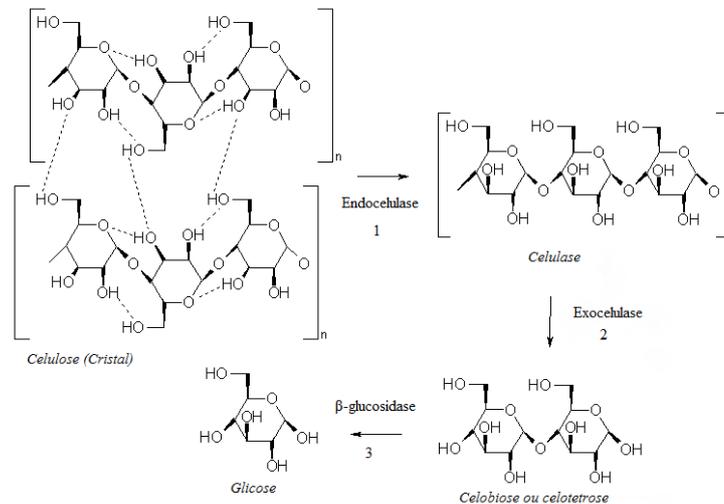
3.5.2 Celulase

A celulose é o componente mais abundante da biomassa vegetal. É encontrada quase que exclusivamente nas paredes celulares de plantas, no entanto podem ser produzidos por outros organismos. Corresponde aproximadamente de 30 a 50 % do peso seco da planta (LYNEL, 1999). Eventualmente a celulose é encontrada no estado puro, porém na maioria dos casos as fibras de celuloses são incorporadas numa matriz estrutural juntamente com lignina e hemicelulose, variando essa composição de acordo com a célula e a idade da planta (LYND et al, 2002). Esses componentes matriciais limitam a utilização da biomassa vegetal não tratada para a formação de produtos através de processos biotecnológicos (LYND et al., 2002 apud WILSON, 1993).

Celulases são enzimas que constituem um complexo molecular que atuam em materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise (CASTRO; PEREIRA 2010, apud REESE, 1976). Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam concomitantemente para a liberação de açúcares, dentre estes a glicose é o que desperta maior interesse industrial, pois sua conversão possibilita a transformação em etanol (LYND et al.,

2002). Os principais tipos enzimáticos encontrados nesse sistema de celulases são: exo- β -1,4-glucanase, endo- β -1,4-glucanase e β -glucosidase. As endoglucanase atuam internamente na cadeia de celulose clivando as ligações β gerando extremidades não redutoras e as exoglucanases atuam removendo celobioses desta extremidade não redutora da cadeia de celulose. Finalmente, a β -glucosidase completa a sacarificação dividindo celobiose e cello-oligossacarídeos pequenos, em moléculas de glicose (**Figura 5**) (BÉGUIN; AUBERT, 1994; SILVA et al., 2005).

Figura 5. Reações catalisadas pelas celulases. 1) Endocelulase; 2) Exocelulase; 3) β -glucosidase.



Fonte: https://en.wikipedia.org/wiki/Cellulase#/media/File:Types_of_Cellulase2.png.

As aplicações das enzimas celulolíticas são variadas: podendo ser utilizada na indústria têxtil e de lavanderia de tecido; processo de lavagem e suavização do tecido, proporcionando maciez e brilho as peças de vestuário; na indústria do papel de celulose com a finalidade da retirada de tintas e impurezas; no processamento da ração animal, aumentando, através da dieta animal, o rendimento na produção pecuária; e por fim, na indústria de processamento de alimentos, nos processos de clarificação do suco, extração do azeite, alteração de propriedades sensoriais de frutos, entre outros (SHARMA et al., 2016).

3.5.1 Protease

As proteases ou peptidases são enzimas pertencentes à classe das hidrolases, estas catalisam a hidrólise de ligações peptídicas (CO-NH) de proteínas, resultando em peptídeos

ou aminoácidos livres. Estas enzimas constituem uma grande família de enzimas. Podem ser divididas em dois grupos principais, as endo e exopeptidases. As exopeptidases, denominadas amino ou carboxipeptidases, agem clivando as ligações peptídicas próximas às regiões de amino ou carboxi-terminal. Já as endopeptidases catalisam a hidrólise das ligações peptídicas nas regiões interiores da proteína (RAO et al., 1998; SOUZA et al., 2015).

As proteases são umas das enzimas mais importantes no cenário industrial. Em 2005 Kumar e colaboradores demonstraram que cerca de 60 % do mercado industrial de enzimas é referente à protease. Boa parte dessa produção corresponde à utilização dessas enzimas na indústria de detergentes, os demais são distribuídos na indústria cervejeira, de couro, farmacêutica e alimentícia, entre outros (KUMAR et al., 2005; DA SILVA et al., 2009).

O custo de produção de enzimas proteolíticas relacionado ao meio de cultura utilizado para o crescimento do micro-organismo é avaliado em torno de 30-40 %. Logo a procura pela redução desses custos de produção é de grande relevância (JOO; CHANG, 2005; NASCIMENTO; MARTINS, 2006).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagem fúngica

Foi utilizada uma linhagem de *M. anisopliae* cedida pela Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE (**Tabela 2**).

Tabela 2. Origem da linhagem.

<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	
Nº do acesso	URM 4920
Substrato	<i>Mahanarva posticata</i>
Origem geográfica	Usina Serra Grande – Maceió – AL
Ano de registro	2005

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

4.2 Origem dos insetos

As formigas foram coletadas de formigueiros presentes na reserva de Mata Atlântica localizada na Universidade Federal da Paraíba (**Tabela 3**).

Tabela 3. Origem das formigas cortadeiras.

<i>Formigas</i>	
Descrição da coleta	<i>In situ</i>
Origem geográfica	Reserva de Mata Atlântica – João Pessoa/PB
Ano da coleta	2017

Fonte: Autora

4.3 Origem do substrato

Foi utilizado a algaroba (fibra obtida após processo de prensagem das vagens) como substrato alternativo pra crescimento de *M. anisopliae*. A algaroba foi coletada na Cidade Japi/RN (Região do Semiárido).

4.4 Prensagem da algaroba

As vagens de algaroba foram devidamente selecionadas, descartando as atacadas por fungos e insetos. Pesadas em uma balança eletrônica (Gural - modelo Esse - 15), carga máxima de 15 kg e mínima de 0,005 Kg. Em seguida, foram sanitizadas imergindo-as em uma

solução de hipoclorito de sódio a 3 % durante 5 minutos, a remoção dos resíduos sanitizantes foi promovida pelo enxágue em água corrente. Após esse procedimento, foram hidratadas em água destilada aquecida a $65 \pm 2^\circ \text{C}$, na proporção de 1:1 m/v (1 kg de vagem para 1 L de água) durante 3 horas. Ao final desse processo, as vagens hidratadas foram submetidas à prensagem em prensa hidráulica manual a uma pressão de 50 Kgf/cm² (SILVA et al., 2003).

4.5 Meio de manutenção da linhagem fúngica

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

4.6 Produção e viabilidade dos conídios

4.6.1 Produção de conídios

O fungo foi inoculado em meio de cultura para conidiogênese (esporulação) (Meio Completo - MC) (ALVES, 1998a). Em seguida, as placas foram incubadas a 25° C e fotofase de 12 horas, por um período de 7 a 10 dias para crescimento e conidiogênese do fungo. Após esse período, os conídios foram coletados, raspando-se a superfície do meio de cultura e transferidos para tubos de ensaio fechados com filme PVC e armazenados sob refrigeração a 4° C por um período não superior a 10 dias. Para o preparo da suspensão, foram adicionados aos conídios água destilada + “tween” 80 a 0,01 %. Em seguida, foi estimada a concentração dos conídios em câmaras de Neubauer e as suspensões foram padronizadas em 1×10^8 conídios/mL.

4.6.2 Teste preliminar para ajustar a umidade do substrato para 70 %

O teste foi realizado para medir o volume de água destilada em 30 g do substrato, contidos em erlenmeyer de 250 mL. Os erlenmeyers foram autoclavados e, após resfriamento, foram feitas as pesagens. Em seguida, os erlenmeyers foram levados à estufa (80° C) para secagem dos materiais até o peso constante. Posteriormente, foi realizada uma nova pesagem e, após a subtração da massa seca, foi calculado o volume de água adicionado a cada substrato de forma a resultar numa umidade em torno de 70 % após a autoclavagem. O volume de líquido adicionado ao meio foi baseado na equação especificada abaixo (**Equação 1**):

$$m_{H_2O} = \frac{m_s(x_2 - x_1)}{1 - x_2} \quad \text{Eq. (1)}$$

Sabendo que:

m_s = massa de substrato

X_1 = umidade inicial do substrato

X_2 = umidade desejada

4.6.3 Avaliação da produção de *Metarhizium anisopliae* na algaroba

O experimento foi realizado em erlenmeyer de 250 mL, contendo 30 g do substrato com umidade em torno de 70 %. Foi realizado um experimento com três repetições. Foram inoculados 0,3mL contendo 1×10^8 conídios/mL, e em seguida os frascos foram incubados ($T = 29 \pm 1^\circ \text{C}$) e analisados durante 10 dias.

Após esse período, foi adicionado 0,9 de água destilada + “tween” 80 a 0,01 % para se obter uma diluição final de 1:10 e coletado uma alíquota de 0,1 mL para realização da contagem dos conídios em câmara de Neubauer ao microscópio óptico (SENE et al., 2010).

4.6.4 Avaliação da viabilidade dos conídios

Amostras dos conídios produzidos na algaroba foram tomadas e submetidas a diluições seriadas, até se obter uma concentração de 1×10^8 conídios/mL. Desta suspensão, inoculou-se, em triplicata, 100 μL em placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Ágar-Dextrose), que em seguida foram incubadas por 18 horas ($T = 29 \pm 1^\circ \text{C}$). Após esse período, foram realizadas as contagens em cada placa, de 200 a 300 conídios viáveis ou não, sob microscópio de luz (aumento de 400 \times) (SENE et al., 2010).

4.6.5 Bioensaio

Para avaliação da atividade inseticida foram utilizadas 30 formigas cortadeiras, coletadas *in situ* com o auxílio de pinça entomológica e colocadas em frascos de vidro com tampa e trazidos para o laboratório. No laboratório foi realizada a esterilização com uma solução de hipoclorito a 1%, por cerca de três segundos. Após a esterilização as formigas foram colocadas em contato com papel de filtro contendo água destilada autoclavada + “tween” (0,01 %) e uma suspensão de conídios (1×10^8 conídios mL^{-1}) por cerca de 24 horas. Após 24h de contato, as formigas foram transferidas individualmente para uma nova placa úmida, contendo uma dieta artificial (solução de mel 10%), que era renovada a cada 48h. Cada câmara úmida continha 10 formigas. As placas foram mantidas em temperatura

ambiente e avaliadas a cada 24 horas durante 10 dias. Os insetos mortos foram esterilizados superficialmente com álcool 70° GL e água destilada autoclavada e transferidos para novas câmaras, mantidas em iguais condições, visando a verificação da mortalidade (**Figura 6**). A colonização do fungo sobre os cadáveres das formigas foi avaliada durante 10 dias após a inoculação (LOUREIRO E MONTEIRO, 2005). O controle negativo foi utilizado água destilada autoclavada + “tween” (0,01 %) e mantendo-as nas mesmas condições citadas anteriormente (ALVES, 1998b).

Figura 6. Experimento de controle biológico da formiga cortadeira. 1) Câmara úmida contendo solução de mel a 1% e formigas pós contato por 24h com a suspensão de conídios (1×10^8 conídios ml^{-1}). 2) Cadáver de formiga após 24h de contato com a suspensão.



Fonte: Autora

4.7 Atividade e produção das enzimas hidrolíticas

4.7.1 Caracterização do substrato

A caracterização físico-química dos resíduos quanto ao teor de sólidos solúveis, densidade aparente, pH, umidade, proteínas totais e açúcares redutores totais, foi realizada com base nas metodologias descritas a seguir.

4.7.1.1 pH

Preparou-se uma suspensão com 100 mL de água e 10 g do substrato. Após homogeneização e precipitação dos sólidos, determinou-se o pH com potenciômetro digital

(AKSO – AK 90) previamente calibrado com soluções padrões (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2005).

4.7.1.2 Teor de açúcares redutores

Para determinação dos açúcares redutores utilizou-se o método DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico) descrito por Santos (2007) e que está de acordo com o protocolo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Agroindústria Tropical. Essa metodologia foi, originalmente, proposta por Miller (1959) e baseia-se na redução do ácido 3-amino-5nitrosalicílico, em que há a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico. O reagente DNS possui uma cor amarelada, após o aquecimento, torna-se avermelhado de acordo com a concentração de açúcares redutores presente na solução, o que permite sua leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A curva padrão foi obtida realizando o teste DNS, utilizando diferentes diluições da solução de glicose a 1 g/L. Com os valores de absorbância obtidos, foi construída a curva de absorbância versus concentração.

Foram pesados 30 g dos substratos em frasco erlenmeyer de 250 mL, adicionado 100 mL de água destilada. A mistura permaneceu em mesa agitadora (SOLAB-SL-223) a 200 rpm durante uma hora. Posteriormente, foi filtrada com auxílio da bomba a vácuo (TECNAL - TE-0581), em funil Buchner, usando papel de filtro qualitativo (14 µm) para separar o bagaço da solução contendo os açúcares. Tomou-se 0,5 mL da solução e adiciono-se 0,5 mL do reagente DNS (em triplicata). Os tubos foram aquecidos a 100° C por dez minutos e resfriados em banho de gelo por cinco minutos. A cada tubo foram adicionados 4 mL de água destilada, homogeneizados e feita a leitura em espectrofotômetro (SPECTRO VISION) a 540 nm. A curva padrão foi usada para transformar a leitura de absorbância em miligramas de açúcares redutores por mililitro de solução e, conseqüentemente, supor a concentração de açúcares redutores por grama de amostra inicial (mg ART/ g amostra).

4.7.1.3 Determinação das proteínas totais solúveis

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

4.7.1.4 Teor percentual de umidade

A umidade é representada pelo teor de água presente na amostra e determinada conforme **Equação 2**. Para análise da umidade, pesou-se aproximadamente 2,0g da amostra em placa de petri previamente seca e tarada. Em seguida, o conjunto amostra-recipiente foi colocado em estufa (OLIDEF - CZ) a $105\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. O procedimento foi realizado em triplicata (MORAIS et al., 2010).

$$\text{Umidade \%} = \frac{(\text{peso inicial} - \text{peso final da amostra})}{\text{peso inicial da amostra}} * 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

4.7.1.5 Teor de sólidos solúveis (*•brix*)

Para determinação dos sólidos solúveis presente na algaroba foram adicionados 9 mL de água destilada a 1g do bagaço em frasco erlenmeyer de 125 mL. A suspensão permaneceu em mesa agitadora (SOLAB – SL 223) por uma hora sob agitação de 200 rpm. Seguida de filtração com bomba a vácuo (TECNAL – TE 0581), em funil de Buchner, usando papel de filtro qualitativo (14 μm) para separar a fibra do sobrenadante. A leitura foi realizada em refratômetro (NOVA - ABBE REFRACTOMETER), o resultado multiplicado por dez, devido à diluição. Esse procedimento foi adaptado da metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (1985).

4.7.1.6 Densidade aparente

Para determinação da densidade aparente pesou-se 100 g da algaroba, em balança (MARTE - AW220). A fibra foi colocada em proveta, sem compactá-lo, para verificar o volume ocupado e espaços vazios (CORREIA, 2004). A densidade aparente é expressa conforme a **Equação 3**.

$$\text{Densidade aparente} = \frac{\text{massa (g)}}{\text{volume ocupado (mL)}} \quad \text{Eq. (3)}$$

4.8 Atividade das enzimas hidrolíticas

4.8.1 Produção enzimática em fermentação em estado sólido

O experimento foi realizado em frascos erlenmeyers de 250 mL, contendo 30 g de cada substrato com teor de umidade de $70 \pm 10 \%$, sendo preparados em triplicata. Para umidificar os substratos foi utilizada água destilada estéril. Os frascos foram autoclavados a 1 atm e 120°C por 20 minutos. Cada frasco foi inoculado com 0,3 mL da suspensão de conídios (1×10^8 conídios/mL) e incubado a $29 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 10 dias (STURMER et al., 2003).

4.9 Testes analíticos

4.9.1 Obtenção do extrato enzimático bruto

Para o processo fermentativo em estado sólido foi realizado nas mesmas condições da produção de conídios. A obtenção do extrato enzimático bruto foi realizada pela adição de 100 mL de água destilada em 30 g de amostra de cada frasco, a qual foi submetida à agitação contínua em *shaker* de bancada durante 30 minutos a 200 rpm. Em seguida, foi feita a filtração a vácuo, em filtro qualitativo Whatmann nº 01, para remoção dos sólidos. O sobrenadante foi utilizado para determinar os açúcares redutores e a atividade enzimática.

4.9.2 pH dos extratos enzimáticos

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

4.9.3 Determinação de proteínas totais solúveis

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

4.9.4 Atividade amilolítica sacarificante

Foi determinada utilizando como substrato específico, solução de amido (Método Sacarificante), submetido ao contato com o extrato enzimático bruto para promover a hidrólise pela ação das enzimas e quantificada pelos açúcares redutores produzidos (MILLER, 1959). A partir do extrato bruto foram feitas as determinações de atividade amilolítica

inoculando 0,5 mL de extrato enzimático em 0,5 mL de solução de amido 1,0 % em tampão fosfato 0,5 M e pH 7,0. A mistura foi incubada por 30 minutos a 37° C. Os açúcares redutores foram determinados pela técnica do ácido dinitrosalicílico (DNS). A leitura foi feita em 540 nm usando solução de glicose como padrão (MILLER, 1959). A calibração do zero no aparelho foi feita utilizando um teste em branco, em que 0,5 mL de água destilada substituiu a amostra, seguindo o mesmo procedimento. Para comprovação dos resultados, foi realizado um branco reacional onde não ocorreu incubação das amostras em banho, sendo realizado apenas o método de DNS. Uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima capaz de liberar 1,0 µmol de glicose por minuto nas condições do método proposto (ALVA et al., 2007) (**Equação 4**).

$$Amilase \left(U/g \right) = \frac{(A-B) \cdot f \cdot d \cdot V \cdot R}{0,18 \cdot t \cdot V_e} \quad \text{Eq. (4)}$$

Em que: A é a absorbância da amostra, B é a absorbância do branco da amostra, f é o fator de conversão da curva, d a diluição da amostra, V é o volume total do meio de reação (mL), 0,18 é o fator de conversão de miligramas para µmol de glicose, t é o tempo de reação (min), VE é o volume da enzima no meio de reação (mL), R é a razão volume de solvente por grama de meio cultivado (mL/g).

4.9.5 Determinação da atividade da exoglucanase (Fpase)

Para determinação da atividade da exoglucanase, foi utilizada a metodologia recomendada por Ghose, (1987), empregando-se como substrato o papel Whatman nº1 cortado em tiras de 1x6 cm. Cada tubo de ensaio recebeu uma tira de papel. Em seguida, adicionou-se 1 mL de tampão citrato 0,05 M, pH 4,8 e 0,5 mL do extrato enzimático, A reação enzimática ocorreu a 50° C durante 60 minutos em banho termostabilizado (SOLAB – SL 150).

Por fim, transferiu-se 0,5 mL da mistura reacional para tubos de ensaio e 0,5 mL do reagente DNS. Os tubos seguiram para o banho termostatizado a 100° C por 10 minutos. O resfriamento ocorreu em banho de gelo durante 5 minutos. A leitura foi realizada no comprimento de onda igual a 540 nm. Para comprovação dos resultados, foi realizado um branco reacional onde não ocorreu incubação das amostras em banho, sendo realizado apenas o método de DNS. Uma unidade de atividade da exoglucanase é definida pela quantidade de enzima que libera 1 µmol de glicose por minuto (equivalente a 0,18 mg de glicose por minuto) (ALVA et al., 2007), conforme a **Equação 5**:

$$FPase(U/g) = \frac{((A-B) \cdot f \cdot d \cdot V \cdot R)}{0,18 \cdot t \cdot V_e} \quad \text{Eq. (5)}$$

Em que: A é a absorbância da amostra, B é a absorbância do branco da amostra, f é o fator de conversão da curva, d a diluição da amostra, V é o volume total do meio de reação (mL), 0,18 é o fator de conversão de miligramas para μmol de glicose, t é o tempo de reação (min), VE é o volume da enzima no meio de reação (mL), R é a razão volume de solvente por grama de meio cultivado (mL/g).

4.9.6 Determinação da atividade da endoglucanase (CMCase)

Para determinação da atividade da endoglucanase (CMCase), fez-se uso do protocolo de Ghose (1987apud ANDRADE, 2016). Em que foi utilizada como substrato uma solução de carboximetilcelulose sódica a 2 % em tampão citrato 0,05 M, pH 4,8. Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,5 do tampão citrato 0,05 M, pH 4,8, 0,5 mL do substrato e 0,5 mL do extrato enzimático. A reação de hidrólise foi incubada a 50° C durante 30 minutos. A glicose liberada foi estimada pela reação com ácido dinitrosalicílico (DNS). Uma unidade da atividade da endoglucanase equivale a 1 μmol de glicose liberada por minuto, como expresso na **Equação 6** (ALVA et al., 2007). Para comprovação dos resultados, foi realizado um branco reacional onde não ocorreu incubação das amostras em banho, sendo realizado apenas o método de DNS.

$$CMCase(U/g) = \frac{((A-B) \cdot f \cdot d \cdot V \cdot R)}{0,18 \cdot t \cdot V_e} \quad \text{Eq. (6)}$$

Em que: A é a absorbância da amostra, B é a absorbância do branco da amostra, f é o fator de conversão da curva, d a diluição da amostra, V é o volume total do meio de reação (mL), 0,18 é o fator de conversão de miligramas para μmol de glicose, t é o tempo de reação (min), VE é o volume da enzima no meio de reação (mL), R é a razão volume de solvente por grama de meio cultivado (mL/g).

4.9.7 Atividade proteolítica

A atividade das proteases foi analisada utilizando como substrato a azocaseína. Dessa forma, foi adicionado 100 μL do extrato do sobrenadante a 100 μL do tampão tris 0,1 M pH 9. Em seguida, foi adicionado 100 μL do substrato (azocaseína 10 mg/mL). A mistura reacional foi incubada a 37° C por 30 minutos. A reação foi interrompida e adicionado 500

μL de ácido tricloacético (TCA) 10 %. Após a centrifugação 10.000 g por 5 minutos, foi adicionado 200 μL de NaOH 1,8N ao sobrenadante. A leitura da amostra foi realizada no comprimento de onda igual a 420 nm. Uma unidade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 0,01 a 429 nm nas condições de tempo e temperatura de incubação do teste. O branco foi feito adicionando água destilada no lugar do sobrenadante (GIONGO, 2006).

4.9.8 Determinação da Atividade da Invertase

Para determinação da atividade da invertase, fez-se uso do protocolo da Embrapa (2007). Onde foram incubados 500 μL de solução de sacarose 0,1 M, 400 μL de tampão acetato 100 mM, pH, 5,0. A mistura foi homogeneizada vigorosamente e levada para o banho termostático a 30°C por 10 minutos. Depois a 100 μL da amostra enzimática foi acrescentada a solução homogeneizada e incubada a 30° C por 30 minutos. Paralizou-se a reação adicionando 1 mL do reagente DNS. Os tubos com DNS foram levados ao banho termoestático 100° C por 5 minutos. Após esse período foi adicionado 8 mL de água destilada aos tubos e homogeneizados vigorosamente. Para a leitura em 540 nm, o espectrofotômetro foi calibrado com amostra sem a presença de grupos redutores, ou seja, a 1,0 mL de DNS, adicionou-se 1,0 mL de água destilada. Por poder apresentar açúcares redutores presentes oriundos do meio de fermentação, foi realizado para cada amostra, um branco correspondente, visando descontar contribuição destes grupos redutores. Para isso, foram as mesmas concentrações de solução de sacarose e tampão acetato, depois acrescentado o DNS e por fim a amostra. Sendo também levado para o banho nas condições de reação do DNS anteriormente citadas. Uma unidade (U) de atividade de invertase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de grupos redutores, medidos como glicose, por minuto, nas condições de reação utilizadas (**Equação 7**).

$$\text{Invertase } (U/g) = \frac{((A-B) \cdot f \cdot d \cdot V \cdot R)}{0,18 \cdot t \cdot V_e} \quad \text{Eq. (7)}$$

Em que: A é a absorbância da amostra, B é a absorbância do branco da amostra, f é o fator de conversão da curva, d a diluição da amostra, V é o volume total do meio de reação (mL), 0,18 é o fator de conversão de miligramas para μmol de glicose, t é o tempo de reação (min), VE é o volume da enzima no meio de reação (mL), R é a razão volume de solvente por grama de meio cultivado (mL/g).

4.9.9 Determinação da temperatura ótima e avaliação da termoestabilidade

O efeito da temperatura foi determinado através da atividade enzimática pelo método DNS (MILLER, 1959). As reações enzimáticas da amilase, CMCase e FPase foram realizadas nas diferentes temperaturas: 30°, 40°, 50°, 65° e 70° C (CARVALHO et al., 2008).

Na avaliação da termoestabilidade destas enzimas, o extrato enzimático foi exposto a temperatura em que houve maior produção enzimática. Durante uma hora, em intervalos pré-definidos foram retirados uma alíquota da amostra para reagir normalmente de acordo com a metodologia da análise da atividade enzimática. A reação foi interrompida com a adição de DNS e procedida à análise.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção e viabilidade dos conídios

M. anisopliae demonstrou um alto crescimento e esporulação na fibra da algaroba (**Figura 7**). Resultado esperado em razão da alta concentração de açúcares e a presença de minerais importantes para o desenvolvimento celular. Esses resultados são similares ao encontrado por Guimarães (2016).

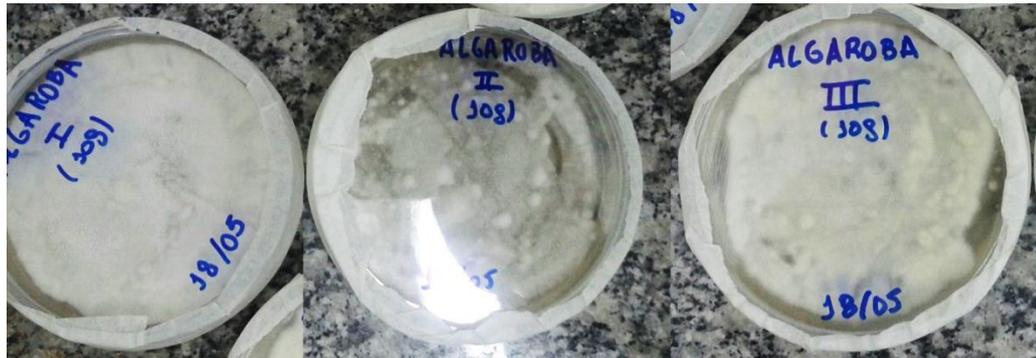
Figura 7. Aspecto macroscópico da colonização de *Metarhizium anisopliae* na fibra da algaroba.



Fonte: Autora

Para analisar a viabilidade dos conídios produzidos na fibra da algaroba, foi inoculado em placas de petri contendo meio BDA, conforme descrito na metodologia. Foi observado que após 72 horas de inoculação, havia mais de 1000 conídios viáveis. Esses resultados demonstram a possibilidade de utilização da algaroba como substrato para crescimento celular de fungos entomopatogênicos, em especial *M. anisopliae* (**Figura 8**).

Figura 8. Análise da viabilidade dos conídios em meio BDA dos conídios produzidos na fibra da algaroba.



Fonte: Autora

5.1.1 Avaliação da patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* sobre a formiga cortadeira

Os conídios de *M. anisopliae* produzidos na fibra da algaroba mostrou um efeito letal na concentração testada (10^8 conídios.mL⁻¹). O controle biológico foi analisado utilizando a porcentagem de formigas mortas e colonizadas ao longo dos 10 dias de experimento (**Figura 9**). Foi observado que às 96h mais 80 % das formigas estavam mortas. Para a comprovação da morte das formigas pelo fungo entomopatogênico relacionamos os dados de morte com os de colonização do fungo na superfície do inseto. Foi observado a presença do fungo na superfície do inseto morto, a partir das 96h. Às 144h cerca de 60 % das formigas mortas haviam sido colonizadas pelo fungo, comprovando assim a morte por *M. anisopliae*. A mumificação completa de todas as formigas mortas foi observada no último dia do experimento (**Figura 10**). No grupo controle foi observado morte natural das formigas devido ao *stress* do ambiente, mas não foi observado a colonização do fungo.

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

A virulência de *M. anisopliae* não foi afetada devido ao seu crescimento na fibra da algaroba após 10 dias de cultivo, sem nenhum suplemento nutricional. A capacidade de infecção, ocasionada inicialmente pela germinação dos conídios na cutícula do inseto, pode estar associada a fatores como patogenicidade (dimensões dos conídios, taxa de crescimento e atividades enzimáticas), virulência, especificidade e tolerância do hospedeiro (VARGAS et al., 2003).

Figura 9. Análise da mortalidade das formigas do gênero *Atta* utilizando *Metarhizium anisopliae* para o controle biológico.

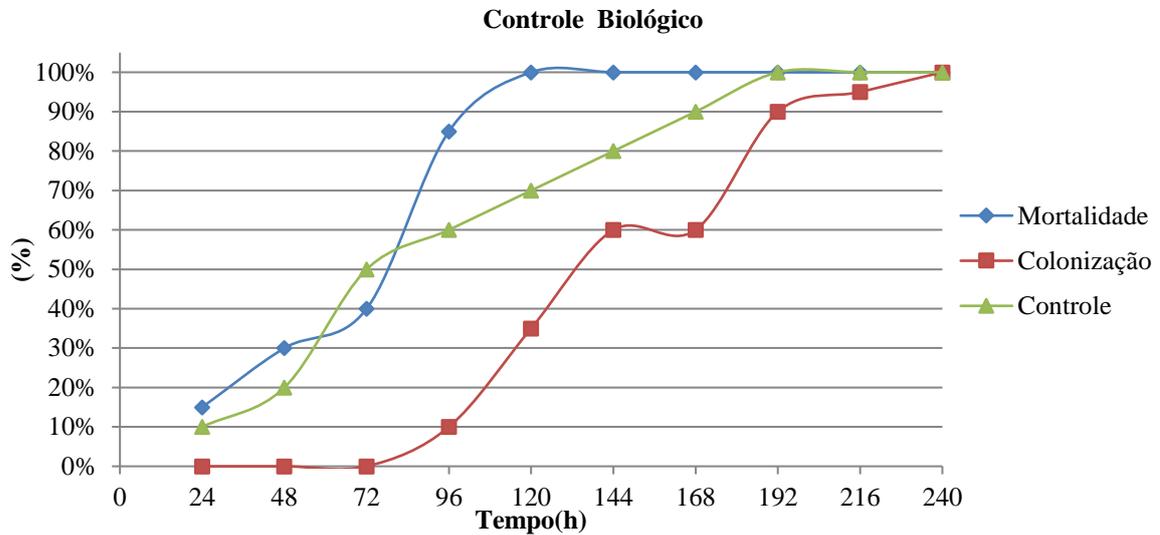


Figura 10. Cadáveres de formigas cortadeiras colonizadas pelo fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*.



Fonte: Autora

5.2 Produção e atividade enzimática

5.2.1 Caracterização do substrato

A caracterização da fibra da algaroba, utilizado como substrato no processo de produção de enzimas amilolíticas, celulolíticas e proteolíticas, na fermentação em estado sólido, está apresentada na **Tabela 4**.

Tabela 4. Caracterização da fibra da algaroba *in natura*.

Parâmetros Analisados	Unidade	Resultados
pH	-	5,4
Açúcares redutores	mg/mL	19,12
Proteínas Totais	mg/mL	13,60
Umidade	%	48,65
Sólidos Solúveis	°brix	12,33
Densidade aparente	g/mL	0,2365

O valor de pH encontrado (5,4) é semelhante ao visto por Guimarães (2016) que demonstrou um pH=5,90. O que caracteriza um substrato ligeiramente ácido. As proteínas totais o valor encontrado neste estudo foi de 13,60 mg/mL, já Guimarães relatou o valor de $0,0110 \pm 0,33 \text{ g.}100 \text{ mL}^{-1}$.

Quanto aos valores referentes aos sólidos solúveis, o valor encontrado foi de 12,33 °brix, um valor alto, no entanto mais baixo quando comparado ao valores de sólidos solúveis do caldo da algaroba, visto por Silva (2003), de 22,3 °brix. Essa diferença se dá em razão do processo de produção do mosto que favorece uma maior extração de açúcares contidos na vagem.

5.4 Fermentação em estado sólido

Durante o cultivo de 240 horas (**Figura 11**), as características do substrato sofreram algumas alterações visuais. O meio, antes de ser inoculado, apresentava uma coloração marrom escura após o processo de esterilização, mas no decorrer do processo fermentativo, após 72 horas de cultivo uma camada de micélio vegetativo de cor esbranquiçada começou a preencher a superfície da algaroba, exibindo um aspecto característico de *M. anisopliae*. Às 120 horas todo o bagaço foi coberto por micélio fúngico como também o aroma foi alterado mostrando-se mais característico ao processo fermentativo. A partir das 192 horas de fermentação começou a surgir conídios esverdeados, o que esperado para a espécie. Os extratos, ao longo da fermentação passou de tons de amarelo escuro à verde escuro, provavelmente pelo aparecimento de células conidiais.

Figura 11. Aspecto macroscópico da fermentação em estado sólido de *Metarhizium anisopliae* em vagens de algaroba. 1) Crescimento em substrato alternativo (algaroba); 2) Controle negativo; 3) Controle positivo, crescimento celular em substrato padrão (arroz).

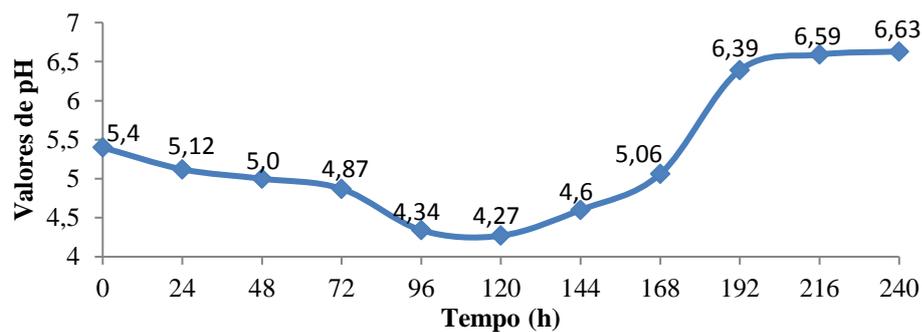


Fonte: Autora

5.4.1 pH

O pH apresentou-se variante durante o processo fermentativo, o que indica a produção de metabólitos pela ação fermentativa, associado à produção enzimática. No início da fermentação, o pH se manteve em valores semelhante ao do substrato. Às 120 horas foi visto o menor valor de pH da fermentação (4,27). No último dia foi encontrado o maior valor de pH (6,63) (**Figura 12**).

Figura 12. Valores de pH ao longo das 240 horas de fermentação.

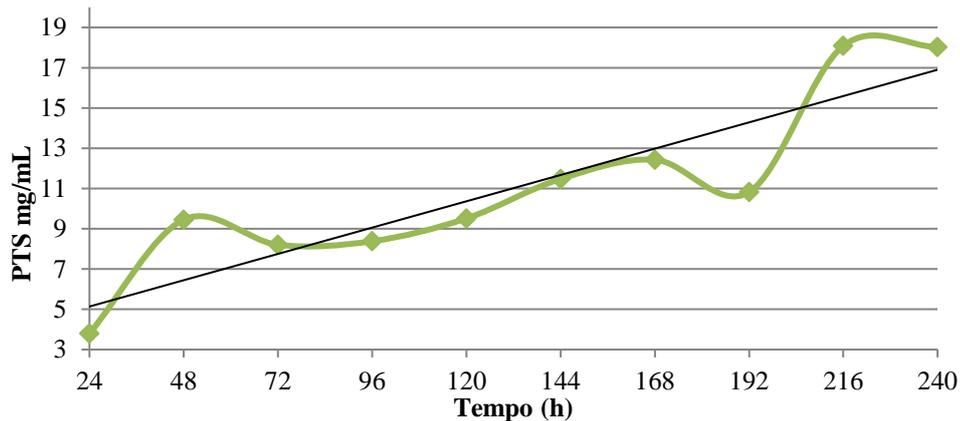


Fonte: Autora

5.4.2 Proteínas totais solúveis (PTS) do extrato bruto

Durante o processo, a quantidade de proteínas aumentou progressivamente, mostrando um perfil satisfatório. Os resultados podem ser observados na **Figura 13**.

Figura 13. Produção de proteínas totais solúveis dos extratos bruto correspondente às 240 horas de fermentação.

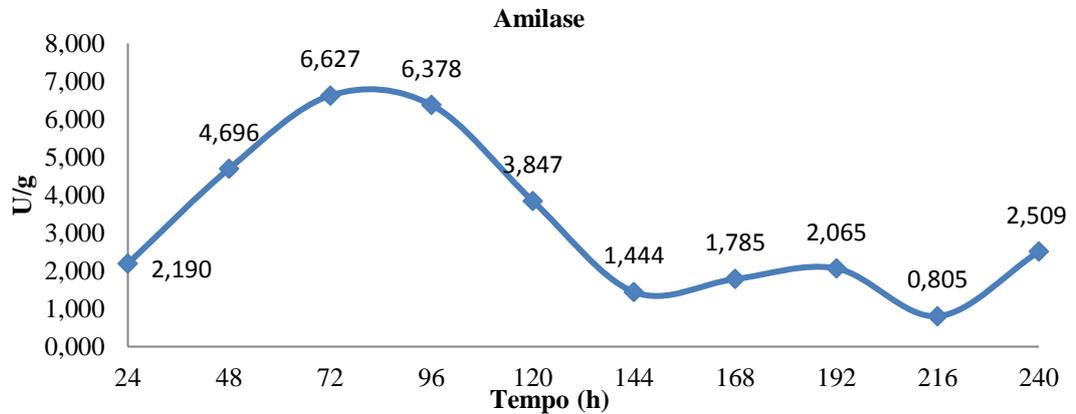


Fonte: Autora

5.4.3 Atividade amilolítica sacarificante

A produção das enzimas amilolíticas sacarificantes foi analisada através da quantificação da unidade de atividade enzimática (U/g) por tempo de fermentação. O período de 72 às 96 horas correspondeu ao período de maior quantificação de atividade enzimática, com valores 6,627 U/g e 6,378 U/g, respectivamente (**Figura 14**). Valores esses superiores aos encontrados por Guimarães (2016), que utilizou o mesmo substrato em FES, porém o fungo foi *Beauveria bassiana*. Diante desse achado pode-se inferir que o micro-organismo *M. anisopliae* é produtor de enzimas que hidrolisam o amido presente no substrato, em moléculas de glicose, com a finalidade de crescimento celular.

Figura 14. Análise da atividade amilolítica sacarificante de *Metarhizium anisopliae* utilizando algaroba como substrato em fermentação em estado sólido.



Fonte: Autora

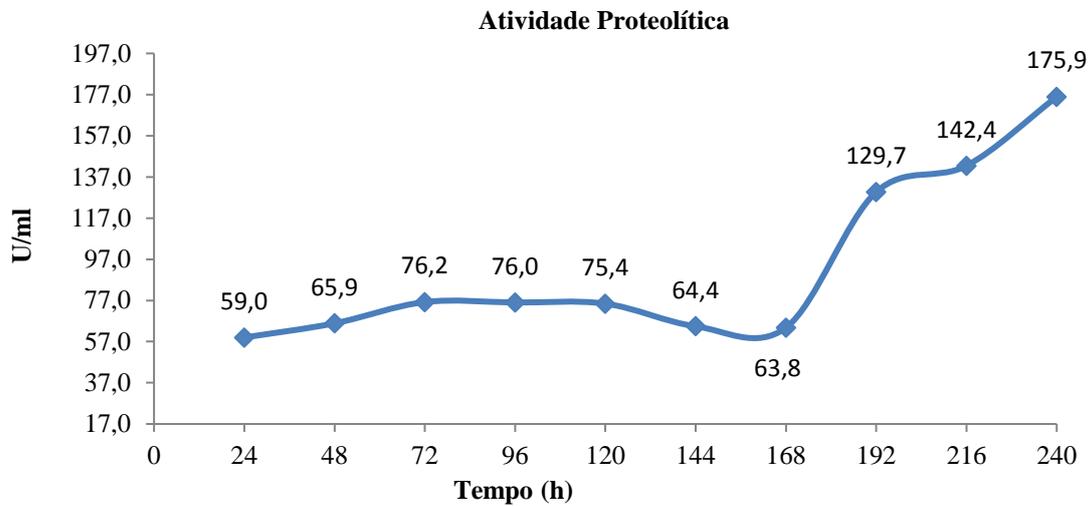
5.4.4 Atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi analisada para comparar com as enzimas analisadas nesse estudo, tendo em vista que a produção de proteases é comum para o *M. anisopliae*, por está relacionado ao processo de infecção no hospedeiro.

Os resultados foram avaliados de acordo com a quantidade de unidade enzimática ao longo das 240 horas de fermentação. Foi observado uma considerável produção de proteases por *M. anisopliae* utilizando algaroba como substrato. A maior produção foi observada no último dia (240h) com o valor de 175,8 U/g, como mostrado na **Figura 15**.

A alta atividade proteolítica pode está relacionado também ao processo de degradação da alta quantidade de enzimas produzidas nesse processo fermentativo.

Figura 15. Análise da atividade proteolítica de *Metarhizium anisopliae* cultivado em meio sólido de fibras de algaroba.

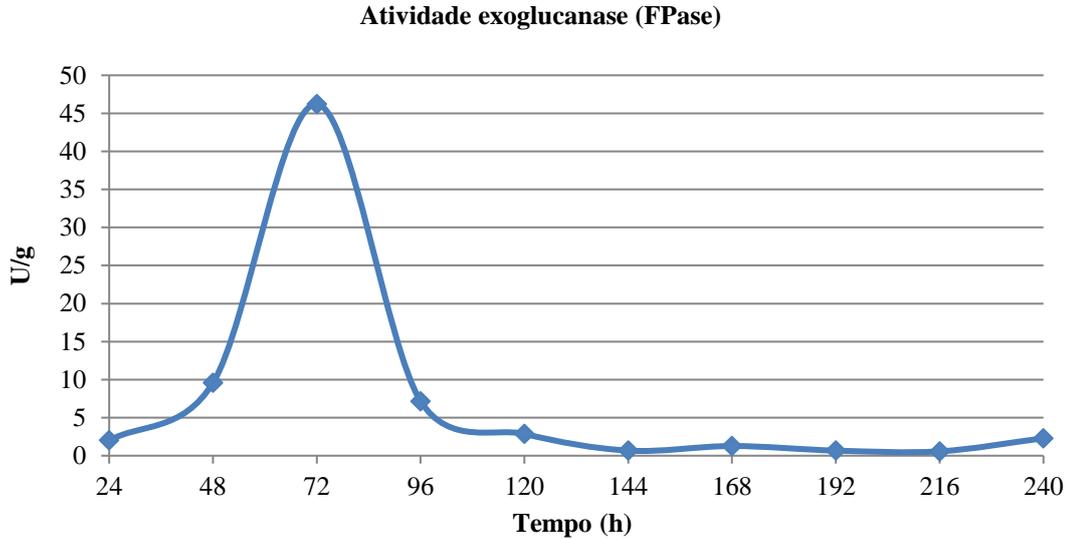


Fonte: Autora

5.4.5 Atividade da exoglucanase (FPase)

Os extratos enzimáticos brutos mostram um perfil de atividade exoglucanase ao longo da fermentação. A alta atividade da Fpase foi vista no período de 72 horas de cultivo, com valores de 46,20 U/g (**Figura 16**). Para os demais dias do processo foram demonstrados uma atividade entre 0,57-9,57 U/g. O alto valor pode está associado à quantidade de fibras encontradas na fibra da algaroba. Os valores encontrados sobrepõe ao cultivo de *B. bassiana* realizado por Guimarães (2016), utilizando o fruto da leguminosa *P. Juliflora* (0,41 U/mL).

Figura 16. Análise da produção celulolítica exoglucanase por *Metarhizium anisopliae* através de fermentação em estado sólido na fibra da algaroba.



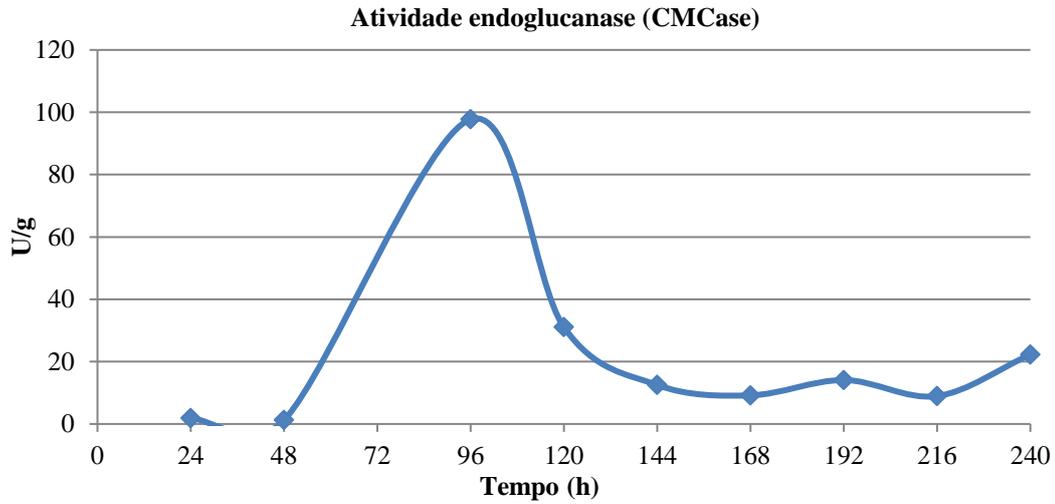
Fonte: Autora

5.4.6 Atividade da endoglucanase (CMCase)

O extrato bruto foi incubado como relatado na metodologia empregada. Sendo observado uma atividade relevante da endoglucanase, semelhante aos valores de exoglucanase relatados anteriormente. De modo que a maior atividade foi relatada durante 96 horas de cultivo (97,74 U/g) (**Figura 17**). A produção de endoglucanase avaliada nesse estudo foi consideravelmente maior que a encontrada por Guimarães (2016), que relatou 1,36 U/mL de atividade da CMCase em decorrência da fermentação de *B. bassiana* em fibras da algaroba.

A produção de enzimas celulolíticas (Fpase e CMCase) pelo fungo filamentosso *M. anisopliae* foi a causa do aumento das proteínas totais analisadas no decorrer das 240 horas de fermentação.

Figura 17. Análise da produção celulolítica endoglucanase por *Metarhizium anisopliae* através de fermentação em estado sólido na fibra da algaroba.

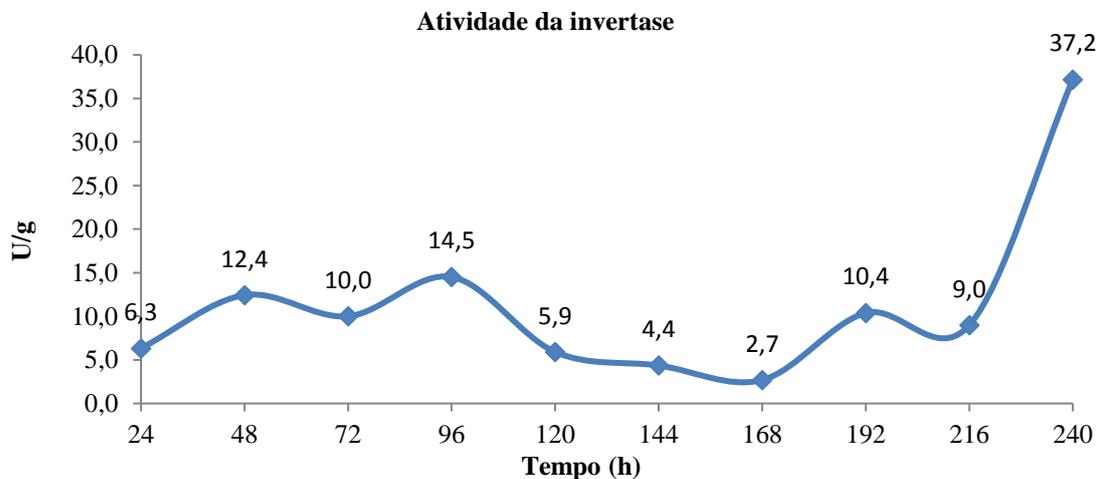


Fonte: Autora

5.4.7 Atividade de Invertase

A invertase foi analisada a partir da unidade enzimática (U), que é a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de grupos redutores. Foi observado uma produção regular (entre 2,7 – 9,0 U/g) no período de 24 – 48 horas de cultivo (**Figura 18**). Um aumento significativo foi visto no último dia de fermentação (240h), chegando ao valor de 37,2 U/g . O valor constante de U/g no período de 24-168 horas é também relatado por Paris (2008) em FES de farelo de soja por *Aspergillus clavatus*. No entanto, os valores da enzima invertase relatado por Paris (2008) são inferiores aos visto no nosso estudo (7 U/mL).

Figura 18. Perfil de produção da invertase por *Metarhizium anisopliae*, analisado a partir unidade da atividade enzimática por gramas de substrato (U/g).



Fonte: Autora

5.4.8 Temperatura ótima

As enzimas amilolíticas e celulolíticas (endoglucanase e exoglucanase) foram submetidas a diferentes temperaturas para analisar qual temperatura favorece a produção enzimática e quais são capazes de provocar desnaturação enzimática. Diante disso para a amilase a melhor temperatura que favoreceu a melhor produção enzimática foi a temperatura de produção (30° C). Já para as enzimas celulolíticas CMCase e Fpase foram 50° C e 65° C, respectivamente (**Tabela 5**). Silva e colaboradores (2005) observaram a mesma temperatura ótima para o favorecimento da atividade de CMCase produzido por *Thermoascus aurantiacus* em meio sólido.

Tabela 5. Perfil de produção enzimática em diferentes variações de temperatura.

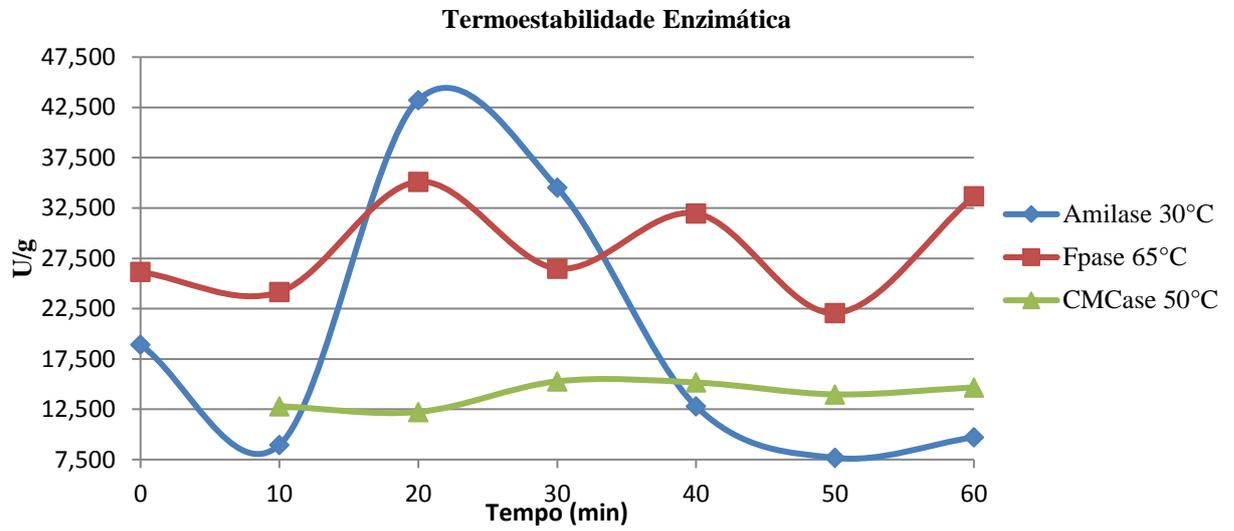
Temperatura °C	Amilase (U/g)	FPase (U/g)	CMCase (U/g)
30	1,17	9,12	25,58
40	0,53	7,77	17,11
50	0,25	12,60	26,81
65	0,63	13,58	15,69
70	0,75	13,07	14,64

Fonte: Autora

5.4.9 Termoestabilidade

As enzimas celulolíticas (CMCase e Fpase) ao longo de 60 minutos, foram expostas à temperatura que favoreceu a maior produção enzimática 50° C para a endoglucanase e 65° C para exoglucanase. No entanto a CMCase, em comparação a Fpase mostrou-se mais estável. Nos primeiros minutos houve um crescimento progressivo da atividade enzimática, que foi mantido a partir de 30 minutos, variando de 13,98 - 14,6 U/g. Quanto a amilase, a análise da estabilidade térmica não foi satisfatória, tendo em vista o crescimento, porém o não mantimento da produção enzimática ao longo dos 60 min de incubação do extrato bruto na temperatura ótima de 30° C (**Figura 19**).

Figura 19. Avaliação da termoestabilidade enzimática das enzimas: amilase, CMCase e Fpase, nas temperaturas ótimas.



Fonte: Autora

6 CONCLUSÕES

Os conídios de *M. anisopliae* produzidos em meio sólido, na fibra da algaroba mostrou-se viável para o uso no controle biológico de formigas cortadeiras.

Os extratos brutos da algaroba oriundos da fermentação em estado sólido mostrou-se favorável à produção de enzimas amilolíticas, celulolíticas (endoglucanase e exoglucanase), proteolíticas e da invertase, garantido pelo crescimento de *M. anisopliae*.

O fungo filamentoso *M. anisopliae* foi capaz de produzir altos valores de enzimas celulolíticas. Estas apresentaram uma temperatura favorável e estável à atividade enzimática de 50° C para endoglucanases e 65° C para as exoglucanases.

As enzimas amilolíticas produzidas no processo fermentativo não são termoestáveis e apresentam atividade ótima a 30° C.

Houve uma alta atividade proteolítica nos extratos brutos da algaroba, em virtude do crescimento de *M. anisopliae*.

O cultivo de *M. anisopliae* em fibras de algaroba também favoreceu a alta produção de invertase.

7 REFERÊNCIAS

- AIDOO, K.E.; HENRY, R.; WOOD, B.J.B. Solid state fermentations. *Advances in Applied Microbiology*, v.28, p.201-237, 1982.
- ALVA, S. et al. Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI 12 in solid state culture. *African journal of Biotechnology*, v. 6, n. 5, p. 576, 2007.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos em controle microbiano de insetos. Editora Malone Ltda, Piracicaba: FEALQ, p. 1163, 1998b.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. Controle microbiano de insetos. 2ª. Edição. Piracicaba: FEALQ, p. 289, 1998a.
- ALVES, S. B.; NOGUEIRA, N. L. Efeito da temperatura na germinação e viabilidade do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA. 1984. p. 170.
- AUTUORI, M. Investigações sobre a biologia da saúva. *Ciência e Cultura*, v. 62, n. SPE1, p. 4-12, 2010.
- AZEVEDO, J. L. Fungos – Genética e melhoramento de fungos na biotecnologia. *Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 2011.
- BÉGUIN, P.; AUBERT, JEAN-PAUL. The biological degradation of cellulose. *FEMS microbiology reviews*, v. 13, n. 1, p. 25-58, 1994.
- CARVALHO, R. V.; CÔRREA, T. L. R.; SILVA, J. C. M; MANSUR, L. R. C. O; MARTINS, M. L. L. Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.39, p.102-107, 2008.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, NEI. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
- CZECZOT, A. M. Desenvolvimento de sistemas de análise da função gênica para fungos entomopatogênicos: Construção de linhagem Δ Ku70 em *Metarhizium anisopliae*. 2016. 50 f. Monografia em Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.
- DA SILVA, C. J. A.; DO NASCIMENTO MALTA, D. J.. A importância dos fungos na biotecnologia. *Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-FACIPE*, v. 2, n. 3, p. 49, 2017.
- DA SILVA, G. AB et al. Produção e caracterização de protease obtida por *Gliocladium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v. 3, n. 1, 2009.

- DE MOURA, C. L. A.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Determinação da atividade de invertase em extratos enzimáticos. Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 2007.
- DEBACH, PAUL; ROSEN, DAVID. Biological control by natural enemies. CUP Archive, 1991.
- DURAND, A. Bioreactors designs for solid state fermentation. Biochemical Engineering Journal, v.13, n.2/3, p.113-125, 2003.
- EL HAG, M. G.; AL SHARGI, K. M.; EID, A. A. The nutrient composition of animal feeds available in the Sultanate of Oman. Agriculture and Fisheries Research Bulletin, v. 1, p. 1-14, 2000.
- FARGUES, J.; REMAUDIERE, G. Considerations on the specificity of entomopathogenic fungi. Mycopathologia. Dordrecht, v.62, v.1, p. 31-37, 1977.
- FERRON, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. Annual review of entomology, v. 23, n. 1, p. 409-442, 1978.
- FOCADO EM VOCÊ. Disponível em: < <http://www.focadoemvoce.com/noticias/algarobeira-frondosa-e-linda/>> Acesso em: 25 maio 2017.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. Pure and Applied Chemistry, v.59, p.257-268, 1987.
- GIONGO, J. L.; Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp. 95f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- GODOY, M. G. Produção de lipases microbianas e detoxificação simultânea de rejeitos agroindustriais. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil. 116 pp. 2009.
- GONÇALVES, L. G. Produção de amilases de *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* e hidrólise enzimática do bagaço de mandioca visando a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. 2016.
- GUANDALINI, N. C. Estudo da produção de enzimas amilolíticas pelo fungo *Metarhizium*. 2007.
- GUIMARÃES, A.G. L. P. Produção de conídios e enzimas hidrolíticas por *Beauveria Bassiana* (Bals) *uillemin* (Deuteromycotina: *Hyphomycetes*) em diferentes substratos. 2016. Dissertação de mestrado, 198p.
- HUGHES, J. B. et al. Cytotoxic effects of an extract containing alkaloids obtained from *Prosopis juliflora* Sw. DC (Algaroba) pods on glioblastoma cells. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, v. 6, n. 1, 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3d. São Paulo, 1985.

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

INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM. Banco de Dados. Disponível em: <https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=154201#null> Acesso em: 25 maio 2017.

JOO, HAN-SEUNG; CHANG, CHUNG-SOON. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 3, p. 1263-1270, 2005.

KAVA-CORDEIRO, V. Cariotipos eletroforeticos de linhagens selvagens e mutantes do fungo entomopatogenico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Curitiba, 1993, 92 p. Tese (Mestrado) - Universidade Federal do Parana.

KRIEGER DE MORAES, C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. (2003) Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Curr Microbiol*, v. 46, n. 3, p. 205-10. ISSN 0343-8651.

KUMAR, Sushil et al. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 5, p. 1701-1705, 2005.

KUMAR, V.; SAHAI, V.; BISARIA, V. S. Production of amylase and chlamydospores by *Piriformospora indica*, a root endophytic fungus. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 1, n. 2, p. 124-128, 2012.

LABORATÓRIO DE ANÁLISES E PESQUISAS DE BEBIDAS ALCOÓLICAS – LBA. Universidade Federal da Paraíba. Disponível em: <<http://www.ct.ufpb.br/lpfd/contents/imagens-1/recursos-naturais/vagens.jpg/view>> Acesso em: 25 maio 2017.

LEEMON, D. M.; JONSSON, N. N. Comparative studies on the invasion of cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) and sheep blowflies (*Lucilia cuprina*) by *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). *Journal of invertebrate pathology*, v. 109, n. 2, p. 248-259, 2012.

LIMA, D. F. et al. Avaliação nutricional da farinha de Algaroba (*Prosopis juliflora*): preparo, composição centesimal e toxidez. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 26, n. 2, p. 193, 1983.

LUNA, E.A. Características citológicas e genéticas de linhagens selvagens, mutantes e diploides de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Rio de Janeiro, 1985, 260p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

LYND, LEE R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

- LYNEL, L. R.; WYMAN, C. E.; GERNGROSS, T. U. Biocommodity Engineering Biotechnol. Prog, v. 15, n. 5, p. 777-793, 1999.
- MESSIAS, C. L.; AZEVEDO, J. L. Parasexuality in the deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. Transactions of the British Mycological Society, v. 75, n. 3, p. 473-477, 1980.
- MILLER, G. L. Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem., v.31, p.426-429, 1959.
- NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS, M. L. L. Produção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2006.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger: Princípios de Bioquímica, 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.
- OLIVEIRA, IURI MONTANDON DE. Aspectos biológicos do fungo entomopatogênico *Aschersonia* sp. cultivado em diferentes meios de cultura. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.
- PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. Enzyme Technology. 1ª ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 2005. 760 p.
- PARIS, LEANDRO D. DE. Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólido das sojas orgânica, transgênica e convencional. Toledo: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2008.
- PEGADO, C. M. A. et al. Efeitos da invasão biológica de algaroba-*Prosopis juliflora* (Sw.) DC. sobre a composição e a estrutura do estrato arbustivo-arbóreo da caatinga no Município de Monteiro, PB, Brasil. Acta Botanica Brasilica, v. 20, n. 4, p. 887-898, 2006.
- PINTO, G. A. S. et al. Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 2005.
- PORTO, M. F.; MILANEZ B. Documento técnico sobre os impactos da sulfluramida e do sulfonato de perfluoroctano (PFOS) sobre a saúde humana e ambiental. Fundação Oswaldo Cruz, 2009.
- RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. Eletronic Journal of Biotechnology, v.1, n.3, 1998.
- RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and molecular biology reviews, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998. ISSN 1092-2172.
- REESE, E. T. History of the cellulase program at the US Army Natick Development Center. In: Biotechnol. Bioeng. Symp.:(United States). Army Natick Development Center, MA, 1976.

ROMBACH, M. C.; HUMBER, R. A.; ROBERTS, D. W. *Metarhizium flavoviride* var. minus, var. nov., a pathogen of plant-and leafhoppers on rice in the Philippines and Solomon Islands. *Mycotaxon*, 1986.

SANTOS, A. V.; DE OLIVEIRA, B. L.; SAMUELS, R. I. Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sub-lethal doses of imidacloprid: perspectives for the control of the leaf-cutting ant *Atta sexdensrubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). *Mycopathologia*, v. 163, n. 4, p. 233-240, 2007.

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

SCHRANK, AUGUSTO et al. Superoxide dismutases in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Ciênc. cult.(São Paulo)*, v. 45, n. 3/4, p. 200-5, 1993.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, v. 56, n. 7, p. 1267-1274, 2010.

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

SHARMA, A., et al. Cellulases: Classification, methods of determination and industrial applications. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 179, n. 8, p. 1346-1380, 2016.

SIA, ELIANDRA DE FREITAS et al. Meios de cultura alternativos para fungos utilizando diferentes substratos, especialmente de mandioca (*Manihot esculenta*). 2012.

SILVA, C. G. M. da et al. Caracterização físico-química e microbiológica da farinha de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC). *Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2007.

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

SILVA, ROBERTO DA et al. Production of xylanase and CMCcase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 36, n. 3, p. 235-241, 2005.

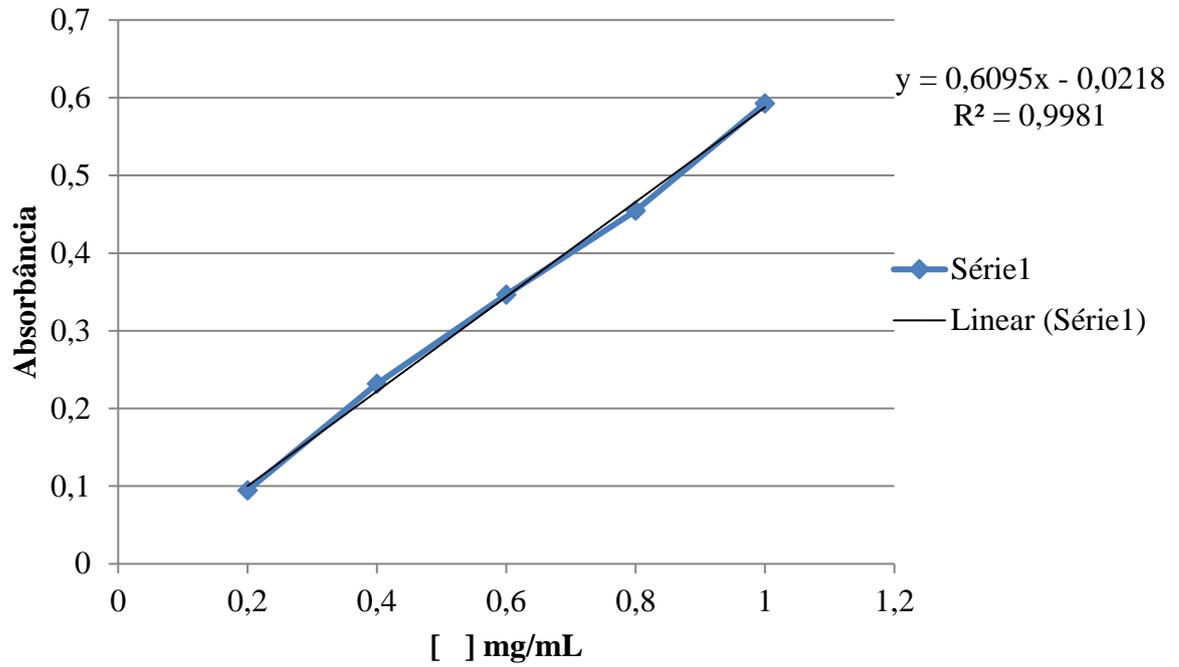
SILVA, ROBERTO DA et al. Production of xylanase and CMCcase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 36, n. 3, p. 235-241, 2005.

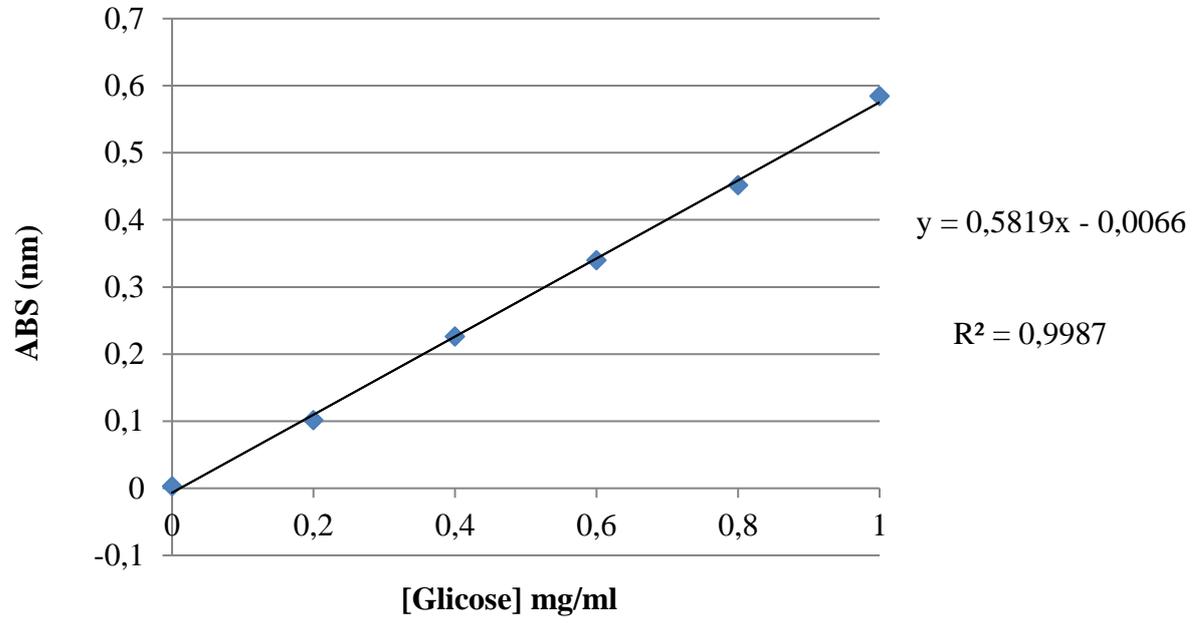
SOROKIN, N. (1883). Plant parasites causing infectious diseases of man and animals of man and animals as causes of infectious diseases. *Journal of Military Medicine (First Supplement)* Part 2, 268–293(In Russian).

- SOUZA, P. M. D. et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 46, n. 2, p. 337-346, 2015. ISSN 1517-8382.
- STURMER, A. T.; LUANGSA-ARD, J. J.; ROBERTS, D. W. Estabilidade de proteases produzidas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. *UNOPAR Cient., Ciênc. Biol. Saúde, Londrina*, v.5/6, p.85-88, 2003.
- TINLINE, R.D. Nuclear distribution in *Metarhizium anisopliae*. *Mycologia*, New York, v. 63, p. 713-771, 1971.
- TULLOCH, M. (1976). The genus *Metarhizium*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 66, 407–411.
- VAN DER MAAREL, M. J. E. C. et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family, *Journal of Biotechnology*, v. 94, p. 137-155, 2002.
- VARGAS, L. R. R.; ROSSATO, M.; RIBEIRO, R. T. T.; BARROS, N. M. Characterization of *Nomuraea rileyi* strains using polymorphic DNA, virulence and enzyme activity. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.46, p.13-18, 2003.
- VEEN, K. H. (1968). Recherches sur la maladie, due a *Metarhizium anisopliae* criquet pélerin. *Mededingen Landbouwhogeschool Wageningen, Netherland* 68, 1–77.
- VEY, A.; MATHA, V.; DUMAS, C. Effects of the mycotoxin e on insect haemocytes and on dynamics and efficiency of the multicellular immune reaction. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.80, p.177-187, 2002.
- VILACORTA, A. Efeito da temperatura e da nutrição sobre o desenvolvimento de vários isolados de *Metarhizium anisoptiae* Sorok. In: Congresso Latinoamericano de Entomologia, 3; Congresso Brasileiro de Entomologia, 4, Bahia, 1978, p. 70. Resumos, 1978.
- WILSON, J. R. Organization of forage plant tissues. Forage cell wall structure and digestibility, n. foragecellwalls, p. 1-32, 1993.

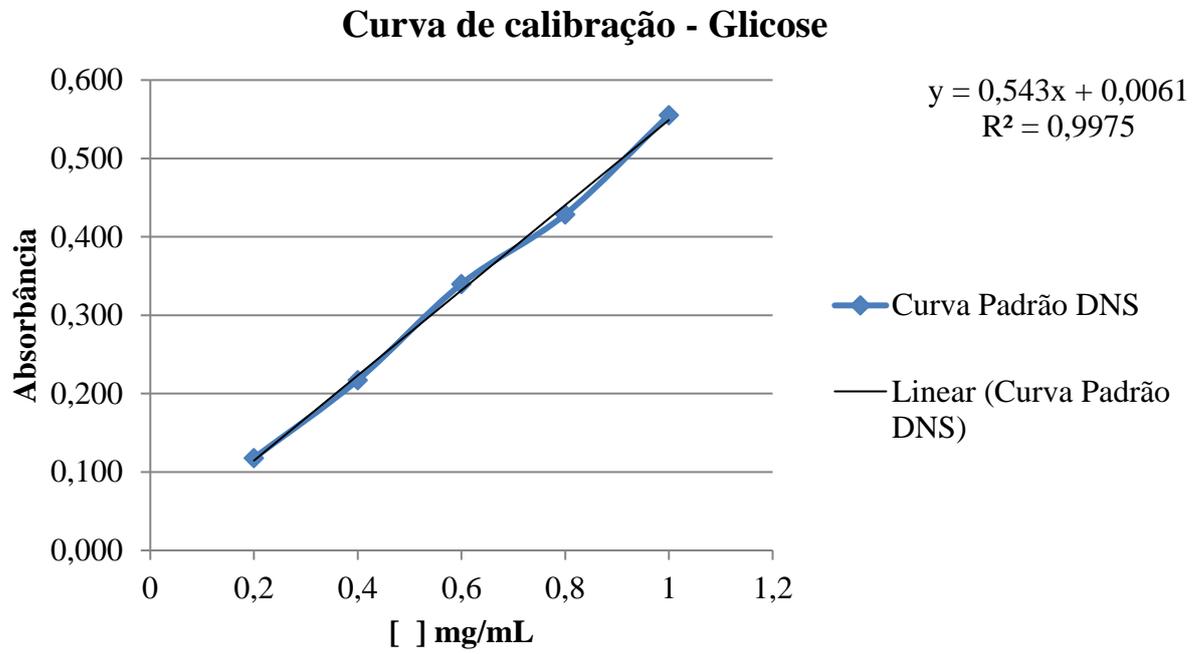
APÊNDICE A – Curva de calibração da Glicose

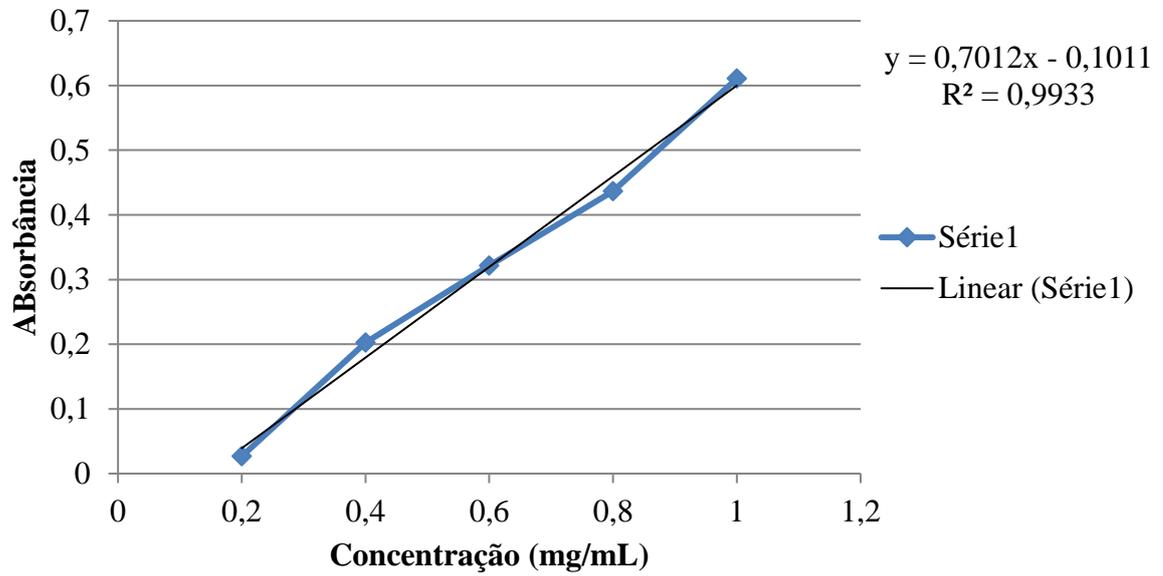
Curva Calibração - Glicose



APÊNDICE B – Curva de calibração - Glicose**Curva de Calibração - Glicose**

APÊNDICE C – Curva de calibração da Glicose



APÊNDICE D – Curva de calibração - Glicose**Curva de Calibração - Glicose**

APÊNDICE E – Curva de calibração - BSA**Curva padrão BSA**