

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE
BIOLÓGICA

PROTEASES E QUITINASES DE FUNGOS ANAMÓRFICOS DE
INSETOS DA AMAZÔNIA COM USO POTENCIAL EM
BIOCONTROLE

JÉSSICA FERREIRA BARRONCAS

MANAUS – AM
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE
BIOLÓGICA

JÉSSICA FERREIRA BARRONCAS

PROTEASES E QUITINASES DE FUNGOS ANAMÓRFICOS DE
INSETOS DA AMAZÔNIA COM USO POTENCIAL EM
BIOCONTROLE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Diversidade Biológica.

Orientadora: Professora Doutora Maria Francisca Simas Teixeira
(DPUA/UFAM)

MANAUS – AM
2013

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Barroncas, Jéssica Ferreira.

B277p Proteases e quitinases de fungos anamórficos de insetos da Amazônia com uso potencial em biocontrole / Jéssica Ferreira Barroncas. - 2014.

54 f. : il..

Dissertação (mestrado em Diversidade Biológica) — Universidade Federal do Amazonas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Francisca Simas Teixeira.

1. Micro-organismos 2. Fungos 3. Enzimas 4. Insetos I. Teixeira, Maria Francisca Simas, orientador II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU (2007): 575.754 (811.3) (043.3)

JÉSSICA FERREIRA BARRONCAS

PROTEASES E QUITINASES DE FUNGOS ANAMÓRFICOS DE
INSETOS DA AMAZÔNIA COM USO POTENCIAL EM
BIOCONTROLE

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Francisca Simas Teixeira- Presidente

Prof. Dra. Ila Maria de Aguiar Oliveira

Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto

Prof. Dr. Neliton Marques da Silva

MANAUS – AM
2013

A Deus, meus pais, minhas irmãs e
meus sobrinhos queridos...

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre esteve comigo em todos os momentos me dando forças para continuar.

À Universidade Federal do Amazonas e ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelos recursos concedidos através do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD 174/2007).

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Maria Francisca Simas Teixeira, minha “mãe científica”, pelos ensinamentos, pelo apoio, pelos conselhos e até mesmo pelas broncas.

Ao meu co-orientador, Dr. Geraldo José Nascimento de Vasconcelos, que vem me acompanhando e me apoiando na minha vida acadêmica e profissional desde a graduação.

Às pessoas da Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco pelo auxílio na identificação dos fungos utilizados neste trabalho.

Ao pessoal do LABTECBIO da Universidade Federal Rural de Pernambuco pela acolhida, pelo aprendizado e pela amizade durante a missão PROCAD em Recife.

A todas as meninas e menino dos Laboratórios de Micologia e Microbiologia, Ana Júlia, Ana Rita, Annie, Felipe, Meire Rossy, Larissa, Leonanda, Lorena, Mircella, Néilly, Rosana, Taciana, Thayana e Valéria, pela amizade, pela ajuda na hora dos experimentos, pelos momentos de descontração e pelos momentos marcantes que passamos durante esses dois anos.

Às melhores amigas, Tamiris Fonseca e Raiane Áila, que me acompanham desde a graduação e trilharam esse caminho do mestrado comigo, sempre dispostas a ajudar, especialmente à Tamiris, que sempre esteve comigo em todos os momentos, me ajudando em todos os experimentos e me dando força nos momentos mais difíceis.

Aos amigos Christiano Felipe e Francisco Luiz, que sempre que eu precisei estiveram presentes, prontos para me animar quando a situação estava difícil.

Aos meus pais, que sempre me incentivaram a estudar e buscar o contínuo aperfeiçoamento, que me tornaram tudo que sou hoje.

Às minhas irmãs, que sempre serviram de exemplo para mim, pelos conselhos e pelo apoio.

Aos meus sobrinhos queridos, que depois de um dia cansativo sempre me alegravam e revigoravam com o seu carinho.

RESUMO

Enzimas hidrolíticas são utilizadas em diversos ramos da indústria e da biotecnologia, dentre elas, as proteases e as quitinases. Estas enzimas são secretadas por fungos que causam patologias em diversos organismos, representando um importante fator de virulência para os mesmos. O objetivo deste trabalho foi isolar fungos de percevejo de renda (*Vatiga illudens*) e cochonilha (*Orthezia* sp.), avaliar o potencial proteolítico dos extratos dos isolados, determinar a temperatura e pH ótimo da enzima, bem como realizar a purificação parcial de proteases e quitinases produzidas. Para isolamento de fungos os insetos foram colocados em câmara úmida a 25 ° C, seguido do cultivo em ágar Sabouraud. Os fungos foram submetidos à fermentação submersa em meio MGYP. O extrato bruto foi recuperado por filtração a vácuo e inoculado em *cup-plate*, em meio sólido com caseína 10% (p/v) a 37 ° C. O efeito da temperatura e do pH sobre a atividade proteolítica foi determinada usando azocaseína 1% (p/v) como substrato, em diferentes tampões de pH (5-10) e temperaturas (25 ° C-60 ° C). Cinco isolados fúngicos foram selecionados a partir dos obtidos de *Vatiga illudens* e de *Orthezia* sp. Os extratos selecionados foram submetidos à purificação parcial das proteínas por fracionamento com sulfato de amônio nas frações 0-60% e 60-80% de saturação. Após diálise, foram determinadas concentração protéica, atividade proteolítica, atividade quitinolítica, atividade específica, rendimento e fator de purificação de cada uma das frações e dos extratos brutos. De *V. illudens*, foram identificados os fungos: *Paecilomyces* sp. e *P. javanicus*. A maior diversidade de fungos foi encontrada em *Orthezia* sp., representado por *Fusarium decemcellulare*, *Penicillium aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. fellutanum*, *P. glabrum* e *P. solitum*. Os ascomicetos foram *Eupenicillium javanicum*. Os isolados formaram halos de 10-19 mm de diâmetro em meio sólido e o extrato bruto expressou atividade proteolítica variando entre 1,40-27,07 U/mL. A atividade enzimática da temperatura e pH ótimo variou entre os isolados. Na fração F2 (60-80%) foram registradas as maiores atividades específicas tanto de protease quanto de quitinase. Nos extratos semipurificados de *P. brevicompactum* (C3) e *P. fellutanum* (C1) foram observadas as maiores atividades específicas de protease (18,72 U/mg) e quitinase (0,88 µg/mg), respectivamente.

ABSTRACT

Hydrolytic enzymes are used in many areas of industry and biotechnology, for example of hydrolytic enzymes we can nominate the proteases and chitinases. These enzymes are secreted by fungi that cause diseases in other organisms, and they represent an important virulence factor for them. The aim of this work was to isolate fungi from lace bug (*Vatiga illudens*) and mealybug (*Orthezia* sp.), evaluating the proteolytic potential of the extracts originated from isolates, and to determine the optimal temperature and pH of the enzyme, as well as to perform partial purification of proteases and chitinases produced by the fungi. For fungi isolation, insects were placed in a moist chamber at 25 °C, followed by the inoculum in Petri dishes containing Sabouraud agar. After that, the fungi were subjected to submerged cultivation with MGYP medium. The crude extract was recovered by vacuum filtration and inoculated into cup-plate, in casein solid medium 10% (w/v) at 37 °C. The effect of temperature and pH on the proteolytic activity was determined using azocasein 1% (w/v) as substrate at different pH buffers (5-10) and temperatures (25 °C-60 °C). Five fungal isolates were selected from the obtained from *V. illudens* and *Orthezia* sp. The selected extracts were subjected to partial protein purification by ammonium sulfate fractionation in fractions 0-60% and 60-80% saturation. After dialysis, protein concentration, proteolytic and chitinolytic activity, specific activity, yield and purification factor of each of the fractions and crude extracts were determined. From *V. illudens* the identified fungi were: *Paecilomyces* sp. and *P. javanicus*. In *Orthezia* sp was found the greater diversity of fungi, represented by *Fusarium decemcellulare*, *Penicillium aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. fellutanum*, *P. glabrum*, *P. solitum* and the ascomycetes *Eupenicillium javanicum*. The isolates formed halos of 10-19 mm diameter in solid medium and the crude extract expressed proteolytic activity ranging from 1.40 to 27.07 U/mL. The enzymatic activity of temperature and pH optima varied among isolates. In the F2 fraction (60-80%) were recorded the highest specific activities of proteases and chitinases. The semi-purified extracts of *P. brevicompactum* (C3) and *P. fellutanum* (C1) showed the highest specific activities of protease (18.72 U / mg) and chitinase (0.88 mg / mg), respectively.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 10 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 12 |
| 2.1. Fungos anamórficos | 12 |
| 2.2. Insetos praga | 12 |
| 2.2.1. Percevejo de renda (<i>Vatigailludens</i>) (Drake) | 12 |
| 2.2.2. Cochonilha (<i>Orthezia</i> sp. Bosc, 1784) | 14 |
| 2.3. Fungos como fonte de enzimas proteolíticas e quitinolíticas | 15 |
| 2.4. Proteases | 16 |
| 2.4.1. Classificação das proteases | 16 |
| 2.5. Quitinases..... | 17 |
| 2.5.1. Classificação das quitinases | 18 |
| 3. OBJETIVOS | 20 |
| 3.1. Objetivo geral | 20 |
| 3.2. Objetivos específicos | 20 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 21 |
| 4.1. Coleta dos insetos para o isolamento dos fungos | 21 |
| 4.2. Isolamento dos fungos | 21 |
| 4.3. Identificação dos micro-organismos | 21 |
| 4.4. Fermentação submersa..... | 21 |
| 4.4.1. Meio para crescimento dos fungos e indução das enzimas | 21 |
| 4.5. Determinação da atividade das enzimas | 22 |
| 4.5.1. Determinação da atividade proteolítica em meio sólido | 22 |
| 4.5.2. Determinação da atividade proteolítica quantitativa usando como substrato azocaseína..... | 22 |
| 4.5.3. Avaliação do efeito da temperatura e do pH na atividade proteolítica | 22 |
| 4.6. Purificação parcial das proteases | 22 |
| 4.6.1. Fracionamento com sulfato de amônio | 22 |
| 4.6.2. Diálise dos extratos semipurificados..... | 23 |
| 4.7. Determinação da atividade proteolítica dos extratos semipurificados..... | 23 |
| 4.8. Quantificação de proteínas totais nos extratos proteolíticos semipurificados | 23 |
| 4.9. Determinação da atividade quitinolítica dos extratos semipurificados..... | 24 |
| 4.10. Análise estatística | 24 |
| Capítulo 01. | 25 |

| | |
|---|----|
| Proteases da diversidade de fungos isolados de <i>Vatiga illudens</i> e <i>Orthezia</i> sp..... | 26 |
| Capítulo 02. | 42 |
| Purificação parcial de proteases e quitinases de fungos anamórficos isolados de <i>Vatiga illudens</i> e <i>Orthezia</i> sp. | 43 |
| 6. CONCLUSÃO | 55 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 56 |

1. INTRODUÇÃO

Os micro-organismos que causam patologias em insetos têm ampla distribuição na natureza. Entre esses agentes etiológicos, 80% são fungos, representados por aproximadamente 90 gêneros e mais de 700 espécies, com ocorrência predominante no Brasil (RODRIGUES E LOUREIRO, 2009).

Dos integrantes do Reino Fungi, os deuteromicetos são fungos filamentosos uni e pluricelulares que ocorrem na natureza em diferentes substratos, têm hábito sapróbio, comensal e parasita, reprodução assexuada e sexuada desconhecida, por isso também são denominados de anamórficos (HAWKSWORTH, 2001; DEACON, 2006; SANTANA, 2009).

Entre os fungos anamórficos, Kim et al. (2008) mencionaram *Verticillium lecanii*, *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces farinosus* e *P. fumosoroseus* como distintos entomopatógenos e produtores de compostos ativos contra outros fungos parasitas e também destacaram que essas espécies podem ser fontes para aplicação em controle dos patógenos de plantas e artrópodes.

O desenvolvimento de micopesticidas pode ser uma alternativa viável para obtenção de produtos promissores e ambientalmente amigáveis porque evitam a poluição e riscos para saúde resultantes da utilização dos pesticidas químicos convencionais. Um micopesticida para uso em controle biológico pode ser o próprio fungo, metabólitos secundários ou enzimas extracelulares que são tóxicos somente ao patógeno, podendo causar impacto restrito ao meio ambiente e, dificilmente, promover a indução da seleção de patógenos resistentes a estes produtos (ZHENG et al., 2011).

A utilização de enzimas como agentes de modificação das propriedades funcionais de substratos têm se difundido nos diversos ramos indústrias. Para avaliar a expectativa do valor das enzimas, a empresa The Freedonia Group Inc., especializada em pesquisa de mercado no ramo industrial, elaborou um estudo, World Enzymes Market, no qual houve a indicação que a venda mundial por enzimas terá um crescimento de 6,3% ao ano e alcançará a marca de 7 bilhões de dólares em 2013 (THIMOTEO, 2011).

As enzimas mais empregadas nos processos industriais são as proteases que ocupam posição de destaque devido à sua vasta gama de aplicações e às inúmeras vantagens que apresentam em relação aos demais agentes utilizados para este fim (THYS, 2004). Proteases têm grande importância comercial, representando cerca de 60% do mercado mundial de enzimas (JOHNVESLY E NAIK, 2001; RODARTE et al., 2011). Tais enzimas constituem um amplo e complexo grupo que diferem em propriedades, como especificidade de substrato,

sítio ativo e mecanismo catalítico, pH e temperatura ótima e estabilidade (SUMANTHA et al., 2006).

Outras enzimas que têm destaque e já estão sendo aplicadas como bioinseticida são as quitinases, hidrolases capazes de degradar a quitina, polímero presente nas carapaças de crustáceos, cutículas de insetos e parede celular de fungos. A utilização dessas enzimas quitinolíticas tem destaque principalmente nas indústrias química, farmacêutica, de entomologia médica e na agricultura para controle de fitopatógenos (THIMOTHEO, 2011). As quitinases diferem entre si principalmente quanto à similaridade das sequências dos resíduos de aminoácidos do domínio catalítico e natureza dos produtos liberados pela hidrólise do substrato nas ligações glicosídicas da quitina que resulta em oligômeros e monômeros de *N*-acetilglicosamina (CALA et al., 2007).

Proteases e quitinases são os principais fatores determinantes da virulência dos fungos entomopatogênicos, hidrolisam polímeros constituintes da cutícula, proteínas e quitina (exo e endocutícula) (PATIL et al. 2000; SASSÁ et al. 2008). Os fungos ainda têm pouca representatividade dentre os biopesticidas utilizados na agricultura e na saúde, pois aproximadamente 98% deles correspondem às formulações feitas com *B. thuringiensis* (SCHNEPF et al., 1998; POLANCZYK, 2003). Sendo assim, há uma grande necessidade de se identificar novos micro-organismos produtores de proteases e quitinases, que posteriormente poderão ser aplicadas na obtenção de produtos biotecnológicos, dentre eles os biopesticidas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Fungos anamórficos

Os fungos são cosmopolitas, geralmente isolados de uma diversidade de substratos, constituem importantes componentes dos ecossistemas de regiões de clima tropical, subtropical e temperado (GOMES et al.; 2008).

Entre esses, os fungos anamórficos ou fungos imperfeitos ou deuteromicetos sobressaem-se por sua diversidade e abundância de espécies. Em consequência, destacam-se não só porque contribuem para o equilíbrio ecológico como degradadores de restos orgânicos e reguladores das populações de fitopatógenos, mas também pelo potencial em produzir enzimas e metabólitos secundários de importância industrial (ABARCA et al., 2004).

Atualmente esses fungos são classificados conforme as características morfológicas microscópicas (tamanho, a forma, a ornamentação da superfície do esporo e a conidiogênese), macroscópicas e, as afinidades filogenéticas usando a relação anamorfo-teleomorfo. Todavia, a característica exclusiva de fungos anamórficos é a reprodução assexuada.

Os deuteromicetos compreendem 20.000 espécies, pertencentes a 1700 gêneros distribuídos em três classes: (1) Hyphomycetes: conídios são formados em conidióforos livres ou agregados (sinêmio ou esporodóquio); (2) Coelomycetes: conídios formados em acérvulos estromas, picnídios; (3) Blastomycetes: apresentam micélio estéril, produzindo somente estruturas vegetativas de resistência como clamidósporos, esclerócios e outras estruturas relacionadas (SANTANA, 2009, GEHLOT et al., 2010)

2.2. Insetos praga

O número de espécies de insetos descritas é estimado em aproximadamente um milhão, das quais cerca de 10% são pragas, prejudicando plantas, animais domésticos e o próprio homem (GALLO et al., 2002). Na agricultura, o conceito de inseto-praga está diretamente relacionado com os efeitos econômicos produzidos pela sua alimentação nas plantas.

2.2.1. Percevejo de renda (*Vatiga illudens*) (Drake)

Os percevejos de renda são classificados na família Tingidae (Hemiptera), gênero *Vatiga*. Froeschner (1993) identificou cinco espécies para a região neotropical, *V. illudens*, *V. manihotae* (Drake), *V. pauxilla* (Drake e Poor), *V. varianta* (Drake) e *V. cassiae* (Drake e Hambleton). Destas, *V. illudens* predomina no Brasil (OLIVEIRA et al., 2009).

V. illudens é encontrado, predominantemente, no Brasil, mas também ocorre na área do Caribe (BELLOTTI et al., 2002a). Populações endêmicas têm causado perdas no campo, principalmente no Cerrado e mais recentemente no Sul do país (BELLOTTI et al., 2002a).

Vatiga illudens é conhecido como uma praga associada à cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), a principal espécie cultivada na Amazônia e uma das principais fontes de carboidratos. O cultivo de mandioca encontra-se em diversos contextos ecológicos (terra firme, várzea, Amazônia central, Amazônia periférica) e culturais (grupos indígenas, populações mestiças, caboclos e colonos). A mandioca é um alimento tanto da área urbana quanto das rurais. Por seu papel de destaque na vida cotidiana, tanto material e cultural como econômico, a mandioca é um recurso fitogenético de primeira importância para as populações amazônicas (EMPERAIRE, 2001).

Os adultos de *V. illudens* são de coloração cinza, enquanto as ninfas são esbranquiçadas com escurecimento das antenas e cercos à medida que se desenvolvem (LOZANO et al., 1981). Estes insetos localizam-se inicialmente na face inferior das folhas basais e medianas da planta, mas podem atingir as folhas apicais quando em altas populações (BELLOTTI et al., 2002a).

Ao alimentar-se do protoplasto das células do parênquima foliar, *V. illudens* ocasiona, inicialmente, pontos cloróticos nas folhas, que podem evoluir para tons marrom-avermelhados (BELLOTTI et al., 1999; FARIAS E ALVES, 2004). Este dano se diferencia do causado pelos ácaros pela presença de pontos negros na parte de trás da folha, que são os excrementos dos percevejos (BELLOTTI et al., 2002a; FARIAS E BELLOTTI, 2006).

Em virtude das lesões causadas pela praga, ocorre a redução da fotossíntese, queda prematura das folhas inferiores (LOZANO et al., 1981; FARIAS, 1987) e, no caso de infestações severas, pode ocorrer desfolha completa da planta (BELLOTTI et al., 2002b). A infestação ocorre no início do período de seca e pode causar perdas expressivas no rendimento da cultura (MIRANDA et al., 2009), principalmente em períodos de seca prolongada.

Poucos estudos têm sido feitos visando o controle do percevejo de renda, sendo a maioria com produtos biológicos (JUNQUEIRA et al., 2005; GUIMARÃES et al., 2009; BELLON, 2010), uma vez que ainda não existem produtos químicos registrados para o percevejo de renda (AGROFIT, 2009).

O controle biológico deste inseto ainda é difícil, devido à existência de poucos inimigos naturais com potencial para o controle desta praga (BELLOTTI et al., 1999). O percevejo, *Zelus nugax* Stal (Hemiptera: Reduviidae) (BELLOTTI et al., 2002a) e os fungos entomopatogênicos *B. bassiana*, *Metarhizium anisopliae* (Metsch) e *Sporothrix insectorum* (Hoog e Evans) são alguns inimigos naturais de *V. illudens* (SCHMITT, 2002).

2.2.2. Cochonilha (*Orthezia* sp. Bosc, 1784)

As cochonilhas são classificadas dentro da ordem Hemiptera, subordem Sternorrhyncha. Existem cochonilhas que apresentam o corpo nu e outras possuem o corpo recoberto com cera (GALLO et al., 2002). A cera é elaborada por glândulas epidérmicas, de forma variável, produzindo secreções pulverulentas que assumem aspecto de placas.

Os machos se desenvolvem de maneira semelhante às fêmeas, exceto no último estágio, antes de transformarem-se em adultos. Eles passam por um estágio intermediário, semelhante a um pupário, envolvido por inúmeros filamentos de cera, de onde emergem os adultos. Os machos são menores, com cabeça, tórax e abdome bem definidos, apresentando asas e uma cauda branca alongada formada por fios de cera (PRATES, 1980).

Orthezia sp. tem como hospedeiros plantas cultivadas, ornamentais e silvestres. As plantas ornamentais e silvestres infestadas pela cochonilha servem como fonte de disseminação da praga entre pomares e regiões, por meio do transporte e introdução de mudas infestadas. No Amazonas, a cochonilha ortézia é uma das principais pragas que atacam citros. Tendo em vista que a citricultura se encontra em ascensão no Estado, o controle de pragas é fundamental, pois lotes que apresentam danos causados por insetos perdem seu valor no momento da comercialização (CARVALHO, 2006).

A cochonilha causa danos diretos às plantas infestadas, decorrentes da alimentação do inseto pela sucção da seiva e, também, da introdução de toxinas prejudiciais à planta. Os danos indiretos causados pela *Orthezia* ocorrem pelo aparecimento da fumagina, uma camada preta formada pelo fungo do gênero *Capnodium*, que utiliza o exsudato da cochonilha (líquido açucarado) para sua colonização e multiplicação. A fumagina recobre as folhas da planta dificultando o seu processo de respiração, bem como a realização da fotossíntese. A soma desses fatores ocasiona o enfraquecimento da planta e a conseqüente queda das folhas e dos frutos (CESNIK E FERRAZ, 2003; BARBOSA et al., 2007; MOLINA, 2007).

O controle biológico é uma estratégia que coloca a praga abaixo do seu nível econômico de danos. No caso específico da *O. praelonga*, que é uma das espécies de cochonilha que causam as maiores perdas econômicas em citros no Brasil, este controle vem sendo feito através do fungo entomopatogênico, *Colletotrichum gloeosporioides*. A literatura, entretanto, cita outros fungos, tais como: *B. bassiana*, *B. brongniartii* e *V. lecanii* (FARIA E MAGALHÃES, 2001; WEILER et al., 2011). Há registros também de algumas espécies de insetos das famílias Miridae, Coccinellidae, Chrysopidae, Reduviidae e Drosophilidae como predadores de *O. praelonga* (CESNIK E FERRAZ, 2003).

2.3. Fungos como fonte de enzimas proteolíticas e quitinolíticas

Fungos filamentosos, como os anamórficos, são utilizados em diversos processos industriais para a produção de enzimas e metabólitos (ADRIO E DEMAIN, 2003). Eles sintetizam diversas substâncias, entre elas, uma variedade de enzimas. Entre esses micro-organismos, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus* são eficientes na produção de proteases, bem como várias espécies desses gêneros são geralmente consideradas seguras, GRAS-Generally Regarded As Safe (GERMANO et al., 2003; SANDHYA et al., 2005; DEVI et al. 2008).

Outros fungos que se destacam, mas como entomopatogênicos são *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *Nomureae rileyi* (Farlow) Samson, *Lecanicillium* (Zimm.) Viègas e *S. insectorum*, *Paecilomyces*, *Aschersonia*, *Aspergillus*, *Entomophthora*, *Hirsutella* e *Trichoderma* devido seu papel nas patologias de insetos praga e também porque sintetizam enzimas extracelulares, proteases, quitinases e lipases que tem ação como micoinseticida (ALVES, 1998; MILNER, 2000; SHAH E PELL, 2003).

Os fungos entomopatogênicos apresentam potencial para uso no manejo sustentável de pragas, pois o número de aplicações pode ser reduzida, devido a estes agentes de controle serem capazes de reciclar-se no ambiente, produzindo fonte de inóculo nos hospedeiros que infectarão novas pragas (RIBEIRO, 2009). Além disso, estes fungos se destacam por constituírem 80% das enfermidades responsáveis pelos surtos epizoóticos dos ecossistemas e agrossistemas, o que os tornam uma excelente alternativa com amplo potencial de utilização (PADIN et al. 1995; ALVES, 1998).

No processo patológico para que o micoparasitismo ocorra, a penetração do fungo na cutícula do inseto depende tanto da pressão mecânica, exercida pelo apressório formado pelo agente etiológico, quanto da secreção de enzimas hidrolíticas, como proteases, quitinases e até lipases (TIAGO E FURLANETO, 2003; BARATTO, 2005; DELGADO-ORAMAS, 2005).

Em geral, proteases microbianas são extracelulares e excretadas nos diferentes substratos, inclusive *in vitro* são secretadas no meio de fermentação pelo produtor, simplificando, assim, o processo *downstream* da enzima quando comparado ao das proteases de plantas e animais, pois são facilmente separadas da biomassa celular por filtração (PHADATARE et al., 1993; GUPTA et al., 2002).

Quanto às quitinases ou enzimas quitinolíticas, os fungos ou outros micro-organismos secretam essas enzimas com especificidades diferentes para transformar ou hidrolisar a quitina que devido a sua insolubilidade, tamanho, complexidade molecular e composição heterogênea, esse polímero não é degradada dentro da célula. (COTTRELL et al., 1999).

Em fungos, as quitinases desempenham uma diversidade de funções como, a digestão da parede celular, a formação de septos, a germinação e a diferenciação de esporos, o

crescimento e a autólise de hifas (XIA et al., 2001; KIM et al., 2003; SELVAGGINI et al., 2004; DUO-CHUAN, 2006).

2.4. Proteases

Proteases ou enzimas proteolíticas catalisam a quebra das ligações peptídicas em proteínas. Assim, essas enzimas causam alterações irreversíveis ou degradação dos substratos, que do ponto de vista biológico podem ser importantes, principalmente nos processos fisiológicos, patológicos e também tecnológicos (BARRET et al., 2001).

Estas enzimas executam uma grande variedade de funções fisiológicas complexas. Sua importância em conduzir o metabolismo essencial e as funções regulatórias se torna evidente a partir da sua ocorrência em todos os organismos vivos existentes, têm papel essencial em muitos processos fisiológicos e patológicos, como o catabolismo de proteínas, a coagulação do sangue, o crescimento de tumores e metástases, ativação de zimogênios e o transporte e secreção de proteínas através da membrana (RAO et al., 1998).

Tradicionalmente, as enzimas mais estudadas são as de origem animal ou vegetal, mas as microbianas apresentam maior interesse do ponto de vista da aplicação industrial. Dois terços (2/3) das proteases industriais produzidas são de origem microbiana (ELLAIAH E ADINARAYANA, 2002).

Os micro-organismos são preferidos frente a outras fontes de proteases devido ao pequeno espaço de tempo necessário para cultivo, às propriedades fisiológicas e bioquímicas e, fácil manipulação celular por serem mais facilmente produzidas em larga escala, via fermentação, por serem mais facilmente expressas (clonagem) em organismos de cultivo já estabelecido e pela enorme diversidade microbiana existente que oferece infinitas possibilidades de modos de ação, nas mais diversas condições (RODARTE et al., 2011).

2.4.1 Classificação das proteases

De acordo com a *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUB-MB) as proteases são enzimas pertencentes à classe 3, as hidrolases, e à subclasse 3.4, as peptídeo-hidrolases ou peptidases. Estas enzimas constituem uma grande família (EC 3.4), dividida em endopeptidases ou proteinases (EC 3.4. 21-99) e exopeptidases (EC 3.4.11-19), de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia peptídica (RAO et al., 1998; SUMANTHA et al., 2006).

As endopeptidases podem ser ainda subdivididas de acordo com o grupo reativo no sítio ativo envolvido com a catálise em serina (EC 3.4.21), cisteína (EC 3.4.22), aspártico-

proteínases ou endopeptidases (EC 3.4.23) e metaloproteínases ou metaloendopeptidases (EC 3.4.24) (RAO et al., 1998).

As enzimas proteolíticas também são classificadas em ácidas, neutras e alcalinas em relação à faixa de pH de atividade ótima (SANDHYA et al., 2005). Proteases ácidas, expressam atividade ótima na faixa de pH entre 2,0 e 4,0. Estas enzimas são produzidas principalmente por fungos e utilizadas na produção de queijos, amaciamento de carne, na produção de alimentos fermentados e na limpeza de compostos ácidos (CRUEGER E CRUEGER, 1993; THYS, 2004; RAO E NARASU, 2007).

O outro grupo, proteases neutras a atividade ótima é expressa em pH neutro, são bastante utilizadas nas indústrias de alimentos porque possuem a função de hidrolisar aminoácidos hidrofóbicos, restritos ao pH neutro, reduzindo o amargor das proteínas hidrolisadas nos alimentos (SANDHYA et al., 2005).

As proteases alcalinas tem a maior atividade na faixa de pH 8,0 a 13,0 (GENÇKAL E TARI, 2005), são classificadas como serino proteases e são importantes na formulação de detergentes em pó, auxiliando na remoção de manchas de origem protéica (KUMAR E TAKAGI, 1999; MOREIRA et al., 2003; ESPÓSITO, 2006; RAO E NARASU, 2007).

De maneira análoga ao pH, há uma zona de temperatura para qual a atividade enzimática é máxima. Essa variação ocorre devido a duas tendências antagônicas: o aumento da agitação das moléculas com a elevação da temperatura que aumenta a frequência das colisões entre o substrato e a enzima; e a desnaturação da enzima frente à ação do calor (BRACHT E ISHII-IWAMOTO, 2003).

2.5. Quitinases

As quitinases (EC 3.2.14) são enzimas pertencentes à família das glicosil-hidrolases, catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas (β -1,4) entre as moléculas de *N*-acetilglicosamina (GlcNAc) do polímero denominado quitina, liberando oligômeros e/ou monômeros de GlcNAc (GALANTE, 2006).

Enzimas quitinolíticas ocorrem em uma ampla diversidade de organismos incluindo bactérias, fungos, plantas, invertebrados (principalmente nematóides, insetos e crustáceos) e todas as classes de vertebrados (MIO et. al., 1998; HOWARD et. al., 2003).

Todos os organismos que contêm quitina também sintetizam quitinases, que provavelmente são utilizadas na morfogênese (GOODAY, 1977; ROBERT E SELITRENNIKOFF, 1986; PATIL et al., 2000).

Alguns organismos que não possuem quitina também produzem quitinases para degradar o polímero com propósitos nutricionais ou de defesa (PATIL et al., 2000;

CHRISTODOULOU et al., 2001; HORN et al., 2006), por exemplo, uma vasta variedade de bactérias (CHET et al., 1990; INBAR E CHET, 1991; CHERNIN et al., 1995), actinomicetos (MAHADEVAN E CRAWFORD, 1997) e plantas (SAHAI E MANOCHA, 1993) produzem enzimas quitinolíticas em resposta a indutores no ambiente que contêm quitina.

As enzimas quitinolíticas apresentam aplicações no ramo da indústria e da agricultura. Várias pesquisas relatam a potencial utilização biotecnológica das quitinases em diversas áreas como no controle de fitopatógenos, controle de insetos (causadores de doença ou pragas), indústria química, farmacêutica, como conservantes de alimentos e sementes. Outra aplicação importante das quitinases é a utilização de resíduos contendo quitina, como cascas de camarão e conchas de mariscos, para produção de produtos com maior valor agregado (HOSTER et al., 2005; THIMOTEO, 2011).

Há um crescente interesse na produção de oligossacarídeos de quitina biologicamente ativos através da utilização das quitinases. Esses oligossacarídeos agem como indutores da defesa da planta, envolvidos na sinalização para a formação de nódulos nas raízes e, também, são potencialmente úteis na medicina humana, por exemplo, a quitohexaosa e a quitoheptaosa, mostraram atividade antitumoral (PATIL et al., 2000; AYALA E TRIVIÑO, 2009).

O monômero da quitina, *N*-acetil-*D*-glucosamina, é utilizado na produção de intermediários químicos e farmacêuticos e em produtos alimentares como adoçantes e fatores de crescimento (GYOÈRGY E ROSE, 1995). Um medicamento de uso direto a partir de quitinases tem sido sugerido para a terapia de enfermidades fúngicas, potencializando a atividade de drogas antifúngicas. Elas também podem ser utilizadas como potenciais aditivos em cremes antifúngicos e loções devido a suas aplicações tópicas e em preparações oftalmológicas podem ser acrescidas de quitinases e outros microbicidas (PATIL et al., 2000; DAHIYA et al., 2006).

2.5.1 Classificação das quitinases

Embora as quitinases sejam classificadas sob um único número de acordo com a IUB-MB, este sistema não reflete a diversidade dos mecanismos de ação destas enzimas, com a liberação de produtos distintos e tampouco a relação evolutiva existente entre si (HENRISSAT, 1999).

Baseando-se na natureza dos produtos liberados pela hidrólise do substrato, as quitinases foram agrupadas em exoquitinases, endoquitinases ou β -1,4-*N*-acetilglicosaminidases. Endoquitinases (EC 3.2.1.14) que clivam aleatoriamente em sítios internos da quitina gerando múltiplos de GlcNAc de baixo peso molecular, como quitotetrose, quitotriose e diacetilquitobiose (PATIL et al., 2000; DAHIYA et al., 2006).

Exoquitinases que podem ser divididas em dois subgrupos: quitobiosidases (EC 3.2.1.29) catalisam a liberação de diacetilquitobiose a partir da ponta não redutora da quitina e β (1,4) *N*-acetilglucosaminidases (EC 3.2.1.30) clivam os oligômeros liberados por endoquitinases e quitobiosidases gerando monômeros de GlcNAc (DAHIYA et al., 2006).

De acordo com a similaridade de sequências de resíduos de aminoácidos do domínio catalítico, as quitinases são divididas entre as famílias 18, 19 e 20 das glicosil-hidrolases (HENRISSAT E BAIROCH, 1993). A família 18 é a maior delas, representada por cerca de 180 membros, dentre eles bactérias, vírus, artrópodes, protozoários, plantas, nematódeos e os fungos (HENRISSAT, 1999). A família 19 consiste de quitinases de plantas e algumas bactérias (KERN, 2003). A família 20 inclui as β -*N*-acetilhexosaminidases ou β -*N*-acetilglucosaminidases de bactérias, estreptomicetos e em humanos (DAHIYA et al. 2006; DUO-CHUAN, 2006).

Estruturalmente, as quitinases da família 18 possuem um resíduo de ácido glutâmico na posição 171, essencial ao mecanismo catalítico, enquanto nas quitinases da família 19, os resíduos de ácido glutâmico importantes para o mecanismo de ação encontram-se nas posições 67 e 89. As quitinases pertencentes à família 18 possuem uma estrutura de barril, formada por oito folhas β inclinadas em direção ao interior do mesmo, com igual número de α -hélices formando uma estrutura em forma de anel externo. As quitinases da família 19 contêm dez α -hélices e três folhas β (HENRISSAT E BAIROCH, 1993; ROBERTUS E MONZINGO, 1999).

O sucesso do uso de quitinase para diferentes aplicações está diretamente associado ao potencial quitinolítico da enzima, assim como, da disponibilização dessas enzimas a baixo custo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Isolar de fungos filamentosos anamórficos de percevejo de renda (*Vatiga illudens*) e da cochonilha (*Orthezia* sp.) para caracterização de espécies como fonte de proteases e quitinases como uma estratégia para controle biológico destas pragas.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar e identificar fungos anamórficos do percevejo de renda e da cochonilha;
- Selecionar qualitativamente, entre os isolados, os produtores de enzimas hidrolíticas extracelulares do tipo proteases;
- Determinar a atividade quantitativa de proteases dos fungos selecionados;
- Realizar a caracterização quanto ao pH e a temperatura ótima de atividade das proteases;
- Purificar parcialmente as enzimas de maior atividade proteolítica;
- Determinar a atividade quitinolítica quantitativa dos extratos semipurificados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta dos insetos para o isolamento dos fungos

Neste estudo, os insetos coletados foram percevejo de renda (*V. illudens*) e a cochonilha (*Orthezia* sp.) apresentando sinais de infecção fúngica. Ao término da coleta, os insetos foram acondicionados em sacos plásticos esterilizados em autoclave e transportados para o Laboratório de Micologia da Universidade Federal do Amazonas.

4.2 Isolamento dos fungos

O isolamento dos fungos foi realizado segundo protocolo proposto por Alves et al. (1998) com as seguintes modificações: os insetos foram imersos por dois segundos em álcool 70% (v/v) e, em seguida, em uma solução de hipoclorito de sódio 4% (v/v) durante três minutos. Ao término desse procedimento, cada inseto foi lavado três vezes em água destilada esterilizada.

Para o crescimento dos micro-organismos, o inseto foi armazenado em câmara úmida a 25 °C e, quando observada estruturas do inseto colonizadas pelos fungos, fragmentos do inseto parasitado foram retirados e inoculados em quatro pontos diferentes na superfície de ágar Sabouraud (SAB) + cloranfenicol [0,01%(p/v)], em placa de Petri. Os cultivos foram mantidos a 25°C por sete dias.

4.3 Identificação dos micro-organismos

Os fungos foram identificados na Micoteca URM, da Universidade Federal de Pernambuco, com base nas características fenotípicas das colônias e das estruturas vegetativas e de reprodução obtidas em ágar batata dextrose (BDA), ágar Czapek concentrado-extrato de levedura (CYA) e ágar malte, mantidos a 25°C (BROWN E SMITH, 1957; DOMSCH, et al. 1980; PITT, 1985).

4.4 Fermentação submersa

4.4.1 Meio para crescimento dos fungos e indução das enzimas

Para crescimento dos isolados e indução das enzimas foi utilizado o meio MGYP (extrato de malte 0,3%, glicose 1%, extrato de levedura 0,3% e peptona 0,5%). Como inóculo, foram utilizados 10 discos miceliais medindo 8 mm de diâmetro, retirado da colônia obtida em meio sólido SAB, CYA e BDA. A fermentação foi conduzida em 50 mL de MGYP, em frasco Erlenmeyer de 125 mL, a 25°C e 150 rpm. Após cinco dias, o extrato bruto foi separado da biomassa por filtração a vácuo e em membrana celulósica para microfiltração (0,22 µm).

4.5 Determinação da atividade das enzimas

4.5.1 Determinação da atividade proteolítica em meio sólido

Do extrato bruto recuperado dos cultivos foi retirado 100 µL para inoculação em cada *cup-plate* ($\varnothing = 8$ mm) em meio de caseína (LACAZ, et al. 2002). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As placas foram mantidas a 37°C por 48 horas. A atividade enzimática foi determinada pelo tamanho do halo em milímetros.

4.5.2 Determinação da atividade proteolítica quantitativa usando como substrato azocaseína

A atividade proteolítica foi determinada utilizando-se 150 µL do extrato bruto adicionados a 250 µL de solução de azocaseína 1,0% (p/v) em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2. A mistura reacional foi incubada por uma hora em ausência de luz. Em seguida, foram adicionados 1,2 mL de ácido tricloroacético 10% (p/v) e o resíduo remanescente foi removido por centrifugação (10.000 rpm) por dez minutos. Do sobrenadante, foi retirado 0,8 mL e adicionados 1,4 mL de hidróxido de sódio 1M. No branco, o extrato bruto foi substituído por água destilada (NEVES et al., 2006). Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância de 0,1/min em uma hora a 440 nm e expressa em U/mL (NASCIMENTO et al., 2007).

4.5.3 Avaliação do efeito da temperatura e do pH na atividade proteolítica

Na determinação da temperatura ótima, a mistura reação com azocaseína 1% (p/v) foi incubada a 25 °C, 37 °C, 40 °C, 50 °C 60 °C por uma hora, usando tampão fosfato 0,1M. Para determinação do pH ótimo, a azocaseína 1% (p/v) foi preparada em tampão na faixa de pH 5-10. Os tampões usados foram citrato 0,1 M (pH 5), fosfato 0,1 M (pH 6, 7 e 8) e carbonato-bicarbonato de sódio 0,1 M (pH 9 e 10) (PETINATE et al., 1999).

4.6 Purificação parcial das proteases

4.6.1 Fracionamento com sulfato de amônio

Os extratos que apresentaram melhores resultados na análise de atividade proteolítica quantitativa foram submetidos à purificação parcial das proteínas por fracionamento com sulfato de amônio segundo método descrito por Vilela et al. (1973). O fracionamento foi feito em duas etapas sucessivas, utilizando-se as frações de 0-60% (F1) e 60-80% (F2) de sulfato de amônio.

Na etapa F1, foram adicionados 20 mL do extrato em um becker de 250 mL e, em seguida, adicionados a quantidade necessária de sulfato de amônio (7,8 g) para precipitar as

enzimas, diluindo-se o sal sob agitação. Esta reação foi realizada em banho de gelo. Após completa diluição do sal, a solução será centrifugada a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante recuperado da fração F1 foi saturado com a quantidade de sulfato de amônio calculada para o volume recuperado, repetindo-se o mesmo procedimento descrito acima. As amostras protéicas foram ressuspensas em 300 µL de tampão fosfato 1mM, pH 7,2 e submetidas à diálise para determinação da atividade proteolítica.

4.6.2 Diálise dos extratos semipurificados

As frações recuperadas e ressuspensas em tampão fosfato 1mM, pH 7,2 foram transferidas para sacos de diálise tratados conforme recomendações do fabricante. A diálise foi realizada a 4°C, em agitador magnético Nova Ética® constante durante 24 horas, trocando-se o tampão a cada 12 horas. As frações dialisadas foram transferidas para microtubos do tipo Eppendorf® 1,5 mL. As amostras dialisadas foram mantidas sob refrigeração para as análises posteriores.

4.7 Determinação da atividade proteolítica dos extratos semipurificados

A atividade proteolítica dos extratos semipurificados será realizada como descrito no item 4.5.2.

4.8 Quantificação de proteínas totais nos extratos proteolíticos semipurificados

A concentração de proteínas totais dos extratos semipurificados foi determinada pelo método de Bradford (1976). Como padrão foi utilizada solução de soro de albumina bovina [(BSA) (1mg/mL)]. De cada amostra do extrato proteolítico semipurificado foi retirado 50 µL para ser adicionado em 2,5 mL da solução do reagente de Bradford. As amostras foram incubadas a 25 °C por 5 minutos. Em seguida, a absorvância foi determinada a 595 nm.

A quantidade de proteína, em mg, foi determinada utilizando-se uma curva padrão com BSA, concentração de 0-20 µg/mL. A atividade específica (AE) foi então calculada pela razão:

$$AE = \frac{U/mL}{mg/proteína}$$

4.9 Determinação da atividade quitinolítica dos extratos semipurificados

A atividade das quitinases foi determinada pelo método de Nahar et al (2004). De cada extrato semi-purificado foi retirado 0,1 mL para ser adicionado a 0,2 mL da solução de quitina coloidal 1% (p/v) em tampão acetato 50 mM pH 5,2. As amostras foram incubadas a 50 °C por 30 minutos. A quitina residual foi separada por centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante recuperado para a determinação da atividade quitinolítica. Para a quantificação dos açúcares redutores liberados foram retirados 250 µL de cada sobrenadante que foram adicionados a 300 µL de ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller 1959) e a reação enzimática foi interrompida em banho-maria fervente por cinco minutos. A leitura foi realizada a 575nm. A curva padrão (Tabela 2) para a quantificação dos açúcares redutores liberados foi feita com *N*-acetilglicosamina, nas concentrações de 50 a 500 µg/mL em água destilada. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1 µg de *N*-acetilglicosamina liberada por mL da solução da enzima nas condições da reação. A atividade específica (AE) foi então calculada pela razão:

$$AE = \frac{\mu\text{g/mL}}{\text{mg/proteína}}$$

Utilizou-se uma curva padrão de *N*-acetilglicosamina preparada a partir de uma solução estoque de 1 mg/ml *N*-acetilglicosamina (NAcGlc).

4.10 Análise estatística

Os resultados das atividades enzimáticas foram submetidos à análise estatística descritiva (média, análise de variância e desvio padrão) e para o cálculo da diferença entre as médias foi realizado o Teste de Tukey (5%) para comparação de médias e utilizando-se o software Minitab 16.

Capítulo 01

Publicado no livro Biodiversidade Amazônica: caracterização, ecologia e conservação. 1 ed.
Manaus: EDUA, 2012, p. 55-67.

Proteases da diversidade de fungos isolados de *Vatiga illudens* e *Orthezia* sp.

Jéssica Ferreira BARRONCAS, Jadson Diogo Pereira BEZERRA, Tamiris Rio Branco da FONSECA, Meire Rossy Oliveira da CRUZ, Cristina Maria de SOUZA-MOTTA, Maria José dos Santos FERNANDES, Maria Francisca Simas TEIXEIRA

ABSTRACT

Proteases are an important virulence factor for entomopathogenic fungi therefore has a fundamental role in the penetration of the insect cuticle. This study aimed to isolate fungi from lace bug (*Vatiga illudens*) and mealybug (*Orthezia* sp.), as well as evaluating the proteolytic potential of the crude extracts of the isolates and to determine the optimal temperature and pH of the enzyme. For fungi isolation, insects were placed in a moist chamber at 25 °C, followed by cultivation on Sabouraud agar with chloramphenicol. The isolates were submitted to submerged fermentation in malt extract-glucose and yeast extract. The enzyme extract was recovered by vacuum filtration and inoculated into cup-plates, in medium supplemented with solid casein substratum at 37 °C. After 48 h, proteolytic activity was measured in millimeters. The effect of temperature and pH on the proteolytic activity was determined using azocasein 1% (w/v) as substrate in different buffers (pH 5-10) and temperatures (25 °C-60 °C). From the insects were isolated 14 anamorphic fungi and two representatives of the phylum Ascomycota. From *V. illudens* isolates, some fungi were identified: *Paecilomyces* sp. and *P. javanicus*. The greatest diversity of fungi was found in *Orthezia* sp., represented by *Fusarium decemcellulare*, *Penicillium aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. fellutanum*, *P. glabrum* and *P. solitum*. The ascomycetes were *Eupenicillium javanicum*. On solid medium, the isolates formed halos with 10-19 mm in diameter and the crude extract had a

proteolytic activity ranged from 1.40 to 27.07 U/mL. Temperature and pH optimum enzyme activity varied among isolates.

INTRODUÇÃO

Estima-se que aproximadamente 250 mil espécies de insetos possam ser consideradas pragas da agricultura ou pragas urbanas, ou seja, em função do aumento da sua densidade, causam perda econômica ao homem (Tiago e Furlaneto 2003; Brechelt 2004).

Atualmente, a prática mais utilizada para o controle de pragas ainda é o uso de inseticidas químicos, mas o uso de microrganismos como agentes de controle biológico apresentou um crescimento significativo como alternativa à redução a esses produtos químicos devido aos danos que eles ocasionam ao homem e ao ambiente (Butt *et al.* 2001).

Em geral, os fungos entomopatogênicos destacam-se por constituírem 80% das causas de enfermidades responsáveis pelos surtos enzoóticos e epizoóticos dos ecossistemas e agrossistemas, o que os tornam uma excelente alternativa para utilização no controle biológico (Padin *et al.* 1995; Alves 1998).

A capacidade de invasão dos fungos entomopatogênicos via tegumento, altamente especializada, é uma característica que os proporciona uma vantagem quando comparados a outros agentes patogênicos como os vírus e bactérias que precisam ser ingeridos.

A invasão do fungo resulta da ação conjunta da pressão física e atividade enzimática de tipo hidrolítica específica, correspondente a enzimas como proteases e quitinases (Tiago e Furlaneto 2003; Delgado-Oramas 2005).

Proteases têm papel importante no metabolismo de fungos, pois são fatores de virulência que tem envolvimento nos processos de formação e germinação dos esporos. Estas enzimas são as primeiras a atuarem na cutícula do inseto por meio da hidrólise das proteínas, atividade

que proporciona a conversão do tecido do inseto e ação de outras enzimas, como as quitinases (Roberts *et al.* 1992; Bidochka *et al.* 1997; Alves 1998).

Estudos para descoberta de novos micro-organismos com fonte de proteases podem auxiliar na caracterização de potenciais isolados para o controle biológico, assim como, fornecer conhecimentos para o melhor entendimento de aspectos básicos da biologia do fungo (Alves, 1998; Franceschini *et al.* 2001). O objetivo deste trabalho foi isolar fungos com potencial proteolítico de insetos considerados pragas agrícolas e proceder a caracterização parcial das enzimas para futura aplicação industrial.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta dos insetos

Os insetos coletados foram percevejo de renda (*Vatiga illudens*) (Hemiptera: Tingidae) e a cochonilha (*Orthezia* sp.) (Hemiptera: Ortheziidae) apresentando sinais de infecção fúngica. Ao término da coleta, os insetos foram acondicionados em sacos plásticos esterilizados e transportados para o laboratório.

Isolamento do fungo

O isolamento dos fungos foi realizado segundo protocolo proposto por Alves *et al.* (1998) com algumas modificações: os insetos foram imersos por dois segundos em álcool 70% (v/v) e, em seguida, em uma solução de hipoclorito de sódio 4% (v/v) durante três minutos. Ao término desse procedimento, cada inseto foi lavado três vezes em água destilada esterilizada. Para o crescimento dos micro-organismos, o inseto foi armazenado em câmara úmida a 25 °C e, quando observada estruturas do inseto colonizadas pelos fungos, fragmentos do inseto parasitado foram retirados e inoculados em quatro pontos diferentes na superfície de ágar Sabouraud + cloranfenicol [0,01%(p/v)], em placa de Petri. Os cultivos foram mantidos a 25 °C por sete dias.

Identificação dos micro-organismos

Os fungos foram identificados na Micoteca URM, da Universidade Federal de Pernambuco, com base nas características fenotípicas das colônias e das estruturas vegetativas e de reprodução obtidas em ágar batata dextrose (BDA), ágar Czapek concentrado-extrato de levedura (CYA) e ágar malte, mantidos a 25 °C (Brown e Smith 1957; Domsch *et al.* 1980; Pitt 1985).

Fermentação submersa

Meio para crescimento dos fungos e indução das enzimas

Para crescimento dos isolados e indução das enzimas foi utilizado o meio MGYP (extrato de malte 0,3%, glicose 1%, extrato de levedura 0,3% e peptona 0,5%). Como inóculo, foi utilizado disco micelial, medindo 8 mm de diâmetro, retirado da colônia obtido em meio sólido SAB, CYA e BDA. A fermentação foi conduzida 50 mL de MGYP, em frasco Erlenmeyer de 125 mL, a 25 °C, 150 rpm por cinco dias. Em seguida, o extrato bruto foi separado da biomassa por filtração a vácuo e em membrana celulósica (0,22 µm).

Determinação da atividade proteolítica em meio sólido

Do extrato bruto recuperado dos cultivos foi retirado 100 µL para inoculação em cada *cup-plate* ($\varnothing = 8\text{mm}$) em meio de caseína (Lacaz *et al.* 2002). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As placas foram mantidas a 37 °C por 48 horas. A atividade enzimática foi determinada pelo tamanho do halo em milímetros.

Determinação da atividade proteolítica quantitativa

A atividade proteolítica foi determinada utilizando 150 µL do extrato bruto adicionados a 250 µL de solução azocazeína 1,0% em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2. A mistura reacional foi incubada por uma hora em ausência de luz. Em seguida, foi adicionado 1,2 mL de ácido

tricloroacético 10% (p/v) e o resíduo remanescente foi removido por centrifugação (10.000 rpm) por 10 minutos. Do sobrenadante foi retirado 0,8 mL e adicionada a 1,4 mL de hidróxido de sódio 1M. No branco, o extrato bruto foi substituído por água destilada (Neves *et al.* 2006). Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorvância de 0,1/min em uma hora a 440nm e expressa em U/mL (Nascimento *et al.* 2007).

Efeito da temperatura e do pH na atividade proteolítica

Na determinação da temperatura ótima, a mistura reação com azocaseína 1% (p/v) foi incubada a 25 °C, 37 °C, 40 °C, 60 °C por uma hora, usando tampão fosfato 0,1M. Para determinação do pH ótimo, a azocaseína 1% (p/v) foi preparada em tampão na faixa de pH 5-10. Os tampões usados foram citrato 0,1 M (pH 5 e 6), fosfato 0,1 M (pH 6, 7 e 8) e carbonato-bicarbonato de sódio 0,1 M (pH 9 e 10) (Petinate *et al.* 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversidade de fungos isolados de *V. illudens* e *Orthezia* sp.

Dos insetos examinados para o isolamento de fungos entomopatogênicos, nas condições de análise, 87,5% dos isolados foram representantes do grupo deuteromicetos e 12,5 % do filo Ascomycota. Os deuteromicetos são fungos anamórficos que representam a forma conidial dos Ascomycota e Basidiomycota, cuja reprodução sexual raramente ocorre na natureza ou é ausente no ciclo vital. Segundo as citações de Guarro *et al* (1999), tornou-se dispensável conservar o termo deuteromicetos, pelo menos para os fins de identificação. Essa terminologia foi oficialmente mantida, mas sem o reconhecimento desses fungos particularizados em uma classe. Já os representantes do filo Ascomycota têm como principal característica que os diferenciam dos demais fungos, a presença do asco e do ascoma (Silva e Coelho 2006).

Na figura 1 está apresentados os resultados referentes à diversidade de fungos isolados de *V. illudens* e de *Orthezia* sp. Da totalidade de fungos isolados, entre os representantes dos deuteromycetes, nas condições de cultivo, 12,5% cresceram a partir do percevejo-de-renda (*V. illudens*), sendo eles, *Paecilomyces* sp. e *P. javanicus* (Frieder. & Bally). Este gênero está entre os principais entomopatogênicos, além de *Metarhizium* Sorokin, *Beauveria* Vuillemin, *Verticillium* Nees, *Nomuraea* Moubanc, *Hirsutella* Pat., *Aschersonia* Mont., *Entomophthora* Fresenius (Alves 1998; Faria e Magalhães 2001). *Paecilomyces* Bainier são comumente boas fontes de enzimas. Esta propriedade confere uma notável versatilidade metabólica, proporcionando a forma de vida sapróbia em uma variedade de substratos, assim como, penetrarem ativamente em insetos vivos, nematóides e em outros fungos, atividade que sugere que tais micro-organismos possam ser processados para produção de micoinseticida (Gupta *et al.* 1993; Kim *et al.* 2007).

Na cochonilha (*Orthezia* sp.), o quantitativo de isolados foi superior (87,5%) quando comparado ao do percevejo de renda, sendo que 75% foram identificados como deuteromicetos [*Fusarium decemcellulare* Brick, *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx, *P. brevicompactum* Dierckx, *P. fellutanum* Biourge, *P. glabrum* (Wehmer) Westling, *P. solitum* Westling] e 12,5% do filo Ascomycota (*Eupenicillium javanicum*). Fungos do gênero *Fusarium* Link podem ocorrer sobre plantas e insetos. As espécies de *Fusarium* que ocorrem sobre insetos podem se comportar como patógenos pouco virulentos, com exceção daqueles que ocorrem em coccídeos (Alves 1998). Com relação aos estes isolados de *Penicillium*, não existe registro na literatura a cerca da classificação como entomopatogênicos. Todos os *Penicillium* isolados neste trabalho, exceto *P. glabrum* já foram isolados do café (*Coffea arabica* L.) e também verificados como produtores de proteases (Rodarte *et al.* 2011). A presença de *E. javanicum* tem sido constatada em rizosfera de girassol, folhas desidratadas de plantas medicinais e no solo (Souza-Motta *et al.* 2003; Silva e Teixeira 2006; Fraga *et al.* 2010).

{ Inserir Figura 1 }

Atividade proteolítica dos fungos isolados

No parasitismo causado por fungos em insetos, enzimas hidrolíticas como as proteases, assim como, as esterases são excretadas para o processo de adesão, então promovem alterações na superfície do tegumento do inseto, proporcionando a absorção de nutrientes e o crescimento dos fungos (Tiago e Furlaneto 2003).

A importância das proteases como fator de virulência e a aplicação dessas enzimas em diversos setores da indústria tem destaque para pesquisa biotecnológica, especialmente em processos tradicionais para produção ou melhoramento de alimentos ou para inovação (Sena *et al.* 2006).

Nos testes de avaliação da atividade proteolítica, os resultados demonstraram que todos os isolados obtidos a partir do percevejo de renda *V. illudens* e da cochonilha *Orthezia* sp. produziram as enzimas pela tecnologia da fermentação submersa. No meio sólido, nos teste de *cup-plate*, o maior halo de degradação dentre os isolados provenientes de *V. illudens* foi determinado no extrato de *Paecilomyces* sp., diâmetro de $11,0 \text{ mm} \pm 0,10$ (Tabela 1). Rodarte *et al.* (2011) ao avaliarem a atividade proteolítica de bactérias, fungos filamentosos e leveduras endofíticas, detectaram que *Paecilomyces* sp. expressou halo com diâmetro de 1 a 5mm.

Quanto aos isolados oriundos de *Orthezia* sp, C2 (*Penicillium aurantiogriseum*), se destacou apresentando halo de $19,0 \pm 0,10 \text{ mm}$ de diâmetro (Tabela 1). Djamel *et al.* (2009), quando avaliaram 253 isolados de *Penicillium* para identificar produtores de protease, definiram como critério para seleção de isolados promissores aqueles com halo maior que 9 mm. Considerando este critério, todos os isolados deste trabalho podem ser considerados promissores quanto à produção de proteases para futuro estudo e aplicação em bioprocessos.

A tabela 1 apresenta a atividade das proteases, a temperatura e o pH ótimo de atividade dessas enzimas produzidas por fermentação submersa dos fungos anamórficos e ascomicetos isolados de *V. illudens* e *Orthezia* sp. Todos os isolados destes insetos produziram proteases com atividade variando de 10,0 a 27,60 U/mL, porém foram dois isolados de *Penicillium brevicompactum* [(C3) 27,60 e (C5) 27,07 U/mL] que expressaram as maiores atividades proteolíticas, seguidos de *Penicillium aurantiogriseum* (C10) e *Penicillium fellutanum* (C1) com valores de atividade proteolítica inferior 23,66% e 20,33%, respectivamente, em relação ao maior produtor dessas enzimas. O gênero *Penicillium*, um dos mais importantes fungos anamórficos, produz uma variedade de biocompostos (metabólitos primários e secundários), como enzimas, alcalóides, terpenóides e antimicrobianos, estes ativos contra bactérias Gram-positivas (Link e Onofre 2010). Ali *et al.* (2010) e Rodarte *et al.* (2011) citam proteases também produzidas por essas espécies, mas de isoladas de outros substratos.

{ Inserir Tabela 1 }

Efeito da temperatura e do pH na atividade proteolítica

Nos extratos enzimáticos analisados, em média a temperatura e o pH ótimo variaram de 25 °C a 60 °C e de 5 a 10, respectivamente. Estes resultados revelam a importância das proteases desses fungos para aplicação em diversos processos biotecnológicos, incluindo a aplicação dos próprios micro-organismos como micoinseticidas devido produzirem proteases extracelulares.

A máxima atividade proteolítica dos fungos do percevejo de renda foi determinada a 50 °C e, em pH 6,0, tanto para *P. javanicus* quanto para *Paecilomyces* sp. Proteases de *P. lilacinus* expressaram temperatura ótima a 60 °C quando o bioprocessamento foi realizado também em meio líquido (Bonants *et al.* 1995). Rodarte *et al.* (2011) verificaram que a atividade de protease de um isolado de *Paecilomyces* sp. aumentou em pH mais básicos.

A atividade ótima das proteases dos fungos da cochonilha foi determinada para maioria dos isolados a 40 °C e 60 °C. Quanto ao pH, os fungos produziram proteases ácidas (pH 5,0 e 6,0), neutras (pH 7,0) e alcalinas (pH 8, 9 e 10), havendo predominância de proteases alcalinas. Apesar de alguns fungos serem da mesma espécie, as proteases se mostraram específicas aos isolados. A atividade proteolítica e pH ótimo das proteases de *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. fellutanum*, e *P. solitum* foram semelhantes às obtidas por Rodarte *et al.* (2011). Proteases alcalinas possuem aplicação comercial na indústria de detergentes, de couro, processamento de carnes, pescados e derivados lácteos, na recuperação de prata, para fins medicinais, na indústria química e também no tratamento de resíduo (Gupta *et al.* 2002; Giongo 2006; Sumantha *et al.* 2006).

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos sugerem a predominância de fungos anamórficos, com maior frequência de espécies de *Penicillium* em *Orthezia* sp. e somente representantes do gênero *Paecilomyces* associados a *V. illudens*. Os dados indicam também que todos os isolados produzem proteases com características para aplicação em processos biotecnológicos, inclusive para controle biológico.

REFERÊNCIAS CITADAS

- Ali, N.H.; Mohamed, L.A; Ali, T.H. 2010. Partial purification and some properties of milk-clotting enzyme produced by: *Penicillium brevicompactum* NRC-829. 32 (4): 204-211.
- Alves, S.B. 1998. Fungos entomopatogênicos, p 289-382. In: ALVES, S.B. (Eds.). *Controle microbiano de insetos*. 2a ed. Piracicaba: Esalq.
- Alves, S.B.; Almeida, J.E.M.; Moino, A.; Alves, L.F.A. 1998. Técnicas de laboratório, p 289-382. In: ALVES, S.B.(Eds.). *Controle microbiano de insetos*. 2a ed. Piracicaba: Esalq.

- Bidochka, M.J.; Leger, R.J.S.; Stuart, A.; Gowanlockl, K. Nuclear rDNA phylogeny in the fungal genus *Verticillium* and its relationship to insect and plant virulence, extracellular proteases and carbohydrases. *Microbiology*, 145: 955-963.
- Bonants, P.J.M.; Fitters, P.F.L.; Thijs, H.; Belder, E.; Waalwijk, C.; Henfling, J.W.D.M. 1995. A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne* hapla eggs. *Microbiology*, 141:775-784.
- Brechelt, A. 2004. *O Manejo Ecológico de Pragas e Doenças*. Rede de Ação em Praguicidas e suas Alternativas para a América Latina (RAP-AL), Santiago de Chile, Chile. 33p.
- Brown, A.H.S. e Smith, G.. 1957. The genus *Paecilomyces* Bainier and its perfect stage *Byssochlamys* Westling. *Trans. Brit. mycol. Soc*, 40 (1): 17-89.
- Butt, T.M.; Jackson C.; Magan, N. 2001. Fungal Biological Control Agents: Progress, Problems and Potential. p.1-8. In: Butt, T.M.; Jackson, C.; Magan, N. (Eds) *Fungi as Biocontrol Agents*. Progress, Problems and Potential. CABI Publishing. Eds, London.
- Delgado-Oramas, B.P. 2005. *Caracterización del hongo nematofago cepa IMI SD 187 de Pochonia chlamydosporia var catenulata (Kamyscho ex Barron y Onions) Zare y Gams*. Tese de Doutorado. Universidad Agraria de la Habana Fructuoso Rodríguez Pérez, Cuba. 124p.
- Djamel, C.; Ali, T.; Nelly, C. 2009. Acid protease production by isolated species of *Penicillium*. *European Journal of Scientific Research*, 25 (3): 469-477.
- Domsch, K.H.; Gams, W.; Anderson, T.H. 1980. *Compendium of soil fungi*. Volume 1. London, New York: Academic Press. 859p.
- Faria, M.R.; Magalhães, B.P. 2001. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 22: 18-21.
- Fraga, M.E.; Pereira, M.G.; Barbosa, D.J.; Melo, M.P. 2010. Diversidade de Trichocomaceae isoladas de solo em dois ecossistemas florestais. *Ciência Florestal*, 20 (1): 167-175.
- Franceschini, M.; Guimarães, A.P.; Camassola, M.; Frazzon, A.P.; Baratto, C.M.; Kogler, V.; Silva, M.V.; Dutra, V.; Nakazoto, L.; Castro, L.; Santi, L.; Vainstein, M.H.; Schrank, A.

2001. Biotecnologia aplicada ao controle biológico: o entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 4: 32-37.
- Galvez-Mariscal A.; Lopez-Munguia A. 1991. Production and characterization of a dextranase from an isolated *Paecilomyces lilacinus* strain. *Appl Microbiol Biotechnol*, 36: 327-331.
- Giongo, J.L. 2006. *Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de Bacillus sp.* Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 95p.
- Guarro, J.; Gene, J.; Stchigel, A.M. 1999. Developments in Fungal Taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev*, 12 (3): 454-500.
- Gupta, S.C.; Leathers, T.D.; Wicklow, D.T. 1993. Hydrolytic enzymes secreted by *Paecilomyces lilacinus* cultured on sclerotia of *Aspergillus flavus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 39: 99-103.
- Gupta, R.; Beg, Q.K.; Khan, S.; Chauhan, B. 2002. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl Microbiol Biot*, 60:381-395.
- Kim, J.J.; Goettel, M.S.; Gillespie, D.R. 2002. Potential of *Lecanicillium* species for dual microbial control of aphids and the cucumber powdery mildew fungus, *Sphaerotheca fuliginea*. *Biological Control*. 40: 327–332
- Lacaz C.S.; Porto E.; Martins J.E.C.; Heins-Vacarri E.M.; Melo N.K. 2002. *Tratado de Micologia Médica*. Sarvier Press, São Paulo, 2002.
- Link, S.; Onofre, S.B. 2010. Microrganismos epifíticos da vassourinha - *Baccharis dracunculifolia* D. C.(Asteraceae). *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente*, 3 (1): 131-143.

- Nascimento, W.C.A.; Silva, C.R.; Carvalho, R.V.; Martins, M.L.L. 2007. Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus* sp. termofílico. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 27(2): 417-421.
- Neves, K.C.S.; Porto, A.L.F.; Teixeira, M.F.S. 2006. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. *Acta Amaz.*, 36 (3): 299-306.
- Padin, S.B.; Dal Bello, G.M.; Vasicek, A.L. 1995. Potencial bioinsecticida de hongos entomopatogênicos de pragas em grãos armazenados. *Revista de la Facultad de Agronomía*, Maracaibo, 15 (1): 1-7.
- Petinate, S.D.G.; Martins, R.M.; Coelho, R.R.R.; Meirelles, M.N.L.; Branquinha, M.H.; Vermelho, A. B. 1999. Influence of growth medium in proteinase and pigment production by *Streptomyces cyaneus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94 (2): 173-177.
- Pitt, J. I. 1985. *A laboratory guide to common Penicillium species*. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Research. 184p.
- Roberts, D.W.; Gupta, S; St. Leger, R.J. 1992. Metabolite production by entomopathogenic fungi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 27: 325-347.
- Rodarte, M.P; Dias, D. R.; Vilela, D. M.; Schwan, R. F. 2011. *Acta Scientiarum*. 33 (3), 457-464.
- Sena, A.R.; Koblitz, M.G.B.; Góes Neto, A.; Uetanabaro, A.P.T. 2006. Seleção de fungos do semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. *Sitientibus*, 35: 91-98.
- Silva, R.R.; Coelho, G.D. 2006. *Fungos principais grupos e aplicações biotecnológicas*. Instituto de Botânica – IBt, São Paulo. 21p.
- Silva, C.; Teixeira, M.F.T. 2006. Monitoramento de fungos toxigênicos em plantas medicinais comercializadas na cidade de Manaus-Amazonas-Brasil. I Encontro de Pós-graduação do Amazonas. II Mostra POSGRAD-FAPEAM.

- Soares, F.E.F.; Braga, F.R.; Geniêr,H.L.A.; Araújo, J.V.; Ferreira, S.R.; Araujo, J.M.; Tavela, A.O.; Vilela, V.L.R.; Queiróz, J.H. 2010. Optimization of medium composition for protease production by *Paecilomyces marquandii* in solid-statefermentation using response surface methodology. *African Journal of Microbiology Research*, 4 (24): 2699-2703.
- Soares, F.E.F.; Braga, F.R.; Geniêr,H.L.A.; Araújo, J.V.; Campos, L.B.; Queiróz, J.H. *In vitro* larvicidal action of *Paecilomyces marquandii* crude extract. *African Journal of Microbiology Research*, 5 (21): 3515-3519.
- Souza-Motta, C.M.; Cavalcanti, M.A.Q.; Fernandes, M.J.S.; Lima, D.M.M.; Nascimento, J.P.; Laranjeira, D. Identification and characterization of filamentous fungi isolated from the sunflower (*Helianthus annus* L.) rhizosphere according to their capacity to hydrolyse inulin. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34: 273-280
- Sumantha, A.; Larroche, C.; Pandey, A. 2006. Microbiology and IndustriaBiotechnhology of food-grade protease: a perspective. *FoodTechnol. Biotechol*, 44(2): 211-220.
- Tiago, P.V.; Furlaneto, M.C. 2003. O papel de proteases degradadoras de cutícula produzidas por fungos entomopatogênicos. *Revista do Programa de Ciências Agro-Ambientais*, 2 (1): 40-51.

Tabela 1 – Atividade proteolítica dos isolados fúngicos em meio sólido e atividade de protease dos testes quantitativos (U/mL).

| Isolados | Halo (mm) | Atividade de protease (U/mL) | Temperatura ótima (°C) | pH ótimo |
|--|------------------|-------------------------------------|-------------------------------|-----------------|
| Filo Ascomycota | | | | |
| <i>Eupenicillium javanicum</i> C13 | 11,0 ± 0,48 | 2,20 | 40 | 10 |
| <i>Eupenicillium javanicum</i> C14 | 11,0 ± 0,00 | 1,87 | 25 | 10 |
| Fungos Anamórficos | | | | |
| <i>Fusarium decemcellulare</i> (C6) | 11,0 ± 0,06 | 1,40 | 60 | 5 |
| <i>Paecilomyces javanicus</i> (PR1) | 10,0 ± 0,06 | 7,80 | 50 | 6 |
| <i>Paecilomyces</i> sp. (PR2) | 11,0 ± 0,10 | 11,87 | 50 | 6 |
| <i>Penicillium aurantiogriseum</i> (C10) | 15,5 ± 0,03 | 21,07 | 60 | 8 |
| <i>Penicillium aurantiogriseum</i> (C11) | 10,0 ± 0,00 | 3,87 | 60 | 9 |
| <i>Penicillium aurantiogriseum</i> (C2) | 19,0 ± 0,06 | 1,40 | 60 | 7 |
| <i>Penicillium aurantiogriseum</i> (C9) | 10,0 ± 0,00 | 1,13 | 50 | 9 |
| <i>Penicillium brevicompactum</i> (C3) | 12,0 ± 0,17 | 27,60 | 40 | 10 |
| <i>Penicillium brevicompactum</i> (C4) | 12,0 ± 0,00 | 2,53 | 40 | 10 |
| <i>Penicillium brevicompactum</i> (C5) | 14,5 ± 0,13 | 27,07 | 60 | 6 |
| <i>Penicillium fellutanum</i> (C1) | 14,0 ± 0,06 | 20,33 | 50 | 10 |
| <i>Penicillium fellutanum</i> (C8) | 15,5 ± 0,03 | 18,87 | 40 | 7 |
| <i>Penicillium glabrum</i> (C7) | 12,0 ± 0,14 | 0,40 | 25 | 9 |
| <i>Penicillium solitum</i> (C12) | 10,0 ± 0,00 | 1,13 | 50 | 7 |

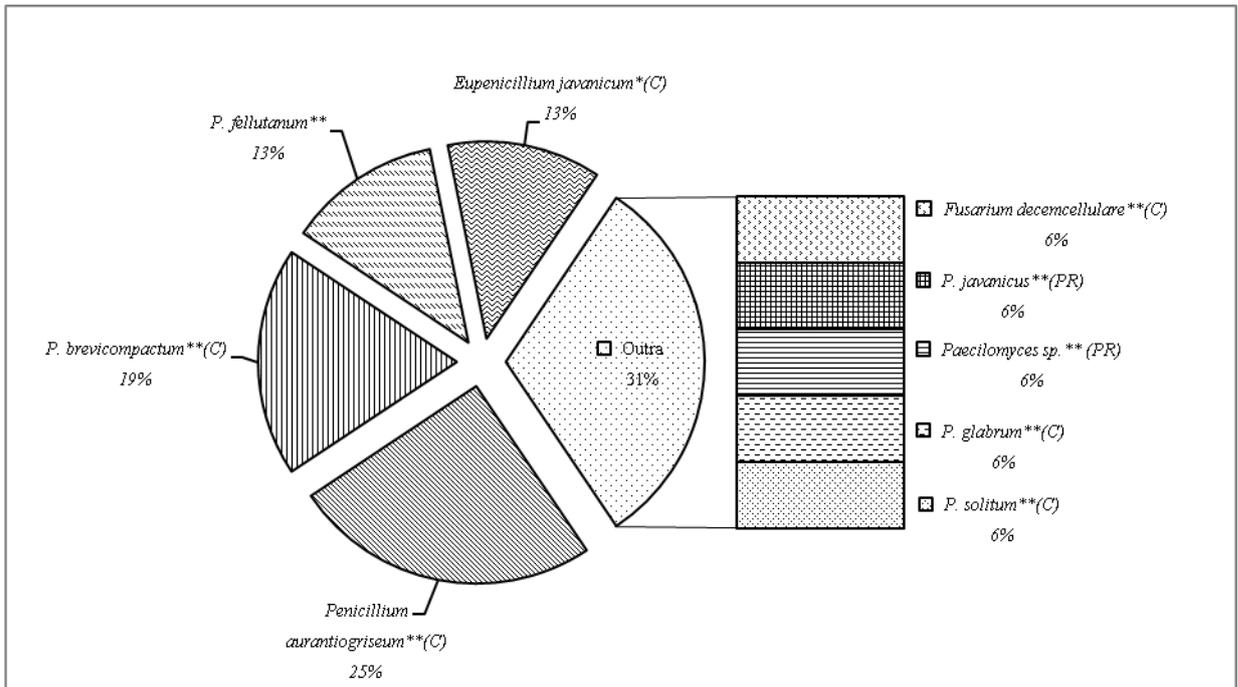


Figura 1 – Frequência e diversidade de fungos isolados de *Vatiga illudens* (PR) e *Orthezia* sp. (C). * Representantes do filo Ascomycota. **Representantes do grupo deuteromycetes.

Cristina Maria de Souza-Motta

Coleção de Culturas de Fungos URM, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil

Jadson Diogo Pereira Bezerra

Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil

Jéssica Ferreira Barroncas

Programa de Pós-graduação em Diversidade Biológica, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas, Brasil

Maria Francisca Simas Teixeira

Coleção de Culturas DPUA, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas, Brasil

Maria José dos Santos Fernandes

Coleção de Culturas de Fungos URM, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil

Meire Rossy Oliveira da Cruz

Programa de Pós-graduação em Diversidade Biológica, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas, Brasil

Tamiris Rio Branco da Fonseca

Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas, Brasil

Capítulo 02

Purificação parcial de proteases e quitinases de fungos anamórficos isolados de *Vatiga illudens* e *Orthezia* sp.

Partial purification of proteases and chitinases of anamorphic fungi isolated from *Vatiga illudens* e *Orthezia* sp.

Jéssica Ferreira Barroncas¹, Rosana Antunes Palheta², Maria Francisca Simas Teixeira³

¹Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil

²Instituto Federal do Amazonas – IFAM

³Coleção de Culturas DPUA, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas, Brasil

RESUMO

Proteases e quitinases são utilizadas em vários processos industriais, bem como são secretadas por fungos que causam patologias em outros organismos. O objetivo deste trabalho foi realizar a purificação parcial de proteases e quitinases produzidas por fungos anamórficos de insetos considerados pragas agrícolas. Cinco isolados, *Penicillium fellutanum* (C1), *P. brevicompactum* (C3), *P. brevicompactum* (C5), *P. aurantiogriseum* (C10) e *Paecilomyces javanicus* (P1), foram submetidos à fermentação em meio líquido a 150rpm, 25° C durante cinco dias. Do extrato recuperado por filtração a vácuo, 20 mL foram submetidos à purificação parcial das proteínas por fracionamento com sulfato de amônio nas frações 0-60% e 60-80% (p/v). Após diálise, foram determinados a concentração protéica, atividade proteolítica, atividade quitinolítica, atividade específica, rendimento e fator de purificação de cada uma das frações e dos extratos brutos. Os valores de atividade específica proteolítica e quitinolítica foram superiores na fração 60-80%, assim como fator de purificação. Nos extratos semipurificados de *P. brevicompactum* (C3) e *Penicillium fellutanum* (C1) foram observadas as maiores atividades específicas de protease (18,72 U/mg) e quitinase (0,88 µg/mg), respectivamente.

Palavras-chave: atividade proteolítica, atividade quitinolítica, semipurificação

ABSTRACT

Chitinases and proteases are used in various industrial processes and are secreted by fungi that cause diseases in other organisms. The aim of this work was the partial purification of proteases and chitinases produced by anamorphic fungi of insects that are considered agricultural pests. Five isolates, *Penicillium fellutanum* (C1), *P. brevicompactum* (C3), *P. brevicompactum* (C5), *P. aurantiogriseum* (C10) and *Paecilomyces javanicus* (P1) were

subjected to fermentation in liquid medium at 150 rpm, 25 °C for five days. The extract recovered by vacuum filtration were subjected to protein partial purification by ammonium sulfate fractionation in fractions 0-60% and 60-80% (w/v). After dialysis, the protein concentration, proteolytic, chitinolytic activity, specific activity, yield and purification factor of each of the fractions and crude extracts were determined. The values of specific proteolytic and chitinolytic activity were higher in the 60-80% fraction, as well as purification factor. In the semi-purified extracts of *P. brevicompactum* (C3) and *P. fellutanum* (C1) showed the highest specific activities of protease (18.72 U/mg) and chitinase (0.88 mg/mg), respectively.

Keywords: proteolytic activity, chitinolytic activity, semipurification

INTRODUÇÃO

Na última década, houve aumento significativo do interesse pelo uso de micro-organismos para controle de insetos pragas, comuns da agricultura, como alternativa ao uso dos pesticidas químicos, devido aos danos que eles ocasionam ao homem e ao ambiente (BUTT et al., 2001).

Estima-se que mais de 700 espécies e cerca de 85 gêneros de fungos sejam entomopatogênicas (SOUZA, 2001; PUTZKE E PUTZKE, 2003). Esses micro-organismos têm mecanismo de infecção especializado, entre os quais muitas espécies podem infectar diferentes estádios de desenvolvimento dos insetos (McCOY E MILANI-TIGANO, 1996; ALVES, 1998). A penetração do fungo no hospedeiro se dá por uma combinação de pressão mecânica e de enzimas, como quitinases e proteases (TIAGO E FURLANETO, 2003; ARRUDA et al., 2005; DELGADO-ORAMAS, 2005).

Proteases e quitinases são aceitas como os principais fatores determinantes da virulência dos fungos entomopatogênicos (ST. LEGER, et al., 1986), pois hidrolisam os principais polímeros constituintes da cutícula, proteínas e quitina, organizados em camadas denominadas exo e endocutícula. Nos artrópodes, a cutícula é constituída principalmente de proteínas (55-80%), dessa forma, as enzimas proteolíticas desempenham um papel principal durante a sua degradação (ST. LEGER, et al., 1986; ST LEGER et al., 1996).

O isolamento e a purificação das enzimas, a partir das misturas complexas constituem etapas fundamentais do seu estudo, considerando que em vários processos industriais exigem enzimas funcionais, semipurificadas ou purificadas. Um dos métodos comumente utilizado para o isolamento e recuperação de proteínas de meios de cultivo é a precipitação. Utiliza-se um sal ou um solvente orgânico com baixo teor de solubilidade e desidratação de proteínas na

fase aquosa, por se tratar de um procedimento simples e barato que produz graus consideráveis de recuperação e purificação, além disso, o sulfato de amônio aumenta a estabilidade de muitas enzimas (TREVAN et al., 1990; KUMAR E TAKAGI, 1999).

Proteases constituem uma classe de enzimas que hidrolisam ligações peptídicas em proteínas e que, devido às suas aplicações, ocupam uma posição central tanto nos campos fisiológico, patológico e tecnológico quanto no campo comercial, representando mais de 60% do mercado de enzimas utilizadas no segmento industrial (JOHNVESLY E NAIK, 2001; RODARTE, 2011). Tais enzimas são utilizadas no processamento de alimentos, na indústria farmacêutica, no processamento de couro, na indústria química, diagnósticos, recuperação de prata na indústria de filmes de raio x, na indústria de tratamento de resíduos e como aditivo de detergentes (HAKI E RAKSHIT, 2003; SUMANTHA et al., 2006; DIAS et al., 2010).

As quitinases catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas (β -1,4) entre as moléculas de *N*-acetilglicosamina (GlcNAc) do polímero denominado quitina, liberando oligômeros e/ou monômeros de GlcNAc (GALANTE, 2006). As enzimas quitinolíticas apresentam aplicações nos ramos da indústria, médico e da agricultura (DAI et al., 2011).

O objetivo deste trabalho foi a purificação parcial de proteases e quitinases produzidas por fungos anamórficos isolados de insetos praga visando a obtenção de compostos bioativos para aplicação na indústria de defensivos agrícolas.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção de proteases e quitinases por fermentação submersa

Neste estudo, foram investigadas quatro espécies de fungos anamórficos (Tabela 1) (BARRONCAS, et al. 2012). Para crescimento das espécies de fungos anamórficos e indução das enzimas foi utilizado extrato MGYP (extrato de malte 0,3%, glicose 1%, extrato de levedura 0,3% e peptona 0,5%). Como inóculo foi utilizado disco micelial, medindo 8mm de diâmetro, retirado da cultura em meio ágar Sabourand e ágar Czapeck extrato de levedura (CYA). A fermentação foi conduzida em 50 mL de extrato MGYP, em frasco Erlenmeyer de 125 mL, a 25°C, 150 rpm por cinco dias. Em seguida, o extrato bruto foi separado da biomassa por filtração a vácuo em papel de filtro e em membrana celulósica (0,22 μ m).

Tabela 1. Fungos anamórficos isolados de *Vatiga illudens* e *Orthezia* sp

| Espécie | Origem |
|--|------------------------|
| <i>Penicillium fellutanum</i> (C1), | <i>Orthezia</i> sp |
| <i>Penicillium brevicompactum</i> (C3) | <i>Orthezia</i> sp |
| <i>Penicillium brevicompactum</i> (C5) | <i>Orthezia</i> sp |
| <i>Penicillium aurantiogriseum</i> (C10) | <i>Orthezia</i> sp |
| <i>Paecilomyces javanicus</i> (P1). | <i>Vatiga illudens</i> |

Purificação parcial das proteases

Fracionamento com sulfato de amônio

Os extratos brutos foram submetidos à purificação parcial das proteínas por fracionamento com sulfato de amônio segundo método descrito por Vilela et al. (1973). O fracionamento foi feito em duas etapas sucessivas, utilizando-se as frações de 0-60% (F1) e 60-80% (F2) de sulfato de amônio.

Na etapa F1, foi adicionado 20 mL do extrato em um becker de 250 mL e, em seguida, adicionados a quantidade necessária de sulfato de amônio (7,8 g) para precipitar as enzimas, diluindo-se o sal sob agitação constante. Esta reação foi realizada em banho de gelo. Após completa diluição do sal, a solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C.

Na etapa F2, o sobrenadante recuperado da fração F1 foi saturado com a quantidade de sulfato de amônio calculada para o volume recuperado, repetindo-se o mesmo procedimento do fracionamento F1. As amostras protéicas foram ressuspensas em 300 µL de tampão fosfato 1mM, pH 7,2 e submetidas à diálise para determinação da atividade proteolítica.

Diálise dos extratos semipurificados

As frações recuperadas e ressuspensas em tampão fosfato 1mM, pH 7,2 foram transferidas para sacos de diálise tratados conforme recomendações do fabricante. A diálise foi realizada a 4°C, em agitador magnético marca Nova Ética® durante 24 horas, com a troca do tampão a cada 12 horas. As frações dialisadas foram transferidas para microtubos do tipo Eppendorf® 1,5 mL e mantidas sob refrigeração.

Quantificação de proteínas totais nos extratos proteolíticos semipurificados

A concentração de proteínas totais dos extratos semipurificados foi determinada pelo método de Bradford (1976). Como padrão foi utilizada soro albumina bovina [(BSA) (1mg/mL)]. De cada amostra do extrato proteolítico semi-purificado foi retirado 50 µL para

ser adicionado em 2,5 mL da solução do reagente de Bradford. As amostras foram incubadas a 25°C por 5 minutos. A leitura foi realizada a 595 nm. A quantidade de proteína em mg foi determinada utilizando-se uma curva padrão com BSA, concentração de 0-20 µg/mL. A atividade específica (AE) foi então calculada pela razão:

$$AE = \frac{U/mL}{mg/proteína}$$

Determinação da atividade proteolítica dos extratos semipurificados

A atividade proteolítica dos extratos semipurificados foi determinada utilizando 150 µL do extrato bruto adicionados a 250 µL de azocazeína 1,0% (p/v) em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2. A mistura reacional foi incubada por uma hora em ausência de luz. Em seguida, foi adicionado 1,2 mL de ácido tricloroacético 10% (p/v) e o resíduo remanescente foi removido por centrifugação (10.000 rpm) por 10 minutos. Do sobrenadante foi retirado 0,8 mL e adicionada a 1,4 mL de hidróxido de sódio 1M. No branco, o extrato bruto foi substituído por água destilada (NEVES et al., 2006). Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância de 0,1/min em uma hora. A leitura foi realizada a 440nm e expressa em U/mL (NASCIMENTO et al., 2007).

Determinação da atividade quitinolítica dos extratos semipurificados

A atividade das quitinases foi determinada pelo método de Nahar et al (2004) e Miller (1959). De cada extrato semi-purificado foi retirado de 0,1 mL para ser adicionado a 0,2 mL da solução de quitina coloidal 1% (p/v) em de tampão acetato 50 mM pH 5,2. As amostras foram incubadas a 50°C por 30 minutos. A quitina residual foi separada por centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante recuperado para a determinação da atividade quitinolítica. De cada sobrenadante foi retirado 250 µL para ser adicionado a 300 µL de DNS e a reação enzimática foi interrompida em banho-maria fervente por 5 minutos. A leitura foi realizada a 575nm. A curva padrão para a quantificação do açúcar redutor liberado foi feita com *N*-acetil-glicosamina, nas concentrações de 50µg a 500µg/mL em água destilada. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1 µg de *N*-acetilglicosamina liberados por mL da solução da enzima nas condições da reação. A atividade específica (AE) foi então calculada pela razão:

$$AE = \frac{\mu\text{g/mL}}{\text{mg/proteína}}$$

Análise estatística

Os resultados das atividades enzimáticas foram submetidos à análise estatística descritiva (média e desvio padrão) e para o cálculo da diferença entre as médias foi realizado o Teste de Tukey (5%) para comparação de médias e utilizando-se o software Minitab 16.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sulfato de amônia é preferido para precipitação de proteínas, devido à sua elevada solubilidade em água, o que permite atingir forças iônicas muito elevadas. As soluções protéicas em sulfato de amônio são estáveis por longos períodos e o sal pode ser removido facilmente por diálise, ultrafiltração ou coluna de dessalificação (BRACHT E ISHII-IWAMOTO, 2003). O fracionamento com sulfato de amônio e as análises de cada fração em termos de atividade enzimática, rendimento e fator de purificação estão demonstradas nas tabelas 4 e 5.

Na tabela 2 estão apresentados os resultados de atividade de protease, conteúdo protéico, atividade específica, fator de purificação e rendimento das etapas da semipurificação por fracionamento por sulfato de amônio. A atividade específica dos isolados estudados variou de 0,06 a 18,72 U/mg (Tabela 2). Verificou-se que a fração F2 (60-80%) apresentou maiores valores de atividade específica da protease, exceto *P. fellutanum* (C1). Dos isolados *Penicillium brevicompactum* (C3) na fração F2 apresentou a maior atividade específica (18,72 U/mg).

O fator de purificação das proteases variou de 0,02 a 11,5, sendo nos extratos semipurificados da fração F2 foi onde houve os maiores níveis purificação das enzimas. *P. brevicompactum* (C5) e *P. javanicus* (P1) apresentaram os melhores rendimentos (superior a 88%) na fração F1, enquanto *P. brevicompactum* C3 e *P. aurantiogriseum* C10 na fração F2.

Devi et al. 2008, observaram para *Aspergillus niger* a 40-80% de saturação de sulfato de amônio atividade específica de 27,07 U/mg e rendimento de 74,25%. *Penicillium aurantiogriseum* a 80-100% de saturação de sulfato de amônio expressou atividade específica de 8,7 U/mg com rendimento de 60% e fator de purificação de 1,2 (SILVA et al., 2003). No

presente estudo, para a mesma espécie, *P. aurantiogriseum* (C10) a 60-80% de saturação foi determinada atividade específica menor (4,83 U/mg), porém um fator de purificação maior (13,9).

As proteases semipurificadas dos *Penicillium* (Tabela 2), em geral, apresentaram melhor rendimento que os obtidos por Abirami et al. (2011) para *P. janthinellum* (79%) e por Graminho et al. (2013) para *P. waksmanii* (74,7%).

Tabela 2. Atividade de protease, conteúdo protéico, atividade específica, fator de purificação e rendimento das etapas da semipurificação por fracionamento com sulfato de amônio.

| Isolados | Atividade de protease (U/mL) | Proteínas totais (mg/mL) | Atividade específica (U/mg) | Fator de purificação | Rendimento (%) |
|---|------------------------------|--------------------------|-----------------------------|----------------------|----------------|
| <i>Penicillium fellutanum</i> C1 | | | | | |
| Extrato Bruto | 20,33a±0,33 | 7,30 | 2,78 | 1,0 | 100% |
| Semipurificado 0-60% | 0,44b±0,39 | 7,74 | 0,06 | 0,02 | 2,2% |
| Semipurificado 60-80% | 0,44b±0,39 | 2,16 | 0,21 | 0,1 | 2,2% |
| <i>Penicillium brevicompactum</i> C3 | | | | | |
| Extrato Bruto | 27,60a±1,23 | 8,10 | 3,41 | 1,0 | 100% |
| Semipurificado 0-60% | 8,00b±0,15 | 6,68 | 1,20 | 0,4 | 29,0% |
| Semipurificado 60-80% | 25,11a±1,54 | 1,34 | 18,72 | 5,5 | 91,0% |
| <i>Penicillium brevicompactum</i> C5 | | | | | |
| Extrato Bruto | 27,07a±2,67 | 12,87 | 2,10 | 1,0 | 100% |
| Semipurificado 0-60% | 26,89a±1,02 | 11,63 | 2,31 | 1,1 | 99,3% |
| Semipurificado 60-80% | 11,93b±0,57 | 1,85 | 6,44 | 3,1 | 44,1% |
| <i>Penicillium aurantiogriseum</i> C10 | | | | | |
| Extrato Bruto | 21,07a±1,40 | 60,88 | 0,35 | 1,0 | 100% |
| Semipurificado 0-60% | 18,58b±0,64 | 48,95 | 0,38 | 1,1 | 88,2% |
| Semipurificado 60-80% | 20,67a±1,02 | 5,20 | 3,97 | 11,5 | 98,1% |
| <i>Paecilomyces javanicus</i> P1 | | | | | |
| Extrato Bruto | 7,80a±0,52 | 9,95 | 0,78 | 1,0 | 100% |
| Semipurificado 0-60% | 6,89a±0,04 | 9,60 | 0,72 | 0,9 | 88,3% |
| Semipurificado 60-80% | 2,44b±0,08 | 0,95 | 2,58 | 3,3 | 31,3% |

Os dados referentes à atividade quitinolítica estão apresentados na tabela 3. Quanto à atividade de quitinase, todos os isolados fúngicos expressaram maiores atividades nos extratos brutos, exceto para *Paecilomyces javanicus* (P1), que não apresentou diferença significativa entre as atividades obtidas no extrato bruto e nas duas frações semipurificadas.

Tabela 3. Atividade de quitinase, conteúdo protéico, atividade específica, fator de purificação e rendimento das etapas da semipurificação por fracionamento com sulfato de amônio.

| Isolados | Atividade de quitinase (U) | Proteínas totais (mg/mL) | Atividade específica (U/mg) | Fator de purificação | Rendimento (%) |
|---|----------------------------|--------------------------|-----------------------------|----------------------|----------------|
| <i>Penicillium fellutanum</i> C1 | | | | | |
| Extrato Bruto | 8,17a±0,00 | 7,30 | 1,12 | 1,0 | 100% |
| Semipurificado 0-60% | 0,89c±0,51 | 7,74 | 0,11 | 0,1 | 11% |
| Semipurificado 60-80% | 1,89b±0,26 | 2,16 | 0,88 | 0,8 | 23% |
| <i>Penicillium brevicompactum</i> C3 | | | | | |
| Extrato Bruto | 0,99a±0,04 | 8,10 | 0,12 | 1,0 | 100% |
| Semipurificado 0-60% | 0,39c±0,10 | 6,68 | 0,06 | 0,5 | 39% |
| Semipurificado 60-80% | 0,78b±0,10 | 1,34 | 0,58 | 4,7 | 79% |
| <i>Penicillium brevicompactum</i> C5 | | | | | |
| Extrato Bruto | 1,34a±0,04 | 12,87 | 0,10 | 1,0 | 100% |
| Semipurificado 0-60% | 0,44b±0,10 | 11,63 | 0,04 | 0,4 | 33% |
| Semipurificado 60-80% | 1,17a±0,33 | 1,85 | 0,63 | 6,1 | 87% |
| <i>Penicillium aurantiogriseum</i> C10 | | | | | |
| Extrato Bruto | 8,39a±0,19 | 60,88 | 0,14 | 1,0 | 100% |
| Semipurificado 0-60% | 1,83b±0,17 | 48,95 | 0,04 | 0,3 | 22% |
| Semipurificado 60-80% | 1,22c±0,26 | 5,20 | 0,23 | 1,7 | 15% |
| <i>Paecilomyces javanicus</i> P1 | | | | | |
| Extrato Bruto | 0,77a±0,04 | 9,95 | 0,08 | 1,0 | 100% |
| Semipurificado 0-60% | 0,72a±0,10 | 9,60 | 0,08 | 1,0 | 94% |
| Semipurificado 60-80% | 0,72a±0,26 | 0,95 | 0,76 | 9,8 | 94% |

A fração F2 (60-80%), em relação à atividade específica de quitinase, também se mostrou mais eficiente, na qual foram registrados os maiores valores de atividade (Tabela 3), exceto *P. fellutanum* (C1) que no extrato bruto expressou a maior atividade específica de

quitinase (1,12 U/mg). Além disso, todos os isolados fúngicos apresentaram maior fator de purificação na fração F2, com valores variando entre 0,8 para *P. fellutanum* (C1) e 9,8 para *Paecilomyces javanicus* (P1).

Lee et al. (2009) mostraram que quitinase de *Penicillium* sp. purificada com isopropanol isolado, a atividade específica foi ligeiramente superior (1,1 U/mg) às determinadas para as quitinases semipurificadas de *P. fellutanum* [(C1) (0,88 U/mg)], *P. brevicompactum* [(C3) (0,58 U/mg)], *P. brevicompactum* [(C5) (0,63 U/mg)], *P. aurantiogriseum* [(C10) (0,23 U/mg)] e *P. javanicus* [(P1) (0,76 U/mg)], neste trabalho e 43,8% de rendimento. O fator de purificação (1,6) foi semelhante aos obtidos para os isolados de *Penicillium* analisados neste estudo, apesar do método utilizado ter sido diferente.

CONCLUSÃO

As proteases e quitinases de fungos anamórficos produzidas por fermentação submersa e, em seguida, purificadas parcialmente por um procedimento simples e rápido apresentaram altos rendimentos. Estas preparações semipurificadas revelaram a presença de enzimas proteolíticas e quitinolíticas nas duas frações analisadas. Estes dados constituem novas contribuições para futuras pesquisas visando a aplicação destes fungos e suas enzimas no controle de insetos pragas, bem como em outros ramos industriais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIRAMI, V., et al. Partial purification and characterization of na extracellular protease from *Penicillium janthinellum* and *Neurospora crassa*. *European Journal of Experimental Biology*, v. 1, n. 3, p. 114-123, 2011.
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: Alves, S.B.(Ed.). Controle microbiano de insetos. 2. ed. Piracicaba: Esalq, 1998. p 289-382.
- ARRUDA, W., et al. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Experimental & Applied Acarology*, v. 37, p. 231-244, 2005.
- BARRONCAS, J.F., et al. Proteases da diversidade de fungos isolados de *Vatiga illudens* e *Orthezia* sp. In: MARCON, J.L. et al. (Org.). Biodiversidade Amazônica: caracterização, ecologia e conservação. 1 ed. Manaus: EDUA, 2012, p. 55-67.

- BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E.L. Métodos de laboratório em bioquímica. Barueri: Manole, 2003. 439p.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BUTT, T.M.; JACKSON C.; MAGAN, N. Fungal Biological Control Agents: Progress, Problems and Potential. London: CABI Publishing, 2001. 390p.
- DAI, D., et al. Purification and characterization of a novel extracellular chitinase from thermophilic *Bacillus* sp. Hu1. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, n. 13, p. 2476-2485, 2011.
- DELGADO-ORAMAS, B.P. Caracterización del hongo nematofago cepa IMI SD 187 de *Pochonia chlamydosporia* var *catenulata* (KamyschoexBarron y Onions) Zare y Gams. 2005. 147p. (Tese de Doutorado). Universidad Agraria de la Habana Fructuoso Rodríguez Pérez, Havana.
- DEVI, M.K., et al. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian Journal of Science Technology*, v. 1, n. 7, p. 1-6, 2008.
- DIAS, D. R., et al. *In vitro* protein digestibility of enzymatically pre-treated bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flour using commercial protease and *Bacillus* sp. protease. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v 30, n. 1, p. 94-99, 2010.
- GALANTE, R.S. Estudos de quitinasas de *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, fungo causador da vassoura-de-bruxa no cacauero: purificação, caracterização e modelagem comparativa. 2006. 101p. (Dissertação de mestrado). Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia.
- GRAMINHO, E.R., et al. Determination of a new serine protease secreted by *Penicillium waksmanii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 169, p. 201-214, 2013
- HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, v. 89, n. 1, p. 17-34, 2003.
- JOHNVESLY, B.; NAIK, G.R. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Process Biochemistry*, v. 37, p. 139-144, 2001.
- KUMAR, C.G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotchnology Advences*, v. 17, p. 561-594, 1999.
- LEE, Y.G., et al. Purification and properties of a chitinase from *Penicillium* sp. LYG 0704. *Protein Expression and Purification*, v. 65, p. 244-250, 2009.

- MILLER, G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for detection of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428, 1959.
- McCOY, C.W.; Milani-Tigano, M.S. Use of entomopathogenic fungi in biological control: a world view. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 27, p. 87-93, 1996.
- NAHAR, P.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M.V. The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 85, p. 80-88, 2004.
- NASCIMENTO, W.C.A., et al. Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus* sp. termofílico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 2, p. 417-421, 2007.
- NEVES, K.C.S.; PORTO, A.L.F.; TEIXEIRA, M.F.S. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. *Acta Amazônica*, v. 36, n. 3, p. 299-306, 2006.
- PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. Os Reinos dos Fungos. 1. edição. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2003. 222 p. v. 2.
- RODARTE, M.P., et al. Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L.). *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 33, n. 3, p. 457-464, 2011.
- SILVA, M.R.O. , et al. Estudo de métodos de extração de protease termoestável produzida pelo *Penicillium aurantiogriseum*. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações, 2003. *Anais...*
- SOUZA, M.L. Utilização de microrganismos na agricultura. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 21, p. 28-31, 2001.
- ST. LEGER, R.J.; COOPER, R.M.; CHARLEY, A.K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. *Journal of Invertebrate Pathology* . v.47, p.167-177, 1986.
- ST. LEGER, R.J., et al. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride* and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 3, p. 907-912, 1996.
- SUMANTHA, A.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technology Biotechnology*, v. 44, n. 2, p. 211-220, 2006.

TIAGO, P.V.; FURLANETO, M.C. O papel de proteases degradadoras de cutícula produzidas por fungos entomopatogênicos. *Revista do Programa de Ciências Agro-Ambientais*, v. 2, n. 1, p. 40-51, 2003.

TREVAN, M. D., et al. *Biocnologia: Princípios biológicos*. Zaragoza: Acribia, 1990. 284p.

VAISHALI, C.; JAIN, P. C. Optimization of process parameters for alkaline protease production by *Aspergillus versicolor* PF/F/107. *Journal of Academic and Industrial Research*, v. 1, n. 1, p. 8-14, 2012.

VILELA, G.G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. *Técnicas e experimentos de bioquímica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973. 552p.

CONCLUSÃO

Houve a predominância de fungos anamórficos dentre os representantes isolados, sendo que em *Orthezia* sp., o gênero *Penicillium* foi o mais freqüente, e associado a *Vatiga illudens* foram isolados somente fungos do gênero *Paecilomyces*. Todos os isolados foram produtores de proteases. Nas temperaturas e pH ótimo avaliados, a atividade enzimática variou entre os isolados.

Determinou-se a presença tanto de enzimas proteolíticas quanto quitinolíticas nas duas frações avaliadas, sendo que as maiores atividades específicas de protease e de quitinase foram registradas na fração F2 (60-80%). O fracionamento com sulfato de amônio, um método simples e barato, purificou proteases e quitinases que apresentam altos rendimentos, sendo assim, essas enzimas possuem características favoráveis para aplicação em processos biotecnológicos, inclusive para uso em controle biológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA, G.H., et al. Adiciones al conocimiento de la diversidad de los hongos conidiales del bosque mesófilo de montaña del Estado de Veracruz. *Acta Botánica Mexicana*, v. 66, p. 1-22, 2004.
- ADRIO, J.E.; DEMAIN, A.L. Fungal biotechnology. *International Microbiology*, v. 6, p.191-199, 2003.
- AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. 2009. (http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons) Acesso em 07/07/2012
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B.(Ed.). Controle microbiano de insetos. Piracicaba: Esalq, 1998. 2. ed, p 289-382.
- ALVES, S.B., et al. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S.B.(Eds.). Controle microbiano de insetos. Piracicaba: Esalq, 1998. 2. ed.,p 289-382.
- AYALA, D.M.F.; TRIVIÑO, C.G. Determinación de la actividad quitinolítica de cepas nativas de actinomicetos y su efecto antagônico sobre microorganismos fitopatogênicos. 2009. 135p. (Tese de obtenção do grau de microbiólogo industrial). Pontificia Universidad Javeriana, Bogota.
- BARATTO, C.M. Caracterização de genes de quitinasas do entomopatôgeno e acaricida *Metarhizium anisopliae*. 2005. 140p. (Tese de doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- BARBOSA, F.R., et al. Manejo e controle da cochonilha ortézia (*Orthezia praelonga*), em plantios irrigados de acerola, no submédio São Francisco. Petrolina: Embrapa Semi-árido, 2007. 8p. (Circular técnica).
- BARRET, A.J.; RAWLINGS, N.D.; O'BRIEN, E.A. The MEROPS database as a proteases information system. *Journal of Structural Biology*, v. 134, p. 95-102, 2001.
- BELLON, P.P. Controle biológico e alternativo do percevejo de renda (*Vatiga manihotae*) (Drake) (Hemiptera: Tingidae) na cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). 2010. 71p. (Dissertação de mestrado). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon.
- BELLOTTI, A.C.; SMITH,L; LAPOINTE, S.L. Recent advances in cassava pest management. *Annual Review of Entomology*, v. 44, p. 343-370, 1999.
- BELLOTTI, A.C., et al. Insectos y acaros dañinos a la yuca y su control. In: OSPINA, B.; CEBALLOS, H. (eds). La yuca en el tercer milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y Comercialización., Cali: CIAT/CLAYUCA, 2002a. p. 160-203.
- BELLOTTI, A.C., et al. Pérdidas en rendimiento del cultivo de yuca causadas por insectos y acaros. In: OSPINA, B.; CEBALLOS, H. (eds). La yuca en el tercer milenio: sistemas

- modernos de producción, procesamiento, utilización y Comercialización., Cali: CIAT/CLAYUCA, 2002b. p. 204-219.
- BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E.L. Métodos de laboratório em bioquímica. Barueri: Manole, 2003. 439p.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BROWN, A.H.S.; SMITH, G. The genus *Paecilomyces* Bainier and its perfect stage *Byssochlamys* Westling. *Transactions of the British Mycological Society*, v. 40, n. 1, p. 17-89, 1957.
- CALA, L.S. et al. Producción de quitinasas extracelulares com uma cepa alcalófila halotolerante de *Streptomyces* sp. aislada de resíduos de camarón. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, v. 6, n. 2, p. 137-146, 2007.
- CARVALHO, R.S. Controle integrado da Ortézia em pomares e hortos comerciais. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 6 p. (Circular Técnica n. 85)
- CESNIK, R.; FERRAZ, J.M.G. Biología e controle biológico de *Orthezia praelonga*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, v. 70, p. 90-96, 2003.
- CHERNIN, L., et al. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, p. 1720-1726, 1995.
- CHET, I., et al. Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by *Rhizobacteria*. *Plant Soil*, v. 129, p. 85-92, 1990.
- CHRISTODOULOU, E.; DUFFNER, F.; VORGIAS, C.E. Overexpression, purification, and characterization of a thermostable chitinase (Chi40) from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Protein Expression and Purification*, v. 23, p. 97-105, 2001.
- COTTRELL, M.T.; MOORE, J.A.; KIRCHMAN, D.L. Chitinases from uncultured marine microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 6, p. 2553-2557, 1999.
- CRUEGER, W.; CRUEGER, A. Biotecnología: manual de microbiología industrial. Zaragoza: Acribia, 1993. 413p.
- DAHIYA, N., et al. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Applied Microbiology and Technology*, v. 71, p. 773-782, 2006.
- DEACON, J. Fungal Biology. 4. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2006. 366p.
- DELGADO-ORAMAS, B.P. Caracterización del hongo nematofago cepa IMI SD 187 de *Pochonia chlamydosporia* var *catenulata* (KamyschoexBarron y Onions) Zare y Gams. 2005. 147p. (Tese de Doutorado). Universidad Agraria de la Habana Fructuoso Rodríguez Pérez, Havana.

- DEVI, M.K., et al. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian Journal of Science Technology*, v. 1, n. 7, p. 1-6, 2008.
- DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. Compendium of soil fungi. v.1. London; New York: Academic Press, 1980. 859p.
- DUO-CHUAN, L. Review of fungal chitinases. *Mycopathologia*, v. 161, p. 345-360, 2006.
- ELLIAIAH, C.A.; ADINARAYAN, M.L. Production and properties of an extracellular protease from *Bacillus* sp. *Journal of Microbiology*, v. 35, p. 91-96, 2002.
- EMPERAIRE, L. Elementos de discussão sobre a conservação da agrobiodiversidade: o exemplo da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) na Amazônia brasileira. In: CAPOBIANCO, J. P. R., et al. (Eds.). Biodiversidade na Amazônia brasileira: avaliação e ações prioritárias para a conservação, uso sustentável e repartição de benefícios. São Paulo: Estação Liberdade/Instituto Socioambiental, 2001. p. 225-234.
- ESPÓSITO, T.S. Aplicação de proteases alcalinas das vísceras do tambaqui (*Colossoma macroponum*) e da carpa (*Cyprinus carpio*) como aditivo de detergentes em pó. 2006. 98p. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- FARIA, M.R.; MAGALHÃES, B.P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v.22, p. 18-21, 2001.
- FARIAS, A.R.N. Biologia de *Vatiga illudens* (Drake, 1922) (Hemiptera: Tingidae) em laboratório. *Revista Brasileira de Mandioca*, v.6, n. 1, p. 17-19, 1987.
- FARIAS, A.R.N.; ALVES, R.T. O percevejo-de-renda na cultura da mandioca. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 2. (Comunicado Técnico v.28).
- FARIAS, A.R.N.; BELLOTTI, A.C. Pragas e seu Controle. In: SOUZA et al. Aspectos Socioeconômicos e Agronômicos da Mandioca. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p.591-671.
- FROESCHNER, R.C. The neotropical lace bugs of the genus *Vatiga* (Heteroptera: Tingidae), pests of cassava: new synonymies and key to species. *Proceedings of the Entomological Society Whash*, v. 95, p. 457-462, 1993.
- GALANTE, R.S. Estudos de quitinases de *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, fungo causador da vassoura-de-bruxa no cacauzeiro: purificação, caracterização e modelagem comparativa. 2006. 101p. (Dissertação de mestrado). Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia.
- GALLO, D., et al. Manual de entomologia agrícola. São Paulo: FEALQ, 2002. 920p.
- GUARRO, J. GENÉ, J.; STCHIGEL, A.M. Development in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, n. 3, p. 454-500, 1999.

- GEHLOT, P.; ATTITALLA, I.H.; SALLEH, B. Anamorphic fungi: An overview. *Middle-East Journal of Scientific Research*, v. 6, n. 3, p. 201-208, 2010.
- GENCKAL, H., TARI, C. Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 703–710, 2005.
- GERMANO, S., et al. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. Produced by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, p. 246-251, 2003.
- GOMES, D.N.F., et al. Filamentous fungi isolated from sand and water of “Bairro Novo” and “Casa Caiada” beaches, Olinda, Pernambuco, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, v. 68, n. 3, p. 577-582, 2008.
- GOODAY, G.W. Biosynthesis of the fungal wall-mechanisms and implications. *Journal of General Microbiology*, v. 99, p. 1-11, 1977
- GUIMARÃES, J., et al. Eficiência de produtos químicos e biológicos para o controle do percevejo-de-renda (Hemiptera: Tingidae) em mandioca. In: XIII Congresso Brasileiro de Mandioca, 2009. *Anais...*
- GUPTA R., et al. An overview on fermentation, *downstream* processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 60, n. 4, p. 381-395, 2002.
- GYOÈRGY, P.; ROSE, C.S. Microbiological studies on growth factor for *L. bifidus* var *pensylvanicus*. *Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 90, p. 219-223, 1995.
- HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, v. 105, p. 1422–1432, 2001.
- HENRISSAT, B. Classification of chitinases modules. In: JOLLÈS, P.; MUZZARELLI, R. A. A. (eds). Chitin and chitinases. Basel: Birkhäuser Verlag, 1999. p. 137-156.
- HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosylhydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal.*, v. 293, p. 781-788, 1993.
- HOSTER, F.; SCHMITZ, J.E; DANIEL; R. Enrichment of chitinolytic microorganism: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. *Applied Microbial and Cell Physiology*, v. 66, p. 434-442, 2005.
- HOWARD, M.B., et al. Detection and characterization of chitinase and other chitin-modifying enzyme. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 30, p. 627-635, 2003.

- INBAR, J.; CHET, I. Evidence that chitinase produced by *Aeromonas caviae* is involved in the biological control of soil-borne plant pathogens by this bacterium. *Soil Biology and Biochemistry*, p. 23, p. 973-978, 1991.
- JOHNVESLY, B.; NAIK, G.R. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Process Biochemistry*, v. 37, p. 139-144, 2001.
- JUNQUEIRA, N.T.V., et al. Patogenicidade de fungos para o percevejo-de-renda (*Vatiga illudens*) da mandioca. *Revista Brasileira de Mandioca*, v. 18, p. 59-64, 2005.
- KERN, M.F. Expressão de uma quitinase de *Metarhizium anisopliae* em *Nicotiana tabacum*: obtenção de plantas transgênicas resistentes a doenças fúngicas. 2003. 83p. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- KIM, K.J.; YANG, Y.J.; KIM, J.G. Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces* sp. M-20. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 36, n. 2, p. 185-189, 2003.
- KIM, J.J., GOETTEL, M.S., GILLESPIE, D.R. Evaluation of *Lecanicillium longisporum*, Vertalec for simultaneous suppression of cotton aphid, *Aphis gossypii*, and cucumber powdery mildew, *Sphaerotheca fuliginea*, on potted cucumbers. *Biological Control*, v. 45, p. 404-409, 2008.
- KUMAR, C.G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotchnology Advances*, v. 17, p. 561-594, 1999.
- LACAZ, C.S., et al. *Tratado de Micologia Médica*. Sarvier Press, São Paulo. 2002. 1104 p.
- LOZANO, J.C., et al. Problemas no cultivo da mandioca. Cali: CIAT, 1981. 205p.
- MAHADEVAN, B.; CRAWFORD, D.L. Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. *Enzyme and Microbial Technology*, v.20, p. 489-493, 1997.
- MILLER, G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for detection of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MILNER, R. Locust and Grasshopper Biocontrol Committee Newsletter. n. 2. Camberra: CSIRO, 2000. 4p.
- MIO, T., et al. The eukaryotic UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylases. *The Journal of Biological Chemistry*, v.273, n. 23, p. 14392-14397, 1998.
- MIRANDA, A.M., et al. Biologia do percevejo-de-renda (*Vatiga manihotae*) (Hemiptera: Tingidae) em plantas de mandioca. In: XIII Congresso Brasileiro de Mandioca, 2009. *Anais...*

- MOLINA, J.H.G. Efeito do controle microbiano em insetos sugadores em três sistemas de manejo de pragas de citros. 2007. 106p. (Tese de doutorado). Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo.
- MOREIRA, K.A., et al. New alkaline protease from *Nocardioopsis* sp.: partial purification and characterization. *Process Biochemistry*, p.39, p. 67-72, 2003.
- NAHAR, P.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M.V. The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 85, p. 80-88, 2004.
- NASCIMENTO, W.C.A., et al. Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus* sp. termofílico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 2, p. 417-421, 2007.
- NEVES, K.C.S.; PORTO, A.L.F.; TEIXEIRA, M.F.S. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. *Acta Amazônica*, v. 36, n. 3, p. 299-306, 2006.
- NIRMAL, N.P.; SHANKAR, S.; LAXMAN, R.S. Fungal proteases: An Overview. *International Journal of BioScience and Biotechnology*, v. 1, n. 1, p. 1-40, 2011.
- OLIVEIRA, M.A.S., et al. Desenvolvimento ninfal de *Vatiga illudens* (Drake) (Hemiptera: Tingidae) em acessos de mandioca. In: XIII Congresso Brasileiro de Mandioca, 2009. *Anais...*
- PADIN, S.B.; DAL BELLO, G.M.; VASICEK, A.L. Potencial bioinsecticida de hongos entomopatogênicos de pragas em grãos armazenados. *Revista de la Facultad de Agronomía, Maracaibo*, v. 15, n. 1, p. 1-7, 1995.
- PANDEY, A., et al. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*, v.77, n. 1, p. 149-162, 1999.
- PATIL, R.S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M.V. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, p. 473-483, 2000.
- PETINATE, S.D.G., et al. Purification and partial characterization of an extracellular serine-proteinase of *Streptomyces cyaneus* isolated from Brazilian cerrado soil. *Journal of Applied Microbiology*, v. 87, n. 4, p. 557-563, 1999.
- PHADATARE, S.U., DESHPANDE, V.V.; SRINIVASAN, M.C. High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20), enzyme production and compatibility with commercial detergents. *Enzyme and Microbial Technology*, 15:72-76, 1993.
- PITT, J.I. A laboratory guide to common *Penicillium* species. Sydney: CSIRO, Division of Food Research, 1985. 184p.

- PRATES, H.S. Piolho branco, a praga dos citros. *Agroquímica Ciba-Geigy*, v. 12, p. 11-13, 1980.
- POLANCZYK, R.A., et al. *Bacillus thuringiensis* no manejo integrado de pragas. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 31, p. 18-27, 2003.
- RAO, K.; NARASU, L. Alkaline protease from *Bacillus firmus* 7728. *African Journal of Biotechnology*, v. 6, n. 21, p. 2493-2496, 2007.
- RAO, M.B., et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v. 62, p. 597-635, 1998.
- RIBEIRO, A.E.L. Aspectos biológicos de *Neozygites floridana* (Weiser & Muma) (Zygomycetes: Entomophthorales) e dinâmica populacional de *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae) e seus inimigos naturais em *Solanum americanum* Mill. 2009. 73p. (Dissertação de Doutorado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- ROBERT, W.K.; SELITRENNIKOFF, C.P. Isolation and partial characterization of two antifungal proteins from barley. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 880, p. 161-170, 1986.
- ROBERTUS, J.D.; MONZINGO, A.F. The structure and action of chitinases. In: JOLLÈS, P.; MUZZARELLI, R.A.A. (eds). Chitin and chitinases. Basel: Birkhäuser Verlag, 1999. p. 125-136.
- RODARTE, M.P., et al. Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L.). *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 33, n. 3, p. 457-464, 2011.
- RODRIGUES, A.M.; LOUREIRO, E.S. Confecção de uma coleção de fungos entomopatogênicos com Isolados encontrados em culturas agrícolas e ambientes de preservação ambiental em Mato Grosso do Sul. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 76, n. 2, p. 303-306, 2009.
- SAHAI, A.S.; MANOCHA, M.S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiology Reviews*., v. 11, p. 317-338, 1993.
- SANDHYA, C.H., et al. A comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, v.40, p. 2689-2694, 2005.
- SANTANA, M.J. Hifomicetos (fungos anamorfos) associados a palmeiras na Floresta Nacional de Caxiuanã. 2009. 76p. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal Rural da Amazônia, Melgaço.
- SASSÁ, D.C., et al. Avaliação de parâmetros cinéticos de quitinases produzidas por *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 29, n. 24, p. 807-814, 2008.

- SCHMITT, Á.T. Principais insetos pragas da mandioca e seu controle. In: CEREDA, M. P. (Eds). Agricultura: tuberosas amiláceas latino americanas. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. p. 350-369.
- SHAH, P.; PELL, J. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 61, p. 413-423, 2003.
- SEVALGGINI, S., et al. Independent regulation of chitin synthase and chitinase activity in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, v. 150, p. 921-928, 2004.
- SUMANTHA, A.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technology Biotechnology*, v. 44, n. 2, p. 211-220, 2006.
- TIAGO, P.V.; FURLANETO, M.C. O papel de proteases degradadoras de cutícula produzidas por fungos entomopatogênicos. *Revista do Programa de Ciências Agro-Ambientais*, v. 2, n. 1, p. 40-51, 2003.
- THIMOTEO, S.S. Isolamento e caracterização molecular de três quitinases de uma biblioteca metagenômica. 2011. 130p. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- THYS, R.C.S. Produção, caracterização, purificação e aplicação de uma protease produzida pelo microrganismo *Microbacterium* sp. kr10. 2004. 114p. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- VILELA, G.G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. Técnicas e experimentos de bioquímica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973. 552p.
- WEILER, R.L., et al. Ocorrência do fungo entomopatogênico *Lecanicillium longisporum* Zimmerman em *Orthezia praelonga* Douglas (Hemiptera: Ortheziidae). *Citrus Research & Technology*, v. 32, n. 1, p. 53-58, 2011.
- XIA, G., et al. A novel chitinases having a unique model of action from *Aspergillus fumigatus* YJ-407. *European Journal of Biochemistry*, v. 208, p. 4079-4085, 2001.
- ZHENG, S.; WANG, H.; ZHANG, G. A novel alkaline protease from wild edible mushroom *Termitomyces albuminosus*. *Acta Biochimica Polonica*, v. 58, n. 2, p. 269-273, 2011.