UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP-DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS –GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

Comparação das propriedades bioquímicas das quitinases produzidas por diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*

Cynthia Barbosa Rustiguel

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Biologia Comparada.

Ribeirão Preto – SP
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP-DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS –GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

Comparação das propriedades bioquímicas das quitinases produzidas por diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*

Cynthia Barbosa Rustiguel
ORIENTADOR: Prof. Dr. Luis Henrique S. Guimarães

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Biologia Comparada.

Ribeirão Preto – SP
2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Rustiguel, Cynthia Barbosa

Comparação das propriedades bioquímicas das quitinases produzidas por diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae.*

Ribeirão Preto, 2014

171 p.il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/ USP – Área de concentração: Biologia Comparada.

Orientador: Guimarães, Luis Henrique Souza.

1- Quitinase. 2. *Metarhizium anisopliae.* 3. Fungo Entomopatogênico. 4. Purificação de enzimas. 5. Virulência.

Dedico:

Aos meus Pais, Wanderley Rustiguel e Laúren Ap. Barbosa Rustiguel (in memorian), por estarem sempre comigo, pelo apoio, amor, carinho, amizade.

A minha avó Therezinha (in memorian) e meu Irmão Wanderley Sammer pelo amor e carinho.

Ao Luís Fernando. A. de Sousa pelo amor e dedicação.

Agradecimentos:

À Deus e todas as energias positivas do universo por estar sempre ao meu lado, guiando meus passos.

Ao orientador, Professor Luís Henrique, por acreditar em mim, pelo apoio, e pelo conhecimento transmitido. Muito obrigada!

Aos professores João Atílio Jorge, Maria de Lourdes T. M. Polizeli, Héctor Francisco Terenzi e Arthur Henrique Cavalcanti de Oliveira por todo o apoio e amizade. Muito obrigada!

Ao Professor José Cesar Rosa e Helen, pelo auxílio e conhecimento transmitido. Muito obrigada!

Ao pesquisador e amigo José Eduardo pelo incentivo e por ajudar nos momentos necessários. Muito obrigada!

Ao orientador, Professor Enrique Quesada Moraga, por me receber com muito carinho e atenção em seu laboratório, por me auxiliar e transmitir seus conhecimentos. Muito obrigada!

Também agradeço muito a todos colegas do laboratório de entomologia - Espanha pelo carinho, paciência e bons momentos. ¡Muchas gracias!

Aos amigos do Laboratório os quais foram, por todo o tempo de desenvolvimento deste trabalho, companheiros, professores e conselheiros. Em especial Josana e Zé.

Aos técnicos Maurício, Ricardo e Mariana pelo auxílio técnico e amizade.

A Vera e Renata secretárias da Pós - graduação da Biologia Comparada pela disponibilidade e atenção.

À Universidad de Córdova Espanha, local onde desenvolvi parte deste.

À Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, local onde foi desenvolvido este trabalho.

Aos professores da FFCL de Ituverava, pelos ensinamentos e incentivos. Especialmente ao Professor Hertz Figueiredo dos Santos por me incentivar desde a graduação.

Ao Luís Fernando A. de Sousa, pela paciência, além de estar sempre ao meu lado me apoiando.

As minhas amigas de infância, adolescência e todos os amigos que fiz durante minha caminhada, agradeço pelo apoio e incentivo.

Ao grupo de pesquisa que faço parte Vanessa, Larissa, Thais e Gabriela obrigada pelo apoio.

Aos amigos Doralva, Maria, Luis Miguel, Juliana Zechi, Luis Andrés, Jonathan, Gloria, Fakhri, Alexis, Luz Marina, José Maria e Nestor por me acolher e cuidar de mim. ¡Muchas gracias, los quiero mucho!

À Simone por transmitir paixão pela pesquisa e pelos conselhos. Muito Obrigada!

À Marita por todas as palavras generosas e conselhos!

À Tatiane Beltramine Souto (Amiga!!!) por compartilhar comigo estes 7 anos de caminhada pessoal, científica e muitos momentos inesquecíveis. Muito obrigada principalmente pelo companheirismo.

À CAPES, CNPq e Ciências sem Fronteiras pelo apoio financeiro.

À Todos aqueles que direta e indiretamente colaboram com a realização deste trabalho e o tornaram realidade.

Muito Obrigada !!!!!!!

"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos é apenas uma gota de água no mar. Mas o mar sería menor se lhe faltasse uma gota."

Madre Teresa de Calcuta

Lição

"Ninguém faz nada sozinho, sempre existe uma pessoa ao seu lado."

Rustiguel, C.B.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....xii

ÍNDICE DE TABELAS.....xvi

ABREVITURAS.....xix

RESUMO.....xx

ABSTRACT.....xxii

1. INTRODUÇÃO.....1

1.1. FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS.....1

1.1.1 *Metarhizium anisopliae*.....3

1.2 QUITINA.....7

1.3 QUITINASES.....9

1.3.1 FAMÍLIAS 18 E 19 DAS QUITINASES.....11

1.3.2 QUITINASES EM MICRORGANISMOS.....15

1.3.3 ÁREAS DE UTILIZAÇÃO DE QUITINASES.....18

2. OBJETIVOS.....20

2.1. OBJETIVO GERAL 20

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 20

3. MATERIAL E MÉTODOS.....21

3.1 MICRORGANISMOS DE ESTUDO.....21

3.2 MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS NO LABORATÓRIO E OBTENÇÃO DAS CULTURAS.....21

3.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS.....22

3.3.1 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL.....22

3.3.2 PCR E PURIFICAÇÃO DO DNA.....23

3.4 OBSERVAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS DE *Metarhizium anisopliae* POR MICROSCOPLIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....…….....24

3.5 OBETENÇÃO DAS CULTURAS EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FSbm).....25

3.6 OBETENÇÃO DAS CULTURAS EM FERMENTAÇÃO SÓLIDA (FSS).....26

3.6.1 COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES.....26

3.6.1.1 SOLUÇÃO DE SAIS DE KHANNA.....26

3.6.1.2 ÁGUA DE TORNEIRA ...……...….....27

3.7 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE QUITINASE EM FSS.....27

3.8 OBTENÇÃO DOS EXTROS ENZIMÁTICOS.....28

3.9 DOSAGEM DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....29

3.9.1 QUITINASES.....29

3.9.2 PROTEASE.....30

3.9.3 LIPASE.....30

3.10 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....31

3.11 ELETROFORESE EM CONDIÇÕES DESNATURANTES SDS- PAGE (10%).....31

3.12 ANÁLISE DO SECRETOMA DOS DIFERENTES ISOLADOS DE *Metarhizium anisopliae* EM FSbm POR ELETROFORESE BIDIMENSIONAL.....32

3.13 SPECTROMETRIA DE MASSA E IDENTIFICAÇÃO DAS

PROTEÍNAS.....33

3.14 PURIFICAÇÃO PARCIAL DAS QUITINASES EXTRACELULAR PRODUZIDAS PELOS ISOLADOS IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 E IBCB 425 EM FSS.....34

3.15 DETERNIMAÇÃO DA TEMPERATURA E DO pH ÓTIMOS DE ATIVIDADE.....35

3.16 DETERNIMAÇÃO DA TERMOESTABILIDADES E ESTABILIDADES AO pH.....35

3.17 INFLUÊNCIA DE DIFERENTES COMPOSTOS NA ATIVIDADE QUITINÁSICA.....35

3.18 DERTERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS (K_m e $V_{máx}$).....36

3.19 EXPERIMENTOS *IN VIVO*.....36

3.19.1 OBTENÇÃO DAS CULTURAS PARA APLICAÇÃO *IN VIVO*.....36

3.19.2 PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS IBCB 384 E IBCB 425 DE *M. anisopliae* SOBRE LARVAS DE *G. mellonella* POR APLICAÇÃO TÓPICA.....37

3.19.2.1 APLICAÇÃO TÓPICA UTILIZANDO IMERSÃO.....37

3.19.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E ENSAIO DE TOXIDADE.....38

3.19.4 COLETA DE HEMOLINFA, PRODUÇÃO DE SORO E INJEÇÃO EM LARVAS.....39

3.19.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....40

4. RESULTADOS.....41

RESULTADOS PARTE I: Morfologia e Identificação.....41

4.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *M.*

anisopliae.....42

4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DOS MICROCULTIVOS DOS ISOLADOS DE *M. anisopliae*.....45

RESULTADOS PARTE II: Produção enzimática em FSbm e FSS.....49

4.3 PRODUÇÃO DE QUITINASES EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FSbm).....50

4.3.1 PRODUÇÃO QUITINÁSICA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO.....55

4.4 PRODUÇÃO DE QUITINASES EM FSS.....58

4.4.1 INFLUÊNCIA DE DIFERENTES SOLUÇÕES NA PRODUÇÃO DE QUITINASES.....58

4.4.2 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS QUITINASES EXTRACELULARES PELOS ISOLADOS DE *M. anisoplia* EM FSS UTILIZANDO PLANEJAMENTO FATORIAL.....60

RESULTADOS PARTE III: ANÁLISE DO SECRETOMA, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS QUITINASES.....69

4.5 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM CONDIÇÃO DESNATURANTE.....70

4.5.1 ANÁLISE DO SECRETOMA DOS DIFERENTES ISOLADOS *M. anisopliae* CRESCIDOS EM FSbm.....73

4.5.1.1 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SECRETOMA DOS ISOLADOS IBCB 167 E IBCB 384 DE *M. anisopliae* CRESCIDOS EM FSbm.....78

4.6 PURIFICAÇÃO DA QUITINASE EXTRACELULAR PRODUZIDA EM

FSS.....87

4.7 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA E IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO SPI DO ISOLADO IBCB 384.....91

4.8 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA E pH ÓTIMO APARENTE DE ATIVIDADE PARA AS QUITINASES PRODUZIDAS PELOS DIFERENTES ISOLADOS DE *M. anisopliae*.....94

4.9 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA E ESTABILIDADE AO pH.....97

4.10 INFLUÊNCIA DE DIFERENTES COMPOSTOS SOBRE A ATIVIDADE QUITINÁSICA.....100

4.11 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS K_m E $V_{máx}$ PARA AS QUITINASES DOS ISOLADOS IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 E IBCB 425 DE *M. anisopliae*.....102

RESULTADOS PARTE IV: EXPERIMENTOS *IN VIVO*.....104

4.12 ENSAIO DE VIRULÊNCIA.....105

4.12.1 ENSAIO DE VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS IBCB 384 E IBCB 425 DE *M. anisopliae* SOBRE *G. mellonella* UTILIZANDO APLICAÇÃO TÓPICA.....105

4.12.2 ENSAIO DE VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS IBCB 384, IBCB 425 SOBRE A LARVA DE *G. mellonella* UTILIZANDO CONÍDIOS INJETADOS.....106

4.12.3 ENSAIO DE TOXICIDADE DOS ISOLADOS IBCB 384 E IBCB 425 CULTIVADOS EM FSbm SOBRE *G. mellonella* UTILIZANDO MICROINJEÇÃO.....108

4.12.4 EFEITO DA TOXICIDADE DO SORO OBTIDO DE LARVAS DE *G.*

mellonella INFECTADAS PELOS ISOLADOS IBCB 384 E IBCB 425 UTILIZANDO MICROINJEÇÃO.....110

5. DISCUSSÃO.....114

6. CONCLUSÃO.....144

7. REFERÊNCIAS…….....146

8. ANEXO.....171

ARTIGO: Optimization of the Chitinase Production by Different *Metarhizium anisopliae* Strains under Solid-State Fermentation with Silkworm Chrysalis as Substrate Using CCRD.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia de *M. anisopliae*, Aspecto da colônia em meio de cultivo (A), Conidióforo (B), Conídio (C).....4

Figura 2. MEV do ciclo de infecção do fungo *M. anisopliae* sobre carrapato. conídio aderido na cutícula, germinação do conídio, diferenciação do tubo germinativo em apressório, penetração na cutícula, colonização do hospedeiro e extrusão do fungo para a superfície do hospedeiro, com produção de conídios.....6

Figura 3. Hidrólise da quitina pela quitinase (A) e a estrutura da cadeia polimérica da quitina (B).....10

Figura 4. Esquema das fendas da família GH 18, onde onde o substrato se liga. (A) As quitinases possuem múltiplos sítios de ligação a carboidratos, ao longo da estrutura da fenda. A clivagem ocorre entre os carboidratos -1 e +1. Os açúcares entram em contado com os aminoácidos D e E, eles são importantes para o reconhecimento catalítico do motif DXXDXDE e clivagem pelas quitinases. (B) Subgrupo A (classe V) e C apresenta um sítio catalítico em forma de túnel e profundo e o subgrupo B um sítio catatítico aberto e amplo, para interação com os açúcares.....14

Figura 5. Esquema da preparação do microcultivo.....25

Figura 6. Alinhamento de múltiplas sequências dos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384, IBCB 425 de *M. anisopliae* e do LRC 189 *M. anisopliae* var. *anisopliae*, utilizando CLUSTALW.....44

Figura 7. Fotomicrografia eletrônica de varredura com as medidas de comprimento e largura dos conídios, para os isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 do fungo *M. anisopliae* em microcultivo.....46

Figura 8. Fotomicrografia eletrônica de varredura das hifas dos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 do fungo *M. anisopliae* em microcultivo.....47

Figura 9. Análise estatística das medidas de comprimento, largura de conídios e largura das hifas dos isolados de *M. anisopliae*.....48

Figura 10. Produção de quitinase intracelular pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae* sob agitação em função do tempo de cultivo.....56

Figura 11. Produção de quitinase extracelular pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae* sob agitação em função do tempo de cultivo.....57

Figura 12. Gráfico de Pareto em resposta ao planejamento fatorial para FSS delineado para as variáveis tempo de crescimento e umidade dos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 do fungo *M. anisopliae*.....66

Figura 13. Superfície de resposta para o planejamento fatorial considerando as variáveis independentes tempo de crescimento e umidade para os isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 do fungo *M. anisopliae* em FSS.....67

Figura 14. Perfil eletroforético em condição desnaturante (SDS-PAGE 10%) para as quitinases extracelulares produzidas em FSbm tendo glicose como fonte de carbono e meio constituído de crisálida + extrato de levedura, corada por Coomassie Blue R-250.....72

Figura 15. Perfil eletroforético bidimensional para as proteínas secretadas pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae* cultivados em FSbm contendo glicose como fonte de carbono. p*I* 3 – 10 e Marcadores de massa molecular em kDa (M).....75

Figura 16. Perfil eletroforético bidimensional para as proteínas secretadas pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae* cultivados em FSbm contento crisálida como fonte de carbono.....76

Figura 17. Comparação entre as bandas proteicas secretadas do isolado IBCB 167 versus as bandas proteicas secretadas pelos isolados IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae* cultivado em FSbm contendo crisálida como fonte de carbono.....77

Figura 18. Perfil eletroforético bidimensional para as proteínas secretadas pelo isolado IBCB 167 de *M. anisopliae* cultivado em FSbm contento crisálida como fonte de carbono.....79

Figura 19. Perfil eletroforético bidimensional para as proteínas secretadas pelo isolado IBCB 384 de *M. anisopliae* cultivado em FSbm contendo crisálida como fonte de carbono.....80

Figura 20.Número de bandas proteicas identificadas no secretoma dos isolados IBCB 167 e IBCB 384 de *M. anisopliae* cultivado em FSbm contendo crisálida como fonte de carbono.....81

Figura 21. Endo-N-acetyl-β-D-glucosaminidase de *M. anisopliae* identificada. MS dos peptídeos tripíticos e MS/MS do peptídeo tripítico.....87

Figura 22. Perfil cromatográfico coluna de troca iônica DEAE-Celulose para as quitinases extracelulares produzidas em FSS pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 do fungo *M. anisopliae*.....89

Figura 23. Perfil cromatográfico da coluna de exclusão molecular Sephadex G – 100 para as quitinases extracelulares produzidas em FSS pelo isolado IBCB 384 do fungo *M. anisopliae*.....90

Figura 24. Perfil eletroforético em condição desnaturante (SDS-PAGE 4-15%) para a quitinase extracelular do isolado IBCB 384 em FSS tendo crisálida como fonte de carbono, ápos Sephadex G-100.....92

Figura 25. Determinação da temperatura ótima aparente de atividade para as quitinases extracelulares produzidas em FSS pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae*.....96

Figura 26. Determinação do pH ótimo aparente de atividade em tampão ácido cítrico para as quitinases extracelulares produzidas em FSS pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae*.....97

Figura 27. Estabilidade térmica das quitinase extracelulares isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae*.....99

Figura 28. Estabilidade ao pH das quitinases extracelulares dos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 do fungo *M. anisopliae*.....100

Figura 29. Representação gráfica de Lineweaver–Burk para as quitinases extracelulares dos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 do fungo *M. anisopliae*.....104

Figura 30. Confirmação da mortalidade por crescimento micótico dos isolados IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae* sobre larvas de *G. mellonella* após injeção de 800 conídios e incubação por 7 dias a 26°C.....108

Figura 31. Efeito da toxicidade do soro obtido de larvas de *G. mellonella* contaminada com os isolados IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae* após injeção de 800 conídios por larva e incubado por 72h.....113

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Insetos vulneráveis à infecção pelo fungo *M. anisopliae*.....5

Tabela 2. Áreas onde se utiliza os polímeros de quitina e quitosana.....9

Tabela 3. Isolados procedente da Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos "Oldemar Cardim Abreu".....21

Tabela 4. Delineamento de Composto Central Rotacional (DCCR), para a otimização da produção de quitinases em FSS.....28

Tabela 5. Identificação molecular dos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae*.....42

Tabela 6. Produção das quitinases intracelular e extracelular pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 do fungo *M. anisopliae* em fermentação submersa com diferentes meios de cultivo.....52

Tabela 7. Produção de quitinases intracelulares e extracelulares pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 do fungo *M. anisopliae* em fermentação submersa em condição estacionária e sob agitação.....54

Tabela 8. Influência de diferentes soluções salinas, água de torneira e solução de extrato de levedura na produção de quitinases por diferentes isolados do fungo *M. anisopliae* em FSS.....59

Tabela 9. Atividade quitinásica extracelular total produzida pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae* cultivados em FSS através do DCCR.....61

Tabela 10. Análise de variância (ANOVA) para a produção de quitinase isolado IBCB 167 de *M. anisopliae* cultivado em FSS.....61

Tabela 11. Análise de variância (ANOVA) para a produção de quitinase pelo isolado IBCB 360 de *M. anisopliae* cultivado em FSS.....62

Tabela 12. Análise de variância (ANOVA) para a produção de quitinase pelo isolado IBCB 384 de *M. anisopliae* cultivado em FSS.....63

Tabela 13. Análise de variância (ANOVA) para a produção de quitinase pelo isolado IBCB 425 de *M. anisopliae* cultivado em FSS.....64

Tabela 14. Quantificação de enzimas extracelulares totais produzidas pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae* cultivados em FSS.....68

Tabela 15. Comparação das bandas proteicas secretadas pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae* cultivados nos meios EG e EC.....77

Tabela 16. Identificação das bandas proteicas secretadas pelos isolados IBCB 167 e IBCB 384 de *M. anisopliae*.....82

Tabela 17. Purificação das quitinases extracelulares produzidas pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 do fungo *M. anisopliae*.....90

Tabela 18. Identificação das proteínas secretadas pelo isolado IBCB 384 de *M. anisopliae*, ápos Sephadex.....92

Tabela 19. Influência de diferentes compostos na atividade quitinásica extracelular dos isolados de *M. anisopliae*.....101

Tabela 20. Parâmetros cinéticos das quitináses produzidas pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 E IBCB 425 DE *M. anisopliae*.....102

Tabela 21. Ensaio de virulência das linhagens IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae* sobre *G. mellonela*.....105

Tabela 22. Ensaio de virulência dos isolados IBCB 384, IBCB 425 de *M. anisopliae* sobre larvas de *G. mellonella* utilizando conídios injetados.....106

Tabela 23. Ensaio de toxicidade das linhagens IBCB 384, IBCB 425 de *M. anisopliae* cultivadas em FSbm sobre larvas de G. *mellonela* utilizando microinjeção.....109

Tabela 24. Ensaio de toxicidade do soro extraído de larvas de G. *mellonela* após microinjeção de conídios dos isolados IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae*.....111

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Atm.....Atmosfera

Da.....Dalton

DEAE.....Dietilaminoetil

DNS.....Ácido 3’, 5’dinitrosalicílico

EDTA.....Ácido etileno diamino tetra acético

FSbm.....Fermentação submersa

FSS.....Fermantação em extrato sólido

HPLC.....Hight Performance Liquid Chromatography

kDa….....Kilo Dalton

Km.....Constante de Michaelis-Menten

min.....Minutos

mM.....Milimolar

N.....Normal

nm.....Nanômetros

PAGE.....Eletroforese em gel de poliacrilamida

p*I*.....Ponto isoelétrico

p/v.....peso por volume

qsp.....Quantidade suficiente para

s.....Segundos

SDS.....Dodecil sulfato de sódio

U.....Unidade enzimática

µL.....Microlitro

µmols.....Micromols

Vmáx .....Velocidade máxima

V/V.....Volume por volume

RESUMO

Os fungos entomopatogênicos, como *Metarhizium anisopliae*, têm despertado grande interesse como agentes no controle de insetos-pragas. Estas espécies de fungos são especializadas na secreção de um complexo enzimático constituído de proteases, lipases e quitinases, entre outras, estando relacionadas com patogenicidade e virulência. Neste contexto a foi analisada a secreção de quitinases pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, como identificado molecularmente. Contudo, alguns aspectos morfológicos analisados mostram pequenas diferenças entre estes isolados. Para produção de quitinases, os isolados foram cultivados em fermentação submersa na presença e ausência de indutores e em fermentação em estado sólido, tendo crisálida como substrato. A maior síntese de quitinase intracelular foi obtida para IBCB 425 no meio contendo extrato de levedura mais glicose (EG). Visando a produção da enzima extracelular e disponibilidade de fonte de carbono, o meio extrato de levedura mais crisálida (EC), sob agitação foi padronizado para fermentação submersa (FSbm). Os maiores níveis enzimáticos intracelulares para os isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 foram obtidos entre 72 h e 216 h e para a forma extracelular entre 96h e 144h. A produção quitinásica em fermentação sólida (FSS) utilizando crisálida como fonte de carbono foi otimizada por delineamento composto central rotacional (DCCR, tendo como variáveis o tempo de crescimento e umidade. O melhor produtor de quitinase em FSS foi o isolado IBCB 360. A análise do secretoma mostrou um maior número de proteínas quando os isolados foram cultivados na presença do indutor, com destaque para o isolado IBCB 425. A maioria das proteínas secretadas pelos isolados IBCB 167 e IBCB 384, foram identificadas, estando entre elas a endo-N-acetyl-β-D-glucosaminidase, enzima do complexo quitinolítico. As quitinases produzidas pelos quatro isolados foram parcialmente purificadas em DEAE – Celulose, obtendo-se dois picos de atividade quitinásica. O processo de purificação foi continuado para o IBCB 384 em coluna de exclusão molecular, obtendo – se um único pico de atividade quitinásica, analisado por electrospray. A temperatura ótima de atividade para as quitinases produzida em FSS pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 variou de 50ºC a 60ºC e pH ótimo de atividade ficou na faixa de 5,0 - 5,5. As quitinases dos isolados mantiveram-se estáveis nas temperaturas de 30ºC e 40ºC e em uma ampla faixa de pH. Os sais $BaCl_2$ e $MnCl_2$ ativaram as quitinases dos isolados IBCB 167 e IBCB 425. Além disso, todas as quitinases foram tolerantes ao β-

mercaptoetanol. O comportamento cinético de todas as quitinases foi Michaeliano e a maior afinidade pelo substrato foi para a quitinase do isolado IBCB 360. Já os experimentos *in vivo* e *in vitro* mostraram que o isolado IBCB 425 foi melhor na fase pré-infecção e isolado IBCB 384 foi melhor na fase pós – infecção, sendo o mais virulento. Portanto, os isolados *M. anisopliae* têm se mostrado como bons produtores de quitinases, com boa estabilidade a temperatura e pH além de outras características distintas que provavelmente estão relacionadas com o potencial de patogenicidade e virulência de cada isolado.

ABSTRACT

Entomopathogenic fungi such as *Metarhizium anisopliae*, have been attracting great interest as agents to control insect pests. These species of fungi are specialized in the secretion of an enzymatic complex consisting of proteases, lipases and chitinases, among others which are related to pathogenicity and virulence. In this context the secretion of chitinase by IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 and IBCB 425 isolated from *M. anisopliae* var. *anisopliae* molecularly identified, were analyzed. However, some structural features analyzed showed small differences among these isolates. For chitinase production, the isolates were grown in submerged culture in the presence and absence of inducers and under solid state fermentation with chrysalis as substrate. The enhanced synthesis of intracellular chitinase was obtained with IBCB 425 using yeast extract plus glucose (EG). Aiming to produce the extracellular enzyme and the carbon source available, the medium yeast extract and chrysalis (EC), was standardized to SbmF. The high intracellular enzymes levels produced by IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 and IBCB 425 isolates were obtained between 72 h and 216 h and for the extracellular form between 96h and 144h. The chitinase production in SSF using chrysalis as carbon source was optimized by CCRD, having the time of growth and moisture as variables. The best producer of chitinase in SSF was the isolated IBCB 360. The analysis of the secretome showed a great number of proteins when the isolates were grown in the presence of the inducer, especially for the isolated IBCB 425. Most of the proteins secreted by IBCB 167 and IBCB 384 isolates were identified. Among these proteins the endo-N-acetyl-β-D-glucosaminidase was identified, enzyme that participates in the chitinulitic complex. Chitinases produced by the isolates were partially purified on DEAE - cellulose, yielding two peaks of chitinase activity. The purification process was continued for IBCB 384 isolated using molecular exclusion chromatographic column, yielding only one peak of chitinase activity, analyzed by electrospray. The optimal temperature for the chitinase activity from IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 and IBCB 425 isolates obtained in SSF, ranged from 50 ºC to 60 ºC and the optimum pH of activity was 5.0 to 5.5. All chitinases were stable at 30 ºC and 40 ºC, and wide pH range. The $BaCl_2$ and $MnCl_2$ salts activated the chitinases of IBCB 167 and IBCB 425 isolates. In addition, all chitinases were β – mercaptoethanol tolerant. The kinetic behavior of all chitinases was Michaelian with the highest affinity to the substrate observed for the chitinase of

isolated IBCB 360. The *in vivo* and *in vitro* experiments showed that isolated IBCB 425 was better in pre -infection phase and the isolated IBCB 384 was better in the post – infection phase. Therefore, the *M. anisopliae* isolates were good producers of chitinases with interesting temperature and pH stability, and other different characteristics that are probably related to the potential pathogenicity and virulence of each isolate.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fungos Entomopatogênicos

Os fungos são organismos com tamanho e formas variadas podendo ser unicelulares, como as leveduras, ou multicelulares constituídos por um conjunto de filamentos (micélio). Entre tais organismos, existe uma grande diversidade de fungos entomopatogênicos, os quais são patógenos com capacidade de provocar doenças nos insetos. Gaumann (1950) define doença, como um processo dinâmico entre patógeno e hospedeiro, intimamente relacionados entre si e com o meio. Ambos são influenciados, resultando em alterações morfológicas e fisiológicas. Esta capacidade de causar doença é definida como patogenicidade e tem relação direta com as características genéticas e fenotípicas do fungo. Desta forma o fungo pode ser patogênico ou não a um inseto. A doença que estes fungos provocam, pode apresentar níveis diferentes. Estes níveis ou graus são definidos como virulência, uma característica biológica mutável que reflete a intensidade da moléstia causada pelo patógeno (ALVES, 1998). Baseado nestas capacidades, os fungos entomopatogênicos, tendo sido os primeiros patógenos a serem utilizados no controle microbiano de pragas, e em diferentes estudos por mais de 100 anos. Vem crescendo o interesse nestes microrganismos principalmente porque os insetos-pragas têm se tornado cada vez mais resistentes aos pesticidas químicos (WRAIGHT & BRADLEY,1996 ; SHAH & PELL, 2003).

Os fungos entomopatogênicos são patógenos de largo espectro capazes de parasitar insetos que habitam diversos nichos ecológicos em diferentes estágios do desenvolvimento. Grande parte é especializada na penetração via tegumento, sendo esta característica uma vantagem contra outros patógenos que infectam o inseto por via oral ou mesentério (ALVES, 1998). Os principais propágulos produzidos pelos

fungos são os esporos, os quais podem ser de diferentes tipos. A interação entre o patógeno (fungo) e seu respectivo hospedeiro é influenciada por diferentes fatores tais como a temperatura, a umidade, a luz e a radiação ultravioleta, bem como pelas condições nutricionais e suscetibilidade do hospedeiro. Desta forma, o ciclo completo de infecção dos fungos entomopatogênicos apresenta as seguintes fases: adesão, germinação, formação do apressório, formação de grampo de penetração, penetração, colonização e reprodução do patógeno no inseto (ALVES, 1998; SCHRANK & VAINSTEIN, 2010).

As enzimas desempenham papel importante durante o processo de penetração do fungo no hospedeiro, especialmente nas fases de adesão e germinação, onde ocorre a formação do tubo germinativo e a liberação das enzimas que degradam a cutícula do inseto, tais como proteases e quitinases, entre outras (St LEGER *et al.*, 1988b). Vários trabalhos relacionam a produção de enzimas com patogenicidade e virulência, como o trabalho de Paris & Segretain (1978). A incapacidade de *Beauveria brongniartii* em produzir quitinase, por exemplo, o tornou não patogênico para *Melolontha melolontha* (PARIS & FERRON, 1979). Segundo Giménez-Pecci *et al.* (2002), diferentes isolados de uma mesma espécie produzem níveis diferentes de enzimas extracelulares.

Os entomopatógenos possuem ampla variabilidade genética, o que lhes confere diferenças importantes quanto à virulência e patogenicidade à grupos específicos de insetos. Assim sendo, para a diferenciação dos isolados, alguns parâmetros devem ser analisados, tais como crescimento vegetativo, meio de cultura, sensibilidade a produtos químicos e tolerância a luz ultravioleta, bem como a produção de enzimas específicas relacionadas ao processo de infecção (PACCOLA-MEIRELES & AZEVEDO, 1990; SÓSA-GOMEZ, 1994). Existem cerca de 750 espécies

entomopatogênicas descritas distribuídas em 85 gêneros (PUTZKE & PUTZE, 2003), sendo que entre estas *Metarhizium anisopliae* tem sido alvo de diferentes estudos.

1.1.1 *Metarhizium anisopliae*

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* é um deuteromiceto da família Monoliaceae amplamente distribuído na natureza, podendo ser encontrado facilmente no solo. Possui micélio hialino, septado e conidióforos característicos com conídios ovais, apresentando uma coloração que vai do verde ao verde oliva (Figura 1). Este fungo necessita de poucos nutrientes para se desenvolver e pode utilizar como fonte de carbono amido, glicose, glicerol, maltose, sacarose e quitina (ALVES, 1998). *M. anisopliae* pode se desenvolver naturalmente entre as temperaturas de 15 ºC a 32 ºC. Porém, a temperatura ótima de crescimento pode estar ente 24 ºC e 30 ºC. Já o pH ótimo de crescimento é de 6 a 9 (DRIVER *et al*., 2000 ; ARRUDA *et al*., 2005). É interessante ressaltar que o gênero *Metarhizium* possui várias espécies e variedades. No trabalho de Bischoff *et al.,* (2009), eles reorganizaram e esclareceram a taxonomia das espécies deste gênero. Sendo elas *M. anisopliae, M. guizhouense, M. pingshaense, M. acridum, M. lepidiotae* e *M. majus*. Também descreveram as novas espécies *M. globosum* e *M. robertsii*.

O primeiro trabalho utilizando este fungo entomopatogênico, foi realizado pelo zoologista e patologista russo Ilya Metchnikoff em 1878, onde aplicou *M. anisopliae* para controlar as larvas do besouro *Anisoplia austriaca* (ALVES, 1998). *M. anisopliae* tem sido estudado devido a sua capacidade de atacar um grande número de insetos (Tabela 1), de modo especial *Diatrea saccharalis* (Lepdoptera: Crambridae), conhecida como cigarrinha da cana-de-açúcar, sendo que cerca de 10% das lagartas são encontradas infectadas com este fungo naturalmente (ALVES, 1998;

COUTINHO, 2009). O ciclo completo de infecção do fungo *M. anisopliae* sobre o carrapato pode ser observado na Figura 2.

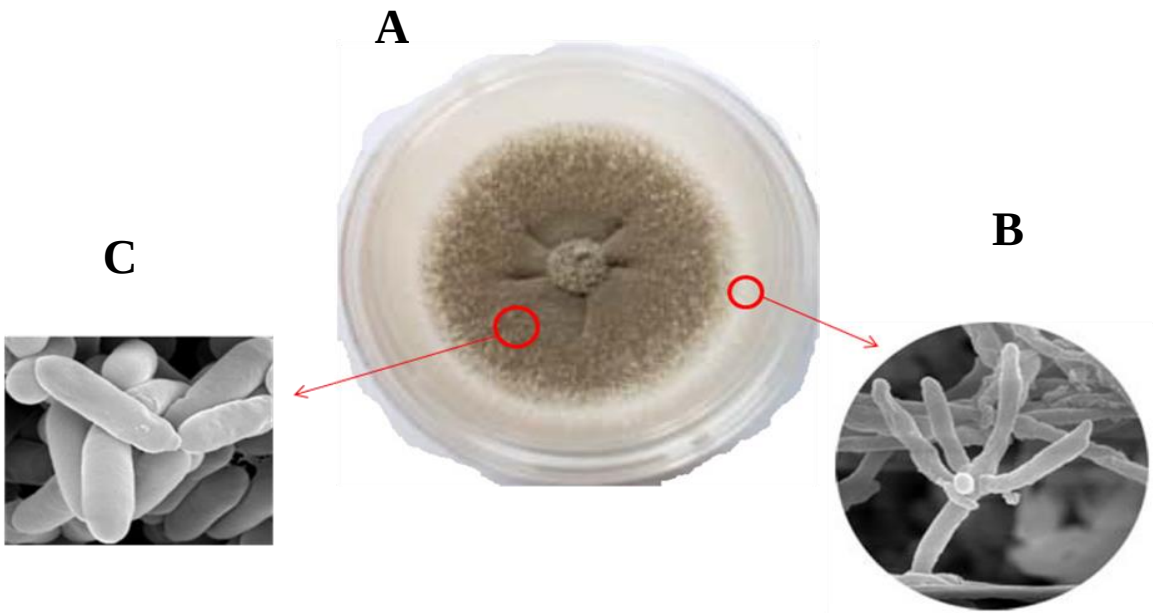


Figura 1. Morfologia de *M. anisopliae* (A) Aspecto da colônia em meio de cultivo, (B) Conidióforo, (C) Conídio. Figura modificada (ARRUDA *et al*., 2005).

Tabela 1. Insetos vulneráveis à infecção pelo fungo *M. anisopliae*.

Espécie hospedeira	Ordem: Família	Descrição	Referências
Anopheles gambiae	Diptera: Culicidae	Vetor da malária	Scholte et al., 2004
Culex quinquefasciatas	Diptera: Culicidae	Transmissor da filariose	Lacey et al., 1988
Musca domestica	Diptera:Muscidae	Mosca	Barson et al., 1994
Glossina spp.	Diptera:Glossinidae	Mosca tse-tsé	Kaaya & Munyinyi, 1995
Ceratitis capitata	Diptera:Tephritidae	Mosca da fruta	Mochi et al., 2006
Zaprionus indianas	Diptera:Drosophilidae	Mosca-do-figo	Svedese et al., 2005
Anastrepha ludens	Diptera:Tephritidae	Mosca das frutas mexicana	Lezana-Gutiérrez et al., 2000
Dysdercas peravianus	Hemiptera:Pyrrhocoridae	Percevejo manchador do algodão	Lubëck et al., 2008
Mahanarva fimbriolata	Hemiptera:Cercopidae	Cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar	Almeida et al., 2003
Mahanarva posticata	Hemiptera:Cercopidae	Cigarrinha da folha da cana-de-açúcar	Filho et al., 2003
Bemisia tabaci	Hemiptera:Aleyrodidae	Mosca branca do tabaco	Batta, 2003
Triatoma infestans	Hemiptera:Reduviidae	Transmissor da doença de Chagas	Luz et al., 1998
Vatiga illudens	Hemiptera:Tingidae	Percevejo -da-renda	Oliveira et al., 2001
Deois flavopieta	Homoptera:Cercopidae	Cigarrinha das pastagens	Teixeira et al., 2007
Tetranychus evansi	Acarina:Tetranychidea	Ácaro vermelho	Wekesa et al., 2005
Hypothenemus hampei	Coleoptera:Scolytidae	Broca do café	Bustillo et al., 1999
Chalcodermus bimaculatus	Coleoptera:Curculionidae	"Manhoso"	Quintela et al., 1992
Capnodis tenebrionis	Coleoptera:Buprestidae	"Flatheaded peachborer"	Marannino et al., 2006
Diploschema rotundicolle	Coleoptera:Cerambycidae	Broca dos citros	Machado & Filho, 2006
Blatella germanica	Dyctioptera:Blattellidae	Barata	Quesada-Moraga, 2004
Schistocerca gregaria	Orthoptera:Acrididae	Gafanhoto do deserto	Mowierski et al., 1996
Manduca sexta	Lepidoptera:Sphingidae	Lagarta da folha do tabaco	St. Leger et al., 1996

Tabela modificada: Junges, (2010).

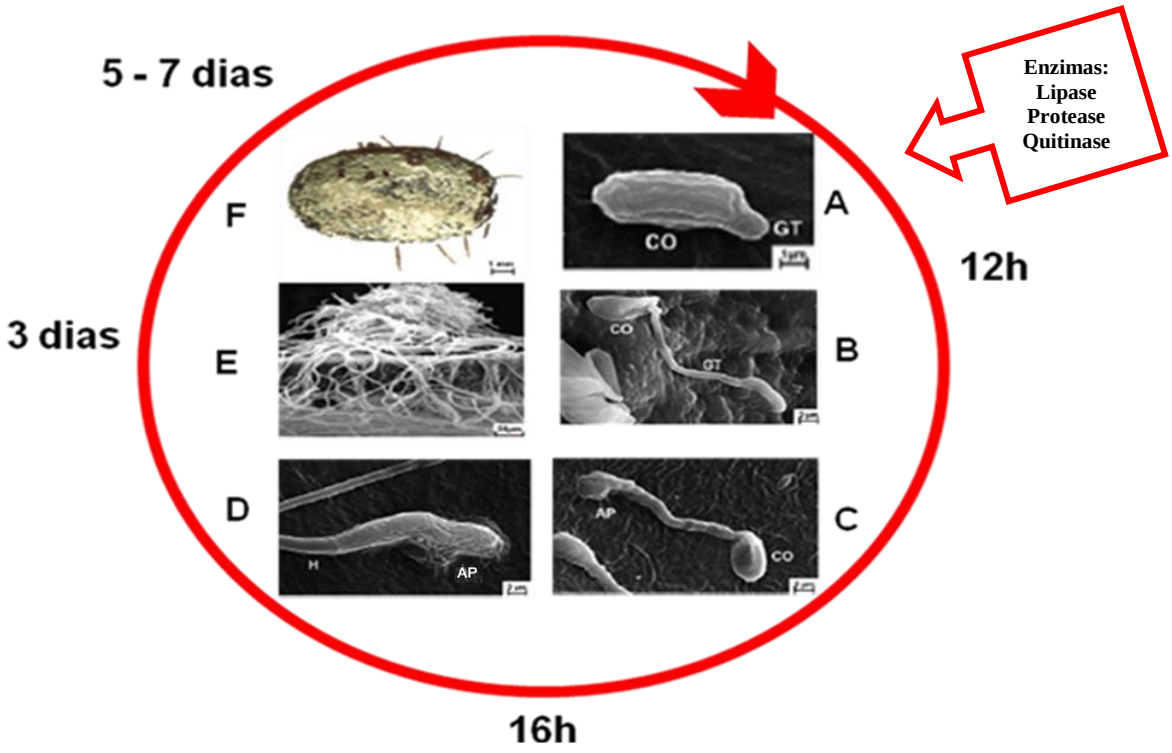


Figura 2. MEV do ciclo de infecção do fungo *M. anisopliae* sobre carrapato. (a) conídio aderido na cutícula, (B) germinação do conídio, (C) diferenciação do tubo germinativo em apressório, (D) penetração na cutícula, (E) colonização do hospedeiro e (F) extrusão do fungo para a superfície do hospedeiro, com produção de conídios. CO - conídio, GT – tubo germinativo, AP – apressório, H – hifa. Escalas utilizadas 2 µm a 1 mm. Figura modificada (SCHRANK & VAINSTEIN, 2010).

Loureiro *et al*. (2005) e Zappelini (2009) selecioaram diferentes isolados dos fungos entomopatogênicos para controle de pragas. Entretando Zappelini (2009) investigou os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *M. anisopliae*, sendo que deste último, foram testados 27 isolados quanto à infecção e a mortalidade de *D. saccharalis*. Analisando os resultados obtidos no trabalho de Zappelini (2009) e outras informações descritas na literatura sobre a relação entre enzimas e virulência de fungos (BOLDO *et al*., 2009), optamos por investigar os isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 da espécie *M. anisopliae*, cujas porcentagens de mortalidade confirmada para a praga *D. saccharalis* foram de 55%, 68%, 96% e 82%, respectivamente.

Este fungo apresenta um bom desenvolvimento em meio sólido tendo arroz pré-cozido como substrato, chegando a uma produção de 10^{12} conídios/Kg de arroz (ALMEIDA & BATISTA FILHO, 2001; ALVES & LOPES, 2008). Segundo o trabalho de Boldo *et al.* (2009), *M. anisopliae* produz diferentes quitinases, enzimas relacionadas ao processo infecção do fungo sobre o hospedeiro, justificando assim a realização deste trabalho.

1.2 QUITINA

Quitina vem da palavra grega χιτώνας que significa túnica. Este polissacarídeo foi descrito pela primeira vez, como substâncias presente em cogumelos pelo pesquisador Henri Braconnot em 1811 (HARTL *et al.*, 2012). Este polissacarídeo é facilmente encontrado na natureza, ocupando o segundo lugar, perdendo apenas para a celulose (FRANCO, 2005). Este polissacarídeo está presente em algas, fungos e exoesqueleto de artrópodes. A quitina é um polímero de cadeia linear, constituídos por moléculas simples de β-(1-4) 2-acetamido-2-deoxi-D-glicose (N-

acetilglicosamina), sendo insolúvel em água e solventes orgânicos (Figura 3). A quitina desempenha diversas funções biológicas, sendo um polímero atóxico, biodegradável, biocompatível e obtido de fontes naturais (DIAS *et al*., 2013). Ela apresenta polimorfismo e está dividida em α, β e γ (Figura 3). A quitina α é a mais rígida porque a cadeia polimérica está disposta em sentido paralelo e antiparalelo e possivelmente encontrada em artrópodes. Na quitina β a cadeia polimérica é paralela, possibilitando maior flexibilidade aos organismos que a possui, como as lulas. Já na quitina γ a cadeia polimérica apresenta uma mistura das posições, porém não em proporções iguais (MATSUI, 2007). A partir da quitina hidrolisada obtem-se a quitosana, que é produto de valor econômico e características biológicas interessantes como atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-colesterolémica e analgésica (MARICATO, 2010). Sendo assim, a quitina e os seus produtos apresentam características únicas e de extremo valor para a humanidade. Estes polímeros podem ser aplicados no tratamento de efluentes industriais ou em outras áreas como descrito na tabela 2. O processo para extrair a quitina, divide-se em três etapas: desproteinização, desmineralização e despigmentação (ANTONINO, 2007). Já a obtenção da quitosana pelo processo natural necessita da desacetilação da quitina (OLIVEIRA, 2006). Em todos os processos citados anteriormente são utilizados ácido fortes, bases fortes e solventes orgânicos, gerando resíduos industriais que podem causar problemas ambientais. A melhor opção para reduzir os problemas ambientais, do processo de extração de quitina, é o aumento de pesquisas voltadas para enzimas que hidrolisam o polímero de quitina. De forma geral a substituição de produtos químicos por enzimas, reduz os resíduos industriais nocivos ao meio ambiente.

Tabela 2. Áreas onde se utiliza os polímeros de quitina e quitosana.

Área	Utilização
Indústria de Alimentos	Aditivos alimentares Nutrição Animal Embalagens
Farmacêutica	Agente Cicatrizante Aditivo Liberação controlada de drogas Controle de Colesterol Lente de contato
Biomédica	Biomembranas artificiais Sutura cirúrgica
Cosmética	Umectante Fungicida Bactericida
Indústria Têxtil	Tratamento de Superfície
Biotecnologia	Imobilização de enzimas células Separação de proteínas Cromatografia Antibacteriana

1.3 QUITINASES (EC 3.2.1.14)

Quitinases são enzimas amplamente encontradas na natureza, existindo uma grande diversidade de organismos que as produzem, tanto procariotos como eucariotos, estando entre estes últimos os fungos. A quitinase catalisa a hidrólise de ligações de β-1,4(GlcNac) da quitina (Figura 3 A) (FLEURI & SATO, 2005).

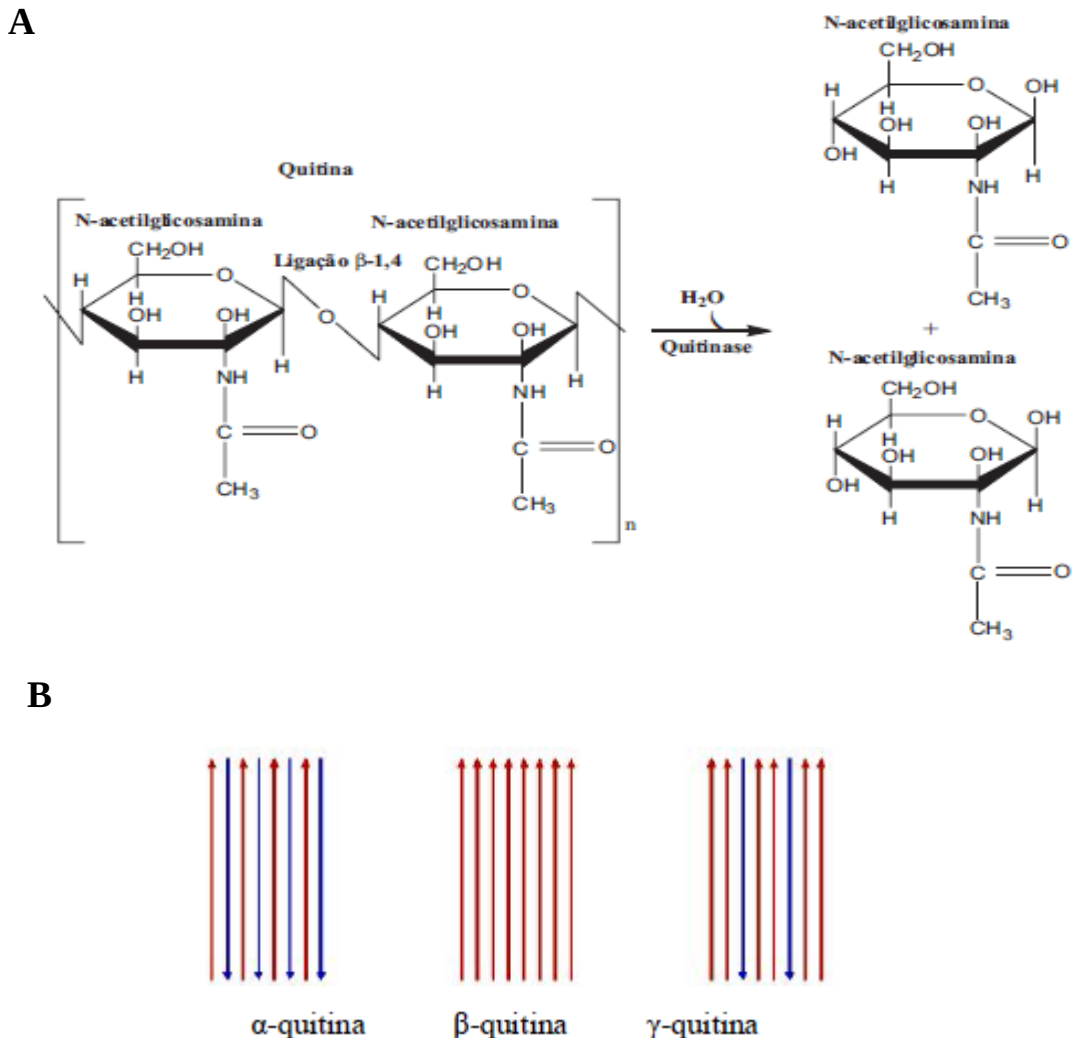


Figura 3. Hidrólise da quitina pela quitinase (A) e a estrutura da cadeia polimérica da quitina (B) Figura modificada (FLEURI & SATO, 2005; SPIN - NETO, 2008 e ANTONINO, 2007).

A hidrólise completa da quitina ocorre através de um sistema quitinolíco o qual atua de maneira sinérgica e consecutiva (PATIL *et al*., 2000). As quitinases são divididas em duas classes principais, as endoquitinases e as exoquitinases. As endoquitinases clivam a quitina em sítios aleatórios no interior do polímero, liberando quito-oligossacarídeos (quitotetraose, quitotriose). As exoquitinases clivam a quitina a partir da sua extremidade não redutora, liberando dímeros de $(GlcNAc)_2$ (DUO-CHUAN, 2006; VAN AALTEN *et al*., 2001). Também foram descritas as endo-exoquitinases, que apresentam as duas atividades (DA SILVA et *al*., 2006). As duas classes de quitinases são distintas das N-acetilglicosaminidases, que atuam sobre os produtos da ação das quitinases, convertendo - os em N-acetilglicosaminas. Entretanto, as N-acetilglicosaminidases também são capazes de liberar resíduos de N-acetilglicosamina a partir da extremidade não redutora da quitina (DUO-CHUAN, 2006). As N-acetilglicosaminidases estão incluídas na família 20 das glicosil hidrolases (GH) com base na conservação da sequência de aminoácidos, na presença de vários motivos conservados e na estrutura das proteínas (HENRISSAT, 1991).

1.3.1 FAMÍLIAS 18 E 19 DAS QUITINASES

Dentro da família das glicosil-hidrolases (GH) as quitinases estão divididas em duas famílias, as famílias GH 18 e GH 19. Sendo assim, as famílias GH 18 e GH 19 não compartilham similaridade de sequências e apresentam algumas características peculiares (BATTACHARYA *et al.*, 2007; KASPRZEWSKA, 2003).

Na família GH 19 encontramos as quitinases produzidas por plantas (PERRAKIS *et al*., 1994). Esta família apresenta um domínio catalítico em forma de estrutura bilobada e predominância de α-hélices. Seu mecanismo enzimático é de inversão e seus produtos são α –anômeros (SEIDL *et al.*, 2005).

Em plantas, estas quitinases parecem estar envolvidas na defesa contra patógenos e contra estresses abióticos. Evidências que comprovam o papel das quitinases em plantas se confirmam pelo fato de que elas são induzidas durante a infecção por patógenos e sob o efeito de várias formas de estresses do meio ambiente. Como conseqüência de sua ação, uma série de eventos degenerativos ocorre na célula do patógeno, incluindo desorganização das células do fungo fitopatogênico e da sua cutícula, levando ao desequilíbrio osmótico, a agregação e o recolhimento do citoplasma e da membrana plasmática (CASTORIA *et al*., 2001).

Tais quitinases estão incluídas em um complexo conhecido como proteínas relacionadas à patogenicidade (PR-patogenesis-related), sendo observadas em plantas, quando estas são atacadas por microrganismos patogênicos (HEIL & BOSTOCK *et al.*, 2002). Atualmente cinco classes de quitinases vegetais são reconhecidas com base nas similaridades entre as sequências de aminoácidos (EL-KATANY *et al*., 2001 e OHNO *et al*., 1996):

- Classe I: contém um domínio rico em cisteína na região N-terminal, o qual está envolvido na ligação com quitina, e um peptídeo C-terminal altamente conservado. Este tipo de quitinase é conhecida por existir em grande quantidade nas monocotiledôneas e dicotiledôneas.

- Classe II: têm alta similariedade de sequências com as da classe I e são secretadas no apoplasto.

- Classe III: não mostra identidade de sequência com outras classes, mas parece estar mais próxima de enzimas de fungos envolvidas na morfogênese. Tipicamente, elas são proteínas extracelulares e têm atividade de lisoenzimas.

- Classe IV: têm significativa similaridade com as da classe I, pois contêm um domínio rico em cisteína e mostram o principal domínio catalítico da classe I, embora

com duas deleções características. Quitinases desta classe são extracelulares e têm sido identificadas principalmente em dicotiledôneas.

- Classe V: compreende um grupo de exoquitinases não relacionadas às outras quitinases de plantas. Estas possuem uma estrutura de sequência primária que parece ser derivada daquela observada em bactérias.

As quitinases das classes I, II e IV têm sequências homólogas e constituem a família GH 19, enquanto que as representantes das classes III e V não são homólogas com as anteriores e pertencem à família GH 18 (SUBROTO *et al*., 1999).

Todas as quitinases de fungos relatadas até o momento pertencem à família GH 18, porém encontramos uma ampla gama de indivíduos que as produzem, incluindo bactérias, plantas, insetos, mamíferos e vírus (PERRAKIS *et al*., 1994). Esta família possui um domínio catalítico em forma de barril $(\alpha/\beta)_{8,}$ e seu mecanismo enzimático é de retenção, o qual resulta em quito-oligossacarídeos com configuração β- anomérica (ARAKANE & MUTHUKRISHNAN, 2010). Todas as quitinases da família GH 18 são sensíveis a alosamidina e estão divididas nos subgrupos A, B e C. Estes subgrupos diferem na arquitetura, no formato da fenda do sítio catalítico, na atividade enzimática endo e extra, na presença de diferentes carboidratos ligados (SEIDL *et al.*, 2005 e 2008; GRUBER & SEIDL – SEIBOTH, 2011). As quitinases do subgrupo A e C pertencem a classe V (fungos e bacterias), o subgrupo B pertence à classe III (fungos e plantas). As quitinases da classe III possuem um sítio ativo aberto e raso, apresentado pelas endoquitinases (TERWISSCHA VAN SCHELTINGA *et al.*,1996). Diferentemente as quitinases da classe V, possuem um sítio catalítico em forma de túnel e profundo, são característicos de exoquitinases como os encontrados nas quitinases bacterianas ChiA e ChiB de *Serratia marcescens* e a quitinase CiX1 do fungo *Coccidioides immitis* (BORTONE *et al.*, 2002).

Geralmente o sítio catalítico das quitinases da família GH 18 é longo e adapta – se no mínimo 5 unidades de açúcar. A clivagem dos substratos sempre ocorre entre o açúcar -1 e +1, como pode ser observado na Figura 4.

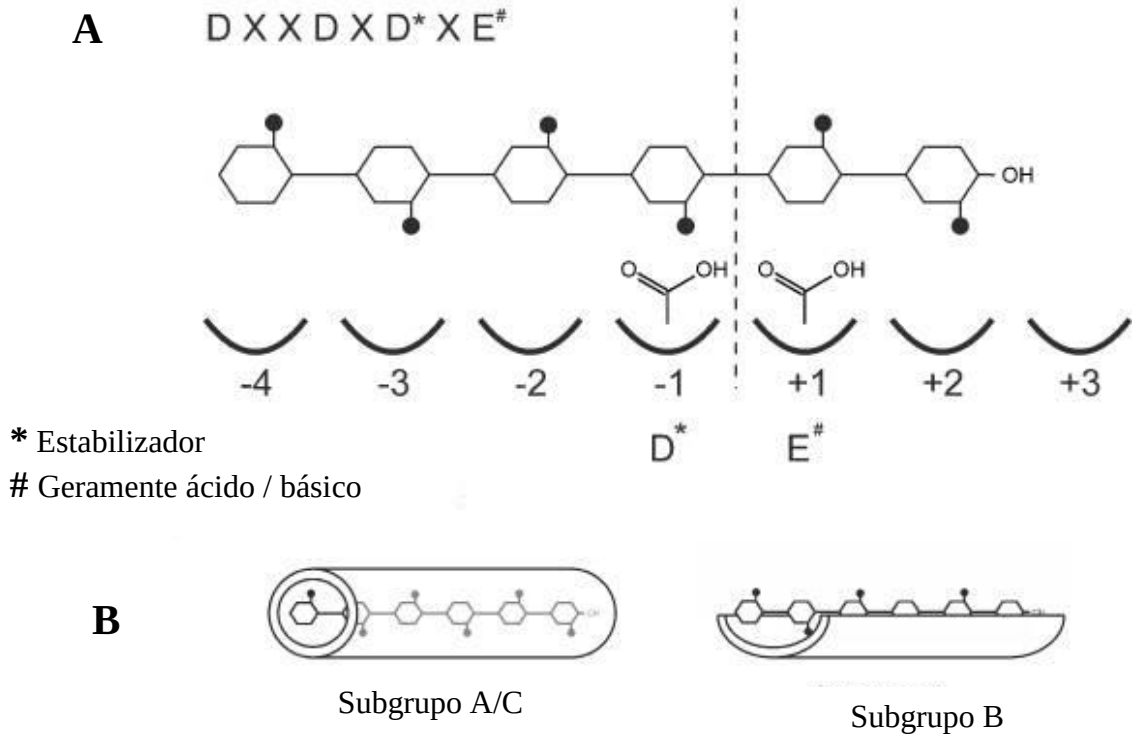


Figura 4. Esquema das fendas da família GH 18, onde onde o substrato se liga. (A) As quitinases possuem múltiplos sítios de ligação a carboidratos, ao longo da estrutura da fenda. A clivagem ocorre entre os carboidratos -1 e +1. Os açúcares entram em contado com os aminoácidos D e E, eles são importantes para o reconhecimento catalítico do motivo DXXDXDE e clivagem pelas quitinases. (B) Subgrupos A (classe V) e C apresentam um sítio catalítico em forma de túnel profundo e o subgrupo B, um sítio catatítico aberto e amplo, para interação com os açúcares. Figura modificada de Hartl *et al.*, 2012.

Dentro dos domínios já identificados, as quitinases da família 18 apresentam domínios característicos como aquele com uma região rica em resíduos de serina / treonina; domínio de união à quitina (ChBD); domínio de união à celulose (CBD), domínios LysM e região N-terminal contendo peptídeo sinal. Sendo assim o subgrupo A possui o domínio S-globulina e o B domínio de união à celulose (CBD). Ambos abrangem quitinases de fungos. Já a subgrupo C contém as quitinases de alta massa molecular, domínios LysM e domínio EGF1 – like (SEIDL *et al* ., 2005).

As quitinases da família GH 18 são capazes de realizar reações de transglicosilação. Esta capacidade foi observada para as quitinases Chit42, Chit33 e de *Trichoderma harzianum* e ChitB1 *A. fumigatus* (ANDRES *et al.,*2012; BOER *et al.,* 2004 e LU *et al.,* 2009). Mutações nos resíduos de aminoácidos da ChitB1 envolvidos na ligação do substrato, alteraram a atividade hidrolítica desta enzima para reação de transglicosilação. Já a reação de transglicosilação de Chit42 e Chit33 foi observada com modificações sintéticas dos quito-ologosacarideos (COSs). Estes quito-oligosacaridios são importantes e utilizados em inúmeros setores (AAM *et al.,* 2010).

1.3.2 QUITINASE EM MICRORGANISMOS

Em fungos, as quitinases estão envolvidas em várias funções como: i) na morfogênese da parede celular, ii) nos processos nutricionais, iii) na degradação da quitina exógena, iv) remodelamento da parede celular durante o ciclo de vida do fungo e v) na competição e defesa contra outros fungos e artrópodes (SEIDL, 2008; BOLDO *et al*., 2009). A quitinase é produzida por diversos microrganismos como *T. harzianum* CECT 2413 (REY *et al*., 2001), *Glomus mosseae* e *Glomus intraradices* (POZO *et al*., 2002), *Tilletiopsis pallescens* (URQUHART *et al.*, 2002),

Cellulomonas flavigena (CHEN *et al.*,1997), *Paecilomyces lilacinus* (KHAN *et al.*, 2003) e *B. bassiana* (SASSÁ *et al*., 2008), entre outros. Muitos microrganismos necessitam da presença de indutores específicos para síntese de enzimas de interesse, os quais podem ser adicionados ao meio de cultivo em estudos conduzidos em laboratório, como foi feito para a obtenção de quitinase em fermentação sólida com *T. harzanium* TUBF 781. O extrato enzimático extracelular obtido do fungo *T. harzanium* TUBF 781 mostrou atividade antifúngica contra uma série de linhagens, tais como *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Mucor* sp. e principalmente *Aspergillus niger* (NAMPOOTHIRI *et al*., 2004). Foi observado que a quitinase produzida por *T. harzanium*, apresentou pH e temperatura ótimos de atividade igual a 3,5 e 50°C, respectivamente, e pI de 7,4. Neste caso, a massa molecular obtida foi de 27,5 kDa (DEANE *et al.*, 1998). Segundo Chang *et al.* (2010), a quitinase produzida por *Bacillus subtilis* também apresentou atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum.*

Quando analisada a produção de endoquitinases por *Bacillus stearothermophilus* CH-4 em meio de cultivo contendo quitina como única fonte de carbono, três formas enzimáticas diferentes foram encontradas, ou seja, quitinase A (endo-ação), quitinase B (exo-ação) e N-acetilglicosaminidase (KENJI *et al*., 1998). Entretanto, vários fungos como *Trichoderma* sp. e *M. anisopliae* secretam diferentes enzimas, entre elas as quitinases que são essenciais para a ação micoparasitária (EL-KATANY *et al*., 2001).

Muitas pesquisas têm focado na produção de quitinases pelos agentes de biocontrole, os quais supostamente agem como depolimerases da parede celular de fungos fitopatogênicos e na cutícula dos insetos-pragas (CASTORIA *et al*., 2001). O fungo *B. bassiana* também é utilizado como um biocontrolador que produz isoformas

de quitinases que foram ativas nos pH 5,5, 6,0 e 8,5 (SASSÁ *et al.*, 2008). No trabalho desenvolvido por Adrangi *et al*. (2010) também foram identificadas e caracterizadas duas isoformas de endoquitinases extracelulares produzidas por *Massilia timonae*, sendo elas Chi 56 e Chi 64. Ambas apresentaram pH ótimo de atividade de 5,0, pI de 8,5, ativação por Mn^{2+} e inibição por Hg^{2+}. Comparando–se ambas as formas, Chi 56 possui massa molecular de 56 kDa e a sequência N-terminal Q-T-P-T-Y-T-A-T-L. Já para Chi 64 a massa molecular foi de 64 kDa e a sequência N-terminal Q-A-D-F-P-A-P-A-E (ADRANGI *et al*., 2010).

A quitinase purificada (30 kDa) de *M. anisopliae* teve seu ótimo de atuação no pH 4,5 e 5,0, e na temperatura entre 40°C e 45°C (PINTO *et al.*, 1997). Nos trabalhos de St. Leger *et al.* (1991), Pinto *et al*. (1997) e Kang *et al.* (1999) foram relatadas quitinases diferentes de *M. anisopliae*, com massas moleculares variando de 30 kDa a 110 kDa.

Vários experimentos com a expressão ou superexpressão de genes de quitinases de fungos vêm sendo desenvolvidos, existindo duas abordagens distintas: i) Sistema biológico *in vivo*; ii) Alta produção da enzima para testes *in vitro*. Como exemplo em sistemas biológicos, o gene de quitinase do fungo *Trichoderma* ssp. foi introduzido em plantas (limão, algodão, maçã e cenoura) conferindo uma maior resistência frente a fungos fitopatogênicos. Estas plantas também apresentaram resistência a outros tipos de estresses biótico (bactérias) e abióticos (salinidade e metais pesados), segundo os trabalhos De Las Mercedes *et al.* (2006) e Kumar *et al.* (2009). A expressão de genes da quitinase tem sido estudada em fungos entomopatógenos, como *B. bassiana* (FANG *et al*., 2004), *Nomuraea rileyi* (WATTANALAI *et al*., 2004) e *Paecilomyces javanicus* (CHEN *et al.*, 2007). O gene *Bbchit1* de *B. bassiana* foi superexpresso e as linhagens resultantes foram bastante

virulentas em bioensaios contra afídeos adultos (*Myzus persicae*) (FANG *et al*., 2004). Utilizando o mesmo gene, Fang *et al*. (2007), superexpressaram em *B. bassiana* uma quitinase recombinante contendo um domínio de reconhecimento da quitina pertencente ao inseto *Bombix mori*. A quitinase recombinante apresentou propriedades cinéticas de hidrólise aumentada e uma maior virulência quando comparada com a quitinase nativa.

Os fungos, de forma geral, podem apresentar entre 10 e 25 quitinases diferentes e a maioria destas quitinases ainda não foram estudadas. Existem várias quitinases preditas nos genomas de fungos como, por exemplo, em *Chaetomium globosum* (LIU *et al*., 2008) e *Hypocrea jecorina* (SEIDL *et al*., 2005). Segundo Seidl *et al*. (2005) o fungo *Trichoderma reesei* possui 18 genes que codificam quitinases e o mesmo número de genes que codificam quitinases, foi observado para o fungo *A. fumigatus* (ALCAZAR – FUOLI *et al*., 2011). Observa - se um número maior de genes codificadores de quitinases em *M. anisopliae*, chegando a aproximadamente 30 genes, já para *M. acridum* são 21 genes (GAO *et al*., 2011) e 20 genes para *B. bassiana* (XIAO *et al*., 2012). Ou seja, há muito que estudar e entender sobre as quitinases.

1.3.3ÁREAS DE UTILIZAÇÃO DAS QUITINASES

As quitinases são enzimas com grande potencial biotecnológico podendo ser utilizadas em diversos setores industriais como o alimentício, farmacêutico, biomédico, cosmético, têxtil e agrícola. São empregadas também no controle fungos fitopatogênicos e pragas agrícolas. Adicionalmente, as quitinases são capazes de realiazar transglicosilação, produzindo quito-oligosacarídeos biologicamente ativos. Eles agem como indutores de defesa da planta e estão envolvidos na sinalização para

desenvolvimento do nódulo radicular. Podem ainda ser empregados na área médica como, por exemplo, a quitohexaose e a quitoheptaose, ambos com atividade antitumoral. Estes quito-oligosacaridios são utilizados ainda no setor de cosméticos e de tratamento de águas (AAM *et al.*, 2010). Para obter os COS é necessária a realização da hidrólise química da quitina utilizando ácidos ou enzimas. No entanto, a hidrólise química gera efluentes contaminados, que causam danos ao meio ambiente. Sendo assim, a capacidade de transglicosilação apresentada pelas quitinases é interessante, evitando a contaminação ambiental, ampliando as áreas de aplicação destas enzimas e ainda destacando o grande potencial biotecnológico das mesmas.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve por objetivo investigar a produção de quitinases pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, caracterizando - as bioquimicamente e utilizando estas características para um melhor entendimento da interação patógeno-hospedeiro e, consequentemente, da virulência.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Foram objetivos específicos deste trabalho:

a) Identificar molecularmente os isolados;
b) Análisar a morfologia dos isolados por microscopia eletrônica de varredura;
c) Determinar e padronizar as melhores condições físico-químicas para a produção de quitinases pelos isolados;
d) Estabelecer as melhores condições de ensaio para atividade enzimática;
e) Purificar e caracterizar as quitinases produzidas pelos isolados;
f) Analisar o secretoma dos isolados e identificar as proteínas secretadas;
g) Realizar ensaios de virulência *in vivo* utilizando os isolados IBCB 384, IBCB 425 de *M. anisopliae* sobre *Galleria mellonella*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMOS DE ESTUDO

Para a realização deste trabalho foram utilizados os isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 (Tabela 3) da espécie *M. anisopliae* procedente da Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos "Oldemar Cardim Abreu" do Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico de Campinas, gentilmente cedido pelo Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida.

Tabela 3. Isolados procedente da Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos "Oldemar Cardim Abreu" do laboratório de Controle Biológico, Instituto Biológico, Campinas – SP.

Isolados IBCB	Mortalidade	Origem	Local
167	55%	Solo	Cascavel-PR
360	68%	Solo da área de cultivo da banana	Piedade-SP
384	96%	Inseto: *Mahanarva fimbriolata*	Sertãozinho-SP
425	82%	Solo Mata Atlântica	Iporanga-SP

Mortalidade: Quantidade de insetos (*Diatraea saccharalis*) infectados e mortos pelo fungo *M. anisopliae.*

3.2 MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS NO LABORATÓRIO E OBTENÇÃO DAS CULTURAS

Os isolados foram mantidos em laboratório em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio sólido BDA (batata-dextrose-ágar), previamente esterilizados em autoclave a 120°C e 1,5 atm, por 20 minutos e solidificado de forma inclinada. Os repiques foram feitos utilizando alça de platina. As culturas foram mantidas a 26°C

por 10 dias em estufa e posteriormente conservadas em geladeira a 4°C e utilizadas em até 30 dias.

3.3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS

Esta parte do trabalho foi desenvolvido na Universidade de Córdoba / Espanha, no Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales na Unidad Entomología Agrícola, Campus de Rabanales sob a orientação do Professor Doutor Enrique Quesada Moraga.

3.3.1 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL

Para a extração de DNA foram utilizados 50 mg de micélio, esferas de vidro estéreis e 500 µL de tampão de lise (24,28 g de Tris, EDTA 0,01 mol/L, NaCl 0,5 mol/L, SDS1% para 1L, pH 7,5), submetidos a agitação em Vórtex por 10 minutos. Em seguida adicionou-se 500 µL da solução fenol-clorofórmio - álcool isoamílico nas proporções (25:24:1) e submetidos a agitação em Vórtex por 5 minutos. O material lisado foi centrifugado por 8 minutos à 8.000 x *g*. O sobrenadante foi transferido para outro tubo tipo Eppendorf e adicionado de 500 µL de clorofórmio - álcool isoamílico (24:1), homogenizado e centrifugado por 8 minutos à 8.000 x *g*. O novo sobrenadante foi transferido para outro tudo tipo Eppendorf, adicionado 10 µL de RNase, misturado e incubado a 37 ° C durante 1h. Passado o período, adicionou-se 500 µL da solução fenol - clorofórmio – álcool isoamílico na proporção (25:24:1), misturando bem e o material foi centrifugado a 8.000 x *g* por 8 minutos. O sobrenadante foi transfertido para um novo tubo tipo Eppendorf, adicionado de 500 µL da solução clorofórmio - álcool isoamílico (24:1), homogenizado e centrifugado a 8.000 x *g* por 8 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tudo tipo Eppendorf, adicionado de 2,5

volumes de etanol 100% e misturado delicadamente, para a preciptação do DNA. O material foi mantido em temperatura ambiente durante 2 minutos e posteriormente centrifugado 9.600 x *g* durante 10 minutos. O etanol foi removido vertendo- se o tubo. Posteriormente 200 µL de etanol a 70 % gelado foi adicionado. Em seguida procedeu-se a centrifugação 9.600 x *g* durante 2 minutos. O tubo foi vertido para secar o preciptado formado. Finalmente a amostra foi solubilizada em 60 µL de água para PCR (RAEDER & BRODA, 1985).

3.3.2. PCR E PURIFICAÇÃO DO DNA

A reação de PCR foi preparada utilizando o kit MyTaq Red DNA Polymerase, como segue: 10µL de 5x MyTaq Red Reaction Buffer, 1µL do Primer R (ITS4) a 20 µM, 1µL do Primer F (ITS1F) a 20 µM, 36µL de água (ddH_2O), 1,5µL de DNA e 0,5µL de MyTaq Red DNA Polymerase.

As sequências dos primers utilizados são as seguintes: Primer forward - ITS1F: 5´-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA – 3´ (GARDES & BRUNS, 1993) e Primer reverse - ITS4: 5´- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3´ (WHITE *et al.*, 1900). Uma vez preparada as amostras, foi realizada a PCR utilizando o aparelho PCR Applied Biosystems® Veriti® 96-Well Thermal Cycler, como descrito nos passos abaixo:

Passos	**Temperatura**	**Tempo**	**Ciclos**
Desnaturação inicial	95ºC	3 min	1
Desnaturação	95ºC	15 s	35 ciclos
Anelamento	50ºC	15 s	35 ciclos
Extensão	72ºC	10 s	35 ciclos
Final	4ºC	∞ (infinito)	∞ (infinito)

Após o termino do PCR, utilizou-se um gel de agarose 0,8% para recortar as bandas de interesse. A purificação foi realizada utilizando o Kit Gene Clean con Favor Prep GEL/PCR Purification, seguindo as intruções do fabricante. As amostras obtidas deste processo foram enviadas a empresa StabVida, que foi responsável pelo sequeciamento. As sequências obtidas foram tratadas com o programa DNAStar. Posteriormente os programas Blast e ClustalW foram utilizados para identificar os isolados e alinhar.

3.4 OBSERVAÇÃO DA MORFOLÓGIA DOS ISOLADOS DE *M. anisopliae* POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Os microcultivos para cada isolado foram preparados sobre lamínulas de vidro, sobre as quais foram colocados pequenos cubos de BDA. Com auxílio de uma alça de platina os isolados foram inoculados nos quatro lados do pedaço de BDA e posteriormente, cobertos com lamínula estéril (Figura 5). Após o inóculo, a lâmina foi acondicionada dentro de uma câmara úmida à 25°C, por 4 dias. Depois do período de crescimento as lamínulas foram retiradas e imersas em banhos sucessivos de concentrações crescentes de álcool etílico (10 – 100%). Sendo analisadas posteriormente em MEV. O microscópio eletrônico de varredura utilizado foi Zeiss EVO 50 e as lamínulas foram pulverizadas com ouro coloidal no pulverizador Bal-Tec SCD 050 sputter coater. Todos os isolados foram submetidos a esta técnica.

Através das micrografias eletrônicas foram medidos os conídios e as hifas dos isolados. Foram escolhidas 5 áreas aleatórias e em cada área foram realizadas 10 medidas das dimensões dos conídios. Para as medidas das hifas foram escolhidas 6 áreas aleatórias. Neste caso, para cada área foram realizadas 8 medidas. Para a análise

dos dados obtidos foi utilizado o teste One-Way Anova seguido pelo pós-teste de Tukey com nível de significância $\alpha = 0,05$, utilizando o programa GraphPad Prism 5.

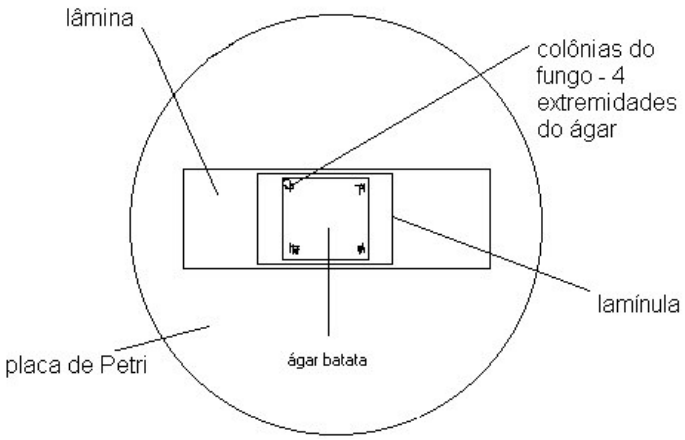


Figura 5: Esquema da preparação do microcultivo (ALMEIDA, 2012).

3.5 OBTENÇÃO DAS CULTURAS EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FSbm)

Os cultivos em FSbm foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de diferentes meios de cultivo descritos a seguir, previamente esterilizados em autoclave a 120°C e 1,5 atm por 20 minutos. Após esterilização, os meios foram inoculados com 1 mL de uma suspensão de esporos (10^5 esporos/mL) em água destilada, adicionada de 20 µL de tween 80, dos diferentes isolados separadamente, e incubados 168 horas a 26°C, sob agitação (100 rpm) ou em condição estacionária.

Meios utilizados:

a) Extrato de levedura (1%) (E).

b) Extrato de levedura (1%) + crisálida de *Bombyx mori* (1%) previamente macerada (EC).

c) Extrato de levedura (1%) + glicose (1%) (EG).

d) Extrato de levedura (1%) + glicose (1%) + crisálida (1%) previamente macerada (EGC).

e) Extrato de levedura (1%) + *Diatraea saccharalis* (Ds) (1%) previamente macerada (EDs).

Posteriormente, a influência do tempo de cultivo sobre o crescimento e a produção enzimática para os quatro isolados foi determinada utilizando-se 50 mL do meio de cultivo constituído por 1% de extrato de levedura adicionado de 1% de crisálida por diferentes períodos (24 a 240 horas).

3.6 OBTENÇÃO DAS CULTURAS EM FERMENTAÇÃO EM SUBSTRATO SÓLIDO (FSS)

As culturas em FSS foram obtidas mediante inóculo de 1mL de uma suspensão de esporos (10^5 esporos/mL) sobre 4 g de crisálida seca triturada como substrato, fornecida pela empresa Fiação de Seda Bratac S/A. O substrato foi umedecido com água de torneira, solução de extrato de levedura (1% m/v), solução de sais SR ou solução de sais de Khanna, na proporção 1,3 : 1 (m/v). As culturas foram incubadas a 26ºC durante 168 horas, em estufa com umidade relativa ao redor de 76% monitorada com o auxílio de um termohigrometro (CAAL, modelo 303C). Ressaltamos que utilizamos Delineamento de Composto Central Rotacional (DCCR), para padronizar a produção de quitinase em FSS, como apresentado no item 3.7.

3.6.1 COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES

3.6.1.1 Solução de sais de Khanna [20x]

NH_4NO_3.....2,0g

KH_2PO_4 .....1,3g

$MgSO_4.7\ H_2O$ 0,362g

KCl 0,098g

$ZnSO_4.H_2O$.....0,007g

$MnSO_4.\ H_2O$.....0,0138g

$FeCl_3\ .6H_2O$.....0,0066g

$CuSO_4.\ 5H_2O$ 0,0062g

Água destilada qsp.....100mL

3.6.1.2 Água de torneira

Alumínio.....0,009 mg/L

Ferro.....0,008mg/L

Nitrogênio.....0,193mg/L

Oxigênio.....1,2 mg/L

Fluoreto.....0,20 mg/L

3.7. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE QUITINASE EM FSS

A otimização da produção enzimática em FSS foi realizada utilizando um planejamento fatorial (2^2) tendo como variáveis independentes o tempo de crescimento (X1) e a umidade (X2). Foram realizadas três repetições nos pontos centrais (0) e dois pontos externos (-α e +α), totalizando 11 experimentos (Tabela 4). O valor calculado para os pontos externos foi ±1,41. Os resultados obtidos foram

submetidos à análise de variância (ANOVA) com *p* fixado em 0,05 e 0,1 utilizando-se o software Statistica 8.0 (Stat Soft), o qual foi também empregado para obtenção das superfícies de resposta e dos gráficos de pareto.

Tabela 4. Delineamento de Composto Central Rotacional (DCCR), para a otimização da produção de quitinases em FSS.

	Valores codificados		Valores reais	
Tratamentos	Crescimento X1	Umidade X2	Tempo de crescimento	Umidade %
1	-1	-1	5	30
2	1	-1	12	30
3	-1	1	5	65
4	1	1	12	65
5	0	0	9	48
6	0	0	9	48
7	0	0	9	48
8	-1,41	0	4	48
9	1,41	0	13	48
10	0	-1,41	9	23
11	0	1,41	9	72

Os cultivos foram feitos conforme as condições estipuladas no DCCR. As amostras do extrato bruto extracelular da FSS foram utilizadas para determinar a atividade quitinásica conforme descrito no item 3.9.1.

3.8 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS

Após incubação, as culturas em FSbm foram filtradas a vácuo, utilizando papel filtro Watman nº 1, obtendo–se um filtrado livre de células chamado extrato bruto extracelular e a massa micelial retida, a qual foi lavada com dois volumes de água destilada, prensada entre folhas de papel filtro, macerada e ressuspensa em 10mL de solução tampão acetato de sódio 100mM, pH 5,0. Essa suspensão foi

centrifugada a 12.000*g* por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante contendo as enzimas intracelulares foi chamado de extrato bruto intracelular. Os extratos brutos contendo as enzimas intracelulares e extracelulares foram dialisados em água destilada, durante 24 horas, a 4 °C e posteriormente, utilizado para a determinação da atividade quitinásica.

As culturas obtidas em FSS foram adicionadas de 50 mL de água destilada a 4 ºC, sendo esta mistura mantida sob agitação com uma barra magnética por 30 minutos, a 4 ºC. Posteriormente, foram filtradas a vácuo em funil de Buchner, obtendo-se um filtrado livre de células. O micélio com os resíduos de substrato foram descartados. O filtrado foi dialisado em água destilada por 24h, a 4 ºC e posteriormente, utilizado para a determinação da atividade enzimática.

3.9 DOSAGEM DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

3.9.1 QUITINASE

A determinação da atividade enzimática foi realizada utilizando-se 1mM do substrato sintético 4-nitrofenil-N-Acetil-β-D glucosaminideo (NP-GlcNAc) em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0.

A mistura de reação foi constituída de 200µL de uma solução de substrato e 200µL de amostra enzimática. Após incubação da mistura de reação na temperatura de 40 ^{o}C esta foi interrompida, em diferentes intervalos de tempo, adicionando – se 1mL de NaOH 1M. O branco consistiu de 200µL da solução de substrato + 1mL de NaOH e posteriormente a adição de 200µL de enzima. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. O paranitrofenolato liberado foi quantificado em λ = 405nm em espectrofotômetro. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 µmol de substrato, por

minuto, nas condições de ensaio. Para FSbm tem-se U/mL e para a FSS, U/g de substrato. A atividade específica foi expressa em U / mg de proteína.

3.9.2 PROTEASE

O substrato utilizado para quantificar a atividade proteoásica foi o leite em pó solúvel Molico a 1%, dissolvido em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0. A mistura da reação foi constituída de 2,5 mL do substrato leite e 500 µL do extrato enzimático. Sendo mantida em banho Maria a 50 ^{o}C. A reação foi interrompida, retiranto alíquotas de 1mL em diferentes tempos e adicionado 1 mL de TCA. 20%. Em seguida, a mistura foi mantida em gelo por 1 h. Ápos este período ocorreu a formação do precipitado e este foi removido através de centrifugação por 10 minutos em centrífuga Eppendorf (14000x *g*). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A absorbância do sobrenadante foi quantificada em λ = 280 nm em espectrofotômetro. Uma unidade de atividade proteásica (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 µg de tirosina por minuto. A metodologia utilizada foi realizada conforme recomendação de Hull (1974).

3.9.3 LIPASE

A determinação da atividade lipásica foi realizada utilizando-se o substrato sintético p-nitrofenilpalmitato (*p*NPP), acompanhando a liberação do íon p-nitrofenilpalmitato. A reação foi padronizada utilizando McIlvaine 50 mM, pH5, contendo *p*NPP 0,8 mM, isopropanol 10%, goma arábica 0,5 mg/mL e Triton X-100 0, 25%, num volume final de 1mL. Inicialmente foram dissolvidos em isopropanol sob agitação, o substrato, Triton X-100 e a goma arábica e adicionados ao tampão. A

reação foi constituída de 50 µL do extrato enzimático adicionado ao meio reacional e interrompida, em diferentes intervalos de tempo, por aquecimento a 90ºC por 1 minuto e adição de 1mL de tetraborato de sódio saturado. A absorbância foi quantificada em λ = 410 nm em espectrofotômetro. Uma unidade da atividade (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 µmol de substrato por minuto.

3.10 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas foram estimadas pelos métodos descritos por Lowry *et al.* (1951) e Bradford *et al*. (1976) utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

3.11 ELETROFORESE EM CONDIÇÃO DESNATURANTE SDS – PAGE (10%)

Para acompanhar a secreção de proteínas produzidas pelos isolados foram utilizadas amostras extracelulares liofilizadas do extrato bruto aplicadas em eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE 10%) de acordo com Laemmli (1970). A corrida eletroforética foi realizada em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 8,9 + glicina 192 mM + 0,1% SDS, sendo a fonte ajustada para 120V e 40 mA, por um período de 2 horas. Foram utilizados os seguintes padrões de massa molecular: α 2-Macroglobulina (168 kDa), β-Galactosidase (112 kDa), Lactoferrina (91 kDa), Piruvato quinase (67 kDa), Dehidrogenase lática (36 kDa) e Triose fosfato isomerase (31 kDa). Para calcular a massa molecular de cada banda proteica foi utilizando o Log da massa molecular de cada marcador em função da mobilidade relativa (Rf). Após a corrida eletroforética o gel foi retirado das placas e corado utilizando-se Comassie Brilliant Blue R- 250 para visualização das bandas proteicas.

3.12 ANÁLISE DO SECRETOMA DOS DIFERENTES ISOLADOS DE *M. anisopliae* EM FSbm POR ELETROFORES BIDIMENSIONAL

Os isolados foram cultivados em dois meios diferentes. O primeiro meio de cultivo, não indutor de quitinase, foi constituído de extrato de levedura 1% (m/v) + glicose 1% (m/v) e água destilada. O segundo meio de cultivo, indutor de quitinase, foi constituído de extrato de levedura 1% (m/v) + crisálida 1% (m/v) e água destilada. Ambos foram mantidos a 26ºC, sob agitação orbital (100 rpm) por 7 dias. Após o cultivo foi obtido o extrato bruto extracelular para cada isolado em ambas as condições de cultivo como descrito no item 3.8. Os extratos enzimáticos obtidos foram então precipitados com TCA 15% a 4ºC, centrifugados a 5.000 *g*, 4ºC por 20 minutos, lavados com acetona 100% e novamente centrifugados a 5.000 *g*, 4ºC por 20 minutos. Os precipitados foram ressuspensos em 300 µL de tampão de re-hidratação contendo uréia 8M, 1 mg de DTT, CHAPS 2%, azul de bromofenol (traço) e 2% IPG Buffer (pH 3 – 11 GE Health Care) e aplicados em strips de 13 cm com variação de pH 3 – 10, para corrida eletroforética da 1º dimensão. A focalização isoelétrica das proteínas foi realizada no IPGPhor System (Amersham Bioscience) nas seguintes condições: gradiente 100 volts/ 1 hora, step 500 volts/ 1 hora, step 1000 volts/ 1 hora, step 2.000 volts/ 1 hora, step 4.000 volts/ 1 hora e step 8.000 volts até 60.00 volts/ hora, gradiente 200 volts/ 5 minutos e step final de 50 volts/ 24 horas. Em seguida as strips foram imersas em solução de equilíbrio, constituída de Tris - HCl 50 mm, glicerol 30%, uréia 6 M, DTT 10mg/mL, SDS 2% e azul de bromofenol 1% por 15 minutos e novamente foram imersas em solução de equilíbrio, constituída de Tris - HCl 50 mm, glicerol 30%, uréia 6 M, 25 mg /mL de iodo acetamida, SDS 2% e azul de bromofenol 1% por 15 minutos. Em seguida a 2ª dimensão foi realizada em SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970), em placas de 18,0 x 16,0 x 0,1 cm. A corrida foi

conduzida a 100 volts, 25 mA por 5 horas. O gel foi corado utilizando Comassie coloidal (NEUHOFF *et al.*, 1988) e as bandas proteicas dos isolados cultivados em meio indutor e não indutor, foram observadas após descoloração do gel com solução contendo 30% de etanol e 10% de ácido acético. Optamos identificar as proteínas dos isolados IBCB 167 e IBCB 384, considerando que ambos apresentam potenciais de controle opostos, frente a *D. saccharalis*.

3.13 SPECTROMETRIA DE MASSAS E IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Os géis bidimensionais obtidos foram analisados pelo software Image Master 7 GE para detecção das bandas proteicas (spots). Os spots recortados e posteriormente analisados foram selecionados seguindo uma avaliação visual de intensidade. As bandas proteicas obtidas dos géis 2D para os isolados IBCB 167 e IBCB 384 crescidos em presença de crisálida foram recortados e digeridos com adição de 0,5 µg de tripsina (Promega) + 17 µL de tampão bicarbonato de amônio 0,1M pH 8,0. Depois da digestão os peptídeos foram aplicados em coluna de fase reversa poros 50 R2 (PerSeptive Biosystems). Os peptídeos purificados foram hidratados em 6 µL de solução matriz (5mg mL^{-1} α-ciano-4-hidroxycinnaminic acid em 50% de acetronitrila e 0,1% de ácido trifluoracetico (v/v). Desta hidratação 2 µL de cada amostra foram aplicados na placa de MALDI-TOF/TOF (Axima Performace, Kratos-Shimadzu, Manchester, UK). Os MS/MS obtidos de cada spot digerido foram analisados utilizando o software MASCOT (Matrix Science, London, UK) e os bancos de dados SwissProt e NCBInr.

3.14 PURIFICAÇÃO PARCIAL DA QUITINASE EXTRACELULAR PRODUZIDA PELOS ISOLADOS IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 E IBCB 425 EM FSS

O extrato bruto extracelular obtido da FSS para os isolados IBCB167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 contendo quitinase foi aplicado em coluna cromatográfica de troca iônica DEAE-Celulose (9,0 x 2,0 cm) previamente equilibrada em tampão Tris-HCl 10mM, pH 7,5, sendo eluída pela aplicação de um gradiente linear de NaCl (0-1M) no mesmo tampão. A coluna foi mantida a 28ºC e frações de 3mL foram coletadas, sendo a vazão mantida em 1,9 mL/min. As frações que apresentaram atividade quitinásica foram reunidas em um único pool o qual foi dialisado contra água destilada por 24h, a 4ºC e posteriormente liofilizado.

O segundo pico com atividade quitinolítica, observado para o isolado IBCB 384, foi liofilizado, ressuspenso em solução tampão Tris-HCl 10mM pH 7,0 e aplicado em coluna cromatográfica de exclusão molecular Sephadex G-100 (89,5 x 2,0 cm) previamente equilibrada com tampão tampão Tris-HCl 10mM pH 7,0, sendo eluída neste mesmo tampão. A coluna foi mantida a 4ºC e frações de 1mL foram coletadas, sendo a vazão mantida em 0,38 mL/min. As frações que apresentaram atividade foram reunidas em único pool, o qual foi dialisado contra água destilada por 24h, a 4ºC e posteriormente aplicado em eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE) e desnaturantes (SDS-PAGE). O Pico I com atividade quitinásica obtido da coluna Sephadex G-100 foi identificado por Eletrospray ESI Q-TOF ULTIMA (da Waters - Manchester-UK).

3.15 DETERNIMAÇÃO DA TEMPERATURA E DO pH ÓTIMO DE ATIVIDADE

Foram realizados ensaios com as quitinases parcialmente purificadas, obtidas da FSS em diferentes temperaturas (30 ºC a 80ºC) para definir a temperatura ótima aparente de atividade. Já para o melhor pH aparente de atividade quitinásica foi utilizado o tampão ácido cítrico 50mM com valores de pH variando de 2,5 a 7,5, e posteriormente foi realizada a dosagem enzimática.

3.16 DETERNIMAÇÃO DA TERMOESTABILIDADE E ESTABILIDADE AO pH

Foram realizados ensaios com as quitinases obtidas da FSS. Para os quatro isolados estas amostras enzimáticas foram previamente incubadas em diferentes temperaturas (30ºC, 40ºC, 50ºC, 60ºC e 70ºC) e diferentes valores de pH (2,5, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0) em tampão ácido cítrico 50 mM por 1 hora. Em ambos os experimentos foram retiradas alicotas e armazenadas em gelo, sendo posteriormente utilizadas na reação enzimática para se avaliar a estabilidade térmica e ao pH, respectivamente.

3.17 INFLUÊNCIA DE DIFERENTES COMPOSTOS NA ATIVIDADE QUITINÁSICA

A mistura de reação foi adicionada de diferentes compostos ($HgCl_2$, NH_4Cl, $CaCl_2$, $BaCl_2$, $CoCl_2$, $FeSO_4$, $FeCl_3$, Cisteína, KCl, KH_2PO_4, $ZnSO_4$, $Zn(NO_3)_2$, EDTA, $CuSO_4$, $CuCl_2$, NaCl, NaH_2PO_4, NaBr, $MgSO_4$, $MnCl_2$, $MgCl_2$, Pb ($C_2H_3O_2$) e β - Mercaptoetanol) na concentração de 1 mM.

3.18 DERTERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS (K_m e $V_{máx}$)

A determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$ para as enzimas parcialmente purificadas foi realizada utilizando-se concentrações crescentes de 0,02 a 5mM do substrato sintético 4-nitrofenil-N-Acetil-β-D glucosaminideo em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. Os valores de K_m e $V_{máx}$ foram calculados com o auxílio do programa Origin 8.0, utilizando as seguintes equações (y=a+b.x); $V_{máx}$ = (1/y) e K_m = (-1/x).

3.19 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

Esta parte do trabalho foi desenvolvido na Universidade de Córdoba / Espanha, no Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales na Unidad Entomología Agrícola, Campus de Rabanales sob a orientação do Professor Doutor Enrique Quesada Moraga.

3.19.1 OBTENÇÃO DAS CULTURAS PARA APLICAÇÃO *IN VIVO*

Os cultivos em FSbm foram realizados em duas etapas: 1) Cultivo em frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio líquido Adamek (40 g de glicose, 40 g de extrato de levedura, 30 g licor de milho e 1000 mL de água destilada) (ADAMEK, 1963), previamente esterilizados em autoclave a 120°C e 1,5 atm por 20 minutos. Este meio foi inoculado com 1 mL de uma suspensão de esporos (10^7 esporos/mL) para os isolados IBCB 384 e IBCB 425 e depois incubado por 96 horas a 25°C, sob agitação (110 rpm); 2) Após este período foram transferidos 2 mL de cultivo para um novo meio de cultivo, onde utilizou–se frascos Erlenmeyer de 1000

mL contendo 250 mL de meio Adamek esterilizado, como descrito anteriormente. O cultivo foi mantido por 168 horas a 25°C, sob agitação (110 rpm).

3.19.2 PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS IBCB 384 E IBCB 425 DE *M. anisopliae* SOBRE LARVAS DE *G. mellonella* POR APLICAÇÃO TÓPICA

Para a aplicação tópica foi utilizada a técnica de imersão. Inicialmente os diferentes isolados foram crescidos em placa de Petri 90 mm com meio MA (12,75 g de extrato de malte, 2,75 g de dextrina, 2,35 g de glicerol, 0,78 g de peptona e 15 g de agar, para um litro de água) previamente esterilizado. As placas foram incubadas a 25°C por 15 dias até ocorrer à esporulação. As suspensões dos conídios foram preparadas por raspagem do micélio crescido na placa e coletado utilizando uma lâmina esterilizada. Em seguida, o micélio foi colocado em tubos estéreis contendo 15 mL de água esterilizada com 0,10% de Tween 80 e sucessivas diluições foram realizadas até a padronização de 1 x 10^8conídios mL^{-1}. A contagem destes conídios foi em câmara de Malassez (Blau Brand, Germany)

3.19.2.1 APLICAÇÃO TÓPICA UTILIZANDO IMERSÃO

Dez larvas de *G. mellonella* no 4° instar foram imersas em 5 mL de suspenção de 1 x 10^8 conídios mL^{-1} por 30 segundos. Este processo foi realizado 3 vezes totalizando 30 larvas para cada isolado testado. No controle deste experimento 10 larvas foram imersas em água destilada com 0,10% de Tween 80. Depois da imersão, cada larva foi colocada individualmente em placas de Petri plásticas (28 mm de diâmetro e 13 mm de altura), com um algodão úmido e alimentada com dieta artificial (30,8 g de farinha de milho, 30,8 g de germe de trigo, 30,8 g trigo fino, 21,1 g de leite em pó, 10,8 g de levedura de cerveja, 27 g de glicerina, 48,6 g de mel e 1,5 g de nipagina). A mortalidade das larvas foi avaliada a cada 24h por 15 dias. As larvas

mortas foram lavadas em solução de 5% de hipoclorito de sódio por 1 minuto e 3 vezes em água destilada estéril por 3 minutos. Após as lavagens cada larva foi colocada em câmara úmida, mantida a 25°C e umidade de 65%. Depois de 5 dias foi avaliada a presença de micélio na superfície da cutícula da larva.

3.19.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E ENSAIO DE TOXIDADE

Os extratos brutos obtidos a partir do cultivo dos isolados IBCB 384 e IBCB 425 em FSbm foram filtrados utilizando o filtro Dynagard de 0,2 µm (Spectrum, Brenda, The Netherlands) e injetados em larvas de *G. mellonella* no 5° instar, na região entre o segundo e o terceiro seguimento abdominal. Já a massa micelial retida no filtro foi descartada. O dispositivo micro injetor (Burkard manufacturin, Rckmansworth, UK) foi utilizado para injetar 8 µL do filtrado com 1 mg proteína/mL, em cada larva. No inseto controle foram injetados 8 µL do meio Adamek bem como 0,16 µL/larva de inibidor de protease. Os ensaios foram em triplicata com 10 larvas cada, totalizando 30 larvas para cada extrato testado. O bioensaio foi monitorado diariamente durante 7 dias.

Em um segundo momento, o extrato bruto com volume de 50 mL foi dialisado utilizando uma membrana de cut off de 3,5 kDa, contra 2 L de água destilada por 24 horas a 4°C. Sendo assim, a fração que ficou retida na membrana recebeu o nome de não dialisado. Já a fração referente aos 2 L de água recebeu o nome de dialisado. Ambas as frações foram concentradas por liofilização até o volume de 50 mL e injetadas nas larvas como descrito acima. Os insetos mortos foram dissecados sob um microscópio binocular para identificar sinais de toxicidade sobre os tecidos, causados

pelas moléculas tóxicas presentes nas frações injetadas (ORTIZ – URQUIZA *et al*., 2010a).

3.19.4 COLETA DE HEMOLINFA, PRODUÇÃO DE SORO E INJEÇÃO EM LARVAS

Cada larva de *G. mellonella* foi injetada com 8 µL da suspensão de conídios, obtidas dos isolados IBCB 384 e IBCB 425, contendo 800 conídios. As larvas tratadas foram alimentadas com dieta artificial, mantidas a 25 ºC até que a pré - fase letal da infecção fosse observada. Esta fase é caracterizada pela presença de hifas na hemolinfa. A hemolinfa foi coletada através de um corte na falsa pata da larva. Esta hemolinfa infectada foi coletada em tubos contendo 300 µL de tampão anticoagulante (WANG et *al*., 2007), sendo centrifugada a 800 *g* a 4 ºC durante 10 minutos para remover as estruturas fúngicas e hemócitos, obtendo-se o soro. Foram quantificadas as proteínas presentes no soro obtido do inseto segundo Bradford (1976). Este soro foi esterilizado por filtração através de um filtro com 0,22-µm Dynagard (Spectrum, Breda, The Netherlands). Após a esterilização foi injetado em cada larva 8 µL de soro. Foram utilizadas 15 larvas distribuídas entre três triplicatas. As larvas tratadas foram mantidas a 25 °C e alimentadas com dieta artificial. A mortalidade foi observada continuamente a cada 24 horas por 9 dias. Também foram observados os sintomas externos e internos tais como melanização da cutícula e traquéia, causados pelo soro injetado e estes sintomas foram comparados com os sintomas causados pela infecção fúngica.

3.19.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados de mortalidade foram submetidos a análise de variância (ANOVA). Para a diferença mínima significativa (LSD) foi realizado o teste de comparação das médias. Também foram calculados os valores do tempo médio de sobrevivência. As análises estatísticas foram realizadas utilizando Statistix 9.0 (Analytical software, 2003) e SPSS 12.0 (SPSS Inc., 1989-2003) para Windows 3.

Observação

Para melhor compreensão dos resultados, os mesmos foram divididos em quatro partes, sendo elas:

I. Morfologia e Identificação;
II. Produção enzimática em FSbm e FSS;
III. Análise do secretoma, purificação e caracterização bioquímica das quitinases;
IV. Experimentos *in vivo*.

RESULTADOS

Parte I

Morfologia e Identificação

4. RESULTADOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *M. anisopliae*

Utilizando os iniciadores descritos no item 3.3.2, obteve - se as sequências constituídas de 567 nucleotídeos para o isolado IBCB 167 e 351 nucleotídeos para o isolado IBCB 360. Já para os isolados IBCB 384 e IBCB 425 foi obtido 540 e 563 nucleotídeos, respectivamente. Estas sequências foram analisadas no programa Blast, obetendo-se uma alta porcentagem de identidade e cobertura para as sequências obtidas, quando comparadas com outras sequências de *M. anisopliae* depositadas no GenBank. Baseado nas análises feitas com o programa Blast, foi possível confirmar a identificação dos isolados utilizados neste trabalho, no nível de variedade, sendo *M. anisopliae* variedade *anisopliae* (Tabela 5). As sequências de nucleotídeos dos isolados deste trabalho e a sequência do LRC 189 *M. anisopliae* var. *anisopliae* foram alinhadas utilizando-se o programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994), por meio do qual foi possível indentificar os nucleotídeos conservados entre as sequências (Figura 6).

Tabela 5. Identificação molecular dos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae*.

Isolado	Score	Query cover	Erro	Identidade	Espécie	Acesso
IBCB 167	1048	100 %	0	100%	LRC 189 *M. anisopliae* var. *anisopliae*	EU307902,1
IBCB 360	586	92%	$5x10^{-164}$	99%	LRC 189 *M. anisopliae* var. *anisopliae*	EU307902,1
IBCB 384	990	99%	0	100%	LRC 189 *M. anisopliae* var. *anisopliae*	EU307902,1
IBCB 425	1040	100%	0	100%	LRC 189 *M. anisopliae* var. *anisopliae*	EU307902,1

Foi utilizado o programa BLAST para comparar as sequências de interesse com as sequências depositadas no banco de dados.

```
167             ------------------------------------------------------------
425             ------------------------------------------------------------
189lr           CCTAAGATGTTTGGCCCAACGGGCGTAACATGACGGGNCAGGAGTAATTCCTTGGCCGGA
384             ------------------------------------------------------------
360             ------------------------------------------------------------

167             ------------------------------------------------------------
425             ------------------------------------------------------------
189lr           AGGCCCGGTAATCTTGTTAACTCCTCGTGCTGGGGATAGAGCATGCAATTATTGTTTTCA
384             ------------------------------------------------------------
360             ------------------------------------------------------------

167             ------------------------------------------------------------
425             ------------------------------------------------------------
189lr           ACGAGGATCCCTAGTAAGCGCAAGTCACAGCTTGCGTTGATACGTCCCTGCCCTTGTACA
384             ------------------------------------------------------------
360             ------------------------------------------------------------

167             ------------------------------------------------------------
425             ------------------------------------------------------------
189lr           CACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGTCAGTGAGGCGTCCGGACTGGCCCAGGGCA
384             ------------------------------------------------------------
360             ------------------------------------------------------------

167             ------------------------------------------------------------TA
425             ------------------------------------------------------------
189lr           GGTGGGCAACTACCACCCAGGGCCGGAAAGCTCTCCAAACTCGGTCATTTAGAGGAAGTA
384             ---------------------------------------TCTTGGTCATTTAGAGGAAGTA
360             ------------------------------------------------------------

167             AAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTATCCAA
425             ----TCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTATCCAA
189lr           AAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTATCCAA
384             AAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTATCCAA
360             ----------------------------GGGGGATGAAAGCCCTTCTTATGTGGTGCCCAA
                                                * * *      *   * * *  ****
167             CTCCCAACCC-CTGTGAATCATACCTTTA-ATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCGC
425             CTCCCAACCC-CTGTGAATCATACCTTTA-ATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCGC
189lr           CTCCCAACCC-CTGTGAATCATACCTTTA-ATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCGC
384             CTCCCAACCC-CTGTGAATCATACCTTTA-ATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCGC
360             CACCAAGTCCACAGGGGACAAGAGGGGCGTAATGACGCTCGAACAGG----CATGCCCGC
                * ** *  ** * * * *  * *       * **  ***    * **    *  ******
167             CGGGGACCCGAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAAATGAA
425             CGGGGACCCGAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAAATGAA
189lr           CGGGGACCCGAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAAATGAA
384             CGGGGACCCGAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAAATGAA
360             CAGA-ATACTGACGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAA
                * *  *  *  **   *  *** *      **  **    *** *   * **      **
167             TCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGA-AGAACGCAGCGAAATG
425             TCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGA-AGAACGCAGCGAAATG
189lr           TCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGA-AGAACGCAGCGAAATG
384             TCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGA-AGAACGCAGCGAAATG
360             TTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTT-CATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCG
                *  * * *    *   *   ** **  *****  ********  *****  ** **   *
167             CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCG
425             CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCG
189lr           CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCG
384             CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCG
360             TTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTAACCACTCAGAAGATACTTATTAAAAAATTCAG
                   *    * * *  ***      ** *   * ***    **  **      * ***  *
167             CCCGTCAGTATTCT-GGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTACGCCCCTCAAGTCCCCT
425             CCCGTCAGTATTCT-GGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTACGCCCCTCAAGTCCCCT
189lr           CCCGTCAGTATTCT-GGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTACGCCCCTCAAGTCCCCT
384             CCCGTCAGTATTCT-GGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTACGCCCCTCAAGTCCCCT
360             AAGGTTCGGGTCCCCGGCGGGCGCGAA-GTCC---CGCCGAAGCAACAATTAAAGGTATG
                   **  *  * *  *******  *   ** *   ** *    *  *  * **
```

```
167             GTGGACTTGGTGTTGGGGATCGGCGAGGCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTA
425             GTGGACTTGGTGTTGGGGATCGGCGAGGCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTA
189lr           GTGGACTTGGTGTTGGGGATCGGCGAGGCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTA
384             GTGGACTTGGTGTTGGGGATCGGCGAGGCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTA
360             ATTCACA-GGGGTTGGGAGTTGGATAACT-------------------------------
                 *  **  ** ******  * **  *

167             ATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTCTGCGCAGTAGTAAAACACTCGCAACAGGAGCCC
425             ATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTCTGCGCAGTAGTAAAACACTCGCAACAGGAGCCC
189lr           ATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTCTGCGCAGTAGTAAAACACTCGCAACAGGAGCCC
384             ATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTCTGCGCAGTAGTAAAACACTCGCAACAGGAGCCC
360             ------------------------------------------------------------

167             GGCGCGGTCCACTGCCGTAAAACCCCCCAACTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGGTAGG
425             GGCGCGGTCCACTGCCGTAAAACCCCCCAACTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGGTAGG
189lr           GGCGCGGTCCACTGCCGTAAAACCCCCCAACTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGGTAGG
384             GGCGCGGTCCACTGCCGTAAAACCCCCCAACTTTTTATAGTT------------------
360             ------------------------------------------------------------

167             ACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA-------------------------------
425             ACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAG-----------------------------
189lr           ACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCC
384             ------------------------------------------------------------
360             ------------------------------------------------------------

167             ------------------------------------------------------------
425             ------------------------------------------------------------
189lr           CCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATTCTGGGTCCCCAGGGCCC
384             ------------------------------------------------------------
360             ------------------------------------------------------------

167             ------------------------------------------------------------
425             ------------------------------------------------------------
189lr           GAGTTGTAATTTGCAGAAGGATGGCTTTTGGTGAGGTGCCTTCCGAGTTCCCTGGAAACG
384             ------------------------------------------------------------
360             ------------------------------------------------------------

167             ------------------------------------------------------------
425             ------------------------------------------------------------
189lr           GGACGCCATAAAGGGTTGAGAAGCCCCGTTCTGGGTTGGAATTACCGAGCCTTCTGTAAA
384             ------------------------------------------------------------
360             ------------------------------------------------------------

167             ------------------------------------------------------------
425             ------------------------------------------------------------
189lr           GCTCCTTCGAACAATTCCAAGTAATTTGGGAATTGCTGCTCCTAAATTGGAAGGTATATG
384             ------------------------------------------------------------
360             ------------------------------------------------------------

167             ---------------------------------------
425             ---------------------------------------
189lr           TTTTTCTTAAAGCTAAATATTGGGCCAGAAAACCCATT
384             ---------------------------------------
360             ---------------------------------------
```

FIGURA 6. Alinhamento de múltiplas sequências dos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 do *M. anisopliae* e var. *anisopliae* LRC 189, utilizando CLUSTALW. Simbolos: Nucleotídeos conservados (*) e ausência de nucleotídeos (-).

4.2 MEV DOS MICROCULTIVOS DOS ISOLADOS DE *M. anisopliae*

Microcultivos dos diferentes isolados de *M. anisopliae* foram analisados por MEV. Nas micrografias eletrônicas pode - se observar os conídios, os quais são ovalados para todos os isolados (Figura 7). Na figura 8 observa – se as dimenções das hifas dos isolados. Após a análise das medidas de comprimento e largura dos conídios para os isolados estudados, não foi observada diferença estatística relevante entre as larguras dos conídios (Figura 9 B). Contudo, existe diferença estatisticamente relevante, quando analisado o comprimento do conídio do isolado IBCB 384 e IBCB 425 (Figura 9 A). Ao analisar as medidas de largura das hifas dos isolados estudados, foram observadas apenas diferenças estatisticamente relevantes entre os isolados IBCB167 e IBCB 425 como mostrado na figura 9 C.

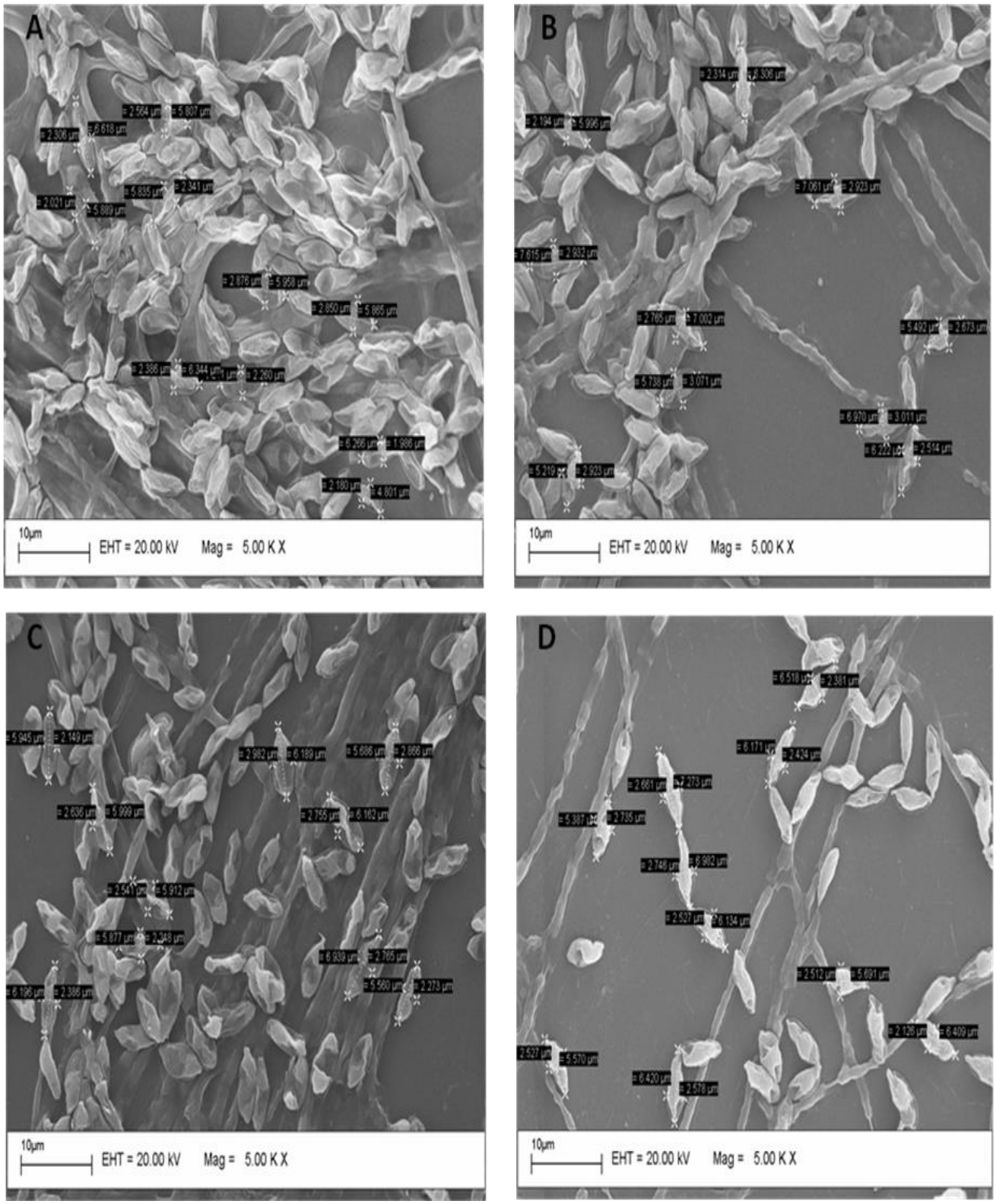


Figura 7. Fotomicrografia eletrônica de varredura com as medidas de comprimento e largura dos conídios, para os isolados IBCB 167 (A), IBCB 360 (B), IBCB 384 (C) e IBCB 425 (D) do fungo *M. anisopliae* em microcultivo.

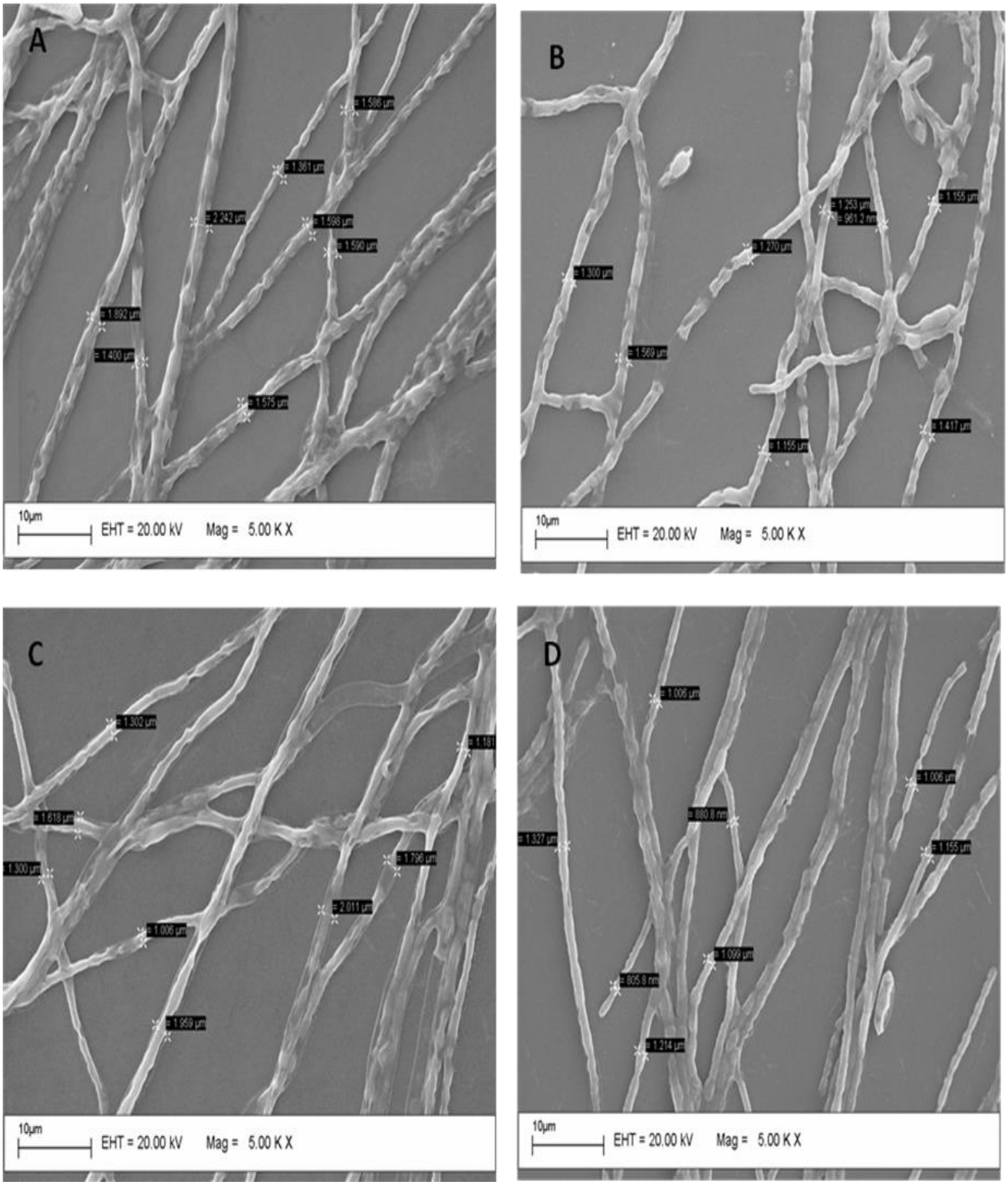


Figura 8. Fotomicrografia eletrônica de varredura das hifas dos isolados IBCB 167 (A), IBCB 360 (B), IBCB 384 (C) e IBCB 425 (D) do fungo *M. anisopliae* em microcultivo.

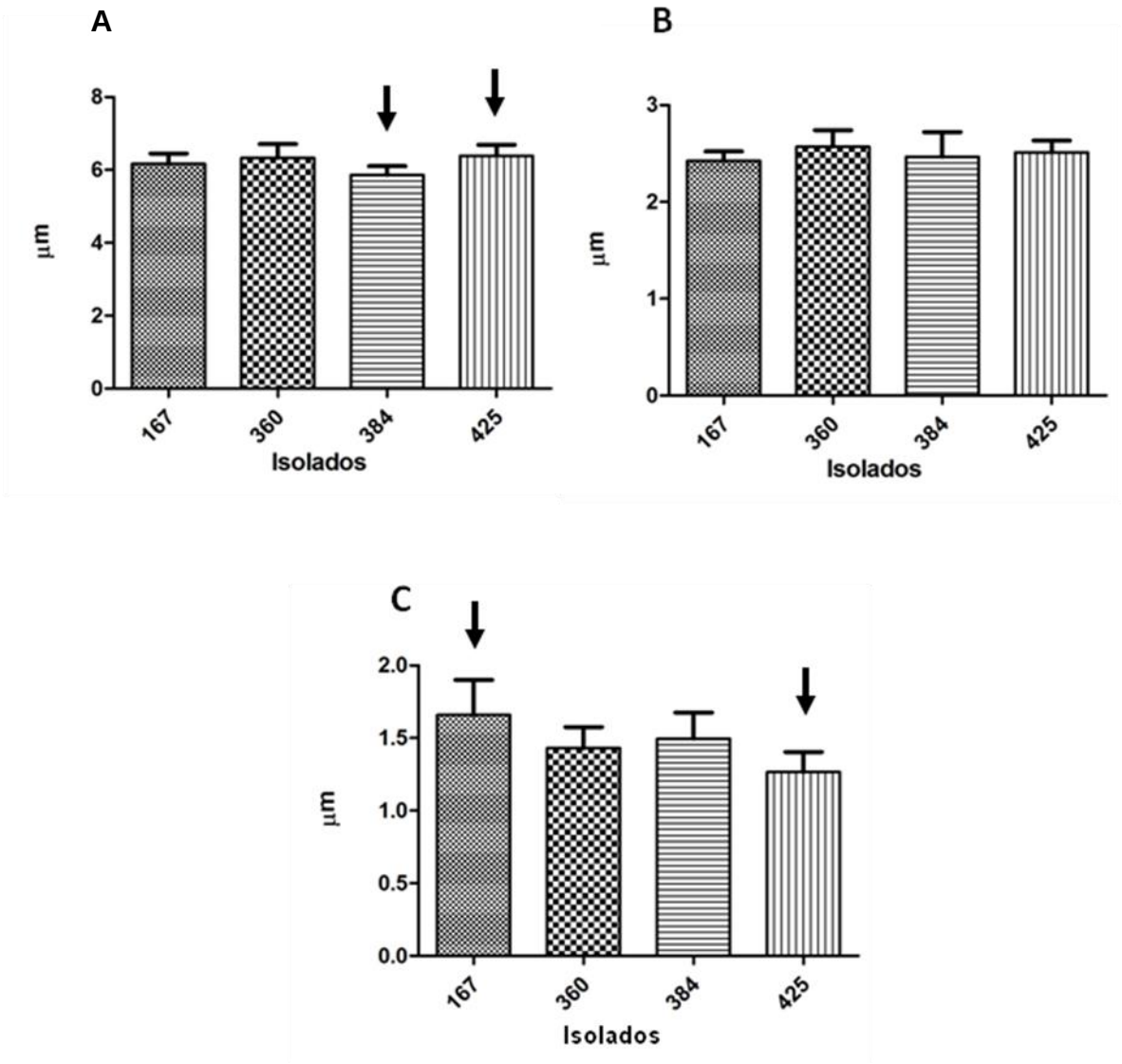


Figura 9. Análise estatística das medidas de comprimento (A) e largura (B) de conídios, e largura das hifas (C) dos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae*.

Parte II

Produção enzimática em FSbm e FSS

4.3 PRODUÇÃO DE QUITINASES EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FSbm)

Na tabela 6 podem ser observados os dados para produção de quitinases pelos isolados do fungo *M. anisopliae* em fermentação submersa em função do meio de cultivo utilizado e mantido sob agitação (100 rpm) a 26ºC, por 168 horas. A temperatura e o tempo de cultivo foram definidos inicialmente, baseados na literatura.

Em todos os meios e condições analisados os fungos cresceram, sendo que a maior produção quitinásica total (intra + extracelular) foi obtida no meio de cultivo EG para todos os isolados deste estudo (Tabela 6). Ainda analisando a produção quitinásica total, o isolado IBCB 425 apresentou produção quitinásica 20% maior se comparado ao isolado IBCB 360 quando cultivado no meio EG.

O maior nível de atividade enzimática intracelular foi obtido no meio de cultivo EG para todos os isolados, sendo o isolado IBCB 425 o melhor produtor (3,10 U totais). O isolado IBCB 425 crescido em EG apresentou uma produção quitinásica intracelular 4,4 vezes superior quando comparado com o isolado IBCB 384 crescido na mesma condição (Tabela 6). Quanto à atividade quitinásica extracelular, esta foi maior quando os isolados IBCB 360 e IBCB 425 foram crescidos em meio de cultivo EGC. Para os isolados IBCB 167 e IBCB 384 a maior atividade foi obtida em meio de cultivo EC (1,60 U totais) e EG (2,47 U totais), respectivamente. De modo geral, a maior produção quitinásica extracelular foi obtida com o isolado IBCB 384 (2,47 U totais) cultivado em EG.

É claro que a presença de indutores no meio de cultivo favoreceu a secreção da quitinase extracelular para todos os isolados. Ao analisar a produção das quitinases extracelulares produzidas pelos quatro isolados, na presença de indutores, verificou – se que o isolado IBCB 425 foi o que mais secretou a enzima no meio EGC, sendo

seguido pelo isolado IBCB 360. Cada isolado apresentou um comportamento e um potencial de produção de quitinase extracelular diferente quando expostos em meios de cultivo diversos. Perante estes resultados e considerando o nível de atividade extracelular e a disponibilidade de indutores, o meio extrato de levedura mais crisálida (EC) foi selecionado para continuidade dos estudos.

Tabela 6. Produção das quitinases intracelulares e extracelulares pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 do fungo *M. anisopliae* em fermentação submersa com diferentes meios de cultivo.

	Atividade enzimática (U Totais)							
	Intracelular				Extracelular			
Meio de cultivo	IBCB 167	IBCB 360	IBCB 384	IBCB 425	IBCB 167	IBCB 360	IBCB 384	IBCB 425
E	0,06 ± 0	0,15 ± 0	0,11 ± 0	0,19 ± 0	0,22± 0	0,07 ± 0	0,14 ± 0	0,16 ± 0
EG	2,73 ± 0,03	2,41 ± 0,01	0,70 ± 0	3,10 ± 0,02	0,72 ± 0	0,55 ± 0,01	2,47 ± 0	0,45 ± 0
EC	0,60 ± 0	0,19 ± 0	0,60 ± 0	0,22 ± 0	1,60 ± 0	1,2 ± 0	1,72 ± 0	0,80 ± 0
EGC	0,26 ± 0,01	0,46 ± 0,01	0,11 ± 0	0,31 ± 0,01	1,35 ± 0	1,80 ± 0	1,15 ± 0	2,05 ± 0
EQ	0,06 ± 0	0,04 ± 0	0,06 ± 0	0,08 ± 0	0,17 ± 0	0,1 ± 0	0,15 ± 0	0,10 ± 0
Eds	0,13 ± 0,01	0,03 ± 0	0,32 ± 0,03	0,05 ± 0,00	1,27 ± 0,01	0,85 ± 0,01	0,80 ± 0,01	0,60 ± 0

Foram utilizados 25mL de meio de cultivo, mantidos sob agitação à 26ºC por um período de 168 horas. Meios de cultivo: Extrato de levedura (E), Extrato + glicose (EG), Extrato + crisálida (EC), Extrato + glicose + crisálida (EGC), Extrato + quitina (EQ) e Extrato + *Diatrea saccharalis* (EDs).

Uma vez selecionado o meio de cultivo para a produção enzimática em FSbm, a influência da agitação ou não do cultivo sobre a produção de quitinases foi avaliada (Tabela 7). Em todas as condições analisadas os fungos cresceram satisfatoriamente. Analisando a produção total de quitinases (intracelular + extracelular), verificou – se que a condição de agitação favoreceu a produção enzimática pelos isolados IBCB 167 e IBCB 384. Para os isolados IBCB 360 e IBCB 425 a condição estacionária foi melhor, obtendo-se 5,32 U totais e 3,94 U totais, respectivamente. O isolado IBCB 360 cultivado em condição estacionária produziu 2,5 vezes mais quitinases que o isolado IBCB 384 submetido a mesma condição. A maior produção de quitinase intracelular foi obtida em condição estacionária para todos os isolados, sendo que o isolado IBCB 425 foi o que se destacou (1,73 U totais), representando uma produção 40% maior se comparada a obtida para o isolado IBCB 167 na mesma condição (Tabela 7).

Quanto à produção quitinásica extracelular observamos que ambas as condições favoreceram a produção da enzima. Porém, a melhor produção quitinásica extracelular foi sob agitação para os isolados IBCB 167, IBCB 384 e IBCB 425, sendo o isolado IBCB 384 o melhor produtor nesta condição (2,76 U totais), cerca de 24% superior se comparado ao isolado IBCB 425. O segundo melhor produtor de quitinase extracelular sob agitação foi o isolado IBCB 167 (Tabela 7). Por outro lado, a melhor produção de quitinase extracelular para o isolado IBCB 360 foi em condição estacionária, sendo que a condição de agitação também proporcionou uma boa produção da enzima (2,58 U totais). Considerando-se a produção da forma extracelular por todos os isolados, a condição de agitação foi selecionada para continuidade dos estudos.

Tabela 7. Produção de quitinases intracelulares e extracelulares pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 do fungo *M. anisopliae* em fermentação submersa em condição estacionária e sob agitação.

	Atividade enzimática (U totais)			
	Intracelular		Extracelular	
Isolados	Estacionária	Agitação	Estacionária	Agitação
IBCB 167	1,23 ± 0	0,74 ± 0,01	1,63 ± 0,01	2,62 ± 0,02
IBCB 360	1,61 ± 0,01	0,30 ± 0,001	3,71 ± 0,01	2,58 ± 0,01
IBCB 384	1,25 ± 0	0,78 ± 0,01	0,84 ± 0	2,76 ± 0,02
IBCB 425	1,73 ± 0	0,25 ± 0,01	2,21 ± 0,02	2,22 ± 0,01

Foram utilizados 50 mL de meio de cultivo EC, mantidos à 26ºC por um período de 168 horas.

4.3.1 PRODUÇÃO QUITINÁSICA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO

Considerando o cultivo dos diferentes isolados de *M. anisopliae* em meio contendo extrato de levedura + crisálida (1%) (EC) e mantidos sob agitação orbital (100 rpm) a 26 ºC, a influência do tempo de cultivo sobre a produção enzimática foi analisada (Figuras 10 e 11). Os maiores níveis enzimáticos intracelulares para os isolados estudados foram obtidos em períodos que variaram de 72 h a 216 h, não sendo coincidentes com os crescimentos máximos observados para os isolados IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 (Figura 10). Já para a produção da forma extracelular, verificou-se que os níveis máximos foram alcançados em periodos variando de 96 h a 144 h (Figura 11), com destaque para o isolado IBCB 384, o qual mostrou maior produção quitinásica em 120 h. Analisando a produção da quitinase intracelular e extracelular verificou – se que cada isolado apresentou comportamento de produção e secreção diferentes e peculiares, ficando claro que as produções de quitinases extracelulares foram maiores quando comparadas com as produções de quitinases intracelulares. Assim sendo, visando a produção das quitinases extracelulares, foram escolhidos os períodos de cultivo de 144 h para os isolados IBCB 167 e IBCB 425, 96 h para o IBCB 360 e 120 h para o IBCB 384.

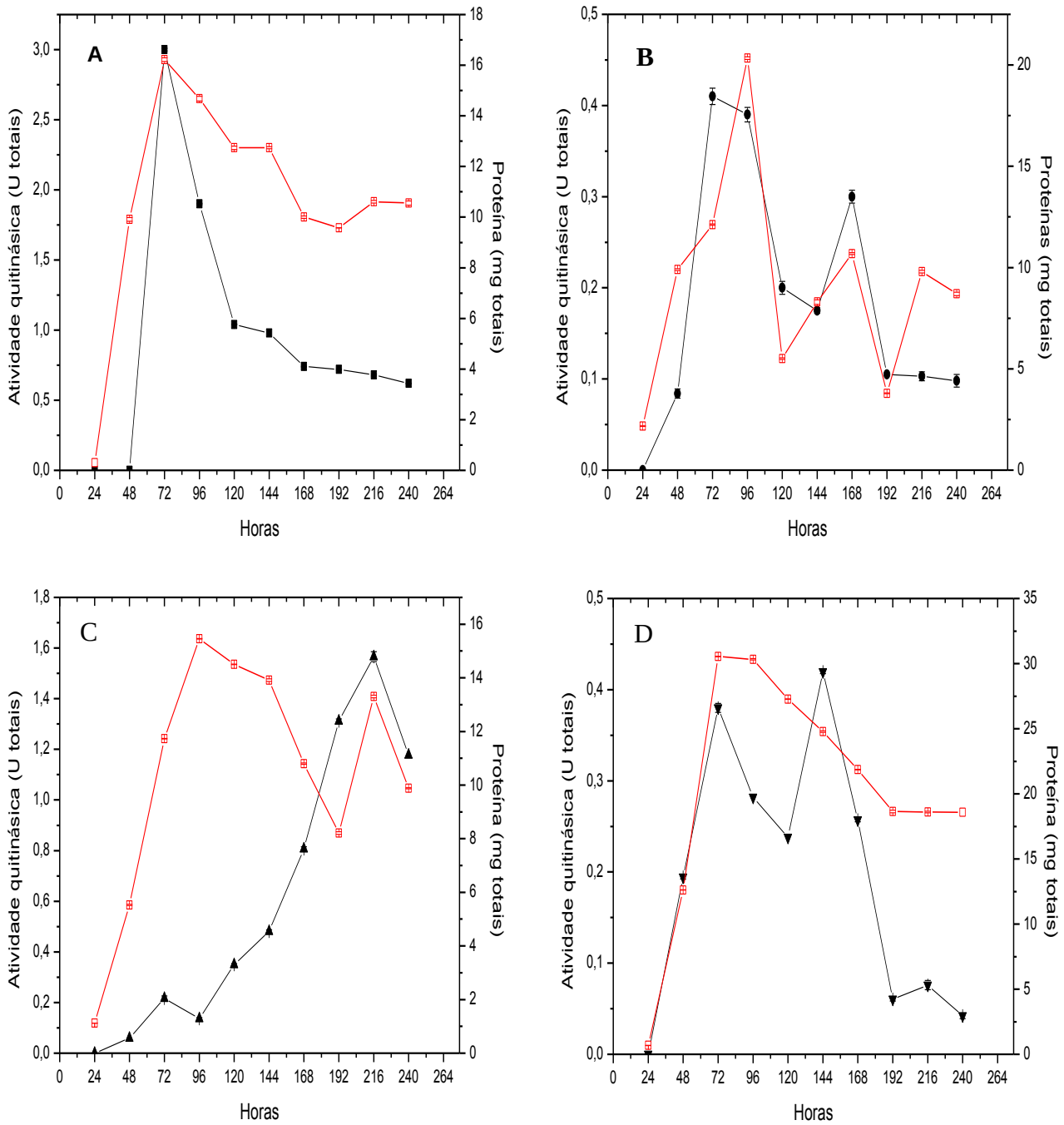


FIGURA 10. Produção de quitinase intracelular pelos isolados IBCB 167 (A), IBCB 360 (B), IBCB 384 (C) e IBCB 425 (D) de *M. anisopliae* sob agitação em função do tempo de cultivo. Desvio padrão para todos os pontos: 0,002 a 0,015. Proteína (□).

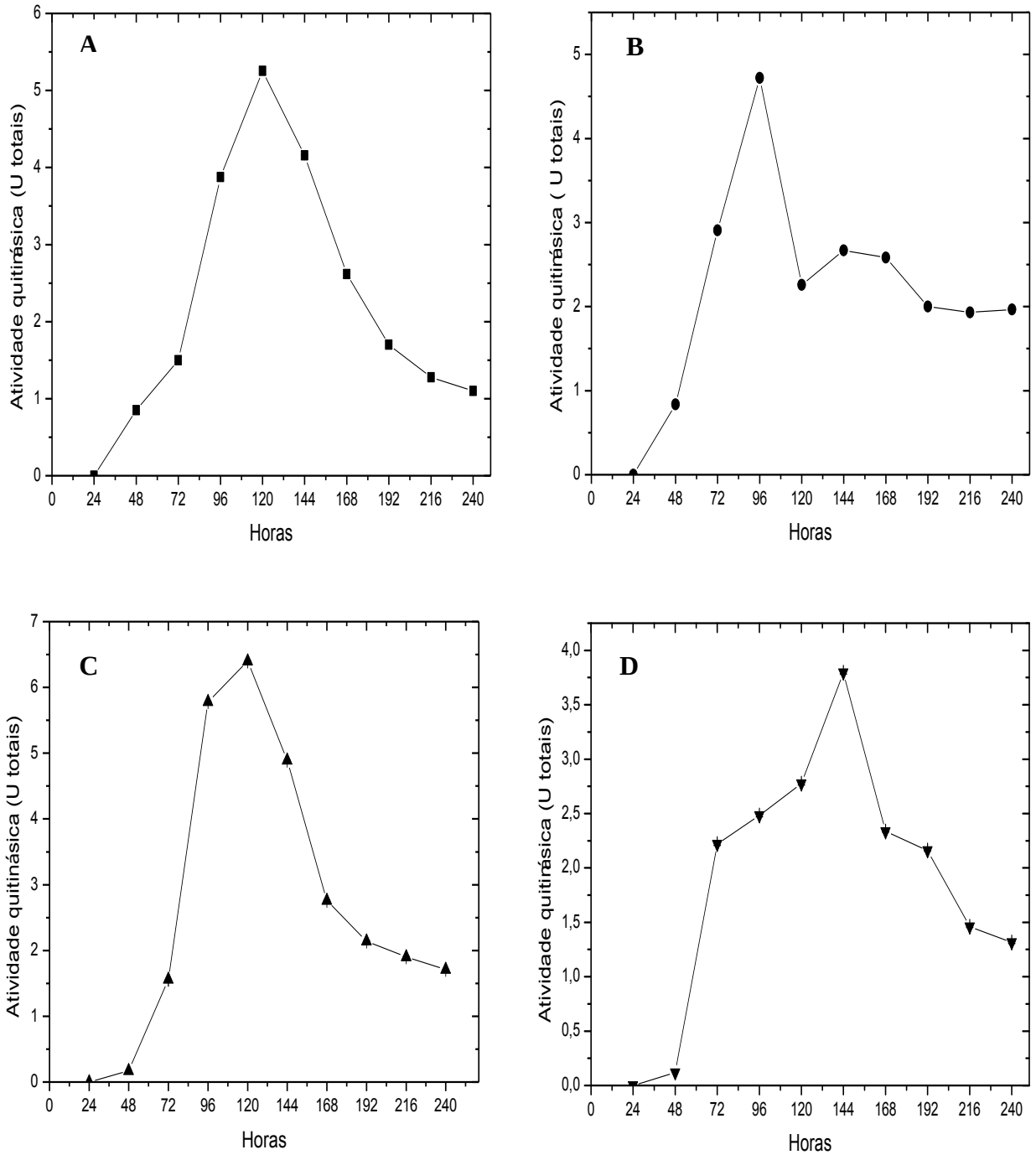


FIGURA 11. Produção de quitinase extracelular pelos isolados IBCB 167 (A), IBCB 360 (B), IBCB IBCB 384 (C) e IBCB 425 (D) de *M. anisopliae* sob agitação em função do tempo de cultivo. Desvio padrão para todos os pontos: 0,002 a 0,012.

4.4 PRODUÇÃO DE QUITINASES EM FSS

4.4.1 INFLUÊNCIA DE DIFERENTES SOLUÇÕES NA PRODUÇÃO DE QUITINASES

Na tabela 8 pode ser verificada a influência das diferentes soluções (água de torneira, solução de extrato de levedura, solução de sais SR e solução de sais de Khanna), utilizadas para umedecer o substrato crisálida, sobre a produção enzimática. Todos os isolados se desenvolveram quando o meio foi umedecido com as quatro soluções. Porém, a maior produção quitinásica extracelular foi observada na presença de solução de extrato de levedura para a maioria dos isolados, exceto para o isolado IBCB 384, sendo a produção enzimática favorecida pela utilização de solução de sais de Khanna. A produção enzimática pelo isolado IBCB 167, quando umedecido com solução de extrato de levedura, foi de 2,42 U/g de substrato, 4 vezes maior quando comparada a utilização da solução de sais de Khanna. Para os isolados IBCB 360 e IBCB 425 foram obtidas produções de 1,76 U/g de substrato e 1,33 U/g de substrato, respectivamente, quando umedecidos com a solução de extrato de levedura. Já o isolado IBCB 384 foi o que menos produziu a enzima de interesse em todas as situações analisadas. Confrontando as melhores condições para a produção da enzima pelos isolados, a produção pelo isolado IBCB 384 foi 5 vezes menor que a obtida para o isolado IBCB 167. Padronizou-se, portanto a utilização da solução de extrato de levedura 1% (m/v) para os isolados IBCB 167, IBCB 360 e IBCB 425, e a solução de sais de Khanna para o isolado IBCB 384.

Tabela 8. Influência de diferentes soluções salinas, água de torneira e solução de extrato de levedura na produção de quitinases pelos diferentes isolados do fungo *M. anisopliae* em FSS.

	Atividade Quitinásica Extracelular (U/g de substrato)			
	IBCB 167	IBCB 360	IBCB 384	IBCB 425
Água de torneira	0,73 ± 0,01	0,87 ± 0,01	0,35 ± 0,01	1,09 ± 0,01
Solução extrato de levedura	2,42 ± 0,05	1,76 ± 0,03	0,30 ± 0,01	1,33 ± 0,01
Solução de sais SR	0,63 ± 0,01	0,71 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,84 ± 0,01
Solução de sais Khanna	0,62 ± 0,01	0,72 ± 0,01	0,46 ± 0,01	0,85 ± 0,00

As culturas foram mantidas em estufa à 26ºC com umidade relativa ao redor de 76% por um período de 168 horas.

4.4.2 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS QUITINASES EXTRACELULARES PELOS ISOLADOS DE *M. anisopliae* EM FSS UTILIZANDO PLANEJAMENTO FATORIAL

Para testar a influência das variáveis crescimento e umidade na produção de quitinases extracelulares pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 do fungo *M. anisopliae*, em FSS, optou-se por um planejamento fatorial de dois níveis, composto por três pontos centrais (0) e dois pontos externos (-α e α), em um total de 11 experimentos (Tabela 9). Os isolados foram inoculados nos meios, cuja as variações foram descritas no item 3.7. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), como apresentado nas tabelas 10 - 13 para os isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425, respectivamente. Entre os 11 experimentos realizados, observou – se que a maior produção enzimática foi encontrada no tratamento 5 para os isolados IBCB 384 e IBCB 425, já para o isolado IBCB 360 foi o tratamento 2 e no tratamento 9 para o isolado IBCB 167.

O planejamento desenvolvido para o isolado IBCB 167 apresentou R^2 de 0,87 (Tabela 10), sendo que a influência de ambas as variáveis foi significante tanto no nível linear quanto quadrático (Figura 12 A). Ao analisar o gráfico de Pareto fica claro que a variável tempo de crescimento, no nível linear tem um efeito positivo sobre a produção da quitinase. Entretanto um período muito longo já apresenta um efeito negativo. Já a variável umidade (linear) nos mostra que a adição de água é favorável para a produção da quitinase, porém quando se adiciona muita água a produção é prejudicada. Apenas a interação entre as variáveis no nível linear, não foi significante, ($p > 0,10$) (Tabela 10). O valor do F-calculado foi de 15,15, ou seja, 4,93 vezes maior que o valor de F-tabelado (3,07), sendo possível gerar o gráfico de superfície de resposta (Figura 13 A). Neste caso, a equação que descreve o modelo é

$z=5,36+1,63.x-1,34.x^2+1,09.y-1,88.y^2$; onde z = Atividade quitinásica (U/g substrato), x = crescimento (Dias) e y = Umidade (%) para todas as equações apresentadas a partir daqui.

Tabela 9. Atividade quitinásica extracelular total produzida pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae* cultivados em FSS através do DCCR.

	Valores codificados		Valores reais		Atividade quitinásica (U/g substrato)			
Tratamentos	**X**	**Y**	**X (Dias)**	**Y (%)**	**167**	**360**	**384**	**425**
1	-1	-1	5	30	0	0	0	0,04
2	1	-1	12	30	1,27	7,36	1,63	1,45
3	-1	1	5	65	1,14	3,9	0,72	4,26
4	1	1	12	65	3,49	4,68	2,81	6,27
5	0	0	9	48	5,38	6,18	4,6	6,38
6	0	0	9	48	5,10	7,23	3,63	6,02
7	0	0	9	48	5,59	6,96	4,51	5,84
8	-1,41	0	4	48	0,05	0,66	0,43	1,5
9	1,41	0	13	48	6,70	6,12	2,18	4,5
10	0	-1,41	9	23	0,4	0,33	0,44	0,55
11	0	1,41	9	72	4,17	6,98	1,29	3,29

X= Tempo de crescimento
Y= Umidade

Tabela 10. Análise de variância (ANOVA) para a produção de quitinase isolado IBCB 167 de *M. anisopliae* cultivado em FSS.

Factor	SS	DF	MS	F	p
(1)crescimento(L)	**21,17663**	**1**	**21,17663**	**12,61577**	**0,016355 ***
crescimento(Q)	**10,00454**	**1**	**10,00454**	**5,96010**	**0,058558 ***
(2)umidade (L)	**9,43655**	**1**	**9,43655**	**5,62173**	**0,063872 ***
umidade (Q)	**19,89718**	**1**	**19,89718**	**11,85355**	**0,018378 ***
1L by 2L	0,29160	1	0,29160	0,17372	0,694118
Error	8,39292	5	1,67858		
Total SS	62,98885	10			

R^2 = 0,87; R^2 ajustado= 0,73. Intervalo de confiança de 90%;
* Variável significante ($p < 0,10$).

Para a produção enzimática pelo isolado IBCB 360, o valor de R^2 foi de 0,89 (Tabela 11). A influência das duas variáveis estudadas foi significante em ambos os níveis, linear e quadrático, bem como a interação entre elas. O F-calculado foi de 12,1 sendo 4 vezes maior que o valor de F-tabelado (3,18). Na figura 12 B fica claro que a variável tempo de crescimento (linear) tem um efeito positivo sobre a produção da quitinase. Entretanto um período muito longo já apresenta um efeito negativo. A variável umidade no nível linear, mostra que a adição de água favorece a produção quitinásica, porém o excesso de água prejudica. O gráfico de superfície de resposta pode ser observado na figura 13 B e a equação que descreve o modelo é $z=6,79+1,98.x-1,59.x^2+1,33.y-1,45.y^2-1,64.x.y$.

Tabela 11. Análise de variância (ANOVA) para a produção de quitinase pelo isolado IBCB 360 de *M. anisopliae* cultivado em FSS.

Factor	SS	DF	MS	F	p
(1)crescimento(L)	**31,45**	**1**	**31,45**	**16,59**	**0,01 ***
crescimento(Q)	**14,13**	**1**	**14,13**	**7,45**	**0,04 ***
(2)umidade (L)	**14,08**	**1**	**14,08**	**7,42**	**0,04 ***
umidade (Q)	**11,85**	**1**	**11,85**	**6,25**	**0,05 ***
1L by 2L	**10,82**	**1**	**10,82**	**5,71**	**0,06 ***
Error	9,48	5	1,9		
Total SS	85,98	10			

R^2 = 0,89; R^2 ajustado= 0,78. Intervalo de confiança de 90%;
* Variável significante (p < 0,10).

No planejamento desenvolvido para o isolado IBCB 384, o R^2 foi 0,97 (Tabela 12). Somente a interação entre as variáveis não foi significante (p> 0,10) sendo o F-calculado de 47,55, ou seja, 13,13 vezes maior que F-tabelado (3,62), possibilitando a obtenção do gráfico de superfície de resposta (Figura 13 C), cuja equação que descreve o modelo é $z=4,25+0,78.x-1,42.x^2+0,39.y-1,65.y^2+0,12.x.y$. A variável tempo de crescimento causa um efeito positivo sobre a produção da quitinase, entretanto um período muito longo gera um efeito negativo. A variável umidade, no nível linear, mostra que a adição de água favorece a produção da quitinase, porém quando a umidade é excessiva a produção enzimática passa a ser prejudicada (Figura 12 C).

Tabela 12. Análise de variância (ANOVA) para a produção de quitinase pelo isolado IBCB 384 de *M. anisopliae* cultivado em FSS.

Factor	SS	DF	MS	F	p
(1)crescimento(L)	**4,84**	**1**	**4,84**	**25,78**	**0 ***
crescimento(Q)	**11,35**	**1**	**11,35**	**60,52**	**0 ***
(2)umidade (L)	**1,21**	**1**	**1,21**	**6,46**	**0,05 ***
umidade (Q)	**15,21**	**1**	**15,21**	**81,05**	**0 ***
1L by 2L	0,06	1	0,06	0,29	0,61
Error	0,94	5	0,19		
Total SS	27,7	10			

R^2 = 0,97; R^2 ajustado= 0,93. Intervalo de confiança de 90%;
* Variável significante (p < 0,10).

O planejamento desenvolvido para o isolado IBCB 425 apresentou R^2 de 0,93 (Tabela 13), sendo que a influência das variáveis analisadas foi significantes, pois o valor de *p* foi < 0,05. A variável tempo de crescimento, no nível linear, exerceu um efeito positivo sobre a produção da quitinase, entretanto um período longo apresenta um efeito negativo. Já a variável umidade, no nível linear, mostra que a adição de água favorece a produção enzimática, porém alta umidade no meio é desfavorável (Figura 12 D). O F-calculado foi de 29,34, ou seja, 9 vezes maior que F-tabelado (3,07). Na figura 13 D pode ser observado o gráfico de superfície de resposta. A equação que descreve o modelo para este planejamento é $z=6,08+0,96.x-1,40.x^2+1,62.y-1,95.y^2$.

Tabela 13. Análise de variância (ANOVA) para a produção de quitinase pelo isolado IBCB 425 de *M. anisopliae* cultivado em FSS.

Factor	SS	DF	MS	F	p
(1)crescimento (L)	**7,33**	**1**	**7,33**	**10,29**	**0,02 ***
crescimento (Q)	**11,07**	**1**	**11,07**	**15,53**	**0,01 ***
(2)umidade (L)	**20,87**	**1**	**20,87**	**29,28**	**0 ***
umidade (Q)	**21,27**	**1**	**21,27**	**29,85**	**0 ***
1L by 2L	0,09	1	0,09	0,11	0,76
Error	4,28	6	0,71		
Total SS	58,06	10			

.R^2 = 0,93; R^2 ajustado= 0,88. Intervalo de confiança de 95%;
* Variável significante (*p* < 0,05).

Interessantemente, para os isolados IBCB 167, IBCB 384 e IBCB 425 a interação entre as variáveis não foi significante diferindo do observado para o isolado IBCB 360 onde a interação entre as variáveis foi significante (Figura 12 B). Considerando que o valor de F-calculado para todos os planejamentos realizados foi

maior que o valor de F-tabelado, os modelos são preditivos e estatisticamente válidos. Adicionalmente, é possível verificar que a maior produção enzimática se dá com quantidades iguais ou superiores a 48% de umidade e em períodos superiores a 5 dias. Este comportamento foi observado para todos os isolados estudados. Através destes resultados foi padronizado o meio de cultivo com umidade inicial de 48% e tempo de crescimento de 9 dias, para continuidade dos experimentos.

Ápos a padronização da produção das quitinases extracelulares pelos isolados de *M. anisopliae* em FSS, as enzimas protease e lipase secretadas nas condições padronizadas foram quantificadas. Verificou – se que os isolados IBCB 360 e IBCB 425 são os melhores produtores de lipases com 1,4 U totais/g e 1,3 U totais/g, respectivamente. Para a protease o isolado IBCB 425 foi o melhor produtor, produzindo 3,7 vezes mais que o isolado IBCB 384 (Tabela 14).

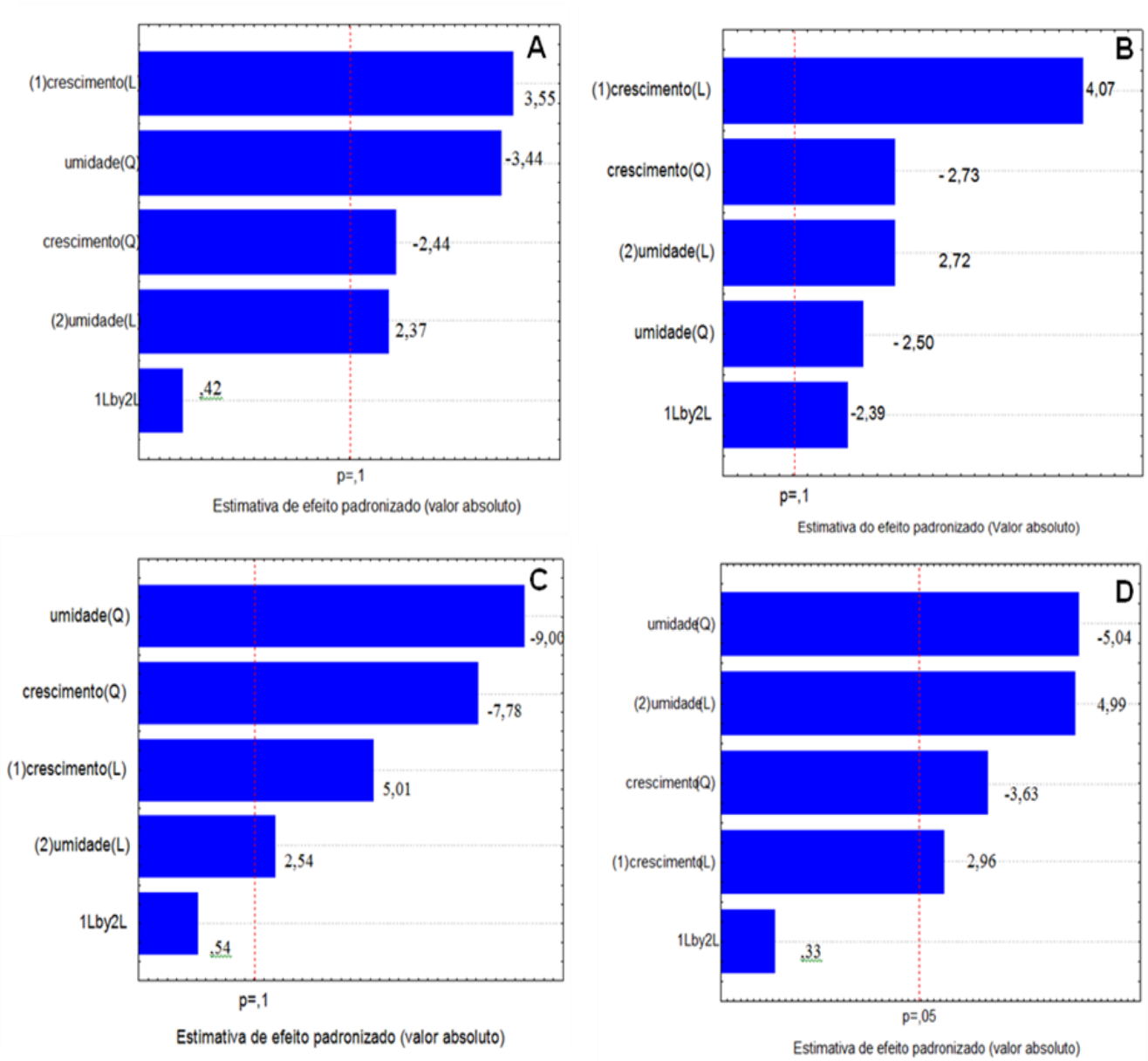


Figura 12. Gráfico de Pareto em resposta ao planejamento fatorial para FSS delineado para as variáveis tempo de crescimento e umidade dos isolados IBCB 167 (A) IBCB 360, (B) IBCB 384 (C) e IBCB 425 (D) do fungo *M. anisopliae*.

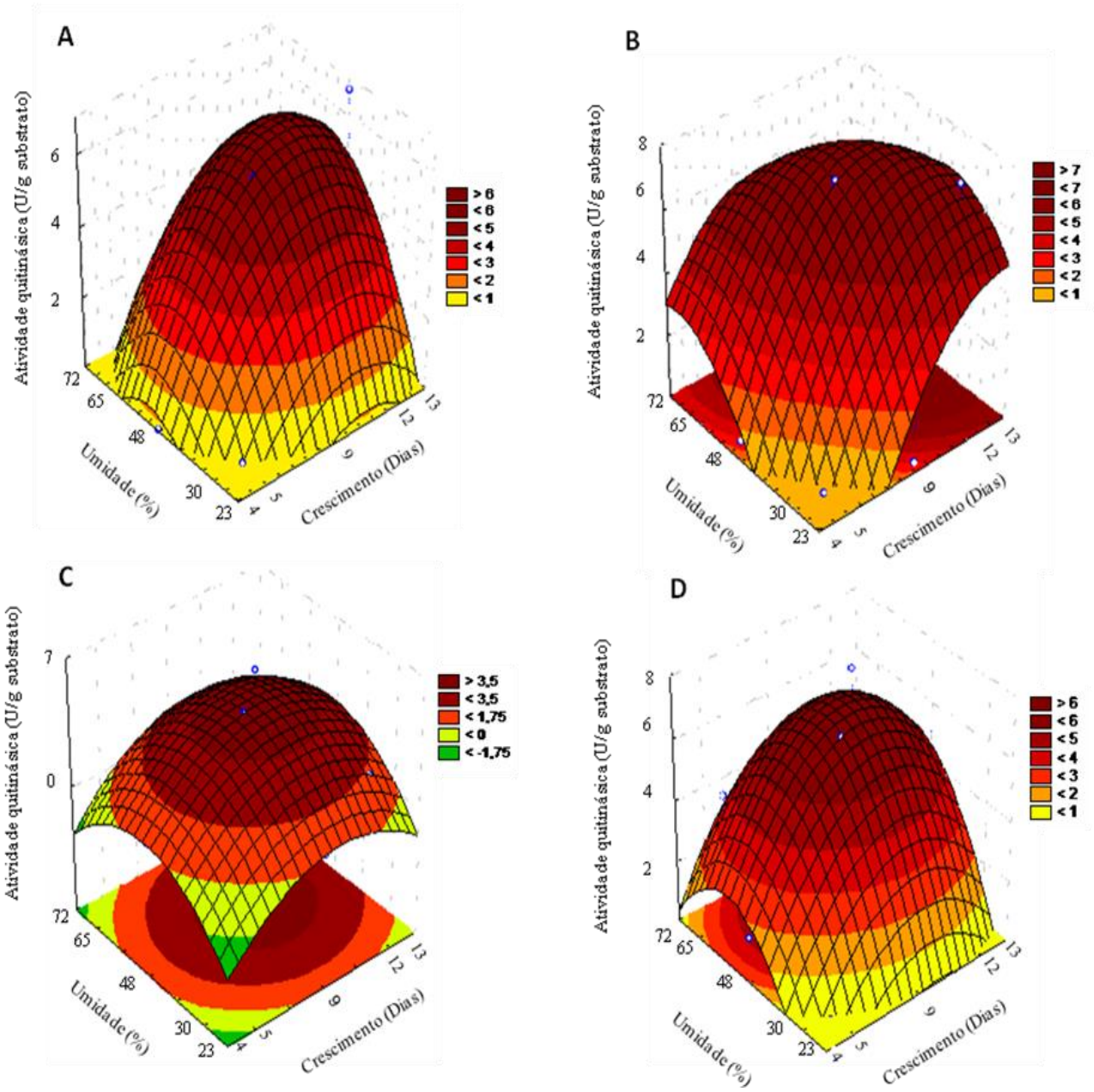


Figura 13. Superfície de resposta para o planejamento fatorial considerando as variáveis independentes tempo de crescimento e umidade para os isolados IBCB 167 (A) IBCB 360, (B) IBCB 384 (C) e IBCB 425 (D) do fungo *M. anisopliae* em FSS.

Tabela 14. Quantificação de enzimas extracelulares totais produzidas pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae* cultivados em FSS.

	U /g de substrato			
Enzimas	IBCB 167	IBCB 360	IBCB 384	IBCB 425
Quitinase	5,2±0,02	7,07±0,02	4,30±0,02	6,14±0,02
Lipase	1,03±0,01	1,37±0,01	0,2±0,01	1,3±0,01
Protease	141,22±0,56	2366±1,61	80,70±0,68	301,16±0,28

As culturas foram mantidas em estufa à 26ºC com umidade relativa ao redor de 76% por um período de 9 dias.

Parte III

Análise do secretoma, Purificação e Caracterização bioquímica das quitinases

4.5 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM CONDIÇÃO DESNATURANTE

Na figura 14 observa – se o perfil eletroforético das proteínas extracelulares produzidas em FSbm no meio EC pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 do fungo *M. anisopliae*, submetidas à condições desnaturantes (SDS - PAGE 10%). Analisando as bandas referentes as proteínas produzidas pelos isolados cultivados em glicose (Figura 14 A), ou na presença de crisálida (Figura 14 B), verificou – se a maior secreção proteica comparada ao observado para os controles negativos, ou seja, somente meio contendo glicose e crisálida, na ausência de crescimento fúngico.

Na presença de glicose, como fonte de carbono, os isolados secretaram grande quantidades de proteínas se comparado ao controle negativo (Figura 15 A). Os isolados IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 167 apresentam três proteínas com a mesma massa molecular sendo elas de 100 kDa, 47 kDa e 30 kDa. Porém, para o isolado IBCB 425 é possível observar uma proteína com massa molecular de 60 kDa. Todos os isolados apresentaram bandas proteicas com massa molecular inferior a 30 kDa, sendo estas secretadas com intensidades diferentes por cada isolado. Na figura 14 B observa - se o perfil das proteínas secretadas quando os isolados foram cultivados tendo crisálida como fonte de carbono, sendo esta uma fonte indutora de quitinases. Nesta condição os isolados secretaram diversas proteínas com massas moleculares diversificadas quando comparada entre eles e com o controle negativo. Na raia 167 verificamos 5 bandas com massas moleculares de 91 kDa, 64 kDa, 54 kDa, 36 kDa e 31kDa. Algumas destas bandas também foram encontradas nas raias 384 e 425. Entretanto é interessante observar nas raias 360 e 425 a ausência das bandas proteicas com massa molecular superior 72 kDa. A menor diversidade de

bandas proteicas foi observada para o isolado IBCB 360. Proteínas com massas moleculares inferiores a 31 kDa também foram observadas. As diferenças entre as bandas proteicas foram determinadas de acordo com a mobilidade relativa de cada proteína. Em suma, é evidente que cada isolado apresenta um comportamento de secreção diferente, mesmo quando submetidos às mesmas situações, evidenciando assim suas diferenças.

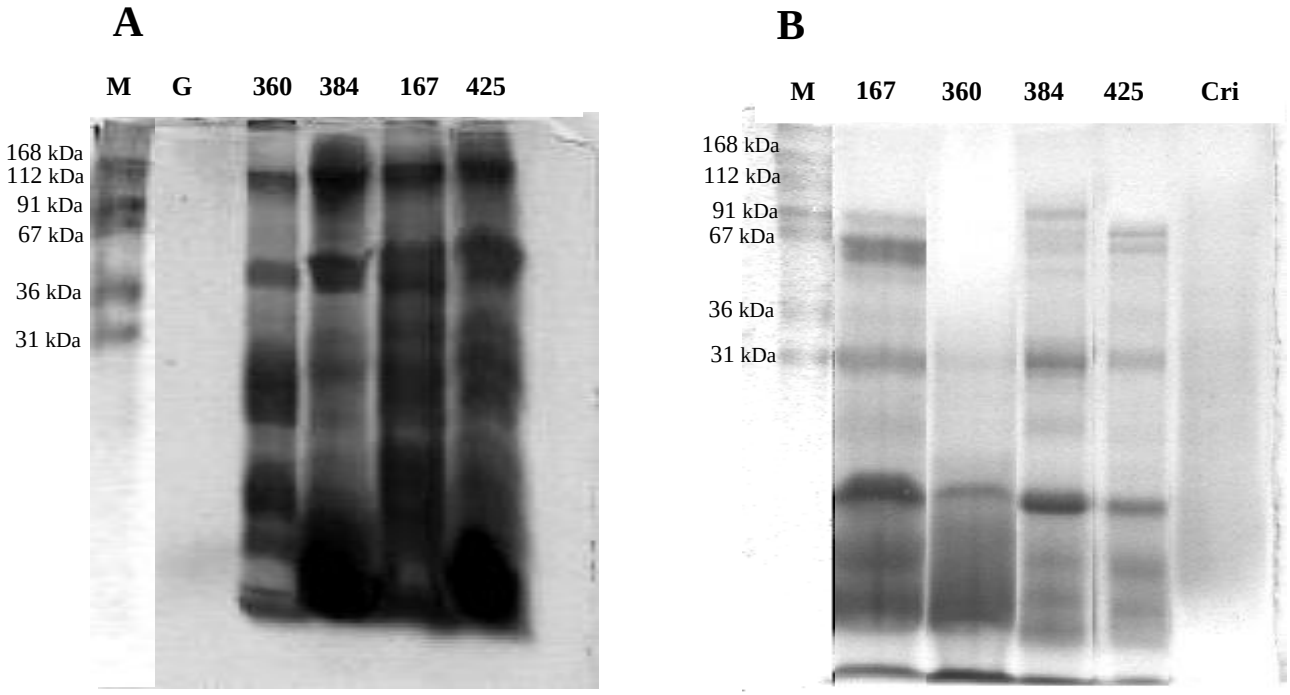


Figura 14. Perfil eletroforético em condição desnaturante (SDS-PAGE 10%) para as quitinases extracelulares produzidas em FSbm tendo glicose como fonte de carbono (A) e meio constituído de crisálida + extrato de levedura (B), corada por Coomassie Blue R- 250. Marcadores de massa molecular (M), meio contendo glicose e sem crescimento fúngico (G) e crisálida + extrato de levedura sem crescimento fúngico (Cri). Marcadores: α 2-Macroglobulina (168 kDa), β-Galactosidase (112 kDa), Lactoferrina (91 kDa), Piruvato quinase (67 kDa) e Dehidrogenase lática (36 kDa) e Triosefosfato isomerase (31 kDa).

4.5.1 ANÁLISE DO SECRETOMA DOS DIFERENTES ISOLADOS *M. anisopliae* CRESCIDOS EM FSbm

A análise do secretoma dos diferentes isolados foi realizado por eletroforese bidimensional dos extratos enzimáticos obtidos sob duas condições: glicose (não indutor) (EG) (Figura 15) e meio contendo crisálida (indução) (EC) (Figura 16), como descrito no item 3.12. Primeiramente, foi realizado análise comparativa das proteínas secretadas diferentemente pelos os isolados cultivados no meio EG vesus as proteínas secretadas no meio EC. Neste caso, os géis foram analisados utilizando o software ImageMaster 2D Platinum v7.0 para localizar as bandas proteicas e sobrepor os géis analisados. As bandas proteicas significantes apresentam valor de ANOVA menor que 0,05. Analisando os perfis bidimensionais, verificamos que o isolado IBCB 167 apresenta 5 bandas proteicas semelhantes em ambas as condições de cultivo, e 25 bandas proteicas presentes apenas no meio EC. O isolado IBCB 360 apresenta 10 bandas proteicas semelhantes em ambos os meio de cultivo, sendo que 22 bandas proteicas são exclusivamente observadas no meio EC. Já o isolado IBCB 425 apresentou 8 bandas proteicas semelhantes e 34 bandas proteicas presentes apenas no meio EC. O isolado IBCB 384 foi o que apresentou o menor número de bandas proteicas secretadas no meio EG e entre os meios EC e EG (Tabela 15).

Realizou – se uma comparação entre o isolado IBCB 167, que é o menos patogênico frente a *D. saccharalis* e os isolados IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425, onde todos foram cultivados no meio EC (Figura 16). Na análise dos perfis bidimensionais, verificamos que algumas das bandas proteicas reveladas para o isolado IBCB 167 são encontradas nos demais isolados. Porém o isolado IBCB 167 apresenta 24%, 26% e 12% de bandas proteicas diferentes quando comparado com os isolados IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425, respectivamente. Já os isolados IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 apresentam 18%, 22% e 46% de bandas proteicas

diferentes das encontradas para IBCB 167, respectivamente (Figura 17). O isolado IBCB 425 foi o que apresentou mais bandas proteicas no perfil eletroforético de forma geral (Figura 16 D).

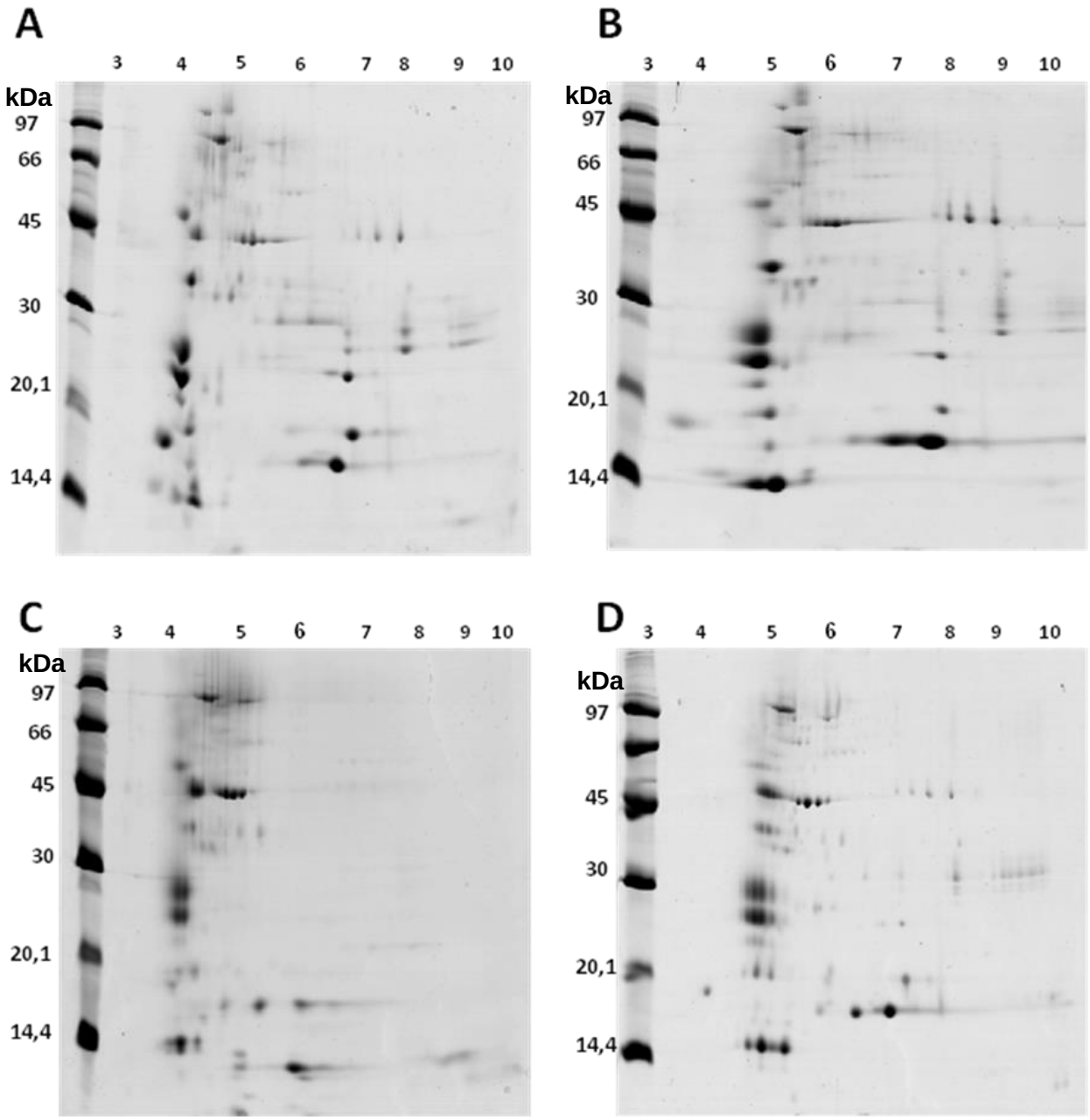


Figura 15: Perfil eletroforético bidimensional para as proteínas secretadas pelos isolados IBCB167 (A), IBCB 360 (B), IBCB 384(C) e IBCB 425 (D) de *M. anisopliae* cultivados em FSbm contendo glicose como fonte de carbono. p*I* 3 – 10 e marcadores de massa molecular em kDa.

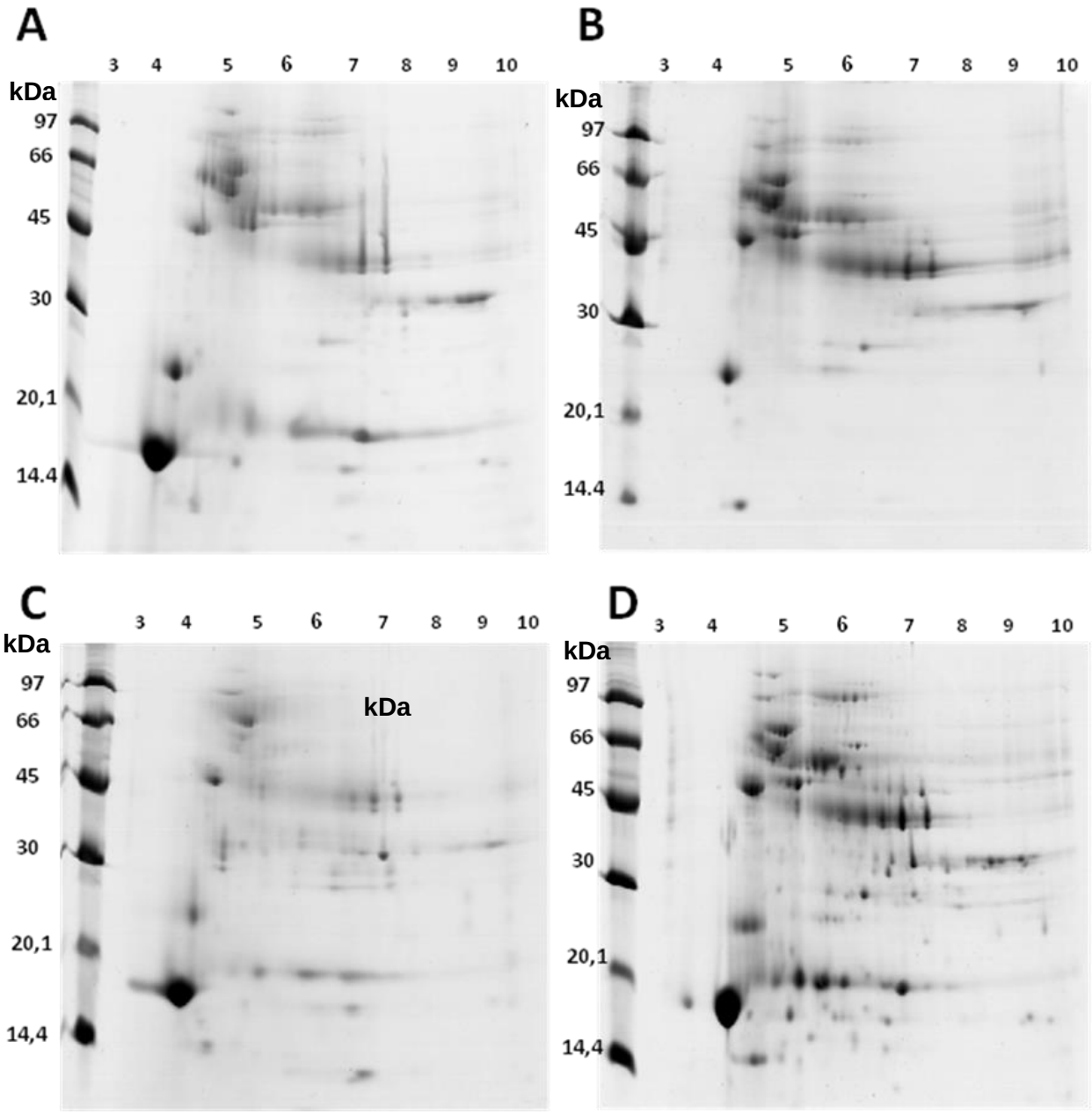
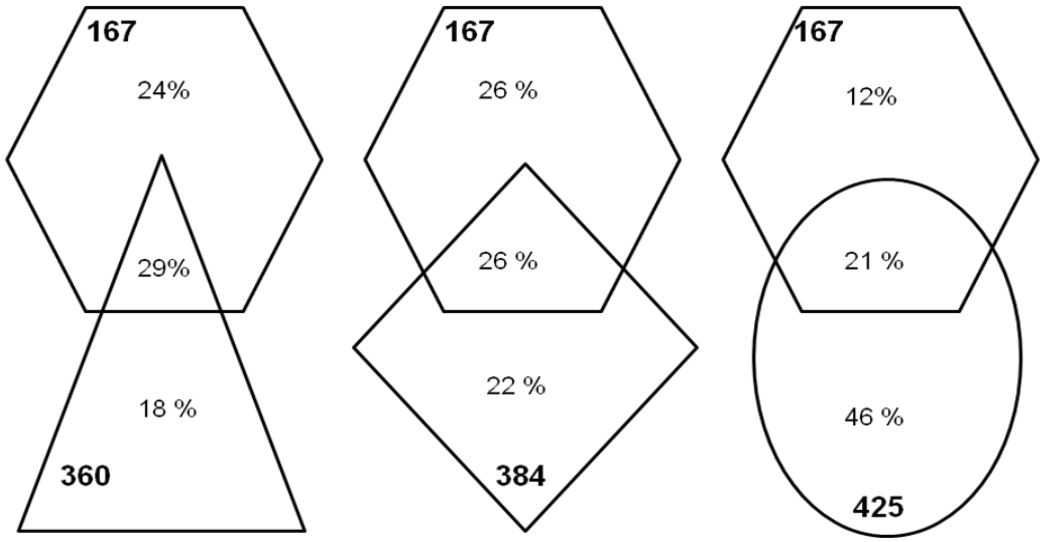


Figura 16: Perfil eletroforético bidimensional para as proteínas secretadas pelos isolados IBCB 167 (A), IBCB 360 (B), IBCB 384(C) e IBCB 425 (D) de *M. anisopliae* cultivados em FSbm contento crisálida como fonte de carbono. p*I* 3 – 10 e marcadores de massa molecular em kDa.

Tabela 15. Comparação das bandas proteicas secretadas pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae* cultivados nos meios EG e EC.

	Número de bandas proteicas		
Isolados	glicose	comum	crisálida
IBCB 167	19	5	25
IBCB 360	19	10	22
IBCB 384	18	3	25
IBCB 425	19	8	34



100% = 68 bp 100% = 70 bp 100% = 111 bp

Figura 17: Comparação entre as bandas proteicas secretadas do isolado IBCB 167 versus as bandas proteicas secretadas pelos isolados IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae* cultivado em FSbm contendo crisálida como fonte de carbono. Abreviatura: Banda proteica (bp).

4.5.1.1 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SECRETOMA DOS ISOLADOS IBCB 167 E IBCB 384 DE *M. anisopliae* CRESCIDOS EM FSbm

As análises dos secretomas dos isolados IBCB 167 e IBCB 384 foram realizadas por eletroforese bidimensional dos extratos enzimáticos obtidos em meio de cultivo contendo crisálida (EC) (indução), como descrito no item 3.12. De forma geral estes isolados apresentam perfis de secreção de proteínas diferentes, tanto qualitativamente como quantitativamente. Considerando que estes isolados, possuem potenciais de controle opostos frente a *D. saccharalis*, as proteínas secretadas foram submetidas à identificação. Na figura 18 observamos spots (bandas proteicas) para o isolado IBCB 167, enumerados de 1 a 60 e as letras A e B, totalizando 62 bandas proteicas, as quais foram digeridas e analisadas. Destas, apenas 17 não foram identificadas. Já na figura 20 foram analisadas 39 bandas proteicas pertencentes ao secretoma do isolado IBCB 384 e apenas 7 destas não foram identificadas. De forma geral, foram identificadas 76% das 101 bandas proteicas selecionadas. Entre as proteínas identificadas foram encontradas enzimas relacionadas a vários processos metabólicos e virulência (Tabela 16). Analisando ambos os secretomas, aproximadamente 34% das proteínas são exclusivas do isolado IBCB 167 e aproximadamente 11% para o isolado IBCB 384, sendo 28% comuns entre os isolados (Figura 20). Também o isolado IBCB 167 expressou 2,47 vezes mais a enzima pyridine nucleotide-disulfide da família oxidoreductase que o isolado IBCB 384. Porém o isolado IBCB 384 expressou 4,30 vezes mais endo-N-acetyl-β-D-glucosaminidase que o isolado IBCB 167 (Tabela 16). Entre as enzimas identificadas a endo-N-acetyl-β-D-glucosaminidase merece destaque, pois ela é uma das enzimas que pertencem ao complexo quitinolítico, estando relacionada ao mecanismo de virulência. A endo-N-acetyl-β-D-glucosaminidase identificada apresentou p*I*

observado de 7,71 e 28 kDa. Na figura 21 observamos o MS e MS/MS do spot 46 obtidos para a identificação da endo-N-acetyl-β-D-glucosaminidase.

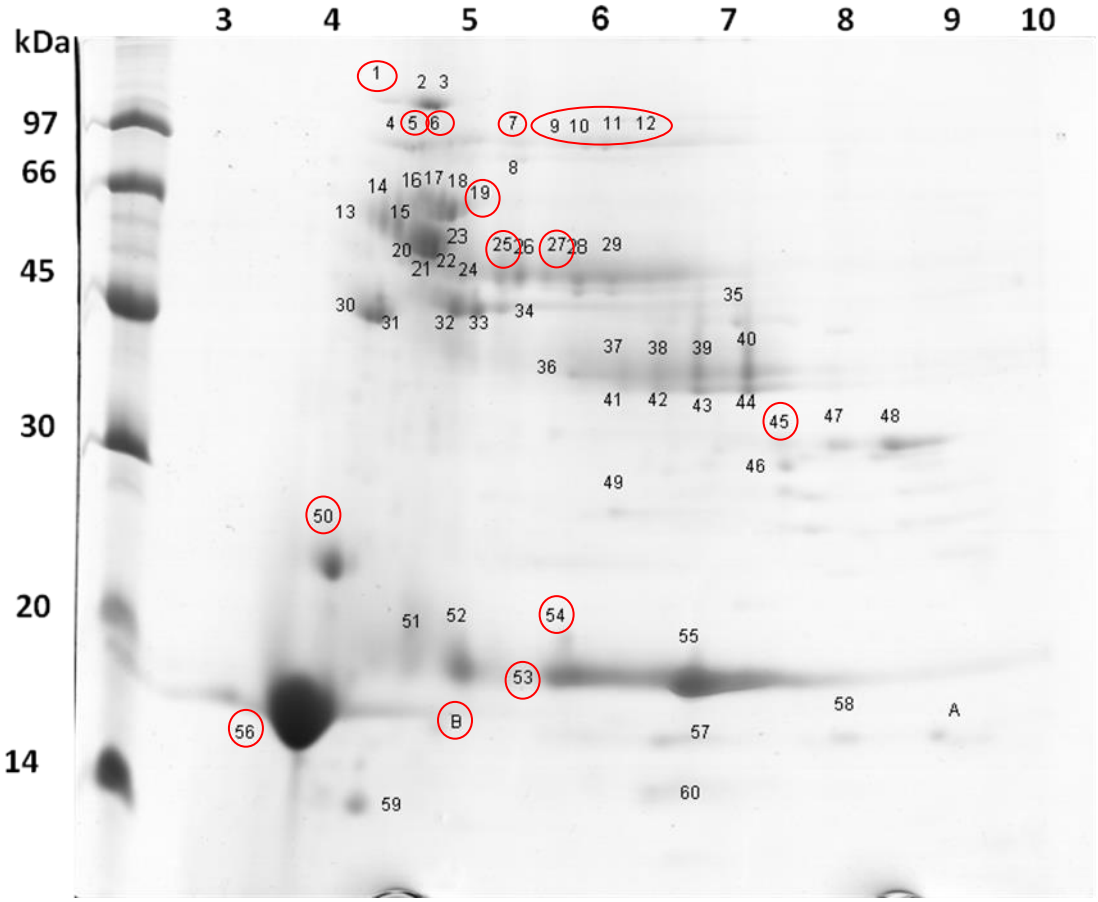


Figura 18: Perfil eletroforético bidimensional para as proteínas secretadas pelo isolado IBCB 167 de *M. anisopliae* cultivado em FSbm contento crisálida como fonte de carbono. Bandas proteicas não identificadas (○).

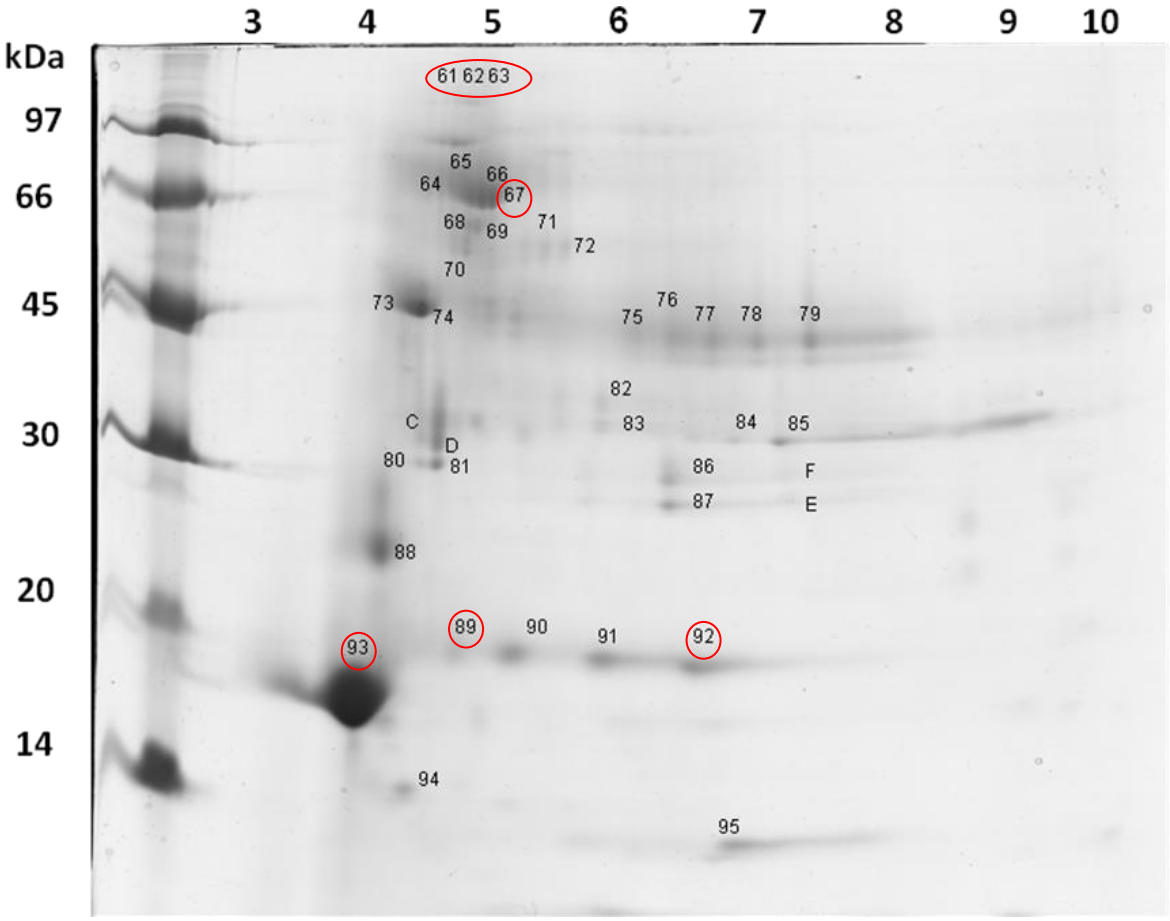


Figura 19: Perfil eletroforético bidimensional para as proteínas secretadas pelo isolado IBCB 384 de *M. anisopliae* cultivado em FSbm contendo crisálida como fonte de carbono. Bandas proteicas não identificadas (○).

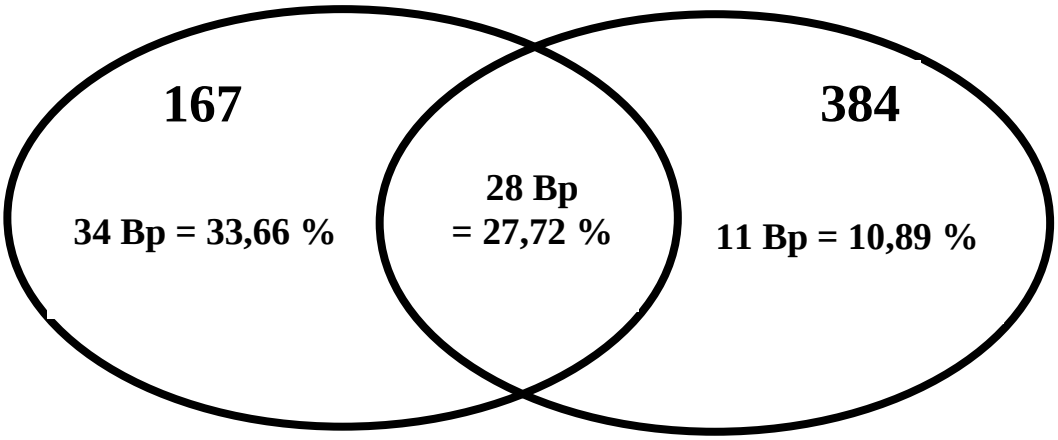


Figura 20: Número de bandas proteicas identificadas no secretoma dos isolados IBCB 167 e IBCB 384 de *M. anisopliae* cultivado em FSbm contendo crisálida como fonte de carbono. Abreviatura: Banda proteica (Bp).

Tabela 16. Identificação das bandas protéicas secretadas pelos isolados IBCB 167 e IBCB 384 de *M. anisopliae.*

Spot	Match count	Cover %	Mascot score	Massa (Da) teórica	Massa (Da) observada	pI teórico	pI observado	Expressão 167	Expressão 384	Código Hits	Sequência identificada	Similariedade	Microrganismo	Base de dados
2	1	3	89	97.470	99.290	5,26	4,77	0	0	gi|322705683	2	WSC domain containing protein	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
3	1	3	140	97.470	99.290	5,26	4,77	0	0	gi|322705683	1	WSC domain containing protein	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
4	2	5	118	110.483	78.167	4,97	4,68	0,13	-0,13	gi|322695977	4	putative glyoxal oxidase precursor	*M. acridum* CQMa 102	NCBInr
8	1	1	67	80.738	74.000	5,74	5,7	0	0	gi|82754305	1	catalase	*P. citrinum*	NCBInr
13	1	3	101	97.470	57.503	5,26	4,36	0	0	gi|322705683	2	WSC domain containing protein	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
14	1	3	151	97.470	57.503	5,26	4,36	0	0	gi|322705683	2	WSC domain containing protein	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
15	1	5	223	97.470	56.347	5,26	4,49	0	0	gi|322705683	3	WSC domain containing protein	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
16	2	8	135	68.421	59.196	5,07	4,87	0,42	-0,42	gi|322710982	3	endonuclease/exonuclease/phosphatase family	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
16	2	3	121	97.470	59.196	5,26	4,87	0,42	-0,42	gi|322705683	1	WSC domain containing protein	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
17	2	10	230	68.421	59.196	5,07	4,87	0,42	-0,42	gi|322710982	4	endonuclease/exonuclease/phosphatase family	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
18	2	10	269	68.421	59.196	5,07	4,87	0,42	-0,42	gi|322710982	4	endonuclease/exonuclease/phosphatase family	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
20	2	4	143	57.916	52.862	5,12	4,75	1,54	-1,54	gi|322710850	1	1,2-a-D-mannosidase	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
20	2	3	64	27.112	52.862	9,64	4,75	1,54	-1,54	gi|256762337	1	predicted protein	Enterococcus faecalis T3	NCBInr
21	2	2	96	57.916	52.862	5,12	4,75	1,54	-1,54	gi|322710850	1	1,2-a-D-mannosidase	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
22	2	4	130	57.916	52.862	5,12	4,75	1,54	-1,54	gi|322710850	2	1,2-a-D-mannosidase	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
23	2	2	97	57.916	52.862	5,12	4,75	1,54	-1,54	gi|322710850	1	1,2-a-D-mannosidase	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
24	1	8	201	42.743	44.000	5,42	5	0	0	gi|322697834	3	thioredoxin reductase, putative	M. acridum CQMa 102	NCBInr
26	1	8	105	42.746	48.738	5,42	5,5	0	0	gi|322697834	2	thioredoxin reductase, putative	M. acridum CQMa 103	NCBInr

Tabela 16. Continuação.

Spot	Match count	Cover %	Mascot score	Massa (Da) teórica	Massa (Da) Observada	pI teórico	PI observado	Expressão 167	Expressão 384	Código Hits	Sequência identificada	Similariedade	Microrganismo	Base de dados
28	1	7	214	87.434	48.036	6,02	5,99	0	0	gi|322710325	4	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase family	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
28	1	11	157	42.743	48.036	5,42	5,99	0	0	gi|322710325	3	thioredoxin reductase, putative	M. acridum CQMa 102	NCBInr
29	1	2	81	87.434	48.245	6,02	6,27	0	0	gi|322710325	2	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase family	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
30	2	5	240	116.92	45.221	5,93	4,25	0	0	gi|322705888	4	hypothetical protein MAA_07113	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
30	2	2	139	130.952	45.221	9,07	4,25	0	0	gi|322712318	2	TRI14-like protein	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
31	2	3	77	39.440	45.221	4,78	4,25	0	0	gi/322712318	2	TRI 14-like protein	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
32	2	3	177	87.828	44.164	7,12	4,95	2,47	-2,47	gi|322692828	2	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase family	M. acridum CQMa 102	NCBInr
33	2	2	117	87.828	43.846	7,12	5,15	1,43	-1,43	gi|322692828	1	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase family	M. acridum CQMa 103	NCBInr
34	1	2	114	87.828	44.164	7,12	5,35	0	0	gi|322692828	1	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase family	M. acridum CQMa 104	NCBInr
35	2	25	575	45.126	42.415	6,57	7,33	-3,17	3,17	gi|322712820	7	secreted protein	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
35	2	3	92	87.828	42.415	7,12	7,33	-3,17	3,17	gi|322692828	2	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase family	*M. acridum* CQMa 102	NCBInr
35	2	10	77	36.156	42.415	7,07	7,33	-3,17	3,17	gi|322705372	2	hypothetical protein MAA_07504	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
36	1	10	150	36.156	36.716	7,07	5,95	0	0	gi|322705372	2	hypothetical protein MAA_07504	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
37	2	5	123	36.156	36.294	7,07	6,34	0,2	-0,2	gi|322705372	1	hypothetical protein MAA_07504	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
38	2	5	141	36.156	36.138	7,07	6,66	-0,24	0,24	gi|322705372	1	hypothetical protein MAA_07504	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
39	2	5	107	36.156	36.822	7,07	6,98	-0,52	0,52	gi|322705372	1	hypothetical protein MAA_07504	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
40	1	10	201	36.156	36.716	7,07	7,4	0	0	gi|322705372	2	hypothetical protein MAA_07504	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
41	2	5	114	36.156	36.294	7,07	6,34	0,2	-0,2	gi|322705372	1	hypothetical protein MAA_07504	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr

Tabela 16. Continuação

Spot	Match count	Cover %	Mascot score	Massa (Da) teórica	Massa (Da) observada	pI teórico	pI observado	Expressão 167	Expressão 384	Código Hits	Sequência identificada	Similariedade	Microrganismo	Base de dados
42	2	10	178	36.156	36.138	7,07	6,66	-0,24	0,24	gi|322705372	2	hypothetical protein MAA_07504	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
43	1	5	76	36.156	34.707	7,07	6,99	0	0	gi|322705372	1	hypothetical protein MAA_07504	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
44	2	5	104	36.156	34.707	7,07	7,4	0,56	-0,56	gi|322705372	1	hypothetical protein MAA_07504	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
46	2	5	115	38.631	28.180	6,6	7,71	-4,3	4,3	gi|322693374	1	endo-N-acetyl-β-D-glucosaminidase precursor	*M. acridum* CQMa 102	NCBInr
47	1	7	86	40.651	29.560	7,14	8,25	0	0	gi|16215662	1	subtilisin-like protease PR1A	*M. anisopliae*	NCBInr
48	1	7	142	40.651	29.560	7,14	8,63	0	0	gi|16215662	1	subtilisin-like protease PR1A	*M. anisopliae*	NCBInr
49	1	7	131	40,304	28.000	5,15	6,45	0	0	gi|322712350	1	leucine aminopeptidase, putative	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
50	2	10	92	20.858	25.000	4,49	4,2	0	0	gi|322709991	1	hypothetical protein MAA_02795	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
51	2	6	55	16,241	18.000	7,27	4,8	0	0	gi|322708481	1	proteinase inhibitor I1, Kazal	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
52	2	2	48	57.012	17.778	10,18	5,02	0,84	-0,84	EX7L_RHIME	1	Exodeoxyribonuclease 7 large subunit OS	*Rhizobium meliloti* 1021	SwissProt
55	2	6	55	16.241	17.205	7,27	6,97	0,98	-0,98	gi|322708481	1	proteinase inhibitor I1, Kazal	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
57	1	10	149	32.477	15.000	9,22	6,86	0	0	gi|322711708	2	hypothetical protein MAA_00355	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
58	1	18	250	20.417	16.200	6,89	8,45	0	0	gi|322709763	3	cyclophilin family peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Cyp2	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
59	1	62	326	14.491	13.350	4,86	4,14	-1,03	1,03	gi|322710287	5	eliciting plant response-like protein	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
60	1	8	391	48.000	14.000	7,05	6,86	0	0	gi|322704711	4	hypothetical protein MAA_08215	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
A	1	19	296	29.896	16.480	9,58	9,35	0	0	gi|322706541	5	nucleoside diphosphate kinase 1	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
A	1	23	231	16.862	16.480	7,77	9,35	0	0	gi|154285406	3	nucleoside-diphosphate kinase	*Ajellomyces capsulatus* NAm1	NCBInr
A	1	17	177	16.762	16.480	7,79	9,35	0	0	gi|396497447	2	similar to nucleoside diphosphate kinase	*Leptosphaeria maculans* JN3	NCBInr
A	1	11	104	17.000	16.480	8,81	9,35	0	0	gi|164662016	1	hypothetical protein MGL_0723	*Malassezia globosa* CBS 7966	NCBInr

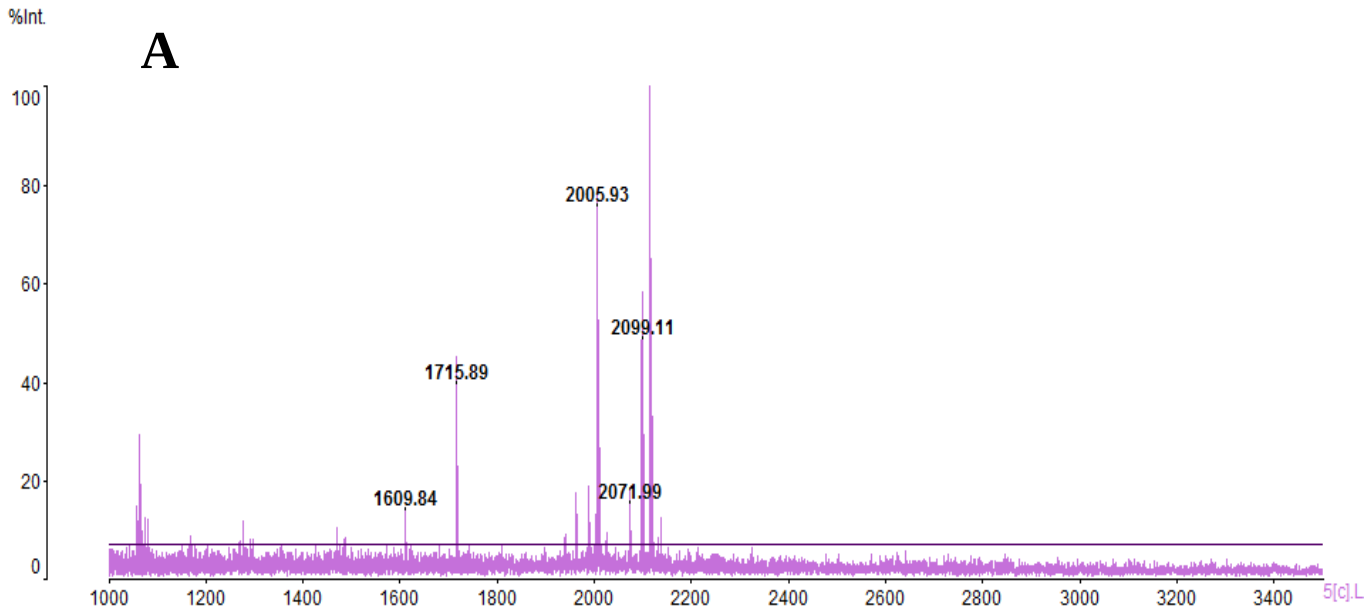
Tabela 16. Continuação

Spot	Match count	Cover %	Mascot score	Massa (Da) teórica	Massa (Da) observada	pI teórico	PI Observado	Expressão 167	Expressão 384	Código Hits	Sequência identificada	Similariedade	Microrganismo	Base de dados
64	1	6	233	68.421	66.710	5,07	4,62	0	0	gi|322710982	3	endonuclease/exonuclease/phosphatase family	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
64	1	1	57	97.986	66.710	5,38	4,62	0	0	gi|322701536	1	WSC domain containing protein	*M. acridum* CQMa 102	NCBInr
65	1	6	171	68.421	66.710	5,07	4,62	0	0	gi|322710982	3	endonuclease/exonuclease/phosphatase family	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
66	1	13	357	68.421	64.933	5,07	4,77	0	0	gi|322710982	4	endonuclease/exonuclease/phosphatase family	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
68	1	4	131	57.916	59.269	5,12	4,73	0	0	gi|322710850	2	1,2-a-D-mannosidase	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
69	1	4	138	57916	59.269	5,12	4,73	0	0	gi|322710850	2	1,2-a-D-mannosidase	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
70	1	6	126	47.95	55.000	5,03	4,73	0	0	gi|322706823	2	NHL repeat-containing protein	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
71	1	2	52	42.74	55.000	5,42	5,4	0	0	gi|322697834	1	thioredoxin reductase, putative	*M. acridum* CQMa 102	NCBInr
71	1	1	52	79,765	55.000	9,58	5,4	0	0	gi|302666331	1	hypothetical protein TRV_01048	*Trichophyton verrucosum* HKI 0517	NCBInr
71	1	4	51	46,84	55.000	5,17	5,4	0	0	gi|326472196	1	bZIP transcription factor	*Trichophyton tonsurans* CBS 112818	NCBInr
72		2	67	77.32	55.000	6,41	5,6	0	0	gi|322692181	1	leupeptin-inactivating enzyme 1 precursor	*M. acridum* CQMa 102	NCBInr
72			53	42.743	55.000		5,6	0	0	gi|322697834	1	thioredoxin reductase, putative	*M. acridum* CQMa 102	NCBInr
73	1	18	300	39.440	45.221	4,78	4,25	0	0	gi|322712318	4	TRI14-like protein	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
74	1	6	143	39.440	45.221	4,78	4,25	0	0	gi|322712318	2	TRI14-like protein	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
75	1	10	198	36.156	40.000	7,07	6	0	0	gi|322705372	2	hypothetical protein MAA_07504	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
76	1	4	73	35.790	40.000	8,48	6,3	0	0	gi|322693886	1	hypothetical protein MAC_08201	*M. acridum* CQMa 102	NCBInr
77	1	10	224	36.156	40.000	7,07	6,8	0	0	gi|322705372	2	hypothetical protein MAA_07504	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
78	1	10	193	36.156	40.000	7,07	7	0	0	gi|322705372	2	hypothetical protein MAA_07504	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr

As culturas foram mantidas à 26ºC por um período de 168 horas em meio adicionado de crisálida. Obs: Match count =1 representa banda proteica exclusiva e Match count = 2 representa banda proteica comum. O valor positivo na coluna de expressão mostra a localização da banda proteica.

Tabela 16. Continuação

Spot	Match count	Cover %	Mascot score	Massa (Da) teórica	Massa (Da) observada	pI teórico	pI observado	Expressão 167	Expressão 384	Código Hits	Sequência identificada	Similariedade	Microrganismo	Base de Dados
79	1	10	193	36.156	40.000	7,07	7,67	0	0	gi|322705372	2	hypothetical protein MAA_07504	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
80	1	22	319	26.499	28.573	5,45	4,42	0	0	gi|556657	4	trypsin-like protease 1	*M. anisopliae*	NCBInr
81	1	22	308	26.499	28.598	5,45	4,39	0	0	gi|556657	4	trypsin-like protease 1	*M. anisopliae*	NCBInr
82	1	0	47	20.355	34.033	4,9	5,78	0	0	VIR_HUMAN	4	Protein virilizer homolog	*Homo sapiens*	SwissProt
83	1	11	125	37.708	34.033	6,44	5,78	0	0	gi|322705292	2	carbohydrate-binding protein	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
84	1	12	271	42.763	30.637	5,81	6,89	0	0	gi|16305048	5	subtilisin-like serine protease PR1D	*M. anisopliae*	NCBInr
85	1	12	182	42.763	30.637	5,81	7,5	0	0	gi|16305048	3	subtilisin-like serine protease PR1D	*M. anisopliae*	NCBInr
86	1	5	62	26.615	27.646	5,68	6,35	0	0	gi|4768909	1	trypsin-related protease	*M. anisopliae*	NCBInr
87	1	10	92	20.858	25.956	4,49	6,35	0	0	gi|322709991	1	hypothetical protein MAA_02795	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
88	2	10	92	20.858	25.000	4,49	4,2	0	0	gi|322709991	1	hypothetical protein MAA_02795	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
90	2	20	136	16.241	17.778	7,27	5,02	0,84	-0,84	gi|322708481	3	proteinase inhibitor I1, Kazal	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
92	2	20	183	16.241	17.205	7,27	6,97	0,98	-0,98	gi|322708481	3	proteinase inhibitor I1, Kazal	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
94	2	41	137	14.491	13.350	4,86	4,14	-1,03	1,03	gi|322710287	4	eliciting plant response-like protein	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
95	1	13	98	18.229	12.323	5,88	6,91	0	0	gi|322712415		hypothetical protein MAA_01062	*M. anisopliae* ARSEF 23	NCBInr
D	1	22	324	26.499	30.181	5,45	4,39	0	0	gi|556657	4	trypsin-like protease 1	*M. anisopliae*	NCBInr
C	1	12	84	26.499	32.388	5,45	4,4	0	0	gi|556657	2	trypsin-like protease 1	*M. anisopliae*	NCBInr
E	1	5	61	26.615	25.956	5,68	7,5	0	0	gi|4768909	1	trypsin-related protease	*M. anisopliae*	NCBInr



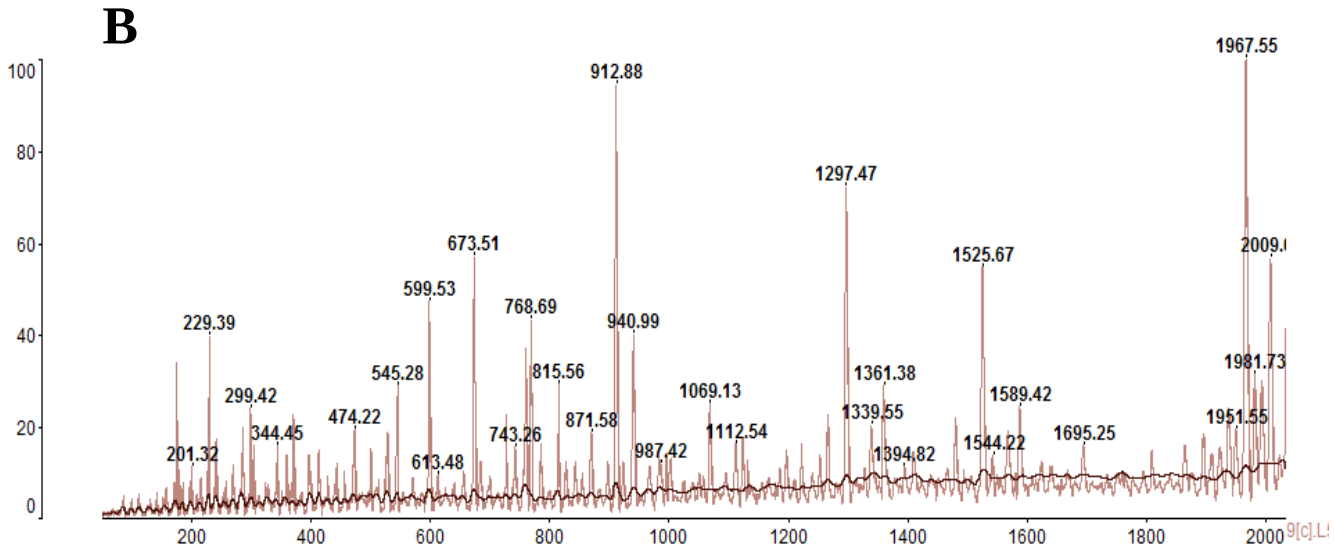


Figura 21. Endo-N-acetyl-β-D-glucosaminidase de *M. anisopliae* identificada. MS dos peptídeos tripíticos (A) e MS/MS do peptídeo tripítico (B).

4.6 PURIFICAÇÃO DAS QUITINASES EXTRACELULARES PRODUZIDAS EM FSS

Na figura 22 observa - se o perfil cromatográfico em DEAE-Celulose para as quitinases produzidas pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae* em FSS. Nesta condição, dois picos de atividade foram obtidos para todos os isolados. O pico I (PI) representa a fração enzimática que não interagiu com a resina e o pico II (PII), é a fração que interagiu com a resina. O PII167 foi eluído com 300 mM de NaCl. Já os picos PII360, PII384 e PII425 foram eluídos com 224 mM, 197 mM e 156 mM de NaCl, respectivamente.

As frações PI que apresentaram atividade quitinásica foram reunidas em um único "pool", assim como as frações PII. Cada "poll" foi dialisado "overnight" contra água destilada a 4ºC e armazenado para posterior utilização nos estudos de caracterização bioquímica. Adicionalmente, o PII384 foi aplicado em coluna cromatográfica Sephadex G-100 (Figura 23), obtendo-se um único pico com atividade quitinásica (SPI). Os índices de recuperação e purificação para cada pool enzimático obtido são apresentados na tabela 17.

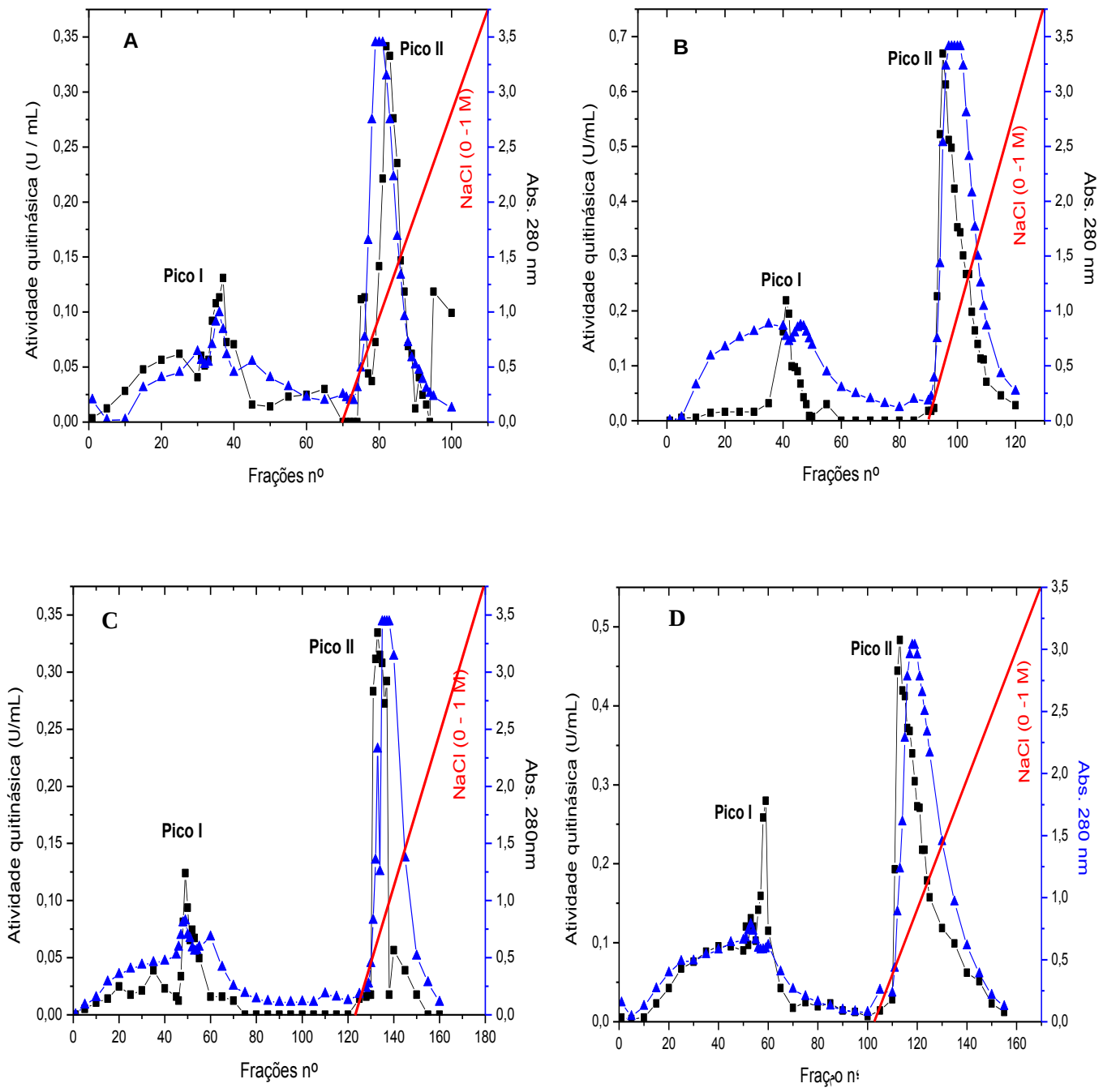


Figura 22. Perfil cromatográfico coluna de troca iônica DEAE-Celulose para as quitinases extracelulares produzidas em FSS pelos isolados IBCB 167 (A), IBCB 360 (B), IBCB 384(C) e IBCB 425(D) do fungo *M. anisopliae*. Símbolos: Atividade enzimática (■); Abs 280 nm (▲).

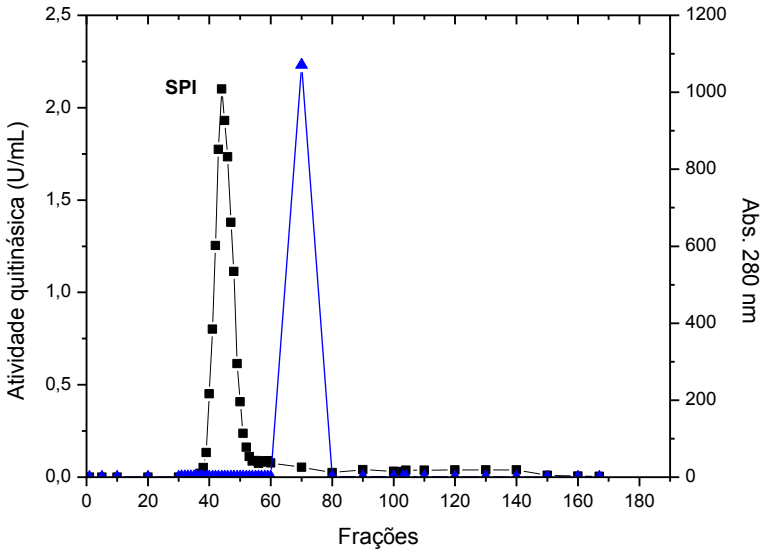


Figura 23. Perfil cromatográfico da coluna de exclusão molecular Sephadex G – 100 para as quitinases extracelulares produzidas em FSS pelo isolado IBCB 384 do fungo *M. anisopliae*. Símbolos: Atividade enzimática (■) e Abs. 280 nm (▲).

Tabela 17. Purificação das quitinases extracelulares produzidas pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 do fungo *M. anisopliae*.

IBCB 167	Volume (mL)	Proteínas (mg Totais)	Atividade (U Totais)	A E (U/mg prot)	Rendimento (%)	Fator de Purificação (X)
Extrato Bruto	140	73,52	13,29	0,18	100	1
DEAE-Celulose Pico I	14	2,62	0,58	0,22	4	1,22
DEAE-Celulose Pico II	35	13,26	4,82	0,36	36	2
IBCB 360						
Extrato Bruto	140	71,7	32,21	0,45	100	1
DEAE-Celulose Pico I	23	2,01	0,99	0,49	3,75	2
DEAE-Celulose Pico II	47	25,26	10,4	0,41	32	1
IBCB 384						
Extrato Bruto	170	54,52	47,25	0,86	100	1
DEAE-Celulose Pico I	44	5,33	11,42	2,14	24,17	2,48
DEAE-Celulose Pico II	84	18,05	15,64	0,87	33,1	1,01
Sephadex G 100 PI	2	2,25	4,78	2,12	10,12	2,46
IBCB 425						
Extrato Bruto	145	68,99	79,61	1,15	100	1
DEAE-Celulose Pico I	28	2,45	4,84	1,97	6,07	1,71
DEAE-Celulose Pico II	38	16,19	21,16	1,3	26	1,13

AE= Atividade específica.

4.7 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA E IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO SPI DO ISOLADO IBCB 384

Na figura 24 observa - se o perfil eletroforético em condições desnaturantes (SDS – PAGE 4 - 15%) das proteínas extracelulares produzidas em FSS pelos isolado IBCB 384, após dois processos de purificação, DEAE-Celulose e Sephadex G-100. Analisando o perfil eletroforético verificamos a presença de diversas proteínas com massas moleculares diferentes. Estas proteínas presentes na amostra foram reduzidas, alquiladas, aplicadas em eletrospray, identificadas e descritas na (Tabela 18). As bandas proteicas assinaladas pelos números 3, 5 e 8 apresentam massas moleculares observadas iguais ou próximas das massas moleculares descritas na tabela 18.

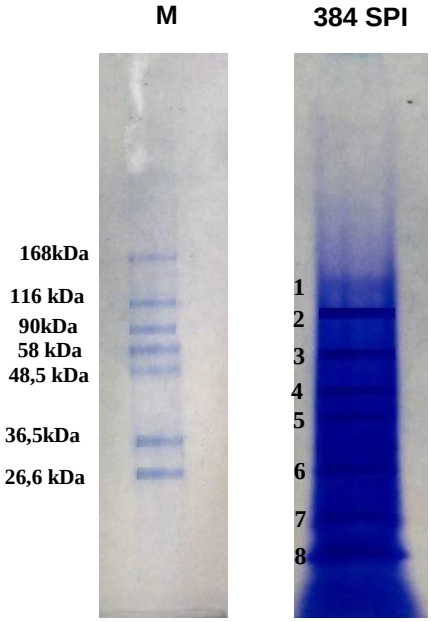


Figura 24. Perfil eletroforético em condição desnaturante (SDS-PAGE 4-15%) para a fração SPI do isolado IBCB 384 crescido em FSS tendo crisálida como fonte de carbono, após Sephadex G-100. Marcador de massa molecular (M).

Tabela 18. Identificação das proteínas secretadas pelo isolado IBCB 384 de *M. anisopliae*, contidas na fração SPI obtida, após Sephadex G-100.

Score	Cover %	Massa teórica (Da)	PI teórico	Código de acesso	Similariedade		Dados
492	14	26.439	5,87	gi|322702995	YcaC amidohydrolase	(*M. anisopliae* ARSEF 23)	NCBInr
275	1	110.524	4,97	gi|322695977	putative glyoxal oxidase precursor	(*M. acridum* CQMa 102)	NCBInr
252	8	63.902	6,27	gi|322712530	putative glucoamylase GMY2	(*M. anisopliae* ARSEF 23)	NCBInr
207	29	40.994	5,32	gi|322705330	Lactonohydrolase	(*M. anisopliae* ARSEF 23)	NCBInr
203	4	63.142	6,6	gi|322695444	GMC oxidoreductase	(*M. acridum* CQMa 102)	NCBInr
202	14	53.319	4,81	gi|322712522	GPI-anchored cell wall beta-1,3-endoglucanase EglC	(*M. anisopliae* ARSEF 23)	NCBInr
190	2	58.944	5,49	gi|322709036	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A	(*M. anisopliae* ARSEF 23)	NCBInr
182	9	42.746	5,42	gi|322697834	thioredoxin reductase, putative	(*M. acridum* CQMa 102)	NCBInr
170	21	25.457	4,71	gi|322704490	hypothetical protein MAA_08391	(*M. anisopliae* ARSEF 23)	NCBInr
153	4	87.423	6,37	gi|16973362	subtilisin-like serine protease PR1C	(*M. anisopliae*)	NCBInr
153	4	49.854	4,99	gi|322703544	hypothetical protein MAA_09356	(*M. anisopliae* ARSEF 23)	NCBInr
153	6	37.861	4,91	gi|322703962	TRI14-like protein	(*M. anisopliae* ARSEF 23)	NCBInr
153	3	58.470	4,77	gi|322705665	tripeptidyl-peptidase 1 precursor	(*M. anisopliae* ARSEF 23)	NCBInr
151	7	64.819	5,51	gi|322705323	hypothetical protein MAA_07723	(*M. anisopliae* ARSEF 23)	NCBInr
128	10	54.215	5,4	gi|322705296	carboxypeptidase Y precursor	(*M. anisopliae* ARSEF 23)	NCBInr

* Significância para proteínas com score > 62 ($p \leq 0,05$).

Tabela 18. Continuação.

Score	Cover %	Massa teórica (Da)	pI teórico	Código de acesso	Similariedade		Dados
107	13	38.683	5,06	gi|9971109	subtilisin-like protease PR1K	(*M. anisopliae*)	NCBInr
105	12	24.900	6,75	gi|322707797	manganese superoxide dismutase	(*M. anisopliae* ARSEF 23)	NCBInr
104	23	17.899	4,93	gi|6624948	DNase1 protein	(*M. anisopliae*)	NCBInr
88	3	48.380	6,77	gi|322702039	hypothetical protein MAC_00278	(*M. acridum* CQMa 102)	NCBInr
82	15	22.344	7,01	gi|322704200	Cupin family protein	(*M. anisopliae* ARSEF 23)	NCBInr
61	2	48.090	5,13	gi|169601268	hypothetical protein SNOG_03494	(*Phaeosphaeria nodorum* SN15)	NCBInr
51	10	42.860	5,44	gi|322708430	vacuolar protease A	(*M. anisopliae* ARSEF 23)	NCBInr
46	3	62.648	8,58	gi|322705325	cellobiose dehydrogenase	(*M. anisopliae* ARSEF 23)	NCBInr
39	11	16.675	4,78	gi|322696294	Cupin family protein	(*M. acridum CQMa 102*)	NCBInr
30	3	55.827	4,93	gi|398388235	peptidase M28	(*Zymoseptoria tritici* IPO323)	NCBInr
50	10	25.955	5,61	gi|322708454	hypothetical protein MAA_04960	(*M. anisopliae* ARSEF 23)	NCBInr
46	3	40.819	5,47	gi|322708454	phosphorylcholine phosphatase	(*M. acridum* CQMa 102)	NCBInr
45	3	48.451	7,05	gi|322692800	hypothetical protein MAA_08215	(*M. anisopliae* ARSEF 23)	NCBInr
44	10	19.490	4,83	gi|322704711	phosphatidylglycerol/phosphatidylinositol transfer protein precursor	(*M. anisopliae* ARSEF 23)	NCBInr
42	1	80.585	5,44	gi|322702496	RecName: Full=Catalase R	(Aspergillus niger)	NCBInr
41	5	32.061	5,37	gi|1705640	hypothetical protein MAA_07607	(*M. anisopliae* ARSEF 23)	NCBInr
36	2	63.954	5,39	gi|322705475	beta-fructofuranosidase	(*M. anisopliae* ARSEF 23)	NCBInr

* Significância para proteínas com score > 62 ($p \leq 0{,}05$).

4.8 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA E pH ÓTIMO APARENTE DE ATIVIDADE PARA AS QUITINASES PARCIALMENTE PURIFICADAS PRODUZIDAS PELOS DIFERENTES ISOLADOS DE *M. anisopliae*

Na figura 25 pode – se observar que a temperatura ótima aparente de atividade para a quitinase extracelular produzida pelos isolados IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae* foi de 60ºC e de 50ºC para o isolado IBCB 167. Analisando a atividade encontrada para os isolados IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 na temperatura ótima de 60ºC verificamos que a quitinase produzida pelo isolado IBCB 425 foi 4 vezes mais ativa se comparada a quitinase produzida pelo isolado IBCB 384. Considerando a temperatura ótima de atividade da quitinase produzida pelo isolado IBCB 167, verificamos que a atividade enzimática foi cerca de 2,6 vezes menor que a observada para a quitinase do isolado 425 em sua temperatura ótima. Já em temperaturas superiores a 60ºC ocorre o declínio da atividade quitinásica para todos os isolados.

Com relação ao pH ótimo aparente de atividade todos os isolados apresentaram atividade quitinásica na faixa de pH de 3,0 a 6,0 (Figura 26). O pH ótimo de atividade para as enzimas produzidas pelos isolados IBCB 360 e IBCB 425 foi 5,0 utilizando-se tampão ácido cítrico 50mM. Entretanto, o pH ótimo de atividade encontrado para a enzima produzida pelo isolado IBCB 167 foi de 5,5 e na faixa de 4,0 a 5,5 para a quitinases do isolado IBCB 384. Sendo assim pode - se observar mais uma vez características diferentes entre as quitinases produzidas pelos isolados estudados.

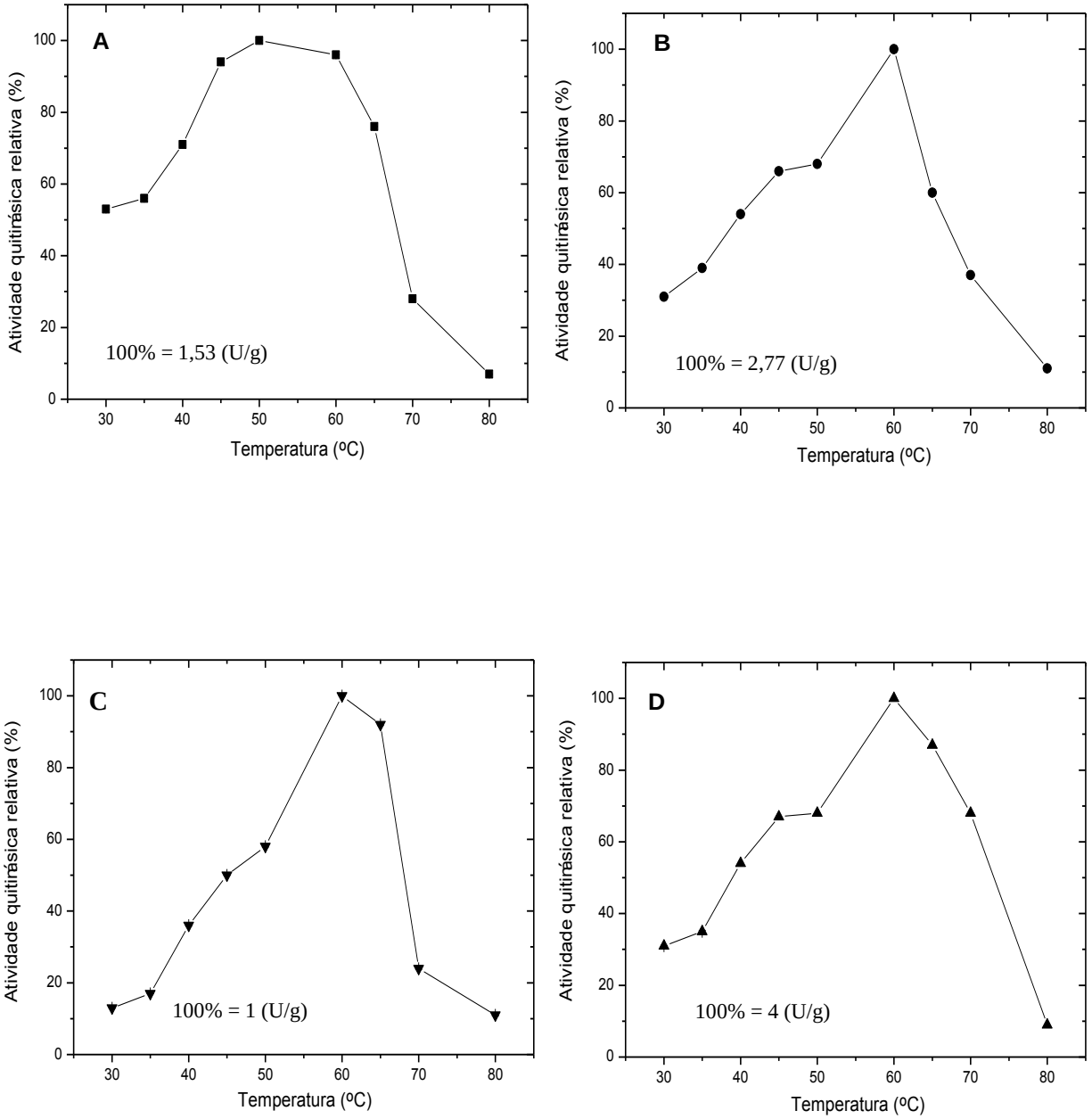


Figura 25. Determinação da temperatura ótima aparente de atividade para as quitinases extracelulares parcialmente purificadas e produzidas em FSS pelos isolados IBCB 167 (A), IBCB 360 (B), IBCB 384 (C) e IBCB 425 (D) de *M. anisopliae*. Desvio padrão para todos os pontos: 0,003 a 0,012.

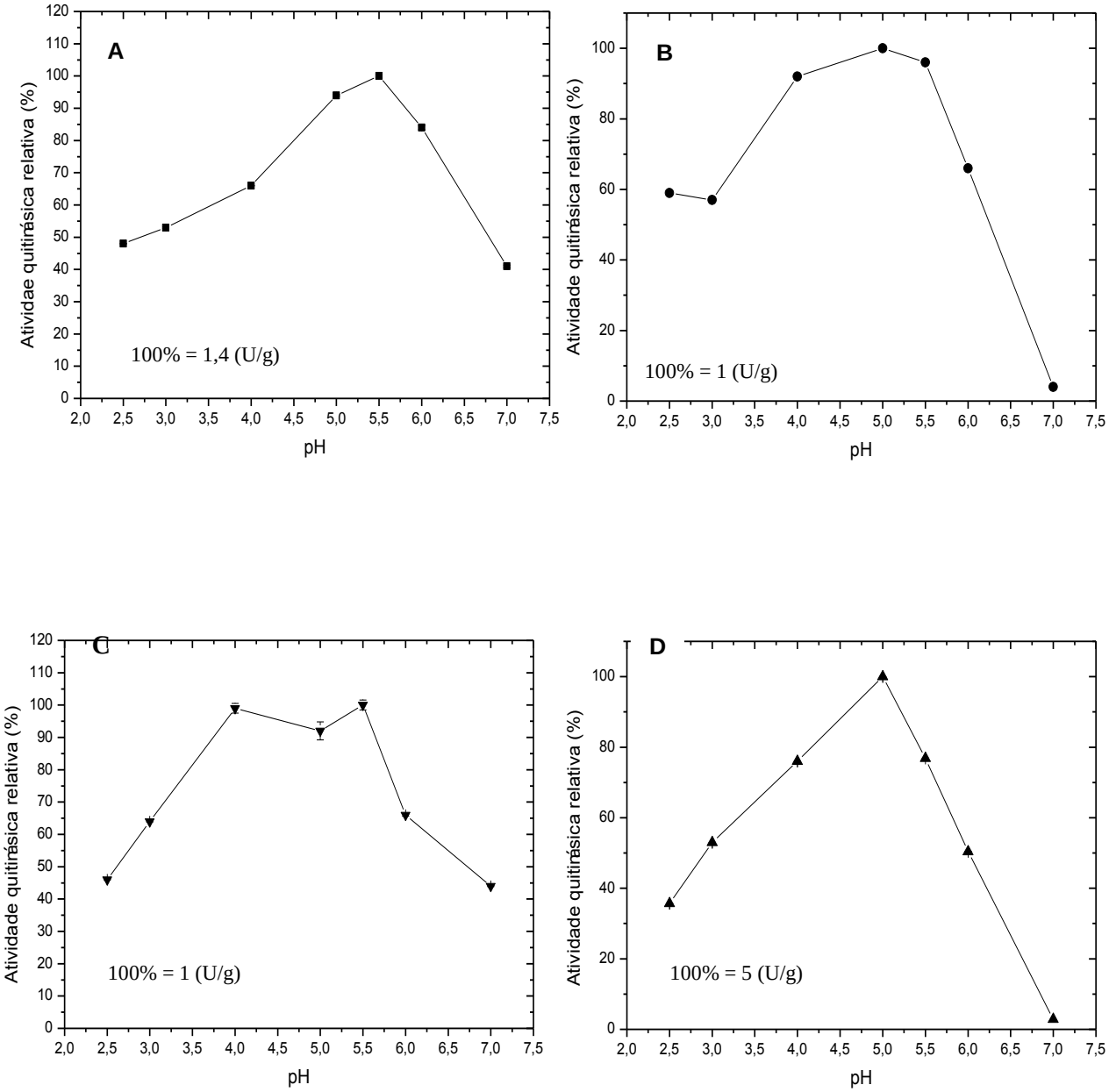


Figura 26. Determinação do pH ótimo aparente de atividade em tampão ácido cítrico para as quitinases extracelulares parcialmente purificadas e produzidas em FSS pelos isolados IBCB 167 (A), IBCB 360 (B), IBCB 384 (C) e IBCB 425 (D) de *M. anisopliae*. Desvio padrão para todos os pontos: 0,002 a 0,011.

4.9 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA E ESTABILIDADE AO pH

Analisando-se a figura 27 verifica – se que as quitinases extracelulares dos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 foram estáveis a 30 ºC e 40 ºC. Adicionalmente as quitinases produzidas pelos isolados IBCB 384 e IBCB 425 foram estáveis a 50 ºC. Os valores de t_{50} encontrados para as quitinases dos isolados IBCB 167, IBCB 360 foram de 10 minutos e 20 minutos a 50ºC, respectivamente. Já os valores de t_{50} para as quitinases dos isolados IBCB 360 e IBCB 384 foram de 5 e 10 minutos a 60ºC, respectivamente. Em geral a quitinase mais suscetível a temperatura, portanto menos estável, foi produzida pelo isolado IBCB 360.

Na figura 28 observa – se que as quitinases dos isolados IBCB 384 e IBCB 425 foram as mais estáveis em uma ampla faixa de pH, quando comparadas com as quitinases dos isolados IBCB 167 e IBCB 360. Adicionalmente a quitinase do isolado IBCB 384 manteve 100% de sua atividade quando incubadas no pH 7,0 por um período de 60 minutos. Já a quitinase do isolado IBCB 425 manteve aproximadamente de 70% de sua atividade original em todos os valores de pH testados. A quitinase do isolado IBCB 360 manteve 100% de sua atividade inicial no pH 6,0 e a quitinase do isolado IBCB 167 manteve 60% de sua atividade inicial no pH 5,5. Entretanto as quitinases dos isolados IBCB 167 e IBCB 360 não foram estáveis em baixos valores de pH. Considerando as estabilidades à temperatura e ao pH fica evidente que as quitinases destes isolados têm comportamentos diferentes frente à mesma situação.

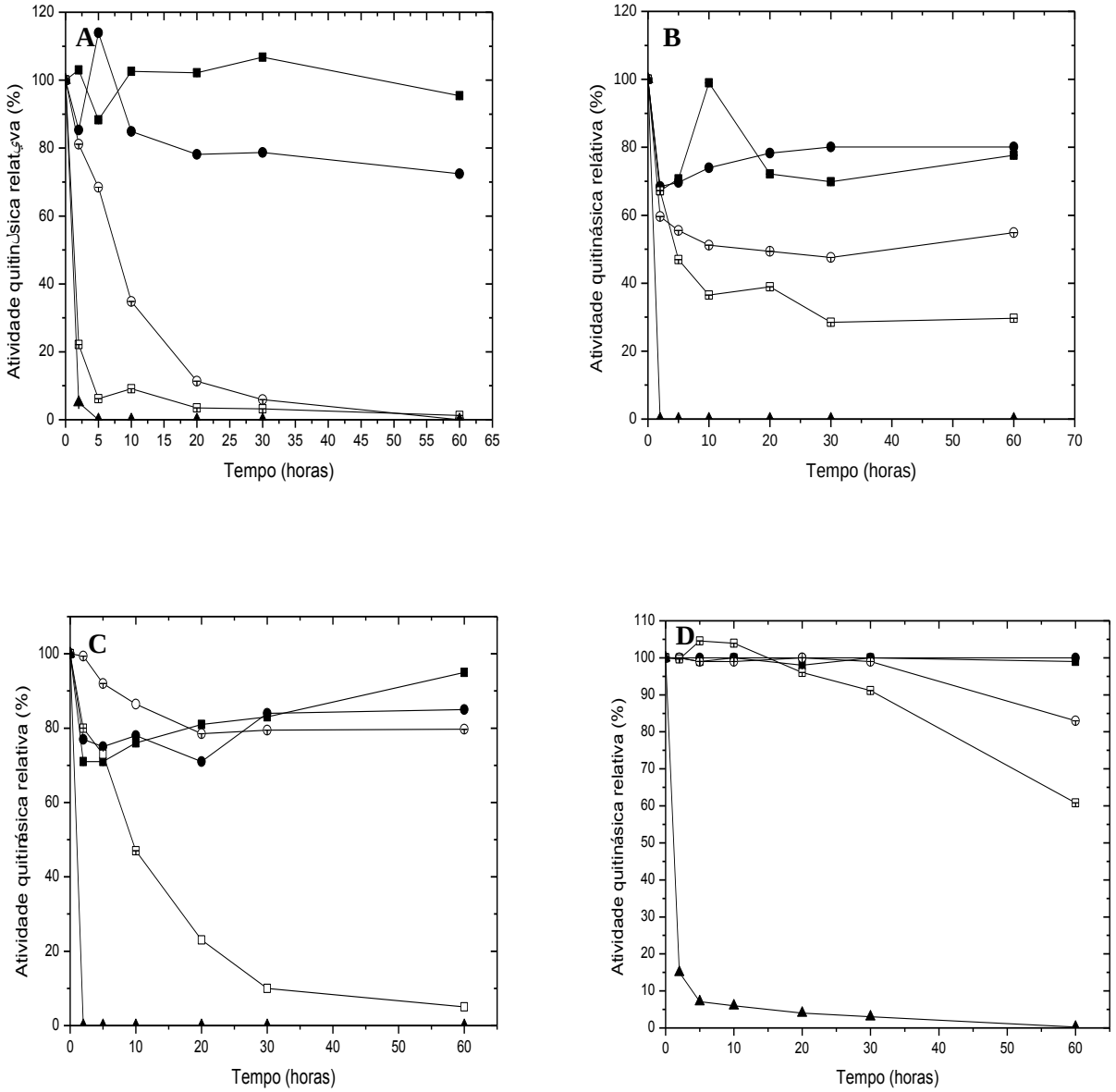


Figura 27. Estabilidade térmica das quitinase extracelulares parcialmente purificadas (PII) dos isolados IBCB 167 (A), IBCB 360 (B), IBCB 384 (C) e IBCB 425 (D) do fungo *M. anisopliae*. Símbolos: 30ºC (■), 40ºC (●), 50ºC (○), 60ºC (□) e 70ºC (▲).

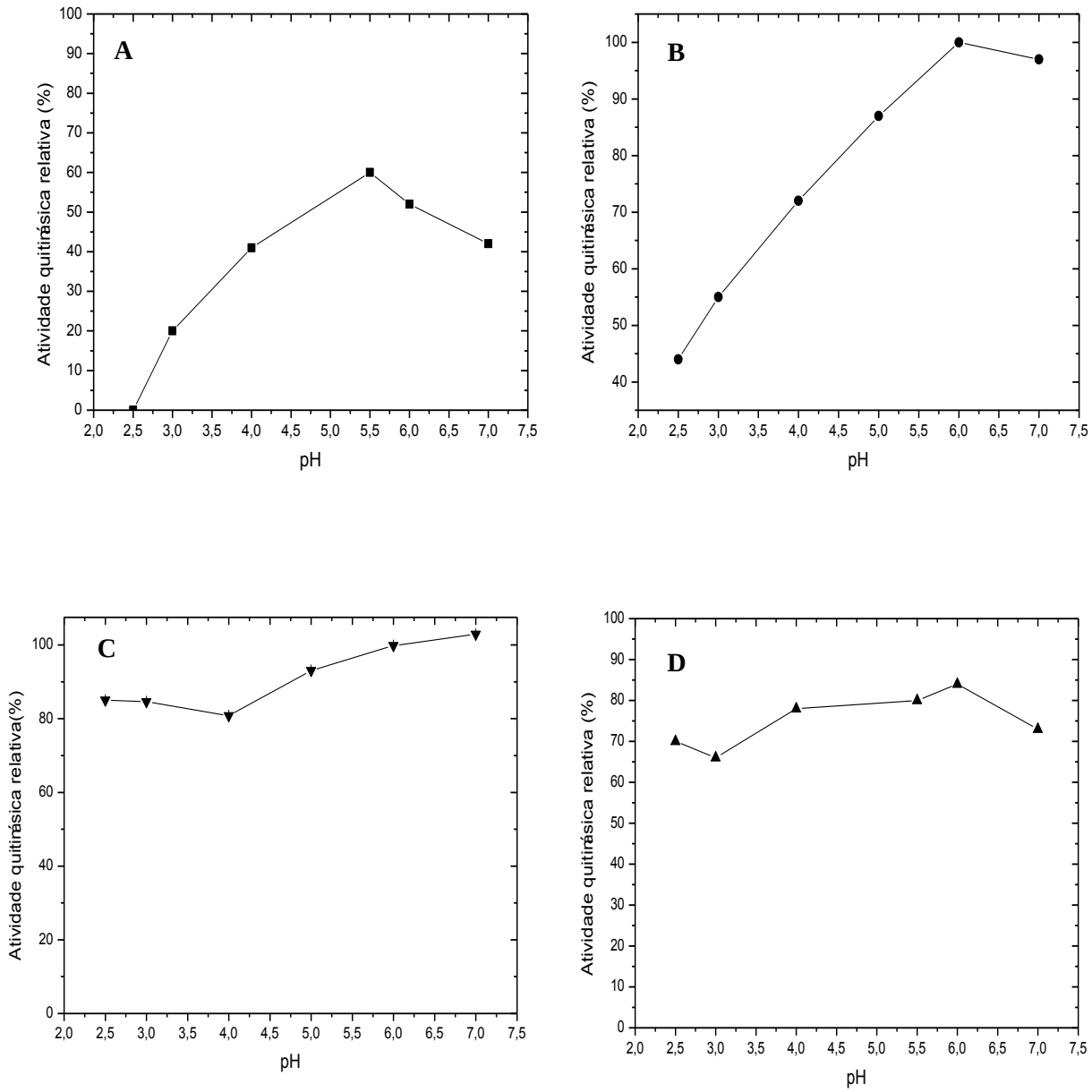


Figura 28. Estabilidade ao pH das quitinases extracelulares parcialmente purificadas (PII) dos isolados IBCB 167 (A), IBCB 360 (B), IBCB 384 (C) e IBCB 425 (D) do fungo *M. anisopliae*. As enzimas foram mantidas em tampão ácido cítrico 50mM, pH 5,0 por 60 minutos a 4ºC.

4.10 INFLUÊNCIA DE DIFERENTES COMPOSTOS SOBRE A ATIVIDADE QUITINÁSICA

Na tabela 19 pode – se observar a influência de diferentes compostos na concentração de 1mM sobre a atividade quitinásica extracelular parcialmente purificada, dos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae.* As ativações máximas encontradas para as quitinases dos isolados IBCB 167 e IBCB 425, foram de 20% na presença de $BaCl_2$ e de 50% na presença de $MnCl_2$, respectivamente. Também foi observado altas ativações da atividade enzimáticas para a quitinases do isolado IBCB 425, na presença dos compostos $CaCl_2$, EDTA, KCl, $MgCl_2$, NaBr, NH_4Cl, e β- mercaptoetanol. Já para as quitinases dos isolados IBCB 360 e IBCB 384 não foram encontradas ativação significativa, frente aos sais testados. Deve-se destacar que as quitinases dos isolados, de forma geral, apresentaram uma tolerância ao β - mercaptoetanol. Já os sais $CuSO_4$, $ZnSO_4$, $Zn(No_3)_2$, $HgCl_2$ e $Pb(C_2H_3O_2)$ provocaram a inibição da atividade enzimática das quitinases produzidas por estes isolados.

Tabela 19. Influência de diferentes compostos na atividade quitinásica extracelular dos isolados de *M. anisopliae*

	Atividade Quitinásica Relativa (%)			
	1mM			
Compostos	167	360	384	425
$BaCl_2$	120 ± 5	101 ± 5	99 ± 1	130 ± 3
$CaCl_2$	110 ± 5	95 ± 3	96 ± 3	132 ± 3
Cisteína	105 ± 2	94 ± 1,5	88 ± 5	128 ± 3
$CoCl_2$	83 ± 5	61 ± 5	83 ± 5	65 ± 4
$CuCl_2$	80 ± 2	71 ± 2	98 ± 1	102 ± 5
$CuSO_4$	39 ± 5	37 ± 4	88 ± 3	42 ± 2
EDTA	117 ± 0,5	86 ± 5	98 ± 5	136 ± 5
$FeCl_3$	109 ± 5	74 ± 3	103 ± 1	116 ± 3
$FeSO_4$	82 ± 1	65 ± 4	108 ± 1	106 ± 5
$HgCl_2$	99 ± 5	80 ± 5	91 ± 5	102 ± 5
KCl	110 ± 2	97 ± 5	99 ± 1	140 ± 2
KH_2PO_4	110 ± 2	87 ± 2	115 ± 5	111 ± 5
$MgCl_2$	102 ± 0,5	90 ± 2	109 ± 1	149 ± 5
$MgSO_4$	103 ± 3	89 ± 1	91 ± 1	125 ± 5
$MnCl_2$	104 ± 3	75 ± 5	83 ± 5	150 ± 5
NaBr	117 ± 5	89 ± 1	92 ± 2	139 ± 3
NaCl	110 ± 3	91 ± 1,5	101 ± 4	141 ± 5
NaH_2PO_4	107 ± 5	88 ± 1	106 ± 3	121 ± 5
NH_4Cl	105 ± 1,5	87 ± 5	98 ± 5	137 ± 4
$Pb(C_2H_3O_2)$	91 ± 2	79 ± 5	99 ± 2	100 ± 4
$Zn(NO_3)_2$	83 ± 3	56 ± 5	70 ± 5	90 ± 5
$ZnSO_4$	87 ± 2	57 ± 2	79 ± 1	98 ± 5
β- mercaptoetanol	109 ± 0,5	89 ± 4	108 ± 5	141 ± 3
Ausente	100 ± 2	100 ± 2	100 ± 3	100 ± 5

Os cultivos foram feitos conforme as condições estipuladas no DCCR e as culturas foram mantidas em estufa à 26ºC com umidade relativa ao redor de 76% por um período de 216 horas e parcialmente purificadas.

4.11 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS K_m E $V_{máx}$ PARA AS QUITINASES DOS ISOLADOS IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 E IBCB 425 DE *M. anisopliae*

A determinação dos parâmetros cinéticos das quitinases produzidas em FSS e purificadas, foram realizadas utilizando o substrato sintético 4-nitrofenil-N-Acetil-β-D glucosaminideo. As formas enzimáticas apresentaram comportamento Michaeliano. Na Tabela 20 podem ser observados os valores de $V_{máx}$, K_m e $V_{máx}/K_m$ para todas as quitinases produzidas pelos isolados de *M. anisopliae*, calculados de acordo com a representação gráfica de Lineweaver–Burk (Figura 29). Como pode ser observado, a quitinase do isolado IBCB 360 apresentou o menor valor de K_m (0,57 mM), sendo o isolado que possui a quitinase de maior afinidade pelo substrato, com $V_{máx}$ = 3,38 U/mg.

TABELA 20. Parâmetros cinéticos das quitináses produzidas pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 E IBCB 425 de *M. anisopliae*.

Isolados	K_m (mM)	$V_{máx}$ (U/mg)	$V_{máx}/K_m$ (U/mg mM^{-1})	N
IBCB 167	0,68	1,79	2,63	1,05
IBCB 360	0,57	3,38	5,93	1,4
IBCB 384	0,66	1,96	2,97	1,05
IBCB 425	0,89	5,26	5,91	1,3

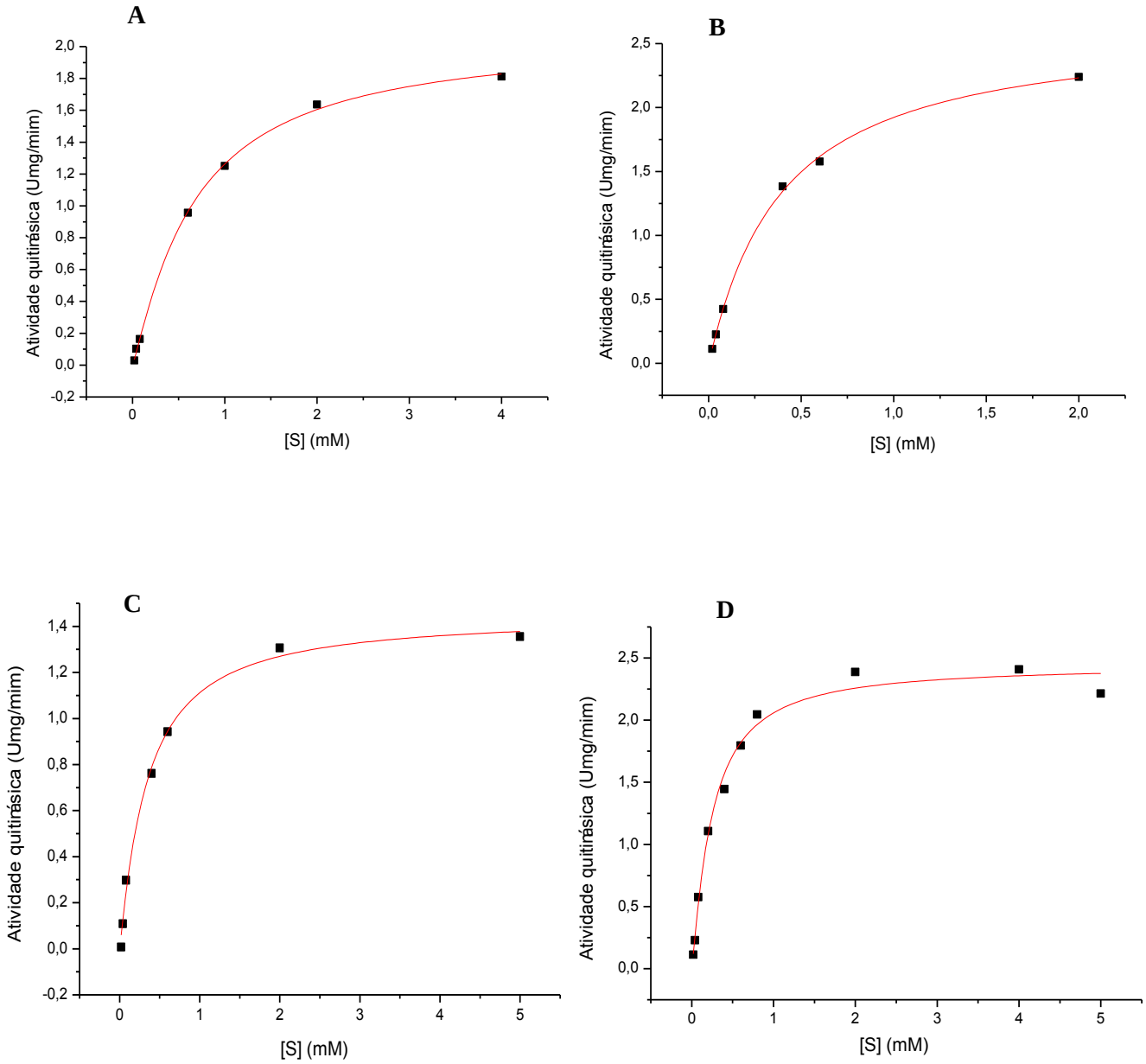


Figura 29. Representação gráfica de Lineweaver–Burk para as quitinases extracelulares purificadas dos isolados IBCB 167 (A), IBCB 360 (B), IBCB 384 (C) e IBCB 425 (D) do fungo *M. anisopliae*. Inserto: representação gráfica de Michaelis – Menten.

Parte IV

Experimentos in vivo

4.12 ENSAIO DE VIRULÊNCIA

4.12.1 ENSAIO DE VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS IBCB 384 E IBCB 425 DE *M. anisopliae* SOBRE *G. mellonella* UTILIZANDO APLICAÇÃO TÓPICA

Para os ensaios *in vivo* utilizou – se os isolados IBCB 384 e IBCB 425, sendo os mais virulentos à praga *D. saccharalis.* Neste ensaio de imersão foi testado o potencial de virulência destes isolados de *M. anisopliae* sobre *G. mellonella* utilizando aplicação tópica (Tabela 21). Observou – se que o isolado IBCB 425 foi o mais virulento, por apresentar um TMS de 4,6 dias, quando comparado com o IBCB 384 (Tabela 21). Analisando a confirmação da mortalidade por micose observou – se alta mortalidade provocada pelo isolado IBCB 384 e uma baixa mortalidade provocada pelo isolado IBCB 425, devido a contaminação com fungos oportunistas.

Tabela 21. Ensaio de virulência das linhagens IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae* sobre *G. mellonela.*

	Imersão		
Tratamentos	Mortalidade* (média ± SE) (%)	Mortalidade (%)* por micose	TMS** (dia ± SE)
Controle	17 ± 3,3a	0 ± 0 a	13,8± 0,52a
IBCB 384	100 ± 0 b	83,33± 3,33 b	7,0± 0,35b
IBCB 425	100 ± 0 b	33,33± 3,33 c	4,6± 0,48c

*Colunas com mortalidade média que apresentam as mesmas letras não apresentam diferença significativas pelo teste LSD ($p \leq 0,05$).
**Colunas com mortalidade média que apresentam as mesmas letras não apresentam diferença significativas pelo teste log -rank ($p \leq 0,05$). Tempo médio de sobrevivências (TMS) foi calculado para 15 dias.

4.12.2 ENSAIO DE VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS IBCB 384 E IBCB 425 SOBRE A LARVA DE *G. mellonella* UTILIZANDO CONÍDIOS INJETADOS

O ensaio do potencial de virulência dos isolados IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae* sobre *G. mellonella* utilizando conídios injetados (Tabela 22) mostrou que os isolados IBCB 384 e IBCB 425 provocaram mortalidade semelhante (90 – 93%). Entretanto os resultados encontrados para TMS mostram que o isolado IBCB 425 e IBCB 384 não apresentam diferenças estatisticamente significantes se considerados os valores absolutos. Porém, na prática, vale ressaltar que a diferença no TMS entre as linhagens é de 1 dia. Esta diferença é muito significante, quando se leva em consideração a ação devastadora de uma praga. Baseado neste quadro, o isolado IBCB 425 pode ser considerado mais virulento que o IBCB 384. Na figura 30 pode-se observar claramente o potencial de crescimento micótico dos isolados analisados, confirmando o potencial de desenvolvimento sobre a larva morta.

Tabela 22. Ensaio de virulência dos isolados IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae* sobre larvas de *G. mellonella* utilizando conídios injetados.

Tratamentos	Mortalidade * (média ± SE) (%)	Mortalidade (%)* por micose	TMS** (dia ± SE)
Controle	3,33 ± 3,33 a	0 ± 0 a	6,93 ± 0,06 a
IBCB 384	93,33 ± 3,33 bc	100 ± 0 b	5,9 ± 0,168 b
IBCB 425	90 ± 5,77 bc	100 ± 0 b	5,5 ± 0,25 b

*Colunas com mortalidade média que apresentam as mesmas letras não apresentam diferença significativas pelo teste LSD ($p \leq 0,05$).
**Colunas com mortalidade média que apresentam as mesmas letras não apresentam diferença significativas pelo teste log -rank ($p \leq 0,05$). Tempo médio de sobrevivências (TMS) foi calculado para 7 dias.

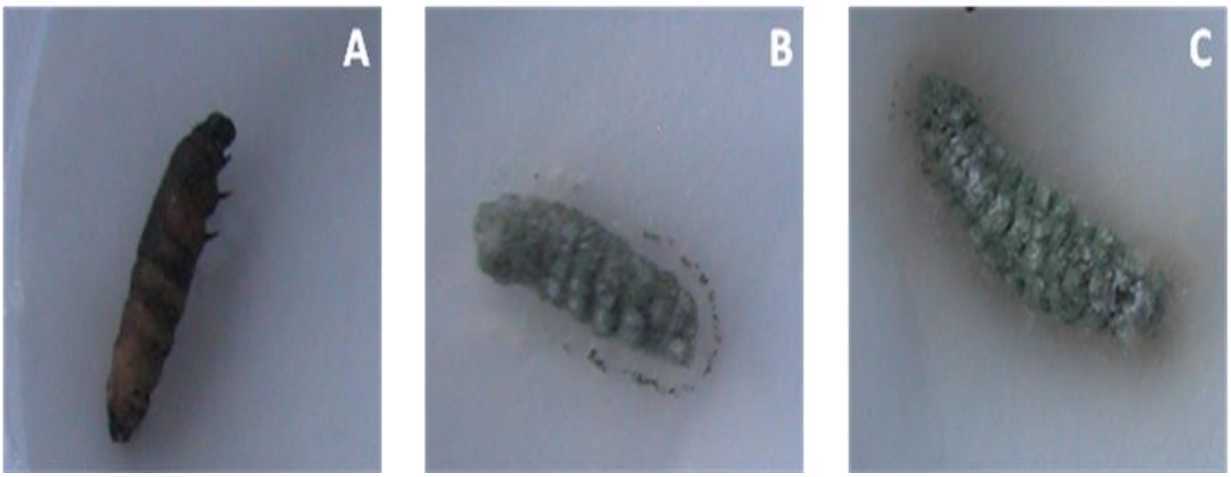


Figura 30. Confirmação da mortalidade das larvas de *G. mellonella* (A) por crescimento micótico dos isolados IBCB 384 (B) e IBCB 425 (C) de *M. anisopliae* após injeção de 800 conídios e incubação por 7 dias a 26°C.

4.12.3 ENSAIO DE TOXICIDADE DOS ISOLADOS IBCB 384 E IBCB 425 CULTIVADOS EM FSbm SOBRE *G. mellonella* UTILIZANDO MICROINJEÇÃO

Neste ensaio foi testado o potencial de toxicidade do extrato bruto, fração dialisada e fração não dialisada obtidos dos isolados IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae* sobre larvas de *G. mellonella* utilizando a técnica de microinjeção (Tabela 23). Primeiramente foi analisada a toxicidade do extrato bruto, sendo que o isolado IBCB 384 provocou alta mortalidade e apresentou TMS de 2,4 dias, sendo 2 vezes mais virulento que o isolado IBCB 425 (Tabela 23). Na toxicidade da fração dialisada observou - se que os isolados de *M. anisopliae* apresentaram mortalidade e virulência semelhantes. Com relação a toxicidade da fração não dialisada dos isolados IBCB 384 e IBCB 425 causaram uma baixa mortalidade das larvas e um alto TMS foi obtido, evidenciando que esta fração é de baixa toxicidade (Tabela 23). Em análise geral pode - se verificar que para os isolados do fungo *M. anisopliae* a toxicidade está presente na fração dialisada onde encontra – se moléculas menores de 3,5 kDa e os metabólitos secundários.

Tabela 23. Ensaio de toxicidade dos isolados IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae* cultivadas em FSbm sobre larvas de G. *mellonela* utilizando microinjeção.

	Extrato bruto			**Dialisado**			**Não dialisado**		
Tratamentos	Mortalidade (média ± SE) (%)	TMS [a] (dia ± SE)	Proteína mg/mL	Mortalidade (média ± SE) (%)	TMS [b] (dia ± SE)	Proteína mg/mL	Mortalidade (média ± SE) (%)	TMS[b] (dia ± SE)	Proteína mg/mL
Controle	11,66 ± 5,77 a	6,4 ± 0,14 a	0,75	13,33 ± 6,6 a	7,66 ± 0,16a	0,3	13,33 ± 6,6 a	7,66 ± 0,16a	0,75
IBCB 384	83,33 ± 5,77 b	2,40 ± 0,40b	1,2	58 ± 11 b	6,5 ± 0,41b	0,59	13,33 ± 6,6 a	7,9 ± 0,08 a	1,06
IBCB 425	46,66 ± 5,77 c	5,46 ± 0,36c	1,14	53 ± 18 b	6,63 ± 0,44b	0,49	33,33 ± 6,66 b	7,0 ± 0,38 a	0,58

*Colunas com mortalidade média que apresentam as mesmas letras não apresentam diferença significativas pelo teste LSD ($p \leq 0,05$).
**Colunas com mortalidade média que apresentam as mesmas letras não apresentam diferença significativas pelo teste log -rank ($p \leq 0,05$).
a Tempo médio de sobrevivências (TMS) foi calculado para 7 dias.
b Tempo médio de sobrevivências (TMS) foi calculado para 8 dias.

4.12.4 EFEITO DA TOXICIDADE DO SORO OBTIDO DE LARVAS DE *G. mellonella* INFECTADAS PELOS ISOLADOS IBCB 384 E IBCB 425 UTILIZANDO MICROINJEÇÃO

O potencial de toxicidade do soro obtido das larvas de *G. mellonella* infectadas pelos isolados IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae* utilizando a técnica de microinjeção foi analisado (Tabela 24). Considerando que os soros obtidos para este estudo são provenientes de larvas contaminadas com os isolados citados, os soros foram nomeados como SORO-384 e SORO-425. Analisando a toxicidade do soro obtido das larvas contaminadas pelos isolados de *M. anisopliae*, verificamos que o isolado IBCB 384 foi mais eficiente, provocando mortalidade de 61% com TMS de 6,56 dias, sendo o isolado com o maior potencial de toxicidade e virulência, quando comparado com o IBCB 425.

Foi observada a melanização da cutícula (parte externa) e da traquéia (parte interna) quando injetado o soro infectado em larvas sadias (Figura 31). Ao analisar a melanização da cutícula verificou –se que todas as larvas apresentaram melanização com padrões diferentes, diferindo dos controles. Porém a larva que apresentou melanização mais intensa foi a que recebeu o SORO-425. Observamos manchas de melanização na traquéia das larvas durante o desenvolvimento dos isolados IBCB 384 e IBCB 425 na hemolinfa (Figura 31).

Tabela 24. Ensaio de toxicidade do soro extraído de larvas de G. *mellonela* após microinjeção de conídios dos isolados IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae*.

Tratamentos	Mortalidade [a] (média ± SE) (%)	TMS (dia ± SE)	Proteína mg por larva
Controle +	28,33 ± 7,23 a	8,3 a	0,01
IBCB 384	60,83 ± 6,2 b	6,56 b	0,01
IBCB 425	35 ± 8,63 ab	7,73 a	0,01

*Colunas com mortalidade média que apresentam as mesmas letras não apresentam diferença significativas pelo teste LSD ($p \leq 0,05$).
**Colunas com mortalidade média que apresentam as mesmas letras não apresentam diferença significativas pelo teste log -rank ($p \leq 0,05$).
Tempo médio de sobrevivência (TMS) foi calculado para 9 dias.
a Mortalidade do controle foi de 13%, TMS de 8,73c e 0,01mg /8µL de proteína.

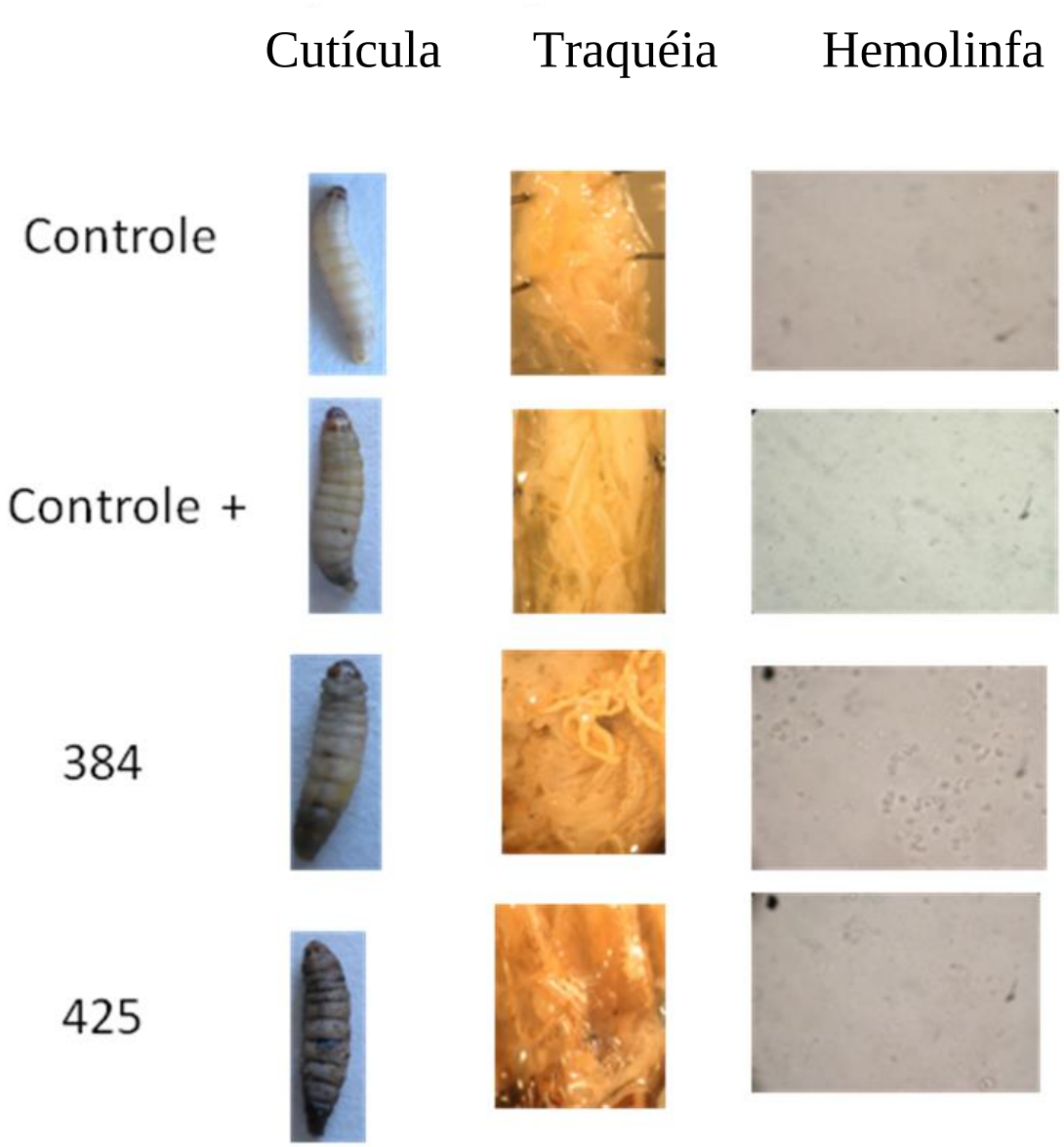


Figura 31. Efeito da toxicidade do soro obtido de larvas de *G. mellonella* contaminada com os isolados IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae* após injeção de 800 conídios por larva e incubado por 72h.

5. DISCUSSÃO

Atualmente a agricultura vem enfrentando um sério problema associado à resistência dos insetos pragas frente aos produtos químicos utilizados para combatê - los. Uma alternativa para controlar estes insetos é aplicar fungos entomopatogênicos nas lavouras (WRAIGHT & BRADLEY, 1996). O estudo destes fungos tem despertado muito interesse, pois grande parte destas espécies de fungos são especializadas na penetração via tegumentos, onde ocorre a secreção de enzimas que degradam a cutícula do inseto, tais como proteases, lipases e quitinases, entre outras (St LEGER *et al.,* 1988b), estando relacionadas a patogenicidade e a virulência (PARIS & SEGRETAIN, 1978).

A produção destas enzimas relacionadas com a patogenicidade e virulência ocorrem durante o ciclo de infecção do patógeno sobre o hospedeiro, permitindo o desenvolvimento da patogênese. A patogênese inclui (i) crescimento do tudo germinativo na cutícula do inseto e simultaneamente a produção de enzimas hidrolíticas; (ii) produção de substâncias mucilaginosas para facilitar a adesão; (iii) formação do apressório; (iv) penetração através do grampo de penetração, até atingir a hemocele e a hemolinfa. Na hemolinfa infectada desenvolvem – se os corpos hifais; há produção de complexos enzimáticos e metabólitos tóxicos que ativam o sistema de defesa do hospedeiro. O confronto entre patógeno e hospedeiro termina com o aparecimento do micélio e a conidiogênese na superfície do hospedeiro, fechando o ciclo de infecção (SMALL & BIDOCKA, 2005; ARRUDA *et al*., 2005). O complexo enzimático é de extrema importância, pois as enzimas proteases, lipases e quitinases, entre outras, são produzidas e secretadas desde o primeiro contato do fungo com o seu hospedeiro como, por exemplo, a protease Pr1 que faz parte de uma gama de proteases, responsáveis pela degradação de proteínas complexadas com a quitina que

constitui a cutícula do hospedeiro, sendo regulada durante a formação do apressório e conidiogênese (SMALL & BIDOCKA, 2005).

As lipases são importantes, pois a cutícula e os integumentos dos insetos possuem gorduras, lipoproteínas e ceras. Estas substâncias dificultam a adesão do conídio, como foi observado por Lord & Howard (2004) para os conídios de *B. bassiana*, *Aspergillus parasiticus* e *M. anisopliae* utilizados para infectar *Liposcelis bostrychophila.* As quitinases são fatores de virulência em entomopatógenos, fitopatógenos e micopatógenos segundo Charnley (1997), St Leger *et al.* (1998), Kishimoto *et al*. (2002) e Barreto *et al*. (2004). Elas são produzidas já na fase inicial de penetração do fungo, agindo sobre a quitina da cutícula do inseto, facilitando a penetração do fungo. A secreção desta enzima é regulada por um sistema de indução e repressão, sendo necessárias quantidades mínimas da enzima para iniciar a degradação do substrato (FRANCESCHINI *et al*., 2001 e SILVA *et al*., 2005). A maior parte das quitinases produzidas e secretadas por *M. anisopliae* são ácidas e sofrem influência do pH do meio (St LEGER *et al.*, 1996b). Os genes chit1, chit2, chit3 de *M. anisopliae* que codificam quitinases já foram estudados. O gene chit 1 codifica uma endo quitinase de 42kDa e p*I* de 5,8 (BOGO *et al*., 1998). O gene chit 2 também codifica uma quitinase de 42kDa, porém com p*I* de 4,8 (Baratto *et al*., 2003 e 2006). Já o gene ortologo de chit3 codifica a quitinase CHIT30, que possui atividade endo e exoquitinásica (Silva *et al.*, 2005). Mesmo com os estudos já realizados, ainda falta informação sobre a regulação e secreção do complexo quitinolítico produzido por *M. anisopliae*. Estas informações são importantes na compreensão da relação patógeno hospedeiro e consequentemente, para mitigar os problemas com insetos praga, evitando os danos incalculáveis no campo (St. LEGER *et al.*, 1996c ; Hu & St. LEGER, 2002). De acordo com Patil *et al*. (2000) a penetração do fungo e a

colonização do hospedeiro é possivelmente facilitada pela presença de um complexo multienzimático, onde o sinergismo entre as enzimas são importantes e a atuação individual é essencial.

Com o objetivo de selecionar isolados do gênero *Metarhizium* para controlar a praga *Diatraea saccharalis*, Zappelini (2009) obteve como resultado porcentagens diferentes de mortalidade da praga para cada isolado da espécie *Metarhizium anisopliae* testado. Examinando os resultados obtidos no trabalho de Zappelini (2009) e outras informações descritas na literatura sobre a relação entre enzimas e virulência de fungos (BOLDO *et al.*, 2009), optamos por investigar a produção e as características bioquímicas das quitinases produzidas pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 da espécie *M. anisopliae*, cujas porcentagens de mortalidade confirmada para a praga *D. saccharalis* foram de 55%, 68%, 96% e 82%, respectivamente.

Inicialmente, analisou-se a morfometria de hifas e conídios dos quatro isolados através do microcultivo em lâmina e posterior análise por MEV. O microcultivo em lâmina possibilita a visualização das estruturas íntegras, sendo uma ótima técnica para identificação de fungos, pois nela é nítido o desenvolvimento de macro e microconídeos (PRADO, 2007). As medidas realizadas para a largura dos conídios dos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 não apresentaram diferenças estatisticamente relevantes. Já na análise da largura das hifas e comprimento dos conídios, dos quatro isolados estudados, ocorreram diferenças significativas. Estas diferenças estão entre os isolados IBCB 167 e IBCB 425 para hifas e entre os isolados IBCB 384 e IBCB 425 para comprimento de conídios. Desta forma as diferenças não estão restritas apenas as características bioquímicas, mas também em relação à morfometria de hifas e conídios. No trabalho de Arruda *et al.*

(2005), utilizando MEV para analisar a morfologia dos conídios de diferente isolados de *Metarhizium* spp., todos os conídios apresentaram a forma alongada. Verificaram ainda que alguns conídios são grandes e outros menores, e que as superfíces dos conídos podem ser irregulares e murchas ou regulares e intumescidas. Estes resultados se assemelham aos obtidos no presente trabalho. Como exemplo da utilização desta técnica para analisar estruturas fúngicas cita-se o trabalho de Nampoothiri *et al.* (2004) que observaram o desenvolvimento das hifas do *T. harzianum* em farelo de trigo e os trabalhos de Arruda *et al*. (2005) e Santi *et al*. (2009) que observaram conídios de *M. anisopliae*.

A identificação morfológica foi confirmada pela identificação molecular, utilizando ITS, cuja região de amplificação foi a sequência parcial da subunidade menor do rRNA, ITS1, gene 5.8S, ITS2 e sequência parcial da subunidade maior do rRNA. As sequências obtidas apresentaram alta identidade com outras sequências de *M. anisopliae* depositadas no GenBank, sendo os quatro isolados identificados como *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Através do alinhamento entre as sequências obtidas e a sequência depositada no GenBank para o isolado LRC 189 *M. anisopliae* var. *anisopliae*, foi possível observar regiões conservadas e não conservadas. Gao *et al*. (2011), Bischoff *et al*. (2009) e Arruda *et al*. (2005) também utilizaram ITS para identificar espécies de *M. anisopliae.* Os espaços intergênicos alteram – se rapidamente ao longo do tempo, portando são menos conservados e são utilizados para identificar espécies ou variedades pertencentes ao mesmo gênero (SOUFRAMANIEN *et al*., 2003; LIU *et al*., 2002) .

Uma vez confirmada a indentificação dos isolados, a produção de quitinases em FSbm e FSS foi avaliada, considerando que são enzimas chaves no processo de infecção e patogênese. A maior produção quitinásica intracelular foi em FSbm no

meio EG para todos os isolados, com destaque para isolado IBCB 425. Considerando a quitinase extracelular o melhor produtor foi o isolado IBCB 384, mantido sob agitação a 26ºC por 168h. Quando os isolados foram cultivados em meios indutores observou – se que os isolado IBCB 425 foi o que mais se destacou. Ao analisar o cultivo dos isolados na presença de substratos indutores, houve um favorecimento da secreção da quitinase. Porém, quando os isolados foram cultivados em meios não indutores, observamos uma boa produção de quitinase intracelular, mas não favoreceram a secreção da quitinase. O fato destes meios não favorecerem a secreção da quitinase extracelular, pode causar alguns problemas para os fungos entomopatogênicos, pois para este tipo de fungo é extremamente importante a secreção da quitinase, porque esta enzima faz parte de um complexo enzimático que permite que o patógeno infecte o hospedeiro. Nos trabalhos de Fleuri *et al*. (2009) e Liu *et al*. (2003) também foi verificado a indução da secreção de quitinase, ao cultivar os microrganismos *Cellulosimicrobium cellulans* 191 e *Verticillium lecanii* F091 em fermentação submersa, utilizando quitinina. De forma geral o cultivo destes isolados em EG favorece a produção da quitinase intracelular, ao passo que cultivar estes isolados em meios com indutores aumenta a secreção da enzima. Considerando a produção enzimática total (intracelular + extracelular) em condição estacionária e sob agitação, as maiores produções quitinásicas foram obtidas para os isolados IBCB 167 e IBCB 384 sob a condição de agitação e para os isolados IBCB 360 e IBCB 425 sob condição estacionária. Entretanto o isolado IBCB 384 foi o que mais se destacou sob agitação e o isolado IBCB 360 se destacou na condição estacionária. No trabalho desenvolvido por Braga *et al*. (1998), a FSbm sob agitação adicionada de quitina como fonte de carbono, também foi utilizada para desenvolvimento de *M. anisopliae*, onde foi verificado um bom crescimento deste microrganismo, assim como observado

para os quatro isolados deste estudo. A condição de agitação possui características que favorecem a produção enzimática tais como, melhor oxigenação do meio de cultivo, homogenização do meio e aumento do contato entre o microrganismo e os nutrientes do meio de cultivo. Estas características que a condição de agitação possui provavelmente influênciou a produção quitinásica observada neste trabalho. Liu *et al*. (2003) investigaram a influencia da condição de agitação e a velocidade de agitação sobre a produção de quitinase, ao cultivar *V. lecanii* F091 em meio de cultivo contendo 0,41% de pó da casca de camarão. Foi concluído que a condição de agitação favoreceu a produção de quitinase, como observado neste trabalho. Porém, é relatado que altas velocidades de agitação causam efeitos negativos como ruptura de células, alterações morfológicas e queda na produtividade. Considerando - se a produção quitinásica extracelular em FSbm foi padronizada, a utilização do meio EC sob agitação foi usada para continuidade dos estudos, uma vez que este favoreceu a secreção da quitinase.

Muitos elementos e fatores afetam o desenvolvimento do microrganismo e consequentemente a produção de uma determinada enzima. Alguns parâmetros podem ser citados como a composição do meio de cultivo, o pH, a temperatura, as fontes de carbono, nitrogênio e fósforo, entre outros. Estudos realizados por Ortiz-Urquiza *et al*. (2010b) utilizando o fungo *M. anisopliae*, confirmaram que diferentes fontes de carbono e fontes de nitrogênio, influenciam a produção de biomassa fúngica, a produção de blastosporos, na secreção de proteínas com atividade inseticida e na secreção de moléculas tóxicas.

Desta forma, a produção de quitinase extracelular em FSbm foi maior para os quatro isolados quando o meio foi suplementado com *D. saccharalis* (Ds), ou crisálida. É importante destacar ainda que a crisálida utilizada como substrato para a

produção de quitinases é um resíduo biológico do processo de produção do fio de seda, pois a crisálida é a pupa do bicho da seda, sendo posteriormente descartada. Encontrar uma aplicação para este resíduo biológico é interessante e atrativo, podendo ser utilizado para a produção de enzimas. Interessantemente, alguns destes resíduos, provenientes de vegetais ou de animais, apresentam grandes vantagens quando utilizados para o cultivo de microrganismos como, por exemplo, redução dos custos de produção, favorecendo o crescimento do microrganismo e a produção de enzimas (PEIXOTO-NOGUEIRA, 2009).

O tempo de incubação de um microrganismo influência muito a produção enzimática. A incubação por um período breve pode não resultar na produção máxima da enzima, já que o microrganismo encontra-se na fase de crescimento vegetativo. Em adição, o crescimento da cultura por um período longo pode levar a exaustão dos nutrientes, conduzindo a um declínio no crescimento e na produção enzimática (PELCZAR *et al*., 1996). O crescimento microbiano divide-se em quatro fases, sendo elas, a fase de adaptação do microrganismo ao meio de cultivo (fase LAG), uma fase caracterizada por um crescimento rápido e uniforme (fase LOG), a qual o microrganismo já adaptado ao meio utiliza todos os recursos oferecidos por este para o seu desenvolvimento, uma fase estacionária na qual o crescimento do microrganismo é interrompido pela escassez nutricional do meio e uma fase de declínio, onde o meio não tem mais nutriente e também apresenta uma série de compostos do metabolismo do próprio microrganismo, os quais são responsáveis pela lise das hifas e conseqüentemente morte celular (ESPOSITO *et al.*, 2004). Considerando as diferentes formas de cultivo, cada microrganismo apresenta seu melhor tempo de crescimento e produção enzimática como, por exemplo, *Bacillus amyloliquefaciens* V656 (SAN-LANG *et al*., 2002) cuja produção máxima de duas

quitinases extracelulares foi obtida em 48 h. Já para *Oerskovia xanthineolytica* e *C. cellulans* 191 a produção quitinásica máxima foi observada em 72 h (WAGHMARE *et al*., 2010 e FLEURI *et al*., 2009). De acordo com Kang *et al*. (1999), uma nova quitinase produzida por *M. anisopliae,* teve sua produção máxima em 96 h. Entretanto, a produção de quitinase por *Paecilomyces lilacinus* ocorreu em 240 h (KHAN *et al*., 2003). Os melhores períodos de incubação para produção enzimática encontrados no presente trabalho foram diferentes, sendo as maiores produções quitinásicas intracelulares dos isolados obtidas entre 72 h e 216 h, não coincidindo com os picos de crescimento observado para os isolados IBCB 360 (96h), IBCB 387 (96 h) e IBCB (72 h), sendo apenas coincidente para o isolado IBCB 167. Contudo a maior atividade quitinásica extracelular produzida pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 foram verificadas entre os períodos de 96 h e 144 h. Os períodos encontrados nos trabalhos de Waghmare *et al*. (2010), Fleuri *et al*. (2009) e Moraes *et al*. (2003) para a produção da quitinase extracelular pelos microrganismos *O. xanthineolytica, C. cellulans* e *M. anisopliae,* respectivamente, foram diferentes de todos os períodos encontrados para a produção da forma extracelular do presente trabalho. Analisando a produção da quitinase intracelular e extracelular verificou – se que cada isolado apresentou comportamentos de produção e secreção diferentes e peculiares, corroborando com os relatos feitos por Gimenez-Pecci *et al*. (2002) onde diferentes isolados de uma mesma espécie produzem níveis diferentes de enzimas extracelulares.

Com relação a produção quitinásica em FSS, os maiores níveis enzimáticos foram obtidos quando foi utilizada crisálida como substrato umedecido com solução de extrato de levedura (1%) na proporção 1,3:1 (m/v) para os isolados IBCB 167, IBCB 360 e IBCB 425. Já para o isolado IBCB 384 a maior secreção de quitinase foi

obtida quando o meio foi umedecido com solução de sais de Khanna na mesma proporção. A solução de extrato de levedura e de sais de Khanna provavelmente supriram alguma necessidade nutricional do microrganismo favorecendo seu metabolismo e consequentemente a produção enzimática, o que não foi observado na presença da água de torneira. A solução de sais de Khanna possui a maior quantidade e diversidades de sais, quando comparada com a composição da água de torneira descrita no item 3.6.1.2, justificando o melhor desenvolvimento dos isolados. Já a solução de extrato de levedura é extremamente rica em diversos nutrientes como proteínas, vitaminas do complexo B, ácido fólico,biotina, niacina, minerais, mananas e glucanas (HALASZ & LÁSZTITY, 1991). Estes nutrientes influenciam no crescimento do fungo e consequentemente na produção enzimática, como foi observado neste trabalho. Após a seleção do substrato e da solução umidificante, a produção enzimática foi otimizada por planejamento experimental. Esta ferramenta permite estudar a interação de variáveis independentes e contínuas no processo de produção enzimática (ROBRIGUES & LEMMA, 2009). Bhanu *et al.* (2008) utilizaram o planejamento fatorial para avaliar o efeito do pH, extrato de levedura e mistura de fontes de carbono na produção de conídios por *M. anisopliae.* Patel e*t al*. (2007) utlilizaram um planejamento do tipo Plackett–Burman com oito variáveis para a produção de quitinase por *Paenibacillus sabina* JD2, permitindo a seleção prévia das variáveis relevantes. Neste trabalho foi utilizado um planejamento de 2ª ordem, utilizando pontos externos e repetições de pontos centrais para as variáveis independentes tempo de crescimento e umidade, as quais mostraram efeito positivo na produção de quitinase extracelular para todos os isolados, elevando a produção quitinolítica. O DCCR realizado para cada um dos isolados foi estatisticamente válido, pois o F-calculado foi maior que o F-tabelado. Os valores de R^2 obtidos no

DCCR para cada isolado, onde R^2 é o coeficiente de explicação que fornece uma media da proporção da variação em relação à variação total das respostas, foram próximos a 1 (RODRIGUES & LEMMA, 2009). Desta forma foi possível obter as gráficos de superfície de resposta bem como as equações que descrevem o modelo para cada uma das enzimas estudadas. Para os isolados IBCB 167, IBCB 384 e IBCB 425 a interação entre as variáveis não foi significante, diferindo do observado para o isolado IBCB 360. A adição de solução umificante ao meio foi positiva e significante, pois quanto mais úmido o meio, maior a produção. Porém, o meio de cultivo com umidade excessiva tem um efeito negativo na produção da quitinase. A maior produção de quitinase extracelular ocorreu com umidade igual ou superior a 48% e por períodos acima de 5 dias. Este comportamento foi observado em todos os isolados. Fica claro que estes isolados têm uma preferência por meios mais úmidos, entretanto são capazes de produzir quitinases em meios com umidade reduzida. Esta flexibilidade demonstrada por todos os isolados é importante, visto que no meio ambiente a presença de água é inconstante. Os resultados obtidos nestes planejamentos foram validados, aumentando o grau de confiabilidade dos experientos. Os planejamentos ainda permitem um melhoramento da produção enzimática utilizando as equações obtidas. Simultaneamente as atividades enzimáticas das proteases e lipases secretadas nas condições padronizadas para FSS foram quantificadas. Estas enzimas são importantes para o processo de infecção entre o patógeno e hospedeiro, auxiliando na compreensão desta relação extremamente complexa. O isolado que destacou - se na produção de ambas as enzimas foi o IBCB 425. Este resultado corrobora ao observado neste trabalho e por Zappelini (2009) com relação a de degradação da cutícula dos insetos. O isolado IBCB 425 também

destacou – se no controle das pragas *Mahanarva fimbriolata* e *Deois flavopicta* segundo Loureiro *et al*. (2005) e Perreira *et al*. (2008).

Quando comparadas a FSbm e FSS, a produção de quitinase extracelular foi máxima, no período de 216 h em FSS, diferindo dos períodos encontrados para FSbm. Nos trabalhos de Patel *et al.* (2007) e Suresh & Chandrasekaran (1999) com *Paenibacillus sabina* JD2 e *Beauveria bassiana* cultivados em FSS os períodos máximos de produção de quitinase encontrados foram 96 h e 44 h, respectivamente. Analisando a produção da quitinase intracelular e extracelular verificamos que cada isolado apresentou comportamentos de produção e secreção diferentes. O mais interessante é que a produção de quitinase tende ser maior quando os isolados são cultivados em FSS quando comparados a FSbm. Este resultado é de extrema importância, uma vez que a FSS se aproxima das reais condições encontradas pelo fungo na natureza. No trabalho de Bhanu *et al*. (2008) o fungo *M. anisopliae* também foi cultivado em FSS, diferindo da maioria dos trabalhos relatados na literatura que são com FSbm como, por exemplo, os trabalhos de Braga *et al*. (1998) para *M. anisopliae*, Fleuri *et al.* (2009) para *Cellulosimicrobium cellulans* e San-Long & Chio (1998) para *Pseudomonas aeruginosa* K-187. A produção de quitinase extracelular em FSbm e FSS foi favorecida quando os isolados foram cultivados em meios adicionados de crisálida. Fica claro, que a secreção de quitinases para o meio externo é maior na presença de indutores.

Ápos a padronização da melhor condição de cultivo para a produção da quitinases em FSbm e FSS, e considerando a importância do complexo enzimático no processo de infecção, os secretomas obtidos dos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae* em FSbm na presença ou na ausência de um indutor foram avaliados inicialmente utilizando eletroforese unidimensional, permitindo

observar algumas diferenças. Diversas proteínas foram secretadas em ambas as situações de cultivo se comparadas aos controles. Algumas das bandas proteicas observadas são comuns entre os secretomas dos isolados, porém em intensidades diferentes entre si, o que reflete o nível de expressão proteico para cada isolado. Bandas proteicas maiores que 72 kDa estão ausentes para os isolados IBCB 360 e IBCB 425. O menor número de bandas proteicas foi observado para o isolado IBCB 360. Em ambas as condições estudadas, ou seja, na presença e na ausência de indutores, houve a secreção de proteínas com massas moleculares inferior a 31 kDa, o que pode indicar a presença de destruxinas ou outros metabólitos secundários. É evidente que quando os isolados foram crescidos em meio de cultivo com crisálida (indutor) observamos maior número bandas proteicas, representando uma maior secreção de proteínas do que na situação de crescimento com glicose. Mesmo assim, os isolados ainda apresentam comportamentos de secreção diferentes entre si, levando a inferir que as diferenças observadas estão relacionadas com os potencias de patogenicidade e virulência de cada um dos isolados. Estas proteínas podem estar relacionadas com o processo de infecção de *M. anisopliae* sobre insetos, sendo que algumas delas podem ser quitinases, uma vez que estas apresentam massa molecular muito diversa como apontado nos trabalhos de Pinto *et al.* (1997), que identificaram uma quitinase de 30 kDa ; Sakai *et al.* (1998) identificaram 3 quitinases de *Bacillus* linhagem MH-1 com massas moleculares de 71 kDa, 62 kDa e 53 kDa. Já Kang *et al.* (1999) verificaram seis quitinases diferentes de *M. anisopliae,* com massas moleculares variando de 30 kDa a 110 kDa. Boa parte das proteínas observadas neste trabalho se encontram na faixa de massa molecular observada por Kang *et al.* (1999).

Baseados nos resultados encontrados em gel de uma dimensão, os secretomas dos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 analisados utilizando

eletroforese bidimensional, que é uma ferramenta mais sensível. Oh *et al*. (2010) utilizaram eletroforese bidimensional para estudar a fase precoce da germinação do conídio de *A. nidulans* e Grinyer *et al.* (2005) utilizaram esta ferramenta na investigação proteômica do fungo *Trichoderma atroviride* desenvolvido sobre parede celular de *Rhizoctonia solani*. A eletroforese bidimensional permite verificar com clareza as proteínas semelhantes ou diferentemente secretadas de acordo com a massa molecular e p*I* de cada uma delas em uma mesma condição ou não. Neste contexto duas análises diferentes foram realizadas, sendo uma para um mesmo isolado em duas condições de cultivo, presença de glicose ou crisálida, e outra entre os diferentes isolados em uma mesma condição de cultivo. Para um mesmo isolado a secreção proteica foi maior quando utilizada crisálida se comparado ao cultivo com glicose.

Murade *et al.* (2008) também investigaram o secretoma de *M. anisopliae* produzido na presença e ausência de exoesqueleto de *Callosobruchus maculates*, utilizando géis bidimensionais. Em seu trabalho foram identificadas várias enzimas, como a metionina gomaliase (p*I* 6,65 e 43 kDa), a proteinase (p*I* 5,99 e 57 kDa), a tripsina (p*I* 5,68 e 26 kDa) e ATPase (p*I* 9,57 e 43 kDa). Nos trabalhos realizados por St-Leger *et al.* (1996a; 1998 e 1999), duas isoformas de tripsina (p*I* 4,4 com 30 kDa e 4,9 com 27 kDa) foram identificadas quando o fungo *M. anisopliae* foi cultivado com o exoesqueleto de barata. Entretanto, quando *M. anisopliae* foi cultivado em meio adicionado de quitina observou-se três isoformas de uma quitina deacetilase (26 kDa , 37 kDa e 70 kDa) (NAHAR *et al.*, 2004). Sendo assim, *M. anisopliae* produz uma diversidade de proteínas que estão relacionadas a patogenicidade. A síntese destas proteínas é influenciada pelo meio indutor utilizado, assim como as enzimas que participam do processo de infecção.

Os isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425, quando considerado o secretoma, apresentam bandas proteicas semelhantes em ambas as condições de cultivo, bem como algumas proteínas exclusivas quando cultivados em EG e em EC. O isolado que secretou o menor número de proteinas, em ambas condições de cultivo, foi o IBCB 425.

Sendo assim, considerando os quatro isolados estudados, optamos por realizar a identificação das proteínas secretadas pelos isolados IBCB 167 (menos virulento) e IBCB 384 (mais virulento), cultivados em meio tendo crisálida (indutor) como fonte de carbono. Diferentes bandas proteicas foram identificadas nos géis bidimensionais e analisadas pelo software Image Master v.7 GE. Foram obtidas, digeridas e analisadas 101 bandas proteicas, sendo identificadas 77 proteínas e apenas 24 não foram identificadas. A não identificação destas proteínas pode estar relacionada a diversos problemas como: i) pequena quantidade de amostra, ii) digestão ineficiente e iii) alteração no espectro de massas, provocado por um erro no aparelho. O número de proteínas identificadas superou o obtido por Murad *et al*. (2008) quando cultivou o fungo *M. anisopliae* em presença de *Callosobruchus maculatus*. Entre as proteínas identificadas, uma diversidade de enzimas relacionadas a vários processos metabólicos foram observadas, como descrito nos trabalhos de Barros *et al*. (2010), Oh *et al*. (2010), Manalil *et al.* (2009) e Murad *et al*. (2008). Desta forma o foco foi apenas identificar qualitativamente as semelhanças ou diferenças entre os isolados estudados, sendo que 28% das proteínas identificadas estão presentes em ambos os isolados.

As proteínas secretadas diferentemente pelos isolados representam pequenas mudanças na via biossintética e secretora decorrente da ativação ou inibição de genes. Interessantemente, não existe uma relação direta vista neste trabalho, entre quantidade

de proteínas secretadas e o potencial de virulência. O isolado IBCB 384 foi o que apresentou o menor número de proteínas exclusivas secretadas, porém, segundo Zappelini (2009), este isolado foi o mais virulento para *D. saccharalis*. Já no trabalho de Loureiro *et al*. (2005) este isolado provocou 98% da mortalidade de *Mahanarva fimbriolata*. Sua eficiência está correlacionada com suas características individuais (carga genética), que certamente sofrem influência do meio ambiente, causando alterações evolutivas correlacionadas com os mecanismos de defesa do hospedeiro (GAO *et al.,* 2011).

Entre as 77 enzimas identificadas e suas isoformas, algumas delas como subtilisin-like serine protease PR1D de *M. anisopliae* foi identificada no trabalho de Santi *et al*. (2009) e Murad *et al*. (2008). A subtilisin-like serine protease PR1 é uma enzima importante no processo de virulência, pois ela catalisa a separação das proteínas conjugadas a quitina, que compõem a cutícula dos insetos (SMALL & BIDOCKA, 2005 e SANTI *et al*. 2009). Murad *et al*. (2008) identificaram as enzimas trypsin-like protease e a oxidoredutase que também foram identificadas neste trabalho. Foi identificado também o domínio WSC, que é um suposto domínio para ligação de carboidratos, composto por oito resíduos de cisteína conservados. Este domínio está presente em *Trichoderma harzianum* na enzima beta-1, 3 exoglucanase, na a proteína SLG1 de leveduras e no fungo *M. anisopliae* (GAO *et al*., 2011). Nos secretomas analisados foram encontradas endonucleases e exonucleases da família das fosfatases. Estas enzimas catalizam a hidrólise dos ácidos nucleicos e participam da replicação e reparo do DNA. A thioredoxin identificada, está envolvida em vários processos biológicos, como a síntese de DNA, defesa antioxidante, modulação da apoptose e resposta immune. Esta proteína também foi detectada no trabalho de proteômica utilizando *M. anisopliae* infectando *Dermolepida albohirtum* (MANALIL *et al*.,

2009). Manosidase e catalase foram também identificadas. A manosidase cataboliza carboibratos, sendo importante para o metabolismo energético do patógeno. Esta enzima foi relatada no trabalho de Brito *et al.* (2011) utilizando *Trichoderma* spp. cultivado em presença de parede celular de *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum.* Já a catalase tem um desempenho importante no sistema detoxificação, desenvolvido durante a infecção do hospedeiro (SREE & PADMA, 2008).

A enzima endo-N-acetyl-β-D-glucosaminidase merece destaque, pois ela é uma das enzimas que pertencem ao complexo quitinolítico e as enzimas deste complexo estão relacionadas a mecanismos de virulência como descrito por Fang *et al.* (2008), Murad *et al*. (2008), Boldo *et al.* (2009) e Santi *et al*. (2009). A endo-N-acetyl-β-D-glucosaminidase identificada apresentou p*I* observado de 7,71 e massa molecular de 28 kDa. Já a endo-N-acetyl-β-D-glucosaminidase produzida por *Stigmatella aurantiaca* DW4 descrita por Bourgerie *et al*. (1994) apresentou massa molecular similar porém o p*I* foi de 6,8. Os resultados obtidos, neste trabalho evidenciam as diferenças presentes entre os isolados, e permitem um melhor entendimento do potencial de patogenicidade destes isolados como descrito por Zappelini (2009) e Loureiro *et al.* (2005), considerando que a patogenicidade está relacionada com a produção de um complexo enzimático. O estudo de proteínas secretadas é interessante e auxilia na elucidação do processo de infecção entre patógeno e hospedeiro do ponto de vista bioquímico, bem como das características de virulência. Sendo possível quantificar e analisar as enzimas importantes para o processo de infecção, permitindo assim, selecionar microrganismos com potencial para controlar diversos insetos-pragas.

Considerando a importância das quitinases no processo de infecção, os extratos brutos contendo estas enzimas produzidas pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 cultivados em FSS, foram submetidos a purificação, uma vez que a maior produção quitinásica foi encontrada neste tipo de fermentação. O processo utilizado neste trabalho foi semelhante ao empregado por Kyoung-Ja *et al.* (2003) para a enzima produzida por *Streptomyces* sp. M-20 aplicando-se extrato enzimático em coluna cromatográfica DEAE-Celulose. No trabalho de Kyoung-Ja *et al.* (2003), o perfil cromatográfico revelou apenas um pico de atividade, diferindo do perfil encontrado por nós para todos os isolados, com a separação do extrato bruto enzimático em dois picos com atividade quitinásica. Os picos II dos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425, que interagiram com a resina, foram eluídos com diferentes concentrações de NaCl, mostrando que elas apresentam diferenças no total global de cargas negativas. Kang *et al.* (1999) estudaram a produção de quitinases por *M. anisopliae* e obtiveram dois picos de atividade quitinásica em DEAE–Sephacel, semelhante ao encontrado neste trabalho. Porém, no estudo desenvolvido por Pinto *et al.* (1997) com o mesmo microrganismo e o mesmo tipo de coluna cromatográfica foi identificado apenas um pico de atividade. Já a quitinase produzida por *P. lilacinus* foi eluída como única forma em coluna DEAE - Sephacel (KHAN *et al*., 2003). Os resultados relatados acima mostram que a espécie *M. anisopliae* apresenta uma grande capacidade de produzir isoformas de quitinases dependendo da condição de cultivo e do isolado. Alguns trabalhos relatam a utilização de DEAE - Sepharose, como descrito por San-long *et al.* (2002) para *B. amyloliquefaciens* V656 e *P. lilacinus*, obtendo-se dois picos de atividade quitinásica, diferindo do resultado encontrado para a quitinase produzida por *Thermomyces lanuginosus* com apenas um pico de atividade quitinásica (GUO RUN – FANG *et al*.,

2008). Assim a diversidade de isoformas e características bioquímicas das quitinases produzidas por vários microrganismos são extensas e intrigantes. O processo de purificação teve continuidade apenas para o isolado IBCB 384, pois este é o isolado mais virulento segundo Zappelini (2009), o que foi confirmado com relação aos estudos de virulência e toxidade apresentados anteriormente na seção de resultados. Portanto, o pico PII384 proveniente de DEAE-Celulose, com maior atividade quitinásica, foi aplicado em Sephadex G-100, obtendo uma única fração quitinásica (SPI). O perfil eletroforético (SDS - PAGE 4-15%) desta fração obtida, evidenciou a presença de várias proteínas com massas moleculares diversificadas, sendo analisadas por eletrospray e posteriormente identicadas no banco de dados NCBI. Algumas das proteínas identificadas nesta fração quando o isolado IBCB 384 foi cultivado em FSS foram semelhantes às encontradas em FSbm. A purificação das quitinases tem sido conduzidas utilizando outras colunas cromatográficas como Sepharose CL 4B 200 (FLEURI *et al.*,2009) e coluna de afinidade "swollen chitin" (DEANE *et al*., 1998), DEAE Sepharose e Pheny1 - Sepharose (GUO *et al.*, 2008). Diferentes massas moleculares têm sido observadas para as quitinases como, por exemplo, 27,5 kDa, 48 kDa, 61 kDa e 110 kDa, descritas nos trabalhos de Deane *et al*. (1998), Kyoung-Ja Kim *et al.* (2003), Guo *et al.* (2008), Fleuri *et al.* (2009) e Guo *et al.* (2004), respectivamente. A não identificação de uma quitinase na fração SPI deve-se provavelmente a baixa concentração da enzima, embora tenha sido observada a atividade quitinásica.

Tendo-se otimizado alguns parâmetros ideais para a produção das quitinases pelos diferentes isolados de *M. anisopliae*, a temperatura de reação para a máxima atividade enzimática extracelular foi obtida a 60ºC para os isolados IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae*, semelhante a temperatura ótima encontrada para a

quitinase secretada por *Bacillus alvei* (SAN-LONG *et al.,* 2001) e diferente da temperatura ótima de 55 ºC encontrada para a enzima de *Thermomyces lanuginosus* SY2 (RUN-FANG *et al*., 2008). Para o isolado IBCB 167 a temperatura ótima de atividade foi de 50ºC, igual a obtida para as quitinases C1 de *O. xanthineolytica* NCIM 2839 (WAGHMARE *et al*., 2010), de *Bacillus cereus* e de *Bacillus spahericus* (SAN-LONG *et al.,* 2001), e a de *Trichoderma harzianum* (DEANE *et al.,* 1998). A temperatura ótima encontrada para o isolado IBCB 167 foi superior a temperatura ótima encontrada para a enzima produzida por *Beauveria bassiana* CG432 (SASSÁ *et al*., 2008) e por *M. anisopliae* (Pinto *et al*., 1997). As quitinases dos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 apresentaram atividade a 30 ºC. A ação de quitinases em temperaturas ambientes, como 30 ºC, é muito relevante, pois esta temperatura é facilmente atingida no ambiente natural, onde são encontrados os fungos entomopatogênicos. Sendo assim, ter quitinases ativas nesta temperatura facilitará o processo de infecção do patógeno sobre o hospedeiro.

As quitinases extracelulares dos isolados estudados não foram estáveis a 70ºC, sendo o mesmo observado no trabalho de Binod *et al*. (2005) para quitinase extracelular produzida por *Penicillium aculeatum* NRRL 2129. Entretanto estas quitinases foram estáveis a 30 ºC e 40 ºC. A quitinase do isolado IBCB 425 foi a mais estável frente as diversas temperaturas testadas. No panorama geral de estabilidade térmica a quitinase mais suscetível e com menor estabilidade térmica foi a do isolado IBCB 360. Estes resultados se assemelham com o encontrado no trabalho de Sassa *et al*. (2008) onde a quitinase produzida por *Beauveria bassiana* foi estável a 45 ºC. Contudo existem três endoquitinases produzidas por *Bacillus* sp. MH-1 que foram estáveis por 10 minutos a 75 ºC (SAKAI *et al.,* 1998), diferindo do resultado encontrado neste trabalho. Para os fungos entomopatogênicos é muito importante ter a

capacidade de produzir e secretar enzimas termoestáveis em uma ampla faixa de temperatura. Pois estes fungos estão presentes em diversos nichos que sofrem com as intempéries climáticas como, por exemplo, a variação da temperatura durante o dia e a noite, e a ausência de enzimas termoestáveis pode causar problemas no desenvolvimento do fungo e problemas na infecção do hospedeiro. Os fungos estudados neste trabalho apresentam esta capacidade.

Os valores de pH ótimo de atividade para as quitinases produzidas pelos isolado IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 do fungo *M. anisopliae* foram coincidentes com aqueles relatados na literatura para outros microrganismos. Em *Streptomyces* sp. M-20 a atividade quitinásica máxima ocorreu em pH 5,0 (KYAUNG-JÁ KIMS *et al*., 2003), sendo o mesmo observado para as quitinases produzidas pelos isolados IBCB 360 e IBCB 425, com excessão para a quitinase do isolado IBCB 167, que foi pH 5,5. Já para o isolado IBCB 384 verifica - se uma faixa de pH ótimo que vai de 4,0 a 5,5, coincidindo com a faixa de pH onde as quitinases são ativas segundo a literatura. As quitinases do microrganismo *B. bassiana* (SASSA *et al*., 2008) apresentaram vários valores ótimos de pH sendo eles 5,5, 6,0 e 8,5 evidenciando que este microrganismo produz isoformas diferentes de quitinase. Já a quitinase secretada por *Bacillus circunlans* 4.1 (WIWAT *et al*., 1999) apresentou pH ótimo de 8,0, diferindo do resultado encontrado em nosso trabalho e no estudo realizado por Park *et al.* (2000) cujo o pH ótimo foi de 6,0. Waghmare *et al.* (2010) verificaram que para as quitinases produzidas por *O. xanthineolytica* a atividade máxima para C1 e C2 foram em pH 7,5 e 8,0, respectivamente. Entretanto, o pH ótimo de atividade quitinásica para *T. harzanium* (DEANE *et al*., 1998) foi de 3,5. Analisando os dados encontrados na literatura, fica evidente que as quitinases, de forma geral, apresentam uma ampla faixa de pH em que são ativas. É interessante

ressaltar que tampões diferentes apresentam forças iônicas diferentes, interferindo na solubilização do substrato e no rearranjo do sítio catalítico da enzima. Por exemplo, o aumento da concentração dos íons constituintes do tampão pode reduzir significativamente a atividade das quitinases (SASSA *et al*., 2008).

Possivelmente, a predominância de cargas negativas na estrutura molecular das quitinases é decisiva para a interação com regiões positivas do substrato quitina nas condições ótimas de pH como observados por Sassa *et al*. (2008). Este fenômeno pode explicar o resultado observado nesta pesquisa para as quitinases produzidas pelos isolados de *M. anisopliae.*

Ainda observando o efeito do pH na atividade quitinásica, as quitinases extracelulares dos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 foram estáveis em diferentes valores de pH por uma hora. As quitinases dos isolados IBCB 360 e IBCB 384 foram estáveis em pH 6,0. O mesmo comportamento foi observado para a quitinase de *Bacillus amyloliquefaciens* V656 (SAN-LONG *et al.*, 2002). A quitinase do isolado IBCB 167 manteve 60% de atividade em pH 5,5, assim como observado por Sassa *et al*. (2008) para a quitinase de *Beauveria bassiana* também foi estável em pH 5,5. A quitinases do isolado IBCB 384 foi completamente estável no pH 7,0. De forma geral, a quitinase do isolado IBCB 425, foi a que se manteve mais ativa nos pH testados. A quitinase produzida por *T. lanuginosus* SY2 manteve sua atividade em uma ampla faixa de pH (3,0 a 9,0) (GUO RUN – FANG *et al*., 2008), semelhante ao encontrado para a quitinase do isolado IBCB 425. É interessante ressaltar que microrganismos que produzem quitinases com atividade e estabilidade em uma ampla faixa de pH, podem aumentar seu potencial de infecção, visto que os microrganismos podem entrar em contato com pH diferentes no interior do corpo do seu hospedeiro, como, por exemplo, nas ordens Orthoptera e Dictyoptera e algumas

famílias de Coleoptera que possuem a porção anterior do intestino médio ácida e a parte posterior neutra ou levemente alcalina. Já em Hemiptera e Hymenoptera o intestino tende a ser ácido. Porém, o conteúdo intestinal é alcalino para a ordem Lepidoptera (TERRA & FERREIRA, 1994).

Quando o *M. anisopliae* entra em contato com o hospedeiro, ele é exposto a pH diferentes, fazendo com que este fungo utilize sua capacidade de regular o pH do meio ou ambiental. Ele realiza esta regulação, produzindo amônia para alcalinizar o meio e proporcionar condições ótimas para atuação de suas enzimas. Entretando a resposta deste fungo ao pH ambiental, leva a reglulação da transcrição de genes que codifcam quitinases e proteases que são fatores de virulência importantes para este fungo (St. Leger *et al*., 1998). Vários fungos filamentosos, incluindo *M. anisopliae* regulam o pH ambiental, que provavelmente está relacionado ao sistema de regulação. Segundo Maccabe *et al*.(1996) e Negrete-Urtasun *et al*.(1997) seis genes participam deste sistema de regulação do pH em *Aspergillus* spp o principal fator de transcrição é o PacC dedo de zinco, um ativador de genes expressos em condição alcalina e um repressor genes expressor em condições ácidas. Sendo assim as quitinases produzidas pelos isolados e analisadas apresentam esta flexibilidade de atividade e estabilidade frente a diferentes valores de pH, garantindo assim o seu potencial de infecção. Em suma, as quitinases dos isolados apresentaram comportamentos bioquímicos diferentes com relação a estabilidade térmica e a estabilidade ao pH.

Com relação a ativação ou inibição das enzimas sabe-se que historicamente que os íons são onipresentes e desempenham importantes funções influenciando as propriedades dos sistemas biológicos. Outro exemplo é o aumento da condutividade da água por várias ordens de grandeza devido a presença de íons. Para as enzimas uma pequena mudança no pH do meio onde se encontram íons gera alterações

cinéticas, além de alterar a sua estrutura terciária tornando - a mais ativa ou inativa. Ainda podem interferir na solubilidade levando a precipitação da enzima, podendo inclusive modificar a carga elétrica global desta molécula (LEHNINGER *et al.*, 2011). Assim as quitinases produzidas pelos isolados de *M. anisopliae* apresentaram comportamentos diferentes frente à presença de sais na reação, sendo inibidas ou ativadas.

A ativação máxima encontrada para as quitinases dos isolados IBCB 167 e IBCB 425 foi na presença de 1mM do sal $BaCl_2$ e $MnCl_2$, respectivamente. Entretanto, não foi encontrada uma ativação significativa para as quitinases dos isolados IBCB 360 e IBCB 384, frente aos sais testados. Deve-se destacar que as quitinases dos isolados de forma geral, não foram inibidas fortemente por β- mercaptoetanol. Todavia ocorreu inibição da atividade quitinásica destes isolados, quando adicionou-se os sais $CuSO_4$, $ZnSO_4$, $Zn(No_3)_2$, $HgCl_2$ e $Pb(C_2H_3O_2)$ na reação enzimática. Sakai *et al.* (1998) e Adrangi *et al.* (2010) verificaram a influência de íons metálicos na atividade quitinásica de *Bacillus* sp. MH-1 e *Massilia timonae* e observaram uma ativação enzimática na presença de Mn^{2+}, como observado por nós. Ainda Sakai *et al.* (1998) verificaram ativação enzimática na presença de $CaCl_2$ que também foi descrita no trabalho de Lee *et al.* (2007) para a quitinase de *Bacillus* sp. Lee *et al.* (2007) relataram os íons Ba^{2+} e Co^{2+} como ativadores da quitinase. Diferindo dos autores acima, Kim *et al.* (2003) observaram ativação enzimática da quitinase produzida por *Streptomyces* sp. M-20 na presença de β - mercaptoetanol. Sendo assim, os íons descritos na literatura como ativadores da quitinase apresentaram - se também como bons ativadores para as quitinases deste trabalho.

A inibição da atividade quitinásica por Zn^{2+}, Cu^{2+}, Hg^{2+} foi relatada para a enzima de *Bacillus* sp. (LEE *et al.*, 2007). Ueno *et al.* (1990), Sakai *et al.* (1998), Kim *et al.*

(2003) e Adrangi *et al.* (2010) também relataram a inibição da quitinase por Hg^{2+}. Novamente observou – se uma similaridade entre resultados encontrados neste trabalho e aqueles já descritos na literatura como inibidores de quitinases. A inibição por Hg^{2+} sugere a presença de grupos thiol no sítio catalítico os quais são importantes para a atividade das enzimas, como citado no trabalho de Guimarães *et al.* (2009) e no trabalho de Kim *et al.* (2003). A ativação observada para as quitinase do isolado IBCB 425 em presença de β- mercaptoetanol também indica a presença de grupos sulfidril no sítio catalítico da enzima e este resultado é reforçado quando observou – se a inibição da atividade enzimática frente ao íon Hg^{2+}. Já o agente quelante EDTA exerceu influência na atividade quitinásica mostrando que os íons metálicos são importantes para atividade enzimática.

Pensando no mecanismo de hidrólise da quitina, é extremamente coerente encontrarmos na natureza uma multiplicidade de quitinases, que estão relacionadas com a necessidade de produzir isoformas com atividades de quitina diacetilase, endo e exoquitinases para hidrolisar totalmente o polímero de quitina (NAHAR *et al*., 2004). Modificações pós-traducionais ocorrem particularmente, pela adição de diferentes tipos e porcentagens de moléculas de carboidratos na cadeia polipeptídica das quitinases (HARMAN *et al*., 1993). Neste contexto, os parâmetros cinéticos das quitinases produzidas em FSS e purificadas foram analisados.

Todas as formas enzimáticas apresentaram comportamento Michaeliano. A quitinase do isolado IBCB 360 foi a que apresentou maior afinidade pelo o substrato 4-nitrofenil-N-Acetil-β-D glucosaminideo. Já quitinase produzida por *Streptomyces* sp. M-20 não hidrolizou o substrato 4-nitrofenil-N-Acetil-β-D glucosaminideo e nem quitobiose (KYOUNG-JA *et al.*, 2003). Pinto *et al*. (1997) também utilizaram o substrato sintético p-nitrofenil-N-diacetilquitobiose, para verificar os parâmetros

cinéticos da quitinase extracelular de *M. anisopliae*, cujo K_m e $V_{máx}$ foram de 0,537 mmoL e 4,86 nmoL.mL^{-1}min^{-1}, respectivamente. Apesar de ser um sustrato síntetico diferente, do utilizado neste trabalho, o valor de K_m foi parecido ao encontrado para a enzima do isolado IBCB 360. A quitinase produzida por *Tenebrio molitor* (TmChi) apresentou baixa atividade para o substrato quitina coloidal e alta espificidade pelo substrato sintético metilumbeliferil-β-N', N'-diacetil-chitobioside, com K_m de 0,0014 (mM) e Kcat de 350 s. A mesma quitinase também apresentou comportamento michaeliano, não sofrendo inibição frente ao produto final N-Acetil-glucosamina, liberado após degradação da quitina e muitas enzimas podem ser inibidas pelos produtos finais das reações enzimáticas (GENTA *et al*., 2006).

Outros trabalhos avaliaram os parâmetros cinéticos das quitinases utilizando quitina coloidal como substrato, como foi apresentado por Guo *et al*. (2004 e 2008) para as enzimas de *Aeromonas schubertii* e *T. lanuginosus* cujos os valores de K_m foram 2,9 mM e 9,56 mg mL^{-1}. Kopparapu *et al*. (2012) descreveram uma quitinase de *Paecilomyces* com K_m de 3,6 mg mL^{-1}, apresentando maior afinidade por quitina coloidal do que a quitinase de *T. lanuginosus.* Analisando os resultados de afinidade pelo substrato obtidos neste trabalho e confrontado com os resultados de afinidade por substratos naturais e sintéticos, como citados acima, é evidente que a patogenicidade e a vilurência não estão relacionadas diretamente a afinidade da enzima pelo substrato, visto que na natureza os microrganimos estão expostos a vários fatores bióticos e abióticos, que favorecem ou não o processo de infecção.

Depois dos estudos de caracterização bioquímica das quitinases secretadas pelos isolados estudados, o pontencial de patogenicidade e toxicidade dos isolados IBCB 384 e IBCB 425 sobre larvas de *G. mellonella*, que é um inseto modelo para estudos de patogênese, foi avaliado (MYLONAKIS, 2008). Os isolados IBCB 384 e IBCB

425 foram escolhidos porque foram os que provocaram as maiores porcentagens de mortalidade da praga *D. saccharalis* de acordo com Zappelini (2009).

O ensaio utilizando aplicação tópica sobre *G. mellonella* permitiu verificar qual dos isolados apresentava maior potencial de atuação na fase de pré-infecção. Nesta fase os fungos entomopatogênicos necessitam produzir enzimas que degradam a cutícula do inseto (FANG *et al*., 2005 ; SHAH *et al*., 2005). Dentro deste contexto, o isolado IBCB 425 de *M. anisopliae* provocou alta mortalidade (100%), com TMS menor (5 dias), evidenciando o seu potencial de pré-infecção. Este resultado difere do encontrado por Zappelini (2009), onde ele utilizou aplição tópica dos isolados IBCB 384 e IBCB 425 pulverizando a suspensão de conídios em Torre de Potter, sobre lagartas de *D. saccharalis* entre o 3º e 4º instar. Neste caso o isolado IBCB 425 apresentou TMS de 10 dias e mortalidade de 62%, não sendo considerado o isolado mais patogênico e virulento. No entanto, é evidente que o isolado IBCB 425 não foi tão eficiente, na fase de pré-infecção sobre *D. saccharalis*, devido à possíveis problemas de adptação do fungo e consequentemente de secreção do complexo enzimático responsável pela degradação da cutícula da larva. Já para o isolado IBCB 384 não foi observado tal dificuldade, pois o TMS encontrado no trabalho de Zappelini (2009) é muito próximo do valor encontrado por nós. A mortalidade das larvas por micose, verificando-se a extrusão dos isolados, foi observada. Assim, concluímos que a mortalidade das larvas realmente foi provocada pelos isolados e que eles não apresentam dificuldades de desenvolvimento micelial no interior do inseto. Resultado semelhante foi verificado no trabalho de Loureiro *et al*. (2005) aplicando os isolados IBCB 384 e IBCB 425 sobre *M. fimbriolata*. Tal dificuldade foi observada nos resultados obtidos no trabalho de Romero (2012) para isolados de *B. bassiana* sobre larvas de *Spodoptera littoralis*, que são endofíticas.

Após verificar o desempenho dos isolados na fase de pré-infecção, a técnica de microinjeção, ou seja, a injeção de conídios ou de extratos enzimáticos brutos produzidos pelos isolados IBCB 384 e IBCB 425, diretamente na hemocele foi avaliada. Assim, os isolados não foram expostos a primeira barreira contra a infecção, que é a cutícula dos insetos, favorecendo a observação do desenvolvimento da fase de infecção propriamente dita. Esta técnica também foi utilizada nos trabalhos de Ortiz-Urquiza *et al*. (2010a, 2010b), Wang *et al*. (2007) e Fan *et al*. (2012). Quando injetados conídios dos isolados IBCB 384 e IBCB 425 em larvas de *G. mellonella*, o desenvolvimento fúngico ocorreu em *in vivo*. Os isolados provocaram mortalidades semelhantes e a diferença entre os valores de TMS não foi significante. No entanto a diferença entre os valores TMS obtidos para os isolados é de aproximadamente 1 dia, o que na prática é muito significante, quando se leva em consideração a ação devastadora de uma praga sobre uma plantação. Baseado neste quadro, o isolado IBCB 425 pode ser considerado mais virulento que o IBCB 384.

Os fungos entomopatogênicos sofrem influência do meio de cultivo ao qual estão expostos. Esta influência é importante porque pode alterar o seu potencial de virulência. A influência do meio de cultivo foi estudada por Ortiz-Urquiza *et al*. (2010a, 2010b) utilizando *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Sendo assim, se faz necessário verificar o crescimento destes isolados *in vitro* e *in vivo*, para que se possa investigar e comparar as produções dos fatores de virulências. Esta comparação também foi realizada no trabalho de Ortiz-Urquiza *et al*. (2010a) e Funguet & Vey (2004) para *B. bassiana*.

A produção dos fatores de virulências *in vivo* presentes no soro da larva, revelou que o SORO-384 foi o mais tóxico por provocar a maior mortalidade, enquanto o isolado IBCB 384 foi o mais virulento por apresentar o menor TMS,

quando comparado com o isolado IBCB 425. Após injeção do soro infectado em larvas sadias, houve melanização na cutícula e na traquéia. A melanização da cutícula foi observada em todas as larvas, porém as larvas apresentaram intensidades diferentes de melanização da cutícula e os tipos de melanização observados, neste trabalho foi semelhante aos tipos de melanização descritos por Fuguet & Vey (2004), quando larvas de *G. mellonela* foram infectadas com conídios injetados. Estas larvas desenvolveram três tipos de melanização cuticular, sendo elas, A, B e C. A melanização tipo A é a mais comum e caracterizada pela formação de pontos negros; a melanização tipo B recebe o nome de leopardo, pois as manchas se assemelham as pintas do leopardo (borda escura e centro claro); e a melanização tipo C é caracterizada por grandes regiões de melanização, que cobrem a maior parte da superfície cuticular (FUGUET & VEY, 2004). Observando a hemolinfa das larvas infectadas pelos isolados IBCB 384 e IBCB 425 foi detectada a presença de corpos hinfais do fungo *M. anisopliae* no período de 72h. Os corpos hifais encontrados neste trabalho são semelhantes aos observados no trabalho de Zhang & Xia (2009) utilizando *M. anisopliae.*

O potencial de virulência e toxicidade dos isolados, foi avaliado também *in vitro*, utilizando o extrato bruto, a fração dialisa e a fração não dialisada dos isolados IBCB 384 e IBCB 425 sobre *G. mellonella* utilizando a microinjeção. O extrato bruto do IBCB 384 provocou alta mortalidade, sendo e o mesmo mais tóxico que o extrato bruto do isolado IBCB 425, mostrando que estes isolados de *M. anisopliae* possuem estratégias diferentes de infecção e virulência, pois até o momento o isolado IBCB 425 destacou – se na fase pré infecçcão.

Outro efeito observado foi a paralisia das larvas logo após ser injetado o extrato bruto do isolado IBCB 425. Este efeito de paralisia também foi observado por

Romero (2012) e Fuguet & Vey (2004) para isolados de *B. bassiana* sobre larvas de *G. mellonella.* Para entender a toxicidade dos extratos brutos e encontrar a molécula responsável por esta toxicidade, submetemos estes extratos a uma diálise, cujo os resultados foram duas frações que receberam o nome de dialisado e não dialisado. Ambas as frações causaram mortalidade das larvas de *G. mellonella* confirmando a presença de moléculas tóxicas nestas frações. A fração dialisada contém moléculas menores que 3,5 kDa. As frações dialisadas de cada isolado foram injetadas em larvas de *G. mellonella,* provocando uma mortalidade de 53 a 58%, sendo a fração mais tóxica. As frações não dialisadas apresentam moléculas maiores que 3,5 kDa de baixa toxicidade, causando baixa mortalidade e valores de TMS maiores, quando comparado com a fração dialisada.

Comparando os resultados encontrados nos ensaios de toxicidade para os isolados IBCB 384 e IBCB 425 de *M. anisopliae* é evidente que a fração dialisada é a mais tóxica, sendo coerente com os trabalhos de Wang *et al*. (2004) e Soledade *et al*. (2002). Nesta fração são encontrados os metabólitos secundários como as destruxinas, que são hexadepsipeptídeos cíclicos, composto por ácido α-hidroxi e cinco resíduos de aminoácidos. O fungo *M. anisopliae* produz uma diversidade de destruxinas, sendo elas as destruxinas A, B, C, D e E. As destruxinas desempenham diversas atividades biológicas como inseticida e fitotóxica, além de causar paralisia tetânica nas larvas, como observado neste trabalho. Na fase de pós - infecção foi investigado o crescimento dos fungos e secreção de compostos tóxicos *in vitro* e *in vivo*. Sendo assim, concluí - se que ambos os isolados foram patogênicos para *G. mellonella*, porém apresentam estratégias de virulência diferentes. Os isolados de *M. anisopliae* são eficientes na fase de infecção, sendo evidente que o isolado IBCB 425 possui uma estratégia de crescimento e o isolado IBCB 384 apresenta uma estratégia tóxica. No

trabalho de Kershaw *et al*. (1999), com isolados de *M. anisopliae*, também foram demonstradas estratégias diferentes de virulências, como as que foram observadas neste trabalho.

Considerando os resultados encontrados para os dois isolados patogênicos, ou seja, IBCB 384 e IBCB 425 segundo Zappelini (2009) e Loureiro *et al*. (2005), as quitinases de ambos, foram tolerantes a várias temperaturas e pH, facilitando a infecção do fungo sobre o inseto. O isolado IBCB 384 pode ser considerado o mais virulento de acordo com as características bioquímicas observadas, corroborando com os resultados encontrados por Zappelini, (2009). Além de produzir uma molécula altamente tóxica, cuja massa molecular é igual ou menor que 3,5 kDa, que possivelmente pode ser um metabólito. Já o isolado IBCB 425 destacou-se na produção de quitinases, lipases e proteases quando cultivado em FSS. Também é o isolado que apresenta o conídio de maior comprimento e a hifa mais larga. Estas características contribuem para o melhor desempenho deste isolado na fase da pré - infecção. Além disso, ambos utilizam estratégias diferentes de infecção e virulência, onde o IBCB 384 utiliza estratégia tóxica e o IBCB 425 utiliza estratégia de crescimento.

6. CONCLUSÃO

Todos os isolados em estudo identificados como *M. anisopliae* var. *anisopliae*, são capazes de produzir quitinases tanto intracelularmente quanto extracelularmente em ambas as formas de cultivo, ou seja, FSbm e FSS. Embora tenham sido caracterizados como uma mesma variedade, diferenças morfológicas entre conídios e hifas foram observadas. O maior produtor de quitinase intracelular é o isolado IBCB 425 e o maior produtor de quitinase extracelular é o isolado IBCB 384. O tempo para obtenção dos maiores níveis enzimáticos variou de 72 h a 216 h. Considerando a FSS, o isolado IBCB 360 é o maior produtor de quitinases, porém o isolado IBCB 425 destaca - se também na produção de lipases e proteases.

Com relação a o secretoma, a maior secreção proteica é obtida na presença de indutor (crisálida), com destaque para o isolado IBCB 425. A maioria das proteínas presentes nos secretomas dos isolados IBCB 167 e IBCB 384, foram identificadas, sendo apenas 28% comuns entre os isolados. Entre elas está a enzima endo-N-acetyl-β-D-glucosaminidase, enzima pertencente ao complexo quitinolítico e relacionada com mecanismos de patogenicidade.

Aparentemente todos os isolados estudados possuem diferentes isoformas de quitinases. A temperatura ótima aparente para as quitinases extracelulares produzidas pelos isolados variou de 50ºC a 60ºC e o pH ótimo de 4,0 a 5,5. Todas as quitinases são estáveis a 30ºC e 40ºC, sendo a quitinase do IBCB 425 a mais estável. A quitinase do isolado IBCB 384 é mais estável frente aos pH testados. A ativação máxima para as quitinases dos isolados IBCB 167 e IBCB 425, é na presença de $BaCl_2$ e $MnCl_2$, respectivamente, enquanto que as quitinases dos isolados IBCB 360 e IBCB 384 não são ativadas. As quitinases estudadas são

tolerantes ao β- mercaptoetanol e inibidas por $CuSO_4$, $ZnSO_4$, $Zn(No_3)_2$, $HgCl_2$ e $Pb(C_2H_3O_2)$. Apresentaram ainda comportamento Michaeliano, sendo a maior afinidade pelo substrato sintético 4-nitrofenil-N-Acetil-β-D glucosaminideo (NP-GlcNAc) observada para a quitinase do isolado IBCB 360.

O isolado IBCB 425 apresenta o melhor desempenho na fase de pré-infecção e o isolado IBCB 384 apresenta o melhor desempenho na de fase pós – infecção, sendo o mais virulento.

Os resultados obtidos para a a carcterização bioquímica da enzima quitinase produzida pelos isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* var. *anisopliae*, cultivados na presença de crisálida, são relevantes e ressalta as diferenças entre eles. A patogenicidade e virulência devem ser estudadas caso a caso, pois muitos fatores interferem no processo de infecção e na relação patógeno/hospedeiro. Os isolados IBCB 167, IBCB 360, IBCB 384 e IBCB 425 do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* apresentam potencial de patogenicidade que deve ser investigado sobre outros hospedeiros.

7. REFERÊNCIAS

AAM, B.B.; HEGGSET, E.B.; NORBERG, A.L.; SORLIE, M. VARUM, K.M. & EIJSINK, V.G. Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine. Mar. Drugs. 8(5): 1482-1517, 2010.

ADAMEK, L. Submersed cultivation of the fungus *Metarhizium anisopliae*. Folia Microbiol. 10: 255-257, 1963.

ADRANGI, S.; FARAMARZI, M.A.; SHAHVERDI, A.R. & SEPEHRIZADEH, Z. Purification and characterization of two extracellular endochitinases from *Massilia timonae*. Carbohydr. Res. 345: 402-407, 2010.

ALCAZAR-FUOLI, L.; CLAVAUD C, LAMARRE C, AIMANIANDA V, SEIDL-SEIBOTH V, MELLADO E, LATGE JP. Functional analysis of the fungal/plant class chitinase family in Aspergillus fumigatus. Fungal Genetics and Biology 48: 418e429, 2011.

ALMEIDA, J.E.M & BATISTA FILHO, A. Banco de microrganismos entomopatogênicos. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. 20: 30-33, 2001.

ALMEIDA, S.R. Apostila de micologia clínica. Faculdade Ciências Farmacêuticas. Universidade São Paulo. Disponível em http://www.portalbrasil.net/downloads/micoses.pdf. Acesso em 31 de janeiro de 2012. 9:57h.

ALVES, S.B. & LOPES, R.B. Controle microbiano de pragas na América Latina: Desafios e Avanços. Piracicaba: FEALQ. 414, 2008.

ALVES, S.B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba: FEALQ. 2.ed. 1163, 1998.

ANDRES, E.; BOER, H.; KOIVULA, A.; SAMAIN, E.; DRIGUEZ, H.; ARMAND, S. & COTTAZ, S. Engineering chitinases for the synthesis of chitinoligosaccharides:

catalytic amino acid mutations convert the GH-family 18 glycoside hydrolases into transglycosylases. J. Mol. Cat. B. Enzymatic. 74: 89-92, 2012.

ANTONINO, N.A. Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundos da industria pesqueira paraibana. Dissertação de Mestrado. UFPB/CCEN. 88p, 2007.

ARAKANE, Y & MUTHUKRISHNAN, S. Insect chitinase and chitinase-like proteins. Cell. Mol. Life Sci. 67: 201-216, 2010.

ARRUDA. W.; LUBECK, I.; SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M.H. Morphologicla alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. Experiment. Appl. Acarol. 37: 231-244, 2005.

BARATTO, C.M.; DUTRA, V.; BOLDO, J.T.; LEIRIA, L.B. VAINSTEIN, M.H. & SCHRANK, A. Isolation, characterization and transcriptional analysis of the chitinase chi2 gene (DQ011663) from the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. Curr. Microbiol. 53 (33): 21-217, 2006.

BARATTO, C.M.; SILVA, M.V.; SANTI, L.; PASSAGLIA, L., SCHRANK, I.S.; VAINSTEIN, M.H. & SCHRANK, A. Expression and characterization of the 42kDa chitinase of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* in *Escherichia coli*. Can. J. Microbiol. 49 (11): 723-726, 2003.

BARRETO, C.C.; STAATS, C.C.; SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M.H. Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* ande effect of N-acetylglucosamine in protein secretion. Curr. Microbiol. 48: 102-107, 2004.

BARROS, B.H.R.; SILVA, S. H.; MARQUES, E.R.; ROSA, J. C. YATSUDA, A.P.; ROBERTS, D.W. & BRAGA, G.U.L. A proteomic approach to identifying proteins differentially expressed in conidia and mycelium of the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum*. Fungal Biol. 14: 572-579, 2010.

BARTHOMEUF, C.; REGERAT, F. & POURRAT, H. Improvement in tannase recovery using enzymatic disruption of mycelium in combination with reverse micellar enzyme extraction. Biotechnol Tech.8: 137 - 142, 1994.

BATTACHARYA, D. NAGPURE, A. & GUPTA, R.K. Bacterial chitinases: properties and potential. Crit. Rev. Biotechnol. 27 (1): 21-28, 2007.

BHANU PRAKASH. G.V.S.; PADMAJA. V. & SIVA KIRAN. R.R. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. Biores. Technol. 99: 1530-1537, 2008.

BINOD, P.; PUSZTAHELYI, T.; NAGY, V.; SANDHYA, C.; SZAK´ACS, G.; P´OCSI, I. & PANDEY, A. Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 under solid-state fermentation. Enzyme Microbial. Technol. 36: 880-887, 2005.

BISCHOFF, J.F.; RELNNER, S.A. & HUMBER, R.A. A multilocus phylogeny of the *Metharizium anisopliae* lineage. Mycologia. 101 (4): 512-530, 2009.

BOER, H.; MINCK, N.; NATUNEN, J.; WOHLFAHRT, G.; SODERLUND, H.; RENKONEN, O. & KOIVULA, A. Differential recognition of animal type β-4galactosylated and α-3-fucosylated chito-oligosaccharides by two family 18 chitinases from *Trichoderma harzianum*. Glycobiology. 14(12): 1303-1313, 2004.

BOGO, M.R.; ROTA, C.A.; PINTO, Jr. H.; CAMPOS, M.; CORREA, C.T.; VAINSTEIN, M.H. & SCHRANK, A. A chitnase encoding gene (chit1 gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full length cDNA. Curr. Microbiol. 37: 1-6, 1998.

BOLDO, J.T.; JUNGES, A.; AMARAL, K.B.; STAATS, C.C.; VAINSTEIN, M.H. & SCHRANK, A. Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae*

affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. Curr. Genet. 55(5): 60-551, 2009.

BORTONE, K.; MOZINGO, A.F.; ERNST, S. & ROBERTUS, J.D. Struture of an allosamidin complex with the *Coccidioides immitis* chitinase defines a role for a second acid residue in substrate assisted mechanism. J. Mol. Biol. 320 (2): 293-302, 2002.

BOURGERIE, S.; KARAMANOS, Y.; GRARD, T. & JULIEN, R. Purification and Characterization of an Endo-N-Acetyl-4-DGlucosaminidase from the Culture Medium of *Stigmatella aurantiaca* DW4. J. Bacteriol. 20 (176): 6170-6174, 1994.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteinedye biding. Anal. Biochem. 72: 248-254, 1976.

BRAGA, G.U.L.; MESSIAS, C.L & VENCOVSKY, R. Estimates of genetic parameters related to chitinase production by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Genet. Mol. Biol. 21: (2) 171-177, 1998.

BRITO, J.P.C.; LOPES, F.A.C. & ULHOA, C. J. Avaliação da atividade de α-manosidase, α -arabinofuranosidase e lipase secretada por isolados de *Trichoderma* spp. em presença de parede celular de *Fusarium solani, Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*. 63º Reunião anual da SBPC. Disponível em http://www.sbpcnet.org.br/livro/63ra/resumos/resumos/4803.htm acesso 13 de fevereiro de 2014, 22:53h.

CASTORIA, R.; CURTIS, F.; LIMA, G.; CAPUTO, L.; PACIFICO, S. & CICCO, V. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. Postharvest Biol. Techonol. 22: 7-17, 2001.

CAZy (Carbohydrate Active Enzyme database). Disponível em http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html acesso 5 de fevereiro de 2012, 10:00h.

CEREIA, M.; TERENZI, H.F.; JORGE, J.A; GREENE, L.J.; ROSA, J.C. & POLIZELI, M.L.T.M. Glucoamylase activity from the thermoplilic fungus *Scytalidium thermophilum*. Biochemical and regulatory properties. J. Basic. Microbiol. 2: 83-92, 2000.

CHANG, W.T.; CHEN. M.C. & WANG, S.L. An antifungal chitinase produced by *Bacillus subtilis* using chitin waste as a carbon source. World. J. Microbiol. Biotechnol. 26: 945-950, 2010.

CHAPMAN, R.J. Integument. The insects: structure and function. Cambridge University Press. 4 ed. 415-440, 1998.

CHARNLEY, A.K. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. in: wicklow dt, soderstrom be (eds) environmental and microbial relationships. (Mycota IV) Springer. Heidelberg. 185-201,1997.

CHEN, C.; HSU, M. & JIANG, S. Purification and characterization of an exo-N,N-diacetylchitobiohydrolase-like enzyme from *Cellulomonas flavigena* NTOU 1. Enzyme. Microb. Technol. 20: 191-197, 1997.

CHEN, C-C.; ASHOK KUMAR, H.G.; KUMAR, S.; TZEAN, S-S. & YEH, K-W. Molecular cloning, characterization, and expression of a chitinase from the entomopathogenic fungus *Paecilomyces javanicus*. Curr. Microbiol. 55: 8-13, 2007.

CHERRYA, A.J.; ABALOB, P. & HELLA, K.A. Laboratory assessment of the potencial of different strains of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo), Vuillemim and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) to control

Callosobruchus maculates (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in stored cowpea. J. Stored. Prod. Res. 41: 295-309, 2005.

COHEN-KUPIEC, R. & CHET, I. The molecular biology of chitin digestion. Curr. Opin. Biotechnol. 9: 270 - 277, 1998.

COUTINHO, H.L.C. Diversidade microbiana e agricultura sustentável. BDT- Base Tropical. Disponível em http://www.bdt.fat.org.Br/publicações/padct/bio/cap9/Heitor.html acesso em 10 setembro. 2009. 14:00h.

DA SILVA, T. Análise comparativa das proteases e quitinases do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*. Na presença de diferentes cutículas de artrópodes. Dissertação de Biologia Celular e Molecular. Centro de Biotecnologia. UFRGS. pp 71, 2006.

DE LAS MERCEDES, M.D.; PINTOR-TORO J.A. & CUBERO, B. Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. Plant. Physiol. 142: 722-730, 2006.

DEANE, E.E.; WHIPPS, J.M.; LYNCH, J.M. & Peberdy, J.F. The purification and characterization of a *Trichoderma harzianum* exochitinase. Biochim. Biophys. Acta.1383: 101-110, 1998.

DIAS. K.B.; SILVA. D.P; FERREIRA, L.A.; FIDELIS, R.R.; COSTA. J.L.; SILVA, A.L.L. & SCHEIDT, G.N. Chitin and chitosan: Characteristics, uses and production current perspectives. J. Biotec. Biodivers. 4 (3): 184-191, 2013.

DRIVER, F.; MILNER, R.J. & TRUEMAN, J.W.H. A taxonomic revision of Metarhizium based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. Mycological Research. 104:134-150, 2000.

DUO-CHUAN, L. Review of fungal chitinases. Mycopathologia. 161:345-360, 2006.

EL-KATANY, M.H.; GUDEL, J.M.; ROBRA, K.H.; ELNAGHY, M.A. & GUBITZ, G.M. Characterization of quitinase and an endo-β-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56: 137-143, 2001.

ESPOSITO, E. & AZEVEDO, J. L. Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Educs. 510p. 2004.

FAN, Y.; ORTIZ-URQUIZA, A.; KUDIA, R.A. & KEYHANI, N. O. A fungal homologue of neuronal calcium sensor-1, Bbcsa1, regulates extracellular acidification and contributes to virulence in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Microbiol. 158: 1843-1851, 2012.

FANG, W.; PEI, Y. & BIDOCHKA, M.J. A regulator of a G protein signalling (RGS) gene cag8 from the insect pathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis. Microbiology 153: 1017-1025, 2007.

FANG, W.; SCULLY, R.L.; ZHANG, L.; PEI, Y.; & BIDOCHKA, M.J. Implication ofa regulator of G protein signaling (BbRGS1) in conidiation and conidial thermotolerance of the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*. FEMS Microbiol. Lett. 279: 146-156, 2008.

FANG, W.; ZHANG, Y.; YANG, X.; ZHENG, X.; DUAN, H.; LI, Y. & PEI, Y. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Beauveria bassiana* using an herbicide resistance gene as a selection marker. J. Invertebr. Pathol. 85(1):18-24, 2004.

FANG, W.G.; LENG, B.; XIAO. Y.H.; JIN. K.; MA, J.C.; FAN, Y.H.; FENG, J.; YANG, X. Y.; ZHANG, Y.J. & PEI, Y. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase

gene Bbchit1 and its application to improve fungal strain virulence. Appl. Environ. Microbiol. 71: 363-370, 2005.

FINNEY, D.J. Probit Analysis. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 1971.

FLEURI, L.F. & SATO, H.H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. Quimica Nova. 28: (5) 871-879, 2005.

FLEURI, L.F.; KAWAGUTI, H.Y & SATO, H.H. Production and application of extracellular chitinase from *Cellulosimicrobium cellulans*. Braz. J. Microbiol. 40: (3) 623-630, 2009.

FRANCESCHINI, M.; GUIMARÃES, A.P.; CAMASSOLA, M.; FRAZZON, A.; BARATTO, C.M.; KOBLER, V.; SILVA, M.V.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; CASTRO, L.; SANTI, L.; VAINSTEIN, M.H. & SCHRANK, A. Biotecnologia aplicada a controle biológico, o entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*. Biotecnologia Ciência Desenvolvimento. 23: 32-37, 2001.

FRANCO, L.O.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, N.P. & CAMPOS-TAKAKI, G.M. Cunninghammellaelegans (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. Revista Analytica. 54: 52-56, 2005.

FUGUET, R. & VEY, A. Comparative analysis of the production of insecticidal and melanizing macromolecules by strains of *Beauveria* spp.: *in vivo* studies. J. Invertebr. Pathol. 85: 152-165, 2004.

GAO, K.; JIN, K.; YING, S.H.; ZHANG, Y.; XIAO, G.; SHANG, Y.; DUAN, Z.; HU, X.; XIE, X.Q.; ZHOU, G.; PENG, G.; LUO, Z.; HUANG, W.; WANG, B.; FANG, W.; WANG, S.; ZHONG, Y.; MA, L. J.; ST. LEGER, R.J.; ZHAO, G.P.; PEI, Y.; FENG, M.G.; XIA, Y. & WANG, C. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and

Metarhizium acridum. PLos. Genet. 7(1): 1001264, 2011. doi: 10.1371/journal.pgen.1001264.

GARDES, M. & BRUNS, T.D. ITS primes with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol. Ecol. 2:113-118, 1993.

GAUMANM, E. Principles of plant infection. London, Corsby Lock & son Ltd. 543p, 1950.

GENTA, F.A.; BLANES,L.; CRISTOFOLETT,P.T.; LAGO, C.L.; TERRA, W.T.& FERREIRA, C. Purification, characterization and molecular cloning of the major chitinase from *Tenebrio molitor* larval midgut. Insect. Biochemistry Molecular Biology. 36: 789-800, 2006.

GIMÉNEZ-PECCI, M.; BOGO, M.R.; SANTI, L.; MORAES, C. K.; CORREA, C.T.; VAINSTEIN, M. H. & SCHRANK, A. Characterization of mycoviruses and analyses of chitinase secretion in the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae.* Curr. Microbiol. 45: 334-339, 2002.

GRINYER, J.; HUNT, S.; MCKAY, M.; HERBERT, B.R.& NEVALAINEN, H. Proteomic response of the biological control fungus *Trichoderma atroviride* to growth on the cell walls of *Rhizoctonia solani*. Curr . Genet. 47: 381-388, 2005.

GRUBER, S. & SEIDL – SEIBOTH. Self vs. non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. Microbiology. 158: 26-34, 2012.

GRUBER, S.; KUBICEK, P. & SEIDL – SEIBOTH, V. Differential regulation of orthologous chitinase genes in mycoparasitic *Trichoderma species*. Appl. Environ. Microbiol. 77 (20): 7217 – 7226, 2011.

GUIMARÃES, L. H. S.; SOMERA, A. F.; TERENZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. & JORGE, J. A. Production of β-fructofuranosidases by *Aspergillus niveus* using

agroindustial residues as carbon sources: Characterization of an intracellular enzyme accumulates in the presence of glucose. Process Biochem. 44: 237-241, 2009.

GUO RUN - FANG, SHI B.S.; LI D. C., MA WEN & WEI Q. Purification and characterization of a novel thermostable chitinase from *Thermomyces lanuginosus* SY2 and cloning of its encoding gene. Agric. Sci. China. 7(12): 1458-1465, 2008.

GUO, S. H.; CHEN, J.K. & LEE, W.C. Purification and characterization of extracellular chitinase from *Aeromonas schubertii*. Enzyme Microb. Tech. 35: 550-556, 2004.

HALASZ, A. & LÁSZTITY, R. Use of yeast biomass in food production. Boca Raton: CRC Press. 312, 1991.

HARMAN, G.E.; HAYES, C.K.; LORITA M.; BRODWAY, R.M.; Di PIETRO, A.; PETERBAUER, C. &TRONSMO, A. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidade and endochitinase. Phytopathology. 83: 313-317, 1993.

HARRIS, R. A. Glossary of surface sculpturing. Entomology of the California Department of Agriculture. 98: 1-34, 1979.

HARTL, L.; ZACH, S. & SEIDL-SEIBOTH, V. Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potencial. App. Microbiol. Biotechnol. 93: 533-543, 2012.

HEIL, M. & BOSTOCK, R.M. Induduced systemic resistance (ISR) agaist pathogens in the context of induced plant defences. Ann. Bot. 89: 503-512, 2002.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. 280, 309-316, 1991.

HU, G. & ST. LEGER, R.J. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. Appl. Environ. Microbiol. 68: 6383-6387, 2002.

HULL, M. E. Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. J. Dairy Sci. 33(11): 881-884, 1947.

JUNGES, A. *Metarhizium anisopliae*: Expressão de proteína tóxica de origem vegetal e análise genômica de quitinases. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular. UFRGS. pp 124, 2010.

KANG, S.C.; PARK, S. & LEE, D.G. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. J. Invertebr. Pathol. 73: 276-281, 1999.

KANG, Z. & BUCHENAUER, H. Immunocytochemical localization of β-1,3-glucanase and chitinase in *Fusarium culmorum*-infected wheat spikes. Physiol. Mol. Plant. 60(3):141-153, 2002.

KASPRZEWSKA, A. Plant chitinases – regulation and function. Cell. Mol. Biol. Lett. 8 (3): 809-824, 2003.

KENJI, S.; AKIRA, Y.; HAJIME, K.; MAMORU, W. & MITSUAKI, M. Purification and characterization of three thermostable endochitinases of a noble *Bacillus* strain, MH-1, solated from chitin-containing compost. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3397-3402, 1998.

KERSHAW, M.J.; BATEMAN, R.; REYNOLDS, S.E. & CHARNLEY, A.K. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. J. Invertebr. Pathol. 74: 213-223, 1999.

KHAN, A.; WILLIAMS, K.; MOLLOY, M.P. & NEVALAINEN, H. Purification and characterization of a serine protease and chitinases from *Paecilomyces lilacinus* and detection of chitinase activity on 2D gels. Prot. Expres. Purif. 32: 210-220, 2003.

KIM, K.J.; YANG, Y. J. & KIM, J. G. Purification and Characterization of Chitinase from *Streptomyces* sp. M-20. J. Biochem. Mol. Biol. 36 (2): 185-189, 2003.

KISHIMOTO, K.; NISHIZAWA,Y.; TABEI, Y.; HIBI, T.; NAKAJIMA, M. & AKUTSU, K. Detailed analysis of rice chitinase gene expression in transgenic cucumber plants showing different levels of disease resistance to gry mold (*Botrytis cinerea*). Plant. Sci. J. 162: 655-662, 2002.

KOPPARAPU, N.K.; ZHOU, P.; ZHANG, S.; YAN, Q. LIU, Z. & JIANG, Z. Purification and characterization of a novel chitinase gene from *Paecilomyces thermophila* expressed in *Escherichia coli*. Carbohydrate Research. 347:155–160, 2012.

KUMAR, V.; PARKHI, V.; KENERLEY, C.M. & RATHORE, K.S. Defense-related gene expression and enzyme activities in transgenic cotton plants expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens* in response to interaction with *Rhizoctonia solani*. Planta. 230 (2): 277-291, 2009.

KYOUNG-JÁ, K.; YONG-JOON, Y. & JONG-GI, K. Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces* sp. M-20. J. Biochem. Mol. Biol. 36 (2): 185-189, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacterophage T4. Nature. 222: 680-685, 1970.

LEE, Y. S.; PARK, H.; YOO, J.S.; CHUNG, S. Y.; LEE, Y. C.; CHO, Y. S.; AHN, S. C.; KIM, C. M. & CHOI, Y. L. Cloning, purification, and characterization of chitinase from *Bacillus* sp. DAU10.1 Bioresour. Technol. 98: 2734-2741, 2007.

LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L. & COX, M.M. Princípios de Bioquímica. United States of América: Sarvier, 4 ed. 225-270, 2000.

LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L. & COX, M.M. Princípios de Bioquímica. United States of América: Sarvier, 5 ed. 54-63, 2011.

LIU, B.L.; KAO, P.N.; TZENG, Y.M. & FENG, K.C. Production of chitinase from *Verticillium lecanii* F091 using submerged fermentation. Enzyme Microb. Technol. 33(4), 410-415, 2003.

LIU, Z.K.; YANG, Q. HU, S.; ZHANG, J.D. & MA, J. Cloning and characterization of a novel chitinase gene (chi 46) from *Chaetomium globosum* and identification of its biological activity. Appl. Microbiol. Biotechnol. 80: 241-252, 2008.

LIU, Z.Y.; LIANG, Z.G.; LIU, A.Y.; YAO, Y.J.; HYDE, K.D. & YU, Z.N. Molecular evidence for telomorph – anamorph connections in Cordyceps based on ITS-5.8s rDNA sequences. Mycol. Res. 106: 1100-1108, 2002.

LORD, J.C. & HOWARD, R.W. A proposed role for the cuticular fatty amides of *Liposcelis Bostrychophila* (psocoptera: Liposcelidae) in preventing adhesion of entomopathogenic fungi with dry-conidia. Mycopathologia. 158:211-217, 2004.

LOUREIRO, E.S.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M. & PESSOA, L.G.A. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra a cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbtiolata* (Stal, 1854) (Hemíptera: Cercopidae) em laboratório. Neotropical Entomology. 34 (5): 791-798, 2005.

LOUREIRO, E.S.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M. & PESSOA, L.G.A. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra a cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbtiolata* (Stal, 1854) (Hemíptera: Cercopidae) em laboratório. Neotropical Entomology. 34 (5): 791-798, 2005.

LOWRY, H.; ROSEHROUGH, N. J.; FARR, L. & RANDALL, R. L. Protein measuremente with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 267-275, 1951.

LU, Y.; YANG, H.; HU, H.; WANG, Y.; RAO, Z. & JIN, C. Mutation of Trp 137 to glutamate completely removes transglycosyl activity associated with the *Aspergillus fumigates* Af ChiB1. Glycoconj. J. 26(5): 525-534, 2009.

LUBECK, I.; ARRUDA, W.; SOUZA, B.K.; STANISÇUASKI, F.; CARLINI, C.R.; SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M.H. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as potential buicontrol agents of the tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* and the cotton stainer *Dysderceus peruvianus*. Fungal Ecology. 1 : 78 – 88, 2008.

MACCABE, A. P.; JOHANNES, P.T.; VAN DEN HOMBERGH, J.T.; ARST, H. N. & VISSER, J. Identification, cloning and analysis of the *Aspergillus niger* gene *pacC*, a wide domain regulatory gene responsive to ambient pH. Mol. Gen. Genet. 250: 367–374, 1996.

MANALIL, N.S.; TE'O, V.S.J. BRAITHWAITE, K.; BRUMBLEY, S.; SAMSON, P. & NEVALAINEN, K.M.H. A proteomic view into infection of greyback canegrubs (*Dermolepida albohirtum*) by *Metarhizium anisopliae.* Curr. Genet. 55: 571-581, 2009.

MARICATO, E. S. O. Desenvolvimento de filmes de quitosana insolúveis em meio ácido com atividade antioxidante. Dissertação de Mestrado em Bioquímica. Departamento de Química. Universidade de Aveiro. 2010.

MATSUI, M. Correlações entre estrutura química, superestrutura macromolecular e morfologia das blendas e redes poliméricas à base de quitina e poliuretano. Tese de Doutorado. Pós-Graduação em Engenharia e Ciências dos materiais. UFPR. pp 119, 2007.

MOCHI, D.A.; MONTEIRO, A.C.; DE BORTOLI, S.A.; DÓRIA, HOS.; BARBOSA, J.C. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Ceratitis capitata* (Wied) (Diptera: Tephritidae) in soil with different pesticides. Neotropical Entomology. 35(3): 382 – 389, 2006.

MORAES, C.K.; SCRANK, A. & VAINSTEIN, M.H. Regulation of extracellular chitinase and proteases in the entomopathogen and acarricide *Metarhizium anisopliae.* Curr. Microbiol. 46: 205-210, 2003.

MURAD, A. M.; NORONHA, E. F.; MILLER, R. N.G.; COSTA, F. T.; PEREIRA, C.D.; MEHTA, A.; CALDAS, R. A. & FRANCO, O. L. Proteomic analysis of *Metarhizium anisopliae* secretion in the presence of the insect pest *Callosobruchus maculates*. Microbiology. 154: 3766-3774, 2008.

MYLONAKIS, E. Galleria mellonella and the study of fungal pathogenesis: making the case for another genetically tractable model host. Mycopathologia. 165: 1-3, 2008.

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. J. Invert. Pathol. 85: 80-88, 2004.

NAMPOOTHIRI, M.K.; BAIJU, T.V.; SANDHYA, C.; SABU, A.; SZAKACS, G. & PANDEY, A. Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. Process. Biochem. 39 (11): 1583-1590, 2004.

NEGRETE-URTASUN, S.; DENISON, S. H. & ARST, H. N. Characterization of the pH signal transduction pathway gene *palA* of *Aspergillus nidulans* and identification of possible homologs. J. Bacteriol. 179:1832–1835, 1997.

NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D. & EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear

background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. Electrophoresis 9: 255-262, 1988.

O´FARREL, P. Z. & GOODMAN, H. M. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. Cell. 12: 1133-1142, 1977.

OH, Y. T.; AHN, C.S.; KIM, J.G.; RO, H. S.; LEE, C. W. & KIM, J.W. Proteomic analysis of early phase of conidia germination in *Aspergillus nidulans*. Fungal Genet. Biol. 47: 246-253, 2010.

OHNO, T.; ARMAND, S.; HATA, T.; NIKAIDOU, N.; HENRISSAT, B.; MITSUTOMI, M. & WATANABE, T. A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037. J. Bacteriol. 178, 5065-5070, 1996.

OLIVEIRA, J.L. Fotodegradação de corantes têxteis e aplicação da quitosana como tratamento terciário destes efluentes. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Química. EUM, 2006.

ORTIZ-URQUIZA, A.; JURADO, I.G.; BORREGO, A. & QUESADA-MORANGA, E. Effects of cultural conditions on fungal biomass, blastospore yields and toxicity of fungal secreted proteins in batch cultures of *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales). Pest Manag. Sci. 66: 725-735, 2010b.

ORTIZ-URQUIZA, A.; RIVEIRO-MIRANDA, L.; SANTIOGO-ÁLVAREZ, C. & QUESADA-MORANGA, E. Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveia bassiana.* J. Invertebr. Pathol. 105: 270-278, 2010 a.

PACCOLA-MEIRELE, L.D. & AZEVEDO, J.L. Variabilidade natural do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana.* Arquivos de Biologia e Tecnologia. 33: 657-672, 1990.

PARIS, S. & FERRON, P. Study of the virulance of some mutants *Beauveria brongniartii (*Syn *Beauveria tenella*). J. Invertebr. Pathol. 34: 133-145, 1979.

PARIS, S. & SEGRETAIN G. Ètude de l' activité lipasique esterasique intracellulaire de *Beauveria tenella.* Ann. Microbiol. 129: 71-77, 1978.

PARK, S.H.; JUNG-HYUN L. & LEE, H.K. Purification and characterization of chitinase from a *Marine Bacterium Vibrio* sp. 98CJ11027. J. Microbiol. 38 (4): 224-229, 2000.

PATEL, B.; GOHEL, V & RAOL. B. Statistical optimisation of medium components for chitinase production by *Paenibacillus sabina* strain JD2. Ann. Microbiol. 57 (4): 589-597. 2007.

PATIL, R. S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V.; Chitinolytic enzymes: an exploration. Enzyme Microb. Technol. 26: 473-483, 2000.

PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C. Produção, propriedades bioquímicas e funcionais do sistema xilanolítico de *Aspergillii* e aplicação biotecnológica no branqueamento da polpa de celulose e em ração animal. Tese de Doutorado em Bioquímica. FMRP/USP, pp 206, 2009.

PELCZAR, M.J.J.; CHAN, E.C.S. & KRIEG, N.R. Microbiologia, Conceitos e Aplicações. vol. 1. Segunda Edição. São Paulo: Markron Books, p. 258-287, 1996.

PEREIRA.; M.F.A.; BENEDETTI.; , R.A.L. & ALMEIDA.; J.E.M. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin no controle de *Deois flavopicta* (stal., 1854), em pastagem de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*). Arq. Inst. Biol. 75 (4): 465-469, 2008.

PERRAKIS, A.; TEWS, I.; DAUTER, Z.; OPPENHEIM, A. B.; CHET, I.; WILSON, K. S. & VORGIAS, C. E. Crystal structure of a bacterial chitinase at 2±3 A/ resolution. Structure. 2: 1169-1180, 1994.

PÉREZ-GUERRA, N.; TORRADO-AGRASAR, A; LÓPEZ-MACIAS, C. & PASTRANA, L. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. Electron. J. Environ. Agric. Food Chem. 2 (3): 343-350, 2003.

PINTO, A.S.; BARRETO, C.C.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. & ULHOA, C.J. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae.* Can. J. Microbiol. 43(4): 322-327, 1997.

POZO, M.J.; CORDIER, C.; DUMAS-GAUDOT, E.; GIANINAZZI, S.; BAREA, J. M. & AZCÓN-AGUILAR, C. Localized *vs* systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. J. Exp. Bot. 53:525-534, 2002.

PRADO, M. R. Isolamento de *Microsporum canis*, *Malassezia* spp. e *Candida tropicalis* em cães: um destaque para teste de sensibilidade de *Malassezia pachydermatis in vitro*. Tese de Mestrado em Ciências Veterinária, Reprodução e Sanidade Animal. UECE. pp 143, 2007.

PUTZKE, J. & PUTZKE, M.T.L. Os reinos dos fungos Volume II-1ª.ed. Santa Cruz do Sul, EDUNISC. 2: 222, 2003.

QUESADA-MORAGA, E. & VEY, A. Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Mycol. Res. 108: 441-452, 2004.

RAEDER, U. & BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Lett. Appl. Microbiol. 1: 17-20, 1985.

REY, M.; DELGADO-JARANA, J. & BENÍTEZ, T. Improved antifungal activity of a mutant of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 which produces more extracellular proteins. Appl. Microbiol. Biotech. 55(5): 8-604, 2001.

RODRIGUES, M.I. & LEMMA, A.F. Planejamento de Experimentos & Otimização de Processos. United States of América: Sarvier, 2 ed. 1 - 6, 2009.

ROMERO, G.A.R. Selection of entomopathogenic fungi isolates (Ascomycota: Hypocreales) for the control of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) based on their virulence and activity of their extracts. Dissertação de Mestrado em Produção, Proteção e Melhora Vegetal. Universidade de Córdoba. 2012.

RUN-FANG, G.; BAO-SHENG, S.; DUO-CHUAN, L.; WEN, M. & QING, W. Purification and characterization of a novel thermostable chitinase from *Thermomyces-lanuginosus* SY2 and cloning of its encoding gene. Agric. Sci. China. 7 (12): 1458-1465, 2008.

SAKAI, K.; YOKOTA, A.; KUROKAWA, H.; WAKAYAMA, M. & MORIGUCHI, M. Purification and characterization of tree thermostable endochitinases of a noble *Bacillus strain* MH-1 isolated from chitin-cantaining compost. App. Environ. Microbiol. 64: 3397–3402, 1998.

SAN-LONG, W. & CHIO, S.H. Reversible immobilization of chitinase via coupling to veversibly soluble polymer. Enzyme Microb. Technol. 22: 634-640, 1998.

SAN-LONG, W. & JAU- REN, H. Microbial reclamation of shellfish waster for the production of chitinases. Enzyme Microb. Technol. 28: 376-382, 2001.

SAN-LONG, W.; SHIH, ING-LUNG.; LIANG, TZE-WUN. & WANG, CHI-HAU. Purification and characterization of two antifungal chitinases extracellularly produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a shrimp and crab shell powder medium. J. Agric. Food Chem. 50: 2241-2248, 2002.

SANTI, L.; DA SILVA, W.O.B.; PINTO, A.F.M.; SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M.H. Differential immunoproteomics enables identification of *Metarhizium*

anisopliae proteins related to Rhipicephalus microplus infection Research Microbiol.160: 824-828, 2009.

SASSÁ, D.C.; VARÉA-PEREIRA, G.; MIYAGUI, D.T. & NEVES, P.M.O.J. Avaliação de parâmetros cinéticos de quitinases produzidas por *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Semana: Ciências Agrárias, Londrina. 29: (4) 807-814, 2008.

SCHRANK, A & VAINSTEIN, M.H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. Toxicon. 56: 1267-1274, 2010.

SEIDL, V. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. Fungal Biol. Rev. 22: 36-42, 2008.

SEIDL, V.; HUEMER, B.; SEIBOTH, B. & KUBICEK, C. P. A complete survey of *Trichoderma chitinases* reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. FEBS. Journal. 272: 5923-5939, 2005.

SHAFIQ, K.; SIKAND, A. & LKRAM, H. Effect of Different Mineral Nutrients on Invertase Production by *Sacharomyces ceresiae* GCB-K5. Biotechnol. 1 (1): 40-44, 2002.

SHAH, F.A.; WANG, C.S.; BUTT, T.M. Nutrition influences growth ande virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. FERMS. Microbiol. Lett. 251: 259-266, 2005.

SHAH, P.A & PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. Appl. Microbiol. Biotechnol. 61: 413-423, 2003.

SILVA, M.V.; SANTI, L.; SAATS, C.C.; COSTA, A.M.; COLODEL, E.M.; DRIEMEIER, D.; VAINSTEIN, M.H. & SCHRANK, A. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the chi3 gene. Res. Microbiol. 156 (3): 382-392, 2005.

SMALL, C.L.N. & BIDOCHKA, M.J. Up-regulation of Pr1, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. Mycol. Res. 109:307-313, 2005.

SOLEDADE, M.CP.; ZAHARIA, L.I. & WARD, D.E. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. Phytochem. 59: 579-596, 2002.

SÓSA-GÓMEZ, D.R.; ALVES, S.B.; MILANI, M.T. Characterization and phenetic analysis of geographical isolates of *Beauveria* spp. Pesq. Agropec. Bras. 29 (3): 401-409, 1994.

SÓSA–GOMEZ, D.R.; TIGANO, M.S. & ARANTES, O.M.N. Caracterização de entomopatógenos. In: S.B. Alves (ed.), Controle Microbiano de insetos. Piracicaba, FEALQ. 731-764. 1998.

SOUFRAMANIEN, I.; JOSHI, A.; GOPALAKRISHNA, T. Intraspecific variation in the internal transcribed spacer region of de rDNA in Black gram *Vigna mungo* L. Hepper. Cur. Sci. 85: 798-802, 2003.

SPIN–NETO, R., PAVONE, C. FRESITAS, R.M.; MARCANTONIO, R.A.C & MARCANTONIO-JÚNIOR, E. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica. Revista de Odontologia da UNESP. 37: 155-161, 2008.

SREE, K.S. & PADMA, J.A.V. Destruxin from *Metarhizium anisopliae* induces oxidative stress effecting larval mortality of the poyphagous pest *Spodoptera litura.* J. Appl. Entomol. 132:68-78, 2008.

St. LEGER, R. J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J. & ROBERTS, D.W. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93(13): 6349-6354, 1996c.

St. LEGER, R. J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; RIZZO, N. W.; ROBERTS, D.W. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae, M. flavoviride* and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. Appl. Environ. Microbiol. 62 (3): 907-912, 1996b.

ST. LEGER, R.J.; CHARNLEY, A.K. & COOPER, R.M. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. J. Invertebr. Pathol. 47: 295-302, 1986.

ST. LEGER, R.J.; COOPER, R.M. & CHARNLEY, A.K. Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. J. Invertebr. Pathol. 58: 415–426, 1991.

ST. LEGER, R.J.; DURRANDS, P.K.; COOPER, R.M. & CHARNLEY, A.K. Regulation of production of proteolytic enzymes by entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Arch. Microbiol. 150: 413-416, 1988.

ST-LEGER, R. J.; JOSHI, L. & ROBERTS, D. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. Appl. Environ. Microbiol. 64: 709-713, 1998.

ST-LEGER, R. J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; RIZZO, N. W. & ROBERTS, D. W. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. Appl. Environ. Microbiol**.** 62: 1257-1264, 1996a.

ST-LEGER, R. J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; RIZZO, N. W. & ROBERTS, D. W. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. Appl. Environ. Microbiol**.** 62: 1257-1264, 1996a.

ST-LEGER, R. J.; NELSON, J. O. E SCREEN, S. E. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. Microbiology. 145: 2691-2699, 1999.

SUBROTO, T.; SUFIOTI, S. & BEINTEMA, J.J. Papaya (*Carica papya*) lysozyme is a member of family 19 (basic, class II) quitinases. J. Mol. Evol. 49: 819-821, 1999.

SURESH. P.V. & CHANDRASEKARAN. M. Impact of process parameters on chitinase production by an alkalophilic marine *Beauveria bassiana* in solid state fermentation. Process Biochem. 34: 257–267, 1999.

TEIXEIRA, V.M.; SÁ LAN & ROCHA, V.F. Utilização de microrganismos entomopatogênicos no controle biologic da cigarrinha – das – pastagens (Homoptera: Cercopidae) no território portal da Amazônia. Anasi de Eventos da UFSCAR. 3: 1210 - 1211, 2007.

TERRA, W.R. & FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartimentalization and function. Comp. Biochem. Physiol. 109b: 1-62, 1994.

TERWISSCHA VAN SCHELTINGA, A.C.; HENNIG, M. & DIJKSTRA, B.W. The 1.8 Å resolution structure of hevamine, a plant chitinase/lysozyme, and analysis of the conserved sequence and structure motifs of glycosyl hydrolase family 18. J. Mol. Biol. 262 (2): 243-257, (1996).

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. v. 22: n 22, p. 4673-4680, 1994.

THRONE, J.E.; WEAVER, D.K.; CHEW, V. & BAKER, J.E.; Probit analysis of correlated data – multiple observations over time at one concentration. J. Econ. Entomol. 88: 1510-1512, 1995.

UENO, H.; MIYASHITA, K.; SWADA, Y. & OBA, Y. Purification and some properties of extracellular chitinase from *Streptomyces* sp. S-84. J. Gen. Appl. Miciobiol. 36: 377-392. 1990.

URQUHART, E. J. & PUNJA, Z.K. Hydrolytic enzymes and antifungal compounds produced by *Tilletiopsis* species, phyllosphere yeasts that are anatagonists of powdery mildew fungi. Can. J. Microbiol. 48: 219, 2002.

VAN AALTEN, D. M. F.; KOMANDER, D.; SYSTAND, B.; GASEIDNES, S.; PETER, M. G. & EIJSINK, V. G. H. Structural insights intothe catalytic mechanism of a family 18 exochitinase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98 (16): 8979-8984, 2001.

VEY, A.; HOAGLAND, R. & BUTT, T.M. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: Butt, T.M.; Jackson, C.W.; Magan, N. (Eds.) Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential. CABI, Wallingford, UK, pp. 311-345, 2001.

WAGHMARE, S.R. & GHOSH, J.S. Study of thermostable chitinases from *Oerskovia xanthineolytica* NCIM 2839. Appl. Microbiol. Biotechnol. 86 (6): 1849-1856, 2010.

WANG, C.; CAO, Y.; WANG, Z.; YIN, Y.; PENG, G.; LI, Z.; ZHAO, H. & XIA, Y. Differentially-expressed glycoproteins in *Locusta migratoria* hemolymph infected with *Metarhizium anisopliae.* J. Invertebr. Pathol. 96: 230-236, 2007.

WANG, C.; SKROBEK, A. & BUTT, T.M. Investigations on the destruxin production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. J. Invertebr. Pathol. 85: 168-174, 2004.

WATTANALAI, R.& WIWAT, C. Chitinase gene of the dimorphic mycopathogen *Nomuraea rileyi*. J. Invertebr. Pathol. 85: 54-57, 2004.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S. & TAYLOR, J. Amplification ande direct sequencing od fugal ribosomal RNS genes for phylogenetics. PCR Protocols: A guide to methods and applications. Acadenic Press. 351-322, 1990.

WIWAT, C.; SIWAYAPRAHM, P. & BHUMIRATANA, A. Purification and characterization of chitinase from *Bacillus circulans.* Curr. Microbiol. 39(3): 40-134. 1999.

WRAIGHT, S.P & BRADLEY, C.A. Production, formulation and application technologies for use of entomopathogenic fungi to control field crop pests. In: Simpósio de controle biologico, 5. Foz do Iguaçu. Anais: Universidade Federal de Lavras. 170-177, 1996.

XIAO, G.; YING, S.H.; ZHENG, P.; WANG, Z.L.; ZHANG, S.; XIE, X.Q.; SHANG, Y.; ST LEGER, R.J.; ZHAO, G.P.; WANG, C. & FENG, M.G. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. Science Reports 2: 483, 2012.

ZAPPELINI, L.O. Seleção de isolados dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* visando o controle da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Dissertação de Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e ambiental no Agronegócio. Instituto Biológico. pp 50, 2009.

ZHANG, C.& XIA, Y. Identification of genes diferentially expressed in vivo by *Metarhizium anisopliae* in the hemolymph of *Locusta migratoria* using suppression-subtractive hybridization Curr Genet. 55: 399-407, 2009.

ZHANG, Z. & YUEN, G. Y. Biological control of *Bipolaris sorakiniana* on tall fescue by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3. Phytopathology. 89: 817-822, 1999.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. Biocontrol Sci. Technol. 17: 553-596, 2007.

ANEXO ARTIGO CIÊNTÍFICO:

Optimization of the Chitinase Production by Different Metarhizium anisopliae Strains under Solid-State Fermentation with Silkworm Chrysalis as Substrate Using CCRD

Advances in Microbiology, 2012, 2, 268-276
doi:10.4236/aim.2012.23032 Published Online September 2012 (http://www.SciRP.org/journal/aim)

Optimization of the Chitinase Production by Different *Metarhizium anisopliae* Strains under Solid-State Fermentation with Silkworm Chrysalis as Substrate Using CCRD

Cynthia Barbosa Rustiguel, João Atílio Jorge, Luis Henrique Souza Guimarães*
Department of Biology, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil
Email: *lhguimaraes@ffclrp.usp.br

Received April 20, 2012; revised May 30, 2012; accepted June 7, 2012

ABSTRACT

Entomopathogenic fungi, such as *Metarhizium anisopliae*, are able to control various insect pests. These fungi attack the integument of the host using an enzymatic complex. Among the enzymes found in this complex, chitinase is an important component. However, the relation between the chitinase production and the virulence from different *M. anisopliae* strains has not been analyzed. In this manuscript it is presented the chitinase production by four *M. anisopliae* strains with different potential of virulence in Solid-State Fermentation using silkworm chrysalis as substrate. The higher chitinase level was obtained with the strain IBCB 360 (7.14 U/g of substrate) with potential virulence of 68% on *Diatrea saccharalis*. The enzyme production was optimized for all strains using a factorial planning (CCRD) considering the cultivation time and medium humidity as independent variables. The maximal production of chitinase was obtained at a range from 8 to 12-days old cultures and from 45% to 62% of moisture according to the surface response plot, with high R^2 value. The enzyme production by the strain IBCB 167 was increased two-folds under optimized conditions, while for the strains IBCB 360 and 425 the chitinase production was increased four-folds and nine-folds for the strain IBCB 384.

Keywords: Entomopathogenic Fungus; *Metarhizium anisopliae*; Chitinase; Solid-State Fermentation

1. Introduction

The entomopathogenic fungi are pathogens with a broad-spectrum of action which are able to attack insects that live in different ecological niches in different stages of development. Most of these species are specialized in penetrating the tegument [1]. The interaction between pathogen and host is influenced by different factors such as enzymes production, environment temperature and humidity, light and ultraviolet radiation, as well as by nutritional conditions and host susceptibility. Thus, the complete cycle of infection involves the sequential stages of adhesion, germination, appressorium formation, formation of staple penetration, penetration, colonization and reproduction of the pathogen in the insect [1]. Enzymes play an important role during the penetration of the fungus in the host, especially during adhesion and germination which occurs at the germ tube formation, releasing enzymes that degrade the cuticle of the insect as, for example, proteases and chitinases, among others [2]. Some studies have discussed the relation between the production of enzymes with pathogenicity and virulence [3-5]. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is a deuteromycete from Monoliaceae family widely distributed in the nature that can be easily found in the soil. This fungus has been studied due to its ability to control insect pests [1,6,7]. Zappelini (2009) [8] analyzed different strains of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *M. anisopliae* to verify their potential of infection and mortality on *Diatrea saccharalis* and it was observed that the virulence from each one of the 27 *M. anisopliae* strains analyzed was variable. The strain IBCB 167, for example, was able to kill around 55% of *D. saccharalis* while the strains IBCB 360, IBCB384 and IBCB 425 showed a mortality power of 68% - 90%. These different values can be attributed to the enzymatic complex associated to the virulence, including chitinase.

Chitinases (EC 3.2.1.14) are enzymes widely spread in nature that can be found in a great diversity of organisms, with special attention to the filamentous fungi. Chitinase catalyzes the hydrolysis of chitin, an insoluble linear

*Corresponding author.

Copyright © 2012 SciRes.

molecule constituted by N-acetyl glucosamine units linked by β-1, 4 (GlcNAc) linking [9] found in insect cuticle. The complete hydrolysis of chitin occurs through a chitinolytic system which acts synergistically and consecutively [10]. Chitinases are divided into two main classes, the endochitinases and the exochitinases. The endochitinases cleave chitin at random sites within the polymer, releasing chito-oligosaccharides (chitotetraose, chitotriose). The exochitinases cleave chitin from its non-reducing end, releasing dimers $(GlcNAc)_2$ [11,12]. These enzymes have multiple biological roles as, for example, in the infection of insects by entomopathogenic fungi. According to Boldo *et al*. (2009) [5], *M. anisopliae* produces different chitinases related to the infection process on the host. However, the relation between the level of chitinase production by different strains of *M. anisopliae* and their virulence has not been analyzed. Hence, this manuscript presents the production of chitinase by the strains IBCB 167, IBCB 360, IBCB384 and IBCB 425 from *M. anisopliae* with different virulence potential and the optimization of enzyme production by factorial design (CCRD).

2. Material and Methods

2.1. Microorganisms

Four different strains (IBCB 167, 360, 384 and 425) from *M. anisopliae* classified according to their virulence potential and deposited in the Collection of Entomopathogenic Microorganisms "Oldemar Cardim Abreu" from the Laboratory of Biological Control, Biological Institute of Campinas, São Paulo, Brazil were used. The strains were maintained on PDA (potato dextrose agar) slants and stored at 4˚C in refrigerator. Spores from 15 days-old cultures were used to obtain new cultures, which were initially maintained at 25˚C for 7 days and then stored at 4˚C.

2.2. Obtainment of Cultures under Solid-State Fermentation (SSF) and Crude Extract

The cultures under SSF were obtained by inoculating of 1 mL of a spore suspension (10^5 spores/mL) on 4 g of crushed dry chrysalis from silkworm (BRATAC S.A., Brazil) (**Figure 1**) as substrate/carbon source moistened with tap water, yeast extract solution (1% m/V), SR salt solution [20×] [13] or Khanna salt solution [14], previously autoclaved at 120˚C, 1.5 atm for 30 minutes. The cultures were maintained in a stove at 26˚C for different periods (96 - 312 hours) with relative humidity around 76% monitored by a thermo hygrometer.

After incubation, the cultures were added with 50 mL of cold distilled water previously autoclaved in the same conditions cited above, maintained under agitation for 1 h and harvested by gauze using Whatman paper No.1. The free cell filtrate, identified as extracellular crude extract, was dialyzed against distilled water at 4˚C overnight and used for chitinase activity determination.

(a) (b)

Figure 1. Pictures from intact chrysalis (a) and triturated chrysalis (b) from silkworm used as substrate for chitinase production by different strains from *M. anisopliae* under SSF.

2.3. Determination of the Chitinase Activity

The determination of the chitinase activity was accomplished using 1 mM of the synthetic substrate 4-Nitrophenyl N-acetyl-β-D glucosaminide (Sigma®) in 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0. The reaction was performed using 200 µL of the substrate solution and 200 µL of the enzymatic sample. After incubation at 60˚C, the reaction was stopped at different time intervals by adding 1 mL of 1 M NaOH. All experiments were performed in triplicate. The *p*-nitrophenolate released was quantified at λ = 405 nm in a spectrophotometer. One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme required to hydrolyze 1 µmol of substrate per minute under the assay conditions.

2.4. Optimization of the Enzyme Production

The optimization of enzyme production for all *M. anisopliae* strains under SSF was carried out using a factorial design (2^2) (CCRD), where the independent variables were the time of growth (X) and humidity (Y). These parameters were chosen because the microbial growth and, consequently, the enzyme production are drastically influenced by the culture conditions, including water activity and cultivation time, among others. The temperature was maintained at 26˚C since the influence of this variable is a well characterized parameter for *M. anisopliae* growth. Three repetitions were performed at the central points (0) and two outer points (–1.41, +1.41) were considered, totalizing 11 trials (**Table 1**). The results were subjected to analysis of variance (ANOVA) with *p* values of 0.05 and 0.1 using the software Statis-

Copyright © 2012 SciRes.

tica 8.0 (Stat Soft). Values lower than the *p* values fixed were considered statistically significant. The Pareto charts and surface response graphs were obtained using the same software. The equations that describe de model for the influence of each independent variable on the enzymatic production were obtained using the same software and validated by the experimental results using the best conditions of cultivation time (9 days-old cultures) and humidity (48%).

3. Results and Discussion

3.1. Influence of Salt Solution on the Enzyme Production in SSF

The availability of the nutrients and salts is an important factor to the growth of microorganisms and, consequently to the enzyme production. In **Table 2**, the influence of different salt solutions (tap water, yeast extract solution, SR and Khanna salt solutions) on chitinase production under SSF by *M. anisopliae* strains can be observed. Higher levels of chitinase were obtained when the substrate silkworm chrysalis was moistened with yeast extract (1%) at the ratio 1.3:1 (m/V) for the strains IBCB 167, 360 and 425, differing than that observed for the strain IBCB 384 with best enzyme production when the substrate was moistened with Khanna salt solution (1.3:1 m/V). The solution of yeast extract has soluble proteins, amino acids, biotin and it is rich in B complex vitamins [15]. Amino acids are absorbed and utilized in cellular metabolism, while the vitamins are important as growth promoter and as co-enzymes [16]. These compounds present in the yeast extract solution as well as the composition of Khanna salt solution are able to supply some nutritional necessity that can not be efficiently supplied by the other solutions analyzed. In addition, the enzymatic production by IBCB 167 strain in the best condition was higher than that observed for the other strains also in the best conditions, regarding 5.3-folds higher if compared to the IBCB 384 strain.

Table 1. Encoded and real values for both independent variables time of growth and medium humidity used for factorial design (CCRD) to evaluate the chitinase production by four strains of *M. anisopliae* under SSF using silkworm chrysalis as substrate.

	Encoded values	–1.41	–1.0	0	+1.0	+1.41
Real values	Time of growth (days)	4	5	9	12	13
	Medium humidity (%)	23	30	48	65	72

The encoded axial points were calculated using $(2^k)^{1/4}$, where k is the number of independent variables in the study.

Table 2. Influence of different salt solutions, tap water and solution of yeast extract in the production of chitinases by different isolates of the fungus *M. anisopliae* in SSF.

Extracellular chitinase activity (U/g substrate)				
Solution	167	360	384	425
Tap water	0.73 ± 0.01	0.87 ± 0.01	0.35 ± 0.01	1.09 ± 0.01
Yeast extract solution	2.42 ± 0.05	1.76 ± 0.03	0.30 ± 0.01	1.33 ± 0.01
SR salt solution	0.63 ± 0.01	0.71 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.84 ± 0.01
Khanna salt solution	0.62 ± 0.01	0.72 ± 0.01	0.46 ± 0.01	0.85 ± 0.00

The cultures were kept at 26˚C with relative humidity of around 76% for a period of 168 hours.

3.2. Optimization of Enzyme Production by CCRD

The experimental design is an important tool to analyze the enzyme production under different culture conditions, such as SSF, allowing to study the interaction of the independent variables. Bhanu *et al*. (2008) [17] used the factorial design to evaluate the effect of pH, yeast extract and mixtures of carbon sources on the production of conidia by *M. anisopliae*. Patel *et al*. (2007) [18] used a Plackett-Burman with eight independent variables for chitinase production by *Paenibacillus sabina* JD2. The influence of other parameters can also be evaluated as for example the cultivation period and the humidity in SSF. These parameters are determinant for fungal development and, consequently, for the enzyme production. There is an optimal range of water activity for microbial growth that should be analyzed for each species. According to **Table 3**, the influence of the independent variables growth' time and medium humidity on chitinase production by all four strains of *M. anisopliae* was analyzed using a 2nd-order planning. Both variables showed a positive effect on the production of extracellular chitinase for all strains (IBCB 167, 360, 384 and 425), regarding an increase in the enzymatic levels. The Pareto chart for the enzyme production by the strain IBCB 167 shows that the linear variable time of growth has a positive effect on the enzyme production, but very long periods of time already have a negative effect. The linear variable moisture shows that the addition of tap water is favorable for chitinase production, but too much water turns the production into negative. The interaction between these variables was not significant (**Figure 2(a)**). The CCRD performed for each strain was statistically significant with the F-value calculated higher than the F-value tabulated. The coefficient of determination (R^2), that explains the proportion of variation related to the total variation of responses, obtained with the CCRD for each strain was close to 1. The R^2 obtained for the strain IBCB 167 was 0.87 (**Table 4**), with *p* value fixed at 0.1,

what allows the obtainment of the response surface plot (**Figure 2(b)**) and the equation that describes the model (Equation 1), where Z is the enzyme activity (U/g of substrate), x is the variable time of growth and y is the variable humidity.

$$Z = 5.36 + 1.63x - 1.34x^2 + 1.09y - 1.88y^2 \quad (1)$$

Considering the strain IBCB 360, the R^2 value was 0.89 with *p*-value fixed at 0.1, and all variables (linear and quadratic mode) as well as the interaction between them were significant (**Table 5**). The respective Pareto chart (**Figure 3(a)**) shows that the linear variable time of growth has a positive effect on the production of chitinase, but a very long time has a negative effect as showed by the quadratic interaction. In addition, the linear variable moisture shows that the addition of tap water is favorable for chitinase production, but the excess of water becomes unfavorable. The interaction between both variables had a negative effect. The F-value calculated was four-times higher than the F-value tabulated, allowing the obtainment of the response surface plot (**Figure 3(b)**) and the equation that describes the model

Table 3. Total extracellular chitinase activity produced by isolates 360, 384 and 425 *M. anisopliae* cultured in SSF through the CCRD.

	Coded values		Real values		Chitinase activity (U/g substrate)			
Treatments	**Time growth X**	**Humidity Y**	**Time growth**	**Humidity %**	**167**	**360**	**384**	**425**
1	–1.00	–1.00	5	30	0.00	0.00	0.00	0.04
2	1.00	–1.00	12	30	1.27	7.36	1.63	1.45
3	–1.00	1.00	5	65	1.14	3.90	0.72	4.26
4	1.00	1.00	12	65	3.49	4.68	2.81	6.27
5	0.00	0.00	9	48	5.38	6.18	4.60	6.38
6	0.00	0.00	9	48	5.10	7.23	3.63	6.02
7	0.00	0.00	9	48	5.59	6.96	4.51	5.84
8	–1.41	0.00	4	48	0.05	0.66	0.43	1.50
9	1.41	0.00	13	48	6.70	6.12	2.18	4.50
10	0.00	–1.41	9	23	0.40	0.33	0.44	0.55
11	0.00	1.41	9	72	4.17	6.98	1.29	3.29

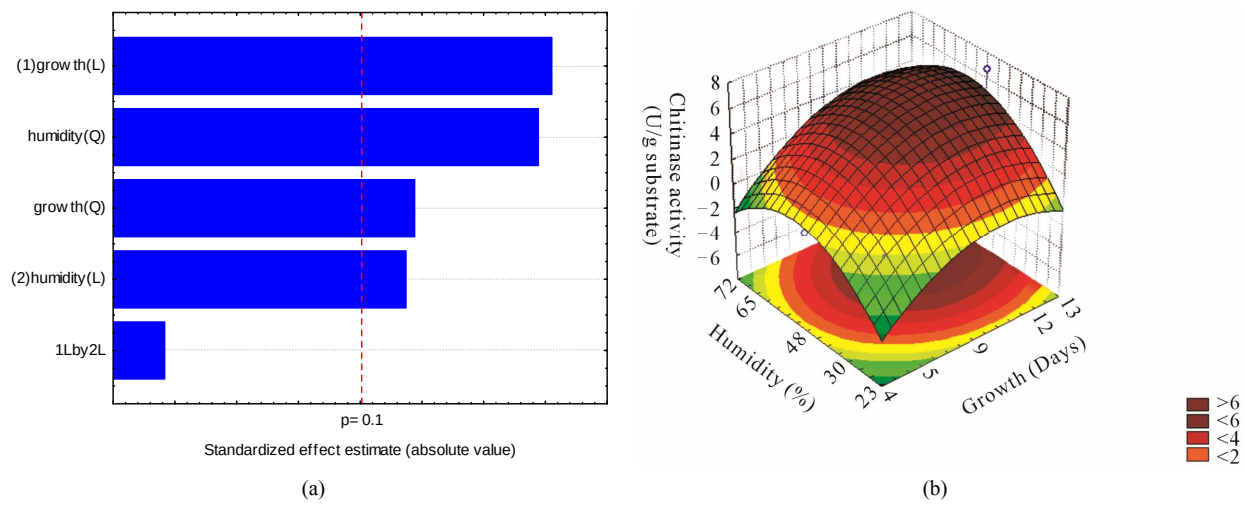


Figure 2. Pareto chart (a) and response surface plot (b) of the factorial design for the influence of the independent variable time of growth and humidity on chitinase production by *M. anisopliae* IBCB 167 under SSF using silkworm chrysalis as substrate.

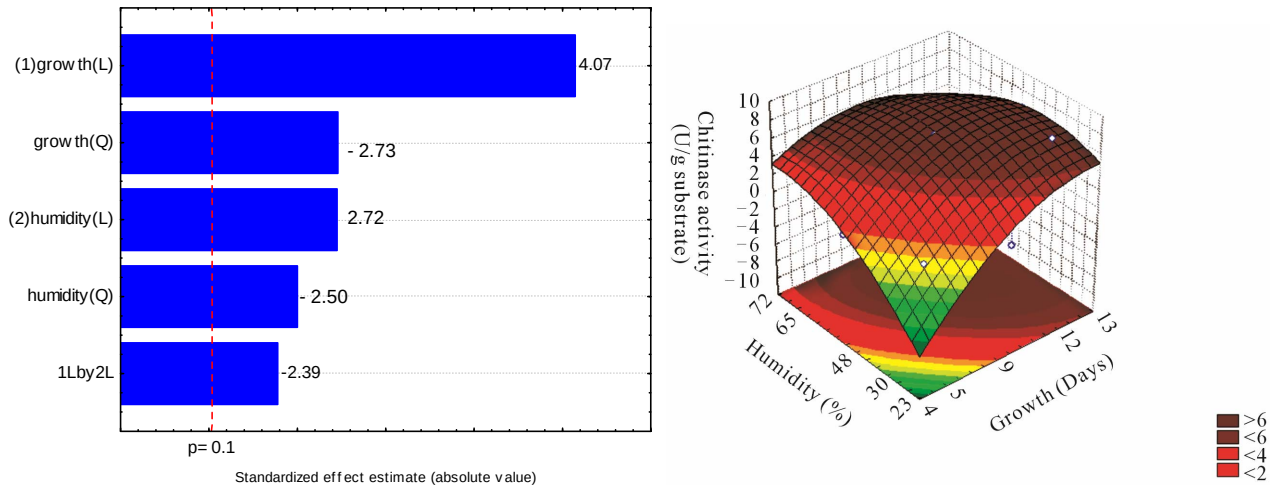
Copyright © 2012 SciRes.

Table 4. Analysis of variance (ANOVA) for chitinase production isolated 167 *M. anisopliae* grown in SSF.

Source for Variation	Sum of Square	Degrees of Freedom	Mean Square	F Calculated
Regression	54.59	3.00	18.19	15.15
Residual	8.39	7.00	1.20	
Total	62.99	10.00		
Regression coefficient: R = 0.87; Ftab 0.90,3;7 = 3.07.				

Table 5. Analysis of variance (ANOVA) for chitinase production isolated 360 *M. anisopliae* grown in SSF.

Source for Variation	Sum of Square	Degrees of Freedom	Mean Square	F Calculated
Regression	76.50	4.00	19.13	12.10
Residual	9.48179	6.00	1.58	
Total	85.98456	10.00		
Regression coefficient: R^2 = 0.89; Ftab 0.90,3;7 = 3.18.				



(a) (b)

Figure 3. Pareto chart (a) and response surface plot (b) of the factorial design for the influence of the independent variable time of growth and humidity on chitinase production by *M. anisopliae* IBCB 360 under SSF using silkworm chrysalis as substrate.

(Equation (2)), where Z is the enzyme activity (U/g of substrate), x is the variable growth time and y is the variable humidity.

$$Z = 6.79 + 1.98x - 1.59x^2 + 1.33y - 1.45y^2 - 1.64xy \quad (2)$$

The R^2 value obtained for the strain IBCB 384 was 0.97, with *p*-value fixed at 0.1 (**Table 6**). The influence of all variables (linear and quadratic mode) was significant. The same can not be observed for the interaction between both variables. According to the Pareto chart (**Figure 4(a)**), the increase of the linear variable time of growth has a positive effect on the chitinase production, but a very long period lead to a negative effect. The linear variable humidity showed that the addition of tap water is favorable for the enzyme production, but when the humidity is excessive the production decreases. The F-value calculated was 47.55 if compared to the F-value tabulated of 3.62, what allows the obtainment of the response surface graph (**Figure 4(b)**) and the equation that describes the model (Equation (3)), where Z is the enzyme activity (U/g of substrate), x is the variable growth time and y is the variable humidity.

$$Z = 4.25 + 0.78x - 1.42x^2 + 0.39y - 1.65y^2 - 0.12xy \quad (3)$$

According to **Table 7**, the R^2 value was 0.93 for the planning using the strain IBCB 425. The linear and quadratic effects for both independent variables were statistically significant with *p*-value fixed at 0.05, but not for the interaction effect (**Figure 5(a)**). The linear variable time of growth had a positive effect on the production of chitinase, but long period has a negative effect as shown by the quadratic effect. The analysis of the effect of the moisture showed that the addition of tap water was favorable for chitinase production, but at high humidity environment the enzymatic production is reduced (**Figure 5(a)**). The F-value calculated was 9 times higher than the F-tabulated allowing the obtainment of the response surface plot (**Figure 4(b)**) and of the adjusted equation that describes the model (Equation (4)), where Z is the enzyme activity (U/g of substrate), x is the variable growth time and y is the variable humidity.

$$Z = 6.07 + 0.96x - 1.40x^2 + 1.62y - 1.95y^2 \quad (4)$$

The higher level of extracellular chitinase was ob-

Table 6. Analysis of variance (ANOVA) for chitinase production isolated 384 *M. anisopliae* grown in SSF.

Source for Variation	Sum of Square	Degrees of Freedom	Mean Square	F Calculated
Regression	26.76	3.00	8.92	47.55
Residual	0.93803	5.00	0.19	
Total	27.69867	10.00		
Regression coefficient: $R^2 = 0.97$; Ftab 0.90,3;5 = 3.62.				

Table 7. Analysis of variance (ANOVA) for chitinase production isolated 425 *M. anisopliae* grown in SSF.

Source for Variation	Sum of Square	Degrees of Freedom	Mean Square	F Calculated
Regression	53.77	3.00	17.92	29.34
Residual	4.27600	7.00	0.61	
Total	58.04445	10.00		
Regression coefficient: $R^2 = 0.93$; Ftab 0.95,3;7 = 3.07.				

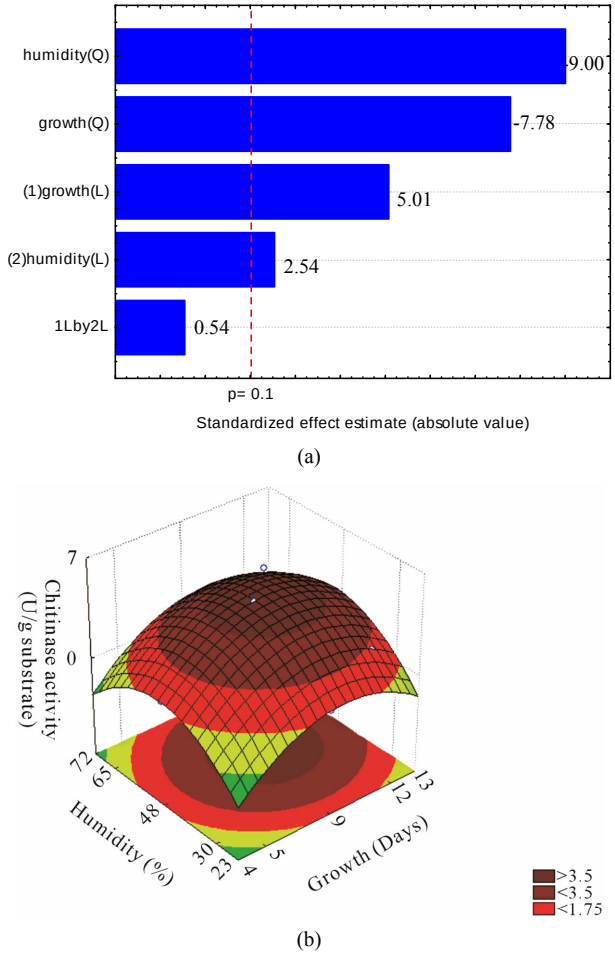


Figure 4. Pareto chart (a) and response surface plot (b) of the factorial design for the influence of the independent variable time of growth and humidity on chitinase production by *M. anisopliae* IBCB 384 under SSF using silkworm chrysalis as substrate.

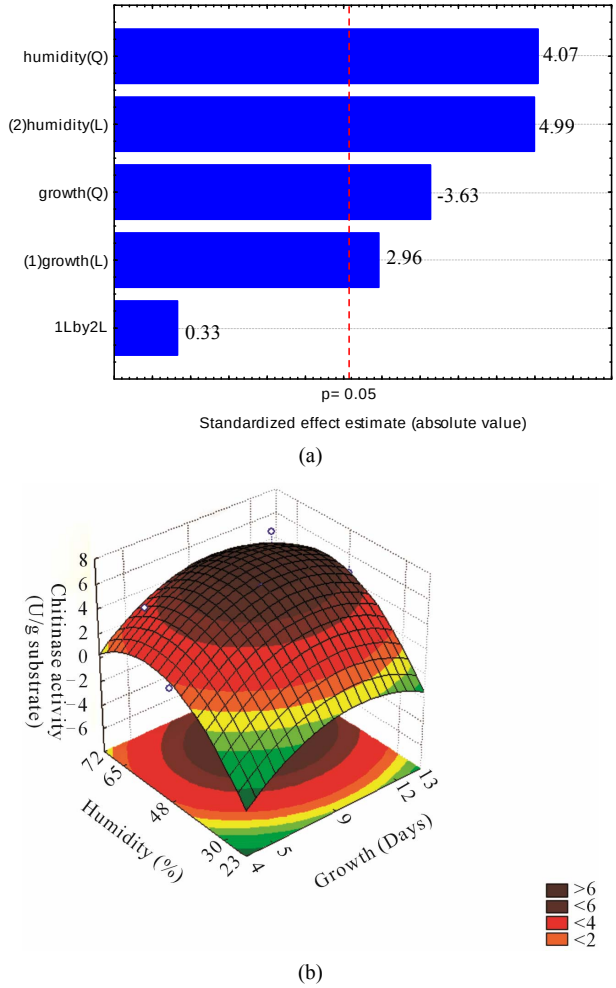


Figure 5. Pareto chart (a) and response surface plot (b) of the factorial design for the influence of the independent variable time of growth and humidity on chitinase production by *M. anisopliae* IBCB 425 under SSF using silkworm chrysalis as substrate.

tained with the strain IBCB 360 (7.23 U/g of substrate) with moisture ratio from 45% to 62% and incubation periods of 8 to 12-days using silkworm chrysalis as substrate according to the analysis of the surface response plot. This same ratio for both variables was also observed for the other strains analyzed. Similarly, the chitinase production by *Aspergillus* sp. S1-13 was increased with 58% - 65% of water under SSF using shrimp shellfish as substrate [19]. The optimization process of chitinase production using CCRD allowed an increase in chitinase production by all isolates if compared to the production showed in **Table 3**. The enzyme production by the strain IBCB 167 was increased two-times under optimized

Copyright © 2012 SciRes.

conditions, while for the strains IBCB 360 and 425 the chitinase production was increased four-times and nine-times for the strain IBCB 384. Despite the good enzyme production with high humidity, *M. anisopliae* strains were able to produce chitinases in dried conditions as well. This flexibility demonstrated by all strains is an important factor that should be considered, since the presence of water in the environment is unstable. Chitinase production by the strain IBCB 360 under optimized conditions was two times higher than that observed for the production by *Trichoderma harzianum* (3.14 U/g of substrate) under SSF using a mixture of chitin and wheat bran as substrate [20]. In addition, this is the first report that shows the possibility to use chrysalis, a biological residue of the textile industry that is discarded into the environment, as substrate for chitinase production by different strains of *M. anisopliae* under SSF.

All equations obtained were validated performing experiments using 9 day-old cultures and humidity adjusted for 48%. Under these conditions the enzymatic activity values experimentally obtained were 5.20, 7.07, 4.60 and 6.08 U/ g of substrate for the strains IBCB 167, 360, 384 and 425, respectively, which are in agreement with the values obtained using the equations (Equation (1)-(4)) of 5.36, 6.80, 4.25 and 6.07 U/g of substrate, respectively.

There are many works which demonstrate that the enzymatic production using SSF is higher than those obtained using Submerged Fermentation. The conditions observed in SSF is much closer to the conditions found in nature by the fungus. The chitinase production in both fermentation conditions has been reported for *M. anisopliae* [17,21]. Usually, the conditions of the SSF are simple and the substrate used has the necessary nutrients for the growth of microorganism. The destination of the biological residues is a preoccupation around the world. These residues, such as chrysalis can be used as alternative substrates to produce enzymes, adding aggregate value to this organic residue and minimizing the negative impact in the environment. On the other hand, the use of low cost substrates has a significant advantage under economic view, reducing the production costs in the industry. Many works showing chitinase production have used colloidal chitin or crab and shrimp shell powder [22-25] as the main substrate/carbon source. Chitinase production using arthropods cuticle was also demonstrated by Da Silva *et al*. (2005) [4].

Chitinase, among other enzymes, from entomophatogenic fungi is related to pathogenicity and virulence. Virulence is defined as the capacity degree that the microorganisms have to cause disease [26]. The virulence of fungal strains over different arthropods is variable and it is related to the production of enzymes and other virulence factors [27]. The production of endochitinase CH2 by *M. anisopliae* as a virulence factor on *Dysdercuperuvianus* was demonstrated by Boldo *et al*. (2009) [5]. Mustafa & Kaur (2009) [28] also evaluated the production of extracellular enzymes from 12 strains of *M. anisopliae*, observing a wide variation in the production of extracellular enzymes. The extracellular lipase produced by *M. anisopliae* also participates in the process of infection [29]. The cultivation of *M. anisopliae* under FSbm using cuticles of *Dysdercus peruvianus*, *Boophilus microplus* and *Anticarsia gemmatalis* as carbon sources showed differences in the secretion of total proteins, chitinases and proteases [4]. These differences in the enzymes secretion are important as virulence factor directly related with the potential of the fungus *M. anisopliae* to recognize the structure of the cuticle of their host and to secrete the correct enzymatic pool. According to Freimoser *et al*. (2003) [30], *M. anisopliae* can encode different chitinase isoforms and other proteins as function of the material used as substrate.

The four *M. anisopliae* strains (IBCB 167, 360, 384 and 425) studied have been recognized according to their potential to control the pest *Diatraea saccharalis* promoting the death of 55%, 68%, 90% and 82%, respecttively, of the insect [8]. However, the chitinase production by these strains had not been analyzed until this moment. The chitinases produced by these strains can be considered an important virulence factor. We found that the best producer of chitinase is the strain IBCB 360, what is not coincident with the best percentage of control found to *D. saccharalis*. The strain IBCB 425 was the second best chitinase producer and was able to control 90% of the pest *D. saccharalis*. The strain IBCB 167 was the third chitinase producer and did not show a good percentage of *D. saccharalis* control. Interestingly, the strain IBCB 384 was the lowest chitinase producer, but it was able to control 82% of the pest *D. saccharalis*. This is the first work that relates the production of extracellular chitinase from these strains to understand the potential capacity to control pests. It is important to highlight that the potential of virulence of an entomopathogenic fungus depends on different factors and not only of the chitinase production, what justifies the differences between the chitinase production by each strain and its capacity to control *D. saccharalis*. These strains are able to produce other virulence factors that were not quantified in this study. In addition, the use of chrysalis as substrate must induce the expression of other genes differently from that observed for the control of *D. saccharalis*. Differences in gene expression of *M. anisopliae* grown on cuticle or hemolymph from its host have been observed [31]. The results obtained are interesting and indicate that chitinases produced by the strains IBCB 167, 360, 384 and 425 of the fungus *M. anisopliae* on chrysalis can have different degrees of participation in the infection process.

Copyright © 2012 SciRes.

4. Conclusion

All strains of the entomophatogenic fungus *M. anisopliae* showed flexibility to produce chitinases under SSF using chrysalis, which was used for the first time as substrate, indicating their potential to adapt to the environment conditions, important factor that should be considered for the infection process. Under optimized condition by CCRD, the strain IBCB 360 was the best chitinase producer although this strain is not the best controller of *D. saccharalis*, indicating that other virulence factors are also involved in the infection.

5. Acknowledgements

This Investigation was supported by Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Coordenadoria de Apoio ao Ensino Superior (CAPES). This manuscript is part of the CBR Doctoral (Comparative Biology Post-Graduate Program, FFCLRP, USP). We thank BRATAC S.A. and Mauricio de Oliveira for technical assistance.

REFERENCES

[1] S. B. Alves, "Controle Microbiano de Insetos," 2nd Edition, FEALQ, Piracicaba, 1998.

[2] R. J. St. Leger, P. K. Durrands, R. M. Cooper and A. K. Charnley, "Regulation of Production of Proteolytic Enzymes by Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*," *Achieves of Microbiology*, Vol. 150, No. 4, 1988, pp. 413-416. doi:10.1007/BF00408316

[3] S. Paris and G. Segretain, "Etude de l'activité Lipasique Esterasique Intracellulaire *Beauveria tenella*," *Annales de Micrology*, Vol. 129, 1978, pp. 71-77.

[4] M. V. Da Silva, L. Santi, C. C. Staats, A. M. Costa, E. M. Colodel, D. Driemeier, M. H. Vainstein and A. Schrank, "Cuticle-Induced Endo/Exoacting Chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* Is Encoded by an Ortholog of the chi3 Gene," *Research in Microbiology*, Vol. 156, No. 3, 2005, pp. 382-392. doi:10.1016/j.resmic.2004.10.013

[5] J. Y. Boldo, A. Junges, K. B. Amaral, D. C. Staats, M. H. Vainstein and A. Schrank, "Endochitinase CHI2 of the Biocontrol Fungus *Metarhizium anisopliae* Virulence Excellent Affects toward the Cotton Stainer Bug *Dysdercus peruvianus*," *Current Genetics*, Vol. 55, No. 5, 2009, pp. 551-560. doi:10.1007/s00294-009-0267-5

[6] P. A. Shah and J. K. Pell, "Entomopathogenic Fungi as Biological Control Agents," *Applied Microbiology Biotechnology*, Vol. 61, 2003, pp. 413-423.

[7] F. V. Vega, "Insect pathology and Fungal Endophytes," *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol. 98, No. 3, 2008, pp. 277-279. doi:10.1016/j.jip.2008.01.008

[8] L. O. Zappelini, "Selection of Isolates of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for the Control of Sugarcane Borer-Cane, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)," Master Dissertation, Biological Institute, Campinas, São Paulo, 2009.

[9] L. F. Fleuri and H. Sato, "Production, Purification, Cloning and Application of Lytic Enzymes," *Quimica Nova*, Vol. 28, No. 5, 2005, pp. 871-879. doi:10.1590/S0100-40422005000500026

[10] R. S. Patil, V. Ghormade and M. V. Deshpande, "Chitinolytic Enzymes: An Exploration," *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 26, No. 7, 2000, pp. 473-483. doi:10.1016/S0141-0229(00)00134-4

[11] L. Duo-Chuan, "Review of Fungal Chitinases," *Mycopathology*, Vol. 161, No. 6, 2006, pp. 345-360. doi:10.1007/s11046-006-0024-y

[12] D. M. F. Van Aalten, D. Komander, B. Systand, S. Gaseidnes, M. G. Peter and V. G. H. Eijsink, "Structural Insights into the Catalytic Mechanism of a Family 18 Exochitinase," *Proceedings of the National of Sciences Academy*, Vol. 98, No. 16, 2011, pp. 8979-8984. doi:10.1073/pnas.151103798

[13] A. C. S. Rizzatti, J. A. Jorge, H. F. Terenzi, C. G. V. Rechia and M. L. T. M. Polizeli, "Purification and Properties of a ThermosTable Extracellular β-D-Xylosidase Produced by Thermotolerant *Aspergillus phoenicis*," *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Vol. 26, No. 3, 2001, pp. 156-160. doi:10.1038/sj.jim.7000107

[14] P. Khanna, S. S. Sundari and N. J. Kumar, "Production, Isolation and Partial Purification of Xylanase from *Aspergillus* sp.," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 11, No. 2, 1995, pp. 242-243. doi:10.1007/BF00704661

[15] E. A. Yamada, I. D. Alvim, M. C. C. Santucci and V. C. Sgarbieri, "Composição Centesimal e Valor Protéico de Levedura Residual da Fermentação Etanólica e de seus Derivados," *Revista de Nutrição Campinas*, Vol. 16, 2003, pp. 423-432.

[16] E. Espósito and J. L. Azevedo, "Fungos: Uma Introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia," Editora da Universidade de Caxias do Sul, Brazil, 2004.

[17] P. G. V. S. Bhanu, V. Padmaja and R. R. S. Kiran, "Statistical Optimization of Process Variables for the Large-Scale Production of *Metarhizium anisopliae* Conidiospores in Solid-State Fermentation," *Bioresource Technolology*, Vol. 99, No. 6, 2008, pp. 1530-1537. doi:10.1016/j.biortech.2007.04.031

[18] B. Patel, V. Gohel and B. Raol, "Statistical Optimization of Medium Components for Chitinase Production by *Paenibacillus sabina* Strain JD2," *Annals of Microbiology,* Vol. 57, No. 4, 2007, pp. 589-597. doi:10.1007/BF03175360

[19] N. Rattanakit, A. Plikomol, S. Yano, M. Wakayama and T. Tachiki, "Utilization of Shrimp Shellfish Waste as a Substrate for Solid-State Cultivation of *Aspergillus* sp. S1-13: Evaluation of a Culture Based on Chitinase Formation Which Is Necessary for Chitin-Assimilation," *Journal of Biosciense and Bioengineering*, Vol. 93, 2002, pp. 550-556.

[20] M. Nampoothiri, T. V. Baiju, C. Sandhya, A. Sabu, G. Szakacs and A. Pandey, "Process Optimization for Anti-

Copyright © 2012 SciRes.

fungal Chitinase Production by *Trichoderma harzianum*," *Process Biochemistry*, Vol. 39, No. 11, 2004, pp. 1583-1590. doi:10.1016/S0032-9592(03)00282-6

[21] G. U. L. Braga, C. L. Messiah and R. Vencovsky, "Estimates of Genetic Parameters Related to Chitinase Production by the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*," *Genetics and Molecular Biology*, Vol. 21, No. 2, 1998, pp. 171-177. doi:10.1590/S1415-47571998000200001

[22] L. F. Fleuri, H. Y. Kawaguti and H. H. Sato, "Production and Application of Extracellular Chitinase from *Cellulosimicrobium cellulans*," *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol. 40, No. 3, 2009, pp. 623-630. doi:10.1590/S1517-83822009000300026

[23] R. F. Guo, B. S. Shi, D. C. Li, W. Ma and Q. Wei, "Purification and Characterization of a Novel ThermosTable chitinase from *Thermomyces lanuginosus* SY2 and Cloning of Its Encoding Gene," *Agriculture Science*, Vol. 7, 2008, pp. 1458-1465.

[24] S. R. Waghmare and J. S. Ghosh, "Study of Thermostable Chitinases from *Oerskovia xanthineolytica* NCIM 2839," *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 86, No. 6, 2010, pp. 1849-1856. doi:10.1007/s00253-009-2432-7

[25] C. Wang, M. A. Typas and T. M. Butt, "Detection and Characterization of pr 1 Virulent Gene Deficiencies in the Insect Pathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*," *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 231, 2002, pp. 252-255.

[26] M. J. J. Pelczar, E. C. S. Chan and N. R. Krieg, "Microbiologia: Conceitos e Aplicações," 2nd Edition, Markron Books, New York, 1996.

[27] M. J. Bidochka and G. G. Khachatourians, "Identification of *Beauveria bassiana* Extracellular Protease as a Virulence Factor in Pathogenicity toward the Migratory Grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*," *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol. 56, No. 3, 1990, pp. 362-370. doi:10.1016/0022-2011(90)90123-N

[28] U. Mustafa and G. Kaur, "Extracellular Enzyme Production in *Metarhizium anisopliae* Isolates," *Folia Microbiologica*, Vol. 54, No. 6, 2009, pp. 499-504. doi:10.1007/s12223-009-0071-0

[29] W. O. B. Silva, S. Mitidieri, A. Schrank and M. H. Vainstein, "Production and Extraction of an Extracellular Lipase from the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*," *Process Biochemistry*, Vol. 40, No. 1, 2005, pp. 321-326. doi:10.1016/j.procbio.2004.01.005

[30] F. M. Freimoser, S. E. Screen, S. Baga, G. Hu and R. J. St. Leger, "Expressed Sequence Tag (ETS) Analysis of Two Subspecies of *Metarhizium anisopliae* Reveals a Plethora of Secreted Proteins with Potential Activity in Insect Host," *Microbiology*, Vol. 149, No. 1, 2003, pp. 239-247. doi:10.1099/mic.0.25761-0

[31] C. Wang and R. J. St. Leger, "Developmental and Transcription Responses to Host and No Host Cuticles by the Specific Locust Pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*," *Eukaryotic Cell*, Vol. 4, No. 5, 2005, pp. 937-947. doi:10.1128/EC.4.5.937-947.2005

Copyright © 2012 SciRes.