

Universidade de Brasília-UnB
Instituto de Ciências Biológicas-IB
Departamento de Biologia Celular
Pós-Graduação em Biologia Molecular

**METABÓLITOS DE ORIGEM FÚNGICA:
aplicações potenciais em processos biotecnológicos**

Jorge William Arboleda Valencia

Julho, 2011 – Brasília –DF.

Jorge William Arboleda Valencia

**METABÓLITOS DE ORIGEM FÚNGICA:
aplicações potenciais em processos biotecnológicos**

Universidade de Brasília-UnB
Instituto de Ciências Biológicas-IB
Departamento de Biologia Celular
Pós-Graduação em Biologia Molecular

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Fátima Grossi de Sá

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Biologia Molecular

Julho, 2011 – Brasília – DF

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Maria Fátima Grossi de Sá (Orientadora)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dra. Marlinda Lobo de Souza
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho
Departamento de Biologia Celular
Universidade de Brasília UnB

Dra. Maria Cristina Mattar da Silva
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dr. Thales Lima Rocha
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dr. Osmundo Brilhante Oliveira Neto (Suplente)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Trabalho realizado nos Laboratórios de Interação Molecular Planta-Praga (LIMPP) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, do Grupo de Investigaciones Biológicas (GIBI), da Universidad Católica de Manizales – Colômbia, e no Departamento de Entomologia (University of Nebraska – Lincoln – NE – EUA)

Julho, 2011 – Brasília – DF

*Aos meus amados pais, Jota e Ofélia, pelo imenso amor, paciência e carinho na educação de seus filhos
Ao meu amado filho Juan Felipe
A minha adorada Luisa
A minha adorada irmã Liliana
A minha amada família*

*Pai, só Deus sabe de promessas, tempos, encontros e esperanças. Porém, tenho certeza
que verei você nos olhos do meu filho ou mesmo no labirinto do universo após a viagem
obrigada.*

"Con toda consideración y respeto"

Dedico

AGRADECIMENTOS

- ✓ Agradeço a DEUS, Mas tenho muitas coisas para lhe perguntar.
- ✓ Agradeço muito aos meus pais pelo imenso amor, apoio e dedicação durante toda a minha vida. Sou quem eu sou graças a vocês.
- ✓ Agradeço a minha amada família Juan, Luisa e Lili, pelo apoio e paciência.
- ✓ Agradeço muito à minha orientadora Dra. Maria Fátima Grossi de Sá pelo exemplo de liderança e dedicação ao trabalho, pela confiança, amizade e carinho. Sempre serei grato com você.
- ✓ Agradeço ao excelente programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da UnB. Para mim é uma grande honra ser um estudante graduado da UnB.
- ✓ Agradeço aos amigos, e a todos os professores da Pós-graduação que passaram para mim todos os seus conhecimentos e experiências.
- ✓ Agradeço a todos os integrantes da banca examinadora pelo apoio e dedicação na revisão desta tese.
- ✓ Agradeço muito ao Arnubio, você lutou e conseguiu. Hoje foi a minha vez.
- ✓ Agradeço muito ao Professor Fernando Delgado B., pelo apoio e incentivo.
- ✓ Agradeço ao meu tio Enrique, sempre lembrarei a sua companhia na fase final deste projeto de vida.
- ✓ Agradeço muito aos meus queridos amigos Simoni, Thales, Osmundo, colegas e colaboradores do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga. Por ter me acolhido com apreço e carinho durante o tempo no laboratório. Vocês são maravilhosos.
- ✓ Aos meus queridos amigos, Félix, Ricardo e Helson, a vida no Brasil foi mais fácil com a sua amizade. Minha eterna gratidão.
- ✓ A Ana e Lecir, sempre me atenderam da melhor forma possível. Obrigado!.
- ✓ Agradeço ao Cesamildo pela valiosa ajuda subministrada na revisão da tese.
- ✓ Agradeço as minhas queridas amigas Gloria, Kelly e Paula pelo apoio constante.
- ✓ Agradeço ao pessoal do Laboratório de Virologia (Brasil), GIBI (UCM- Colômbia) de Entomologia (UNL-USA) pelos ensinamentos, apoio e incentivo.
- ✓ À CAPES, instituições e pessoas, de forma direta ou indireta, contribuíram para que este trabalho fosse realizado, minha eterna gratidão.

ÍNDICE

1	RESUMO	2
2	ABSTRACT	3
3	INTRODUÇÃO	5
3.1	Aplicação potencial: seleção de controladores biológicos na área agrícola	6
3.1.1	Mecanismo de infecção de fungos entomopatogênicos	6
3.1.2	Análise de toxinas e melhoramento dos fungos controladores	6
3.1.3	Broca gigante da cana-de-açúcar <i>Telchin licus licus</i>	7
3.2	Aplicação potencial: avaliação de substratos para processos agroindustriais	8
3.2.1	Aproveitamento de resíduos lignocelulósicos	8
3.2.2	Fermentação e biocatálise	10
3.2.3	Substratos agrícolas renováveis utilizados em processos de fermentação industrial	10
3.2.4	Carboidratos como substratos de carbono	11
3.2.5	Utilização de resíduos agroindustriais na indústria biotecnológica	12
3.2.6	Bambu (<i>Guadua angustifolia</i>) como substrato potencial para processos de bioconversão	13
3.2.7	<i>Schizophyllum commune</i>	14
3.2.8	Exemplos de aproveitamento de resíduos	14
3.3	Aplicação potencial: avaliação da atividade antimicrobiana nas áreas de farmacologia e medicina	17
3.3.1	Moléculas de origem fúngica com atividade contra agentes infecciosos em humanos	17
3.3.2	Infecções hospitalares	18
3.3.3	Principais Gêneros bacterianos causadores de infecções hospitalares	18
3.3.4	Epidemiologia	22
3.3.5	Resistência antimicrobiana	22
3.4	Moléculas de interesse biotecnológico	23
4	HIPÓTESE	24
5	OBJETIVO GERAL	24
5.1	Objetivos específicos	24
CAPITULO 1. Atividade biológica de metabólitos produzidos pelo fungo entomopatogênico <i>Beauveria bassiana</i>: uma avaliação intraespécie da produção da sua principal toxina beauvericina (BEA)		
6	Resumo do primeiro capítulo	25
7	Material e Métodos	25
7.1	Isolados fúngicos, germinação e testes	25
7.2	Preparação e inoculação dos meios líquidos de cultura	26
7.2.1	Quantificação de Beauvericina (BEA): ELISA	27
7.2.2	Ensaio contra a ferrugem do cafeeiro <i>H. vastatrix</i>	28

7.2.3	Obtenção de meios líquidos dos isolados de <i>B. bassiana</i>	28
7.2.4	Teste de germinação de uredósporos	28
7.3	Avaliação do efeito de extratos de <i>B. bassiana</i> sobre o desenvolvimento da ferrugem em casa de vegetação	28
7.4	Análise estatística.....	29
7.5	Bioensaios: Atividade citotóxica de metabólitos do fungo <i>B. bassiana</i>	30
7.5.1	Micotoxinas e reagentes.....	30
7.5.2	Cultura das células e tratamentos.....	30
7.5.3	Testes de viabilidade celular.....	30
7.5.4	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	31
7.5.5	Análise estatística.....	31
7.6	Avaliação da atividade antibacteriana.....	32
7.6.1	Bactérias.....	32
7.6.2	Ensaio de inibição	32
8	Resultados e Discussão	33
8.1	Testes de germinação e produção de massa micelial seca	33
8.2	Variabilidade na produção de BEA.....	34
8.3	Avaliação do efeito de extratos de <i>B. bassiana</i> sobre a germinação de uredósporos e no desenvolvimento da ferrugem do café.	37
8.4	Atividade biológica sobre linhagens celulares de insetos	42
8.4.1	Atividade citotóxica de metabólitos puros (micotoxinas)	42
8.4.2	Atividade citotóxica de extratos brutos.....	44
8.5	Atividade antibacteriana.....	47
CAPITULO 2. Atividade biológica de metabólitos produzidos pelo fungo <i>Schizophyllum commune</i>: estudo dos processos bioquímicos e físicos da interação com bambu		
9	Resumo do segundo capítulo.....	52
10	Materiais e Métodos.....	53
10.1	Material Biológico.....	53
10.2	Produtos químicos e substratos.....	53
10.3	Cultivo do fungo	53
10.4	Ensaio enzimáticos.....	54
10.5	Caracterização parcial das β -glicosidases.....	55
10.6	Efeito de pH, temperatura e parâmetros cinéticos das β -glicosidases.....	55
10.7	Determinação de proteínas totais solúveis.....	55
10.8	Western blot.....	56
10.9	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	56
10.10	Análise estatística	57
11	Resultados e Discussão	57
11.1	Atividade holocelulase	57

11.2	Atividade da β -glicosidase e holocelulase na presença e ausência de carboximetilcelulose CMC.	60
11.3	Atividade da lacase	64
11.4	Caracterização parcial das β -glicosidases.....	65
11.5	Western blot.....	67
11.6	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	68
CAPITULO 3. Caracterização parcial de enzimas digestivas de larvas de broca gigante da cana-de-açúcar <i>Telchin licus licus</i>.		
12	Resumo do terceiro Capítulo	74
13	Materiais e Métodos.....	74
13.1	Insetos	74
13.2	Reagentes.....	75
13.3	Determinação do pH do trato digestivo da broca gigante	75
13.4	Obtenção dos extratos intestinais	75
13.5	Ensaio de atividade e inibição de leucina-aminopeptidase (LAP)	75
13.6	Ensaio de atividade de β -glicosidases	76
13.7	Efeito de ativadores e inibidores na atividade de β -glicosidases	76
13.8	Efeito de pH, temperatura e parâmetros cinéticos das enzimas	76
13.9	Separação eletroforética e detecção da atividade LAP em géis nativos e de focalização isoeletrica (IEF)	77
13.10	Análise estatística	77
14	Resultados e Discussão	77
14.1	Determinação do pH do trato digestivo da broca gigante	77
14.2	Caracterização parcial das β -glicosidases de broca gigante da cana-de-açúcar	78
14.3	Caracterização parcial da atividade leucina-aminopeptidase (LAP) de <i>T. licus licus</i> 82	
14.4	Inibição da leucina-aminopeptidase de <i>T. licus licus</i>	85
15	CONCLUSÃO FINAL.....	88
16	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
17	ANEXOS.....	105

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

4MU β G	4-metilumbeliferil- β -glicósideo
β	Beta
Σ	Somatória
μ M	Micromolar
μ m	Micrômetro
AMPs	Peptídeos antimicrobianos
BEA	Beauvericina
BAS	Basianina
CC ₅₀	Concentração citotóxica 50
CL ₅₀	Concentração letal media
CMC	Carboximetilcelulose
CO	Monóxido de carbono
EDTA	Acido etilenodiaminotetracético
HEC	Hidroxietilcelulase
IEF	focalização isoeletrica
kDa	kiloDalton
LAP	leucina-aminopeptidase
LIMPP	Laboratório de interação molecular Planta-Praga
LSD	Minima diferença estatística
M	Molar
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
pI	Ponto isoeletrico
PMSF	Phenylmethyl sulphonyl fluoride
pN β G	p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo
ppm	Partes por milhão
OOS	Oosporeina
PI	Período de infecção
PL	Período de latência
SO _x	Óxidos de enxofre
TEN	Tenellina
TNM-FH	Meio para cultura de células de inseto + L-glutamina e bicarbonato de sódio
TTBS	Tris Buffer Salino contendo Tween 0.1%
TBS	Tris Buffer Salino
UFC	unidades formadoras de colônia
m/v	Massa/volume
v/v	Volume/volume

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Fontes típicas de carbono utilizadas em fermentações industriais.....	10
Tabela 2. Funções importantes dos carboidratos	11
Tabela 3. Informação do genótipo dos isolados selecionados para o estudo.....	27
Tabela 4. Valores de porcentagens de germinação, massa seca e produção de proteína total solúvel (Bradford) para cada um dos 10 isolados fúngicos de <i>B. bassiana</i> selecionados.	33
Tabela 5. Quantificação de BEA por 10 isolados do fungo <i>B. bassiana</i> . ND: Não detectado.	34
Tabela 6. Classificação por grupos de produção	34
Tabela 7. Análise LSD e diferenciação entre os grupos pela produção de BEA.....	35
Tabela 8. Média da germinação de uredósporos de <i>H. vastatrix</i> tratados com as culturas do fungo <i>B. bassiana</i>	38
Tabela 9. Atividade citotóxica de metabólitos de <i>B. bassiana</i> sobre as linhagens celulares SF-9 e SF-21 usando a solução azul de tripan após 48 h.....	43
Tabela 10. Atividade citotóxica de extratos brutos de <i>B. bassiana</i> sobre a linhagem celular SF-9 usando a solução azul de tripan. Valores de CL ₅₀ com limite de confiança inferior e superior -95%- foram calculados usando Probit. (SPSS Inc., US).....	44
Tabela 11. Análise de porcentagem de inibição, média da leitura dos bioensaios realizados com os metabólitos puros sobre as diferentes espécies de bactérias.	48
Tabela 12. Análise de porcentagem de inibição, média da leitura dos bioensaios realizados com os extratos brutos do crescimento do fungo <i>B. bassiana</i> de diferentes grupos de produção de BEA e mistura sobre as diferentes espécies de bactérias.....	49
Tabela 13. Composição dos resíduos agroindustriais utilizados.	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagem microscópica de <i>E. coli</i> . Coloração Gram; ampliação: 1.000X.	19
Figura 2. Micrografia eletrônica transmissão de <i>S. typhimurium</i>	19
Figura 3. Imagem de microscopia confocal de <i>K. pneumoniae</i>	20
Figura 4. <i>P. vulgaris</i> bactéria Gram negativa demonstrada por coloração vermelha/rosa..	21
Figura 5. Imagem microscópica de <i>S. aureus</i> . Coloração Gram; magnificação: 1.000X.....	21
Figura 6. Escala de reações da <i>Hemileia vastatrix</i> Berk. y Br. (Leguizamón, 1983).	29
Figura 7. Produção específica de BEA por diferentes isolados de <i>B. bassiana</i>	36
Figura 8. Efeito de BEA na porcentagem de germinação de uredósporos da ferrugem-do-café (<i>H. vastatrix</i>).	37
Figura 9. Curvas calculadas com base nas taxas de infecção da doença para todos os tratamentos em casa de vegetação em época seca	39
Figura 10. Curvas calculadas com base nas taxas de infecção da doença para todos os tratamentos em casa de vegetação em época de chuvas	40
Figura 11. Sintomas da ferrugem nas plantas do cafeeiro..	41
Figura 12. Atividade citotóxica das micotoxinas BEA, OOS, BAS e TEN sobre a linhagem celular SF-9 de <i>S. frugiperda</i>	42
Figura 13. Curvas de viabilidade dose-resposta obtidas com BEA após 48 horas de exposição.....	43
Figura 14. Microscopia de luz 20X. A. Células controle linhagem celular SF-9. B. Células tratamento com BEA 10 μ M, após 48 horas de exposição.	46
Figura 15. Micrografias eletrônicas de transmissão (MET) das células SF-9. A. controle. B. células tratadas com BEA 10 μ M.	46
Figura 16. Locais de coleta do fungo <i>S. commune</i> na localidade de Santágueda –Caldas, Colômbia–.....	53
Figura 17. Atividade da holocelulase do extrato bruto de <i>S. commune</i> crescido em cultura submersa durante 15 dias com diferentes fontes de carbono.	58
Figura 18. Atividade da holocelulase de extratos de <i>S. commune</i> em cultura submersa durante 15 dias com diferentes concentrações de bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono.	59
Figura 19. Atividade específica da β -glicosidase de <i>S. commune</i>	61
Figura 20. Atividade de CMCase de extratos do 7º dia de crescimento do fungo <i>S. commune</i> empregando-se CMC como substrato	62
Figura 21. Atividade de endoglucanasas de extratos do 7º dia de crescimento, utilizando-se HEC como substrato.	62
Figura 22. Atividade enzimática de extratos do 7º dia de crescimento, utilizando-se avicel como substrato.	63
Figura 23. Atividade enzimática de extratos líquidos do 7º dia de crescimento do fungo <i>S. commune</i> utilizando-se xilana como substrato.	63
Figura 24. Atividade das lacases do fungo <i>S. commune</i> durante 20 dias de crescimento.	64
Figura 25. Atividade da enzima de extratos do dia 15 de crescimento do fungo <i>S. commune</i> utilizando-se ABTS como substrato.	65
Figura 26. Atividade específica das β -glicosidasas de extratos do dia 15 de crescimento do fungo <i>S. commune</i> , utilizando-se os substratos pN β G e 4MU β G.....	66
Figura 28. Efeito do pH na atividade de β -glicosidasas de extratos do fungo <i>S. commune</i>	67
Figura 27. Curva de K_m e V_{max} para β -glicosidasas de <i>S. commune</i>	67
Figura 29. Identificação das β -glicosidasas em amostras de <i>S. commune</i> por meio de Western blot.	68
Figura 30. MEV visualização topográfica. A e B: fibras de bambu não tratadas. C e D: fibras de bambu tratadas com extratos enzimáticos durante 8 dias.	69

Figura 31. A: esporo germinado. B: corte infectado. C e D: distribuição micelial na planta. .	70
Figura 32. MEV visualização topográfica. A: carpóforo na fase inicial. B: infecção dos feixes vasculares. C e D: Ruptura das células do parênquima e do tecido parenquimático de bambu.....	71
Figura 33. A: corte longitudinal do protoxilema com pontuações escalariformes. B: anéis de suporte do floema. C: basidiósporos no parênquima. D: corte longitudinal do carpóforo.	71
Figura 34. Determinação do pH do trato digestivo da broca gigante da cana-de-açúcar <i>T. licus licus</i>	78
Figura 35. Curva de K_m e V_{max} para β -glicosidases da broca gigante da cana-de-açúcar.....	79
Figura 36. Efeito do pH na atividade de β -glicosidases da broca gigante da cana-de-açúcar.	79
Figura 37. Efeito da temperatura na atividade de β -glicosidases da broca gigante da cana-de-açúcar <i>T. licus</i>	80
Figura 38. Atividade relativa de β -glicosidases de <i>T. licus licus</i> na presença de diferentes concentrações de $MgCl_2$	81
Figura 39. Atividade relativa de β -glicosidases de <i>Telchin licus licus</i> na presença de diferentes concentrações de NaCl, KCl, $CaCl_2$, EDTA, Ureia e SDS.	82
Figura 40. Atividade específica de LAP de diferentes insetos praga.	83
Figura 41. Efeito do pH na atividade de Leucina-aminopeptidase da broca gigante da cana-de-açúcar <i>T. licus licus</i>	84
Figura 42. Separação eletroforética e detecção da atividade Leucina-aminopeptidase (LAP)	84
Figura 43. Separação eletroforética e detecção da atividade Leucina-aminopeptidase (LAP). em géis de focalização isoelétrica.....	85
Figura 44. Atividade específica de LAP da broca gigante da cana-de-açúcar <i>T. licus licus</i> na presença do inibidor específico bestatin.	86
Figura 45. Atividade relativa de LAPs da broca gigante da cana-de-açúcar <i>T. licus licus</i> na presença do produto comercial.	87

1 RESUMO

A biotecnologia visa atender inúmeros problemas que afetam a humanidade e para isto muitas moléculas devem ser exploradas como ferramentas para construir soluções alternativas. Metabólitos como os produzidos por fungos apresentam geralmente duplicidade de ação, o que permite explorar seu potencial uso em aplicações industriais em diferentes áreas, como farmacologia, agroindústria, bioprocessos, tecnologia ambiental e bioconversão. Com o objetivo de estabelecer o potencial dos metabólitos produzidos pelo fungo *Beauveria bassiana*, toxinas puras (beauvericina, basianina, tenellina, oosporeina) e extratos brutos foram testados em diferentes ensaios de atividade citotóxica e antimicrobiana. Os resultados mostram que a produção de beauvericina (BEA) foi significativamente diferente entre todos os isolados e sugerem uma ativa participação desses metabólitos na morte do inseto, mostrando diferenças estatisticamente significativas entre a CC_{50} de BEA sobre a linhagem celular *Spodoptera frugiperda* SF-9 (2,81 e 6,94 μ M) e os valores das outras micotoxinas (4,23 - 11,95 μ M). Adicionalmente, demonstrou-se o efeito no desenvolvimento da ferrugem e redução na germinação. Todos os tratamentos dos metabólitos puros e dos extratos brutos provenientes do crescimento do fungo *B. bassiana* apresentaram efeitos inibitórios sobre as diferentes espécies de bactérias utilizadas nos ensaios mostrando atividade bactericida contra o gênero *Proteus sp.* e bacteriostática sobre os gêneros *Staphylococcus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Salmonella sp.* e *E. coli*. Da mesma forma, as enzimas digestivas β -glicosidases e Leucina-aminopeptidase (LAP) da broca gigante da cana-de-açúcar *Telchin licus licus* foram estudadas visando o controle da praga. Os resultados mostraram que as β -glicosidases da broca possuem uma K_m e V_{max} para p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pN β G) de 1,74 mM e 0,005 mmol/min/mg de proteína respectivamente, a melhor atividade da enzima foi encontrada com pH 6,0 e 7,0 e temperatura entre 50 e 55° C. Do mesmo modo, demonstrou-se o efeito de diferentes inibidores e ativadores da enzima, registrando para Mg^{2+} o maior incremento em atividade. Na comparação da atividade específica de LAPs com outros insetos, *Hypothenemus hampei* mostrou a maior atividade. *T. licus licus* possui 3 isoformas da enzima que são inibidas completamente com bestatin 0,1 mM a pH 7,0. Adicionalmente, um completo estudo da atividade holocelulase do fungo *Schizophyllum commune* demonstrou o efeito indutor do carboximetilcelulose (CMC) 1% e das diferentes fontes de carbono na produção das enzimas, aparentes K_m e V_{max} para pN β G das β -glicosidases de 0,303 mM e 0,504 mmol/min/mg de proteína, a melhor atividade da enzima foi a temperatura entre 50 - 60° C e pH 7,0. Finalmente, usando microscopia eletrônica de varredura (MEV) o mecanismo

físico usado pelo fungo para degradar bambu (*Guadua angustifolia*) foi observado e o potencial dos metabólitos produzidos avaliado. Os dados aqui apresentados constituem uma valiosa ajuda no desenho de estratégias voltadas a geração de plantas resistentes aos insetos-praga estudados, na busca de novos compostos antibacterianos e no aproveitamento de resíduos lignocelulósicos para produção de álcool de segunda geração.

2 ABSTRACT

Biotechnology aims to address several problems affecting mankind. For this reason, many molecules should be explored as tool to develop new alternatives solutions. Metabolites produced by fungi have usually double action, which allow approach theirs potentials use in different industrial applications in areas such as pharmacology, agroindustry, bioprocess, environmental technology and bioconversion. In order to establish the potential of metabolites from *Beauveria bassiana* fungus, the cytotoxicity and antimicrobial activity of pures toxins (beauvericin, bassianin, tenellin, oosporein) and crude extracts were tested. The results show that beauvericin (BEA) production was significantly different among all isolates and suggest an active participation of these metabolites in the insect's death. Statistical difference was found when BEA CC_{50} values on cell line *Spodoptera frugiperda* SF-9 (2.81 and 6.94 μ M) were compared with those values from others mycotoxins (4.23 - 11.95 μ M). Additionally, it was shown an effect on the development of rust, and reduced germination. All treatments of pure metabolites and crude extracts from *B. bassiana* growth showed inhibitory effects on different species of bacteria used in bioassays, showing bactericidal activity on the genus *Proteus sp.* and bacteriostatic effect on the genus *Staphylococcus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Salmonella sp.* and *E. coli*. Likewise, digestive enzymes β -glucosidases and Leucine aminopeptidase (LAP) from sugarcane giant borer *Telchin licus licus* were studied in order to control the insect pest. The results showed apparent K_m and V_{max} towards p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside of 1.74 mM and 0.005 mmol/min/mg of protein respectively for β -glucosidases, the highest enzyme activity resulted with pH between 6.0 and 7.0 and temperature between 50 e 55 °C. Besides, it was shown an effect of activators and inhibitors on the enzyme with major increments with Mg^{2+} . The LAP specific activity was compared among different insects and *Hypothenemus hampei* exhibited the highest activity. *T. licus licus* has three isoforms that are inhibited completely with 0.1 mM bestatin at pH 7.0.

Finally, a complete study of holocellulase activity from *Schizophyllum commune* fungus showed inducing effect of 1% carboxymethyl-cellulose CMC and different carbon sources on enzyme production. K_m and V_{max} towards p-nitrophenyl- β -D- glucopyranoside (pN β G) of β -glucosidases were 0.303 mM and 0.504 mmol / min / mg protein respectively, the highest enzyme activity resulted with temperature between 50 - 60° C and pH 7.0. Finally, by using scanning electron microscopy (SEM), the physical mechanism used by the fungus to degrade bamboo (*Guadua angustifolia*) was observed and the potential of metabolites produced was evaluated. The data presented here constitute a valuable contribution in the design of strategies to generate plants resistant to insect pests, in search of new antibacterial compounds and the use of lignocellulosic residues for production of second generation biofuels.

3 INTRODUÇÃO

A produção mundial de alimentos é suporte para o desenvolvimento da humanidade, uma vez que este aspecto é fundamental em todos os sentidos para a sobrevivência dos seres vivos que habitam o planeta. A quantidade e a qualidade da produção de alimentos pelo setor agrícola são afetadas por vários agentes abióticos e bióticos. Com relação aos agentes bióticos, os principais são os insetos-praga e os micro-organismos patogênicos que atacam em diferentes órgãos da planta. Estes danos causados por agentes bióticos na produção, juntamente com preços baixos e elevados custos de produção, estão provocando uma drástica diminuição de lucros para os produtores de culturas como café, soja, cana-de-açúcar, milho, tomate e outras.

Consideráveis perdas econômicas são ocasionadas pelo ataque de pragas e doenças destas importantes culturas. Atualmente, a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) pode causar perdas de até 100% da produção em diferentes locais, enquanto que em cana-de-açúcar insetos da ordem Lepidoptera, como *Telchin licus licus* (Broca gigante da cana-de-açúcar), geram perdas de 30% da produção (Mendonça et al., 1996). Quanto a doenças de importância econômica, pode-se ressaltar a ferrugem do cafeeiro causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* e a ferrugem da cana-de-açúcar causada pelo fungo *Puccinia melanocephala* (Agrios, 1996).

Uma solução alternativa para os problemas fitossanitários tem sido o uso do controle biológico. Para o manejo integrado de pragas como a broca-do-café, *H. hampei*, recomenda-se o uso de fungos entomopatogênicos, como *Beauveria bassiana* (Bustillo et al., 1998). A eficácia deste fungo entomopatogênico, frequentemente utilizado em programas de biocontrole de pragas, é atribuída principalmente à produção de uma ampla variedade de metabólitos secundários, incluindo micotoxinas, que são moléculas bioativas de natureza geralmente peptídica (Thakur e Smith 1997; Nilanonta et al., 2000). Estas moléculas são produzidas por reações consecutivas, catalisadas por enzimas do metabolismo intermediário primário, as quais geram respostas em diferentes organismos que apresentam atividade inseticida e antimicrobiana (Volcy e Pardo, 1994). É precisamente para as propriedades acima demonstradas por este tipo de micro-organismo que são necessários maiores estudos para analisar o potencial uso dessas moléculas, não só para o controle de pragas e doenças em vegetais, mas também em animais e humanos.

A biotecnologia oferece oportunidades para a resolução de muitos dos problemas que afetam a agricultura, como, por exemplo, a redução da produção de alimentos causada por

insetos-praga e fitopatógenos, efeito estufa, contaminação, entre outros (Bon *et al.*, 2008). No entanto, é necessário que haja um aprofundamento nas linhas de pesquisa para fornecer soluções eficazes para estes problemas. Uma alternativa viável é a exploração da atividade biológica de diferentes moléculas provenientes de micro-organismos, para estabelecer as aplicações potenciais em processos biotecnológicos. Os fungos produzem uma quantidade significativa de biomoléculas (produto dos metabolismos primário e secundário) que podem ser utilizados para aplicações industriais em diferentes áreas, como farmacologia, agroindústria, bioprocessos, tecnologia ambiental e bioconversão.

3.1 Aplicação potencial: seleção de controladores biológicos na área agrícola

3.1.1 Mecanismo de infecção de fungos entomopatogênicos

O uso dos fungos entomopatogênicos no controle biológico de pragas tem sido amplamente demonstrado (Ferron, 1981). No entanto, para o controle das pragas no campo, além do controle biológico (entomopatogênicos e parasitoides), é recomendável a integração de outros métodos, como o controle químico e o trato cultural. A pulverização de formulações líquidas de fungos entomopatogênicos como *B. bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, na dose de 1×10^{10} conídios, induz mortalidades entre 36% e 69% na população de broca-do-café (Bustillo *et al.*, 1991). O processo de infecção dos fungos entomopatogênicos pode ser resumido em três fases (Chanrley e St Leger, 1986):

1. Adesão de esporos à cutícula do inseto.
2. Ação enzimática do fungo na cutícula do inseto, permitindo a entrada dos tubos germinativos e a produção de micélio no corpo do inseto.
3. Ação complementar das toxinas produzidas por fungos no processo infeccioso e posterior morte do inseto.

A produção *in vitro* de toxinas de *B. bassiana* é induzida com quitina no crescimento dos fungos em meio líquido enriquecido e em ambientes adequados para o seu metabolismo (Rombach, 1988).

3.1.2 Análise de toxinas e melhoramento dos fungos controladores

Atualmente, algumas metodologias foram desenvolvidas para detectar micotoxinas nos alimentos, em contraste com os poucos estudos de metabólitos de fungos, que podem ser utilizados como inseticidas, herbicidas, fungicidas e antibióticos (Strasser *et al.*, 2000). Para produção e extração de metabólitos de fungos como as micotoxinas, são utilizadas

metodologias de crescimento do fungo em meios de cultura suplementados com sacarose, nitrato de sódio, fosfato de potássio, sulfato de ferro e outros minerais, para fornecer os compostos essenciais no desenvolvimento do organismo. Além disso, a adição de indutores é considerada uma parte importante da produção (Jegorov *et al.*, 1998). Após o crescimento dos fungos em meio de cultura, a obtenção final envolve métodos de filtração à vácuo para separação de micélio e esporos do meio líquido, precipitação de proteínas com sulfato de amônio e extração com solventes (Claydon e Grove, 1982). A análise dos extratos é realizada por técnicas sorológicas ou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) por comparação com padrões. A cromatografia é utilizada comumente para separar e detectar moléculas produzidas pelos fungos e na análise de metabólitos, devido à sua sensibilidade na detecção de compostos não voláteis ou termolábeis (Skoog e Leary, 1994; Turner *et al.*, 2009; Craveiro *et al.*, 2010). Atualmente, outro tipo de técnicas como a Cromatografia líquida acoplada a massas LC/MS, Cromatografia gasosa acoplada a massas GC/MS e técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) tem sido amplamente utilizadas na separação e identificação de toxina e moléculas bioativas (Pelegri *et al.*, 2011).

Os fungos entomopatogênicos são amplamente utilizados para o controle de pragas no mundo todo. No entanto, é necessário desenvolver melhores critérios de seleção por meio das ferramentas biotecnológicas, que permitiriam caracterizar a produção de micotoxinas envolvidas nos processos infecciosos, explorar novas moléculas bioativas, selecionar genes de interesse, desenvolver materiais transformados e, principalmente, avaliar a atividade inseticida dos micro-organismos previamente coletados no campo.

3.1.3 Broca gigante da cana-de-açúcar *Telchin licus licus*

A broca gigante da cana-de-açúcar *T. licus licus* (Drury, 1173), ataca culturas economicamente importantes, como banana e cana-de-açúcar, e representa o maior problema fitossanitário dessas culturas em países das Américas do Sul e Central como Brasil, Bolívia, Colômbia, Panamá, Trinidad e Tobago e Guiana (Mendonça *et al.*, 1996). O ciclo de vida do inseto é longo e pode chegar a 10 meses nas plantas da bananeira, as larvas penetram no pseudocaule em quase toda a sua extensão geralmente na altura de 1 a 1,5 m acima do solo, onde graves prejuízos gerados afetam a germinação das gemas e a produtividade, devido à queda de plantas e posterior morte da bananeira. Em plantas jovens de cana-de-açúcar, as larvas passam ao rizoma e produzem apodrecimento e posterior secagem dos tecidos da planta, estas geralmente são as partes com maior conteúdo de sacarose (Esquivel, 1980). O controle químico é dificultado, principalmente pela localização das diferentes fases larvais

nas plantas, devido ao fato que o inseto está escondido entre os tecidos formando galerias (Mendoça et al., 1996). Apesar dos graves danos e perdas econômicas significativas são poucos os trabalhos voltados a entender e caracterizar plenamente todos os aspectos da praga. Por esta razão, são necessários maiores estudos visando desenvolver estratégias de controle do inseto mediante ferramentas biotecnológicas como utilização de inibidores, tecnologias de RNAi e plantas resistentes.

3.2 Aplicação potencial: avaliação de substratos para processos agroindustriais

3.2.1 Aproveitamento de resíduos lignocelulósicos

A demanda mundial de petróleo para a produção de energia, produção de químicos e outros materiais vem aumentando continuamente em função do declínio dos recursos fósseis. Desta forma, é evidente que a longo prazo o preço tem uma tendência ascendente. O alto preço não só afeta dramaticamente a produção de químicos e energia no mundo todo, mas também tem impacto grande nos países em desenvolvimento (Soetaert e Vandamme, 2006). Assim, há preocupações acerca do futuro em termos de fornecimento de energia e produtos químicos. Em primeiro lugar, isto tem causado uma busca contínua de fontes de energia renováveis, como hidrelétrica, solar, eólica, maremotriz, geotérmica e energia a partir de matérias-primas renováveis, como a biomassa. A biomassa pode ser definida como “qualquer material orgânico de origem animal ou vegetal que ocorre em ecossistemas naturais ou manipulados, transformados ou não industrialmente”.

Bioenergia é a energia renovável que vem a partir de biomassa, e se espera que contribua significativamente para a produção de energia a médio e longo prazo. Segundo a Agência Internacional de Energia (International Energy Agency (IEA)), a bioenergia tem o potencial para atender 50% das necessidades energéticas do mundo no século XXI. O mesmo é válido para a síntese de produtos químicos e materiais, também baseados principalmente em recursos fósseis como petróleo, gás e carvão. A indústria química tem o desafio de fazer uso da biomassa antes do previsto (Vandamme, 2009).

Em contraste com estes recursos fósseis, alguns anos atrás *commodities* agrícolas como arroz, trigo e milho continuaram a preços baixos (e até mesmo com tendência de queda) devido ao aumento da produção agrícola. Recentemente, isso mudou radicalmente, dada a concorrência entre biomassa para utilização alimentar e biomassa para produção de substâncias químicas ou biocombustíveis, tornando-se um problema social. Entretanto, outros fatores, como mudanças climáticas, seca e preços elevados dos combustíveis em economias

em rápido desenvolvimento, são as principais causas da alta dos preços dos alimentos. Assim, estratégias como a engenharia genética, especificamente das culturas energéticas ou industriais (Van-Beilen, 2008), e a produção de bioenergia a partir de produtos químicos e resíduos agroindustriais podem aplacar essas tendências (Morris, 2006, Zhang e Percival, 2008).

Atualmente, culturas agrícolas como milho, trigo, arroz, cana-de-açúcar, beterraba, batata, entre outros, são transformados em amido e açúcares em refinarias, como principais substratos para a indústria alimentícia, mas também para a maioria dos processos industriais de fermentação e alguns processos químicos (Dahod, 1999; Kamm e Kamm, 2004). Especialmente, os processos de fermentação podem transformar matérias-primas agrícolas em uma variedade de valiosos subprodutos químicos, incluindo biocombustíveis como o álcool, e também solventes orgânicos, como o butanol (Demain, (2000, 2007); Soetaert e Vandamme, (2005, 2009); Kunz, 2008; Wall *et al.*, 2008).

Oleaginosas como soja e canola, bem como sementes de palma de óleo (também óleos vegetais e gorduras animais) são transformadas em óleos como matéria-prima para as indústrias de alimentos ou oleoquímica, mas recentemente têm sido cada vez mais utilizadas para a produção de biodiesel (Canakci e Sanli, 2008; Vasudevan e Briggs, 2008). Embora essas tecnologias sejam bastante novas, resíduos agroindustriais ou de fluxos de resíduos como a palha, farelo, cascas de frutas, palha de milho, bagaço de cana-de-açúcar, resíduos de madeira, entre outros, são ricos em materiais lignocelulósicos e estão sendo desaproveitados, gerando, por sua vez, problemas ambientais (Sarath, *et al.*, 2008; Zhang e Percival, 2008). Atualmente, esses resíduos são transformados em biogás de forma eficiente e também utilizados para produção de calor, vapor ou geração de eletricidade. Estes materiais destacam-se como matérias-primas renováveis, abundantes e econômicas, tornando-se importantes para a obtenção de produtos químicos e biocombustíveis (Moldes *et al.*, 2002; Sreenath *et al.*, 2001). Estudos recentes em biotecnologia enzimática têm desenvolvido rapidamente processos para tratar esses resíduos agroindustriais de forma física e química, a fim de melhorar seu potencial na produção econômica de produtos com maior valor agregado (enzimas, pigmentos, antibióticos, etc.; Bon *et al.*, 2008). A utilização dos resíduos agroindustriais tem um impacto na preservação da qualidade ambiental, considerando-se as tecnologias orientadas para a transformação sustentável dos recursos naturais (Dahod, 1999; Mejía *et al.*, 2007).

3.2.2 Fermentação e biocatálise

Os micro-organismos (bactérias, fungos, microalgas) são fontes inesgotáveis de uma ampla gama de produtos químicos. De fato, um número crescente de produtos químicos, solventes, aditivos, alimentares, enzimas, agroquímicos e biofármacos são produzidos com base na indústria da biotecnologia microbiana por meio de fermentação ou biocatálise (Demain, 2007; Vandamme, 2007). Boa parte dos processos microbianos tem impactos ambientais positivos. Estes produtos microbianos geralmente são biodegradáveis e quase todos são produzidos a partir de fontes renováveis (agrosustratos), principalmente amido e açúcares. Na atualidade, esses substratos, que são ingredientes industriais em processos de fermentação em todo o mundo, provêm principalmente da agricultura. As práticas agrícolas, assim como a transformação industrial dos produtos, demonstram que os resíduos agroindustriais devem ser considerados como substratos e não como desperdícios.

3.2.3 Substratos agrícolas renováveis utilizados em processos de fermentação industrial

Nos dias de hoje, a matéria-prima para os processos de fermentação é disponibilizada direta ou indiretamente pela agricultura. De fato, os grãos dos cereais, resíduos de culturas e produtos agroindustriais são as principais fontes de nutrientes para os micro-organismos. A maioria das fontes de carbono é de origem vegetal, mas também alguns tipos de nutrientes microbianos são de origem animal (peptona, lactose, soro do leite; Dahod, 1999; Tabela 1). Há uma tendência geral para substituir os nutrientes de origem animal por derivados de plantas em virtude da ameaça de transferência de doenças.

Tabela 1. Fontes típicas de carbono utilizadas em fermentações industriais.

Carboidratos	
Farinha de milho	Melaço de cana-de-açúcar
Amido (diversas plantas)	Melaço de beterraba
Dextrina	Sacarose
Xarope de glicose	Licor de sulfitos de resíduos
Dextrose	Hidrolisados de madeira
Maltose	Ácidos Orgânicos
Soros	Resíduos agroindustriais
Lactose	
Óleos e alcoois	
Óleo de soja, oleato de metila	Glicerol
Óleo de milho, óleo de algodão, óleo de amendoim	Poliois
Óleo de palma	Hidrocarbonetos
Óleo de peixe	Metanol
	Etanol

3.2.4 Carboidratos como substratos de carbono

Em geral, os carboidratos servem para muitas funções importantes, especialmente como fonte de carbono e nutrientes para cultivos em larga escala de micro-organismos (Tabela 2). Alguns carboidratos baratos, como melão de beterraba e cana-de-açúcar, sacarose, fécula, hidrolisados e xaropes de glicose, são utilizados quase universalmente como fontes renováveis de carbono em processos de fermentação em larga escala.

Tabela 2. Funções importantes dos carboidratos

Comum:
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Dieta dos organismos vivos, incluídos os micro-organismos ✓ Fonte de energia ✓ Armazenamento de compostos ✓ "Construção" de material biológico ✓ Substrato para fracionamento químico
Especial:
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Moléculas mensageiras: receptores, reconhecimento de sítios, interação lectina, imunoestimulantes. ✓ Açúcares não usuais ✓ Intermediários quirais ✓ Biopolímeros, bioplásticos
Volumes:
Sacarose: > 100 x 10 ⁶ toneladas/ano
Glicose: > 10 x 10 ⁶ toneladas/ano
Fermentação de carboidratos como matéria- prima: 4 x 10 ⁷ toneladas / ano

Uma estimativa de carboidratos totais da natureza utilizados como matéria-prima para processos de fermentação industrial é de 4.107 toneladas por ano. O melão produzido a partir de cana-de-açúcar ou de beterraba, produto separado do licor-mãe da sacarose cristalizada, possui um total de açúcar fermentáveis na faixa de 50-55% em peso e é amplamente utilizado na fermentação e produção de fermento, etanol, glutamato monossódico, ácido cítrico, enzimas industriais e muitos outros. Além disso, é também uma fonte de nitrogênio, minerais, vitaminas e fatores de crescimento (Vandamme, 2009).

Por outro lado, o amido quase sempre não pode ser usado em sua forma nativa na maioria das aplicações de fermentação, porque ele sofre gelatinização na esterilização do caldo de fermentação, o que resulta em alta viscosidade, cuja diminuição requer a liquefação com as α -amilases. Já submetido ao processo anterior, o amido pode ser utilizado como fonte de carbono; porém, os micro-organismos envolvidos têm de produzir as glicoamilases necessárias, como no caso de muitos bacilos e fungos. A maltodextrina, resultado da hidrólise ácida ou enzimática do amido, pode ser utilizada para a produção de antibióticos como penicilina –cefalosporina– e estreptomicina, entre outros (Hobbs *et al.*, 2009; Liu e Zhang,

2009; Maningat *et al.*, 2009; Mimi-sakinah *et al.*, 2009; Vasanthan, 2009; Yamada *et al.*, 2009).

Os xaropes de glicose são obtidos pela ação da amilase no amido, um processo chamado de sacarificação. Estes xaropes (85-90% glicose), também conhecidos como amido hidrolisado, são os mais frequentemente utilizados em aplicações de fermentação para a produção de ácido cítrico, ácido glucônico, ácido itaconico, L-aminoácidos (Glutamato monossódico, L-lisina, L-treonina) e vários antibióticos. Para a produção de ácido láctico e outros produtos químicos, é preferível a utilização de glicose pura (dextrose) para facilitar a recuperação do produto (Dostálek *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2009; Morales *et al.*, 2008).

Os resíduos do processo de fabricação de papel são ricos em açúcares, como pentoses, que podem ser utilizados como fonte de carbono por leveduras do gênero *Candida sp.*, entre outros micro-organismos (Murdock, 1952). Atualmente, as fontes de carbono são preferidas em fermentações industriais devido às limitações impostas pelos micro-organismos e porque só requerem uma transformação simples do produto final.

3.2.5 Utilização de resíduos agroindustriais na indústria biotecnológica

Ao processar resíduos agroindustriais ou fluxos de resíduos, o maior desafio ainda é a liberação de açúcares fermentáveis, o principal componente destes resíduos (Canakci e Sanli, 2008; Sarath *et al.*, 2008; Vasudevan e Briggs, 2008; Zhang e Percival, 2008). Na maioria dos casos desses resíduos agroindustriais, são necessários pré-tratamentos físicos (calor), químicos e enzimáticos antes de iniciar as tecnologias de fermentação microbiana ou enzimática (biocatálise). Uma exceção é o uso da tecnologia de fermentação em estado sólido, em que a lignocelulose crua é o substrato direto para a produção microbiana (Robinson *et al.*, 2001).

A maioria dos resíduos agroindustriais tem grande potencial, uma vez que podem servir como fonte de nutrientes para os processos de biotecnologia industrial que visam à produção de uma vasta gama de produtos químicos, combustíveis e outros. Finalmente, a utilização de diversos resíduos agroindustriais alternativos é uma importante proposta para a produção de biocombustíveis e outros produtos. Esta medida reduziria a dependência dos resíduos mais utilizados e estudados, como os provenientes da cana-de-açúcar, gerando valor agregado e permitindo o desenvolvimento social das comunidades comprometidas com o desenvolvimento sustentável (Morris, 2006; Vandamme, 2009).

3.2.6 Bambu (*Guadua angustifolia*) como substrato potencial para processos de bioconversão

O bambu é um recurso natural barato e de rápido crescimento que tem sido amplamente utilizado na construção de casas e em diversas aplicações industriais (produtos domésticos, indústrias de papel, indústria química, energia, e outros). Na caracterização de colmos de *G. angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae), demonstrou-se que este material vegetal é composto de células parenquimáticas (metaxilema, floema, e protoxilema) do córtex, fibras, canais vasculares, e tubos crivosos. A composição do colmo é parênquima 52%, fibra 40% e tecidos condutores 8%. Esses valores variam de acordo com a espécie (Xiaobo, 2004). A biotecnologia, por meio da tecnologia enzimática, oferece a possibilidade de bioconversão de novos resíduos agroindustriais (materiais lignocelulósicos), tais como farelo, palha, cascas de frutas, cascas de milho, resíduos de madeira ou bambu. Estes materiais estão sendo subestimados e oferecem uma alternativa adequada como novas fontes de energia.

O bambu é infectado naturalmente por *S. commune*, um fungo com ampla distribuição, Basidiomicete da família Schizophyllaceae, pertencente aos fungos da podridão branca, que coloniza diferentes plantas, incluindo o bambu. Os basidiomicetos têm a capacidade genética de decompor resíduos lignocelulósicos e são responsáveis pelos processos de oxidação e degradação, mecanismos destrutivos que transformam inúmeras plantas. Dada a capacidade destes fungos em processos importantes como biorremediação, fungos como *Phanerochaete chrysosporium* e *S. commune* são amplamente estudados a fim de se compreender os mecanismos de infecção.

A conversão de biomassa lignocelulósica envolve processos de hidrólise. Esta é catalisada por enzimas que degradam a celulose e a hemicelulose em açúcares fermentáveis. Adicionalmente, isso tem um impacto positivo na preservação da qualidade ambiental, considerando o desenvolvimento de tecnologias voltadas para a transformação sustentável dos recursos naturais (Berlin *et al.*, 2006). Por esta razão, os estudos centrados na biodiversidade e nos aspectos que afetam o processo hidrolítico, como as enzimas celulolíticas dos micro-organismos e a avaliação de potenciais substratos, permitiriam encontrar novos materiais para serem utilizados em processos biotecnológicos. Estudos anteriores envolvendo fungos filamentosos e basidiomicetes agindo sobre diferentes substratos demonstram a hidrólise da holocelulose (Siqueira *et al.*, 2010).

3.2.7 *Schizophyllum commune*

O fungo é um basidiomiceto causador da podridão branca, capaz de degradar a lignina de forma eficiente até uma completa mineralização. Este processo ocorre porque esses fungos tem um sistema completo de enzimas que ataca a molécula de lignina por oxidação. Por outro lado, o corpo de frutificação do fungo é um carpóforo pequeno com bordas irregulares, muitas vezes entre 1 e 3 cm de largura, o fungo é um decompositor importante de madeira e requer condições especiais de umidade. O corpo frutífero é branco-acinzentado no tempo seco e mais escuro quando chove. As lamelas são da mesma cor e tem uma disposição longitudinal. O fungo tem uma ampla distribuição (cosmopolita) e coloniza diferentes tipos de árvores em muitos biomas. Além disso, cresce em áreas tropicais e é resistente a mudanças climáticas (Wessels *et al.*, 1972).

3.2.8 Exemplos de aproveitamento de resíduos

3.2.8.1 Biocombustíveis

Atualmente, incrementou-se a demanda por fontes lignocelulósicas para a produção de biocombustíveis (etanol e biodiesel) a partir de resíduos agroindustriais. Na produção de etanol, utiliza-se comumente bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho e serragem de madeira, enquanto que para produzir biodiesel são utilizados óleos vegetais e óleos residuais (Cardona e Sanchez, 2007).

Os resíduos lignocelulósicos possuem lignina e celulose. A primeira é a parte mais rígida da madeira ou das plantas, enquanto a segunda é o componente maleável que contém açúcares necessários para produzir álcool, os quais são de difícil extração. Diferentes projetos de pesquisa têm sido desenvolvidos na busca de enzimas que permitam digerir os materiais lignocelulósicos (Baldrian *et al.*, 2005). Existem micro-organismos encontrados na natureza, como fungos e bactérias, que são eficientes na extração de açúcares a partir de materiais lignocelulósicos. São exatamente os fungos decompositores que crescem sobre madeira os que contêm enzimas que degradam adequadamente a lignina e facilitam a extração dos açúcares como parte do metabolismo primário.

No Brasil, atualmente o etanol é produzido a partir de cana-de-açúcar, enquanto que o milho é o principal substrato nos EUA para fabricação de álcool. É precisamente este país o maior produtor mundial de etanol, com 36 bilhões de litros, seguido por Brasil, com aproximadamente 24 bilhões de litros por ano. No entanto, muitas políticas desses países visam à produção de álcool de segunda geração, a partir de resíduos lignocelulósicos como

filosofia da utilização eficiente dos recursos naturais e como uma estratégia de mercado e economia (Sánchez e Cardona, 2008).

Na Colômbia, o etanol é derivado da cana-de-açúcar. Mas um dos objetivos a serem alcançados é a produção de biocombustíveis sem o uso de produtos da agricultura destinados ao consumo humano, utilizando-se subprodutos dessa atividade que possam ser considerados como resíduos. A visão mundial é não competir com a produção global de alimentos. Adicionalmente, o país tem uma experiência muito importante na produção de biodiesel a partir de óleo de palma e espécies emergentes como a mamona. O biodiesel é um biocombustível renovável obtido a partir da transesterificação de óleos vegetais com alcoois de baixo peso molecular. O uso de biodiesel é favorável ao meio ambiente, pois ajuda a manter o equilíbrio do CO₂ e reduz as emissões de gases com efeito de estufa, tais como SO_x e CO (Almeida *et al.*, 2002). As técnicas para a produção de biodiesel utilizam reatores com catalisadores ácidos ou básicos, com posterior separação em operações unitárias, como destilação, centrifugação, *flash*, filtração e sedimentação (Basha *et al.*, 2009; Leung *et al.*, 2010).

No entanto, um dos principais problemas que enfrenta atualmente o processo de produção de biodiesel é a baixa rentabilidade devido ao alto custo das matérias-primas, porque exige que possuam um baixo teor de umidade e baixa acidez, o que requer o uso de óleos refinados, alcoois e catalisadores de alta pureza. Por esta razão, são planejados processos não convencionais, como processos extração-reação (Sanchez e Cardona, 2008) e enzimáticos (Bajaj *et al.*, 2010; Winayanuwattikun *et al.*, 2008).

3.2.8.2 Ácido láctico

Alguns autores sugeriram o uso de materiais lignocelulósicos para a produção de certos aditivos alimentares, tais como o ácido láctico (Moldes *et al.*, 2001; Sreenath *et al.*, 2001). O ácido láctico foi descoberto no leite em 1780 pelo químico sueco C.W. Scheele. A obtenção tem uma longa tradição industrial que remonta a 1881. A produção de ácido láctico pode ser abordada por via química, a partir de acetaldeído, que reage com ácido cianídrico e produz lactonitrila. Esta é hidrolisada em ácido láctico por meio da biotecnologia, com o crescimento de micro-organismos que completam o processo a partir das soluções de açúcares. Vários micro-organismos podem fermentar hexoses, mas só alguns podem fermentar pentoses (Hofvendahl e Hahn, 1997). Assim, o *Lactobacillus pentosus* tem sido utilizado para fermentar resíduos hemicelulósicos da atividade agrícola com o emprego de fermentação em batelada com boa produtividade e rendimento (Bustos *et al.*, 2004). A

produção biotecnológica de ácido láctico com espécies de lactobacilos pode ser realizada com várias tecnologias (descontínua alimentada, batelada e fermentação contínua). Cultivos em fermentação contínua têm várias vantagens em relação às fermentações em batelada. Em um sistema contínuo, as células são mantidas em estado fisiológico e tempo de crescimento constante. O tempo de crescimento pode ser ajustado, alterando-se a taxa de alimentação, sendo, portanto, mais fácil de aperfeiçoar a produtividade total. Além disso, um fenômeno biológico observado em culturas descontínuas é a fase de latência, que ocorre no início da fermentação e obriga a adaptação fisiológica da cultura ao novo ambiente. O crescimento durante a fase de latência é muito lento e representa um período com produtividade muito baixa. No entanto, quando se refere aos sistemas de cultura contínua, os termos fase de latência, fase exponencial, fase estacionária e fase de morte não têm sentido. Isso ocorre porque o sistema está funcionando continuamente e o crescimento não pode ser diferenciado em fases. Além disso, a cultura contínua é fechada com menos frequência quando comparada com reatores em batelada (em que o reator deve ser esvaziado, limpo, esterilizado e recarregado); dessa forma, há menor perda de produtividade durante a fase latente (Gassem *et al.*, 1997). Finalmente, durante a fermentação contínua, as complexas exigências nutricionais encontradas para várias espécies de *Lactobacillus* poderiam ser reduzidas (Cruz *et al.*, 2000).

3.2.8.3 Fungos comestíveis

Os cogumelos cultivados representam um exemplo do valor e da produtividade dos resíduos agrícolas, florestais e agroindustriais que existem em abundância e podem ser transformados em proteínas, vitaminas e aminoácidos essenciais à vida humana e animal. Além disso, o trabalho com este tipo de material oferece um valioso aspecto para a reciclagem de resíduos contaminantes devido ao fato de poderem transformar resíduos de celulose e constituírem-se em uma opção produtiva no agronegócio (Horton *et al.*, 2005). A produção de cogumelos tem evoluído nos últimos tempos, passando da utilização de técnicas improvisadas para processos mais elaborados na indústria com alta tecnologia e melhores rendimentos. Atualmente, poucos especialistas estão dedicados ao estudo de propagação, melhoramento e cultivo de cogumelos. Conseqüentemente, poucos são os avanços em novas técnicas de cultivo. Geralmente, inúmeros resíduos da agricultura, silvicultura e agroindústria são desperdiçados a cada ano em grandes volumes nos campos, perdendo-se a possibilidade de transformá-los por meio da biotecnologia em produtos para as indústrias química e farmacêutica, entre outras.

A produção de cogumelos é uma excelente alternativa para atender às necessidades nutricionais da população, principalmente nos países em desenvolvimento, em função dos baixos custos de produção, do alto teor de proteínas e grandes volumes de colheita em pouco espaço e tempo. Em países asiáticos como China, Japão, Taiwan, Hong Kong e Filipinas, e países europeus como França, Grã-Bretanha, Espanha e Alemanha, além dos Estados Unidos da América, o cultivo de cogumelos é muito comum, com dividendos elevados e boas perspectivas quanto ao futuro desta cultura. Entretanto, no Brasil e na Colômbia, levando-se em conta a grande diversidade ecológica destes países, esta cultura é minimamente desenvolvida. (Bonatti *et al.*, 2004).

3.3 Aplicação potencial: avaliação da atividade antimicrobiana nas áreas de farmacologia e medicina

3.3.1 Moléculas de origem fúngica com atividade contra agentes infecciosos em humanos

Os fungos produzem durante seu ciclo de vida uma grande variedade de metabólitos secundários, que geralmente são utilizados nas suas relações com o hospedeiro. As micotoxinas são metabólitos secundários formados por uma série de reações catalisadas por enzimas consecutivas de intermediários do metabolismo primário dos fungos e podem levar a uma resposta tóxica em diferentes organismos (Volcy e Pardo 1994). Metabólitos produzidos por fungos entomopatogênicos têm grande potencial como substâncias naturais para controlar pragas e doenças agrícolas e no desenvolvimento de novos medicamentos (Turner, 2000). Tem sido demonstrado que a capacidade do fungo entomopatogênico *B. bassiana* para superar os mecanismos de defesa do hospedeiro está relacionado em grande parte à produção de toxinas, que oferecem vantagens significativas no processo infeccioso. Adicionalmente, estes metabólitos também têm propriedades antimicrobianas com elevado potencial de bioacumulação (Thakur e Smith, 1997; Nilanonta *et al.*, 2000, Dev e Koul, 1997).

A história da medicina moderna divide-se em dois períodos: antes e depois da descoberta da penicilina. Graças a esta importante contribuição para o mundo científico, o ser humano pode desfrutar de uma vida mais longa e de um mecanismo de defesa eficiente contra o ataque de patógenos (Fleming, 1942). Muitas outras pesquisas concentraram-se na busca de moléculas com propriedades antibióticas para o tratamento de doenças infecciosas em todos os níveis (Fournet *et al.*, 1997). A necessidade de descobrir novos agentes antimicrobianos tornou-se inevitável, uma vez que as bactérias têm desenvolvido resistência aos antibióticos convencionais (Li *et al.*, 2008).

3.3.2 Infecções hospitalares

Atualmente, um dos problemas enfrentados pelos sistemas de saúde ao redor do mundo é o uso indiscriminado de antibióticos pela população, o que gera aumento de bactérias e fungos resistentes aos medicamentos mais frequentemente receitados. Dentre os micro-organismos causadores de infecções hospitalares, estão as bactérias da família Enterobacteriaceae, que inclui bactérias dos gêneros *Proteus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Escherichia sp.* e *Enterobacter sp.*, dentre outros, assim como fungos filamentosos como *Aspergillus*. As enterobacteriáceas ou enterobactérias são bacilos Gram negativos com características em comum. São organismos encontrados amplamente na natureza e, em mamíferos, habitam os intestinos como membros da microbiota natural ou como agentes de infecção. Enterobactérias podem ser causadoras de infecções intestinais e extraintestinais. Também, algumas cepas de *Salmonella* e *Yersinia* podem atravessar a mucosa intestinal provocando inúmeras bacteremias, assim como infecções em diferentes órgãos. Bactérias dos gêneros *Citrobacter*, *Hafnia* e *Providencia* podem eventualmente também ser enteropatogênicas.

3.3.3 Principais Gêneros bacterianos causadores de infecções hospitalares

3.3.3.1 *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* consiste em cinco espécies, das quais a *E. coli* é a mais comum e clinicamente importante, estando relacionada a diversas doenças como a sepse, a meningite e a gastroenterite (Murray *et al.*, 2009). *E. coli* (Figura 1) é uma bactéria anaeróbia facultativa, Gram negativa e componente da flora intestinal normal (Tortora *et al.*, 2003). A quantidade de cepas aptas para causar doenças é refletida na diversidade antigênica da bactéria. Existem muitas cepas patogênicas de *E. coli* que podem causar diarreias e outras doenças em humanos e animais. Essas cepas patogênicas expressam fatores de virulência que são envolvidos na patogênese (Whittam *et al.*, 2005). Também podem agir como patógenos oportunistas, aproveitando períodos em que a imunidade do hospedeiro está baixa para ocasionar infecções localizadas e clinicamente importantes, em que as bactérias podem alcançar a corrente sanguínea e causar sepse (Levinson e Jawetz *et al.*, 2005).



Figura 1. Imagem microscópica de *E. coli*. Coloração Gram; ampliação: 1.000X.

3.3.3.2 *Salmonella sp.*

As bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos anaeróbios facultativos, Gram negativos, não formadores de esporos e todas são consideradas patogênicas em algum grau, ocasionando salmonelose ou gastroenterite. Seu *habitat* normal é o trato intestinal dos seres humanos e de muitos animais (Tortora *et al.*, 2003). Estas bactérias crescem rapidamente em meios de cultura simples, mas quase não fermentam a lactose ou sacarose e possuem a capacidade de sobreviver congelados em água por longo período de tempo (Jawetz *et al.*, 2009). São as maiores responsáveis por toxinfecções alimentares humanas. *S. typhimurium* (Figura 2) é o sorotipo de origem alimentar com maior frequência em todo o mundo, e *S. enteritidis* é o segundo sorotipo, sendo este mais comumente encontrado nos alimentos.

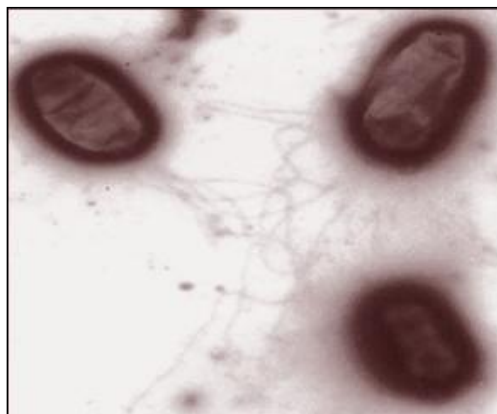


Figura 2. Micrografia eletrônica transmissão de *S. typhimurium* negativamente corada para aumentar o contraste. ampliação: 10.000X.

O risco de bacteremia por *Salmonella* é maior em pacientes pediátricos e geriátricos e em pacientes com AIDS. Adicionalmente, a resistência a diversos fármacos, transmitida

geneticamente por plasmídios entre bactérias entéricas, representa um problema nas infecções por Salmonela (Tirulli e Costa, 2006).

3.3.3.3 *Klebsiella pneumoniae*

A *Klebsiella* faz parte da flora normal do trato digestivo humano, mas pode ser encontrada nas mucosas vaginal, nasal, bucal, uretral e em todas as cavidades. Bactérias pertencentes a este gênero infectam, principalmente, os tratos respiratório e urinário, assim como feridas cirúrgicas. Bactérias pertencentes a este gênero são Gram negativas, frequentemente associadas a infecções do trato urinário, septicemia intra-hospitalar e pneumonia. Elas são importantes patógenos hospitalares que causam morbidade grave e mortalidade em pacientes hospitalizados (Martínez *et al.*, 2004). *K. pneumoniae* (Figura 3) e *K. oxytoca* causam infecções hospitalares, e a resistência a antibióticos é o fator principal e cada vez maior de infecções hospitalares (infecções nosocomiais). A pneumonia causada por *Klebsiella* tende a afetar pessoas mais idosas com baixa resistência, como as hospitalizadas ou que sofrem de alcoolismo (Tortora *et al.*, 2003).

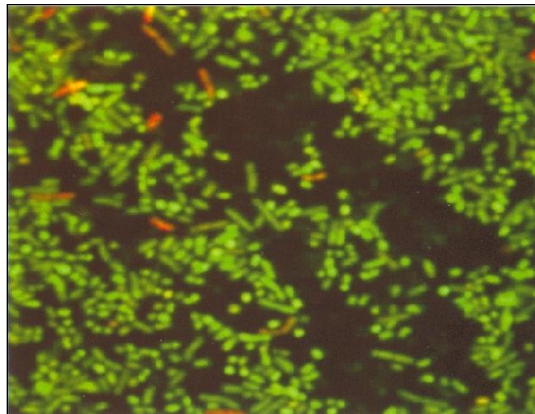


Figura 3. Imagem de microscopia confocal de *K. pneumoniae*. Microbiology (2005). Fonte: Instituto de Microbiologia, Seoul National University. ampliação: 1.000X.

3.3.3.4 *Proteus sp.*

As espécies de *Proteus* são Gram negativas produtoras de urease, tendo como consequência uma rápida hidrólise da ureia e liberação de amônia. As cepas variam quanto à sua sensibilidade a antibióticos. *P. mirabilis* é mais suscetível aos antimicrobianos, incluindo penicilinas, do que outros membros do grupo, sendo um agente que infecta uma proporção muito elevada de doentes com complicação urinária. Nestes pacientes, não só esta bactéria causa cistite e pielonefrite aguda, mas também a produção de pedras urinárias, o que marca a infecção com este micro-organismo (Figura 4; Jawetz *et al.*, 2009).



Figura 4. *P. vulgaris* bactéria Gram negativa demonstrada por coloração vermelha/rosa. Fonte: (<http://biology.clc.uc.edu>). ampliação: 1.000X.

3.3.3.5 *Staphylococcus aureus*

Os estafilococos são células esféricas Gram positivas, anaeróbios facultativos, capazes de crescer em meios que contêm alta concentração salina e que desenvolveram rapidamente resistência a diversos antimicrobianos. Hoje menos de 10% das cepas são suscetíveis ao antibiótico penicilina. O gênero é constituído de pelo menos 35 espécies, das quais destacam-se: *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* (Murray *et al.*, 2009). *S. aureus* (Figura 5) produz várias toxinas que lesam os tecidos ou aumentam a virulência dos micro-organismos e é um importante patógeno para os seres humanos, sendo o mais patogênico dos estafilococos (Jawetz *et al.*, 2009). As infecções hospitalares causadas por *S. aureus* são difíceis de tratar, pois este está exposto a tantos antibióticos que rapidamente torna-se resistente a eles. Essa resistência a antimicrobianos representa um grave problema e motivo de grande preocupação (Tortora *et al.*, 2003).

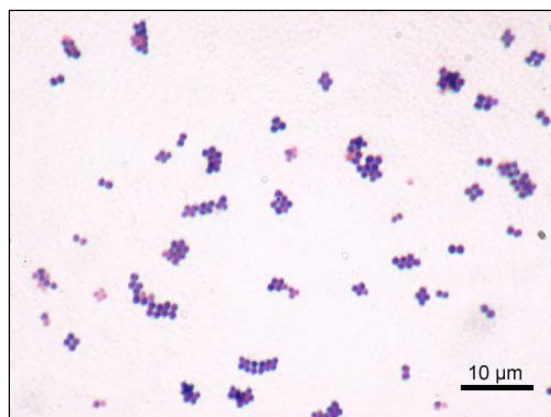


Figura 5. Imagem microscópica de *S. aureus*. Coloração Gram; magnificação: 1.000X.

3.3.4 Epidemiologia

De modo geral, as enterobactérias são os micro-organismos responsáveis por processos infecciosos mais frequentemente isolados, representando em torno de 70% a 80% das bactérias Gram negativas isoladas em rotina de laboratório. A frequência de diferentes gêneros e espécies é fortemente influenciada pelo local onde a infecção foi adquirida, isto é, na comunidade ou no hospital. É importante mencionar que as enterobactérias são responsáveis por aproximadamente 50% das infecções hospitalares, causadas frequentemente por *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia* e *Serratia marcescens*. A permanência destas bactérias nos hospitais é favorecida pelo uso constante de antibióticos e pela presença de pacientes com defesas orgânicas reduzidas em função do uso de medicamentos ou de outras formas de tratamento. Deve ser lembrado que antes do uso intensivo dos recursos modernos de terapêutica, as infecções hospitalares eram causadas, na maioria das vezes, por bactérias Gram positivas, destacando-se a *Staphylococcus aureus*. Na realidade, a microbiota infecciosa hospitalar foi amplamente substituída nos últimos trinta anos.

3.3.5 Resistência antimicrobiana

A incidência crescente de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos é preocupante para a comunidade médica e científica, pois os recursos terapêuticos disponíveis para o tratamento de muitas infecções estão se esgotando devido ao aumento da ineficácia dos antibióticos (Torres *et al.*, 2002). Desde a introdução dos antibióticos, tem sido registrada uma pressão seletiva dos micro-organismos causada, principalmente, pelo uso inadequado de antibióticos e quimioterápicos, o que resultou no desenvolvimento de espécies resistentes (Andrade *et al.*, 2006). Micro-organismos da família Enterobacteriaceae já mostraram resistência contra aminoglicosídeos e medicamentos da família das Cefalosporinas. Infecções causadas por membros desta família parecem provir de bactérias resistentes a medicamentos mal administrados em infecções anteriores. A resistência microbiana refere-se a cepas de micro-organismos que são capazes de se multiplicar em presença de concentrações de antimicrobianos mais altas do que as que provêm de doses terapêuticas dadas a humanos (Levinson e Jawetz, 2005).

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético relacionado à existência de genes contidos no micro-organismo que desencadeiam diferentes mecanismos bioquímicos, os quais impedem a ação das drogas. Essa resistência pode originar-se em mutações que ocorrem no micro-organismo durante seu processo reprodutivo e resultam em

erros de cópia na sequência de bases que formam o DNA cromossômico. Outra origem da resistência é a importação dos genes causadores do fenômeno que consiste na resistência transferível. Esta resistência ocorre por meio dos mecanismos de transdução, transformação e conjugação que envolvem genes situados em plasmídios e transposons que nunca receberam antibióticos (Tavares, 2000).

3.4 Moléculas de interesse biotecnológico

O uso de moléculas como uma alternativa para o controle e apoio aos programas de biotecnologia destinados a neutralizar o efeito deletério de insetos em culturas de importância econômica não é novo. Muitos estudos demonstram a atividade biológica destes compostos por meio de dietas artificiais que são realizadas em insetos testados (Mello *et al.*, 2003; Carlini e Grossi de Sá, 2002). Alternativas como inibidores de enzimas digestivas de insetos e moléculas com propriedades inseticidas são utilizadas hoje em programas de melhoramento com o objetivo de gerar plantas resistentes (Oliveira *et al.*, 2004). Os inibidores produzem efeitos antinutricionais que interferem nas vias metabólicas e geram processos degenerativos nos ciclos regulares de crescimento dos insetos (Valencia *et al.*, 2000). No entanto, moléculas amplamente utilizadas na agricultura possuem também diferentes tipos de atividades antibióticas, característica interessante na área médica como uma alternativa no tratamento de doenças infecciosas (Strasser, 2000).

O conhecimento profundo a respeito do metabolismo de insetos-praga e micro-organismos patogênicos permite identificar alternativas de controle. Inúmeras pesquisas têm sido realizadas e descrevem em detalhes a atividade de algumas das mais importantes enzimas dos insetos (Valencia *et al.*, 2000). No entanto, organismos como fungos e insetos têm uma grande variedade de enzimas que lhes permitem superar os efeitos inibitórios produzidos por proteínas vegetais, extrair alimento das plantas e decompor materiais lignocelulósicos. Precisamente, estas enzimas representam um alvo de estudo, pela importância em outras áreas do conhecimento, como a avaliação de metabólitos a serem envolvidos em processos de bioconversão de biomassa.

4 HIPÓTESE

Metabólitos derivados do metabolismo primário e secundário dos fungos *Beauveria bassiana* e *Schizophyllum commune* possuem atividade inseticida, antibacteriana e decompositora com potenciais aplicações em diferentes processos biotecnológicos.

5 OBJETIVO GERAL

Este trabalho objetiva contribuir para o conhecimento, a exploração e a bioprospecção das potenciais aplicações de metabólitos produzidos pelos fungos *Beauveria bassiana* e *Schizophyllum commune* na área agroindustrial (manejo de pragas e doenças de culturas de importância econômica e processos de bioconversão) e na área da saúde humana (avaliação da atividade antimicrobiana). Adicionalmente, realizar a caracterização de enzimas digestivas da broca gigante da cana-de-açúcar *Telchin licus licus*.

5.1 Objetivos específicos

- Determinar a participação dos metabólitos secundários do fungo *B. bassiana* no mecanismo de infecção mediante testes de citotoxicidade e a sua atividade antimicrobiana sobre bactérias causadoras de doenças infecciosas nosocomiais.
- Estudar o mecanismo de infecção natural do fungo *S. commune* sobre fibras de *G. angustifolia* Kunt, mediante microscopia eletrônica de varredura e avaliar a atividade holocelulase do fungo *S. commune* sobre diferentes resíduos lignocelulósicos.
- Caracterizar parcialmente as enzimas digestivas β -glicosidases e Leucina-aminopeptidase da broca gigante da cana-de-açúcar *T. licus*. e identificar enzimas de interesse que possam ser utilizadas em processos de pré-tratamento enzimático no fungo *S. commune* e na broca gigante da cana-de-açúcar *Telchin licus*.

CAPITULO 1. Atividade biológica de metabólitos produzidos pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*: uma avaliação intraespécie da produção da sua principal toxina beauvericina (BEA)

6 Resumo do primeiro capítulo

A Beauvericina é um ciclo-hexadepsipeptídeo e a principal toxina produzida pelo fungo entomopatogênico *B. bassiana* (Balsamo). Utilizando ELISA, isolados do fungo pertencentes a distintos grupos genéticos foram analisados para determinar a variabilidade na produção de BEA. Adicionalmente, a participação destes metabólitos secundários (Oosporeína (OOS), Basianina (BAS), Tenellina (TEN) e extratos brutos) no processo de infecção do fungo sobre o inseto foi avaliada em testes de citotoxicidade sobre as linhagens celulares SF-9 e SF-21. No entanto, este tipo de molécula possui atividades biológicas distintas e seu potencial antifúngico e antimicrobiano foi determinado contra a ferrugem-do-café e bactérias causadoras de doenças nosocomiais, respectivamente. Os resultados mostram que a produção de BEA foi significativamente diferente entre todos os isolados e sugerem uma ativa participação desses metabólitos na morte do inseto, mostrando diferenças estatisticamente significativas entre a CC_{50} de BEA (2,81 e 6,94 mM) e os valores das outras micotoxinas (4,23-11,95 mM). Adicionalmente, demonstrou-se o efeito no desenvolvimento da epidemia da ferrugem, redução na germinação e ativação de proteínas de defesa na planta de café. Todos os tratamentos dos metabólitos puros e dos extratos brutos provenientes do crescimento do fungo *B. bassiana* apresentaram efeitos inibitórios sobre as diferentes espécies de bactérias utilizadas nos ensaios.

A avaliação da atividade biológica deste tipo de metabólitos facilita a seleção de melhores isolados, mas também, oportunidades de aplicação em outras áreas de importância.

7 Material e Métodos

7.1 Isolados fúngicos, germinação e testes

Nove isolados de *B. bassiana* (Bb 9205, Bb 9010, Bb 9024, Bb 9011, Bb 9119, Bb 9016, Bb 9023, Bb 9001, Bb 9005), um de *B. brogniartii* (Bbr 9301) e um de *M. anisopliae* (Ma 9236) foram obtidos a partir da Coleção de Micro-organismos do Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé, Colômbia, SA (Tabela 3). Todas as cepas tinham sido

anteriormente caracterizadas com a utilização de RAPDs e sequências ITSs, sendo representados os principais grupos genéticos do trabalho descrito por Gaitán *et al.* (2002). A reativação de 0,1 mL de estoque (10% de glicerol a -70°C) foi feita por replicação em placas de Petri com Sabouraud Dextrose Agar (SDA), cultura contendo 0,4% de cutícula de broca-do-café. Vinte placas de cada linhagem foram mantidas de 9 a 11 dias a 25°C em completa escuridão. Das colônias obtidas em DAS, uma suspensão de esporo foi preparada por meio da adição de 10 mL a cada mL de água destilada estéril contendo 0,1% de Tween 80 e 0,25% de glicerol. A partir de uma diluição 10^{-2} , alíquotas de 5 μL foram coletadas e depositadas em lâminas de vidro. Após uma incubação de 24 horas em câmara úmida a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e escuro, uma gota de lactofenol azul (50 μL) foi depositada sobre os pontos de inoculação e 100 esporos foram registrados para determinar a porcentagem de germinação. Três repetições para cada isolado foram testados.

7.2 Preparação e inoculação dos meios líquidos de cultura

Utilizou-se o meio líquido Sabouraud contendo 0,1% de quitina estéril para a inoculação com a suspensão inicial dos esporos (Vélez *et al.*, 1997). Frascos contendo 10 mL de meio líquido foram ajustados para uma concentração de $1,4 \times 10^7$ esporos viáveis/mL, corrigindo o volume a ser inoculado de acordo com o teste de germinação. Os frascos foram incubados em um agitador orbital (150 rpm), a $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 80% de umidade relativa e escuridão durante 9 dias. O pH foi mantido em 6,8 durante a incubação. Para verificar a pureza da cultura, alíquotas de 0,1 mL de cada isolado foram coletadas nos dias 5 e 7 e cultivadas em placas com SDA. A identificação das colônias foi feita com a utilização de um estereoscópio, após 7 dias de incubação a 25°C . Estes meios líquidos foram filtrados com o emprego de papel Whatman # 1 e vácuo, para separar o extrato bruto da massa de micélios e esporos. Os micélios obtidos foram lavados três vezes com água destilada estéril e depositadas em placas de alumínio (anteriormente pesadas) para secar durante 5 dias sob temperatura ambiente. Então, o peso seco foi determinado para todos os micélios (Uribe *et al.*, 1997). Por outro lado, a concentração de proteínas solúveis totais dos meios líquidos de cada isolado foi quantificada utilizando-se o protocolo de Bradford (1976) e um equipamento Unicam UV/VIS 2 espectrofotômetro a 595 nm. Finalmente, as culturas líquidas foram centrifugadas a $14.000 \times g$ durante 30 minutos, e o sobrenadante foi recolhido para testes sorológicos (Kershaw *et al.*, 1999).

Tabela 3. Informação do genótipo dos isolados selecionados para o estudo.

Isolado	Origem	Inseto: hospedeiro	Família
Bb 9001	Colômbia (Nariño)	<i>Hypothenemus hampei</i>	Coleoptera: Curculionidae
Bb 9005	Colômbia (Nariño)	-----	--- ---
Bb 9010	Colômbia	<i>Hypothenemus hampei</i>	Coleoptera: Curculionidae
Bb 9011	Colômbia (Huila)	<i>Monalonium dissimulatum</i>	Hemiptera: Miridae
Bb 9016	Tailândia	-----	--- ---
Bb 9023	Filipinas	<i>Leptocorisa sp.</i>	Hemiptera: Coreidae
Bb 9024	Canadá	<i>Drycoetes confusus</i>	Coleoptera: Scolytidae
Bb 9119	Colômbia (Risaralda)	<i>Hypothenemus hampei</i>	Coleoptera: Curculionidae
Bb 9205	Colômbia	<i>Diatraea saccharalis</i>	Lepidoptera: Pyralidae
Bbr 9301	Colômbia (Santander)	<i>Antaeotricha sp.</i>	Lepidoptera: Stenomidae
Ma 9236*	Colômbia	<i>Diatraea saccharalis</i>	Lepidoptera: Pyralidae

*Controle

7.2.1 Quantificação de Beauvericina (BEA): ELISA

Alíquotas de 200 µL de cada uma das amostras obtidas do líquido sobrenadante de cada cepa, foram aplicados em poços distintos da microplaca para fixação durante 24 horas a 8° C. A placa foi lavada duas vezes com solução Tris Buffer Salino contendo Tween 0.1% (TTBS) e uma vez com solução Tris Buffer Salino (TBS); em seguida, foram adicionados 200 µL de Tween 20 em cada poço para bloquear a placa durante 1 hora. O passo da lavagem foi repetido conforme descrito anteriormente, e a incubação da microplaca ocorreu durante 2 horas a 37° C, com 50 µL/mL do primeiro anticorpo (Pabs BEA) dissolvido em 15 mL de solução de gelatina 1%. As microplacas foram lavadas nas mesmas condições e incubadas durante 2 horas a 37° C com 5 µL do segundo anticorpo (conjugado com a enzima peroxidase produzida em coelho e dissolvido em 30 mL de solução de gelatina 1%). Logo após a lavagem dos poços, adicionou-se uma alíquota de 200 µL da solução de 1 mg de tetrametilbenzidina dissolvido em 10 mL de TBS contendo 5 µL de H₂O₂ e, finalmente, as leituras da absorbância foram realizadas a 490 nm. A concentração de BEA (mg/L) foi calculado por meio de uma correlação entre a amostra e absorbância na curva de concentrações conhecidas, descrito como $ABS = 0,235 (BEA \text{ concentração}) + 0,0268$.

7.2.2 Ensaios contra a ferrugem do cafeeiro *H. vastatrix*

Isolados do fungo *B. bassiana* Bb 9024, Bb 9010, Bb 9205 e Bb 9001 foram utilizados. Além disso, foram utilizadas soluções-padrão Beauvericina (Sigma, 2010) e Basianina (doada pelo Dr. Leo C. Vining, Dalhousie University, Canadá). Os bioensaios foram realizados com folhas e mudas de *Coffea arabica* var. Caturra. Os uredósporos de *H. vastatrix* foram coletados a partir de lesões em folhas de campo por meio de raspagem e dissolvidos em água destilada estéril. Esta solução foi homogeneizada mediante tratamento com ultrassom durante 30 segundos para dispersar os uredósporos, obtendo-se uma concentração de aproximadamente $7-8 \times 10^4$ uredósporos/mL.

7.2.3 Obtenção de meios líquidos dos isolados de *B. bassiana*

Os extratos líquidos, obtidos da forma descrita anteriormente, foram centrifugados a 14.000xg durante 15 minutos, e o sobrenadante foi esterilizado com o emprego de filtros Millipore 0,22 μ m e seringa especial pouco antes da adição das soluções de uredósporos necessárias para a montagem final do teste de germinação e da pulverização sobre as plantas de *C. arabica* var. Caturra com 6 meses de idade.

7.2.4 Teste de germinação de uredósporos

Para os tratamentos, soluções foram preparadas contendo os meios a partir de isolados de *B. bassiana* e toxina beauvericina, correspondendo a 1, 2, 5, 10, 15 e 20 partes do extrato em 100 partes da solução de uredósporos. O controle utilizado foi o meio líquido sem o crescimento do fungo, e o controle de germinação foi a solução original de uredósporos. As soluções foram inoculadas como gotas nos espaços internervais das folhas removidas para cada dose de cada tratamento. Estas foram colocadas em câmaras úmidas e transportadas para uma sala escura, com saturação de 100% de umidade até a leitura de germinação em um microscópio óptico.

7.3 Avaliação do efeito de extratos de *B. bassiana* sobre o desenvolvimento da ferrugem em casa de vegetação

A unidade experimental para cada um dos tratamentos consistiu de 15 plantas de *Coffea arabica* var. Caturra, que foram pulverizadas com os extratos líquidos dos fungos Bb 9010, Bb 9205 e Bb 9001, pertencentes aos grupos de alta, média e baixa produção da toxina BEA (Grupos I, II e III) respectivamente. Além destes tratamentos, também foram pulverizados meio líquido e água como controles. A dose + alta (>) consistiu somente de extrato cru,

enquanto que a dose + baixa (<) de uma diluição do extrato com água 1:1. Após 24 horas, as plantas foram inoculadas com uma solução recente de uredósporos da ferrugem em uma concentração de $6,5 \times 10^4$ u/mL, aplicando-se 8 gotas de 10 μ L cada nos espaços internervais entre o primeiro par de folhas. As plantas já inoculadas ficaram incubadas durante três dias em câmara escura com saturação de 100% de umidade. Posteriormente, estas foram transferidas durante 60 dias para casa de vegetação onde permaneceram para o acompanhamento do desenvolvimento da doença, este foi realizado com base no aparecimento e no grau das lesões, determinado com o emprego da escala Leguizamón (Leguizamón, 1983, Figura 6). O experimento foi conduzido em duas épocas (seca e de chuvas). Para a análise estatística, avaliou-se a taxa de infecção calculada para cada tratamento, com base no número e no grau das lesões, de acordo com a seguinte fórmula: $tf = \frac{\sum n(g)}{N \cdot 7}$, em que n é o número de lesões em cada grau (g), N é o número total de inoculações (16) e 7 equivale ao grau mais alto na escala utilizada.

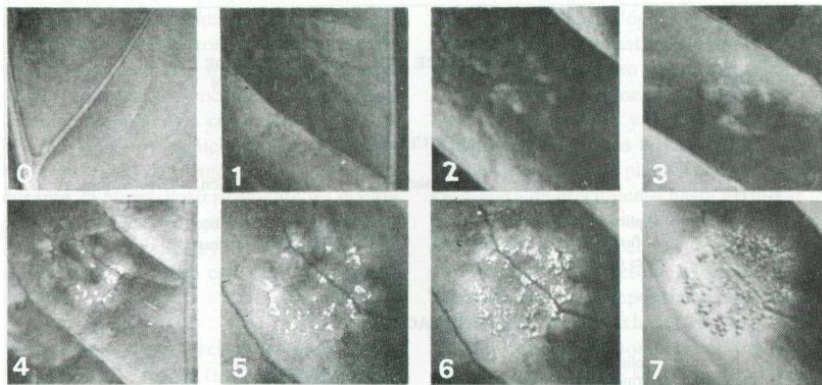


Figura 6. Escala de reações da *Hemileia vastatrix* Berk. y Br. (Leguizamón, 1983).

As curvas de infecção foram comparadas com etapas importantes da epidemia como o período de infecção (PI), que corresponde ao tempo no qual pelo menos 75% dos locais de inoculação possuem lesões de grau 1, e com o período de latência (PL) definido como o momento no qual 75% dos locais inoculados apresentam esporulação (graus ≥ 4 ; Leguizamón *et al.*, 1983). Assim, na escala da doença, o PI é alcançado quando a taxa de infecção chega a 0,107, e PL quando ela atinge 0,428.

7.4 Análise estatística

Para a análise estatística dos experimentos, realizou-se uma análise de variância (ANOVA) e um teste comparativo entre os tratamentos de Duncan e Tukey a 5%. Os dados

adicionais de transformação e análise LSD (Mínima Diferença Estatística) foram utilizados para a classificação final de todos os isolados para produção da micotoxina.

7.5 Bioensaios: Atividade citotóxica de metabólitos do fungo *B. bassiana*.

7.5.1 Micotoxinas e reagentes

As seguintes micotoxinas foram utilizadas para os testes biológicos: BEA (Sigma Co.), OOS, BAS e TEN com 97% de pureza, doada pelo Prof. Leo C. Vining (University of Dalhousie, Canadá). Os reagentes TNM-FH, soro fetal bovino, dimetilsulfóxido (DMSO), solução de antibiótico e uma solução de azul de tripan a 0,4% foram adquiridas de Sigma Co. (St. Louis, EUA).

7.5.2 Cultura das células e tratamentos

Células de Lepidoptera (*S. frugiperda*) das linhagens IPLB-SF-21 obtidas do envoltório dos ovários das pupas (Vaughn *et al.*, 1977) e células SF-9 clonadas a partir das primeiras (Summers e Smith, 1987) foram utilizadas. As células foram mantidas a 27° C em meio TNM-FH suplementado com 10% de soro fetal bovino e uma solução de antibióticos 1% (penicilina, estreptomicina e anfotericina) e repicadas a cada 5 dias. Culturas de células em fase de crescimento (2×10^5 células/mL com viabilidade de 85%) foram utilizadas para o início do experimento. Com exceção de BAS e TEN que foram dissolvidos em DMSO, todas as toxinas foram dissolvidas em metanol e testadas em concentrações de 1 µM a 10 µM. Os sobrenadantes (extratos brutos) provenientes do fungo *B. bassiana* e pertencentes aos grupos (I, II, III e mistura) foram testados em concentrações que variaram entre 1 – 100 ppm. Controles sem presença dos compostos, água, solventes e meio líquido sem crescimento do fungo foram utilizados sem superar 1% da solução final. Posteriormente, as células do inseto na fase estacionária de crescimento ($1,6 \times 10^6$ células/mL) foram semeadas em placas de cultura de células de 6 poços, adicionando as diferentes soluções para o ensaio na proporção de 1:100 (v/v). Finalmente, as placas foram incubadas por 48 e 72 h a 27° C.

7.5.3 Testes de viabilidade celular

Segundo a metodologia proposta por Fornelli *et al.* (2004), as porcentagens de viabilidade de cada um dos tratamentos foram determinadas mediante a contagem da exclusão do corante azul de tripan a 0,4% , feito pelas células viáveis no microscópio de luz (40X). A solução corante foi adicionada em uma proporção de 1:1. A concentração citotóxica 50 (CC₅₀) definida como a concentração do composto que diminui em 50% a viabilidade

celular, foi calculada por comparação com uma curva padrão. Adicionalmente, a concentração letal média (CL_{50}) foi calculada para todos os tratamentos com adição dos extratos brutos do fungo. O experimento foi realizado três vezes e cada tratamento foi avaliado com 5 repetições.

7.5.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Células da linhagem celular SF-9 controle e do tratamento BEA 10 μ M após 72 h foram utilizadas para as análises. A avaliação foi realizada com tampão glutaraldeído 2,5% e cacodilato de sódio 0,1 M (pH 6,8), após ser mantidas a 4° C durante 12 horas. O material fixado foi centrifugado a 4500 g por 5 min e o sobrenadante foi descartado. Este processo foi repetido três vezes. Posteriormente, o sedimento foi pós-fixado em tetróxido de ósmio 2% por 2 h, seguido de centrifugação e lavagem com água Milli-Q, cinco vezes. O sedimento foi ressuspenso em acetato de uranila 0,5%, e armazenadas durante 12 horas a 4° C no escuro. Adicionalmente, foi desenvolvida uma escala progressiva de desidratação com etanol (10%, 30%, 50%, 70%, 90% e 100%), esperando 10 minutos entre uma e outra troca, e seguida de centrifugação. A infiltração foi feita através da remoção do etanol e adição de resina *Spurr*, seguindo o protocolo do fabricante. As amostras foram colocadas em moldes e polimerizadas por 48 horas em estufa a 70° C. Em seguida, as amostras foram cortadas em seções semi-finas de 500 nm e ultrafinas de 50 nm preparadas em um ultramicrotomo (LKB Ultratome III). Finalmente, as amostras foram coradas com acetato de uranila 2% por 1 h no escuro e a análise realizada em um microscópio eletrônico de transmissão JEOL JSM-1011 (JEOL, Tóquio – Japão), com um potencial de 10 kV.

7.5.5 Análise estatística

Para a análise estatística dos experimentos, realizou-se uma análise de variância (ANOVA) e um teste não-paramétrico de Tukey a 5% para a comparação entre os tratamentos. As análises estatísticas de viabilidade celular foram realizadas utilizando o programa SigmaStat 2,03 para Windows (SPSS Inc., EUA). As diferenças foram consideradas significativas para CC_{50} e CL_{50} para $p \leq 0,05$ e $p \leq 0,005$ respectivamente. CL_{50} e seus limites de confiança inferior e superior (95%) foram calculados com o programa estatístico Probit.

7.6 Avaliação da atividade antibacteriana

7.6.1 Bactérias

As bactérias patogênicas dos gêneros *Proteus sp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* e *Klebsiella pneumoniae* todas causadoras de infecções hospitalares oportunistas foram usadas nos bioensaios.

7.6.2 Ensaios de inibição

A atividade antimicrobiana foi determinada usando o método de microdiluição em caldo descrito no M7-A6 do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (2006). Previamente, uma curva de crescimento da cultura original foi obtida, com a finalidade de determinar a relação entre unidades formadoras de colônias (UFC) e densidade ótica, de acordo com a técnica de micro gotas para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão. Para os ensaios de atividade antimicrobiana, 0,1 mL do inóculo foi cultivado em 4 mL de meio LB (Lúria-Bertani, pH 7,0) por aproximadamente 3 horas, até que a densidade ótica alcançasse a metade da fase logarítmica. Após esse tempo, uma alíquota correspondente a 5×10^5 UFC.mL⁻¹, as micotoxinas (BEA, BAS, TEN e OOS) a uma concentração de 1,5 e 10 µM e os extratos brutos dos isolados selecionados de cada grupo de produção de BEA (I, II, III bem como a mistura deles) em uma concentração de 5, 10 e 20% dos mesmos foram adicionados em uma solução contendo meio LB para obtenção de um volume final de 0,1 mL. Posteriormente, foram aplicados nos poços das microplacas. O controle positivo foi representado pela presença das bactérias em meio suplementado com cloranfenicol a uma concentração de 60 µg.mL⁻¹; o controle negativo, consistiu-se na presença das bactérias em meio líquido LB na ausência de qualquer composto. Também foi realizado um controle do meio de cultura (ausência das bactérias na presença de qualquer composto), para assegurar a confiabilidade dos ensaios. Os poços foram preenchidos com 0,1 mL tanto da amostra quanto dos controles. Os ensaios foram realizados em triplicata. O crescimento bacteriano foi monitorado a 595 nm, a cada 30 minutos até o crescimento bacteriano atingir a fase estacionária.

Para avaliação da atividade antibacteriana, as médias de todos os tempos foram subtraídas pela média do primeiro tempo de leitura. A porcentagem de inibição do crescimento bacteriano foi calculada de acordo com a fórmula abaixo:

$$100 - \frac{(A \times 100)}{C}$$

A = Média da absorbância da triplicata da amostra teste, referente a cada tempo
C = Média da absorbância da triplicata do controle negativo, referente a cada tempo

8 Resultados e Discussão

8.1 Testes de germinação e produção de massa micelial seca

A análise de variância (ANOVA) feita para a variável germinação de conídios indicou diferenças estatisticamente significativas entre os isolados ($\alpha = 0,05$, $p < 0,0001$, $CV = 10,04$). A partir dos resultados do teste de Duncan, Bb 9001 apresentou a maior taxa de germinação (80,88%), enquanto que a partir de conídios, Bb 9010 e Bb 9011 mostraram a menor taxa de germinação (Tabela 4). Mesmo com a correção do inóculo introduzido após os testes de germinação, a produção de micélio variou entre os isolados ($\alpha = 0,05$, $p < 0,0001$, $CV = 18,33$), embora 6 deles tenham apresentado semelhante produção de micélio seco após 9 dias de incubação (Tabela 4). Consistentemente, Bb 9010 apresentou o menor crescimento de todos. A quantificação de proteínas totais solúveis, realizada com a utilização do método de Bradford, resultou em diferenças significativas entre as linhagens ($\alpha = 0,05$, $p < 0,0001$, $CV = 17,32$), em que o isolado Bb 9205 produziu a maior concentração de proteínas totais solúveis (475,40 mg/L), enquanto Bb 9023 apresentou a menor concentração (56,69 mg/L). Para o resto dos isolados, as concentrações variaram de 100 a 300 mg/L (Tabela 4).

Tabela 4. Valores de porcentagens de germinação, massa seca e produção de proteína total solúvel (Bradford) para cada um dos 10 isolados fúngicos de *B. bassiana* selecionados.

Isolado	Porcentagem de germinação (%)	Massa micelial seca (mg)	Proteína total solúvel (mg/L)
Bb 9001	80,88 ± 0,61 ^e	43,00 ± 5,09 ^{cde}	355,73 ± 10,89 ^e
Bb 9005	56,59 ± 8,70 ^{cd}	39,34 ± 7,01 ^{cd}	204,54 ± 33,85 ^{cd}
Bb 9010	37,29 ± 3,70 ^a	8,72 ± 1,77 ^a	133,19 ± 24,61 ^b
Bb 9011	30,05 ± 4,20 ^a	40,76 ± 2,73 ^{cde}	198,76 ± 24,86 ^{cd}
Bb 9016	38,58 ± 4,88 ^{ab}	33,64 ± 7,48 ^{bc}	166,21 ± 31,21 ^{bcd}
Bb 9023	61,01 ± 4,59 ^d	43,90 ± 4,17 ^{de}	56,69 ± 35,12 ^a
Bb 9024	49,15 ± 7,55 ^c	44,70 ± 6,51 ^{de}	183,72 ± 45,39 ^{cd}
Bb 9119	61,61 ± 4,62 ^d	46,52 ± 7,12 ^{de}	156,59 ± 28,26 ^{bc}
Bb 9205	65,24 ± 6,69 ^d	50,88 ± 7,33 ^e	475,40 ± 67,39 ^f
Bbr 9301	47,18 ± 2,22 ^{bc}	28,26 ± 12,21 ^b	213,53 ± 36,60 ^d

* Médias com a mesma letra não são estatisticamente diferentes (Duncan 5%).

8.2 Variabilidade na produção de BEA

Uma maior produção líquida de BEA foi observada para os isolados Bb 9024 e Bb 9010, com concentrações de 98,56 e 98,30 mg/L, respectivamente. Ao contrário, Bb 9119 e Bb 9001 tiveram menor produção, com 18,81 e 15,66 mg/L, respectivamente. (Tabela 5). Não se observou correspondência entre massa micelial, proteínas totais solúveis e produção de BEA. Todas as cepas apresentaram diferenças estatisticamente significativas com o controle –Ma 9236– e também entre eles, permitindo definir três grupos bem diferenciados. Assim, os maiores produtores foram Bb 9024 e Bb 9010, enquanto Bb 9011, Bb 9205, Bb 9005, 9023 e Bbr 9301 conformaram o nível médio, e os menores produtores foram Bb 9016, 9119 e Bb 9001. Utilizando-se análise LSD, as diferenças dentro de cada grupo foram detectadas (Tabela 6).

Tabela 5. Quantificação de BEA por 10 isolados do fungo *B. bassiana*. ND: Não detectado.

Isolados	Produção de BEA (mg/L)	CV
Bb 9001	15,66 ^c	0,5194
Bb 9005	37,53 ^b	0,7955
Bb 9010	98,30 ^a	0,2089
Bb 9011	69,62 ^b	0,6774
Bb 9016	27,92 ^c	0,3883
Bb 9023	35,23 ^b	0,1707
Bb 9024	98,56 ^a	0,4505
Bb 9119	18,81 ^c	0,7643
Bb 9205	45,79 ^b	1,0425
Bbr 9301	32,43 ^b	0,2963
Ma 9236	ND: 0	

*Médias com a mesma letra não são estatisticamente diferentes (Duncan 5%).

Tabela 6. Classificação por grupos de produção

Duncan teste	Média do grupo	N	Classificação
a*	98,433	10	I
b	44,125	25	II
c	20,799	15	III

*Médias com a mesma letra não são estatisticamente diferentes (Duncan 5%). N = Número de dados por grupo.

Muitos aspectos afetam significativamente a produção de toxinas, tais como: tempo de crescimento, produção de micélios, metabolismo do fungo e condições de incubação, temperatura, umidade relativa, etc (Rombach, 1988). No processo de produção desta toxina, um importante aspecto que deve ser considerado é a síntese do peptídeo estar ligada ao crescimento exponencial na fase de micélio (Vey e Riba 1989). Utilizando-se testes sorológicos na presença *in vitro* da micotoxina em meios líquidos, esta foi produzida, detectada e quantificada por meio da cultura do fungo em meios líquidos enriquecidos com cutícula do inseto broca-do-café como agente indutor. A incubação de fungos em ambientes apropriados para o metabolismo deles e a presença de indutores favorece a produção de metabólitos secundários (Rombach, 1988).

Os resultados do presente estudo mostram uma variação na produção de BEA entre as cepas selecionadas. Quando se compara estes resultados com os obtidos por Gupta *et al.* (1995) e Uribe *et al.* (1997) que utilizaram outros isolados de *B. bassiana*, confirma-se a variabilidade na produção desta micotoxina por diversos isolados de fungos. Além disso, estudos recentes que avaliam beauvericina e enniatinas (K e I) de espécies de *Fusarium* sp. também demonstram essa diversidade (Song *et al.*, 2008). Os resultados deste estudo confirmam a variabilidade intraespécie na produção do peptídeo, no que se refere às cepas selecionadas (Tabela 7).

Tabela 7. Análise LSD e diferenciação entre os grupos pela produção de BEA.

Grupo	Isolados	Produção de BEA Transformado ⁺	Análise estatística LSD
I	Bb 9024	9,928	a*
	Bb 9010	9,915	b
II	Bb 9011	8,344	a
	Bb 9205	6,767	b
	Bb 9005	6,127	c
	Bb 9023	5,936	d
	Bbr 9301	5,695	e
III	Bb 9016	5,284	a
	Bb 9119	4,337	b
	Bb 9001	3,958	c

*Médias com a mesma letra não são estatisticamente diferentes (análise LSD).

A produção de proteína total solúvel do isolado Bb 9205 alcançou níveis mais elevados, enquanto Bb 9023 atingiu níveis mais baixos, ambos pertencentes ao grupo II. Para o caso do primeiro grupo (I), os valores foram 183,71 e 133,19 mg/L (Tabela 4). Na variável

produção de BEA por grama de proteína total solúvel, Bb 9010 apresentou os maiores valores, enquanto que Bb 9205 (grupo II) a menor produção específica (Figura 7). No entanto, isolados pertencentes ao mesmo grupo genético apresentaram similares níveis de produção específica da toxina (Bb 9023 e 9024). Estes resultados confirmam a grande variabilidade intraespécie na produção geral e na produção específica de BEA.

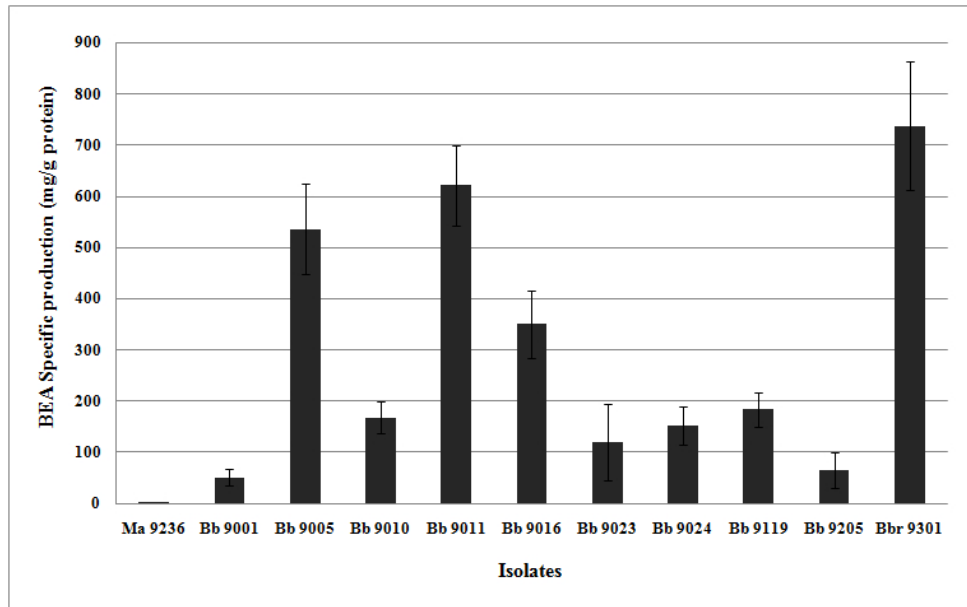


Figura 7. Produção específica de BEA por diferentes isolados de *B. bassiana*.

Atualmente, na Colômbia utiliza-se apenas um isolado Bb 9205 do fungo *B. bassiana* para o controle biológico de insetos-praga como a broca-do-café, *H. hampei*. Há, portanto, um grande potencial para utilizar a diversidade de micro-organismos para o controle biológico, aspecto que deve ser considerado para melhorar os programas de manejo integrado que visam controlar insetos-praga que atacam culturas de importância econômica (Bustillo *et al.*, 1998). A produção de toxinas pelo fungo é a uma última etapa do processo de infecção, que começa com a aderência dos esporos sobre o inseto e continua com a ação enzimática, a fim de permitir a entrada do tubo germinativo no organismo hospedeiro e terminá-la com a atividade tóxica que causa a morte do inseto e permite a colonização final (Charnley e St Leger 1986). Para *Beauveria* spp., beauvericina é a principal toxina (Gupta *et al.*, 1995).

A ação inseticida da toxina tem sido amplamente demonstrada. No entanto, os metabólitos secundários produzidos pelo fungo entomopatogênico têm um grande potencial como substâncias naturais para controlar pragas e doenças ou como uma nova droga (Turner 2000), além de terem potencial de bioacumulação (Thakur e Smith 1997; Nilanonta *et al.*, 2000, Dev e Koul, 1997). Em geral, a ação biológica de BEA está relacionada com a sua

propriedade ionófora, que forma complexos com metais alcalinos e gera distúrbios na membrana celular exatamente nas substâncias responsáveis pelo transportes e pelo intercâmbio da célula com o seu ambiente. Além disso, a Beauvericina na concentração de 110 μM tem atividade inibitória sobre a enzima colesterol acetiltransferase, razão pela qual tem recebido atenção especial para uso na prevenção e tratamento de arteriosclerose e hipercolesterolemia (Tomoda *et al.*, 1992). Estes aspectos são importantes e devem ser considerados conhecer mais sobre as características de produção apresentadas pelos diferentes isolados, a fim de formular produtos biológicos que utilizam misturas (Cruz *et al.*, 2006), os quais permitam melhorar sua utilização não só para controlar insetos-praga, mas também um amplo espectro de micro-organismos patógenos. Salientando igualmente a sua importância para várias utilizações médicas. O presente estudo permitirá novos aperfeiçoamentos na seleção de isolados do fungo *B. bassiana*, com o intuito de tornar mais eficiente o controle biológico de pragas, apoiando, dessa forma, a produção de formulações para a incorporação do fungo em programas de manejo integrado de pragas.

8.3 Avaliação do efeito de extratos de *B. bassiana* sobre a germinação de uredósporos e no desenvolvimento da ferrugem do café.

Os resultados de germinação com o tratamento de Beauvericina mostram que há semelhança quando comparado com os extratos líquidos, enquanto ocorre uma redução linear na porcentagem de germinação com o aumento da concentração da toxina na solução de uredíniosporas (Figura 8).

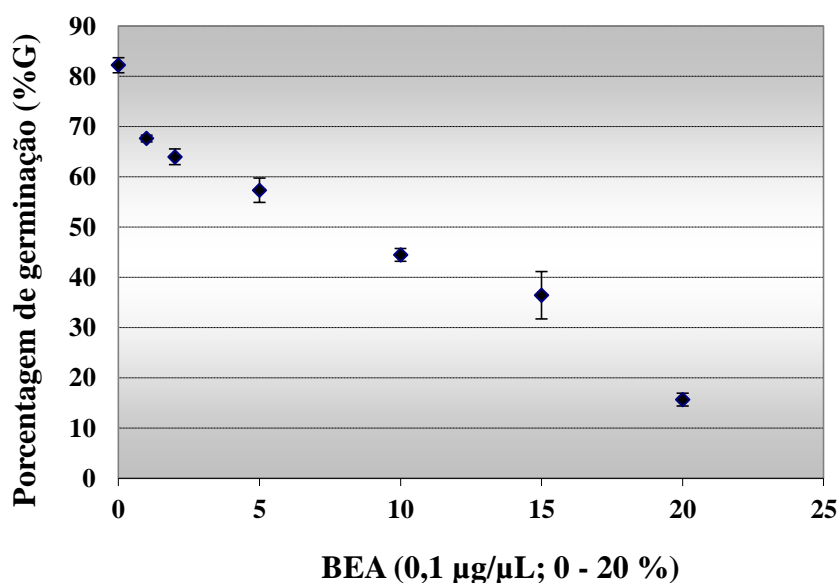


Figura 8. Efeito de BEA na porcentagem de germinação de uredósporos da ferrugem-do-café (*H. vastatrix*).

Para todos os tratamentos, houve um efeito de inibição sobre a germinação dos uredósporos da ferrugem, inibição esta que é diretamente proporcional ao aumento da concentração dos extratos, em comparação com a resposta obtida nos controles (Tabela 8).

Tabela 8. Média da germinação de uredósporos de *H. vastatrix* tratados com as culturas do fungo *B. bassiana*.

Tratamento	Dose	%G	Desvio Padrão	CV	Análise por TTO total	Análise entre TTO
Controle H₂O	0	82,20	1,531	0,018	A	
Controle Meio	0	84,44	3,240	0,042	A	
Bb 9010 (I)	1	55,22	0,655	0,011	C	a
	2	53,43	1,784	0,033		a
	5	46,72	1,270	0,027		b
	10	37,54	1,016	0,027		c
	15	32,23	3,157	0,097		d
	20	17,63	1,313	0,074		e
Bb 9205 (II)	1	50,32	2,607	0,051	C	a
	2	54,84	1,878	0,034		a
	5	40,05	2,946	0,073		b
	10	34,08	3,748	0,109		c
	15	29,52	4,175	0,141		c
	20	20,84	3,986	0,191		d
Bb 9001 (III)	1	68,31	1,852	0,027	D	a
	2	66,54	4,985	0,074		a
	5	55,95	0,831	0,014		b
	10	46,97	2,032	0,043		c
	15	41,26	1,511	0,036		d
	20	34,80	4,788	0,137		e

*Médias com a mesma letra não são estatisticamente diferentes (Duncan 5%).%G: Porcentagem de germinação. CV: Coeficiente de variação.

Na avaliação do desenvolvimento da doença em plantas previamente pulverizadas e mantidas em casa de vegetação durante 55 e 62 dias de avaliação constante para as duas épocas (seca e chuvas, Figuras 9 e 11 respectivamente), verificou-se que o patógeno foi encontrado em níveis mais elevados no primeiro par de folhas dos tratamentos controles, resultando em maior número de lesões e níveis elevados na escala de gravidade da doença. No entanto, embora em menor grau, observou-se o surgimento da doença, cujos sintomas apareceram nas folhas dos tratamentos; porém, em muitos casos, essas lesões aparentemente pararam (Figura 10).

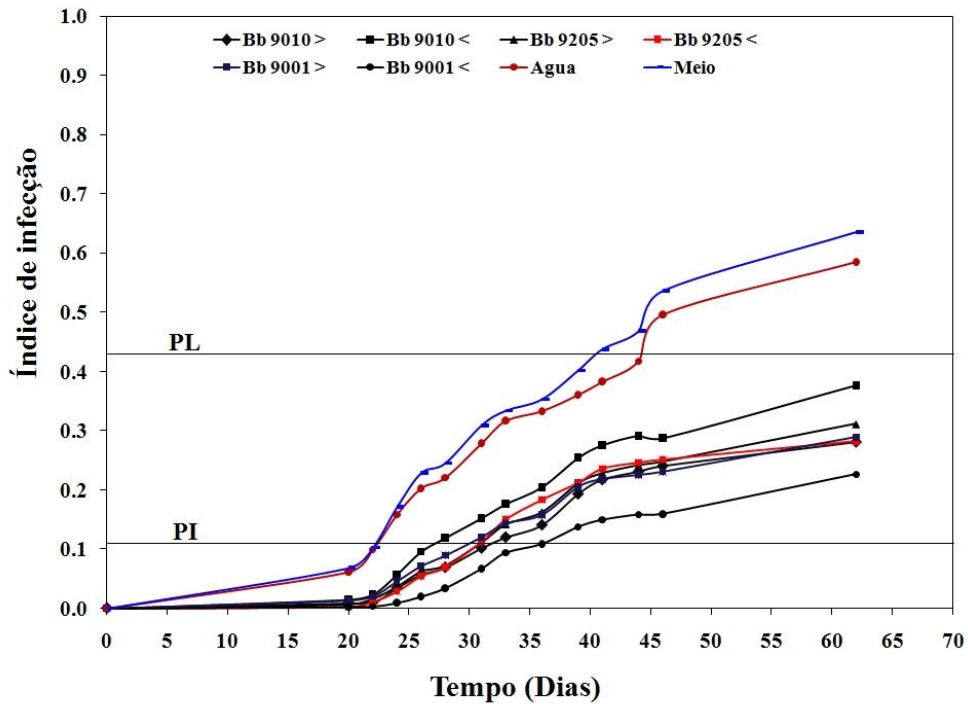


Figura 9. Curvas calculadas com base nas taxas de infecção da doença para todos os tratamentos em casa de vegetação em época seca (PI= período de infecção; PL= período de latência; controles: água e meio sem crescimento do fungo; tratamentos: extratos brutos de *B. bassiana*; > = dose alta e < =dose baixa).

Adicionalmente, na figura 11 se observam as curvas de desenvolvimento da doença na repetição do experimento na segunda época de avaliação (chuvas). Considerando o teste de Tukey a 5%, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a média das taxas de infecção dos tratamentos com extratos líquidos (isolados nas doses altas e baixas), mas sim com relação às testemunhas. Nas curvas da doença com base em taxas de infecção, os controles sempre atingiram primeiro o PI (período de infecção) na epidemia em relação aos outros tratamentos (Figuras 9 e 11), a diferença na época seca foi de 8 dias, em quanto que na época de chuvas foi de 11 dias aproximadamente. Durante o tempo de avaliação da época seca, nenhum dos tratamentos atingiu o PL (período de latência), já os controles demoraram 42 dias, isto resultou em uma redução da doença como efeito direto dos extratos brutos (Figura 9). No entanto, durante o tempo de avaliação do experimento na época de chuvas todos os tratamentos e controles atingiram o PL, mas é preciso ressaltar que nesta época a alta umidade favoreceu a epidemia diminuindo os tempos das curvas de infecção (Figura 11).

Nos experimentos, registrou-se que os tratamentos dos extratos líquidos Bb 9205 alta e Bb 9001 baixa, sempre mantêm os níveis mais baixos de infecção durante todos os dias do ensaios, mostrando reduções significativas da enfermidade quando comparados com os controles (Figuras 9 e 11).

Os resultados deste estudo indicam que os metabólitos secundários produzidos por isolados do fungo entomopatogênico *B. bassiana* afetam significativamente o desenvolvimento da interação do cafeeiro com a ferrugem mediante dois efeitos: efeito de proteção, inibindo a germinação dos uredósporos (Tabela 8); e efeito indutor em longo prazo, caracterizado pela ativação de proteínas de defesa da planta, resultando na diminuição da doença no final da epidemia (Figuras 9 e 11).

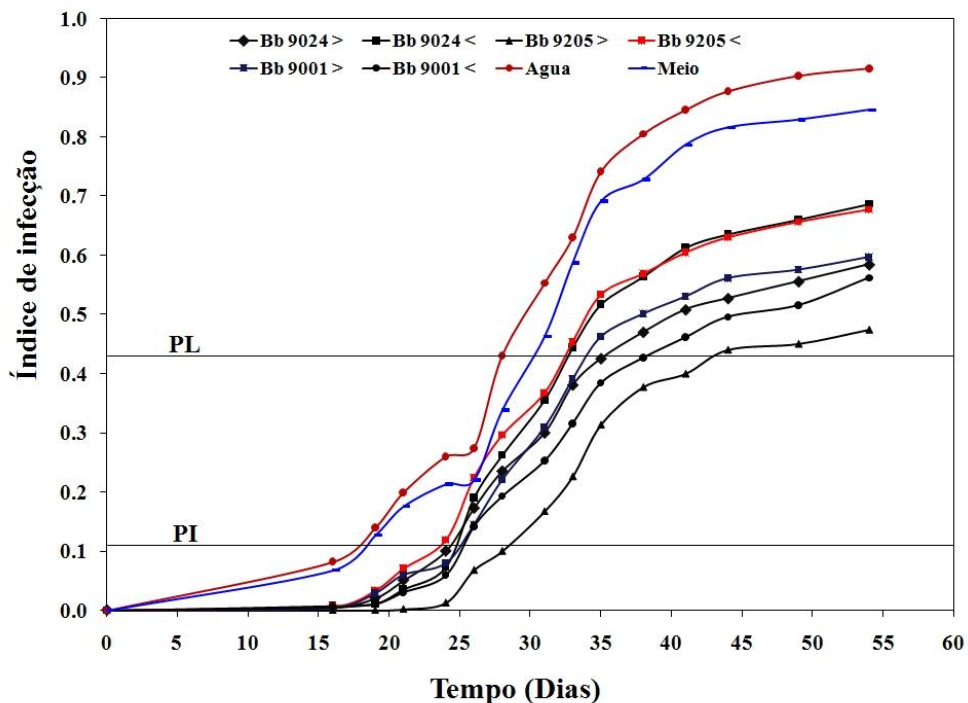


Figura 10. Curvas calculadas com base nas taxas de infecção da doença para todos os tratamentos em casa de vegetação em época de chuvas (PI= período de infecção; PL= período de latência; controles: água e meio sem crescimento do fungo; tratamentos: extratos brutos de *B. bassiana*; > = dose alta e < =dose baixa).

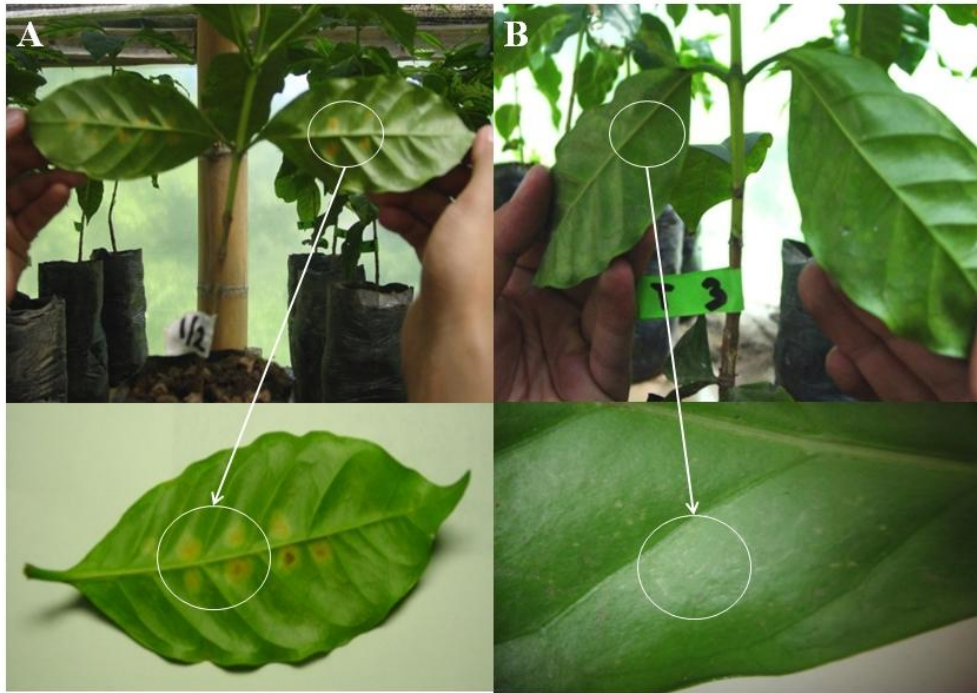


Figura 11. Sintomas da ferrugem nas plantas do cafeeiro. A. controles. B. Tratamentos, plantas pulverizadas com extratos líquidos do fungo *B. bassiana*.

Sobre o efeito protetor, a Beauvericina como peptídeo ativo tem participação individual ou juntamente com outras moléculas na inibição da germinação das uredósporas do patógeno. A maioria dos estudos com essa toxina foram realizados mediante testes de sua atividade biológica contra insetos. Além disso, a este ciclopeptídeo têm sido atribuídas características antimicrobianas contra micobactérias e plasmódios (Thakur e Smith 1997; Dev e Koul 1997; Nilanonta *et al.*, 2000). No caso de fungos, BEA tem capacidade inibitória no desenvolvimento de cepas agressivas de *Ceratocystis ulmi*, fungo associado com a mancha gordurosa do olmo holandês, e a inibição foi diretamente proporcional a concentração do peptídeo (Gemma *et al.*, 1985). A atividade biológica das toxinas produzidas por *B. bassiana* está relacionada com a capacidade de formação de poro das moléculas, que permitem influenciar no transporte de cátions por meio da membrana e da parede celular, tornando possíveis os mecanismos inibitórios.

As diferenças significativas entre os tratamentos e controles observadas neste trabalho, além de uma relação direta do teor de toxinas nas soluções em comparação com o decréscimo nos valores de germinação, confirmam o potencial destes peptídeos antimicrobianos, como resultado de sua atividade biológica individual ou em mistura com diferentes culturas testadas. Também se observou um efeito sinérgico positivo e aumento da

atividade biológica quando concentrações maiores foram testadas, o que corrobora resultados de outros estudos com toxinas produzidas por diferentes cepas de *B. bassiana*, que apresentam uma relação direta entre a concentração de toxinas e sua atividade (Vey *et al.*, 2001).

Com respeito ao efeito indutor de resistência, Martins *et al.* (1986) sugerem que metabólitos secundários de origem fúngica podem agir como elicitores, induzindo a produção de enzimas e a formação de outros compostos, como mecanismo de defesa das plantas à infecção. Essas enzimas são produzidas por plantas em resposta ao ataque de patógenos, e fazem parte de uma complexa resposta sistêmica produzida por uma série de reações bioquímicas que podem ser induzidas (Münch *et al.*, 1997). Os resultados deste estudo sugerem o envolvimento de BEA e/ou outros metabólitos como indutores de resposta dos vegetais ao ataque de patógenos, o que explica em grande parte a diminuição no desenvolvimento da doença para os tratamentos pulverizados em mudas de café avaliadas em casa de vegetação, que foram mantidas até os 60 dias de medição, resultando em uma redução significativa da doença ao longo do tempo.

8.4 Atividade biológica sobre linhagens celulares de insetos

8.4.1 Atividade citotóxica de metabólitos puros (micotoxinas)

Os resultados indicam uma diminuição na viabilidade das células SF-9 na adição de todos os metabólitos do fungo *B. bassiana* selecionados para este estudo (BEA, OOS, BAS e TEN; Figura 12) quando comparados com o controle.

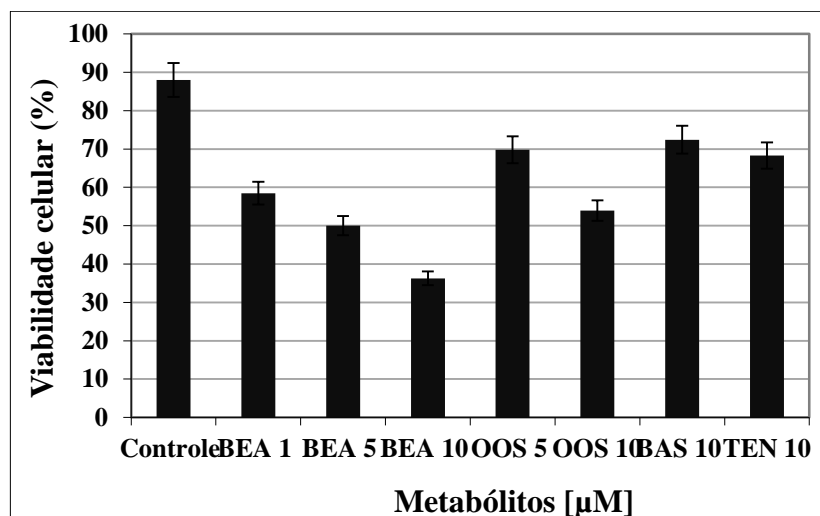


Figura 12. Atividade citotóxica das micotoxinas BEA, OOS, BAS e TEN sobre a linhagem celular SF-9 de *S. frugiperda*.

O efeito dos metabólitos BEA, BAS, OOS e TEN sobre as linhagens celulares SF-9 e SF-21 foi avaliado calculando as concentrações CC_{50} . Estes metabólitos apresentaram valores entre 4,23 e 4,91 μM para SF-9, e de 10,43 e 12,12 μM para SF-21 (Tabela 9). Após 48 h de exposição, a BEA apresentou diferenças estatisticamente significativas na atividade tóxica em ambas às linhagens celulares, em comparação com os outros metabólitos que foram testados, mostrando valores de CC_{50} de 2,81 e 6,94 μM para SF-9 e SF-21, respectivamente. Da mesma forma, uma correlação direta dose-resposta entre a viabilidade celular e a concentração da toxina foi registrada quando as linhagens celulares SF-9 e SF-21 foram expostas a BEA, mostrando diferenças estatisticamente significativas das concentrações 1 e 5 μM com a maior concentração (10 μM) para cada linhagem celular ($p \leq 0,05$, Figura 13).

Tabela 9. Atividade citotóxica de metabólitos de *B. bassiana* sobre as linhagens celulares SF-9 e SF-21 usando a solução azul de tripan após 48 h.

Metabólitos	CC_{50} (μM) SF-9	CC_{50} (μM) SF-21
Beauvericina	2.8160 \pm 0.3706*	6.9461 \pm 0.9143*
Oosporeína	4.2301 \pm 0.4622	10.4342 \pm 1.1401
Basianina	4.9157 \pm 0.5058	12.1255 \pm 1.2476
Tenellina	4.8476 \pm 0.3121	11.9574 \pm 0.7698

Os valores mostram a média \pm desvio padrão a partir de três diferentes ensaios com 5 repetições cada. *valores significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

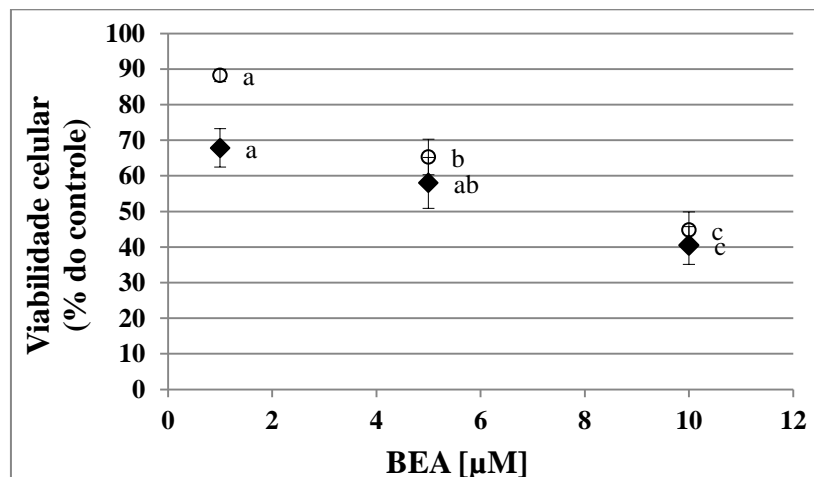


Figura 13. Curvas de viabilidade dose-resposta obtidas com BEA após 48 horas de exposição. As barras representam o desvio padrão da média das porcentagens de viabilidade celular (5 repetições). As diferenças estatisticamente significativas para cada linhagem celular são indicadas por diferentes letras Tukey ($p \leq 0.05$).

O efeito do tratamento com BEA sobre SF-9 é comparável aos resultados obtidos com *Artemia salina* (Logrieco *et al.*, 1996), *S. frugiperda* (Fornelli *et al.*, 2004) e a outros registrados com metabólitos de fungos provenientes de *Fusarium sp.* (Gutleb *et al.*, 2002). Atualmente, este é o primeiro relatório que mostra o efeito citotóxico das toxinas puras (BAS, OOS e TEN) e extratos brutos produzidos pelo fungo *B. bassiana* sobre linhagens celulares de lepidópteros.

8.4.2 Atividade citotóxica de extratos brutos

Todos os extratos brutos provenientes dos isolados previamente caracterizados mostraram efeito citotóxico sobre a linhagem celular SF-9 após 48 e 72 horas. Após 48 h de exposição os valores de CL₅₀ para todos os tratamentos foram superiores a 100 ppm, variando entre 112 - 316 ppm. No entanto, após 72 h de exposição todos os tratamentos, aumentaram o efeito mostrando valores de CL₅₀ que variaram entre 31 e 145 ppm, exceto Bb 9205 com 451 ppm (Tabela 10).

Tabela 10. Atividade citotóxica de extratos brutos de *B. bassiana* sobre a linhagem celular SF-9 usando a solução azul de tripan. Valores de CL₅₀ com limite de confiança inferior e superior -95%- foram calculados usando Probit. (SPSS Inc., US).

Extratos brutos	CL ₅₀ (ppm)	
	48 h incubação	72 h incubação
Bb 9205	264 (79; 633) ^{bc}	451 (153;1570) ^c
Bb 9024	190 (n.c.) ^b	31 (n.c.) ^a
Bb 9001	112 (73; 233) ^a	37 (n.c.) ^a
Mistura (Bb 9205 + 9024 + 9001)	316 (n.c.) ^c	145 (87; 384) ^b

n.c. limites de confiança não confiável. * Para cada tempo de avaliação as diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações são indicados por letras diferentes Tukey ($p \leq 0,005$).

Bb 9024 e Bb 9001 mostraram maiores efeitos sobre a linhagem celular SF-9 com valores de CL₅₀ de 31 e 37 ppm, respectivamente, sem diferença estatística. No entanto, foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,005$) entre Bb 9205, a mistura e os outros tratamentos após 48 h. Além disso, a susceptibilidade da linhagem celular SF-9 aos diferentes isolados do fungo foi demonstrada. Os resultados sugerem que houve uma grande variação não só na produção de BEA, mas também no conteúdo de outras toxinas e metabólitos que facilitam a atividade citotóxica. Os principais estudos de citotoxicidade com esta toxina foram realizados mediante testes de sua atividade biológica contra insetos-

praga. Vários estudos realizados com *Murine* sp. e linhagens celulares de humanos apresentaram alta toxicidade (Di Paola *et al.*, 1994; Ojcious *et al.*, 1999, Calò *et al.*, 2004). Com base nos resultados dos ensaios de viabilidade, verificou-se que os valores de CC_{50} calculados para as outras toxinas, foram aproximadamente duas vezes maiores do que o valor calculado para BEA, em ambas as linhagens celulares SF-9 e SF-21 (Tabela 9). Valores semelhantes de CC_{50} (3,0 e 2,5 μ M) foram reportados por Fornelli *et al.* (2004) e por Calò *et al.* (2003) em ensaios com BEA sobre a linhagem SF-9. Nossos resultados também mostram que a linhagem celular SF-9 é mais sensível do que a linhagem SF-21.

BEA, não tem apenas propriedades inseticidas, mas possui também características antimicrobianas (Nilanonta *et al.*, 2000; Mei *et al.*, 2009). Experimentos anteriores aplicando BEA puro em larvas e adultos da broca-do-café apresentaram mortalidade superior a 50% apenas para as larvas (Arboleda *et al.*, 2003). Existe uma relação direta entre a quantidade da toxina e a patogenicidade ocasionada pelo fungo, que provoca degeneração progressiva do tecido hospedeiro, alterações estruturais das membranas, desidratação e alterações na atividade elétrica dos nervos motivada pelo aumento do consumo de oxigênio em uma tentativa do inseto para se recuperar do efeito tóxico (Evlakhova e Rakítin, 1968; Vey *et al.*, 1985).

Zizca e Wisner (1993) corroboraram o efeito de BEA sobre larvas de *Culex pipiens*. Estes estudos mostraram que o uso de concentrações baixas (0,1 mg/mL) da toxina, aplicadas topicamente em insetos, geram uma mortalidade de 44% no período de 48 horas. Os mesmos resultados foram obtidos por Gupta *et al.* (1991), que testaram a ação inseticida em larvas de *Leptinotarsa decemlineata* e detectaram mortalidade entre 50 e 90% no período de 48 horas, aplicando concentrações de 633 e 1196 ppm de BEA. Além disso, alguns autores também reportaram efeitos *in vivo* de metabólitos de fungos como agentes de controle de insetos e constataram que o principal sintoma da intoxicação foi a vacuolização generalizada e o efeito da toxina na mitocôndria, que cresceu e assumiu o aspecto de vacúolo arredondado (Vey *et al.*, 2001). No presente estudo, efeitos similares foram observados nas células SF-9 por análises usando microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão (MET), que exibiram vacuolização e estresse generalizado na maioria dos tratamentos, assim como lise como mostrado nas figuras 14 e 15 obtidas após análises. Entretanto, a análise de DNA das linhagens celulares SF9, SF21 e HF5, após os tratamentos com as toxinas para observação do comportamento das células em apoptose, não mostrou resultados conclusivos (dados não mostrados).

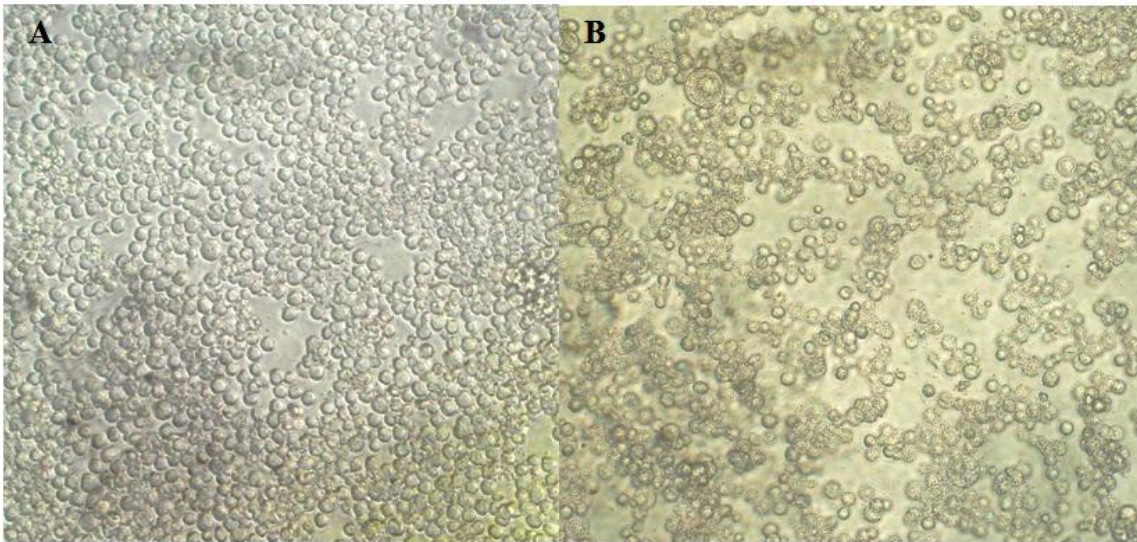


Figura 14. Microscopia de luz 20X. A. Células controle linhagem celular SF-9. B. Células tratamento com BEA 10 μ M, após 48 horas de exposição.

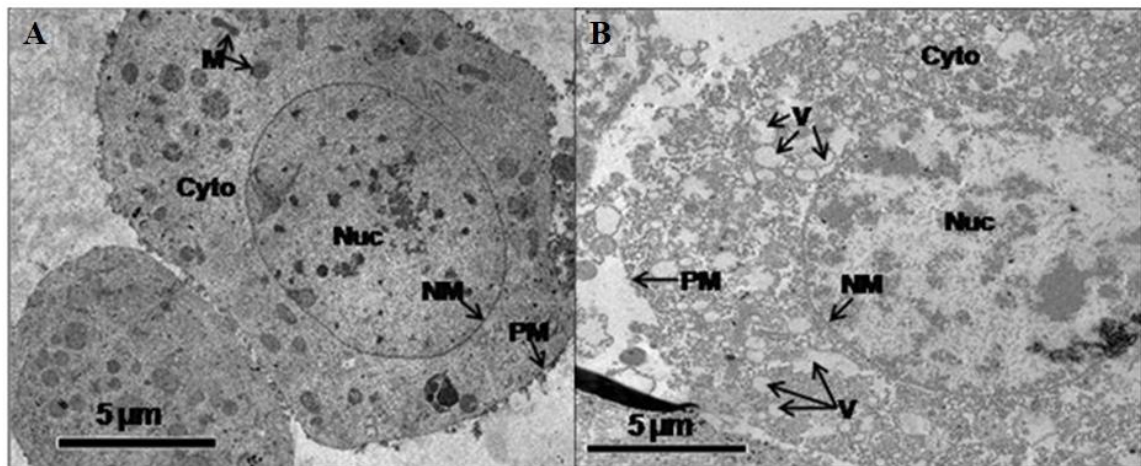


Figura 15. Micrografias eletrônicas de transmissão (MET) das células SF-9. A. controle. B. células tratadas com BEA 10 μ M. M. Mitocôndria. Cyto. Citoplasma. Nuc. Núcleo. NM. Membrana nuclear. PM. Membrana plasmática. V. vacúolos.

Nossos resultados sugerem um claro envolvimento dos metabólitos do fungo *B. bassiana* no processo de infecção por intermédio da atividade tóxica sobre a viabilidade das células (Figura 12; Tabelas 9 e 10). Também possivelmente a sinergia e antagonismo entre os compostos podem influenciar na toxicidade mostrada pelos extratos (Skrobek e Butt, 2005).

Apesar da variabilidade na produção de BEA ter sido demonstrada, e que isolados de cada grupo de produção tenham sido selecionados, nenhuma correlação foi observada entre a viabilidade celular (extratos brutos) e a produção da toxina. Por exemplo, Bb 9001 de menor produção de BEA (15,66 mg/L) teve um efeito maior sobre a viabilidade da linhagem celular SF-9 com um valor de CL_{50} de 112 e 31 ppm, às 48 e 72 h de exposição, respectivamente.

Estudos prévios com Dextruxin A (DTXA) de *M. anisopliae* mostraram um efeito mais tóxico sobre SF-9 com um valor de CL_{50} de 5 ppm. No entanto, 500 ppm do extrato bruto contendo 90 ppm de DTXA foi menos eficaz e não causou mortalidades elevadas (Skrobek e Butt, 2005).

8.5 Atividade antibacteriana

Os resultados da atividade antimicrobiana dos metabólitos produzidos pelo fungo entomopatogênico *B. bassiana* mostrado pelas micotoxinas avaliadas BEA, BAS, TEN e OOS são apresentados na tabela 11. Adicionalmente, a atividade antimicrobiana dos extratos brutos é apresentada na tabela 12. Os valores foram expressos em porcentagens de inibição calculados de acordo com a fórmula descrita em materiais e métodos e com relação aos respectivos controles de crescimento bacteriano. Em todos os casos, o maior efeito antibacteriano dos tratamentos realizados com as micotoxinas foi de 100 % de inibição contra a bactéria do gênero *Proteus sp.* com diferenças nos tempos de atividade; enquanto que o menor efeito inibitório foi mostrado por todos os metabólitos sobre *Salmonella sp.* Porém, a maior concentração dos compostos (10 μ M) nos primeiros tempos de avaliação (60 min) mostrou também porcentagens de inibição de 100%. Nenhum composto alcançou o 100% de inibição das bactérias *Staphylococcus sp.* e *Klebsiella sp.* Adicionalmente, unicamente BAS alcançou o 100% de inibição de *E. coli* para todas as concentrações utilizadas a partir dos 120 min de avaliação (Tabela 11). A produção de compostos antibióticos por parte dos fungos é realizada para inibir o crescimento de competidores nos ambientes naturais, além das propriedades inibitórias tais compostos podem ter características de moléculas sinal (Fajardo e Martinez, 2008).

A sobrevivência dos seres humanos tem se adaptado as estratégias complexas dos micro-organismos que diariamente desafiam o conhecimento científico pela ameaça constante da resistência à quimioterapia. O arsenal terapêutico diminuiu nos últimos anos e neste momento, os fenômenos de resistência bacteriana atingiram o clímax, tornando-se um problema de saúde pública crescente com altos registros de morbidade e mortalidade. Nos Estados Unidos estima-se que as infecções com micro-organismos resistentes a penicilina e meticilina geram custos anuais de 530 bilhões de dólares; estes custos elevados são praticamente inatingíveis em países em desenvolvimento (Smith *et al.*, 1999).

Tabela 11. Análise de porcentagem de inibição, média da leitura dos bioensaios realizados com os metabólitos puros sobre as diferentes espécies de bactérias.

Bactéria	Tempo (Min)	Porcentagens de Inibição (%)											
		Beauvericina (µM)			Basianina (µM)			Tenellina (µM)			Oosporeina (µM)		
		1	5	10	1	5	10	1	5	10	1	5	10
<i>Escherichia coli</i>	30	12.93	27.58	62.06	0.00	0.00	0.00	68.10	93.97	77.59	9.48	20.69	40.52
	60	68.98	38.32	85.36	29.27	10.45	19.16	73.17	90.24	86.76	46.34	51.57	35.54
	90	82.82	52.41	64.75	29.16	29.87	37.39	55.97	75.16	69.50	43.40	29.56	33.96
	120	59.03	57.78	68.69	100	100	100	61.43	80.57	79.14	68.86	41.71	48.86
	150	60.00	57.78	66.59	100	100	100	56.36	74.86	69.65	74.57	64.74	45.38
	180	-	-	-	-	-	-	61.52	90.58	86.91	81.41	78.80	64.66
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	30	0.00	0.00	42.86	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	60	85.02	73.17	63.41	76.66	48.43	39.72	66.55	81.18	89.20	60.28	62.72	66.20
	90	89.62	26.10	17.30	61.32	49.37	48.11	36.48	47.17	58.49	11.95	0.00	0.00
	120	0.00	0.00	0.00	22.86	5.14	4.29	6.00	11.14	49.14	36.57	20.29	17.14
	150	0.00	0.00	0.00	10.40	10.98	4.05	5.20	21.10	63.01	31.21	24.28	18.50
<i>Salmonella typhimurium</i>	30	52.63	94.08	100	81.58	95.39	100	50.66	75.00	74.34	92.11	81.58	100
	60	0.00	80.65	100	0.00	0.00	0.00	0.00	22.58	100	54.84	0.00	100
	90	0.00	0.00	12.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	46.88	40.63	0.00	0.00
	120	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	39.22	0.00	0.00
	150	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	180	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Staphylococcus aureus</i>	30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	60	57.14	43.21	63.76	59.23	58.54	64.46	40.77	61.32	70.56	80.84	74.56	74.91
	90	57.86	38.36	73.27	57.86	68.24	74.84	26.10	58.18	66.51	63.84	71.38	70.44
	120	69.14	49.43	72.86	54.57	63.14	76.86	16.57	48.00	61.29	40.57	44.57	56.86
	150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus sp.</i>	30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	60	100	100	100	100	100	100	0.00	0.00	60.28	0.00	94.08	57.14
	90	100	100	100	100	100	100	97.80	100	100	44.03	100	100
	120	100	100	100	100	100	100	95.71	100	100	72.29	100	100
	150	100	100	100	100	100	100	58.09	61.56	100	38.15	100	100

Tabela 12. Análise de porcentagem de inibição, média da leitura dos bioensaios realizados com os extratos brutos do crescimento do fungo *B. bassiana* de diferentes grupos de produção de BEA e mistura sobre as diferentes espécies de bactérias.

		Porcentagens de Inibição (%)											
Bactéria	Tempo (Min)	Grupo I (%)			Grupo II (%)			Grupo III (%)			Mistura (%)		
		5	10	20	5	10	20	5	10	20	5	10	20
<i>Escherichia coli</i>	30	0.00	0.00	0.00	8.62	44.83	9.48	63.79	12.07	18.97	53.45	84.48	72.41
	60	7.32	17.07	18.82	36.59	32.75	31.01	67.60	52.61	37.28	27.53	33.45	51.57
	90	8.18	17.92	21.07	41.51	37.42	29.25	75.47	48.74	38.99	0.00	7.55	13.52
	120	0.00	18.57	35.43	31.71	35.14	19.71	62.29	35.43	14.86	0.00	7.43	20.29
	150	0.00	20.23	48.55	30.06	32.37	7.80	63.01	39.88	13.29	0.00	2.02	20.23
	180	0.00	34.29	51.83	36.13	38.48	19.11	70.16	53.66	34.82	0.52	23.30	25.39
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	30	0.00	0.00	7.14	0.00	0.00	42.86	100	100	100	0.00	0.00	0.00
	60	78.75	82.23	95.47	75.61	70.38	97.21	99.30	100	99.30	72.13	71.78	79.79
	90	12.26	11.32	22.01	0.00	13.21	30.19	15.09	30.50	33.65	71.07	77.36	77.99
	120	30.00	23.71	28.00	11.71	20.29	32.57	32.00	39.71	42.86	70.86	74.29	80.00
	150	23.12	15.32	34.68	8.09	20.81	31.50	27.75	32.95	34.97	43.35	59.25	71.39
<i>Salmonella typhimurium</i>	30	98.03	96.71	100	76.97	86.18	76.32	100	97.37	100	100	100	100
	60	12.90	0.00	29.03	22.58	48.39	16.13	0.00	0.00	0.00	100	100	100
	90	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100	100
	120	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100	100
	150	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100
	180	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.73	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	60	77.00	65.16	79.44	57.49	77.00	78.75	66.20	82.23	81.88	54.01	53.66	68.64
	90	38.99	39.94	57.23	32.08	49.06	47.48	28.30	48.74	52.52	54.72	52.83	47.80
	120	27.71	32.86	48.57	22.29	31.43	35.71	10.29	19.71	24.00	58.29	77.43	34.57
	150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus sp.</i>	30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100	100
	60	0.00	100	0.00	0.00	0.00	100	0.00	0.00	0.00	0.00	100	100
	90	32.08	100	100	0.00	100	100	15.41	22.33	40.25	89.31	100	100
	120	100	100	100	0.00	100	100	22.86	33.71	44.57	100	100	100
	150	15.32	100	100	100	100	100	0.00	0.00	22.54	59.83	100	100

Algumas cepas de *Klebsiella*, primariamente da espécie *K. pneumoniae*, têm-se mostrado produtora de β -lactamases e, por isso, resistente a antibióticos da família das Penicilinas. Este grupo de bactérias é denominado de ESBL (β -lactamases de espectro

estendido) e vem se tornando um desafio para os estudiosos da área de saúde, uma vez que desenvolvem mecanismos que desativam a ação de antibióticos, via plasmidial. Apesar, de nenhum metabólito puro testado contra *Klebsiella* ter atingido 100 % de inibição, BEA (1 μ M) e TEN (10 μ M), inibiram em 89 % o crescimento da bactéria (Tabela 12).

Adicionalmente, é importante salientar que uma característica comum às bactérias dos gêneros *Proteus*, *Morganella* e *Providencia* é a resistência natural às polimixinas, um grupo de antibióticos bastante ativos contra as demais enterobactérias e outros germes gram-negativos. Da mesma forma, bactérias do gênero *Proteus*, além de causarem infecções no sistema nervoso central e prostatites, também são agentes causadores de pielonefrite na comunidade, e outras infecções urinárias. No presente estudo, foi demonstrado que peptídeos e extratos brutos do fungo *B. bassiana* conseguiram inibir completamente o crescimento de *Proteus sp.* durante o tempo do experimento, mostrando propriedades interessantes e potenciais no controle da bactéria.

Recentes estudos demonstraram efeitos significativos de atividade antimicrobiana de extratos brutos do fungo *B. bassiana* sobre bactérias patogênicas aeróbicas que incluíam: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, e *Klebsiella aerogenes*, entre outros (Narasimha *et al.*, 2010). Isto é similar aos resultados encontrados neste estudo com extratos brutos dos diferentes grupos de *B. bassiana* classificados pela produção de BEA e a mistura dos mesmos contra as bactérias dos tipos gram positiva e negativa. No presente estudo, o maior efeito antibacteriano foi obtido sobre os gêneros *Proteus sp.* e *Salmonella sp.* usando a mistura dos extratos nas maiores concentrações, atingindo o 100% de inibição para todo o tempo de avaliação e mostrando um efeito bactericida (Tabela 12). Com exceção dos extratos do grupo III todos os tratamentos atingiram 100% de inibição de *Proteus sp.* Porém, unicamente os extratos do mesmo grupo atingiram 100% de inibição nos ensaios contra *Klebsiella pneumoniae* nos primeiros 60 min de avaliação. A menor atividade biológica sobre as bactérias foi mostrada pelos extratos do grupo I e II sobre *E. coli*, mostrando valores de 51,83% de inibição na maior concentração e no máximo do tempo avaliado (180 min). Nos primeiros 30 min de avaliação com *Staphylococcus aureus* nenhum tratamento teve inibição diferente de 0% ou alcançaram 100% durante o restante do tempo do experimento o qual indica uma menor susceptibilidade deste tipo de bactérias gram-positivas aos compostos puros dos metabólitos e aos extratos brutos (Tabelas 11 e 12). Tem-se reportado para *Staphylococcus aureus* resistência a compostos antibióticos como penicilina, oxacilina e vancomicina, como também contra os compostos aqui testados. No geral, este tipo de bactéria

possui resistência intrínseca a diversas moléculas, incluindo oxacilina e β -lactâmicos, devido a presença do gen *mecA* (Smith *et al.*, 1999).

Todos os tratamentos dos metabólitos puros e dos extratos brutos provenientes do crescimento do fungo *B. bassiana* apresentaram efeitos antibacterianos sobre as diferentes espécies de bactérias utilizadas nos ensaios. Na maioria dos tratamentos observou-se uma correlação da concentração, e do tempo e a atividade de inibição. Com exceção da maior concentração da mistura (20%) que mostrou evidente 100% de atividade inibitória durante todo o tempo do ensaio com *Salmonella sp.*, o demais tratamentos mostraram unicamente atividade bacteriostática durante os primeiros 60 min, para este tipo de bactéria (Tabelas 11 e 12). Em todos os casos, a mistura mostrou valores altos de inibição para todas as bactérias testadas quando comparada com a atividade dos extratos dos grupos, demonstrando um efeito cumulativo.

Na busca de novos compostos antibacterianos, inúmeros trabalhos de pesquisa vem sendo desenvolvidos com o objetivo de avaliar peptídeos de diferentes fontes vegetais (Pelegrini *et al.*, 2011). Da mesma forma, estudos para avaliar AMPs (peptídeos antimicrobianos) provenientes de animais marinhos tem sido desenvolvidos (Otero-González *et al.*, 2010). Além disso, a síntese e desenho de novos compostos também é uma alternativa na identificação de moléculas com atividade antimicrobiana como demonstrado por Basode *et al.*, (2009).

CAPITULO 2. Atividade biológica de metabólitos produzidos pelo fungo *Schizophyllum commune*: estudo dos processos bioquímicos e físicos da interação com bambu

9 Resumo do segundo capítulo

A biodiversidade dos países tropicais oferece inúmeras oportunidades em biotecnologia, especialmente se considerarmos que os micro-organismos têm sido importantes durante muitos anos nas diferentes aplicações industriais em áreas como farmacologia, agroindústria, bioprocessos, tecnologia ambiental e bioconversão de vários produtos. Procurando por novas enzimas lignocelulolíticas, *Schizophyllum commune*, um fungo de ampla distribuição, foi coletado e cultivado durante 20 dias em meio de cultura líquida contendo Carboximetilcelulose (CMC 1%) e fibras lignocelulósicas de bambu. Constatou-se diferença estatística entre os tratamentos na presença e na ausência de CMC ($p \leq 0,05$), demonstrando que a presença deste composto tem um efeito indutor sobre a atividade da celulase. Os resultados mostram quatro picos de atividade da β -glicosidase, referentes a 5, 13, 17 e 20 dias de cultivo celular. A atividade enzimática de xilanase, mananase, endoglicanase, exoglicanase e poligalacturonase, também foi avaliada. Por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), o mecanismo físico que esse fungo utiliza para degradar bambu foi observado em ambas as fibras, tratadas e não tratadas, mostrando ruptura estrutural e invasão dos feixes vasculares, das células do parênquima e dos tecidos parenquimatosos, como consequência da presença deste fungo no tecido da planta.

10 Materiais e Métodos

10.1 Material Biológico

Uma linhagem selvagem *S. commune* foi coletada na localidade de Santágueda (Caldas, Colômbia), localizada a 5° 05' N - 75° 40' W, 1010 metros de altitude, temperatura de 23,5° C e umidade relativa do ar de 71% (Figura 16). As amostras foram levadas para o laboratório, onde os carpóforos crescidos sobre as estruturas do bambu foram lavados, desinfetados e mantidos a 24° C. Para a replicação do fungo, os fragmentos dos corpos frutíferos foram mantidos em placas de petri de 8.7 cm de diâmetro contendo meio de cultura sólido Sabouraud Dextrose Agar (SDA) e pedaços de bambu como suporte. Realizou-se a incubação das placas a 37° C, até que se observou o crescimento micelial com as características macroscópicas típicas do fungo.



Figura 16. Locais de coleta do fungo *S. commune* na localidade de Santágueda –Caldas, Colômbia–.

10.2 Produtos químicos e substratos

Todos os substratos foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). As fibras de bambu, bagaço de cana-de-açúcar e engaço de bananeira foram coletadas de uma fonte local. Estes resíduos foram autoclavados a 121°C durante 20 min. Após a autoclavagem, foram misturados com os meios líquidos, a fim de formar uma mistura homogênea para ser utilizada nos experimentos de hidrólise enzimática.

10.3 Cultivo do fungo

O inóculo foi preparado pela adição de dois fragmentos (1 cm²) de crescimento ativo do fungo em meio sólido em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultura líquido (Kolenová *et al.*, 2005) (peptona 10 g/L, D-glucose 20 g/L e chloroamphenicol 0,05

g/L) e pH 7,0. O meio de cultura também foi complementado com fibras de bambu 1% (m/v) autoclavadas, na presença e ausência de CMC 1% (m/v) como indutor da atividade endoglicanase. Adicionalmente, outros tratamentos foram também suplementados com fibras de bambu 1% (m/v), engaço de bananeira 1% (m/v) e bagaço de cana-de-açúcar, variando a concentração do resíduo lignocelulósico entre 1-15% (m/v). Com exceção do último experimento com diferentes concentrações de bagaço de cana-de-açúcar, mantido sem agitação, todos os tratamentos foram incubados sob agitação rotacional a 150 rpm e 37° C. Após 20 dias de crescimento, os cultivos foram filtrados com o emprego de vácuo e papel Whatman # 1 para separar a massa micelial e substratos dos extratos. Todos os tratamentos foram clarificados por meio de centrifugação, a 14.000xg durante 30 minutos, e o sobrenadante foi concentrado por ultrafiltração, utilizando-se um sistema Amicon com membranas de 300 kDa de retenção (PM 300, Millipore) (Siqueira *et al.*, 2010). O material filtrado foi coletado e mantido a -80° C; posteriormente, utilizou-se este material para a realização de eletroforese e ensaios enzimáticos.

10.4 Ensaios enzimáticos

As atividades endoglicanase (CMCase), Hidroxietilcelulase (HECase), xilanase, poligalacturonase e mananase foram determinadas com o emprego do método do ácido dinitrosalicílico (DNS), que mede a quantidade de açúcares redutores liberados durante a reação enzimática, utilizando-se um espectrofotômetro Unicam UV2, a 540 nm (Miller, 1959). Para isso, 50 µL do extrato enzimático foram misturados com 100 µL de substrato 1% (m/v) (carboximetilcelulose, hidroxietilcelulose, xilana ou pectina) e 0,5% (m/v) de substrato (galactomanana) e mantidos a 50° C durante 30 min. A atividade FPase (celulase total) foi determinada com o emprego de 150 µL de enzima com papel de filtro (Whatman nº 1) como substrato, mantendo-se o material a 50° C durante 1 hora (Mandels *et al.*, 1976). A atividade enzimática foi definida como um µmol de açúcar redutor formado por minuto por mL de solução da enzima, ou seja, UI mL⁻¹. Glicose, xilose, manose e ácido galacturônico foram utilizados como padrões. Para calibração, utilizou-se uma solução estoque de 2 mg/mL para cada açúcar, variando a concentração do açúcar redutor com água destilada, totalizando sempre o volume de 150 µL. Assim, foram construídos 5 pontos para plotagem no gráfico de regressão linear. A partir do gráfico, obteve-se a equação da reta, que foi utilizada para quantificar o total de açúcar redutor após a adição de 300 µL de DNS, seguida de fervura durante 10 minutos e leitura a 540 nm. A atividade da lacase foi realizada segundo a metodologia descrita por Gómez *et al.* (2005), em que se utiliza o substrato ABTS 2,2'-azino-

bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) 0,5 mM em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5). A oxidação do ABTS foi monitorada pelo aumento da absorbância em 420 nm, durante 180 segundos, a 36° C, utilizando-se $\epsilon = 3,6 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$. Uma unidade de atividade enzimática (UI) foi definida como a quantidade de enzima requerida para oxidar 1 μmol de ABTS por mL/minuto. Para todos os ensaios, as reações foram realizadas em triplicata.

10.5 Caracterização parcial das β -glicosidases

A atividade da β -glicosidase foi determinada pela incubação de 50 μL de solução de enzima a partir de extratos líquidos de *S. commune* com 5 μL de p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pN β G; 25 mM) e 145 μL de tampão citrato 50 mM (pH 5,0), a 37° C durante 30 min. Parou-se a reação mediante a adição de 50 μL de carbonato de sódio (1 M), e a absorbância foi lida a 405 nm no ensaio espectrofotométrico. Já no ensaio fluorimétrico, foram utilizados 50 μL de solução de enzima, 100 μL de tampão glicina 50 mM (pH 9,0) e 50 μL do substrato 4-metilumbeliferil- β -glicósido (4MU β G; 5 mM). O produto liberado foi monitorado durante 180 minutos em condições de emissão e excitação 360/460. Para ambos os ensaios, os resultados foram comparadas com curvas-padrão de p-nitrofenil e 4-metilumbeliferil, respectivamente. Os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicata para cada tratamento, e a atividade foi expressa em micromoles de produto liberado por minuto por miligrama de proteína ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$).

10.6 Efeito de pH, temperatura e parâmetros cinéticos das β -glicosidases

Determinou-se o efeito do pH por meio de pré-incubação das enzimas durante 15 min, a 37° C, em tampão apropriado: Citrato de sódio 50 mM (pH 3-5), succinato 50 mM (pH 6), fosfato de sódio 50 mM (pH 7), Tris-HCl 50 mM (pH 8 e 9) e 50 mM de glicina (pH 10 e 11). O efeito da temperatura foi analisado nas condições acima descritas, variando a temperatura de 30 a 80° C, com 15 min de pré-incubação. Adicionalmente, concentrações de substratos finais foram variadas e a constante de Michaelis-Menten (K_m) como a velocidade máxima (V_{max}) foram estimadas mediante a análise de regressão não linear, utilizando-se o pacote do *software Prism (software Graphpad, versão 5)*.

10.7 Determinação de proteínas totais solúveis

Determinou-se a quantidade de proteína total solúvel da preparação enzimática dos extratos líquidos de *S. commune* pelo emprego do método de Bradford, utilizando-se o kit para determinação de proteínas da BioRad e albumina bovina (BSA) como padrão (Bradford,

1976). Igualmente, leituras de proteínas foram realizadas com 1,5 µL de amostra e medições de absorvância direta no equipamento Nanodrop.

10.8 Western blot

Amostras de sobrenadante, obtido a partir das culturas de *S. commune* contendo aproximadamente 10 microgramas de proteínas, foram separadas por SDS-PAGE (12%), segundo a metodologia descrita por Laemmli (1970). As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, e a transferência (úmida) foi realizada em tampão Tris 25 mM contendo glicina 200 mM e metanol 20% durante a noite, a 30 V e 4° C. Após a transferência, a membrana foi bloqueada em leite desnatado 5% durante 2 horas em temperatura ambiente e lavada com solução TTBS (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 138 mM, Tween 20 0,05%). A membrana de nitrocelulose foi incubada em solução antisoro (1:1000). Anti-β-glicosidase doada pelo Dr. Siegfried Blair) durante 2 horas, a 37° C, e lavada com TTBS. A membrana foi incubada com uma solução de anticorpos secundários anti-IgG produzidos em coelho, conjugada a peroxidase (HRP; 1:1000; BioRad). As lavagens foram repetidas e as proteínas detectadas seguindo as instruções do fabricante do kit de detecção de Western blot, utilizando 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB; Invitrogen) como substrato. Finalmente, utilizando-se o marcador de proteínas 10-250 kDa (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards Value Pack # 161-0394 BioRad), o peso molecular das proteínas detectadas.

10.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O mecanismo físico usado pelo fungo na decomposição de bambu foi observado por MEV, utilizando-se fragmentos de bambu saudável e degradados em diferentes estágios de crescimento. Adicionalmente, as fibras de bambu tratadas e não tratadas com extratos de enzima, obtidos a partir do crescimento do fungo em meio líquido, foram mantidas por cerca de 15 dias em a 50° C e umidade relativa de 80%. Posteriormente, as fibras foram lavadas, fixadas com acetaldeído, desidratadas com gradiente de etanol e metalizadas com partículas de ouro no vácuo. Finalmente, a visualização topográfica foi efetuada utilizando-se um equipamento JEOL JSM-5000 (JEOL, Tóquio – Japão), com um potencial de 10 kV. O trabalho foi realizado no Laboratório de Microscopia Avanzada de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

10.10 Análise estatística

Foram comparados os dados por meio da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$, utilizando-se o programa SigmaStat 2,03 para Windows (SPSS Inc., EUA).

11 Resultados e Discussão

11.1 Atividade holocelulase

Schizophyllum spp., o gênero responsável pela podridão branca, além de ser amplamente distribuído, é também um importante agente fúngico em virtude de sua ação na decomposição de resíduos lignocelulósicos (Fang, 1998). Além disso, diversos estudos têm mostrado que altas concentrações de nitrogênio, durante a cultura de fungos da podridão branca, são essenciais para melhorar a produção de enzimas (Cavallazzi *et al.*, 2005; Srinivasan *et al.*, 2005). Estudos prévios demonstraram que alguns substratos ou metais pesados podem gerar alterações fisiológicas e de reprodução em basidiomicetos como *S. commune*, afetando seriamente não só a capacidade para colonizar tecidos vegetais, mas também a atividade das enzimas celulolíticas envolvidas no processo de infecção (Baldrian, 2003). Não está claro ainda se estes metais específicos estão presentes nos tecidos do bambu, ou como esses compostos poderiam afetar o desenvolvimento do fungo e sua capacidade de degradar naturalmente material celulósico. Trabalhos adicionais devem ser realizados para se obter uma melhor compreensão sobre este processo. Por outro lado, conforme apresentado na figura 17, obteve-se maiores atividades de xilanase, poligalacturonase, endoglicanase, exoglicanase e FPase com a utilização de bagaço de cana-de-açúcar como substrato. Em contraste, obteve-se a melhor atividade de mananase com o emprego de engaço de bananeira como substrato. Com exceção da poligalacturonase, todas as enzimas mostraram menor atividade quando bambu foi usado como substrato, mas isso não esteve diretamente relacionado com a composição de bambu (Tabela 13; Xiaobo, 2004).

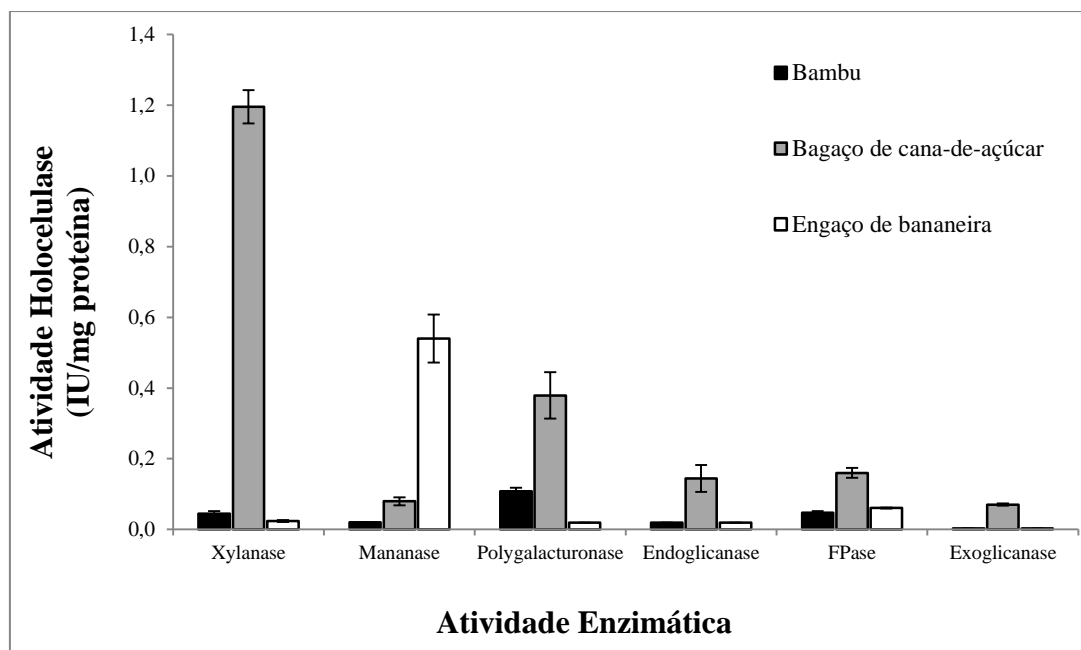


Figura 17. Atividade da holocelulase do extrato bruto de *S. commune* crescido em cultura submersa durante 15 dias com diferentes fontes de carbono.

Haltrich *et al.* (1993) otimizaram a atividade enzimática do fungo *S. commune* crescido em culturas líquidas contendo celulose microcristalina como fonte de carbono. O fungo tem uma importante capacidade para decompor esses tipos de resíduos lignocelulósicos, com propriedades interessantes para ser usado em pré-tratamentos enzimáticos (Robinson *et al.*, 2001; Siqueira, 2010; Yi-heng e Lee, 2004). Isolados selvagens de *S. commune* crescidos em culturas contendo celulose pura incrementaram a atividade enzimática de celulase, xilanase e mananase. Em contraste, xilana pura não induziu a atividade xilanase e mananase (Haltrich e Steiner, 1994). Além disso, um estudo recente realizado por Dillon *et al.* (2011) com o mutante S1M29 de *Penicillium echinulatum* mostrou uma mais rápida e maior produtividade de celulases do que a cepa parental.

Tabela 13. Composição dos resíduos agroindustriais utilizados.

Composição (%)	Bagaço de cana-de-açúcar ⁺	Engaço de bananeira ⁺	Bambu [*]
Celulose	34.6	52.9	46.8
Hemicelulose	16.2	17.4	25.8
Lignina	5.1	9.4	23.9

Referências: ⁺Siqueira 2010; ^{*}Xiaobo 2004

Esses resultados demonstram que, no caso de *S. commune*, a síntese deste tipo de enzima encontra-se sob padrões de regulamentação comum. Bagaço de cana-de-açúcar utilizado como fonte de carbono induz maiores atividades enzimáticas das principais enzimas avaliadas no ensaio. Adicionalmente, os resultados do estudo apresentando sugerem uma correlação direta entre a concentração de bagaço de cana-de-açúcar utilizada e a atividade enzimática da pectinase e exoglicanase, ao passo que nenhuma correlação foi observada nas atividades de xilanase, mananase, endoglicanase e FPase (Figura 18).

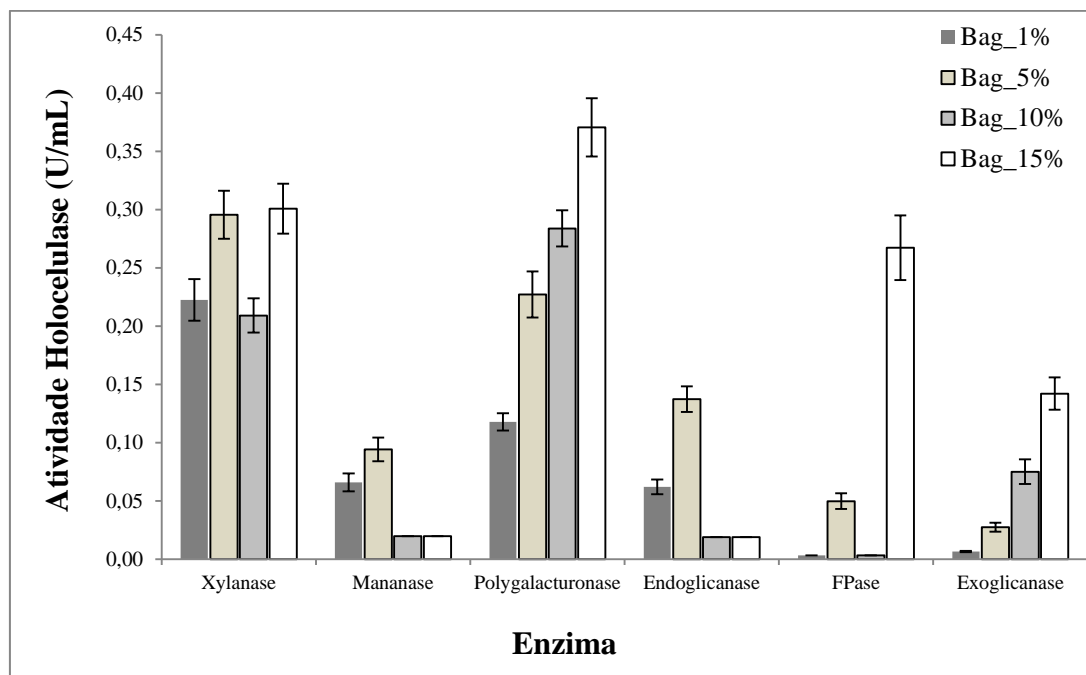


Figura 18. Atividade da holocelulase de extratos de *S. commune* em cultura submersa durante 15 dias com diferentes concentrações de bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono.

Da mesma forma, outros estudos com *Agaricus brasiliensis* e *Pleurotus sajor-caju*, cultivados em diferentes concentrações de fontes de carbono obtidas a partir de resíduos lignocelulósicos (como bagaço de cana-de-açúcar, engaço de bananeira e resíduos de algodão da indústria têxtil), mostraram maior atividade de xilanase e pectinase (Siqueira, 2010). Bailey *et al.* (1993) demonstraram um aumento da atividade de xilanase de *Trichoderma reesei* quando o fungo é cultivado em meio de cultura contendo celulose e xilana como as principais fontes de carbono. Além disso, o fungo mesófilo *Penicillium corylophilum* produz a maior atividade da holocelulase quando cultivado na presença de resíduos de algodão sujo (Siqueira *et al.*, 2010). Apesar do fato de engaço de bananeira e bambu terem maiores concentrações de celulose, hemicelulose e lignina do que bagaço de cana-de-açúcar (Tabela

13), a atividade total de celulase apresentada pelo fungo sobre este último substrato foi maior em comparação aos outros. Tem sido demonstrado que a atividade das enzimas que participam durante o processo de infecção é mediado por fatores de indução e regulamentado pelo ambiente (Cavallazzi *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 2005). Além disso, esta atividade é em parte diferenciada pela constituição do material hospedeiro definindo a interação patógeno-hospedeiro (Haltrich *et al.*, 1993). Enzimas como celulases e xilanases desempenham um papel importante na degradação de materiais lignocelulósicos (Haltrich *et al.*, 1993). A baixa atividade enzimática observada quando foi utilizado bambu como suplemento pode ser explicada, pela complexidade deste material vegetal e ao fato que o processo de infecção e hidrólise enzimática depende diretamente de variáveis como características do substrato, produção das enzimas, sinergia e inibição enzimática (Yi-heng e Lee, 2004). Enzimas hidrolíticas desempenham um papel importante durante o processo de degradação final dos resíduos biológicos (Coughlan, 1991).

11.2 Atividade da β -glicosidase e holocelulase na presença e ausência de carboximetilcelulose CMC.

Os resultados mostram altos picos de atividade nos dias 5, 13, 17 e 20, uma diminuição significativa no dia 10 e diferenças significativas entre os dias avaliados para cada tratamento em presença e ausência de CMC 1% (m/v), corroborando o efeito indutivo destes compostos na atividade enzimática até 20 dias de crescimento (Figura 19). A produção extracelular de 1,3- β -glicanase é semelhante quando cepas de micélios dicarióticos ATCC 38458 e monocarióticos de *S. commune* foram testados após 96 horas de crescimento (Prokop *et al.*, 1992). É importante entender os mecanismos bioquímicos de degradação dos resíduos lignocelulósicos. As endoglicanases e exoglicanases possuem domínios bifuncionais ou multifuncionais para ligar-se aos diferentes pontos do substrato. Da mesma forma, enzimas hidrolíticas como β -glicosidases desempenham um papel importante durante o processo final de degradação dos resíduos biológicos (Coughlan, 1991). Os resultados sugerem que a atividade da β -glicosidase de *S. commune* pode ser aumentada mediante a complementação do meio de cultura com diferentes fontes de carbono (Figura 19). Em contraste, na avaliação da atividade enzimática de *Trichoderma harzianum* crescido em diferentes fontes de carbono, a maior atividade obtida foi a endoglicanase em substrato contendo CMC, em comparação com exoglicanase e β -glicosidase (Aslam *et al.*, 2010).

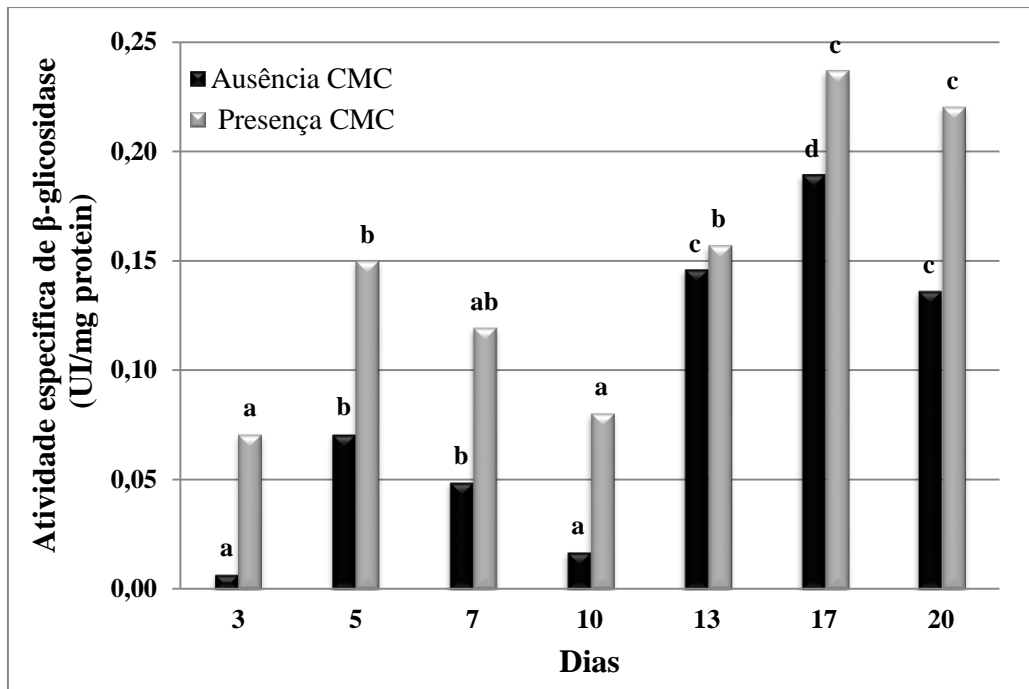


Figura 19. Atividade específica da β -glicosidase de *S. commune* crescido durante 20 dias em meio líquido contendo cultura de fibras de bambu 1%, na presença e ausência de CMC 1%. * Para cada tratamento, diferenças significativas entre os dias avaliados são indicados por letras diferentes Tukey ($p \leq 0,05$).

Na figura 20 são apresentados os resultados de atividade específica para endoglicanases, demonstrando a positiva indução e superior atividade deste tipo de enzima quando comparada com as celulases endógenas do inseto *Diabrotica virgifera*. Porém, para o mesmo tempo de avaliação (7 dias) dos extratos obtidos a partir do meio de cultura suplementado com CMC 1%, não houve diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos na presença e ausência do indutor na avaliação da atividade HECase (Figura 21).

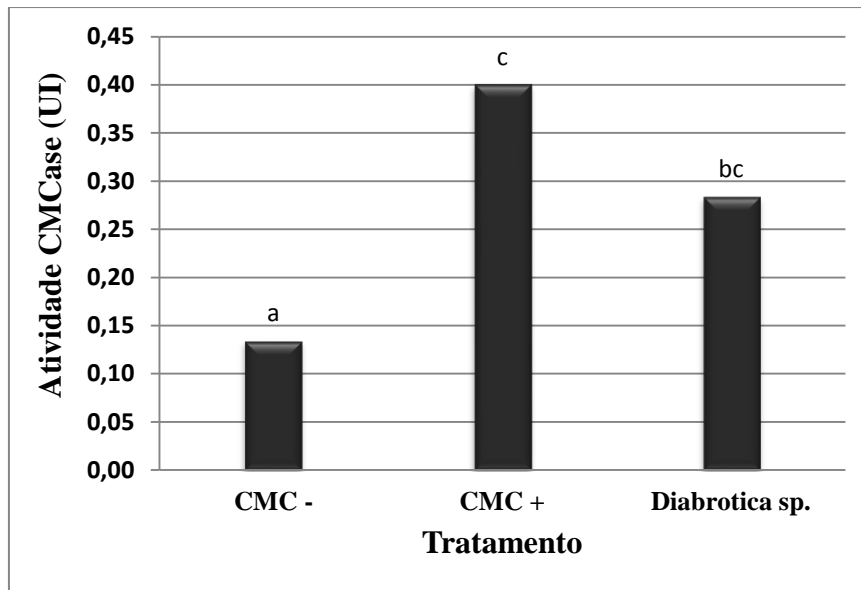


Figura 20. Atividade de CMCase de extratos do 7º dia de crescimento do fungo *S. commune* empregando-se CMC como substrato e extrato de *Diabrotica virgifera*. * Letras diferentes indicam diferenças estadísticas significativas Tukey ($p < 0.05$).

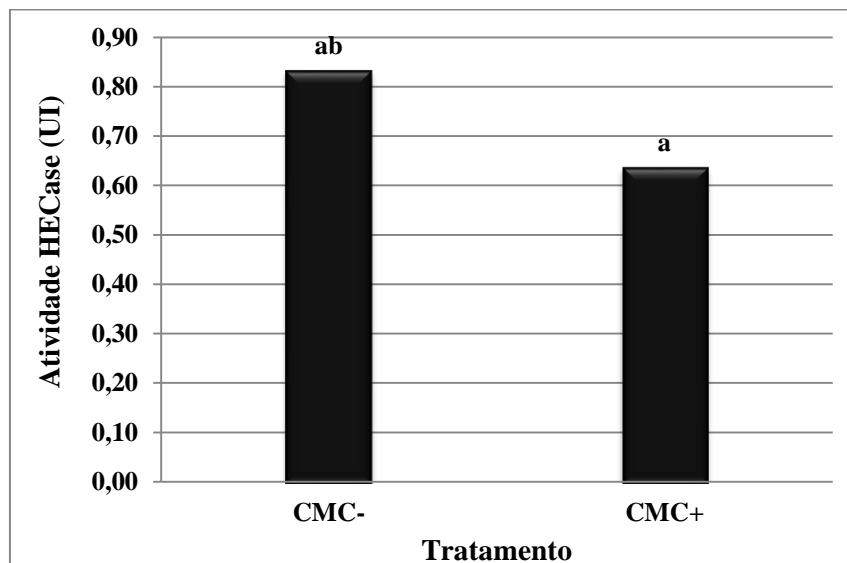


Figura 21. Atividade de endoglucanasas de extratos do 7º dia de crescimento, utilizando-se HEC como substrato. *Letras diferentes indicam diferenças estadísticas significativas Tukey ($p < 0.05$).

Adicionalmente, os resultados mostraram diferenças estadísticas significativas entre os tratamentos nos ensaios para avicelases e xilanases, sendo corroborada a indução na produção e atividade destas enzimas pelo composto CMC (Figuras 22 e 23). O efeito

representa um incremento na atividade, que foi mantido ao longo do tempo de incubação dos experimentos.

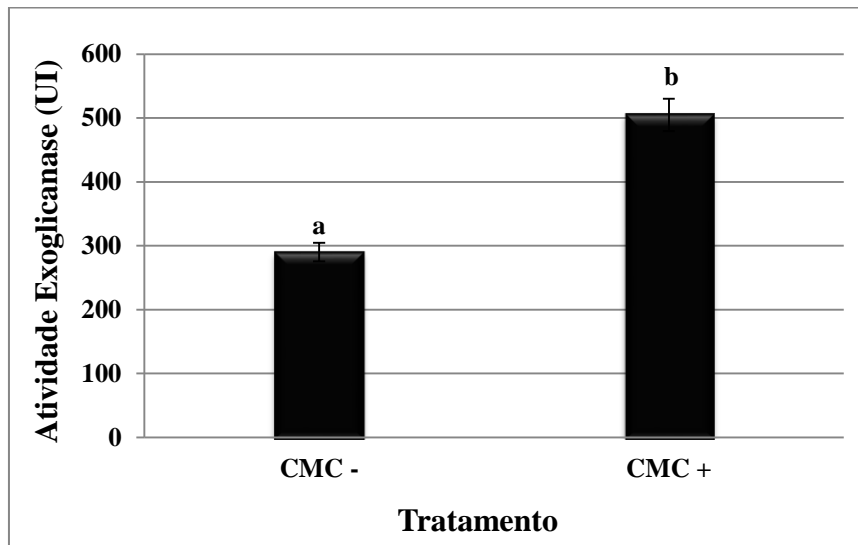


Figura 22. Atividade enzimática de extratos do 7º dia de crescimento, utilizando-se avicel como substrato. * Letras diferentes indicam diferenças estadísticas significativas Tukey ($p < 0.05$).

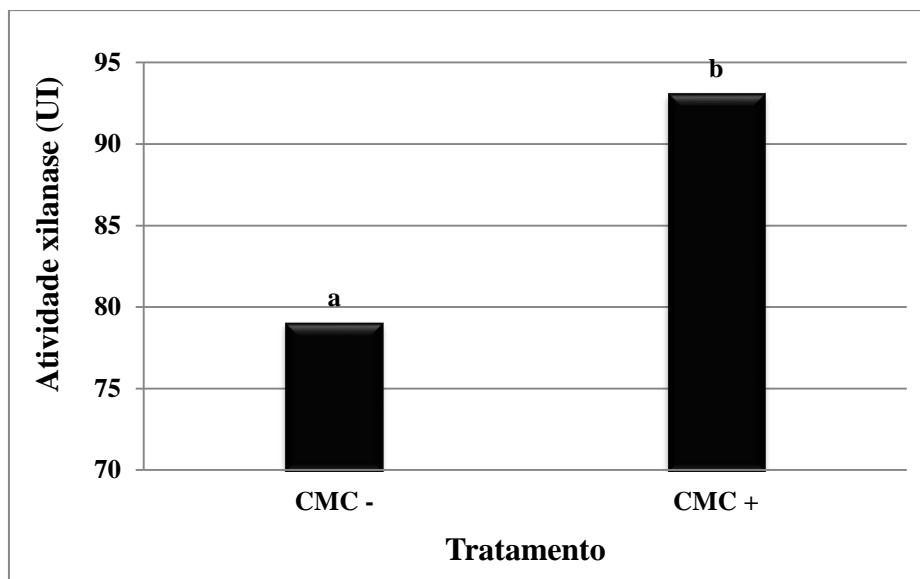


Figura 23. Atividade enzimática de extratos líquidos do 7º dia de crescimento do fungo *S. commune* utilizando-se xilana como substrato. * Letras diferentes indicam diferenças estadísticas significativas Tukey ($p < 0.05$).

A atividade xilanase avaliada em extratos provenientes do fungo *Aspergillus veriscolor*, utilizando-se diferentes substratos como indutores, demonstrou que o maior efeito na produção da enzima correspondeu ao composto CMC (Carmona *et al.*, 1997). Na natureza, a variedade de substratos induz produções de enzimas diferenciadas, em virtude de alterações

morfológicas e fisiológicas na reprodução dos basidiomicetos que regulam a produção das enzimas celulolíticas ao nível de transcrição, produção e ação (Baldrian, 2003).

Adicionalmente, da mesma forma que ocorre com o fungo *Phanaerochaete chrysosporium*, *S. commune* é amplamente estudado pelo potencial na biorremediação e produção de enzimas de importância biotecnológica. Muitos processos agroindústrias usam *P. chrysosporium* para o branqueamento de polpa por meio de tratamento enzimáticos (Martínez *et al.*, 2004).

11.3 Atividade da lacase

Na figura 24 observou-se a atividade lacase dos extratos do fungo, mostrando um pico de atividade ao dia 15 de avaliação. As lacases dos fungos têm a capacidade de atacar a lignina para favorecer o acesso aos polissacarídeos, os quais são metabolizados com maior facilidade. Ander e Erickson (1976) discutiram sobre a ação da lacase na regulação das enzimas lignolíticas para a geração de metabólitos ligninolíticos oxidáveis. Quando as lacases são adicionadas, protege-se o micélio do fungo, em razão da despolimerização de tóxicos intermediários no processo de degradação da lignina. Lacases produzidas pelo fitopatógeno *Botrytis cinerea* têm papel essencial para sobrepor o mecanismo de defesa da planta na desintoxicação dos compostos antifúngicos formados no hospede infectado (Viterbo *et al.*, 1993). Da mesma forma, o fungo *Aspergillus nidulans*, para sintetizar pigmentos nas conídias, utiliza duas lacases (Herman *et al.*, 1983).

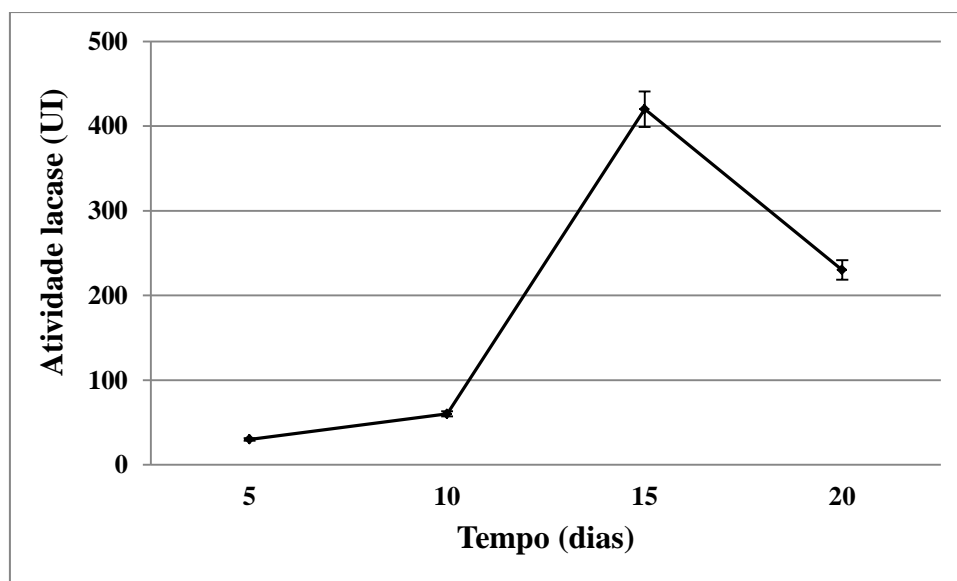


Figura 24. Atividade das lacases do fungo *S. commune* durante 20 dias de crescimento.

Os fungos basidiomicetos, responsáveis pela podridão branca, possuem um complexo de oxidases e peroxidases que permite catalisar as primeiras reações, quebrando as uniões da molécula de lignina (Jordaan, 2004). A cinética da enzima no tempo foi monitorada (Figura 25) para o dia 15 de expressão, pico de atividade na cinética da enzima (Figura 24).

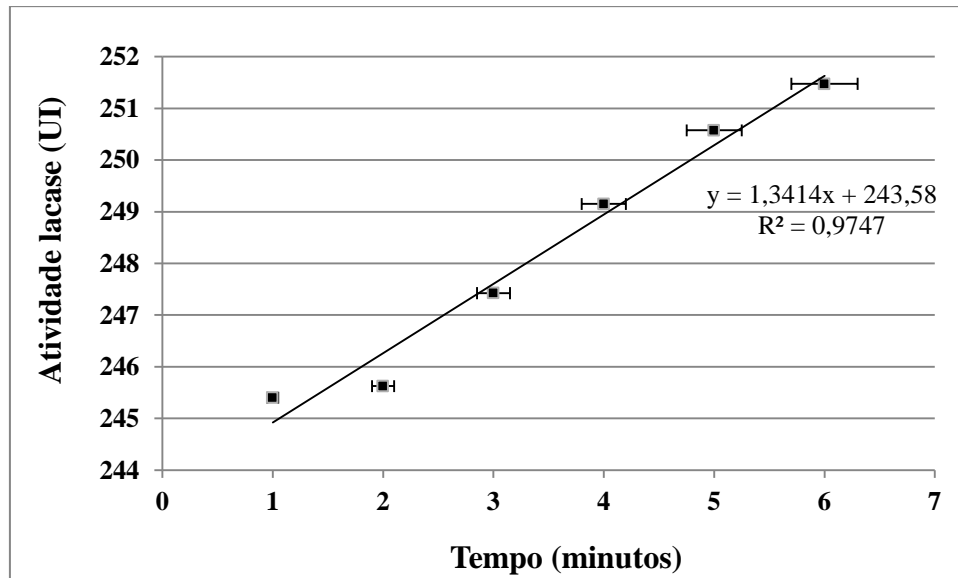


Figura 25. Atividade da enzima de extratos do dia 15 de crescimento do fungo *S. commune* utilizando-se ABTS como substrato.

Neste estudo, a utilização de CMC 1% e de fibras de bambu como suplementos das culturas incrementou a atividade das principais enzimas lignocelulolíticas, como as lacases. Porém, diferentes estudos têm demonstrado que o uso de indutores como o cobre são essenciais para a expressão da lacase (Cavallazzi *et al.*, 2005). As lacases são reguladas por metais como o cobre, que fazem parte da molécula em forma constitutiva por meio de íons (cofatores), em que cada um destes estaria associado a cadeias únicas polipeptídicas (Mouso *et al.*, 2003). Além disso, já se demonstrou que este elemento pode induzir a expressão de genes da enzima e modificar o processo transcricional em outros fungos, como *P. chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* e *Coriolopsis rigida* (Horton *et al.*, 2005).

11.4 Caracterização parcial das β -glicosidases

O efeito da temperatura foi avaliado na atividade das β -glicosidase, utilizando-se os substratos pN β G e 4MU β G, a melhor atividade da enzima observou-se entre 50 e 60° C, mostrando diferenças significativas entre as temperaturas utilizadas (Figura 26).

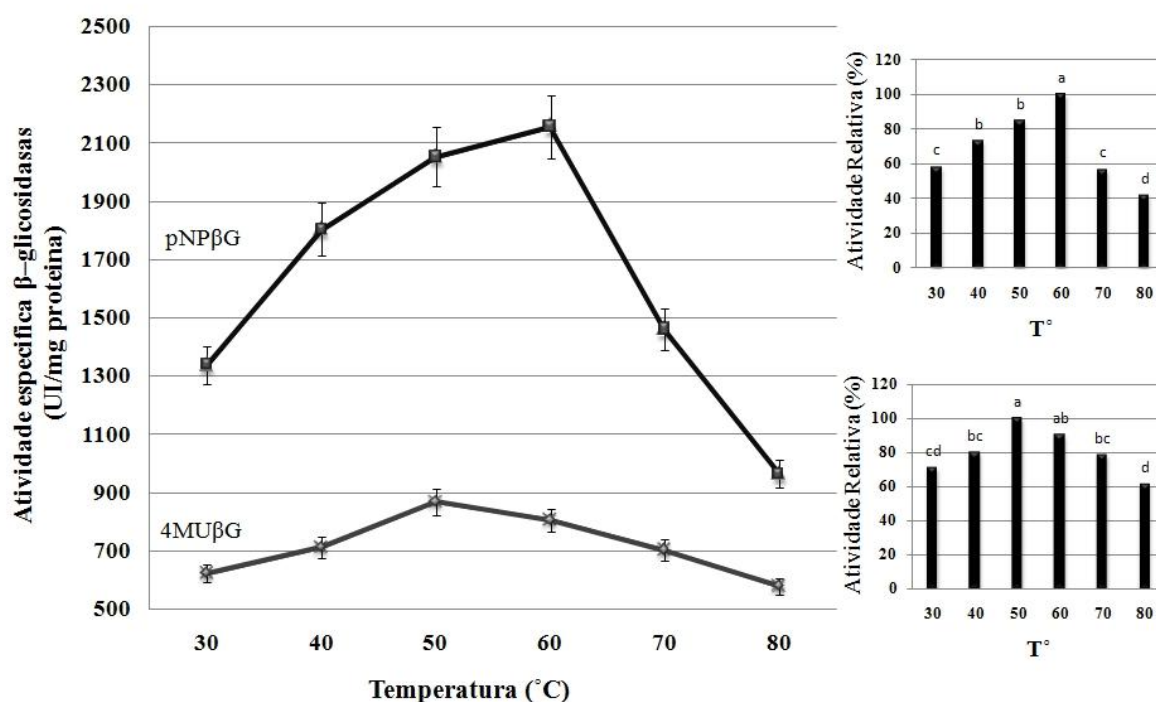


Figura 26. Atividade específica das β -glicosidasas de extratos do dia 15 de crescimento do fungo *S. commune*, utilizando-se os substratos pNP β G e 4MU β G. * Letras diferentes indicam diferenças significativas Tukey ($p < 0.05$).

Adicionalmente, a maior atividade enzimática foi observada a pH 7,0, empregando-se 4MU β G como substrato (Figura 27). Resultados semelhantes de efeito de pH e temperatura foram observados por Ghadamyari *et al.* (2010) e Clarke (1990), respectivamente.

Aparentes K_m e V_{max} para pNP β G foram 0.303 mM e 0.504 mmol/min/mg de proteína, respectivamente (Fig. 28). Da mesma forma, parâmetros cinéticos para esta enzima utilizando pNP β G como substrato foram reportados anteriormente, com K_m e V_{max} de 0,99 mM e 0,30 mmol/min/mg de proteína, respectivamente (Prokop, 1992; Ghadamyari *et al.*, 2010). É importante ressaltar que estes parâmetros são muito úteis para o desenvolvimento, a padronização e a implementação de ensaios enzimáticos durante processo de bioconversão de materiais lignocelulósicos (Moldes *et al.*, 2002).

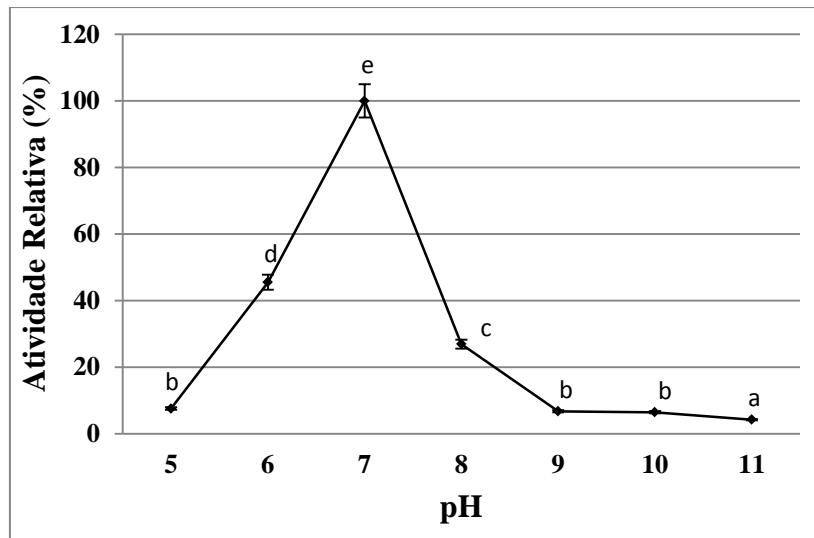


Figura 27. Efeito do pH na atividade de β -glicosidases de extratos do fungo *S. commune*. As barras representam o desvio padrão da media. As diferenças estatisticamente significativas para cada ensaio são indicadas por diferentes letras Tukey ($p \leq 0.05$).

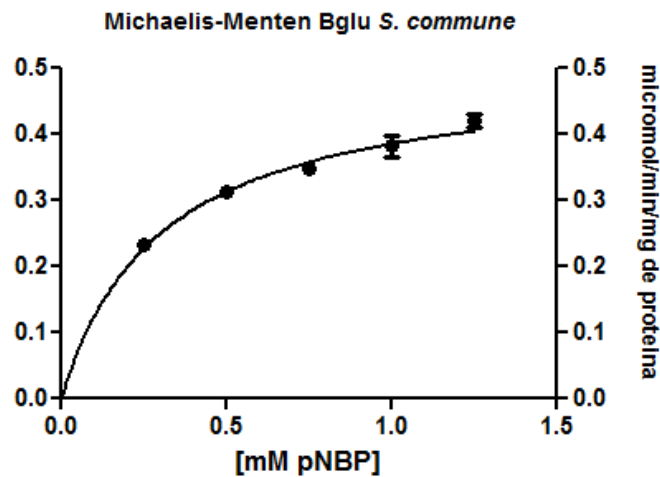


Figura 28. Curva de K_m e V_{max} para β -glicosidases de *S. commune*.

11.5 Western blot

Pelo menos três diferentes isoformas de β -glicosidases foram observadas entre 30 e 50 kDa, por meio da análise de Western blot (Figura 29). Esse resultado não corresponde ao valor de 95 kDa, que foi anteriormente reportado para uma isoforma semelhante desta enzima (Clarke, 1990). A diferença da massa molecular observada pode ser explicada pelo efeito da incorporação de diferentes fontes de carbono no meio de cultura celular. No entanto, é

importante mencionar que, com o emprego de anticorpos específicos nos ensaios de Western blot para detectar bandas de proteínas β -glicosidasas para essa família de enzimas, é possível obter moléculas com certo grau de homologia entre espécies diferentes, mas que não representam necessariamente o completo potencial do fungo, considerando-se que a composição do meio de cultura pode induzir a expressão de diferentes isoformas.

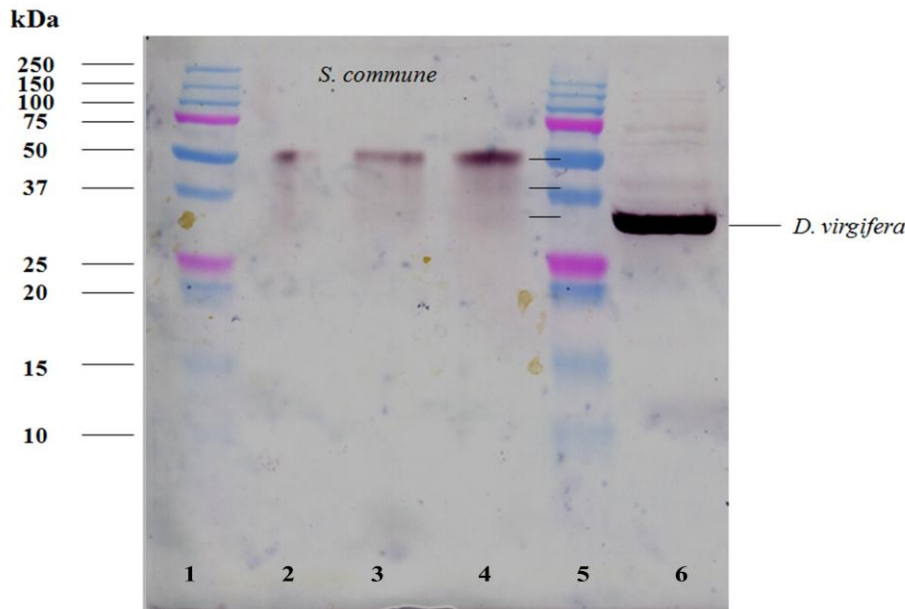


Figura 29. Identificação das β -glicosidasas em amostras de *S. commune* por meio de Western blot. Linhas 1 e 5: Marcador de massa molecular. Linhas 2 – 4: 1, 5 e 10 μ g de proteína. Linha 6: *Diabrotica virgifera*.

Além disso, a hidrólise de ligações β -glicosídicas de β -glicanos envolve enzimas com diferentes isoformas (Nuero, 1995), e todas estas isoformas provenientes de fungos basidiomicetos também são reguladas por fatores genéticos (Martínez *et al.*, 2004).

11.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Observou-se o mecanismo físico do fungo *S. commune* na degradação do tecido de bambu em fibras coletadas no campo e infectadas com o fungo, mas também em amostras pré-tratadas com os extratos enzimáticos. Além disso, observou-se estruturas do parênquima com a presença de imperfeições resultantes do corte abrasivo nas amostras provenientes do corte mecânico realizado sobre bambu jovem usado como controle. No entanto, pode-se observar a integridade das fibras não tratadas (Figs. 30A e B). As fibras de bambu imersas na solução enzimática resultante do crescimento do fungo durante 15 dias em meio líquido de

cultura têm aparência degradada e porosa em comparação com as fibras não tratadas. Observou-se claramente uma ruptura estrutural das fibras do bambu após o tratamento, processo atribuído à ação de enzimas presentes nos extratos (Figs. 30C e D; Andreus, 2008).

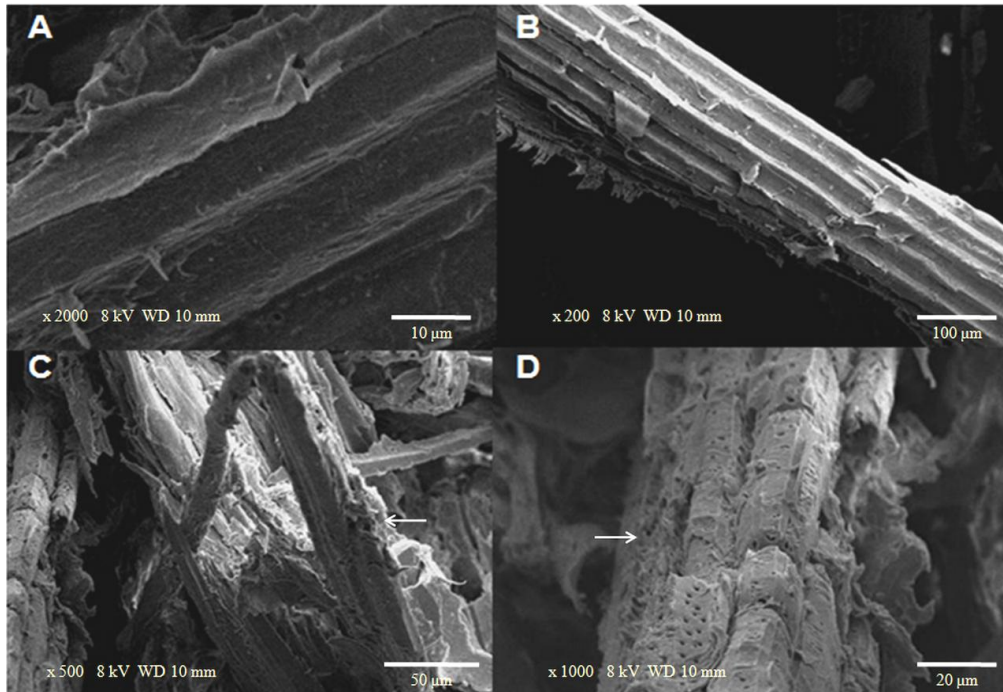


Figura 30. MEV visualização topográfica. A e B: fibras de bambu não tratadas. C e D: fibras de bambu tratadas com extratos enzimáticos durante 8 dias.

É importante ressaltar que a ação complementar de ambos, mecanismos físico e enzimático mediante a atividade celulase e xilanase, desempenham um papel fundamental na degradação de vários materiais lignocelulósicos, como observado em estudos anteriores (Haltrich e Steiner, 1994). Durante o processo infeccioso do fungo sobre este tipo de material, um dos fatores iniciais e determinantes é a disseminação dos esporos no meio ambiente por meio de fatores bióticos ou abióticos, uma vez que são depositados em um meio ou substrato adequado para o crescimento (como o bambu), processo que começa por adesão, germinação e penetração física e bioquímica dos tecidos vegetais por intermédio da massa micelial. Esse processo ocorre por meio da ativação de uma série de enzimas lignocelulolíticas em quantidades suficientes para iniciar o trabalho de degradação destes materiais lignocelulósicos, de acordo com a estrutura encontrada, com o suporte dos metabolismos primário e secundário (Fig. 31).

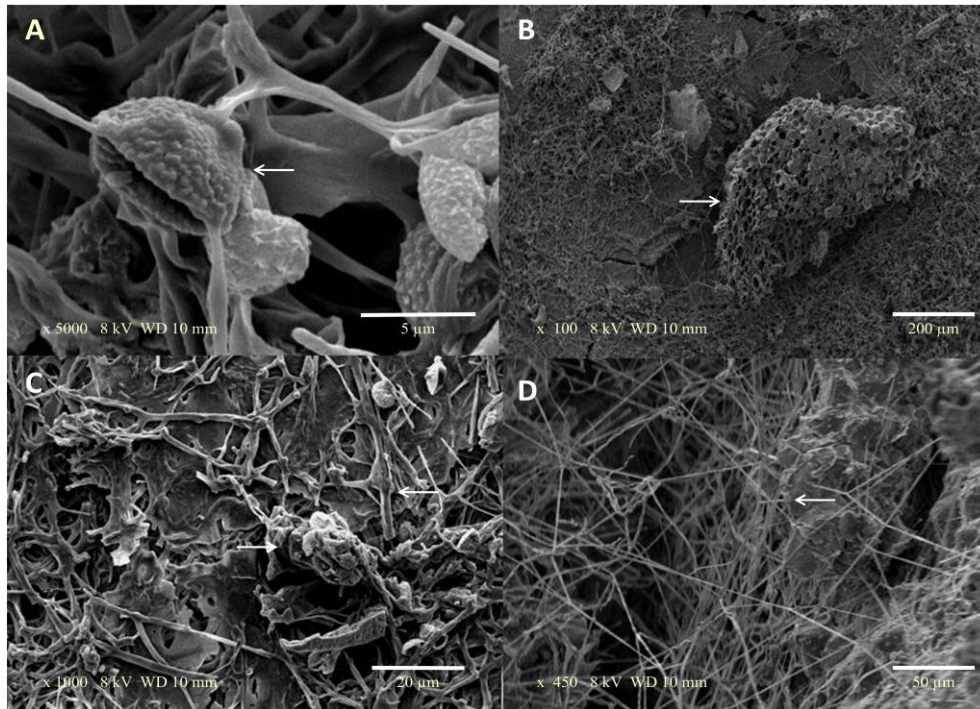


Figura 31. A: esporo germinado. B: corte infectado. C e D: distribuição micelial na planta.

É importante mencionar que a composição da espécie *G. angustifolia* corresponde a 51% de parênquima, 40% de fibra e 9% de tecidos condutores (Xiaobo, 2004). Estudos anteriores sobre caracterização química e morfológica foram iniciados na década de 70, a fim de se compreender os mecanismos físicos utilizados pelo *S. commune* durante o processo de infecção (Wessels *et al.*, 1972). Assim que o fungo penetra o tecido da planta, produz uma cobertura total de hifas nos tecidos, que é sempre facilitada pela ação sinérgica das enzimas digestivas (Kumari *et al.*, 2008). Isso permite ao fungo colonizar o parênquima, por meio de furos naturais localizados no interior da planta (Fig. 32B), gerando a ruptura das células do parênquima e tecidos parenquimáticos (Fig. 32C e D). O processo de infecção continua com a formação de corpos frutíferos, carpóforos típicos ao nível da estrutura do feixe vascular, como já foi descrito para *Schizophyllum* sp. (Horton *et al.*, 2005; Fig. 32A).

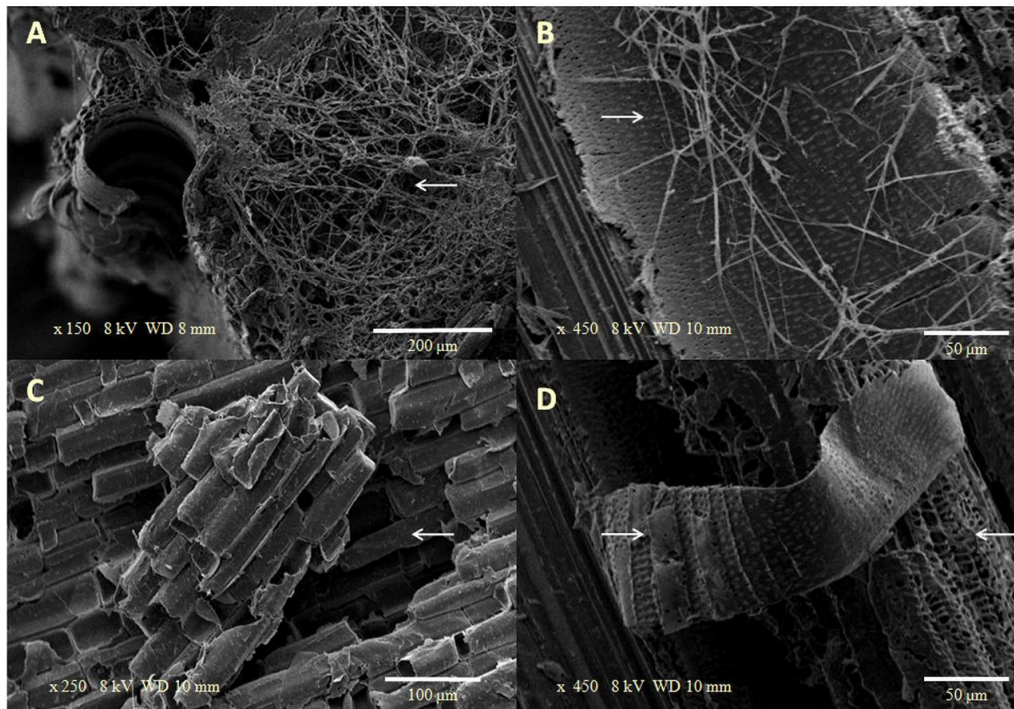


Figura 32. MEV visualização topográfica. A: carpóforo na fase inicial. B: infecção dos feixes vasculares. C e D: Ruptura das células do parênquima e do tecido parenquimático de bambu.

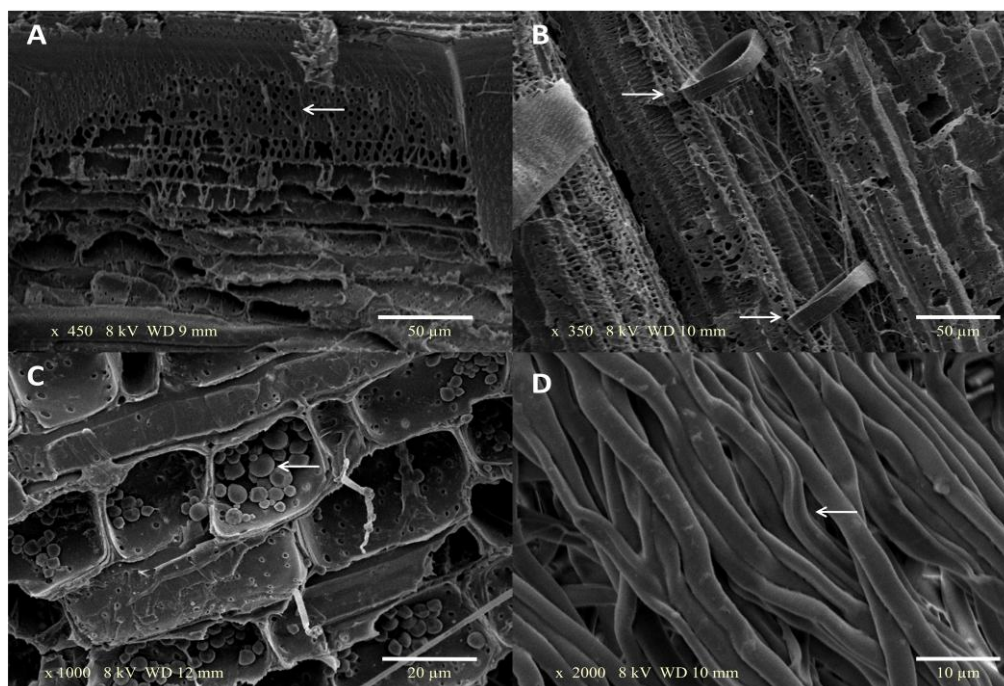


Figura 33. A: corte longitudinal do protoxilema com pontuações escalariformes. B: anéis de suporte do floema. C: basidiósporos no parênquima. D: corte longitudinal do carpóforo.

Ainda, outros autores têm estabelecido o processo completo que ocorre durante a infecção de fungos basidiomicetos (Hernández *et al.*, 1990). Após a colonização completa

das estruturas correspondentes às pontuações escalariformes da parede do parênquima (Fig. 33A), esta continua pelo protoxilema e degrada o material, a ponto de deixar visíveis apenas poucos anéis de suporte que fazem parte da estrutura dos tubos crivosos do floema, cujas estruturas têm sido amplamente descritas por Montiel (2006) para as diferentes variedades de bambu (Fig. 33B).

O processo infeccioso de fungos decompositores, como *Trametes versicolor* e *S. commune*, foi avaliado, detectado e discriminado em blocos de madeira infectada por meio de técnicas de microscopia de infravermelho (FITR; Naumann *et al.*, 2005). Neste caso, este tipo de microscopia (MEV) permitiu estudar as diferentes fases do processo de degradação e identificar as estruturas típicas do fungo nas amostras observadas, como esporos e formação inicial do carpóforo (Fig. 33C e 33D). A formação do corpo frutífero do fungo, que consiste de um pé muito pequeno na base do corpo e um chapéu em suas partes externas e corresponde a estruturas típicas de um basidiomiceto, depende das estruturas internas, que são formados por fibras fibuladas, hifas entrelaçadas e crescimentos paralelos (Wessels *et al.*, 1972; Fig. 33D). Este tipo de formação tem sido descrito por vários autores para o gênero *Schizophyllum* sp. (Horton *et al.*, 2005). Além disso, a caracterização completa da parede das hifas em *Armillaria mellea*, como um processo complementar aos processos infecciosos em basidiomicetos, mostrou estágios diferenciais na infecção (Hernández *et al.*, 1990). A diferenciação do corpo de frutificação nos primeiros estágios é induzida por fatores como luz, ventilação e prevalência de condições nutricionais (Raudaskoski e Vauras, 1982).

Apesar do fato de que existe uma formação e diferenciação precoce do himênio pelo fungo, a produção de basidiósporos é adiada por uma camada de mucilagem produzida, que cobre a superfície ventral da formação para o crescimento do carpóforo. Esta mucilagem também parece funcionar como fator dominante em algumas fases de crescimento e diferenciação (Raudaskoski e Vauras, 1982). Estudos recentes identificaram moléculas nestas excreções e demonstraram que alguns polissacarídeos têm importantes atividades biológicas, como efeitos antitumorais, imunomoduladores e anti-inflamatórios, pelas suas estruturas químicas e as conformações da cadeia (Yang e Zhang, 2009). Da mesma forma, foram identificadas moléculas como “Schizophyllan”, que tem importância biotecnológica (Kumari *et al.*, 2008).

Finalmente, o desenvolvimento do processo de decomposição varia de acordo com o micro-organismo envolvido e o material lignocelulósico atacado; contudo, existem muitas semelhanças. Os fungos da podridão penetram a madeira das árvores na forma de micélio ou basidiósporos, que germinam por meio de feridas, galhos mortos, ou de raízes danificadas.

Uma vez alterado o tecido por produtos químicos, bactérias, ascomicetos e/ou fungos imperfeitos, os basidiomicetos completam o processo digerindo e desintegrando os componentes da parede celular por meio da atividade de enzimas lignocelulolíticas. Fungos da podridão branca, espécies de fungos comestíveis como *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Bjerkandia adular*, *Chrysosporium pruinosa*, *Merulius tremellosus*, *Phanerochaete chrysosporium*, entre outros, são grandes produtores de enzimas lignocelulolíticas (Agrios, 1996; Andreaus, 2008).

Enzimas como as lacases permitem despolimerizar os compostos aromáticos e expor a hemicelulose e as cadeias de celulose para a ação de enzimas como xilanase, pectinase e avicelase, as quais liberam cadeias curtas, que são adequados para a ação enzimática das endoglicanases e glicanases (Siqueira *et al.*, 2010; Srinivasan *et al.*, 2005). No entanto, demonstrou-se que alguns isolados de linhagens endofíticas têm a capacidade de desenvolver nas plantas hospedeiras um processo de decomposição com padrões não seletivos semelhantes aos descritos acima (Oses *et al.*, 2006). O exato mecanismo subjacente dos padrões de decomposição observada em amostras de bambu infectadas ainda é incerto. É possível que os mecanismos de degradação em bambu, resultante do ataque de *S. commune*, dependam completamente da ação conjunta de processos físicos e enzimáticos para alcançar a degradação final das fibras desta planta.

CAPITULO 3. Caracterização parcial de enzimas digestivas de larvas de broca gigante da cana-de-açúcar *Telchin licus licus*.

12 Resumo do terceiro Capítulo

A fim de caracterizar a atividade das enzimas digestivas β -glicosidases e leucina-aminopeptidase (LAP) em larvas de *T. licus licus*, intestinos de larvas de último estágio foram embebidos em tampão adequado, homogeneizados, centrifugados e o sobrenadante utilizado para a determinação e caracterização parcial das enzimas. Adicionalmente usando indicadores, o pH do trato digestivo do inseto foi determinado. Os resultados mostram que o intestino da broca gigante da cana-de-açúcar possui um pH de 9,6 altamente alcalino consistente com o relatado na literatura. Além disso, para as β -glicosidases foram observados aparentes K_m e V_{max} para pN β G de 1.74 mM e 0,005 mmol/min/mg de proteína respectivamente, a melhor atividade da enzima foi obtida a pH entre 6,0 e 7,0 e temperatura entre 50 e 55 °C. Do mesmo modo, demonstrou-se o efeito de diferentes inibidores e ativadores da enzima, registrando para Mg^{2+} um incremento da atividade diretamente relacionado a concentração. Estudo com as LAPs foram identificadas 3 isoformas ativas e demonstrou-se a inibição completa da atividade da enzima utilizando bestatin 0,1 mM, foi determinado o efeito do pH sobre a atividade da enzima e finalmente a atividade específica comparada com outros insetos praga de importância econômica das ordens Lepidoptera e Coleoptera.

As LAPs são enzimas que atuam em processos chave da alimentação e desenvolvimento do inseto, por esta razão são consideradas alvos importantes na busca por alternativas de controle da praga procurando inibidores específicos ou estudando as interações com organismos controladores biológicos como *Bacillus thuringiensis*.

13 Materiais e Métodos

13.1 Insetos

Larvas de *T. licus licus* foram coletadas em campos agrícolas de cana-de-açúcar (*Sacharum officinarum* L.) da Região Nordeste do Brasil, Larvas de *H. hampei* foram coletadas de grãos infestados de café e enviados desde Minas gerais. Larvas de *Anthonomus grandis*, *S. frugiperda*, *Acanthoscelides obtectus* e *Zabrotes subfasciatus* foram fornecidas pela Plataforma de Criação de Insetos (PCI) do Prédio de Controle Biológico da Embrapa

Recursos Genéticos e Biotecnologia. As larvas de *T. licus licus* foram mantidas em fragmentos de colmo de cana-de-açúcar e acondicionadas em câmara de crescimento.

13.2 Reagentes

Os substratos L-leucil-2-naftilamida e pN β G assim como o cromóforo *Fast Black K*, os diferentes sais de cloreto, indicadores de pH e o inibidor bestatin foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

13.3 Determinação do pH do trato digestivo da broca gigante

O pH do intestino da broca gigante da cana-de-açúcar *T. licus licus* foi determinada por uma modificação da metodologia relatada por Valencia *et al.* (2000). Os seguintes indicadores de pH: amarelo de dimetilo, vermelho do congo, azul de bromofenol, laranja de metilo, verde de bromocresol, vermelho de metilo, púrpura de bromocresol, azul de bromotimol, vermelho de fenol, vermelho de cresol e azul de timol, foram adicionados a uma dieta líquida na concentração de 0,1% (m/v) e a solução usada para impregnar algodões para alimentar as larvas. Posteriormente, estas foram mantidas em condições ideais em câmara de crescimento por 24 horas. As larvas foram observadas em lupa estereoscópica para registrar a viragem da cor dos indicadores no intestino. Finalmente, os intestinos foram removidos para confirmar a cor e o pH estimado de acordo com a sobreposição dos valores dos indicadores.

13.4 Obtenção dos extratos intestinais

Para a caracterização das enzimas digestivas de *T. licus licus*, tratos intestinais foram removidos de larvas e colocados em tampão fosfato pH 7,0. Os intestinos foram homogeneizados e então, centrifugados a 10.000xg durante 30 minutos. O sobrenadante foi guardado a -80 °C até o uso. A concentração de proteínas nos extratos intestinais foi medida de acordo como método de Bradford (1976). A albumina de soro bovino foi usada como padrão.

13.5 Ensaio de atividade e inibição de leucina-aminopeptidase (LAP)

De acordo com a metodologia proposta por Valencia (2009), a atividade de LAP foi medida com o substrato sintético L-leucil-2-naftilamida. Para o ensaio enzimático, o substrato sintético e o cromóforo *Fast Black K* foram diluídos em tampão fosfato 100 mM, pH 7,0, contendo 0,5 mM de MgCl₂. Inicialmente foram misturados 200 μ L de tampão fosfato 100 mM, pH 7,0 e 5 μ L de extrato intestinal e pré-incubados a 36° C durante 15 minutos, depois dos quais foram adicionados 5 μ L de *Fast Black K* 24 mM. As reações foram iniciadas pela adição de 5 μ L do substrato sintético L-leucil-2-naftilamida 14 mM e levado

para incubação a 36° C durante 5 minutos, no escuro. Uma unidade de atividade da enzima (UI) foi definida como sendo o incremento de 0,01 na absorbância a 590 nm. Para a medição de absorbância, foi utilizado um espectrofotômetro Unicam UV2. Cada ensaio enzimático foi feito em triplicata e as médias das atividades observadas são apresentadas. A inibição da atividade da enzima LAP foi determinada mediante a pré-incubação da enzima com bestatin 0,1 mM e um produto comercial (Inseticida biológico) durante 15 minutos a 36° C, em tampão de atividade (pH 7,0). Os resultados foram comparados com os obtidos nos ensaios de atividade da enzima na ausência dos inibidores.

13.6 Ensaio de atividade de β -glicosidases

A atividade da β -glicosidase foi determinada pela pré-incubação de 5 μ L de solução de enzima a partir de extratos intestinais de *T. licus licus* com 200 μ L de tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) a 37° C durante 15 min. Posteriormente, a reação foi iniciada com 5 μ L de pN β G (25 mM) e incubada a 37° C durante 30 min. A reação foi interrompida 50 μ L de carbonato de sódio (1M), a absorbância foi lida a 405 nm. A atividade foi determinada pela comparação com uma curva-padrão de p-nitrofenil. Os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicata e a atividade foi expressa em micromoles de produto liberado por minuto por miligrama de proteína (μ mol/min/mg).

13.7 Efeito de ativadores e inibidores na atividade de β -glicosidases

Para avaliar o efeito de diferentes íons na atividade das β -glicosidases de *T. licus licus*, os ensaios enzimáticos partindo de extratos de *T. licus licus* foram realizados na presença de diferentes concentrações de sais de cloreto de Na⁺ (5, 10, 20 e 40 mmol/L), K⁺ (5, 10, 20 e 40 mM), Ca²⁺ (5, 10, 20 e 40 mM), Mg²⁺ (5, 10, 20 e 40 mM), e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA; 0,5, 1, 2 e 4 mM), sódio dodecilsulfato (SDS; 2, 4, 6 e 8 mM) e uréia (2, 4, 6 e 8 M). Estes compostos foram adicionados à mistura de ensaio, e a atividade foi medida após 30 minutos de incubação. Um controle foi realizado sem adição dos compostos. Para calcular a atividade relativa final. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

13.8 Efeito de pH, temperatura e parâmetros cinéticos das enzimas

O efeito do pH determinou-se por meio de pré-incubação das enzimas β -glicosidases e LAP durante 15 min, a 37° C, em tampão: Citrato de sódio 50 mM (pH 3-5), 50 mM succinato (pH 6), fosfato de sódio 50 mM (pH 7,12), 50 mM Tris-HCl (pH 8-9) e 50 mM de glicina (pH 10-12). Adicionalmente, para as β -glicosidases, o efeito da temperatura foi

analisado nas condições acima descritas, variando a temperatura de 30 a 80° C, com 15 min de pré-incubação. Da mesma forma, concentrações de substratos finais foram variadas e a constante de Michaelis-Menten (K_m) como a velocidade máxima (V_{max}) foram estimadas mediante a análise de regressão não linear, utilizando-se o *software Prism (software Graphpad, versão 5)*

13.9 Separação eletroforética e detecção da atividade LAP em géis nativos e de focalização isoeétrica (IEF)

As proteínas extraídas dos intestinos de *T. licus licus* foram separadas por eletroforese géis 10% homogêneos (Equipamento Miniprotean), Phastsystem (Phastgel 12.5%) e géis de focalização isoeétrica (Phastgel IEF 3-9). Os zimogramas foram obtidos por meio da incubação dos géis de eletroforese em uma solução de tampão fosfato 100 mM, pH 7,0, contendo 0,5 mM de $MgCl_2$ e uma concentração final de *Fast Black K* 24 mM e L-leucil-2-naftilamida 14 mM a 36° C, durante 30 min, no escuro. Este tratamento revelou bandas de cor azul intenso em um fundo alaranjando claro. Os géis foram lavados para remover o excesso da solução inicial e finalmente foram fotografados. Os pontos isoeétricos foram calculados usando-se proteínas padrão com pontos isoeétricos conhecidos e o software ImageMaster VDS.

13.10 Análise estatística

Os dados foram comparados por meio da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$, utilizando-se o programa SigmaStat 2,03 para Windows (SPSS Inc., EUA).

14 Resultados e Discussão

14.1 Determinação do pH do trato digestivo da broca gigante

As larvas de broca gigante da cana-de-açúcar alimentadas com a solução da dieta no algodão e mantidas em câmara de crescimento não mostraram aparente efeito negativo ou mortalidade quando comparadas com o controle (dieta sem indicador). No entanto, observou-se uma apropriada solubilização nos tratos digestivos dos diferentes indicadores usados. Após a análise em lupa estereoscópica tanto das larvas como dos tratos removidos, registrou-se os valores de pH em função da cor de viragem dos indicadores. A comparação final dos intervalos de pH permitiu estimar o pH do trato digestivo entre 9,6 e 10,1 (Fig. 34).

Geralmente, boa parte do floema das plantas mostra um valor de pH entre neutro (7,2) a ligeiramente alcalina (8,5), isto não é consistente com o valor de pH estimado para *T. licus*

licus (9,6 - 10,1). Nossos resultados são consistentes com o valor de pH 9,6 relatado para o trato digestivo de *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) e contrastante com os valores relatados para broca do café (Coleoptera: Scolytidae) de 4,2 a 5,6 (Valencia *et al.*, 2000). Ao mesmo tempo, os maiores valores de pH do trato digestivo em lepidópteros têm sido atribuídos a uma adaptação dos ancestrais para a extração eficiente de hemicelulose da parede celular das plantas (Chougule *et al.*, 2008).

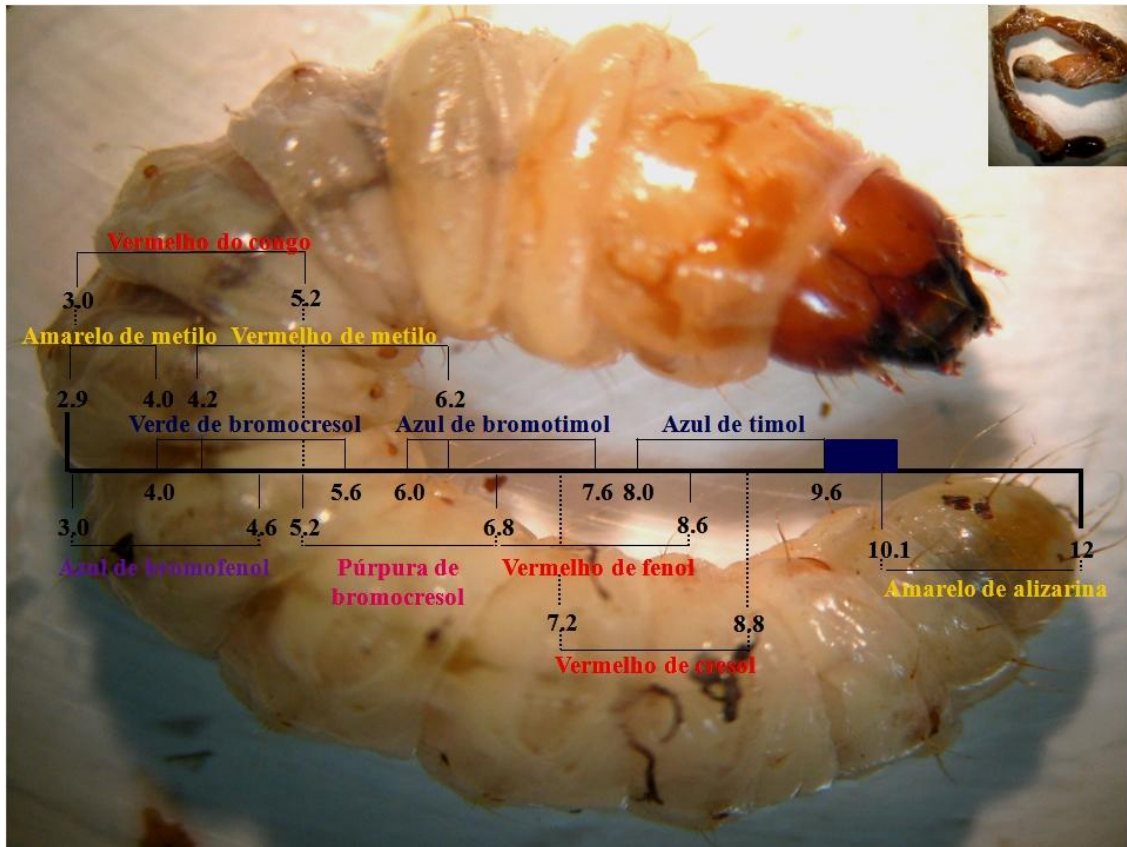


Figura 34. Determinação do pH do trato digestivo da broca gigante da cana-de-açúcar *T. licus*. As cores dos nomes indicam a cor observada na viragem dos indicadores.

14.2 Caracterização parcial das β -glicosidases de broca gigante da cana-de-açúcar

As β -glicosidases catalisam a hidrólise da extremidade de oligossacarídeos de ligações β -1,4. Além disso, a ocorrência de diferente especificidade destas enzimas nas ordens dos insetos pode ser uma adaptação evolutiva dos ancestrais as dietas de plantas contendo glicosídeos (Ferreira *et al.*, 1998). A participação deste tipo de enzimas digestivas é muito importante para os insetos no processo final de degradação dos carboidratos (Zibae *et al.*, 2009). Tendo a cana-de-açúcar um alto conteúdo de di e oligossacarídeos a partir da composição de hemicelulose e celulose (Tabela 13), é possível concluir sobre a importância

desta enzima para o desenvolvimento dos diferentes estágios da broca gigante da cana-de-açúcar na planta. Por este motivo, a enzima foi selecionada para conduzir os ensaios de caracterização parcial. Os resultados mostram aparentes K_m e V_{max} para pN β G de 1.74 mM e 0.005 mmol/min/mg de proteína, respectivamente (Figura 35). Da mesma forma, outros parâmetros cinéticos da enzima utilizando pN β G como substrato foram reportados anteriormente, com K_m e V_{max} de 0,99 mM e 0,30 μ mol/min/mg de proteína, respectivamente, para o Lepidoptera *Glyphodes pyloalis* (Ghadamyari *et al.*, 2010). E, um valor de K_m de 0,32 mM foi encontrado para a Lepidoptera *S. frugiperda* (Marana *et al.*, 2000).

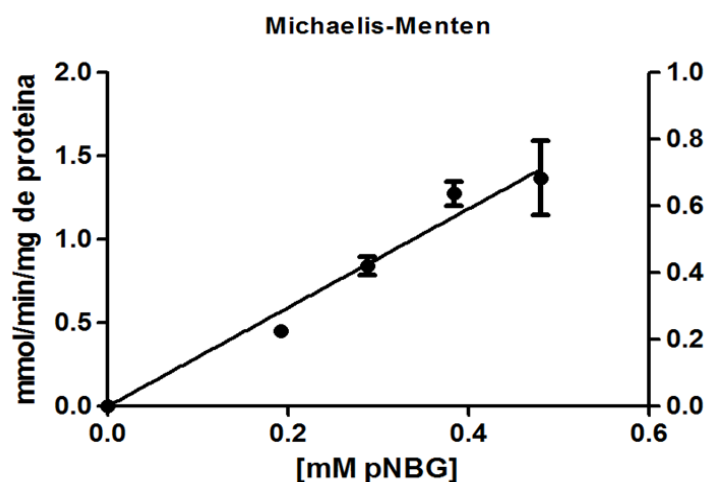


Figura 35. Curva de K_m e V_{max} para β -glicosidases da broca gigante da cana-de-açúcar

Adicionalmente, o pH e a temperatura da atividade da enzima foram determinados e os resultados estão nas figuras 36 e 37.

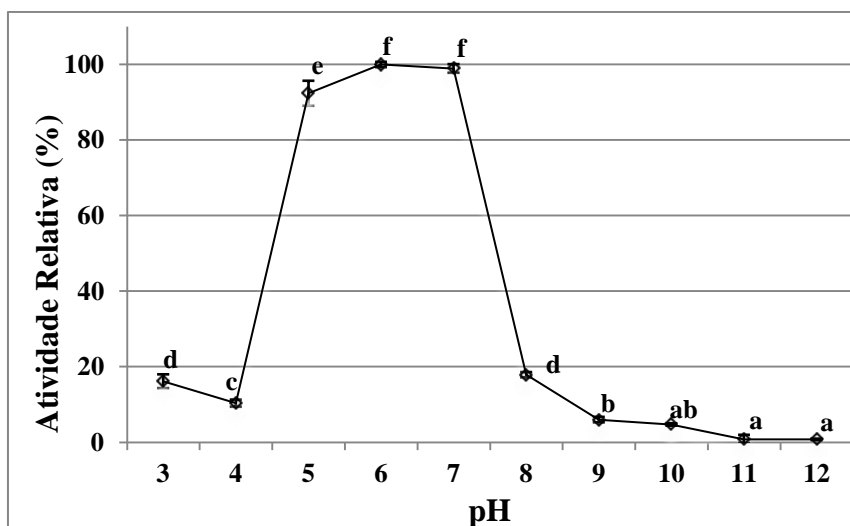


Figura 36. Efeito do pH na atividade de β -glicosidases da broca gigante da cana-de-açúcar *T. licus licus*. As barras representam o desvio padrão da media. As diferenças estatisticamente significativas para cada ensaio são indicadas por diferentes letras Tukey ($p \leq 0.05$).

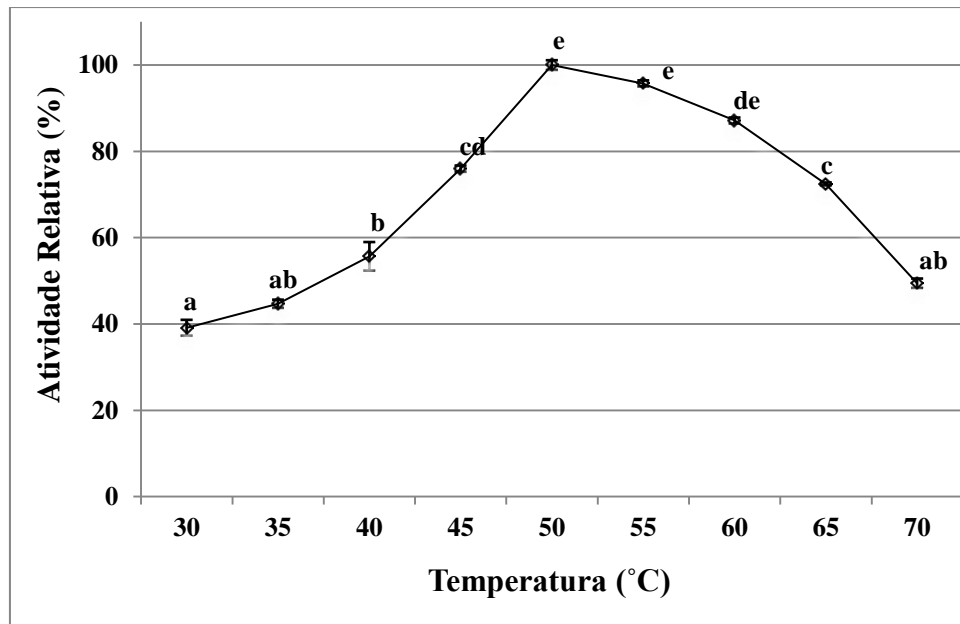


Figura 37. Efeito da temperatura na atividade de β -glicosidases da broca gigante da cana-de-açúcar *T. licus*. As barras representam o desvio padrão da média. As diferenças estatisticamente significativas para cada ensaio são indicadas por diferentes letras Tukey ($p \leq 0.05$).

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os valores de pH 6,0 e 7,0 (Fig. 36), valores nos quais observou-se a maior atividade da enzima. A maioria das enzimas digestivas de insetos lepidópteros possuem atividades ótimas em torno de valores de pH entre 6,5 e 8,5 (Chougule *et al.*, 2008) como registrado neste trabalho tanto para *Telchin licus licus* como para *S. commune*. Entretanto tem-se reportado para β -glicosidases um pH ótimo entre 8,0 e 12,0 e temperaturas ótimas entre 20 e 50° C, especialmente em insetos lepidópteros (Zibae *et al.*, 2009). Além disso, houve diferenças estatisticamente significativas entre as temperaturas avaliadas, mas não houve diferença entre 50 e 55° C, sendo estas as temperaturas de maior atividade da enzima e consistente com o relatado na literatura (Fig. 37; Mehrabadi *et al.*, 2009). Também, observou-se termo-estabilidade da enzima mostrando atividade residual de 50% a 70° C. Tais características permitiriam aplicações potenciais em diferentes processos biotecnológicos de bioconversão em altas temperaturas (Moldes *et al.*, 2002).

Do mesmo modo, na determinação do efeito de ativadores e inibidores sobre atividade da enzima registrou-se o maior incremento nos níveis de atividade na presença de $MgCl_2$ e $CaCl_2$ mostrando para Mg^{+} uma correlação diretamente proporcional entre concentração e atividade, com valores de até o dobro do controle (Fig. 38), em contraste com o observado em outros estudos que não mostram efeitos significativos de $MgCl_2$ e $CaCl_2$ com lepidópteros

(Yapi *et al.*, 2009; Ghadamyari *et al.*, 2010). Nenhum efeito considerável na presença de NaCl, KCl e EDTA foi registrado. Porém, foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os tratamentos NaCl 20 mM, KCl 20 mM e EDTA 0,5 mM em relação ao controle. Adicionalmente, observou-se uma drástica diminuição da atividade com SDS e Ureia (Fig. 39).

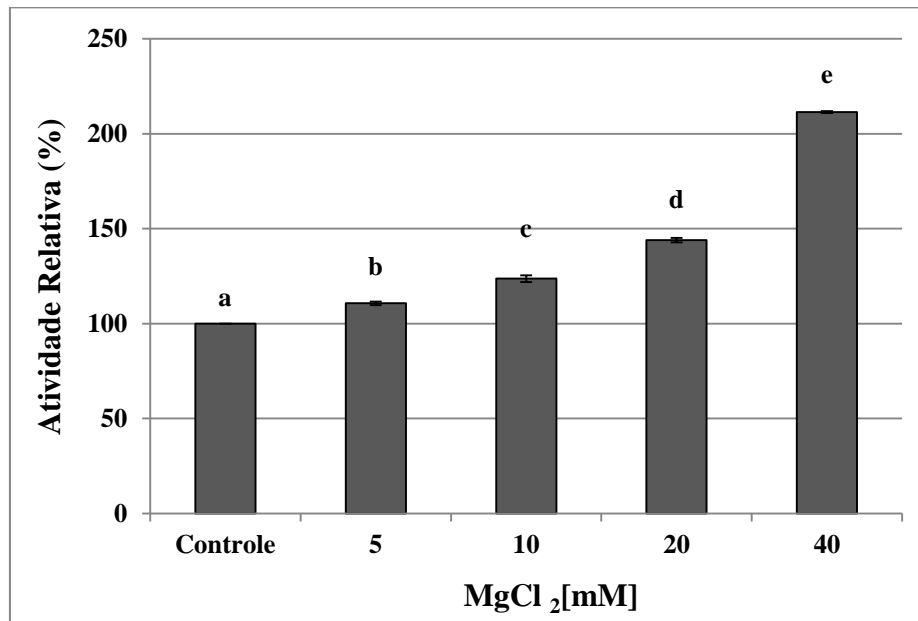


Figura 38. Atividade relativa de β -glicosidases de *T. licus licus* na presença de diferentes concentrações de $MgCl_2$. As barras representam o desvio padrão da média. As diferenças estatisticamente significativas para cada ensaio são indicadas por diferentes letras Tukey ($p \leq 0.05$).

Tem sido demonstrado que as glucosidases são metaloproteínas que requerem cálcio para a sua máxima atividade em diferentes fontes, incluindo insetos, e que os íons como Mg^{2+} atuam como cofatores que lhes permite estabilidade em valores de pH e temperatura extremos (Baker, 1983). Do mesmo modo, recentes estudos confirmam o efeito inibitório dos compostos SDS e Ureia sobre as β -glicosidases de insetos (Ghadamyari *et al.*, 2010; Zibae *et al.*, 2009) devido ao fato que as enzimas demonstram especial sensibilidade a estes tipos de compostos (Terra *et al.*, 1996). O estudo das enzimas digestivas, neste caso de enzimas de grande importância para os insetos-praga constitui um interessante aspecto para o desenvolvimento de estratégias de controle úteis e seguras (Zibae *et al.*, 2009).

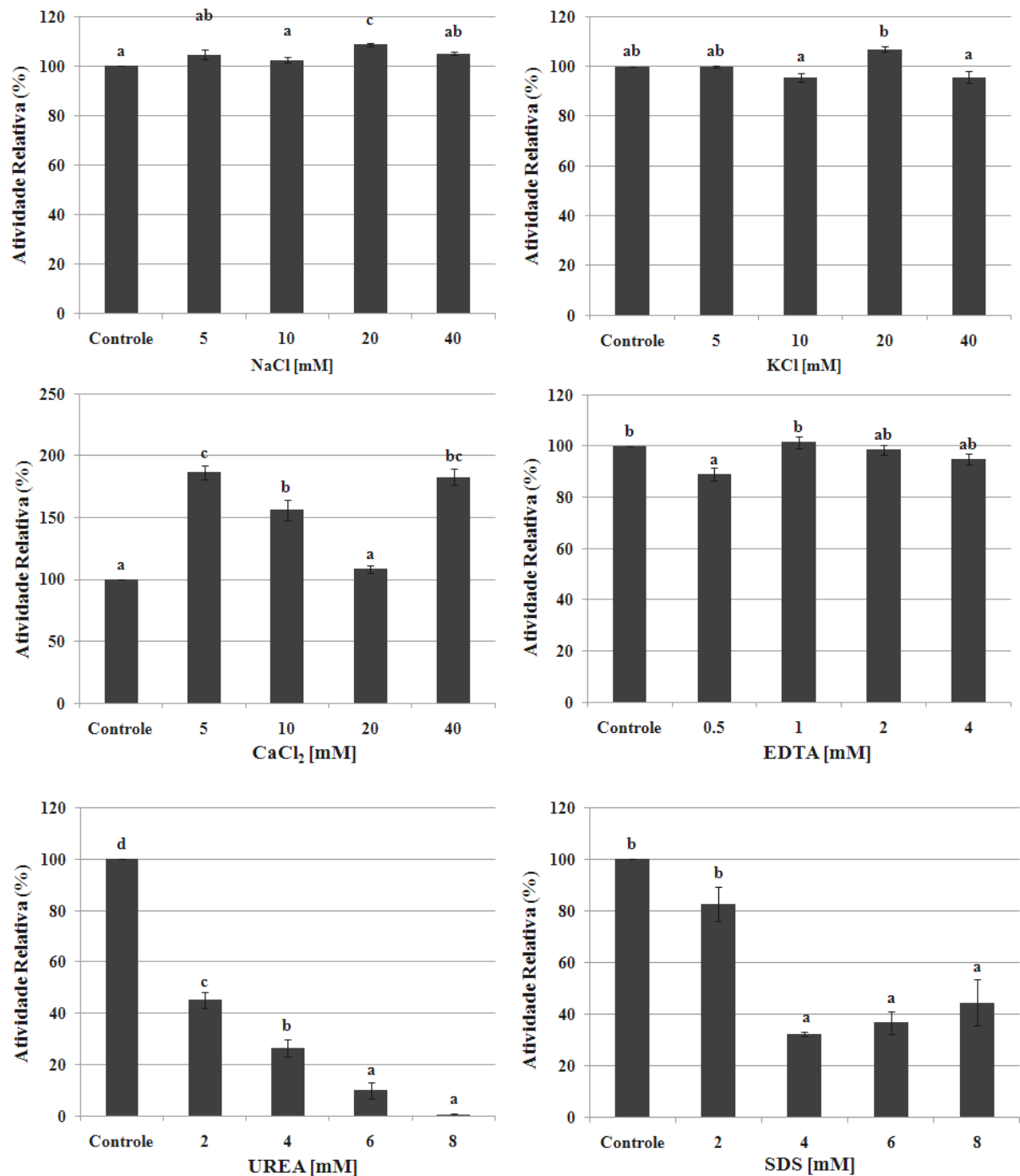


Figura 39. Atividade relativa de β -glicosidases de *Telchin licus licus* na presença de diferentes concentrações de NaCl, KCl, CaCl₂, EDTA, Ureia e SDS. As barras representam o desvio padrão da média. As diferenças estatisticamente significativas para cada ensaio são indicadas por diferentes letras Tukey ($p \leq 0.05$).

14.3 Caracterização parcial da atividade leucina-aminopeptidase (LAP) de *T. licus licus*

Leucina-aminopeptidase (LAP) é uma exopeptidase amplamente distribuída, presente em animais, plantas, insetos e bactérias com diversas funções fisiológicas que incluem

regulação das vias metabólicas, controle do ciclo celular e degradação seletiva de proteínas (Taylor, 1993). Estas catalisam a hidrólise de aminoácidos a partir das extremidades terminais das cadeias polipeptídicas, hidrolisam substratos tipo leucil, amidas de aminoácidos, alquilamidas, arilamidas, hidrazidas e também têm alguma atividade esterase (Delange, 1971). No estudo da atividade específica de LAP de diferentes insetos praga de importância econômica, observou-se a maior atividade da enzima para *H. hampei* e *T. licus* assim como menor atividade para o bicudo do algodoeiro *A. grandis* (Fig. 40). No geral, as aminopeptidases são responsáveis pela hidrólise adicional dos polipeptídeos, produtos da clivagem das endopeptidases nos sistemas digestivos de artrópodes (Billingsley, 1990) e insetos (Božić *et al.*, 2008).

Adicionalmente, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os pHs testados, demonstrando que o tampão fosfato 7,0 é o valor de pH de melhor atividade para esta enzima (Fig. 41). Estes resultados são similares aos relatados tanto para espécies de Coleoptera (Božić *et al.*, 2008) como de Lepidoptera (Lee e Anstee, 1995).

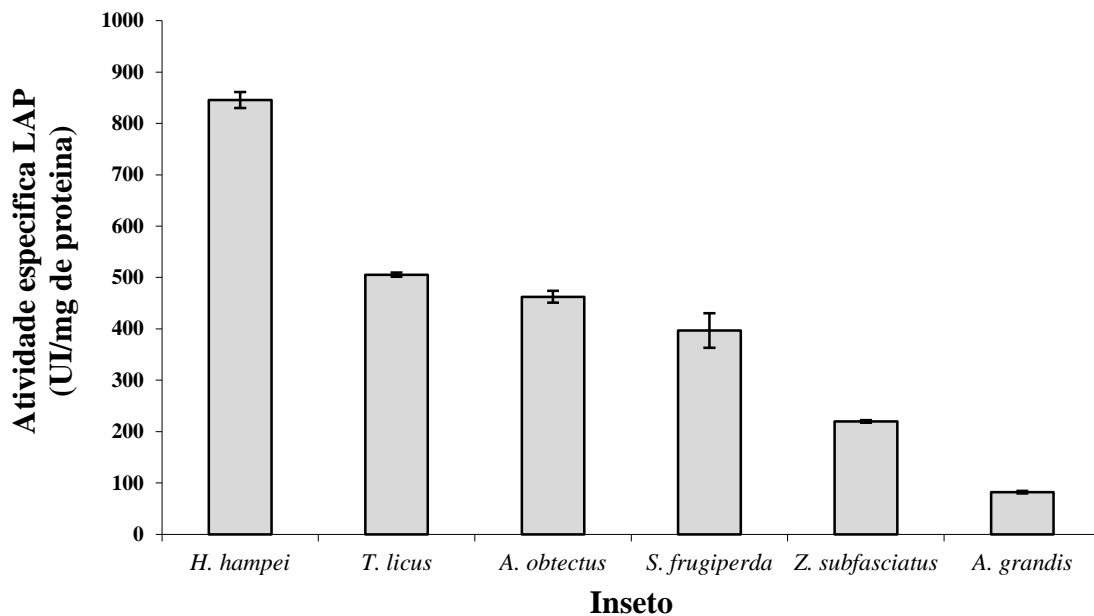


Figura 40. Atividade específica de LAP de diferentes insetos praga.

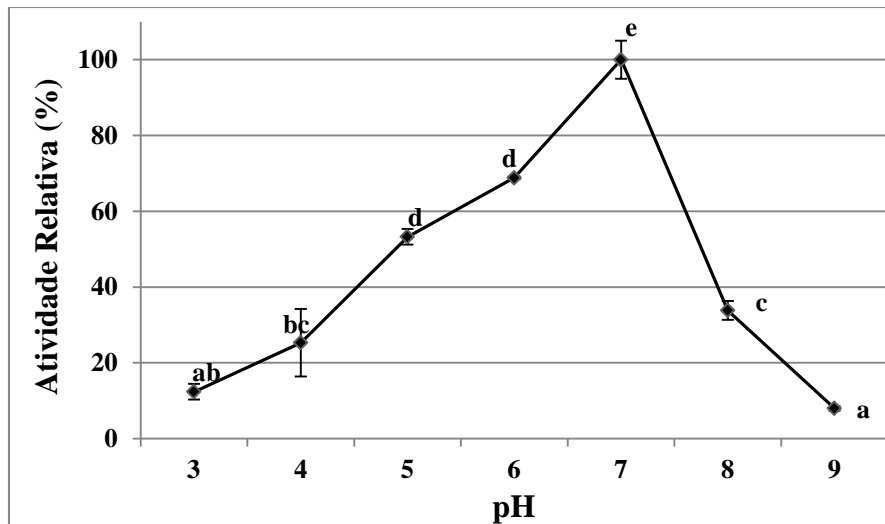


Figura 41. Efeito do pH na atividade de Leucina-aminopeptidase da broca gigante da cana-de-açúcar *T. licus licus*. As barras representam o desvio padrão da média. As diferenças estatisticamente significativas para cada ensaio são indicadas por diferentes letras Tukey ($p \leq 0.05$).

Visando à detecção de possíveis isoformas da enzima LAP, as proteínas do trato digestivo de larvas de *T. licus licus* e *A. grandis* foram separadas na forma nativa pela massa molecular e pelo ponto isoelétrico para detecção da atividade biológica no gel. Foram observadas duas isoformas de *T. licus licus* e pelo menos 5 isoformas nas amostras de bicudo do algodoeiro *A. grandis* (Fig. 42).

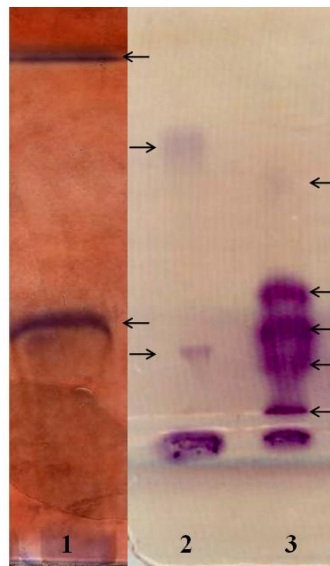


Figura 42. Separação eletroforética e detecção da atividade Leucina-aminopeptidase (LAP) em géis nativos. Gel 10% corrido no sistema miniprotean IV BioRad. Linha 1. *T. licus licus*. Linha 2 e 3. Proteínas dos insetos *T. licus licus* e *A. grandis* separadas em gel Phastgel 12,5%.

É importante salientar que ao observar os zimogramas, aparentemente *A. grandis* possui maior atividade LAP e um maior número de isoformas da enzima. Porém, o resultado da atividade específica para broca gigante da cana-de-açúcar demonstra que este é 10 vezes maior que atividade observada em *A. grandis* (Fig. 40). Do mesmo modo, 2 isoformas foram observadas nos zimogramas realizados a partir da separação eletroforética nativa para *T. licus licus*, enquanto que a separação por ponto isoelétrico mostrou 3 bandas de atividade com valores aproximados pI de 6,6, 6,8 e 7,6. Ao contrario, para *A. grandis* observou-se 5 bandas de atividade na separação nativa e somente 2 isoformas na focalização isoelétrica com valores de pI de 6,75 e 7,82 aproximadamente (Fig. 43). As isoformas podem apresentar igual massa molecular e diferente pI ou vice-versa.

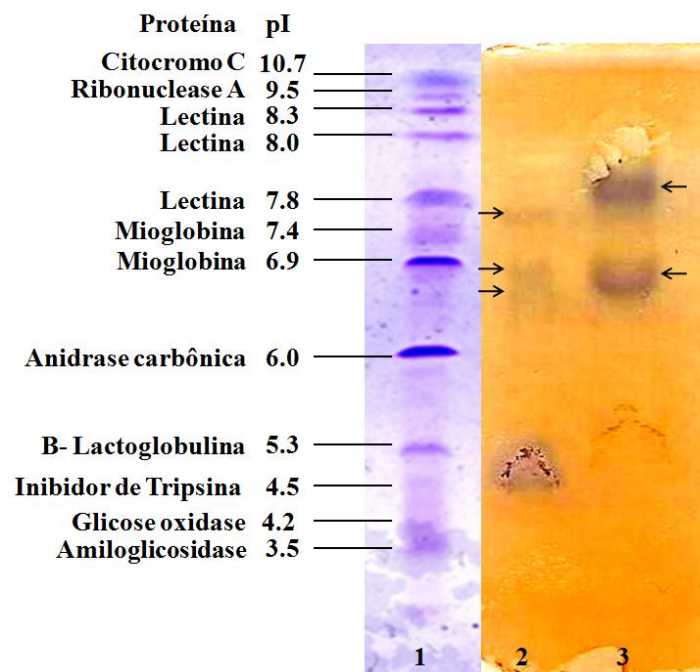


Figura 43. Separação eletroforética e detecção da atividade Leucina-aminopeptidase (LAP) em géis de focalização isoelétrica (IEF, 3 - 9). Linha 1. Marcador de ponto isoelétrico. Linha 2. Broca gigante da cana-de-açúcar *T. licus licus*. Linha 3. Bicudo do algodoeiro *A. grandis*.

14.4 Inibição da leucina-aminopeptidase de *T. licus licus*

Durante a evolução, insetos fitófagos tem se adaptado a diversos nichos tróficos devido ao fato que os diferentes órgãos da planta diferem não apenas no conteúdo e a qualidade dos nutrientes, mas também na quantidade de metabólitos secundários que agem como inibidores da enzima em resposta ao ataque do inseto (Carlini e Grossi de Sá, 2002). Com o objetivo de caracterizar e testar a sensibilidade das LAPs provenientes dos tratos digestivos da broca gigante da cana-de-acucar, a atividade da enzima foi testada na presença do inibidor

comercial bestatin, um inibidor específico para aminopeptidases. Os resultados mostram a completa inibição da atividade específica da enzima na presença de bestatin 0,1 mM a 36° C em tampão de atividade pH 7,0 (Fig. 44).

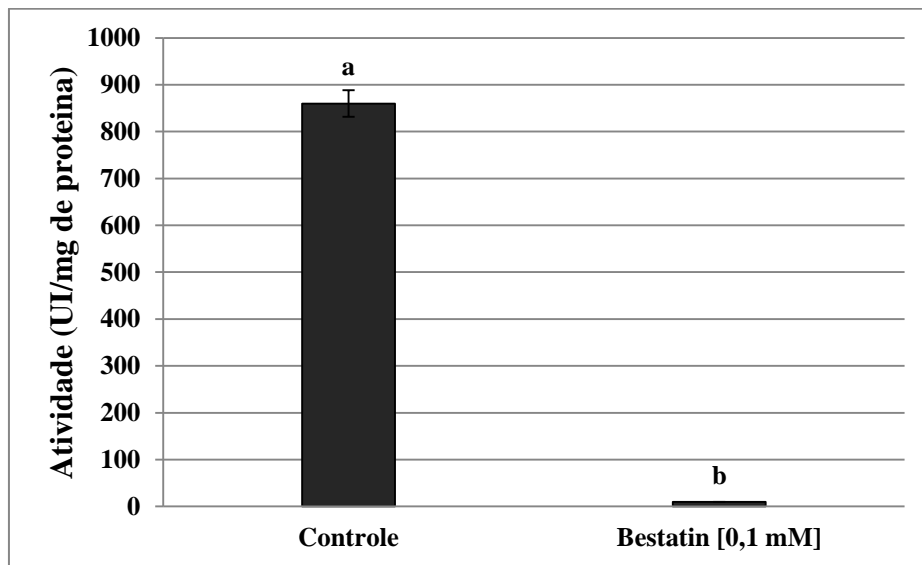


Figura 44. Atividade específica de LAP da broca gigante da cana-de-açúcar *T. licus licus* na presença do inibidor específico bestatin.

Além disso, a presença de aminopeptidases em diferentes tecidos durante as diferentes fases de desenvolvimento dos organismos demonstra a participação da enzima no metabolismo de regulação dos níveis de aminoácidos e pequenos peptídeos na hemolinfa, assim como importantes processos de anabolismo protéico e manutenção de estabilidade osmótica (Del-Lama *et al.*, 2001). Ainda, em diversas pragas, as aminopeptidases ligadas à membrana fazem parte do mecanismo receptor que se liga ao inseticida δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* (Nakanishi *et al.*, 2002). Estudos preliminares de ligação das LAPs de *T. licus licus* foram realizados neste trabalho a fim de estabelecer o envolvimento da enzima como receptor de toxinas cry, usando produto comercial de *B. thuringiensis* (Figura 45).

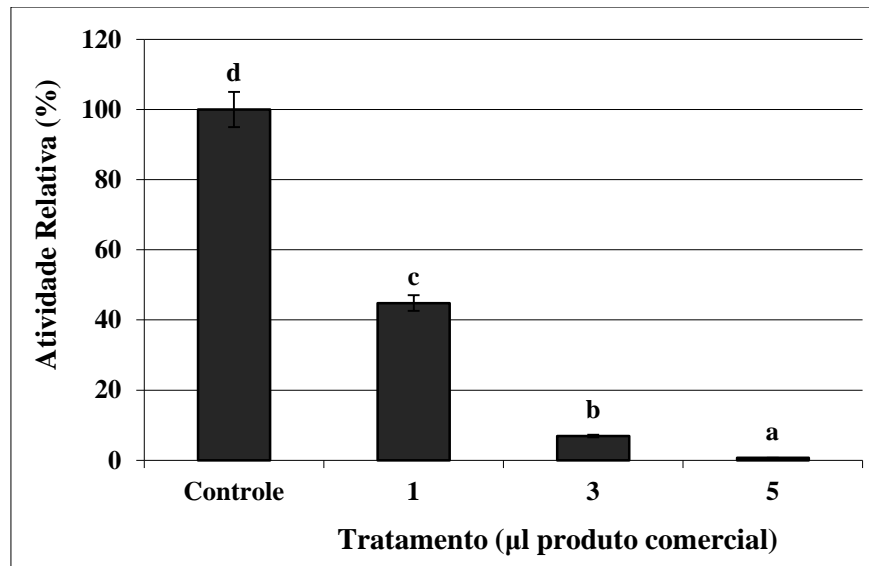


Figura 45. Atividade relativa de LAPs da broca gigante da cana-de-açúcar *T. licus licus* na presença do produto comercial.

Observou-se diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes volumes utilizados do produto comercial de Bt e o controle, demonstrando uma correlação diretamente proporcional entre o volume do produto e atividade da enzima, isto demonstra a efetiva ligação da enzima e a toxina. As toxinas de Bt possuem a habilidade de ligar-se a regiões específicas de aminopeptidases (Nakanishi *et al.*, 2002). A busca por moléculas promissoras e inibidores de importantes enzimas digestivas como LAPs envolvidas em processos de importância biotecnológica permitirá complementar os trabalhos de bioprospecção visando o controle do inseto praga (Craveiro *et al.*, 2010)

15 CONCLUSÃO FINAL

Pesquisas com fungos como fontes de metabólitos, enzimas, toxinas e genes de interesse, são uma alternativa interessante na seleção e no desenvolvimento de produtos biológicos à base de fungos com potenciais aplicações biotecnológicas em áreas como: agroindústria, bioprocessos, tecnologia ambiental, bioconversão e farmacologia.

Os resultados deste estudo confirmam a variabilidade existente entre diferentes isolados do fungo entomopatogênico *B. bassiana* pela produção da sua principal toxina BEA. Ainda, foi demonstrada a atividade biológica de BEA sobre as linhagens celulares SF-9 e SF-21 de *S. frugiperda* exibindo valores de CC_{50} de 2,81 e 6,94 μ M, respectivamente. Metabólitos secundários obtidos a partir do crescimento do fungo entomopatogênico *B. bassiana* em meios líquidos afetaram significativamente o desenvolvimento da interação da ferrugem e o cafeeiro mediante dois efeitos: de proteção, inibindo a germinação dos uredósporos, e indutor a longo prazo, caracterizado pela ativação de proteínas de defesa da planta, resultando uma importante diminuição da doença no final da epidemia. Adicionalmente, este é o primeiro registro da atividade citotóxica e antimicrobiana de metabólitos do fungo *B. bassiana* sobre linhagens celulares e bactérias causadoras de doenças nosocomiais em humanos. Os resultados sugerem um claro envolvimento deste tipo de metabólitos ao final do processo infeccioso do fungo sobre os insetos praga, mas também uma significativa atividade antibacteriana. Todos os tratamentos dos metabólitos puros e dos extratos brutos provenientes do crescimento do fungo *B. bassiana* apresentaram efeitos inibitórios sobre as diferentes espécies de bactérias utilizadas nos ensaios. A atividade bactericida foi observada no caso do gênero *Proteus sp.* e bacteriostática sobre os gêneros *Staphylococcus sp.*, *Klebsiella sp.* e *E. coli* alcançando em muitos casos 100% de inibição em diferentes tempos e concentrações utilizadas no ensaio. Com exceção da mistura na maior concentração, todos os tratamentos mostraram menor atividade inibitória contra *Salmonella sp.*

Com base nos resultados apresentados nos experimentos utilizando *S. commune* ficou demonstrado o potencial deste fungo como fonte de enzimas catalíticas para a degradação de materiais lignocelulósicos, bem para a produção de biocombustíveis de segunda geração. É necessário explorar a biodiversidade e caracterizar as mais importantes moléculas que são produzidas por micro-organismos selvagens e o papel delas na degradação de biomassa, a fim de se obter acesso a novas fontes de energia disponíveis. Apesar do fato de o bagaço de cana-de-açúcar e o engaço de bananeira mostrarem a maior indução de atividade da holocelulase,

pela composição, disponibilidade e oferta de bambu no mundo todo este continua sendo um material potencial e interessante. No entanto, requerem-se estudos adicionais para ser considerado um material lignocelulósico adequado e com potencial para bioconversão após o pré-tratamento da sua fibra. Nesse trabalho, foi comprovado o efeito indutor do CMC e das diferentes fontes de carbono na produção das holocelulases. Os valores determinados de K_m e V_{max} para pN β G das β -glicosidases em 0.303 mM e 0.504 mmol/min/mg de proteína, observou-se a melhor atividade da enzima a temperaturas entre 50 - 60° C e pH 7,0. Do mesmo modo, a ruptura estrutural das fibras de bambu foi bem visível com a utilização de MEV com amostras afetadas pela presença de *S. commune* ou previamente hidrolisadas com os extratos enzimáticos. Adicionalmente, torna-se necessária uma melhor compreensão do processo de biodegradação deste tipo de material lignocelulósico, a fim de possibilitar a transformação desse valioso material biológico em produtos de valor agregado.

Os resultados obtidos na caracterização parcial das enzimas digestivas β -glicosidases e LAPs vitais no desenvolvimento de *T. licus licus* permitiram gerar conhecimento estratégico sobre o inseto visando o futuro controle mediante aplicações biotecnológicas como identificação de inibidores vegetais, técnicas de RNAi e tecnologias de transformação genética de plantas. O pH do trato digestivo da broca gigante da cana-de-açúcar encontrado foi de 9,6 altamente alcalino mas consistente com o relatado na literatura. Além disso, para as β -glicosidases foram observadas aparentes K_m e V_{max} para pN β G de 1,74 mM e 0,005 mmol/min/mg de proteína respectivamente, e valores de pH entre 6,0 e 7,0 e temperatura entre 50 e 55° C na melhor atividade enzimática. Do mesmo modo, demonstrou-se o efeito de diferentes inibidores e ativadores da enzima, registrando para Mg^{2+} um incremento diretamente proporcional entre concentração e atividade, com valores de até o dobro do controle. No caso das LAPs foram identificadas 3 isoformas e demonstrou-se a inibição completa da atividade da enzima com bestatin 0,1 mM. Foi determinado o efeito do pH e a atividade específica comparada com outros insetos praga de importância econômica das ordens Lepidoptera e Coleoptera. Sabe-se que este tipo de enzima atua como receptor específico de toxinas Cry obtidas de *Bacillus thuringiensis* e os resultados desse trabalho indicaram a ligação das toxinas Cry com a enzima.

Este trabalho é um importante estudo envolvendo metabólitos produzidos pelos micro-organismos, com potenciais aplicações em diferentes áreas. Os estudos da atividade citotóxica sobre linhagens celulares permitiram a seleção e o melhoramento de formulações do fungo no controle biológico de pragas de importância econômica. Da mesma forma, a avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos é um aporte significativo na busca de

novos compostos com potencial aplicação no controle de bactérias dada a atual situação de crescente resistência à quimioterapia.

Finalmente, parte dos dados aqui apresentados constituem uma valiosa ajuda para o desenho de estratégias voltadas a geração de plantas resistentes aos insetos-praga estudados. A caracterização das enzimas da broca gigante *T. licus licus* obtidos para β -glicosidases e LAPs somados à informação do transcritoma do inseto e busca por possíveis inibidores visando à geração de plantas com maiores níveis de resistência encontram-se em desenvolvimento no Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga (LIMPP) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, liderado pela Dra. Fátima Grossi de Sá.

16 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios GN. 1996. Fitopatología. Editorial Limusa S.A. Grupo G.A editores. Segunda edición. México. 527 p.
- Almeida SC, Belchior CR, Nascimento MV, et al. 2002. Performance of a diesel generator fuelled with palm oil. *Fuel*, 81(16): 2097-2102.
- Ander P, Eriksson KE. 1976. The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Arch. Microbiol.* 109: 1–8.
- Andrade D, Leopoldo VC, Haas VJ. 2006. Ocorrência de Bactérias Multiresistentes em um Centro de terapia intensiva de Hospital Brasileiro de Emergências. *RBTI - Revista Brasileira Terapia Intensiva*, 18(1): 27- 33.
- Andreas J, Ferreira-Filho E, Pinto E. 2008. Biotechnology of holocellulose - degrading enzymes. in: biocatalysis and bioenergy, Edited by Ching T. Hou and Jei-RT Shaw. John Wiley & Sons, inc. p. 197.
- Arboleda V JW, Delgado F, Valencia A. 2003. Efecto de la toxina beauvericina sobre la broca del café *Hypothenemus hampei*. *Manejo integrado de plagas y agroecología*. 68: 71 – 76.
- Aslam N, Munir A, Shiekh MA, et al. 2010. Expression pattern of *Trichoderma* cellulases under different carbon sources. *Pakistan Journal of Botany* 42: 2895 – 2902.
- Bailey MJ, Buchert J, Viikari L. 1993. Effect of pH on production of xylanase by *Trichoderma reesei* on xylan- and cellulose-based media. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40: 224 – 229.
- Bajaj A, Lohan P, Jha PN, et al. 2010. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62(1): 9-14.
- Baker JE. 1983. Properties of amylase from midguts of larvae of *Sitophilus zeamais* and *Sitophilus granaries*, *Insect. Biochem.* 13: 421–428.
- Baldrian P, Valasková V, Merhautová V, et al. 2005. Degradation of lignocelullose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. *Research in Microbiology*, 156: 670-676.
- Baldrian P. 2003. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*; 32: 78-91.
- Bansode, TN; Dongre, M; Dongre, VG. 2009. Synthesis, antibacterial and antifungal activity of 1, 3-di(2-substituted 10h-phenothiazin-10-yl)propan-1-one. *Pharmaceutical Chemistry Journal* , 43 (6): 311 -314.

Basha SA, Gopal KR, Jebaraj S. 2009. A review on biodiesel product ion, combustion, emissions and performance. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(6-7): 1628-1634.

Berlin A, Balakshin M, Gilkes N, et al. 2006. Inhibition of cellulase, xylanase and beta-glucosidase activities by softwood lignin preparations. *Journal Biotechnol*, 125: 198–209.

Billingsley PF. 1990. Blood digestion in the mosquito, *Anopheles stephensi* liston (Diptera: Culicidae): partial characterization and post-feeding activity of midgut aminopeptidase. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 15: 149–163.

Bon E, Ferrara MA, Corvo ML. 2008. *Enzimas em Biotecnologia*. Rio de Janeiro, Editora Interciência LTDA.

Bonatti M, Karnopo P, Soares HM, et al. 2004. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. *Food Chemistry*, 88:425-428.

Božić N, Ivanović J, Nenadović V, et al. 2008. Purification and properties of major midgut leucyl aminopeptidase of *Morimus funereus* (Coleoptera, Cerambycidae) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 149: 454–462.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Analytical biochemistry* 72: 248-254.

Bustillo AE, Castillo A, Villalba DA, et al. 1991. Evaluaciones de campo con el hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café *Hypothenemus hampei* en Colombia. In: COLLOQUE Scientifique International sur le café, 14. San Francisco, Juillet 14-19, París, ASIC, p.679-686.

Bustillo AE, Cárdenas MR, Villalba, DA, et al. 1998. Manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei* (ferrari) en colombia. Centro Nacional De Investigaciones de Café CENICAFE. Chinchiná, Colombia. 134 p.

Bustos G, Moldes AB, Alonso JL, et al. 2004. Optimization of Dlactic acid production by *Lactobacillus coryniformis* using response surface methodology. *Food Microbiol*, 21(2): 143-148.

Calò L, Fornelli F, Nenna S, et al. 2003. Beauvericin cytotoxicity to the invertebrate cell line SF-9. *J Appl Genet* 44:515–520.

Calò L, Fornelli F, Ramires R, et al. 2004. Cytotoxic effects of the mycotoxin Beauvericin to human cell lines of myeloid origin. *Pharmacol Res* 49:73–77.

Canakci M, Sanli H. 2008. Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(5): 431-441.

Cardona CA, Sánchez ÓJ. 2007. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. In: *Bioresource Technology*, No. 98, Vol. 12. pp. 2415-2457.

Carlini CR, Grossi de Sa MF. 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities of bioinsecticides. *Toxicon*, 40(11):1515-1539.

Carmona E, Pizzirani-Kleiner AA, Rosim R, et al. 1997. Xylanase production by *aspergillus versicolor*. *Journal of Basic Microbiology* 37(6): 387 – 393.

Cavallazzi JR, Kasuya CM, Soares MA. 2005. Investigación de los inductores para la producción de Lacasa por *Lentinula edodes* en medio líquido. *Diario Brasileño de Microbiología* 36: 1517 - 8382.

Charnley AK, St. Leger RJ. 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 48: 82-95.

Chougule, NP, Doyle E, Fitches E, et al. 2008. Biochemical characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae* (cabbage moth; Lepidoptera: Noctuidae) and effect of soybean Kunitz inhibitor (SKTI) in feeding assays. *J. Insect Phys.* 54: 563 – 572.

Claydon N, Grove JF. 1982. Insecticidal secondary metabolic products from the entomogenous fungus *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology* 40: 413-418.

Clarke AJ. 1990. Chemical modification of a β -glucosidase from *S. commune*: evidence for essential carboxyl groups. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure Molecular Enzymology*, 1040: 145-152.

Coughlan M. 1991. Mechanisms of cellulose degradation by fungi and bacteria. *Animal Feed Science and Technology* 32: 77-100.

Craveiro K, Gomes JE, Silva MC, et al. 2010. Variant CryIIa toxins generated by DNA shuffling are active against sugarcane giant borer. *Journal of Biotechnology*. 145(3): 215-221.

Cruz JM, Domínguez JM, Domínguez H, et al. 2000. Xylitol production from barley bran hydrolysates by continuous fermentation with *Debaryomyces hansenii*. *Biotechnology Letters*, 22:1895-1898.

Cruz LP, Gaitán A, Góngora CE. 2006. Exploiting the genetic diversity of *B. bassiana* for improving the biological control of the coffee berry borer through the use of strain mixtures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71: 918 – 926.

- Dahod SK. 1999. Raw materials selection and medium development for industrial fermentation processes, in *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, A.L.a.D. Demain, J.E, Editor. ASM Press: Washington DC. p. 213-220.
- Delange RJ, Smith EL. 1971. *The Enzymes III*. (Academic, New York), 3rd Ed., pp. 81-103.
- Del-Lama MA, Bezerra RM, Soares AE, et al. 2001. Genetic, ontogenetic, and tissue specific variation of aminopeptidases of *Apis mellifera* *Apidologie* 32, 25–35.
- Demain AL. 2000. Small bugs, big business: The economic power of the microbe. *Biotechnology Advances*, 18(6): 499-514.
- Demain AL. 2007. REVIEWS: The business of biotechnology. *Industrial Biotechnology*, 3(3): 269-283.
- Dev S, Koul O. 1997. *Insecticides of natural origin*. Amsterdam, hardwood academic publisher. 365 p.
- Di Paola R, Nenna S, Fornelli F, et al. 1994. Cytotoxicity of Beauvericin on humans b-lymphocyte cell lines, in *icaci xv eaaci 94. Allergy and clinical immunology news 2*: 256.
- Dillon AH, Bettio M, Pozzan FG, et al. 2011. A new *penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. *Journal of Applied Microbiology* DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05026.x.
- Dostálek P, Gabrovská D, Rysová J, et al. 2009. Determination of gluten in glucose syrups. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22: 762-765.
- Esquivel, EA. 1980. Basic studies on sugarcane resistant varieties to the giant borer *T. licus licus* Drury in Panamá. *Entomol. News* 1. 8: 8-9.
- Evlakhova A, Rakitin A. 1968. *Insecticidas biológicos y sus aplicaciones*. *Doklady Academic Nauk*. 178: 485-488.
- Fajardo A, Martínez JL, 2008. Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Current Opinion in Microbiology* 11(2): 161–67.
- Fang J, Liu W, Gao PJ 1998. Cellobiose dehydrogenase from *S. commune*: Purification and study of some catalytic, inactivation, and cellulose-binding properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 353: 37- 46.
- Ferreira C, Bayardo B, Terra W. 1998. Substrate Specificities of Midgut b-Glycosidases from Insects of different Orders. *Comp. Biochem. Physiol.* 119(1): 219–225.
- Ferron P. 1981. Pest control by the fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae*. In: BURGESS, H. ed. *Microbial control of pest and plant diseases*. 1970-1980. London,

Academic Press. p. 465-482.

Fleming A. 1942. In-vitro tests of penicillin potency. *The Lancet*, 239(6199):732-733.

Fornelli F, Minervini F, Logrieco A. 2004. Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (sf-9). *Journal of Invertebrate Pathology* 85: 74-79.

Fournet A, Ferreira ME, Rojas A. 1997. Activity of Compounds Isolated From Chilean Lichens Against Experimental Cutaneous Leishmaniasis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 116(1): 51-54.

Gaitán A, Valderrama AM, Saldarriaga G, et al. 2002. Genetic variability of *B. bassiana* associated with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* and other insects. *Mycological Research*. 106:1307-1314.

Gassem MA, Sims K, Frank J. 1997. Extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* RR in a continuous fermentor. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 30(3): 273-278.

Gemma N, Wasti SS, Hartmann C. 1985. Antagonism of entomogenous fungal extracts to the duct elm disease fungus, *Ceraticystis ulmi*. *Journal New York Entomology Society*. 93(3): 1109-1112.

Ghadamyari M, Hosseininaveh V, Sharifi, F. 2010. Partial biochemical characterization of α - and β -glucosidases of lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis* Walker (Lep.: Pyralidae). *Comptes Rendus Biologies* 333: 197-204.

Gómez C, Martínez M, Nieto D, et al. 2005. Estudio del efecto de dos inductores y un protector enzimático sobre la actividad de las enzimas Mn - peroxidasa y Lacasa producidas por *Trametes versicolor* y su efecto en la decoloración de efluentes de la industria papelera. *Universitas Scientiarum: Revista de la Facultad de Ciencias* 10(2): 37 - 45.

Gupta S, Krasnoff SB, Underwood NL, et al. 1991. Isolation of Beauvericin as an insect toxin from *Fusarium semitectum* and *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. *Mycopathologia* 115:185-189.

Gupta S, Montlor C, Huang YS. 1995. Isolation of novel Beauvericin analogues from the fungus *B. bassiana*. *Journal of Natural Products*, 58 (5): 733-738.

Gutleb A, Morrison E, Murk AJ. 2002. Cytotoxicity assay for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. *Environ Toxicol Phar* 11:309–320.

Haltrich D, Preiss M, Steiner, W 1993. Optimization of a culture medium for increased xylanase production by a wild strain of *S. commune*. *Enzyme and Microbial Technology* 15: 854-860.

Haltrich D, Steiner W 1994. Formation of xylanase by *S. commune*: Effect of medium components. *Enzyme and Microbial Technology* 1994; 16: 229-235.

Herman TE, Kurtz MB, Champe SP. 1983. Laccase localized in hulle cells and cleistothecial primordia of *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* 154: 955–964.

Hernández E, Garcia C, Novaes-Ledieu M. 1990. Chemical characterization of the hyphal walls of the basidiomycete *Armillaria mellea*. *Experimental Mycology* 1990; 14: 178-183.

Hobbs L, James B, Roy W. 2009. Sweeteners from Starch: Production, Properties and Uses, in *Starch (Third Edition)*. Academic Press: San Diego. p. 797-832.

Hofvendahl K, Hahn-Hagerdal B. 1997. Lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of Lactobacilli and Lactococci. *Enzyme Microbiol. Biotechnol*, 20: 301-307.

Horton JS, Bakkeren G, Klosterman SJ, et al. 2005. Genetics of morphogenesis in basidiomycetes. *Applied Mycology and Biotechnology* 5: 353-422.

Jawetz M, Adelberg B, Brooks GF, et al. 2009. *Microbiologia médica*. 24^a ed.

Jegorov A, Sedmera P, Havlicek V, et al. 1998. Destruxin Ed₁ a cyclopeptide the fungus *M. anisopliae*. *Phytochemistry* 49(6): 1815-1817.

Johnson R, Padmaja G, Moorthy S. 2009. Comparative production of glucose and high fructose syrup from cassava and sweet potato roots by direct conversion techniques. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 10(4): 616 - 620.

Jordaan J, Pletschke B, Leukes W. 2004. Purification and partial characterization of a thermostable laccase from an unidentified basidiomycete. *Enzyme and Microbial Technology*. 34: 635-641.

Kamm B, Kamm M. 2004. Principles of biorefineries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(2): 137-145.

Kershaw MJ, Moorhouse ER, Bateman R, et al. 1999. The role of destruxins in the pathogenicity of *M. anisopliae* for three species of insect. *Journal of Invertebrate Pathology*, 74: 213-223.

Kolenová K, Vršanská M, Biely P. 2005. Purification and characterization of two minor endo- β -1,4-xylanases of *S. commune*. *Enzyme and Microbial Technology* 36: 903–910.

- Kumari M, Survase SA, Singhal RS. 2008. production of schizophyllan using *S. commune* nrcm. *bioresource technology* 99(5): 51036-104.
- Kunz M. 2008. Bioethanol: Experiences from running plants, optimization and prospects. *Biocatalysis and Biotransformation*, 26(1): 128 - 132.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *nature* 1970; 227: 680–685.
- Lee MJ, Anstee JH. 1995. Characterization of midgut exopeptidase activity from larval *Spodoptera littoralis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25: 63–71.
- Leguizamón J. 1983. Contribution a la connaissance de la résistance incomplete du caféier a *hemileia vastatrix* berk. Et br. Montpellier (francia). Ecole nationale superieure de agronomie de montpellier. Tesis Docteur Ingenieur en Agronomie. 183 p.
- Leung DY, Wu X, Leung MK. 2010. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy*, 87: 1083 – 1095.
- Levinson, N; Jawetz, N. 2005. *Microbiologia medica e imunologia*. 7 ed., Porto Alegre: Editora Artmed.
- Li C, Haug T, Styrvold OB, et al. 2008. Novel antimicrobial peptides from the green sea urchin, *S. droebachiensis*. *Developmental and comparative immunology*, 32(12):1430-1440.
- Liu ZG, Zhang F. 2009. Removal of lead from water using biochars prepared from hydrothermal liquefaction of biomass *J. Hazard. Mater.* 167(1-3): 933– 939.
- Logrieco A, Moretti A, Fornelli F, et al. 1996. Fusaproliferin production by *Fusarium subglutinans* and its toxicity to *Artemia salina*, SF-9 insect cells, and IARC/LCL 171 Human B Lymphocytes. *Appl. Environ. Microbiol* 62: 3378–3384.
- Mandels M, Andreotii R, Roche C.1976. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology and Bioengineering Symposium* 16: 21-33.
- Marana S, Terra W, Ferreira C. 2000. Purification and properties of a b-glycosidase purified from midgut cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30: 1139–1146.
- Martínez D, Larrondo LF, Putman N, et al. 2004. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nature Biotechnology* 22: 695 -700.
- Martínez J, Martínez L, Rosenblueth M, et al. 2004. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of Klebsiella. *International microbiology*. 7:261-268.

Martins MF, Roveratti DS, Moraes BC. 1986. Elicitation of stress metabolites in coffee leaves by a non-pathogen. *Fitopatología brasileira (Brasil)* 11: 898-909.

Mehrabadi M, Bandani A, Saadati F, et al. 2009. Sunn pest, *Eurygaster integriceps* Putton (Hemiptera: Scutelleridae), digestive α -amylase, α -glucosidase and β -glucosidase. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 12 (2009) 79–83.

Mei L, Zhang L, Dai R. 2009. An inhibition study of Beauvericin on human and rat cytochrome P450 enzymes and its pharmacokinetics in rats. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24 (3): 753-762.

Mello LV, Santos RC, Grossi de Sa MF. 2003. Molecular cloning of α -amylases from Cotton Boll Weevil, *Anthonomus grandis* and structural relations to plant inhibitors: An approach to insect resistance. *Journal of Protein Chemistry*, 22(1): 77-87.

Maningat CC, Seib PA, Bassi SD, et al. 2009. Wheat Starch: Production, Properties, Modification and Uses, in *Starch (Third Edition)*. Academic Press: San Diego. p. 441-510.

Mejía LF, Martínez HA, Betancourt JE 2007. Aprovechamiento del residuo agroindustrial del mango común (*Mangifera Indica* L.) en la obtención de azúcares fermentables. *Ingeniería y Ciencia*, 3(6): 41-62.

Mendonça, AF. et al. 1996. A broca gigante da cana-de-açúcar, *T. licus licus* Drury, (Lepidoptera: Castniidae), p. 133–167. In A.F. Mendonça (ed.), *Pragas da cana-de-açúcar*. Maceió, Insetos & Cia, 239 p.

Miller G. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-428.

Mimi-Sakinah AM, Ismail AF, Hassan OA, et al. 2009. Influence of starch pretreatment on yield of cyclodextrins and performance of ultrafiltration membranes. *Desalination*, 239(1-3): 317-333.

Moldes AB, Alonso JL, Parajó JC. 2001. Strategies to improve the bioconversion of processed wood into lactic acid by simultaneous saccharification and fermentation. In: *J. Chem. Technol. Biotechnol*, 76(3): 279-284.

Moldes AB, Cruz JM, Domínguez JM, et al. 2002. Production of a cellulosic substrate susceptible to enzymatic hydrolysis from prehydrolyzed barley husks. *Agricultural and Food Science* 11: 51-58.

Montiel M, Jiménez VM, Guevara E. 2006. Caracterización anatómica ultraestructural de las variantes "Atlántica", "Sur" y "Cebolla" del bambú, *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae), en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 54:1-12.

Morales S, Álvarez H, Sánchez C. 2008. Dynamic models for the production of glucose syrups from cassava starch. *Food and Bioproducts Processing*, 86(1): p. 25-30.

Morris D. 2006. The next economy: from dead carbon to living carbon. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(12): 1743-1746.

Mouso N, Papinutti L, Forchiassin F. 2003. Efecto combinado del cobre y pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de lacasa y manganeso peroxidasa por *stereum hirsutum* (willd) pers. *Revista Iberoamericana de Micología* 20: 176 - 178.

Münch S, Neuhaus J, Boller T, et al. 1997. Expression of β -1,3-glucanase and chitinase in healthy, stem rust-affected and elicitor-treated near-isogenic wheat lines showing *sr5* or *sr24*-specified race-specific rust resistance. *Planta* 201: 235-244.

Murdock HR. 1952. Pulp and Paper Industry. *Industrial & Engineering Chemistry*, 44(3): p. 507-513.

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. 2009. *Medical microbiology*. 6^a ed. p. 475.

Nakanishi K, Yaobi K, Nagino Y, et al. 2002. Aminopeptidase N isoforms from the midgut of *Bombyx mori* and *Plutella xylostella* their classification and the factors that determine their binding specificity to *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin. *FEBS Lett.* 519: 215–220.

Narasimha, RP; Akbar, AP; Sarayu B. et al. 2010. Antibacterial Efficacy of Secondary Metabolites from Entomopathogenic Fungi *B. bassiana*. *International Journal of Chemical and Analytical Science*, 1(5): 94-96.

Naumann A, Navarro-González M, Peddireddi S, et al. 2005. Fourier transforms infrared microscopy and imaging: Detection of fungi in wood. *Fungal Genetics and Biology*. 42:829-835.

Nilanonta CH, Isaka M, Kittakoop P, et al. 2000. Antimycobacterial and antiplasmodial cyclodepsipeptides from the insect pathogenic fungus *Paecilomyces tenuipes* bcc 1614. *Planta Medica* 66: 756 –758.

Nuero G, OM. 1995. Estudio bioquímico de P-1,3-Glucanasas de *Aspergillus nidulans* para el control biológico de *Fusarium oxysporum* sp. *lycopersici* raza 2. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Químicas. Madrid 187 p.

Ojcious M, Zychlinsky L, Zheng M, et al. 1999. Ionophore-induced apoptosis: role of DNA fragmentation and calcium fluxes. *Experimental Cell Research*, 197: 43-49.

Oliveira OB, Batista J, Rigden DJ, et al. 2004. Molecular cloning of a cysteine proteinases cDNA from cotton boll weevil *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68(6):1235-1242.

Oses R, Valenzuela S, Freer V, et al. 2006. Evaluation of fungal endophytes for lignocellulolytic enzyme production and wood biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 57: 129-135.

Otero-González AJ, Magalhães BS, Garcia-Villarino M, et al. 2010. Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control. *The FASEB Journal* 24: 1320-1334.

Pelegri P, Perseghini del Sarto, R, Nascimento O, et al. 2011. Antibacterial Peptides from Plants: What They Are and How They Probably Work. *Biochemistry Research International*. doi:10.1155/2011/250349.

Prokop A, Rapp P, Wagner F. 1992. Production of extracellular B-1,3-/B-1,6-glucan by mono- and dikaryons of *S. commune*. *Experimental Mycology* 16: 197-206.

Raudaskoski M, Vauras R. 1982. Scanning electron microscope study of fruit body differentiation in *S. commune*. *Transactions of the British Mycological Society*. 78(3): 475-481.

Robinson T, Singh D, Nigam P. 2001. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55: 284-289.

Rombach MC. 1988. Production of *B. bassiana* (deuteromicotina: hyphomicetes) sympoduloconidia in submerged culture. *Entomophaga* 33: 315-324.

Sánchez ÓJ, Cardona CA. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. In: *Bioresource Technology*, No. 99, Vol. 13. pp. 5270-5295.

Sarath G, Mitchell RB, Sattler SE, et al. 2008. Opportunities and roadblocks in utilizing forages and small grains for liquid fuels *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(5): 343-354.

Sigma, 2010. Catalog Sigma - Aldrich 2010 - 2011. USA. 2843 p.

Siqueira F. 2010. Resíduos Agroindustriais com Potencial para a Produção de Holocelulases de Origem Fúngica e Aplicações Biotecnológicas de Hidrolases. Universidade de Brasília, Tese de Doutorado, 277 p.

Siqueira FG, Siqueira AG, Siqueira EG, et al. 2010. Evaluation of holocellulase production by plant-degrading fungi grown on agro-industrial residues. *Biodegradation*, 21: 5 815 - 824.

Siqueira FG, Siqueira EG, Jaramillo PM, et al. 2010. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64: 20 - 26.

Skoog DA, Leary JJ. 1994. Análisis instrumental. 4. ed. Madrid, Mc Graw-Hill. p. 882-890.

Skrobek A, Butt TM. 2005. Toxicity testing of destruxins and crude extracts from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. FEMS Microbiol Lett 251:23–28.

Soetaert W, Vandamme E. 2006. The impact of industrial biotechnology. Biotechnology Journal, 1(7-8): 756-769.

Soetaert W, Vandamme EJ. 2005. Biofuel production from agricultural crops. In: Biofuels for fuel cells: Renewable energy from biomass fermentation, in Series Integrated Environmental Technology, P. Lens, Westerman, P., Haberbauer, M., and Moreno, A., Editor. IWA Publ: UK. p. 37-50.

Soetaert W, Vandamme EJ. 2009. Biofuels, in Renewable Resources series, C. Stevens, Editor. J Wiley & Sons Ltd. p. 242.

Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, et al. 1999. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. N Eng J Med 340: 493-501.

Song HH, Lee HS, Jeong JH, et al. 2008. Diversity in Beauvericin and enniatins h, i, and mk1688 by *Fusarium oxysporum* isolated from potato. Int. J. Food Microbial, 122 (3):296-301.

Sreenath HK, Koegel RG, Moldes AB, et al. 2001. Lactic acid production by simultaneous saccharification and fermentation of alfalfa fiber. Journal of Bioscience and Bioengineering, 92: 518-523.

Srinivasan C, D'souza TM, Boominathan K, et al. 2005. Demonstration of Laccase in the White Rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1765. Applied Environmental and Microbiology 61: 4274 - 4277.

Strasser H, Abendstein D, Stuppner H, et al. 2000. Monitoring the distribution of secondary metabolites produced by the entomopathogenic fungus *B. brongniartii* with particular reference to oosporein. Mycological Research 10: 1227-1233.

Summers MD, Smith GE. 1987. A manual of methods of Baculovirus Vectors an Insect Cell Cultures Procedures. Texas AES Bull. 1555: 1-156.

Tavares W. 2000. Bactérias Gram positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 33(3):281-301.

Taylor A. 1993. Aminopeptidases: structure and function. FASEB Journal 7: 290–298.

Terra W, Ferreira C., Jordao BP, et al. 1996. Digestive enzymes, In: M.J. Lehane, P.F. Billingsley (Eds.), *Biology of the Insect Midgut*, Chapman & Hall, London, 1996, pp. 153–193.

Thakur R, Smith J. 1997. Liquid chromatography / thermospray / mass spectrometry analysis of Beauvericin. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 45: 1234–1239.

Tirolli IC, Costa CA. 2006. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos recém abatidos em feiras e mercados da cidade de Manaus-AM. *Acta Amazônica*. 36(2):205-208.

Tomoda HX, Huang H, Nishida R, et al. 1992. Inhibition of acyl-coa:cholesterol acyltransferase activity by cyclodepsipeptide antibiotics. *J. Antibiot*, 45:1626–1632.

Torres YR, Berlinck RG, Nascimento GG, et al. 2002. Antibacterial activity against resistant bacteria and cytotoxicity of four alkaloid toxins isolated from the marine sponge *Arenosclera brasiliensis*. *Toxicon*. 40: 885-891.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. 2003. *Microbiologia*. 6^a ed, p. 723.

Turner G. 2000. Exploitation of fungal secondary metabolites old and new. Em: www.sgm.ac.uk.

Turner NW, Subrahmanyam S, Piletsky SA. 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Analytica Chimica Acta*, 632: 168–180.

Uribe SS, Saldarriaga Y, Pineda F, et al. 1997. Producción de beauvericina por *B. bassiana* 9401 aislada sobre *Lutzomya* sp. *Revista Colombiana de Entomología* 23: 3-4.

Valencia A, Bustillo AE, Ossa G, et al. 2000. α -Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30:207-213.

Valencia A. 2009. As enzimas presentes no trato digestivo dos insetos: um alvo susceptível de inibição. Universidade de Brasília, Tese de Doutorado, 99 p.

Van-Beilen JB. 2008. Transgenic plant factories for the production of biopolymers and platform chemicals. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2(3): 215-228.

Vandamme EJ. 2009. Agro-Industrial Residue Utilization for Industrial Biotechnology Products in *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*, P.S.n.N.a.A. Pandey, Editor. Springer Netherlands: Netherlands. p. 3-11.

Vandamme EJ. 2007. Microbial gems: Microorganisms without frontiers. *SIM-News*, 57(3): 81-91.

Vasanthan T, Hoover R, James B, et al. 2009. Barley Starch: Production, Properties, Modification and Uses, in *Starch (Third Edition)*. Academic Press: San Diego. p. 601-628.

Vasudevan PT, Briggs M. 2008. Biodiesel production - current state of the art and challenges *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(5): 421-430.

Vaughn JL, Goodwin RH, Thompkins GJ, et al. 1977. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). *In vitro* 13: 213–217.

Vélez PE, Posada FJ, Marín P, et al. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Chinchiná, CENICAFE, Boletín Técnico Cenicafe 17:1 – 34.

Vey A, Hoagland RE, Butt TM. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: Butt, T.M., Jackson, C.W., Magan, (Eds.), *Fungi as Biocontrol Agents*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 311–346.

Vey A, Quiot JM, Vago C, et al. 1985. Effect immunodepresseur de toxines fongines: inhibition de la reaction de encapsulement multicellulaire par les destruxines. *Comptes Rendus de l'academie des sciences* 300: 647-651.

Vey A, Riba G. 1989. Toxines insecticides issues de champignons entomopathogenes; etat actuel des connaissances et nouvelles stratégies d'utilisation de leurs activités. *C. R. Acad. Agric. Fr.* 75(6): 143 – 149.

Viterbo A, Yagen B, Mayer AM. 1993. Induction of laccase formation in *Botrytis* and its inhibition by cucurbitacin: Is gallic acid the true inducer?. *Phytochemistry*. 34: 47 – 49.

Volcy C, Pardo VM. 1994. *Principios de micología*. Medellín, Universidad Nacional de Colombia. 141 p.

Wall JD, Harwood CS, Demain AL. 2008. *Bioenergy*. Washington DC: ASM-Press. 243 p.

Wessels JG, Kreger DR, Marchant BA, et al. 1972. Chemical and morphological characterization of the hyphal wall surface of the basidiomycete *S. commune*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1972; 273: 346-358.

Whittam TS, Winkworth CL, Riley MA, et al. 2005. Genomic divergence of *Escherichia coli* strains: evidence for horizontal transfer and variation in mutation rates. *International microbiology*. 8:271-278.

Winayanuwattikun P, Kaewpiboon C, Piriyananon K, et al. 2008. Potential plant oil feedstock for lipase-catalyzed biodiesel production in Thailand. *Biomass and Bioenergy*, 32(12): 1279-1286.

Xiaobo L. 2004. Physical, chemical, and mechanical properties of bamboo and its

utilization potential for fiberboard manufacturing, Theses. Louisiana State University. 68 p.

Yamada R, Bito Y, Adachi T, et al. 2009. Efficient production of ethanol from raw starch by a mated diploid *Saccharomyces cerevisiae* with integrated [alpha]-amylase and glucoamylase genes. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(5): 344-349.

Yang L, Zhang LM. 2009. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *Carbohydrate polymers* 76(3): 349-361.

Yapi DYA, Gnakri D, Niamke S, et al. 2009. Purification and biochemical characterization of a specific b-glucosidase from the digestive fluid of larvae of the palm weevil, *Rhynchophorus palmarum*. *J. Insect Sci.* 4 : 1–13.

Yi-Heng PZ, Lee RL. 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and bioengineering* 88: 797-824.

Zhang Y, Percival H. 2008. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(5): 367-375.

Zibae A, Bandani A, Ramzi S. 2009. Enzymatic properties of α - and β -glucosidases extracted from midgut and salivary glands of rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) C. R. *Biologies* 332: 633–641.

Zizca J, Weiser J. 1993. Effect of Beauvericin a toxic metabolite of *B. bassiana*, on the ultrastructure of *Culex pipiens* autogenicus larvae. *Cytobios*, 7513- 7519.

17 ANEXOS

Artigos publicados (Primeiro Autor).

Arboleda V, J.W.; Valencia J, A.; Gaitan, A.; Grossi de Sá, M.F. 2011. Cytotoxic activity of Beauvericin and fungal metabolites from the pathogenic fungus *Beauveria bassiana*: an intraspecific variation evaluation. Current Microbiology. DOI: **10.1007/s00284-011-9977-2**

Arboleda V, J.W.; Valencia J, A.; Dussan M, K.J.; Restrepo F, G.M.; Siqueira, F.G.; Ferreira-Filho, E.X.; Siegfried, B.D.; Grossi-de-Sá, M.F. 2011. Holocellulase activity by *Schizophyllum commune* grown on bamboo: a comparison with different substrates. Aceito em: Current Microbiology. *In press*.

Arboleda V, J.W.; Sarmiento, A.; Betancur P, F. Delgado B, F. 2009. Separación de proteínas de la capa externa del parásito *Ascaris lumbricoides*. Revista de Investigaciones Universidad Católica de Manizales. Ed. # 14 p. 62-71.

Arboleda V, J.W.; Restrepo F, G.M.; Dussan M, K.J. 2010. Aprovechamiento biológico de residuos agroindustriales. Revista de Investigaciones Universidad Católica de Manizales. Ed. # 15 p. 108-120

Artigos publicados (Segundo Autor).

Valencia J, A.; **Arboleda V, J.W.;** Grossi de Sá, M.F. 2007. Detection of α -amylase inhibitors by a zymography method, performed in IEF electrophoretic PhastGels. Analytical Biochemistry 366: 113 – 115.

Valencia J, A.; **Arboleda V, J.W.;** Grossi de Sá, M.F. 2008. Digestive alpha amylases from *Tecia solanivora* larvae (Lepidoptera: Gelechiidae): response to pH, temperature and plant amylase inhibitors. Bulletin of Entomological Research ISSN: 0007-4853 ed: Cambridge University Press v.98 fasc.6 p.575 – 579.

Jimenez, A. V., **Arboleda V, J.W.;** Grossi-de-Sa, M.F. 2008. Activity of α -Amylase Inhibitors from *Phaseolus coccineus* on Digestive α -Amylases of the Coffee Berry Borer. Journal of Agricultural and Food Chemistry. v.56, n.7, p.2315 – 2320.

Artigos publicados (co-autor).

Monteiro, ACS; Oliveira N, OB; Magalhaes, MT; **Arboleda V, JW;** et al. 2008. Recombinant form of chagasin from *Trypanosoma cruzi*: inhibitory activity on insect cysteine proteinases. Pest Management Science ISSN: 1526-498X ed: Wiley v.64 fasc.7 p.755 – 760.

Artigos em fase de submissão (Primeiro Autor).

Arboleda V, J.W.; Valencia J, A.; Grossi de Sá, M.F. 2011. Activity of digestive enzymes in the intestinal tract of *Telchin licus licus* an important insect pest of sugarcane.

Arboleda V, J.W.; Dos santos de Lima, D.; Valencia J, A.; Grossi de Sá, M.F. 2011. A cysteine proteinase from bean weevil larvae *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera:Bruchidae).

Artigos em fase de submissão (Co-autor).

Pinto M.; Fensterseifer I.; Migliolo L.; Souza D.; **Arboleda V, J.W.;** Cograve M.; Craik D.J.; Magalhães B.; Dias C, S.; Franco O. Molecular identification and structural characterization of a *Palicourea rigida* cyclotide with insecticidal activity

Participações em eventos (Primeiro Autor)

II Workshop Interação Molecular Planta-Praga. "Caracterização parcial de enzimas proteolíticas intestinais de larvas de broca gigante da cana-de-açúcar, *Telchin licus licus* (drury)." Abril, 2007. Brasília - Brasil.

VIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática – ENZITEC. "Quantificação de lacases e xilanases produzidas pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium* na degradação de *Guadua angustifolia* Kunt" Agosto 10 – 12, 2008. Rio de Janeiro- Brasil.

Entomological Society of America (ESA) Annual Meeting. Poster: "Activity of α -amylase inhibitors from *Phaseolus coccineus* on digestive α -amylases of the coffee berry borer" Dezembro 15 - 18, 2008.

IX Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática – ENZITEC. "Production of lignocellulolytic enzymes by *Schizophyllum commune* grown on different substrates" Novembro 10 – 12, 2010. Rio de Janeiro- Brasil.

III Workshop Interação Molecular Planta-Praga. "Metabólitos secundários do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*: Avaliação do potencial da atividade biológica" e "Identificação e Caracterização de enzimas celulolíticas de importância biotecnológica provenientes do fungo *Schizophyllum commune*". Brasília - Brasil. Março de 2010.

33rd SBFC, Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. Poster: "Lignocellulolytic enzymes by *Schizophyllum commune* grown on bamboo: An physical and biochemical view". Seattle – WA – USA. Maio 2- 5, 2011.