



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RAPHAEL CARLOS FERRER DE SANTANA

INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Aspergillus sp.*

Recife
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RAPHAEL CARLOS FERRER DE SANTANA

INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Aspergillus sp.*

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Leonor Alves de Oliveira da Silva

Recife
2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Santana, Raphael Carlos Ferrer de
Investigação das atividades biológicas de *Aspergillus* sp. /
Raphael Carlos Ferrer de Santana - 2019.
114 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
Coorientadora: Leonor Alves de Oliveira da Silva
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.
Recife, 2019.

Inclui referências.

1. Fungo filamentoso 2. Bioinseticida 3. *Sitophilus zeamais*
I. Coelho, Luana Cassandra Breitenbach Barroso (orient.) II. Silva,
Leonor Alves de Oliveira da (coorient.) III. Título

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-350

RAPHAEL CARLOS FERRER DE SANTANA

INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Aspergillus sp.*

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 15/07/2019

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho (Orientadora)
Departamento de Bioquímica-UFPE

Dr^a. Patrícia Maria Guedes Paiva
Departamento de Bioquímica-UFPE

Dr^a. Leonor Alves de Oliveira da Silva
Departamento de Biologia celular e Molecular-UFPB

Dr. Bruno Severo Gomes
Departamento de Micologia -UFPE

Dr^a. Norma Buarque de Gusmão
Departamento de Antibióticos - UFPE

Dedico a Deus e a todos que contribuíram de alguma forma.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que realiza milagres na minha vida todos os dias, que me sustenta e dá forças para que eu não desamine na realização dos meus sonhos.

À Andrea Nunes, minha esposa e mãe da minha pequena MARIA LUIZA, sempre me ajudando a seguir.

A minha mãe, Maria de Fátima Silva Santos, por ter sempre investido na minha educação fazendo o (im) possível.

A minha “coorientadora” Dra. Leonor Alves, a quem tanto estimo e que sempre acompanhou de perto o meu trabalho e foi solícita em todos os momentos.

À Professora colaboradora do meu trabalho Dra. Norma Gusmão, que me incentivou e me recebeu no seu laboratório e sempre me dedicou grande atenção e cuidado.

À orientadora Professora Dra. Luanna Cassandra pela paciência e grande aprendizado.

À amiga Camila Borba pela cumplicidade, companheirismo e milhões de mensagens trocadas ao longo desse período.

Ao IC/Mestrando Thalles Henrique, pelas ajudas e dedicação com os experimentos em todas as etapas.

À todos meus amigos do LAMAI, do Departamento de Antibióticos/ UFPE, pela feliz e cooperativa convivência nestes últimos dois anos: Pérsio, Dr. Erik, Luana, Diana, Apolônio, Hugo, Sara, Eduardo Marques, Patrícia, Iasmin Lucas, Welma e Augusto.

Aos amigos do Laboratório genética de microrganismo, do Departamento de Antibióticos da UFPE, Dra. Janete Magali, Wanda, Diego, Dona Fátima, Marcela e Dra. Glaucia Manoela.

Aos amigos do laboratório de Microbiologia da UFOPA, pela feliz cooperação nesses quatro anos: Dra. Katrine Silva, Sara Sousa, Talita Liberal, Barbara Moura e Alef.

Ao Professor Thiago Napoleão e a Professora Patrícia Paiva, a Dra. Thâmarah de Albuquerque Lima e a Dra. Priscila Moura do departamento de Fisiologia e Bioquímica, pelo companheirismo no experimento com os *Sitophillus zeamais*.

Deus me proteja da sua inveja Deus me defenda
da sua macumba Deus me salve da sua praga
Deus me ajude da sua raiva Deus me imunize do
seu veneno Deus me poupe do seu fim. (Lee
;Rita,2012)

RESUMO

Os fungos filamentosos são fontes de diversos compostos bioativos com aplicações nas indústrias farmacêutica, alimentícia, de materiais e na agricultura. Com isso, o objetivo deste trabalho é avaliar o potencial enzimático, antioxidativo e inseticida do complexo bioativo excretado por *Aspergillus sp.* Como seguimento desse estudo, foi realizado um ensaio de degradação, no qual foi analisada a produção das enzimas quitinases, xilanases e amilases. Visando otimizar a produção do complexo enzimático, realizou-se um planejamento fatorial 2^2 do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR), sendo as variáveis concentração da farinha de camarão e rotação. Posteriormente, realizou-se a análise estatística das variáveis e a análise da variância (ANOVA) dos resultados obtidos utilizando o programa Statistica, versão 8.0 (StatSoft Co., USA). Seguidamente foi realizado um fracionamento do extrato bruto e realizadas as atividades de antioxidante das frações utilizando os ensaios de ABTS e DPPH; ensaios de fumigação, toxicidade por contato e por ingestão do composto bioativo produzido da fermentação do microrganismo, além da identificação do composto majoritário cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa (GC-MS). No presente estudo foi realizada a identificação do microrganismo pela técnica de MALDI-TOF MS. Inicialmente foi realizada seleção com 72 fungos, dos quais 8 (11,11%) isolados apresentaram atividade para as enzimas quitinases, amilases e xilanases. Dentre as linhagens estudadas, a 98 apresentou um rápido crescimento e um melhor tempo de produção enzimática. Na avaliação do efeito do tempo de incubação, para produção do halo de degradação, a linhagem 98 produziu 5,646 U/mL de quitinase em 24 h, 4,777 U/mL em de Xilanase em 72h e 3,575 U/mL de Amilase em 48h. Em seguida foi escolhida a enzima quitinase para a realização do planejamento fatorial 2^2 , sendo estudadas as variáveis concentração da farinha de camarão (2%, 2,18%, 2,5%, 2,82% e 3%) e rotação (0; 29,5; 50; 70,5 e 100 rpm) estudadas. O melhor resultado no procedimento de otimização da atividade quitinolítica foi obtido no ensaio 7 com concentração da farinha de camarão a 2,5 % em condição estática, com valores de atividades 0,4869 U/mL e 0,7016 U/ mg de proteína, respectivamente. No ensaio de toxicidade de ingestão mostrou-se que os insetos *Sitophilus zeamais* consumiram o alimento, porém o composto bioativo não induziu a mortalidade e sim à repelência com índice de deterência moderado a forte. A linhagem produtora do complexo bioativo, foi identificada como sendo a espécie

identificada como *Aspergillus fumigatus*. Ensaios de atividade antioxidante, da fração 22, revelaram que o extrato em acetato de etila apresentou boa atividade utilizando DPPH como substrato, com CI₅₀ $6,03 \pm 0,02 \mu\text{g}$ de extrato enquanto que o ácido ascórbico obteve CI $50 \pm 1,06 \mu\text{g}$. Utilizando o método de ABTS, também foi possível detectar uma excelente atividade antioxidante com o extrato acetato de etila obtido do líquido metabólito de *Aspergillus fumigatus* isolado de água mineral obtendo-se valores de CI₅₀ $0,164 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ e 1,24 vezes superior ao CI 50 $0,204 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$ do padrão Trolox. Posteriormente, a fração 22 foi submetida ao CG-MS e o ácido linoleico identificado como o composto majoritário (32,28%).

Palavras-chave: Fungo filamentosos. Bioinseticida. *Sitophilus zeamais*

ABSTRACT

Filamentous fungi are sources of various bioactive compounds with applications in the pharmaceutical, food, material and agricultural industries. That said, the objective of this work is to evaluate the enzymatic, antioxidative and insecticidal potential of the bioactive complex excreted by *Aspergillus* sp. As a follow-up to this study, a degradation assay was performed, in which the production of the enzymes chitinases, xylanases and amylases was analyzed. Aiming to optimize the production of the enzymatic complex, a factorial design 2^2 , the variables concentration of shrimp flour (2%, 2.18%, 2.5%, 2.82% and 3%) and rotation (0, 29.5, 50, 70.5 and 100 rpm). Subsequently, statistical analysis of the variables and analysis of variance (ANOVA) of the results obtained were performed using the Statistica program, version 8.0 (StatSoft Co., USA). In continuity, the centesimal composition of the shrimp residue flour was carried out. Then, fumigation, contact toxicity and ingestion of the bioactive compound produced from the fermentation of the microorganism were evaluated, in addition to the identification of the major compound gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Then, a fractionation of the crude extract was carried out on a sephadex column (silica 60) and the antioxidant activity of the fractions was done using the ABTS and DPPH assays. In the present study, the microorganism was identified by the MALDI-TOF MS technique. Initially, 72 fungi were selected, of which 8 (11.11%) showed activity for the enzymes chitinases, amylases and xylanases. Among the studied strains, the 98 showed a rapid growth and a better time of enzymatic production. In the evaluation of the effect of the incubation time, for the production of the degradation halo, the 98 strain produced 5.646 U / mL chitinase in 24 h, 4.777 U / mL in Xylanase in 72 h and 3.575 U / mL Amylase in 48h. The chitinase enzyme was chosen to perform the factorial design 2^2 of the rotational central composite design (DCCR), in which the variables of the concentration of shrimp flour (2%, 2.18%, 2.5%, 2.82% and 3%) and rotation (0, 29.5, 50, 70.5 and 100 rpm) were studied. The best result in the chitinolytic activity optimization procedure was obtained in test 7 with 2.5% shrimp flour concentration in static condition, with activity values 0.489 U / mL and 0.7016 U / mg protein, respectively. In the ingestion toxicity test it was shown that the insects *Sitophilus zeamais* consumed the food, but the bioactive compound did not induce the mortality, but the repellency with a moderate to strong deterrence index. The lineage producing of the bioactive complex with ingestion toxicity activity was identified by the MALDI-TOF MS technique, the species identified

as *Aspergillus fumigatus* with score values ≥ 2.0 . Antioxidant activity assays of fraction 22 showed that ethyl acetate extract showed good activity using DPPH as substrate, with $IC_{50} 6.03 \pm 0.02 \mu\text{g}$ extract while ascorbic acid obtained $CI 50 \pm 1.06 \mu\text{g}$. Using the ABTS method, it was also possible to detect an excellent antioxidant activity with the ethyl acetate extract obtained from *Aspergillus fumigatus* metabolite liquid isolated from mineral water, obtaining IC_{50} values $0.164 \pm 0.01 \mu\text{g} / \text{mL}$ and 1.24 times higher than $IC 50 0.204 \pm 0.02 \mu\text{g} / \text{mL}$ Trolox standard. Subsequently, fraction 22 was submitted to GC-MS and linoleic acid identified as the major compound (32.28%). Taken together, these results suggest that this.

Key words: Filamentous fungi. Bioinsecticide. *Sitophilus zeamais*

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO

Figura 1 – Estruturas características do gênero <i>Aspergillus</i>	19
Figura 2 – Microscopia do <i>Aspergillus fumigatus</i>	20
Figura 3 – Representação das estruturas das enzimas.....	23
Figura 4 – Estrutura do domínio catalítico de uma quitinase GH18.....	26
Figura 5 – Complexo Xilanolítico.....	28
Figura 6 – (A) Inseto se desenvolvendo dentro do grão de milho e (B) inseto adulto de <i>Sitophilus zeamais</i>	33

ARTIGO I

Figura 1- Starch (1) chitin, (2), and xylan (3) degradation halos produced by strain 98.....	47
Figura 2 - Enzymatic kinetics of xylanase excreted by strain 98 (<i>A. fumigatus</i>) in liquid steady-state fermentation at 30° C, using oat xylan as the carbon source.....	49
Figura 3 - Enzymatic kinetics of chitinase excreted by strain 98 (<i>A. fumigatus</i>) in steady liquid fermentation at 30°C using shrimp shell as carbon source.....	50
Figura 4 - Enzymatic kinetics of amylase excreted by strain 98 (<i>A. fumigatus</i>) in liquid steady-state fermentation at 30° C, using soluble starch as the carbon source.....	51

ARTIGO II

Figura 1- Fluxograma para obtenção da farinha de casca de camarão.....	61
Figura 2 - Farinha da casca da casca de camarão secas a 80 °C por 24h.....	63

Figura 3 - Gráfico de Pareto para significância dos fatores Concentração e RPM.....	67
Figura 4 - Gráficos de contorno 3D de superfície de resposta da produção de quitinase extracelular.....	68
Figura 5 - Superfície de resposta da otimização de meio para produção da enzima quitinase, tendo valores da farinha da casca de camarão e rotação variáveis.....	69

ARTIGO III

Figura 1 - Taxa de consumo relativo e índice de deterência alimentar de adultos tratados com dietas artificiais contendo água destilada como controle e o extrato bruto em concentrações finais de 5,15,20 %.....	79
Figura 2 - Parâmetros nutricionais de <i>S. zeamais</i> adultos tratados com dietas artificiais contendo água destilada como controle e o extrato bruto em concentrações finais de 5,15,20 %.....	80
Figura 3 - Resultado da identificação pelo MALDI Biotyper.....	81

ARTIGO IV

Figura 1- Estabilização do radical ABTS.+ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio. Adaptada de SOUSA et al, 2007.....	90
Figura 2- Resultado da identificação pelo MALDI Biotyper.....	96
Figura 3 - Valores do potencial de inibição de DPPH do extrato acetato de etila obtido do liquido metabolito do <i>Aspergillus fumigatus</i> isolado de água mineral.....	97
Figura 4 - Valores do potencial de inibição de ABTS do extrato acetato de etila obtido do liquido metabolito do <i>Aspergillus fumigatus</i> isolado de água mineral.....	98
Figura 5 - Espectro do ácido linoléico da fração bioativa.....	99

LISTA DE TABELAS

REVISÃO

Tabela 1- Exemplos de espécies de <i>Aspergillus</i> produtoras de Metabólitos secundários.....	22
Tabela 2 - Classificação das enzimas.....	24

ARTIGO I

Table 1 - Enzymatic activity values (U/mL) of xylanases, chitinase and amylase produced by filamentous fungi isolated from mineral water in modified Czapeck liquid medium after 48 h at 30° C in stationary condition.....	47
---	----

ARTIGO II

Tabela 1 - Níveis e variáveis para produção de quitinase.....	62
Tabela 2 - Composição centesimal da farinha da casca do camarão.....	64
Tabela 3- Resultados obtidos em cada ensaio do planejamento fatorial 2 ²	66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS	16
1.1.1	Objetivo Geral	16
1.1.2	Objetivos Específicos	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
3	RESULTADOS	41
3.1	ARTIGO 1 HYDROLYTIC ACTIVITY OF ENZYMES PRODUCED BY FUNGI ISOLATED FROM DRINKING MINERAL WATER.....	39
3.2	ARTIGO 2 – OBTENÇÃO DE QUITINASE EXTRACELULAR DE <i>Aspergillus</i> sp. UTILIZANDO RESÍDUO DE CAMARÃO.....	58
3.3	ARTIGO 3 – AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO DE <i>ASPERGILLUS</i> SP. AO <i>SITOPHILUS ZEAMAE</i> (GORGULHO DO MILHO).....	74
3.4	ARTIGO 4 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO DE <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i>	87
4	CONCLUSÃO	105
	REFERÊNCIAS	106

1 INTRODUÇÃO

Os fungos são micro-organismos produtores de princípios bioativos, por possuírem uma alta capacidade de produção metabólica diversificada. Com a descoberta da penicilina produzida pelo fungo *Penicillium notatum*, têm-se dado maior ênfase aos estudos de descoberta e aplicação dos metabólitos oriundos de microrganismos.

As substâncias excretadas pelos fungos estão as enzimas, catalisadores biológicos, que apresentam vantagens e importância para a indústria, tendo em vista a procura por melhorias em processos diversos de biotransformações e compostos naturais com ação inseticidas, utilizando substrato de baixo custo (Baptista et al, 2012; Carvalho, 2012; CAMAROTTI et al, 2017).

Os resíduos são subprodutos e/ou sobras do processamento de alimentos de valor econômico relativamente baixo. O aproveitamento dos resíduos industriais representa fonte potencial para obtenção de substrato para o processamento de ração animal, alimentos para humanos e produção de enzimas de interesse industrial.

Assim, estudos que envolvam novas fontes de compostos naturais com ação inseticida são importantes, com o objetivo de se manter a produtividade agrícola mitigando os danos à saúde e ao meio ambiente (CAMAROTTI et al, 2017). Uma tendência para reverter essa questão é a utilização de agentes biológicos (Cardoso, 2007; Oliveira, 2013). Dentre os agentes biológicos, destaca-se os fungos, possuem capacidade de formar armadilhas ou excretar substâncias que conseguem inibir ou eliminar insetos, nematoides entre outros microrganismos.

Aditivamente, a formação de radicais livres é uma consequência natural do metabolismo, porém se não forem neutralizados levam ao estresse oxidativo, que pode favorecer o desenvolvimento de várias doenças, como diabetes, câncer e doenças degenerativas, como Alzheimer e Parkinson (WU et al., 2013; BARBA et al., 2017; CAROCHO et al., 2018). Com o crescimento no interesse pelos antioxidantes naturais, frente à possível toxicidade dos antioxidantes sintéticos, (CAROCHO et al., 2018; SAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015), os micro-organismos e seus metabólitos podem ser fontes de antioxidantes naturais (THENMOZHI et al., 2010).

Diante destes aspectos, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção enzimática, atividade antioxidante e inseticida frente a *Sitophilus zeamais* do *Aspergillus sp.*

1.1 OBJETIVO

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial enzimático, antioxidativo e inseticida do complexo bioativo excretado por *Aspergillus sp.*

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar fungos produtores de enzimas hidrolíticas;
- Determinar as melhores condições experimentais para produção enzimática;
- Avaliar a atividade fumigante, toxicidade por contato e toxicidade por ingestão do complexo bioativo contra *Sitophilus zeamais*.
- Avaliar a atividade antioxidantes;
- Identificação molecular da linhagem fúngica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FUNGOS

Os fungos são organismos eucarióticos, possuem parede celular rígida, podendo ser uni ou multicelulares. São heterotróficos, aclorofilados, produzindo esporos, tendo o glicogênio como principal substância de reserva. Eles podem ser encontrados na forma filamentosa ou leveduriformes (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996). A reprodução ocorre de forma assexuada ou sexuada. Os esporos são hialinos ou pigmentados, de parede fina ou espessa, haplóides ou diplóides. O segundo maior grupo de espécie sobre a Terra, os fungos perdem apenas para os insetos. Estimativas sugerem que existem cerca de 2,2 a 3,8 milhões de espécies diferentes de fungos, sendo que menos de 5% foram descritos (HAWKSWORTH, 2017).

A ocorrência dos fungos no ambiente se dar de três modos: saprófitos, parasitismo e simbiótico. A maioria dos fungos filamentosos são terrestre, contudo, exigem geralmente elevado nível de umidade, sendo alguns grupos aquáticos. Os fungos são micro-organismos produtores de princípios bioativos, por possuírem uma alta capacidade de produção metabólica diversificada. Com a descoberta da penicilina produzida pelo fungo *Penicillium notatum*, têm-se dado maior ênfase aos estudos de descoberta e aplicação dos metabólitos oriundos de micro-organismos (STROBEL et al., 2004, SILVA et. al. ,2018).

Alguns fungos conseguem sintetizar substâncias tóxicas para mamíferos, como as micotoxinas, entre elas, algumas consideradas carcinogênicas. Entre as micotoxinas incluem-se aflatoxinas (I), ocratoxinas (II), citreoviridinas (III), tricotecenos e fumonisinas, além de uma variedade de derivados indólicos tremorgênicos (PINTO et al., 2002). Devido à capacidade de produção de metabólitos bioativos por fungos, são relatados muitos medicamentos provenientes de substâncias produzidas por estes (SCHULZ; BOYLE, 2005; PATERSON & LIMA, 2017).

Os medicamentos de maior repercussão terapêutica para doenças infecciosas são os antibióticos penicilinas (IV) e cefalosporinas (V). Outros exemplos mais recentes são a mevinolina (VI), um agente redutor de colesterol, ciclosporinas e alcalóides ergot (VII) (PINTO et al., 2002). As substâncias isoladas de fungos destacam-se também como agroquímicos naturais, tais como destruxinas (inseticidas) e estrobilurinas (fungicidas), além de várias fitotoxinas (herbicidas) (PINTO et al., 2002, KELLER, 2019).

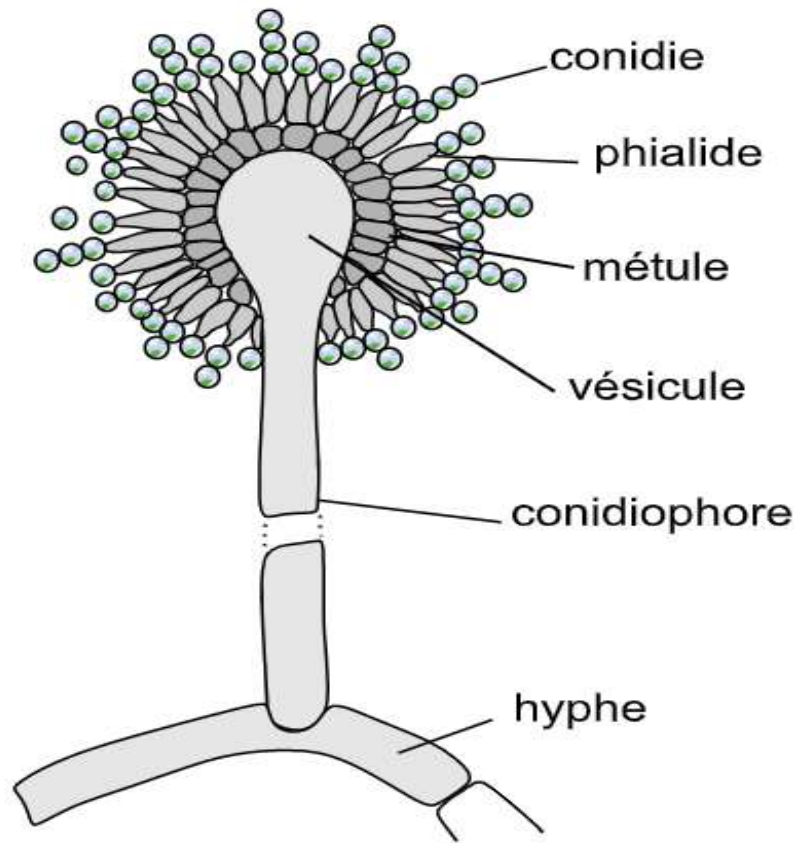
2.2.2 O GÊNERO *ASPERGILLUS*.

Em 1729, Micheli descreveu o gênero *Aspergillus* após observar um fungo no microscópio e lembrar de um aspergillum, instrumento utilizado na igreja católica para aspergir água benta. Esse gênero é representado por espécies que crescem em diferentes habitats como: Água doce e marinha, matérias orgânicas em decomposição, solo e animais. Paulussen (2016) o gênero *Aspergillus* estão adaptados a diferentes condições ambientais e aptos a utilizar uma variedade de substrato.

Em 1965 Raper e Fennell descreveram 132 espécies de *Aspergillus* e os classificaram com base nas características morfológicas em 18 grupos. Klich e Pitt (1988), separaram o gênero em seis subgêneros, cada um abrangendo uma ou mais seções. Nesta classificação, o termo “Seção” corresponde aos grupos do sistema de Raper e Fennell. A modificação do termo "grupo" não tem relevância no Código Internacional de Nomenclatura Botânica (ICN). Samson et al. (2014), em sua revisão mantém o conceito amplo de *Aspergillus* e recomenda a importância das características morfológicas e identificação molecular para identificação das espécies.

A taxonomia clássica de *Aspergillus* tem como base os caracteres morfológicos, fisiológicos e estruturas reprodutivas citadas por Raper e Fennell. *Aspergillus*, gênero anamórfico, se caracteriza pela produção de hifas especializadas, o conidióforo, tem três partes: distintas: (1) a parte basal em forma de “T” ou “L” (célula-pé) às vezes separada por um septo que liga o conidióforo a massa micelial; (2) o estipe, hifa cilíndrica e, (3) a vesícula (extremidade alargada). Na vesícula estão dispostas as células conidiogênicas, as fiálides. Em muitas espécies, entre a vesícula e fiálides estão outras células chamadas metulas. Na Cabeças conidiais encontramos apenas fiálides denominadas unisseriadas, aqueles com fiálides e metulas, bisseriados (Klich e Pitt, 1988) (Figura 1).

Figura 1 : Estruturas características do gênero *Aspergillus*



Fonte: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/8a/Conidiophore_Aspergillus_niger.svg

O gênero *Aspergillus*, tem grande importância na produção de compostos bioativos de interesse industrial, de ação tóxica (micotoxinas) e patológica.

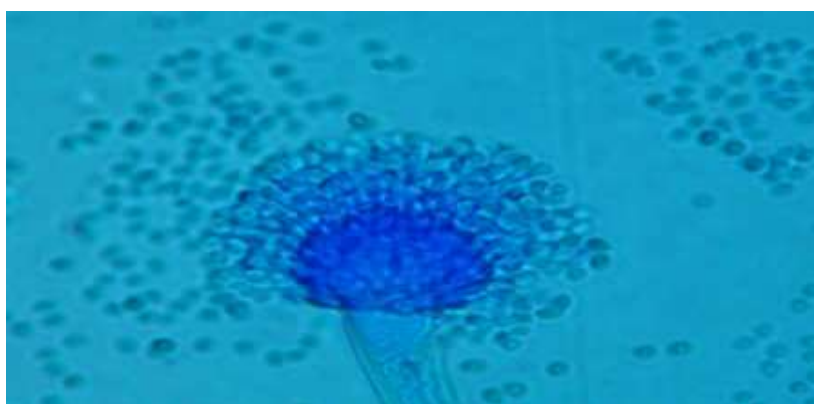
Infecções são tipicamente causadas por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus*, sendo *A. fumigatus* o responsável por mais de 90% das infecções seguidos por *A. flavus* e *A. niger* (Reis et al., 2015; Paulussen et al., 2016). Micotoxinas são metabólitos secundários, de baixo peso molecular, cujos efeitos são crônicos (carcinogênico, lesão renal e imunodepressão).

2.2.3 ASPERGILLUS FUMIGATUS

A espécie *A. fumigatus* é um fungo termofílico, saprofítico e patogênico, sendo responsável pelas infecções provocadas pelo gênero, denominadas aspergiloses, que acometem principalmente pacientes imunocomprometidos (Kwon-Chung & Sugui, 2013; Rokas et al., 2012). Uma característica da elevada

patogenicidade está relacionada às estruturas dos seus esporos ou conídios, que constituem a principal forma de reprodução dessa espécie (Kwon-Chung & Sugui, 2013). Os mesmos apresentam coloração verde-acinzentada e um diâmetro variando de 2 a 3 μm , que constitui um tamanho ideal para adentrar as vias aéreas inferiores do hospedeiro, onde geralmente se iniciam as infecções sistêmicas. Além disso, a superfície conidial do *A. fumigatus* contém um número maior de resíduos de ácido siálico com carga negativa expostos quando comparado aos demais indivíduos do gênero, sendo os mesmos responsáveis por mediar, parcialmente, a ligação às proteínas da lâmina basal do hospedeiro o que, portanto, torna a adesão dos conídios dessa espécie ao tecido epitelial de vias aéreas e alvéolos mais efetiva (Kwon-Chung & Sugui, 2013).

Figura 2: Microscopia do *Aspergillus fumigatus*



Fonte : www.aspergillus.org.uk

2.2.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os metabólitos secundários são significativos, por desempenharem diversas funções nos organismos produtores, como defesa (contra predadores, micro-organismos e vírus), competição, atração, estimulação, como agentes de transporte de metais, como agentes de simbiose entre micro-organismos e plantas, nematóides, insetos e animais superiores, na forma de hormônios sexuais; como efetores de diferenciação e ainda agem contra estresses abióticos (KELLER,2019).

Sabe-se ainda que alguns metabólitos secundários (incluindo antibióticos) podem estimular a formação de esporos e inibir ou estimular sua germinação. Isso

acontece porque tanto a formação de metabólitos secundários como a formação de esporos são regulados por fatores semelhantes (HARTMANN, 2007; KELLER, 2019).

Os metabólitos secundários não estão circundados no crescimento e desenvolvimento dos organismos produtores, mas desempenham um importante papel como moléculas de defesa. Eles são moléculas orgânicas, e em sua maioria são classificados com base na sua origem biosintética. A maior produção dos metabólitos secundários ocorre entre a fase de crescimento e a fase estacionária, sendo que, mesmo na ausência dessa síntese, o organismo produtor continua seu desenvolvimento (AGOSTINI-COSTA et al., 2012).

Para a produção dos metabólitos secundários existem três hipóteses. A primeira trata da produção não afetar o desenvolvimento e sobrevivência em curto prazo dos organismos produtores. A segunda hipótese afirma que os genes envolvidos no metabolismo secundário permitem que as mutações e que a seleção natural fixe características benéficas por meio da evolução. A terceira trata os metabólitos secundários como parte integral do metabolismo celular, sendo que esse necessita dos produtos do metabolismo primário para conseguir as enzimas, energia, substrato e maquinaria celular, de modo a contribuir para a sobrevivência do organismo produtor a longo prazo (ROZE; CHANDA; LINZ, 2011).

Os metabólitos secundários agem principalmente como moléculas de adaptação, auxiliando na sobrevivência dos organismos produtores. Além disso, eles são produzidos por espécies e linhagens específicas, estando, assim, intimamente ligados com a ecologia dos organismos produtores (O'BRIEN; WRIGHT, 2011).

Os metabólitos secundários (tabela 1) produzidos por fungos constituem uma grande variedade de compostos que podem desempenhar papel vital em contextos agrícolas, farmacêuticos e industriais, ou podem ter efeitos devastadores sobre a agricultura, saúde animal e humana em virtude da sua toxicidade (DRACON, 2006).

Tabela 1: Exemplos de espécies de *Aspergillus* produtoras de Metabólitos secundários.

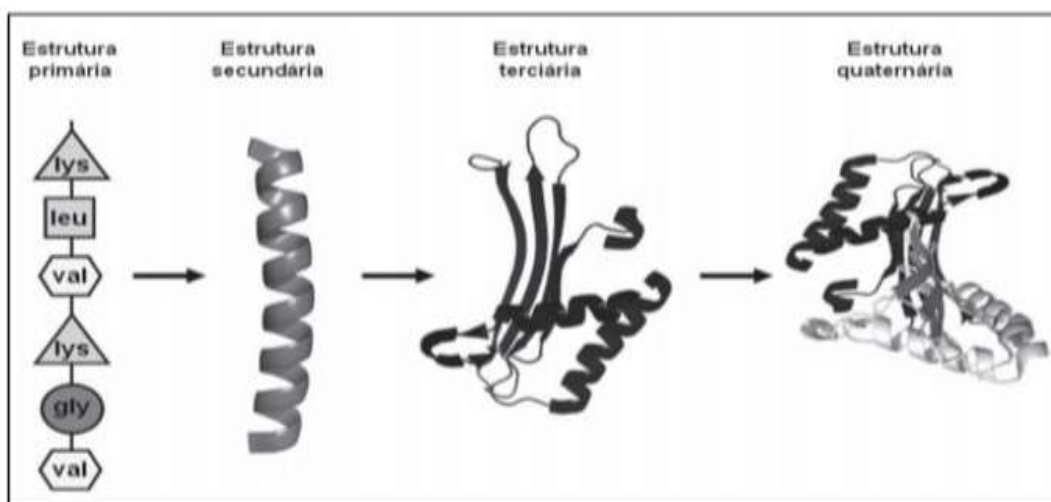
Metabólitos Secundários	Espécies Produtoras
Ácido 3-nitropropionico	A. flavus, A. oryzae
Aflatoxina	A. arachidicola, A. flavus, A. minisclerotigenes, A. nomius, A. parasiticus
Asperazina	A. tubingensis
Aspirona	A. westerdijkiae
Aspergamida A	A. melleus, A. westerdijkiae, A. ochraceus
Aspergamida B	A. melleus, A. westerdijkiae
Acido secalônico	A. aculeatinus, A. aculeatus, A. japonicus, A. uvarum
Citreoviridina A	A. terreus,
Ácido ciclopiazônico	A. flavus, A. oryzae
Citochalasina E	A. clavatus
Ditriptofenalina	A. flavus
Fumigaclavina A e B	A. fumigatus,
Funalenona	A. niger, A. tubingensis, A. brasiliensis
Fumitoxinas	A. fumigatus
Fumitremorgina A e B	A. fumigatus
Fumonisinás	A. niger, A. fumigatus
Gliotoxina	A. fumigatus
Ácido kójico	A. arachidicola, A. flavus, A. minisclerotigenes, A. oryzae, A. parasiticus, A. sojae
Kotanina	A. niger
Melleína	A. melleus, A. ochraceus
Neoxalina	A. aculeatinus, A. aculeatus, A. japonicus, A. uvarum
Nafto-γ-pironas (grupo)	Nigri, principalmente A. Níger
4 - Hidroxi – melleína	A. ochraceus
Ocratoxina A	A. carbonarius, A. niger, A. ochraceus, A. steynii, A. westerdijkiae,
Orlandina	A. Níger
Patulina	A. clavatus,
Piranonigrina	A. Nigri
Ácido penicílico	A. ochraceus, A. steynii, A. westerdijkiae
Esterigmatocistina	A. versicolor
Acido tenuazônico	A. nomius
Tensidol A	A. niger, A. tubingensis
Tensidol B	A. niger, A. tubingensis
Triptoquivalinas	A. clavatus, A. fumigatus
Verruculogena	A. fumigatus,
Viomeleína	A. ochraceus, A. steynii, A. westerdijkiae, A. melleus
Vioxantina	A. ochraceus, A. steynii, A. westerdijkiae, A. melleus
Xantomegnina	A. ochraceus, A. steynii, A. westerdijkiae, A. melleus

Fonte : (SAMSON et al.)

2.2.5 ENZIMAS

As enzimas são substâncias, que conseguem baixar a energia de ativação das reações químicas, apresentam alta eficiência e especificidade com seu substrato. As reações mediadas por estas resultam em produtos com elevado nível de pureza e como atrativo observa-se a minimização de produção de subprodutos indesejáveis. Apresentam várias vantagens e importâncias para as grandes indústrias, tendo em vista a procura por melhorias em processos diversos de biotransformações (BAPTISTA et al, 2012; CARVALHO, 2012; NELSON E COX, 2011). As enzimas são formadas por aminoácidos interligados por ligações peptídicas, essas podem apresentar estrutura primária, secundária, terciária e quaternária, sendo sua funcionalidade decorrendo de sua conformação (figura 3) (NELSON E COX, 2011). Durante a reação catalisada, o substrato liga-se à enzima, em geral, através de ligações não covalentes em certa região denominada sítio-ativo. Geralmente, as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio-ativo são responsáveis pela ligação ao substrato ou pela catálise da reação (grupos catalíticos) (MORAES et al, 2013).

Figura 3 : Representação das estruturas das enzimas



Fonte: Moraes e Colaboradores (2013)

União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) classifica as enzimas de acordo com a sua forma de atuação, podendo catalisar diversas reações, dentre elas oxirredução e hidrólise (tabela 2) (NELSON E COX, 2011). As reações de

catálise enzimáticas são influenciadas por diferentes fatores, dentre eles destacamos pH, temperatura, concentração de substrato, concentração da enzima e cofatore.

Tabela 2. Classificação das enzimas

Enzima	Característica	Exemplo
Oxirredutases	Agem transferindo elétrons, hidretos (H) ou prótons (H ⁺), reações de oxidação-redução	Lactato desidrogenase
Transferases	Transferem grupos químicos entre moléculas	Monofosfato quinase
Hidrolases	Utilizam a água como receptor de grupos funcionais de outras moléculas	Quitinase, Xilanase e Amilase
Liasas	Reações de quebra de ligações covalentes, removendo moléculas de água, amônia e gás carbônico.	Fumarase
Isomerases	Transformam uma molécula em seu isômero	Triose fosfato isomerase
Ligases	Formam Ligações Químicas por reação de condensação, consumindo energia sob a forma de ATP	Aminoacil-tRNA sintetase

Fonte: Adaptado de NELSON E COX, 2011

2.2.6 ENZIMAS FÚNGICAS NA INDÚSTRIA

As enzimas microbianas são promissoras para os mercados por apresentar maior facilidade e menor tempo de produção (REDDY et al. 2003, CELESTINO et al. 2014). Os fungos mostram-se como os principais produtores de enzimas por terem algumas características interessantes para produção em quantidade de produto em tempo relativamente curto e gasto reduzido no uso de matérias primas (LUZ et al., 2016)

Enzimas industriais em sua maioria, são produzidas por fermentação utilizando microorganismos tais como bactérias e fungos, em condições cuidadosamente

controladas (SARROUH et al., 2012). Dentro deste campo os fungos representam os microrganismos mais promissores, pois desempenham importante papel no processo de bioconservação, visto que podem reduzir a quantidade de resíduos, minimizar a poluição e formar produtos de interesse às indústrias, englobando a farmacêutica, agrícolas e têxtil (Acosta et al., 2017; CRUZ et al., 2011; GONZÁLEZ, 2012).

Ao longo dos anos esses microrganismos vêm apresentando eficácia na produção de uma grande variedade de metabólitos bioativos, incluindo enzimas, antibióticos pigmentos e aditivos alimentícios. Dentre eles, os leveduriformes e filamentosos, são amplamente utilizados na biotecnologia para diversos fins. (SOUZA et al., 2016; CORTÉS E MOSQUEDA 2013).

No que diz respeito a geração de enzimas, os fungos apresentam capacidade de produzir uma grande variedade, dentre elas as xilanases, celulasas, proteases e amilases (PIROTA et al, 2015). Os filamentosos se destacam, pois conseguem secretar suas enzimas diretamente no meio em que se encontram, não carecendo de ruptura celular para sua liberação (FARIA SILVA et al., 2017).

Quando se trata de enzimas amilolíticas, os filamentosos ganham destaque devido a sua facilidade de cultivo e propriedades físico-químicas das enzimas obtidas a partir de sua 15 fermentação. Espécies dos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, e *Penicillium* tem sido amplamente utilizada na indústria como produtores de amilases (FREITAS, 2014; PANDEY,2000). Como exemplar, estudos microbiológicos e bioquímicos relatam o fungo *Syncephalastrum racemosum* como bom produtor da α -amilase em condições de pH, temperatura e substrato ideais (FREITAS, 2014).

Assim como relato de Cruz e seus colaboradores (2011), onde mostra produção de α -amilase por *Aspergillus niger* utilizando resíduos de casca de mandioca como substrato para produção enzimática. Outra característica relevante conferida a eles é que mesmo os mesófilos, como fungos que crescem entre 28 e 32 °C, são capazes de produzir enzimas que atuam em temperaturas até 30 °C acima da temperatura máxima de crescimento, conforme descrito por Gomes et al. (2007).

2.2.6.1 QUITINASE

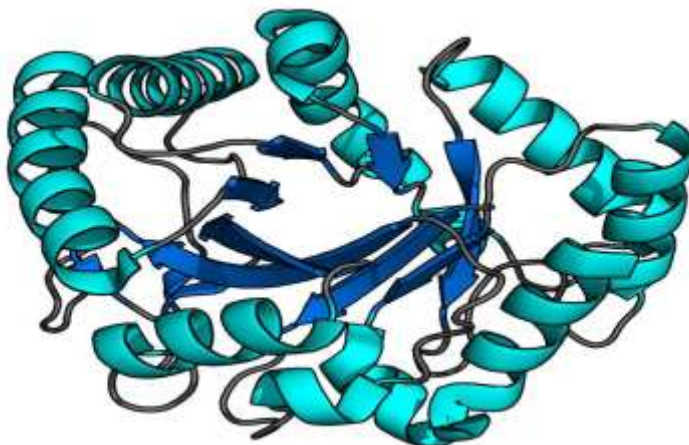
As quitinases são enzimas encontrada na natureza que clivam as ligações β -1,4(GlcNac) da quitina (Figura 2) (FLEURI & SATO, 2005). São divididas em duas classes, as endoquitinases e exoquitinases. As endoquitinases clivam a quitina em locais específicos, liberando quito-oligossacarídeos (quitotetraose, quitotriose). Já as

exoquitinases, clivam a quitina na extremidades não redutora, liberando dímeros de (GlcNac)₂ (DUO-CHUAN, 2006; VAN AALTEN et al., 2001).

Com base na sequência de aminoácidos, as quitinase pertencem às famílias 18 e 19 das glicosil-hidrolase (GH) (Henrissat and Davies, 1997). As famílias GH18 e GH 19 não são iguais em suas sequências e possuem características específicas. A família GH18 possui um domínio catalítico em forma de barril (β/α)₈ (Figura 4) e estas enzimas utilizam o mecanismo de retenção ao hidrolisar o substrato. As quitinases da família 19 têm um domínio catalítico com alto teor de α -helicoidal e usam o mecanismo inversor como seu mecanismo de ação. Em contraste com as quitinases da família GH19, a família GH18 das quitinases é encontrada em organismos diferentes, incluindo bactérias, plantas superiores, animais, vírus e fungos, e estão entre as enzimas quitinolíticas mais estudadas (Hoell et al., 2010).

As quitinases encontradas em fungos pertencem a família GH18, seu modo enzimático é de retenção, o que resulta na obtenção de quito-oligosacarídeos (ARAKANE & MUTHUKRISHNAN, 2010).

Figura 4 : Estrutura do domínio catalítico de uma quitinase GH18



A aplicação biotecnologia das quitinases podem ser utilizadas em diversos setores industriais como agrícola (controle fungos fitopatogênicos e pragas agrícolas), alimentício, farmacêutico, biomédico, cosmético, têxtil. As quitinases são capazes de realizar transglicosilação, produzindo quito-oligosacarídeos biologicamente ativos, agindo como defesa para as plantas.

Na área médica, as quitinas, possuem atividade antitumoral. No setor de cosmético Estes quito-oligosacarídeos são utilizados ainda no setor de cosméticos e

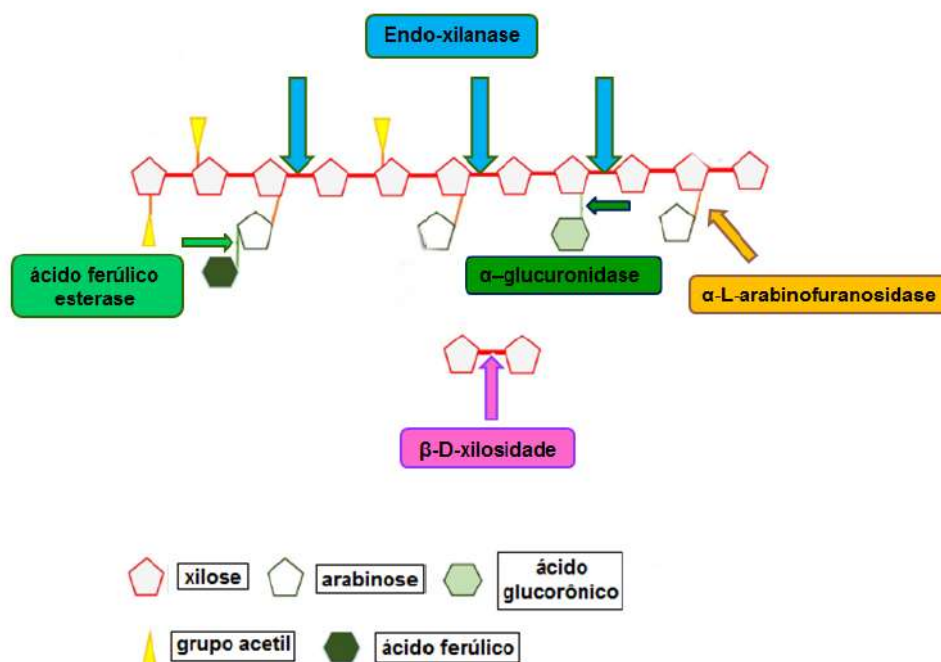
de tratamento de águas (AAM et al., 2010). Sendo assim, a capacidade de transglicosilação apresentada pelas quitinase é interessante, evitando a contaminação ambiental, ampliando as áreas de aplicação destas enzimas e ainda destacando o grande potencial biotecnológico.

2.2 6.2 XILANASE

A variação na composição das ramificações do xilano confere tal heterogeneidade a este polissacarídeo, onde para que seja hidrolisado eficientemente é necessário um conjunto de diferentes enzimas específicas, chamado complexo xilanolítico (Figura 5), tal complexo atua em coadjuvância na cadeia principal e nas ramificações. Em geral, as principais enzimas envolvidas na degradação do xilano são: Endo-xilanase (*endo-1,4- β -xilanase*, E.C.3.2.1.8) que hidrolisa as ligações glicosídicas da cadeia principal liberando xilooligossacarídeos, e β -xilosidase (*xilano-1,4- β -xilosidase*, E.C.3.2.1.37) que atua nos xilooligossacarídeos reduzindo-os a xilose.

Além destas existem as enzimas acessórias que são capazes de estimular a hidrólise dos ácidos e demais açúcares que compõem as ramificações do esqueleto principal, salienta-se a α -L-arabinofuranosidase (E.C. 3.2.1.55) que retira os resíduos de arabinose, a α -glucoronosidase (E.C.3.2.1.139) que libera os resíduos de ácido glucorônico ou sua forma metilada, e a ácido ferúlico esterase (E.C. 3.1.1.73) que catalisa a quebra das ligações feruloiléster presentes nos ácidos ferúlicos (DECARLI, 2016; KNOB, 2010; SUNNA, 1997; UDAY, 2016) (Fig. 5).

Figura 5 – Complexo Xilanolítico.



Fonte: DECARLI (2016) modificado.

Segundo KNOB (2010) e YANG (2014), o sinergismo entre as duas principais enzimas do complexo xilanolítico é indispensável devido à produção dos xilooligossacarídeos comprometer a atuação da endo-xilanase. Tal coadjuvância aumenta a susceptibilidade do xilano ao ataque e catálise da endo-xilanase, esta por sua vez tem sua eficiência aumentada e garante uma eficiente hidrólise do xilano, visto que, os xilooligossacarídeos estão sendo degradados pela β-xilosidase. Ainda é notável um sinergismo considerável entre a endo-xilanase e as enzimas acessórias, no que diz respeito à remoção dos grupamentos de açúcares e ácidos presentes nas ramificações o que potencializa a ação da endo-xilanase na redução da cadeia principal a xilooligossacarídeos e demais resíduos.

2.2.6.3 AMILASE

A primeira enzima produzida industrialmente foi uma amilase fúngica no ano de 1894, essa foi utilizada como medicamento para o tratamento de distúrbios digestivos (Pandey et al., 2000). Sendo Boidin e Effront (1917), os primeiros a usar o *Bacillus subtilis* e *Bacillus mesentericus* para a produção de α-amilases em escala comercial utilizando grandes fermentadores em fermentação submersa. As amilases são

enzimas hidrolíticas que atuam clivando amido, oligo e polissacarídeos, em processos que liquefação ou sacarificação.

A enzimas amilolíticas podem ser classificadas de acordo com a maneira pela qual ataca a ligação glicosídica, ou seja, de acordo com seu mecanismo de ação, podendo ser divididas em duas grandes classes: as exoamilases, atuam clivando a molécula através de sua extremidade não redutora; e as endoglucanases, agem clivando aleatoriamente ligações glicosídicas do interior da molécula (Husain, 2017). O complexo amilolítico pode compreender diversas enzimas hidrolíticas, sendo suas principais representantes α -amilase, β -amilase e amiloglucosidase (Silva et al, 2017; Vaidya et al., 2015; Chun-yen et al, 2013). As enzimas amilolíticas são vantajosas devido a sua capacidade de atuar em condições moderadas, o que nem sempre é possível ao utilizar processos químicos, por apresentarem hidrólise não específica e formação de produtos indesejáveis (Grupta et al, 2003).

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO

Espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio (EROs/ERNs), também conhecidas como radicais livres ou oxidantes, são átomos ou moléculas produzidas durante os processos metabólicos que possuem um elétron desemparelhado na última camada, ocupando um único orbital atômico ou molecular (ALVES et al., 2007; MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA et al., 2018). A formação de radicais livres é uma consequência natural do metabolismo aeróbico, tendo importante função para o metabolismo celular na transferência de elétrons em várias reações químicas, participando da manutenção da homeostase nos tecidos, sendo essencial para a produção de energia destinada as atividades biológicas (CAROCHO et al., 2018; BARBA et al., 2017; CAROCHO et al., 2018; SEIFRIED et al., 2007).

Embora extremamente importantes para impedirem o estresse oxidativo, os antioxidantes endógenos humanos não são capazes de eliminar totalmente os radicais livres produzidos, sendo necessária a busca por fontes exógenas dos compostos com essa capacidade, principalmente a partir do consumo de antioxidantes nos alimentos (CAROCHO et al., 2018). Atualmente, há um crescimento no interesse pelos antioxidantes naturais, principalmente por conta da preocupação em relação à possível toxicidade dos antioxidantes sintéticos, além do aumento da preferência dos consumidores por produtos naturais ou por produtos que contenham

menos aditivos sintéticos (CAROCHO et al., 2018; SAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). Existem vários métodos para medir a atividade antioxidante de uma determinada substância. As mais utilizadas avaliam a capacidade dos antioxidantes a partir da oxidação em um sistema modelo, monitorando as mudanças associadas utilizando meios físicos, químicos ou instrumentais. Os ensaios de eliminação radicais incluem métodos baseados em mecanismos de transferência de átomos de hidrogênio (HAT) ou de transferência de elétron único (SET). A capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) e a atividade antioxidante de captura total dos radicais (TRAP) são os principais métodos que medem o HAT; enquanto a capacidade antioxidante equivalente de trolox (TEAC), o poder antioxidante de redução do íon ferro (FRAP) e os ensaios de 2,2-difenilpicilidrazilo (DPPH) representam métodos baseados em SET. Os métodos baseados em HAT medem a capacidade clássica de um antioxidante para eliminar os radicais livres por doação de hidrogênio, enquanto os métodos baseados em SET detectam a capacidade de um determinado antioxidante para transferir um elétron para reduzir qualquer composto, incluindo metais, carbonilas e radicais livres (SAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). A produção de compostos com ação antioxidante por microrganismos apresenta algumas vantagens significativas em relação aos processos de síntese química, extração de plantas ou cultura de células vegetais, devido à rápida taxa de crescimento microbiano, pela facilidade de utilização e processamento em larga escala, além do alto custo-benefício e os benefícios meio ambiente. São três importantes compostos fenólicos de ocorrência natural com propriedades antioxidantes, anticarcinogênicas, antivirais, antimutagênicas e antiparasitárias. Vários microrganismos foram explorados para a produção ácido gálico (GA), ácido elágico (EA) e ácido ferúlico (FA) (DEYA et al., 2016).

2.4 INSETICIDA

Os inseticidas naturais, também conhecido bioinseticidas, podem substituir os agrotóxicos na luta contra algumas pragas agrícolas. Dentre os bioinseticidas, estão os produzidos por microrganismos que conseguem produzir substâncias com resultado de mecanismos de defesa desenvolvidos contra insetos predadores. Esse aspecto torna-os fontes importantes de substâncias bioativas com estruturas químicas diferentes e com diversas atividades de interesse da indústria agrícola (SÁ, 2018).

Na busca por estratégias que visem à diminuição do desenvolvimento de resistência pelos insetos, inseticidas naturais são preferíveis para o controle, uma vez que, em geral, são biodegradáveis e não exercem ou possuem menores efeitos deletérios sobre organismos não-alvo (PAIVA et al., 2013; TENNYSON et al., 2015; REDDY & ANTWI, 2016).

2.5 INSETOS PRAGA

Insetos praga são definidos como aqueles que causam danos econômicos às áreas agrícolas, florestais, agropecuárias e urbanas. Para que uma espécie seja definida como praga, deve-se levar em consideração alguns fatores como: a susceptibilidade da espécie ou do material vegetal armazenado, as condições ambientais do local, bem como a forma como o material vegetal é estocado (armazéns ou silos) (GALLO et al., 2002; CAMAROTTI et al, 2017; GETU, 2018;).

De acordo com seus hábitos alimentares, os insetos são classificados como praga primária (aqueles que atacam grão íntegro e sadio), como os gêneros *Callosobruchus*, *Sitophilus*, *Rhyzopertha*; ou praga secundária (quando o inseto ataca o grão já quebrado e danificado), que inclui os gêneros *Oryzaephilus*, *Cryptolestes*, *Cadra* e *Tribolium* (GALLO et al., 2002; GETU, 2018; CAMAROTTI et al, 2017).

Vários danos econômicos são gerados pelas perdas na produção agrícola decorrente de pragas (SALVADORI, et al., 2014; GETU, 2018). Para evitar ataques de pragas ao material vegetal armazenado, é necessário tomar várias medidas integradas que garantam a qualidade e segurança do mesmo, tais como limpeza e secagem dos grãos, manutenção da aeração, regulação da temperatura, além da aplicação de inseticidas (VIEGAS JÚNIOR, 2003).

Os inseticidas destinados a eliminar as pragas podem ser classificados em organossintéticos, inorgânicos e bioinseticidas (SANTOS, 2014). A utilização de produtos químicos orgânicos em larga escala para combate às pragas que infestam a produção agrícola ocorreu após as descobertas das propriedades inseticidas do organoclorado DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano), em 1939, sendo o seu uso difundido no processo de expansão industrial após a II Guerra Mundial (NAKAMURA, 2014).

Os inseticidas aplicados para o combate de pragas agrícolas podem ser: de contato, que agem por serem absorvidos pela pele (tegumento) do inseto; inseticidas

de ingestão, que penetram no inseto por via oral e são usados no controle dos mastigadores; inseticidas voláteis, que possuem ação por fumigação pelas vias respiratórias do inseto; inseticida de profundidade, que são os inseticidas com ação translaminar; e os de ação sistêmica, que são absorvidos e translocados para torná-la tóxica para os insetos (LAZZARI, et al. 2006; MENEZES, 2005; SANTOS et al., 2014).

O crescimento populacional avança em escala exponencial e, junto a ele, aumenta a demanda por alimentos, o que tem ocasionado o uso exacerbado de inseticidas para proteger as culturas de importância econômica e, consequentemente, aumentar a produtividade. Contudo, essa prática, junto à falta de um planejamento adequado para aplicação dos inseticidas, tem resultado em diversos problemas que incluem: morte de insetos polinizadores e outras espécies não-alvo, eliminação de inimigos naturais dos insetos-praga (que os controla naturalmente), seleção e multiplicação de indivíduos resistentes, contaminação residual em alimentos e diferentes formas de poluição ambiental (ABROL; SHANKAR 2014, FISHEL, 2014).

Diante deste panorama, estudos envolvendo a produção de inseticidas biológicos têm sido desenvolvidos, considerando a necessidade de se obter novos compostos para controle de insetos vetores de doenças e pragas agrícolas que não resultem em contaminação ambiental, depósito de resíduos nos alimentos, efeitos prejudiciais sobre populações de insetos benéficos, como os polinizadores (HATTING et al., 2018; CAMAROTTI et al, 2018).

Como a aplicação de inseticidas químicos em culturas para controle de insetos nocivos tornou-se perigosa para o meio ambiente e para a saúde humana, muitos esforços têm sido orientados para alterar seu uso para métodos de controle alternativos mais ecológicos e seguros.

2.5.1 SITOPHILUS ZEAMAI

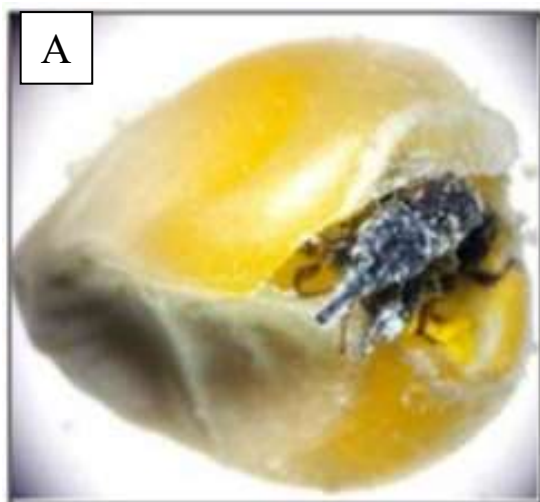
A espécie *S. zeamais* (Ordem Coleoptera, Família Curculionidae) é conhecido popularmente como gorgulho do milho e apresenta grande importância econômica em regiões tropicais e subtropicais, pois infesta uma grande variedade de cultivos e estoques de grãos como milho e arroz, e frutos como maçã, pêssegos e uvas (BOTTON et al., 2005; NOOMHORM et al., 2013; SULEIMAN et al., 2015). *S. zeamais* apresenta elevado potencial de multiplicação e a postura dos ovos pela fêmea é feita

no grão onde a larva completa o seu desenvolvimento, passa ao estágio de pupa até a emergência do adulto no seu interior (Figura 6a). As fêmeas vivem em média 140 dias dos quais 104 dias correspondem ao período de oviposição, e o número médio de ovos por fêmea é de 282.

O período de incubação oscila entre 3 e 6 dias e o ciclo de ovo até a emergência de adultos é de 34 dias. As larvas apresentam coloração amarelo-clara e cabeça marrom-escura, e as pupas são brancas. Adultos de *S. zeamais* (Figura 6B) possuem de 2 a 3,5 mm de comprimento, cor castanho-escura e manchas mais claras nas asas anteriores (élitros). Sua cabeça é projetada para frente e o rostro curvado. Insetos machos têm o rostro mais curto e grosso enquanto nas fêmeas é mais longo e afilado (BOTTON et al., 2005; LORINI et al., 2015).

O gorgulho do milho apresenta infestação cruzada, ou seja, podem infestar sementes no campo e também no armazenamento, onde penetram profundamente na massa de grãos (FAZOLIN et al., 2010). Na busca de alimentos que garantam energia para a oviposição, os insetos infestam grãos ricos em carboidratos tais como trigo, arroz, cevada e aveia. Uma vez dentro dos grãos, os insetos fazem a postura dos ovos que se desenvolvem em pupa e se transformam em novos adultos (BOTTON et al., 2005; LORINI et al., 2010).

Figura 6. (A) Inseto se desenvolvendo dentro do grão de milho e (B) inseto adulto de *Sitophilus zeamais*.



Fonte: O autor

Classificados como uma praga primária, os *S. zeamais* são considerados um dos insetos mais prejudiciais pelo fato de perfurarem e penetrarem os grãos para completar o seu desenvolvimento e assim provocar infestações generalizadas (LORINI, 2017). A praga de gorgulho do milho tem sido cada vez mais comum, devido à expansão de produção de grãos no setor de agrícola e aumento da sua estocagem (NEUMANN et al., 2010; BETA & ISAAK, 2016; FLEURAT-LESSARD, 2016).

O *S. zeamais* infesta diversas variedades de milho e como consequências ao ataque existem perda de peso do grão, perda do poder germinativo, perda do valor nutritivo, redução do padrão comercial e contaminação da massa do grão de milho (SANTOS, 2006; SULEIMAN et al., 2015). O controle de *S. zeamais* é realizado através do uso de inseticidas químicos por meio de técnicas de fumigação e pulverização. No entanto, o uso prolongado e excessivo desses compostos favorece a proliferação de indivíduos resistentes (MONDAL & KHALEQUZZAMAN 2010; NAPOLEÃO et al., 2015; LIANG et al., 2016).

2.6 APROVEITAMENTO DE RESIDUO DA INDUSTRIA DE CAMARÃO

Os resíduos são subprodutos e/ou sobras do processamento de alimentos de valor econômico relativamente baixo. O aproveitamento dos resíduos industriais representa fonte potencial para obtenção de ingredientes para o processamento de ração animal, de alimentos para humanos e produção de enzimas de interesse industrial. A necessidade de implantar sistemas de aproveitamento de resíduos industriais é embasada em fatores econômicos e ambientais através da otimização de processos e do desenvolvimento de novos produtos a partir dos resíduos líquidos ou sólidos provenientes das etapas de processamento dos mais variados alimentos.

Os resíduos de alguns crustáceos, dependendo da espécie e do processamento, chegam a atingir 85% do peso inicial. A espécie *Litopenaeus vannamei*, o cefalotórax e a casca correspondem aproximadamente 40% de seu peso total, o qual geralmente continua sendo descartado pelas unidades beneficiadoras, sem qualquer tipo de aproveitamento tecnológico (GILDBERG, 2001; SEIBEL E SOUSA, 2003).

Estes descartes, comumente desperdiçados, representam um sério problema para a indústria, pois são de difícil disposição e fácil deterioração quando não são

devidamente manipulados, interferindo nos custos e na eficiência de produção, além de causar poluição ambiental. Em geral, esses resíduos são clandestinamente enterrados ou jogados no mar ou em rios, ocasionando problemas ao meio ambiente, uma vez que se trata de um poluente com difícil descarte (ASSIS et. al. 2008). Deste modo, evidencia-se a importância desta pesquisa para o aproveitamento de resíduos sólidos, gerados nas indústrias de beneficiamento do camarão, como a produção de uma farinha da casca de camarão para ser utilizada como fonte de carbono na produção de quitinase pelo *Aspergillus sp.*

2.7 MALDI-TOF

Na espectrometria de massa, a desorção / ionização por laser assistida por matriz (MALDI) é uma técnica de ionização que utiliza uma matriz de absorção de energia laser para criar íons a partir de moléculas grandes com fragmentação mínima (Hillenkamp, 1991).

Nas últimas décadas, o MALDI TOF tornou-se uma das ferramentas mais poderosas para a análise de biomoléculas. O princípio geral da MS é produzir, separar e detectar íons em fase gasosa. O MALDI como princípio para análise de grandes biomoléculas foi introduzido por Karas e Hillenkamp. Em resumo, a amostra é incorporada na estrutura cristalina de pequenos compostos orgânicos (matriz) e depositada em um suporte de amostra condutor. Os cocteryis são irradiados com um raio laser de nanosegundo, por exemplo, um laser ultravioleta (UV) com um comprimento de onda de 266 ou 337 nm. As energias introduzidas estão na gama de 1×10^7 a 5×10^7 W / cm². A energia do laser causa a decomposição estrutural do cristal irradiado e gera uma nuvem de partículas (a pluma) a partir da qual os íons são extraídos por um campo elétrico. O mecanismo por trás do processo de desorção não é totalmente compreendido. Pode ser mais bem descrito como uma conversão da energia do laser para a oscilação vibratória das moléculas de cristal. Isso resulta na desintegração do cristal. Após a aceleração através do campo elétrico, os íons derivam através de um caminho livre de campo e, finalmente, alcançam o detector (multiplicador de elétrons secundário ou placa de canal). As massas de íons (taxas de massa a carga [m / z]) são tipicamente calculadas medindo o TOF, que é mais longo para moléculas maiores do que para menores (desde que suas energias iniciais sejam idênticas). Como os íons predominantemente carregados, não fragmentados são

gerados, as massas de íons parentais podem ser facilmente determinadas a partir do espectro resultante sem a necessidade de processamento de dados complexo. (Hillenkamp, 1991). As massas são acessíveis como dados numéricos para processamento direto e análise subsequente. Os TOF medidos durante um experimento típico MALDI estão no intervalo de vários microsegundos (Jurinke, 2004).

Segundo JURINKE (2004) a Dessorção a laser assistida por matriz ionizante-espectrometria de massa por tempo de voo (maldi-tof) identifica com precisão bactérias e fungos selecionados em situações clínicas selecionadas. Na qual no atual momento está sendo avaliada para uso rotineiro hospitalar.

ARTIGO I

Hydrolytic activity of enzymes produced by fungi isolated from drinking mineral water

Este artigo foi submetido a jornal Internacional: **Journal of Applied Biology and Biotechnology**

Title: Hydrolytic activity of enzymes produced by fungi isolated from drinking mineral water

Specific subject area: Biotechnology

Author names and affiliations:

Raphael Carlos Ferrer de Santana^a, Thales Henrique Barbosa de Oliveira^a, Camila Beatriz Atanásio Borba^a, Luana Maria Cavalcanti Teixeira^a, Patrícia Barbosa Rodrigues Silva^a, Thiago Ubiratan Lins e Lins^b, Leonor Alves de Oliveira da Silva^a, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^{c*}.

^aLaboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial – LAMAI, Departamento de Antibióticos, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil

^bLaboratório de Pesquisa em Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas - LINAT, UFPE, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil

^cLaboratório de Bioquímica de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, UFPE, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil

Corresponding Author:

lcbbcoelho@gmail.com (L.C.B.B. Coelho)

Laboratório de Bioquímica de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil

Abstract

The use of fungi for enzyme production has attracted interest in the research of microorganisms from varied sources; among these, mineral water has become a choice, since there are many polluted water supplies. This study aimed to obtain chitinase, xylanase and amylase enzymes yielded by fungi isolated from mineral water. In the qualitative evaluation the degradation halo production for three enzymes was observed among the studied microorganisms; the strain 98 (*Aspergillus fumigatus*) showed best enzyme activity for xylanase at 72 h (15.73 U/mL), chitinase at 24 h (6.95 U/mL) and amylase at 48 h (0.65 U/mL). The highest specific activity was obtained for xylanase at 72 h (7.35 U/mg protein), chitinase at 24 h (3.05 U/mg protein) and amylase at 48 h (9.55 U/mg protein). The drinking mineral water proved to be a microorganism source to produce industrial interest enzymes.

Keywords: drinking mineral water; enzyme; chitinase; xylanase; amylase.

1 INTRODUCTION

According to the Brazilian legislation that regulates the drinking mineral water commercialization throughout the national territory, mineral water is defined as those samples obtained directly from natural or artificial sources of underground origin. These are determined by the defined and constant content of mineral salts, the presence of trace elements and, in addition, to limiting maximum levels of polluting substances with the intention of not being harmful to consumers [1]

The crescent mineral water consumption is mainly related to the progressive water pollution [2]. Among various fungi predominant in mineral water are *Oomycetes* and *Hyphomycetes* genus [3]. However, there is a significant presence of *Aspergillus*, *Penicilium*, *Cladosporium*, *Curvularia* and *Fusarium*, which are closely related to human and animal pathogens, arousing the interest in the search for different studies such as enzyme production.

Enzymes are protein biomolecules capable of accelerating reactions, widely investigated; their applications vary according to the reaction type catalyzed as well as the product obtained. According to the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, enzymes are classified into six major groups: Oxidoreductases, Transferases, Hydrolases, Liases, Isomerases and Ligases [4].

Many enzymes used are naturally biosynthesized by microorganisms, which are the easiest source of production, especially filamentous fungi, applied in a range of industrial processes such as food and beverage, drug synthesis, paper, textile and detergent manufacturing, cosmetology and biofuels [5]. Filamentous fungi are recognized as the largest enzyme producer, holding this denomination due to low demands on growing conditions; they are able to secrete the enzymes that are characteristically required by large-scale procedures. The excreted enzymes mentioned are amylases, proteases, lipases, cellulases, hemicellulases, xylanases and hydrolytic enzymes, widely used in industrial processes as food supplement, biopulping and directed composting [5].

Xylanases are enzymes capable of hydrolyzing xylan, the most abundant hemicellulose in plants; they are used in food, textile, beer and biofuel industries [6–8]. Chitinases are responsible for cleaving O-glycosidic bonds between the C1 and C4 carbons of the β -1,4-N-acetylglucosamine (GlcNAc) residues, constituents of the chitin

polymer. Chitinases have a great interest in the agricultural and livestock industry being capable to degrade insect carapace and cell wall of pathogenic fungi [9,10].

Thus, it is necessary to intensify the search for new production sources of microorganisms in order to reduce costs, improve processes and product capture, promoting a sustainable development with the concomitant economic rise [4,11]. This study evaluated the ability of seventy-two fungal strains isolated from drinking mineral water to excrete amylolytic, xylanolytic and chitinolytic enzymes in liquid fermentation medium.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Production of hydrolytic enzymes from fungi selection

2.1.1 Amylase, xylanase and chitinase qualitative assays

The same methodology with different carbon sources was used for the qualitative enzyme assays. Initially, 72 fungal strains were sown in a central colony and incubated for 48 h at 30 °C in a petri dish containing starch or xylan oat or shrimp peel (8 g/L carbon source, 15 g/L agar). The fungi capable of producing enzymes were selected using the method of enzymatic degradation halos visualized with dye solution addition in culture medium according to analyzed enzyme: iodine vapors for amylase and chitinase. Red Congo (1 g/L) was used for xylanase, as an indicator of substrate degradation by the enzyme aiming the development of degradation halo around the colony [12].

2.2.2. Stationary liquid fermentation and enzymatic excretion

After performing the qualitative test with 72 fungal strains (item 2.1.1), only the strains 4, 13, 18, 22, 29, 43, 52 and 98 presented degradation halos for the three studied enzymes. These were subjected to fermentations in liquid medium containing as carbon source their respective inducers for each enzyme (amylase starch, xylan for xylanase and chitin for chitinase); 3 gelose blocks (8 mm in diameter) that were transferred to Erlenmeyer flasks (125 mL) containing 30 mL of modified Czapeck medium with the addition of 10 g/L starch (xylanase) or shrimp shell (chitinase). The amount of gelose blocks corresponded to the 100 g/L proportion of the culture medium total value used in each vial. After fermentation (96 h) at 30° C the material was centrifuged at 16.800 g for 7 min; the supernatant was packed into 2 mL microtubes and kept at a temperature of approximately -2° C and then subjected to the respective enzymatic and protein dosages. All assays were performed in triplicate.

3 Amylolytic activity determination

The amylolytic saccharifying enzyme activity was analyzed according to a modified MILLER (1959) method [13]. The determination was carried out with 60 µl of enzyme extract added to 100 µl of starch 10g/L (prepared in 50 mM sodium acetate buffer, pH 6.0). To react, the material was incubated at 40° C for 30 min. Then 250 µL of DNS was added and the entire mixture was exposed at 100° C for 5 min. After, 1000 µL of deionized water was added and samples were read in a spectrophotometer (Evolution™ 60S UV-Visible Spectrophotometer® manufactured by Thermo Fisher

Scientific) at 550 nm. One unit of activity was defined as the amount of enzyme capable of releasing one μmol of glucose per min.

4 Xylanolytic activity determination

The xylanolytic activity was determined by detecting the formation of reducing sugars (xylooligosaccharides) from Birchwood xylan using the DNS method described by MILLER (1959). For the determination of xylanolytic activity, 125 μL of enzymatic extract plus 125 μL of xylan 10 g/L (prepared in sodium acetate buffer at a concentration of 50 mM and pH 5.5) was added. The material was incubated at 50° C for 10 min. Then 250 μL of 3,5-dinitroxylic acid (50 mL of NaOH (2N), 2.5 g of dinitrosalicylic acid, 250 mL of distilled water, and 75 g of sodium and potassium double tartrate) were added and heated at 100° C for 5 min, after adding 1000 μL of deionized water and reading at 540 nm in a spectrophotometer (Evolution60 manufactured by ThermoScientific®). One unit of activity was defined as the amount of enzyme capable of releasing one μmol xylose per min.

5 Chitinolytic activity determination

The chitinolytic activity was determined by the hydrolysis detection of the glycosidic bonds between the N-acetylglucosamine molecules (GlcNAc), liberating oligomers and/or GlcNAc monomers from chitin using the DNS method described by MILLER (1959) [13]. For chitinolytic activity determination, 250 μL of enzymatic extract plus 250 μL of Sigma® standard 1% (m/v) colloidal chitin (prepared in 50 mM sodium acetate buffer pH 5.0) was incubated at 37° C for 60 min. Then 250 μL of 3,5-dinitroxylic acid (50 mL of NaOH (2N), 2.5 g of dinitrosalicylic acid, 250 mL of

distilled water, and 75 g of sodium and potassium double tartrate) was added and heated at 100 ° C for 5 min. Then 1000 µL of deionized water was added and reading at 540 nm in a spectrophotometer (Evolution60 manufactured by ThermoScientific®). One unit of activity was defined as the amount of enzyme capable of releasing one µmol of N-acetylglucosamine per min.

6 Total protein determination

Initially, protein concentration was determined using the method described by BRADFORD (1976) [14] with bovine serum albumin as standard [15]. All assays were performed in triplicate.

The isolates were submitted to protein extraction analysis by mass spectrometry (MALDI-TOF Autoflex III Bruker Laser nd: yag smartbeam, Bruker Daltonics Inc., USA / Germany). The microorganism colony surface material (spores and mycelium were used to identification. Briefly, after protein extraction, the supernatant (1 µl) was placed in duplicate on a steel plate, dried at room temperature at 25 °C. Thereafter, each sample was coated with matrix solution (1 µl), which consists of an α -cyano-4-hydroxy cinnamic acid saturated solution (HCCA) in 50% acetonitrile and 2.5% trifluoroacetic acid (final concentration: 10 mg HCCA/ml) and dried at room temperature at 25 °C. The MALDI-TOF MS polished steel target plate was subsequently introduced into the mass spectrometer to obtain the protein spectra, which were obtained through a 1064 nm. The laser intensity was adjusted slightly above the threshold for ion production. A protein calibration standard I (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) with known proteins mass values were used for calibration. The mass variation between 2.000 and 20.000 Da was recorded using linear mode with 104 ns pulse at a voltage of +20 kV.

The peak list obtained was exported to Biotyper™ software (Biotyper system, version 3.0) where the final identifications were determined.

7 RESULTS AND DISCUSSION

The microorganism identification by MALDI-TOF MS occurred through the obtained spectra that were analyzed by an algorithm, which were compared with the raw spectra and with the Biotyper™ version 3.1 database (BrukerDaltonics, Germany / USA) spectra. The tested isolates were the species level identified with a score of ≥ 2.0 . When the identification presented a score below 2.0, a new protein extraction of the isolate was performed to confirm the result. The identification report of isolates presented the best scores of 2.038 and 1.99 (MALDI Biotyper Software version 3.1).

In the first step of the 72 fungal strain selection in agar plates containing starch or xylan or shrimp shell (item 2.1.1), 11.11% of strains (4, 13, 18, 22, 29, 43, 52 and 98) had highlighted capacity to degrade the mentioned carbon sources (Table 1), which were later submitted to fermentative processes to evaluate the ability to excrete the xylanases, chitinases and amylases enzymes in liquid fermentation medium. Among the 8 strains, only one (strain 98) produced a halo degradation of better quality of visualization, as showed in **Figure 1**. The enzyme quantitative detection by the DNS method described by MILLER (1959) [13] was necessary in order to quantify the enzymatic units synthesized by the release of 1 mol of reducing sugar/min/mL.

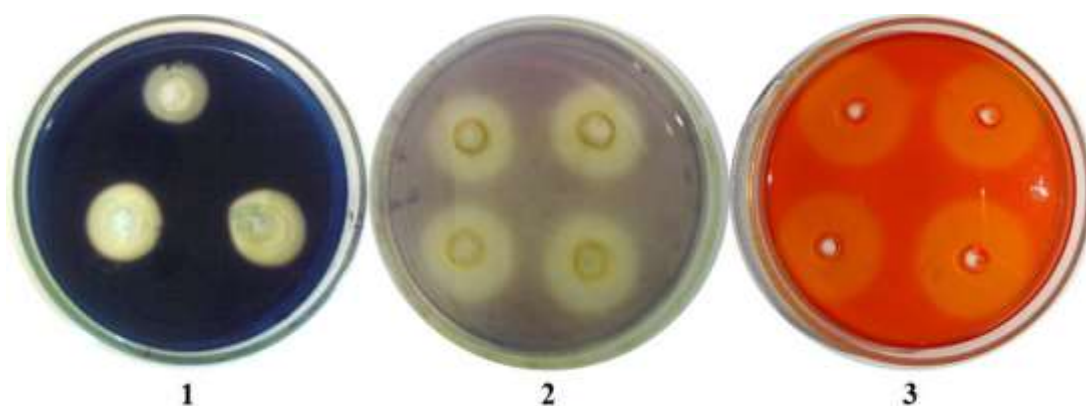


Figure 1: Starch (1) chitin, (2), and xylan (3) degradation halos produced by strain 98.

The fungal strain 98 (*Aspergillus fumigatus*) obtained the highest enzymatic activity for the three enzymes studied, presenting values of 4.777 U/mL for xylanase; 5.646 U/ml for chitinase and 3.575 U/ml for amylase (**Table 1**).

Table 1: Enzymatic activity values (U/mL) of xylanases, chitinase and amylase produced by filamentous fungi isolated from mineral water in modified Czapeck liquid medium after 48 h at 30° C in stationary condition.

Strains number	Xylanases (U/mL)	Chitinases (U/mL)	Amylases (U/mL)
4	0.411	0.046	0.359
13	0.322	0.007	0.535
18	0.466	0.262	0.385
22	0.353	0.264	0.182
29	0.392	0.327	0.029
43	0.572	0.124	0.444
52	0.213	0.156	0.463
98	4.777	5.646	3.575

MENDES et al. (2015), in their study on the production of hydrolytic enzymes from fungi isolated from Amazonia, obtained 26 amylase-producing fungi and 16 with xylanase activity [16].

SHARAF et al. (2005) isolated nine species of chitinolytic fungi from the Rosetta coast black Egyptian sand [17]. JENIN et al. (2016) isolated ten *Artemis* fungi strains from the Kanyakumari District in India, where five showed chitinolytic activity [18].

Among the enzymatic activities assayed in the present study, strain 98 had a highlighted xylanolytic production that was considered the second better of this study, when compared to a study performed by BONUGLI-SANTOS et al. (2015), where *A. niger* xylanase production (5.80 U/mL) was approximately three times higher [19]. CARVALHO et al. (2015) using cane bagasse as a substrate for *A. fumigatus* xylanase production in submerged fermentation at pH 5.5 and temperature of 25° C obtained enzymatic activities around 5.0 U/mL, corroborating with results found in the present study [20].

The amylolytic activity of strain 98 was higher when compared to the results obtained by RODRIGUES et al. (2017) using *Aspergillus niger* as enzymatic producer microorganism. In this study samples from submerged fermentation and solid state, presented 0.79 U/mL and 1.63 U/mL activities, respectively [21]. ALMEIDA et al. (2017) showed very different results for the amylases produced by the studied fungi [22]. The *R. oryzae* had an enzymatic activity (3.0 U/mL) which was lower than strain 98; furthermore the *A. brasiliensis* had an activity approximately of 4.0 U/mL corroborating with our study.

The production of xylanases, chitinases and amylases was induced by the presence of nutrients in the substrates as well as fermentation time. The fungal strain

98 was fermented in modified Czapeck liquid medium containing inducing substrates and the fermentation time was studied aiming better enzymatic productivity.

The enzymatic production results from the xylanolytic complex excreted by the fungal line 98 isolated from mineral water were presented in **Figure 2**, showing a peak activity at 72 h of culture with 15.73 U/mL and 7.35 U/mg of protein values; activity declined starting from the subsequent 24 h to the 144 h test end time. The enzymatic activity decline maybe is due to the sugar release in the culture medium and its use by the fungus. In this way, the new enzyme synthesis and secretion is not necessary to hydrolyze the substrate.

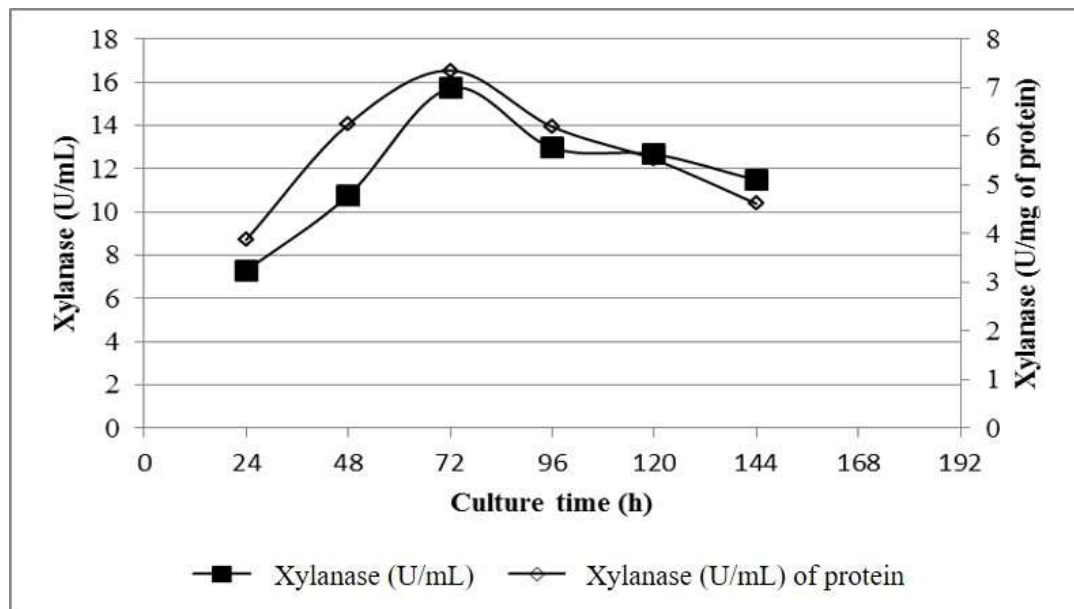


Figure 2: Enzymatic kinetics of xylanase excreted by strain 98 (*A. fumigatus*) in liquid steady-state fermentation at 30° C, using oat xylan as the carbon source.

BAJAJ and ABBASS (2011) reported xylanase production by the fungus MA 28 that exhibited enzymatic activity values equivalent to 7.5 U/mL with an enzymatic activity peak at 168 h after the fermentation test beginning [23]. LIU et al. (2013)

identified xylanase production peaks with mean enzyme activity of 13 U/mL [24]; strain 98 of this work had enzymatic activity of 15.74 U/mL at 72 h of incubation.

The kinetic study of the chitinolytic complex production (Figure 3) showed the relationship between quantification and enzymatic and specific activity of strain 98 where the best production time was 24 h with 3.05 U/mL and 6.95 U/mg protein. It is suggested that the enzymatic activity decline is due to the sugar release in the culture medium and its use by the fungus.

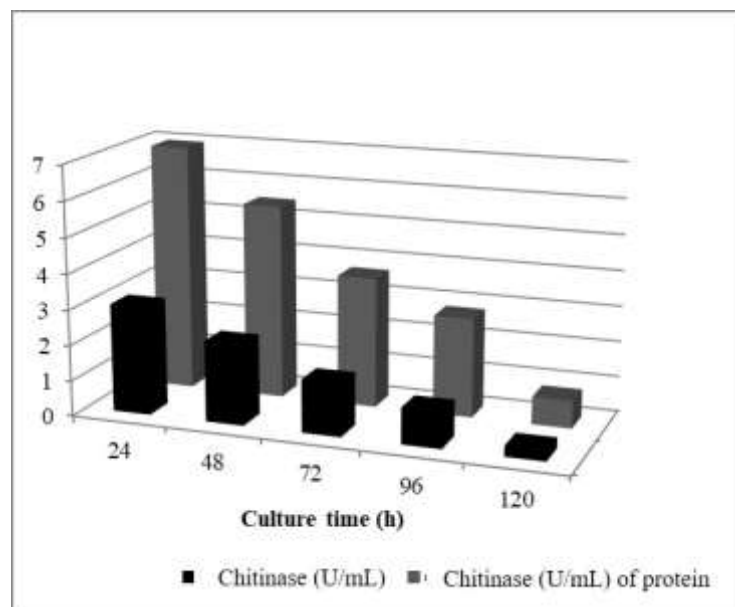


Figure 3: Enzymatic kinetics of chitinase excreted by strain 98 (*A. fumigatus*) in steady liquid fermentation at 30°C using shrimp shell as carbon source.

According to FLEURI et al. (2009) studying the production, purification and application of chitinase isolated from *Cellulosimicrobium cellulans* 191, an enzymatic activity of 6.9 U/mL during 72h of incubation was obtained [25]. WAGHMARE et al. (2010) observed the thermostatic chitinase of *Oerskoviaxanthi neolytica* NCIM 2839; it achieved a maximum chitinase production peak at 72 h and a best production period of 24 h [26].

The enzymatic complex excreted from static liquid fermentation by strain 98 for a period of 168 h revealed a peak concerned to amylolytic complex enzyme production after completing 48 h of culture, with amylolytic activity of 0.65U/mL and 9.53 U/mg protein. Then, an enzymatic activity decay of approximately 50% occurred with 96 h of fungal culture (**Figure 4**).

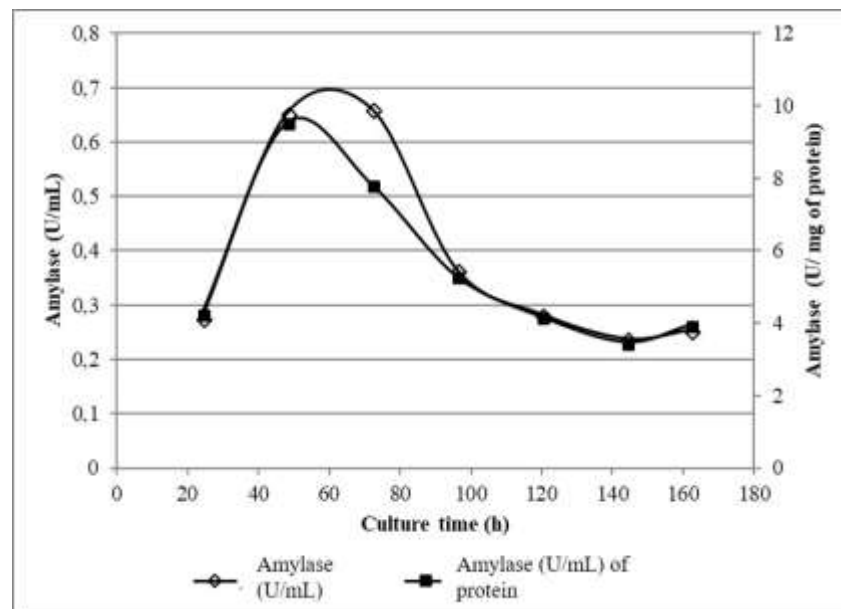


Figure 4: Enzymatic kinetics of amylase excreted by strain 98 (*A. fumigatus*) in liquid steady-state fermentation at 30° C, using soluble starch as the carbon source.

When soybean residues were used as an inducing source for amylase production, it was obtained an enzymatic production peak at 48 h to *Penicillium spp.* culture, with amylolytic activity corresponding to 0.13 U / mL [27], lower than those achieved in the present study. ZAFERANLOO et al. (2014) used soluble starch as a carbon source and the filamentous fungus *Preussia minima* to produce the same enzyme, obtaining specific activity of 47 U/mg of protein. However this was obtained after 120 h of the fermentation beginning [28]. We had a smaller activity but reaching enzyme activity in less than 48h.

Fungi isolated from mineral water produced the hydrolytic enzymes amylase, chitinase and xylanase by different carbon sources of low cost, through liquid fermentation, with potential industrial interest.

The fungi isolated from mineral water are hydrolytic enzyme producers of industrial interest. Different carbon sources were used for the hydrolytic enzyme production, with a low cost. In this way, these sources can be used in industrial application becoming a viable alternative for enzyme hydrolytic production.

8 CONCLUSIONS

Mineral water can be conceptualized as a natural source of substances and microorganisms of various species; among them the filamentous fungi. This group produced and excreted enzymes with hydrolytic activity providing amylolytic, xylanolytic and chitinolytic activities according to the substrates in the medium. In our work, we confirmed the presence of these enzymes in mineral water and, at the same time, we characterized the amylolytic, xylanolytic and chitinolytic activities using specific methodology. Thereby, we highlight the importance of these microorganisms in nature, when the enzymes degrade the substrates present in the medium functioning as a controller of substrates mainly in water. Then, our study confirmed that hydrolytic enzymes could be produced from these fungi species using different carbon sources as substrates opening a potential industrial application in a low cost process.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the Fundação de Amparo à Ciência do Estado de Pernambuco (FACEPE) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for grants; LCBBC is grateful to fellowship (CNPq).

REFERENCES

1. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 274, de 22 de setembro de 2005 - REGULAMENTO TÉCNICO PARA ÁGUAS ENVASADAS E GELO. Brasil: 2005.
2. Leclerc H, Moreau A. Microbiological safety of natural mineral water. *FEMS Microbiol Rev* 2002;26:207–22.
3. Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. *Introductory Mycology*. 4ª Edição. New York: John Wiley & Sons Inc.; 1996.
4. Sarrouh B. Up-to-date insight on industrial enzymes applications and global market. *J Bioprocess Biotech* 2012;s1:1–10.
5. Pandey A, Soccol CR, Mitchell D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochem* 2000;35:1153–69.
6. Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001;56:326–38.
7. Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005;67:577–91.
8. Harris AD, Ramalingam C. Xylanases and its application in food industry: a review. *J Exp Sci* 2010;1:1–11.
9. Asenjo JA, Andrews BA. Enzymatic cell lysis for product release. *Bioprocess Technol* 1990;9:143–75.
10. Salazar O, Asenjo JA. Enzymatic lysis of microbial cells. *Biotechnol Lett* 2007;29:985–94.
11. Johnson FS, Obeng AK, Asirifi I. Amylase production by fungi isolated from Cassava processing site. *J Microbiol Biotechnol Res Sch Res Libr J Microbiol*

- Biotech Res 2014;4:23–30.
12. Teather RM, Wood PJ. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Appl Environ Microbiol 1982;43:777–80.
 13. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem 1959;31:426–8.
 14. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248–54.
 15. Simonian MH. Spectrophotometric determination of protein concentration. Curr Protoc Cell Biol 2002;15:A.3B.1-A.3B.7.
 16. Marta MG da SM, Salony AP, Rafael L e O, Leonor A de O da S, Sergio DJ, Patricia MA. Screening of Amazon fungi for the production of hydrolytic enzymes. African J Microbiol Res 2015;9:741–8.
 17. Sharaf EF. A potent chitinolytic activity of *Alternaria alternata* isolated from Egyptian black sand. Polish J Microbiol 2005;54:145–51.
 18. Jenin GA, Babu MM, Murugan M, Murugan T. Isolation and identification of chitinase producing native fungi from Saltpan of Puthalam, Kanyakumari District, Tamil Nadu, India. J Appl Biol Biotechnol 2016;4:1–5.
 19. Bonugli-Santos RC, dos Santos Vasconcelos MR, Passarini MRZ, Vieira GAL, Lopes VCP, Mainardi PH, et al. Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. Front Microbiol 2015;6.
 20. Azevedo Carvalho AF, de Oliva Neto P, Zaghetto de Almeida P, Bueno da Silva J, Escaramboni B, Pastore GM. Screening of xylanolytic aspergillus fumigatus for prebiotic xylooligosaccharide production using bagasse. Food Technol

- Biotechnol 2015;53:428–35.
21. Rodrigues ÉF, Ficanha AMM, Dallago RM, Treichel H, Reinehr CO, Machado TP, et al. Production and purification of amylolytic enzymes for saccharification of microalgal biomass. *Bioresour Technol* 2017;225:134–41.
 22. Almeida PZ de, Pereira MG, Carvalho CC de, Heinen PR, Ziotti LS, Messias JM, et al. Bioprospection and characterization of the amylolytic activity by filamentous fungi from Brazilian Atlantic Forest. *Biota Neotrop* 2017;17:0–5.
 23. Bajaj BK, Abbass M. Studies on an alkali-thermostable xylanase from *Aspergillus fumigatus* MA28. *3 Biotech* 2011;1:161–71.
 24. Liu D, Li J, Zhao S, Zhang R, Wang M, Miao Y, et al. Secretome diversity and quantitative analysis of cellulolytic *Aspergillus fumigatus* Z5 in the presence of different carbon sources. *Biotechnol Biofuels* 2013;6:149.
 25. Fleuri LF, Kawaguti HY, Sato HH. Production, purification and application of extracellular chitinase from *Cellulosimicrobium cellulans* 191. *Brazilian J Microbiol* 2009;40:623–30.
 26. Waghmare SR, Ghosh JS. Study of thermostable chitinases from *Oerskovia xanthineolytica* NCIM 2839. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;86:1849–56.
 27. Cunha JRB, Santos FCP dos, Assis FG do V de, Leal PL. Cultivo de *Penicillium spp.* em resíduos da colheita de soja para produção de celulase, protease e amilase. *Rev Ceres* 2016;63:597–604.
 28. Zaferanloo B, Bhattacharjee S, Ghorbani MM, Mahon PJ, Palombo EA. Amylase production by *Preussia minima*, a fungus of endophytic origin: optimization of fermentation conditions and analysis of fungal secretome by LC-MS. *BMC Microbiol* 2014;14:55.

ARTIGO II

OBTENÇÃO DE QUITINASE EXTRACELULAR DE *Aspergillus* sp. UTILIZANDO RESÍDUO DE CAMARÃO

Raphael Carlos Ferrer de Santana^a, Erik Jonn Vieira de. Melo^a, Thales Henrique Barbosa de Oliveira^a ;Pérsio Alexandre da Silva^a ; Norma Buarque de Gusmão^a, Leonor Alves de Oliveira da Silva^a, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^{b*}.

^aLaboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial – LAMAI, Departamento de Antibióticos, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil

^bLaboratório de Bioquímica de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, UFPE, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil

RESUMO

Os resíduos/efluentes são subprodutos e/ou sobras do processamento de alimentos de baixo valor agregado. O aproveitamento dos resíduos industriais representa fonte potencial para obtenção de ingredientes para o processamento de ração animal, de alimentos para humanos e produção de enzimas de interesse industrial. O objetivo deste trabalho foi melhor compreender os parâmetros para aumentar a produção de quitinase excretada pelo *Aspergillus fumigatus*, utilizando como substrato indutor resíduo de camarão. No presente estudo visa aumentar a produção do complexo quitinolítico com realização um planejamento fatorial 2² e após os resultados obtidos um novo planejamento do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR). Em seguida, foi realizado a composição centesimal da farinha de resíduo de camarão. A melhor produção ocorreu com os resultados obtidos na otimização da atividade da quitinase foram os ensaios (7) com concentração da farinha de 2,5% e sem condição estática, com valores de atividades 0,4869 U/mL e 0,7016 mg de proteína/mL. A composição centesimal da farinha mostra o teor de Umidade de 8,37%, de Cinzas de 33,88%, de Proteína de 36,48% e de Lípidios de 0,44% na amostra. Portanto, os resultados obtidos da como o planejamento para produção da enzima quitinase, mostrara dados extremamente importante para a indústria biotecnológica, apresentando assim a viabilidade e confiabilidade do estudo realizado.

Palavras chaves: Planejamento DCCR. Quitinase.

1 INTRODUÇÃO

Conhecidas como catalisadores biológicos, as enzimas, tem o diferencial de aumentam a velocidade das reações químicas. As reações mediadas pelas enzimas, resultam em produtos com elevado nível de pureza tornando-se atrativas por conseguem minimizar a produção de subprodutos indesejáveis. A utilização industrial vem sendo motivada pela necessidade do desenvolvimento de processos que gerem produtos de qualidade por tecnologias limpas (BAPTISTA et al, 2012).

As enzimas de fontes microbianas têm maior preferência no mercado por apresentar maior facilidade e menor tempo de produção (REDDY et al. 2003, CELESTINO et al. 2014). Dentro deste campo os fungos representam os microrganismos mais promissores, pois desempenham importante papel no processo de bioconservação, visto que podem reduzir a quantidade de resíduos, minimizar a poluição e formar produtos de interesse às indústrias, englobando a farmacêutica, agrícolas e têxtil (ACOSTA et al., 2017; GONZÁLEZ, 2012; CRUZ et al., 2011)

As quitinases são glicosil hidrolases de massa molecular na faixa de 20-90 kDa e atuam no processo de hidrólise da quitina (HAMID et al., 2013). Baseado no modo de ação, podem ser classificadas em dois grupos: endoquitinases e exoquitinases (HAMID et al., 2013; RATHORE; GUPTA, 2015).

Em fungos, as quitinases agem na manutenção estrutural para o remodelamento da parede celular desempenhado pelo balanço entre a lise e síntese de quitina, germinação e diferenciação de esporos, na autólise das hifas, em funções nutricionais para degradação de quitina exógena, no ataque a outros fungos (micoparasitismo) e insetos (fungos entomopatogênicos) e na divisão celular em leveduras (BHATTACHARYA; NAGPURE; GUPTA, 2007).

As quitinases possuem uma vasta gama de aplicações biotecnológicas, variando desde tratamentos de resíduos quitinosos, aplicações médicas para a obtenção de quitoligossacarídeos, para a produção de protoplastos para fins de estudos e até mesmo para o biocontrole de pragas na agricultura (PATIL; GHORMADE; DESHPANDE, 2000; RATHORE; GUPTA, 2015; STOYKOV; PAVLOV; KRASTANOV, 2015).

Enzimas que despertam interesses industriais são principalmente aquelas que hidrolisam polímeros insolúveis (MANDIGAN et al., 2012). As quitinases estão entre essas enzimas, possuindo uma gama de aplicações que vão desde a degradação

eficiente e não poluente de resíduos quitinosos (grandes poluidores de regiões costeiras), até o combate de fitopatógenos, sendo esses, fungos (por possuírem quitina na parede celular), ou insetos (por possuírem quitina no exoesqueleto) (KUMAR, 2000; DAHIYA; TEWARI; HOONDAL, 2006; GOHEL et al., 2006).

Os produtos da ação enzimática sobre a quitina também possuem aplicações. Os monômeros GlcNAc, por exemplo, são utilizados em produtos alimentícios como prébióticos, promovendo o crescimento de bifidobactérias (KUMAR, 2000). Alguns quitoooligosacarídeos, por sua vez, podem ser utilizados em curativos, mimetizando a estrutura ordenada do tecido e facilitando a agregação de plaquetas (OKAMOTO et al., 2003).

os resíduos de alguns crustáceos, dependendo da espécie e do processamento, chegam a atingir 85% do peso inicial. A espécie *Litopenaeus vannamei*, o cefalotórax e a casca correspondem aproximadamente 40% de seu peso total, o qual geralmente continua sendo descartado pelas unidades beneficiadoras, sem qualquer tipo de aproveitamento tecnológico (GILDBERG, 2001; SEIBEL E SOUSA, 2003).

Estes descartes, comumente desperdiçados, representam um sério problema para a indústria, pois são de difícil disposição e fácil deterioração quando não são devidamente manipulados, interferindo nos custos e na eficiência de produção, além de causar poluição ambiental. Em geral, esses resíduos são clandestinamente enterrados ou jogados no mar ou em rios, ocasionando problemas ao meio ambiente, uma vez que se trata de um poluente com difícil descarte (ASSIS et. al. 2008). Deste modo, evidencia-se a importância desta pesquisa para o aproveitamento de resíduos sólidos, gerados nas indústrias de beneficiamento do camarão, como a produção de uma farinha da casca de camarão para ser utilizada como fonte de carbono na produção de quitinase pelo *Aspergillus sp.*

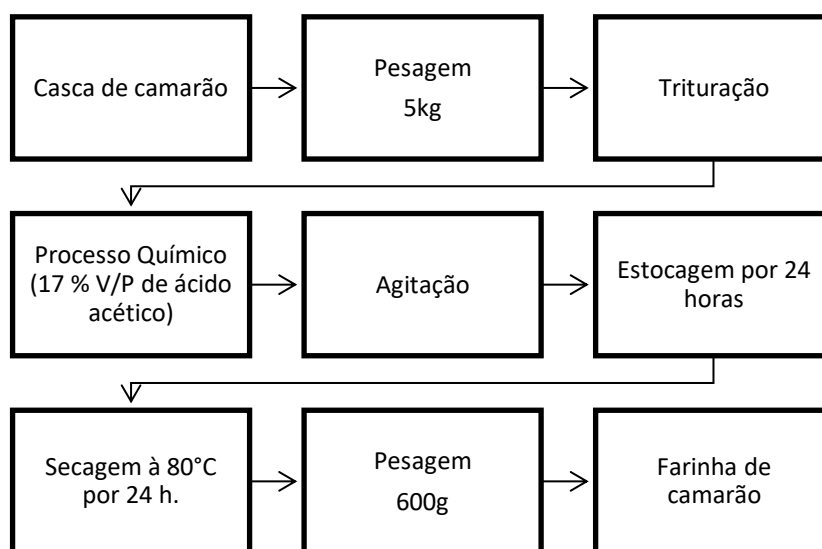
2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DA FARINHA DA CASCA DE CAMARÃO

Os resíduos de camarão provenientes da empresa MS pescados S/A, foram transportados ao laboratório de microbiologia ambiental e industrial, para obtenção da farinha. A mesma foi utilizada como indutora para produção de quitinase no meio

Czapeck, conforme fluxograma apresentado na figura 1, baseando-se na metodologia de Figueiredo (2007).

FIGURA 1- Fluxograma para obtenção da farinha de casca de camarão



2.2 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

A composição centesimal foi realizada, segundo a metodologia descrita pelo o Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008), em parceria com o laboratório Ciência e Tecnologia de Alimentos do departamento de Nutrição da UFPE.). Foram analisadas as porcentagens de valor umidade, cinzas, lipídeos e proteína.

2.3 ENSAIO DE QUITINASE

A atividade quitinolítica foi determinada pela detecção da hidrólise das ligações glicosídicas entre as moléculas de N-acetilglicosamina (GlcNAc), liberando oligômeros e/ou monômeros de GlcNAc a partir de quitina utilizando o método de açúcares redutores, DNS descrito por MILLER (1959). Para determinação da atividade quitinolítica foi adicionado 250 µL de extrato enzimático, mais 250 µL de quitina coloidal padrão Sigma® 1% (m/v) (preparado em tampão acetato de sódio a uma concentração de 50 mM e pH 5,0), para ocorrer a reação o material foi incubado a 37 °C por 60 minutos. Em seguida foi adicionado 250 µL de ácido 3,5 dinitrosalicílico e aquecido a 100° C por 5 minutos, após foi adicionado 1000 µL de água deionizada e

procedeu-se a leitura a 540nm em espectrofotômetro (Evolucion60 fabricado pela ThermoScientific®). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um μmol de N-acetilglicosamina por minuto

2.4 ENSAIO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Método de Bradford (1976) foi utilizado na determinação do conteúdo de proteínas totais que se ligam ao corante de um modo proporcional à concentração. O corante utilizado é o Comassie Brilliant Blue G-250. O corante interage com as macromoléculas de proteínas que possuem aminoácidos de cadeia lateral básica ou aromática de forma que há um desequilíbrio no corante deixando-o aniônico, sendo sua coloração emitida e absorvida a 595 nm (ZAIA, 1998).

2.5 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE QUITINASE EXTRACELULAR

2.5.1 EFEITOS DA TEMPERATURA E DA CONCENTRAÇÃO SOBRE AS ATIVIDADES QUITINOLÍTICA NO EXTRATO BRUTO

Nesta etapa o *Aspergillus sp* foi semeado em placa de Petri contendo o meio Czapek (CZ) e cultivado a uma temperatura de 30° C por 96 horas. O meio padrão utilizado para o processo de fermentação líquida foi Czapk adicionado de 1% de farinha de camarão. O ensaio foi realizado para aumentar a produção de quitinase. Para esse este utilizou-se o planejamento fatorial 2^2 com 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 11 ensaios, fixando-se os valores máximos (+1) e mínimos (-1). Para avaliar o efeito da rotação e da concentração da farinha, foi empregando o delineamento composto central rotacional (DCCR), conforme a tabela 1. Como variável resposta do delineamento foi analisado a atividade enzimática (U/mL).

Tabela 1 : Níveis e variáveis para produção de quitinase

Variáveis	Níveis				
	$-\alpha$ (-1,41)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+ 1,41)
[Farinha de camarão] %	2%	2,18%	2,5%	2,82%	3%
Rotação (rpm)	0	29,5	50	70,5	100

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os planejamentos fatoriais, a análise estatística foi realizada com o auxílio do software Statistica® 8,0. (StatSoft, Inc.). A qualidade do ajuste dos modelos gerados foi avaliada empregando-se análise de variância (ANOVA). A significância estatística de cada equação de modelo polinomial obtida foi avaliada por meio do coeficiente de variação R^2 e validada pelo teste F (distribuição de *Fisher*).

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 ELABORAÇÃO DA FARINHA DE CAMARÃO

A farinha obtida dos resíduos de cefalotórax do camarão apresentou bom aspecto visual e aroma agradável. Na figura 2 podem-se observar os resíduos em pó após desidratação a 80 °C por 24 h. A tabela 2 ilustra a composição centesimal da casca do camarão

Figura 2 : Farinha da casca de camarão secas a 80 °C por 24h.



TABELA 2: Composição centesimal da farinha da casca do camarão

Variáveis	Farinha (%)
Umidade	8,37 ± 0,03
Cinzas	33,88 ± 1,08
Proteína	36,46 ± 3,36
Lipídios	0,44 ± 0,1

O teor de umidade foi de 8,37% de acordo com a Tabela 2 com a secagem dos resíduos para a obtenção da farinha. Esta umidade final atende os padrões da legislação brasileira vigente (BRASIL, 2017) que determina umidade máxima de 10% para farinha de pescado, favorecendo assim a manutenção de sua qualidade físico-química e microbiológica.

Os teores de umidade encontrados por Corrêa et al. (2012) que avaliaram a obtenção de um extrato aromático a partir do cefalotórax de camarão *L. vannamei*, foi de 8,75% de umidade, mostrando que o valor desse trabalho está muito próximo de outros autores. Em seu estudo Savay da Silva et al. (2016), avaliaram a composição de um tipo de farinha do cefalotórax de camarão, obtendo um valor de umidade de 5,12%, inferior a 8,37% dessa pesquisa.

Mendes e Bandeira (2016) ao avaliarem o teor de cinzas em farinha de cascas de camarão cinza, obtiveram teores de 17,77%, valores inferiores ao extrato obtido da casca de 33,88% dessa pesquisa.

Fernandes et al. (2013) em seu trabalho sobre elaboração de farinha obtida através de processo de secagem de resíduos sólidos de camarão da espécie *L. vannamei*, encontraram um valor de cinzas de 20,57%, já Brasileiro et al. (2012), encontraram um teor de 15,75% ao avaliarem a qualidade de farinha obtida do cefalotórax de camarão da mesma espécie.

O teor de proteína da farinha (36,48%) foi inferior ao encontrado *L. vannamei* por Azevedo (2014) e Savay da Silva et al. (2016), que foram de 39,3% e 51,57%, respectivamente. Isto indica que os resíduos de camarão podem ser usados como uma fonte proteica alternativa.

O teor de lipídios da farinha (0,44%), quando comparado com outras pesquisas apresentou-se elevado. Segundo o Expert Panel on Food Safety and Nutrition (1991) o depósito de gordura do camarão fica localizado no hepatopâncreas, que esta situado

na região 69 da cabeça, assim a farinha produzida apenas de cefalotórax terá teor lipídico superior ao de uma farinha confeccionada a partir de exoesqueletos.

O percentual lipídico encontrada na amostra da farinha foi de 0,44 %, valor esse superior ao encontrado por Mendes e Bandeira (2016), 0,33%, ao avaliarem o teor de lipídeos em farinha de cascas de camarão cinza.

7.2 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE QUITINASE EXTRACELULAR

A matriz experimental completa esta apresentada na tabela 2, juntamente com rendimento de quitinase em U/mL. De acordo com as condições experimentais, a maior concentração enzimática (0,7016 U/mL) foi obtida a partir das condições ótimas de planejamento que foram com concentração da farinha de 2,5 % por 24h e estática, enquanto a mais baixa (0,1953 U/mL) foi detectada nas condições mais favorecidas para produção da enzima. Os melhores rendimentos deram-se com o diminuição do substrato indutor de quitinase (2,18 e 2,5 %), variando de 0,6062 à 0,07016 U/mL .

Tabela 2: . Resultados obtidos em cada ensaio do planejamento fatorial 2²

Nº Ensaio	[]%	RPM	U/ml	U/mg de proteína
1			0,36463	
	2,18	29,5	4	0,60622481
2			0,19531	0,27861223
	2,18	70,5	7	7
3			0,36925	0,52494621
	2,82	29,5	8	8
4			0,19531	0,28172663
	2,82	70,5	7	2
5			0,35538	0,53781080
	2	50	4	7
6				0,57210143
	3	50	0,35076	4
7				0,70168262
	2,5	0	0,46869	2
8			0,19531	0,28392385
	2,5	100	7	8
9			0,21296	0,30194186
	2,5	50	2	8
10			0,20965	0,29600471
	2,5	50	5	1
11			0,23565	0,40634419
	2,5	50	5	8

Comparando os resultados do ensaio 1 em relação ao ensaio 2, onde temos um aumento na agitação e mantendo- se constante a concentração do substrato foi possível detectar uma queda na atividade da enzima quitinase, tanto em U/mL quanto

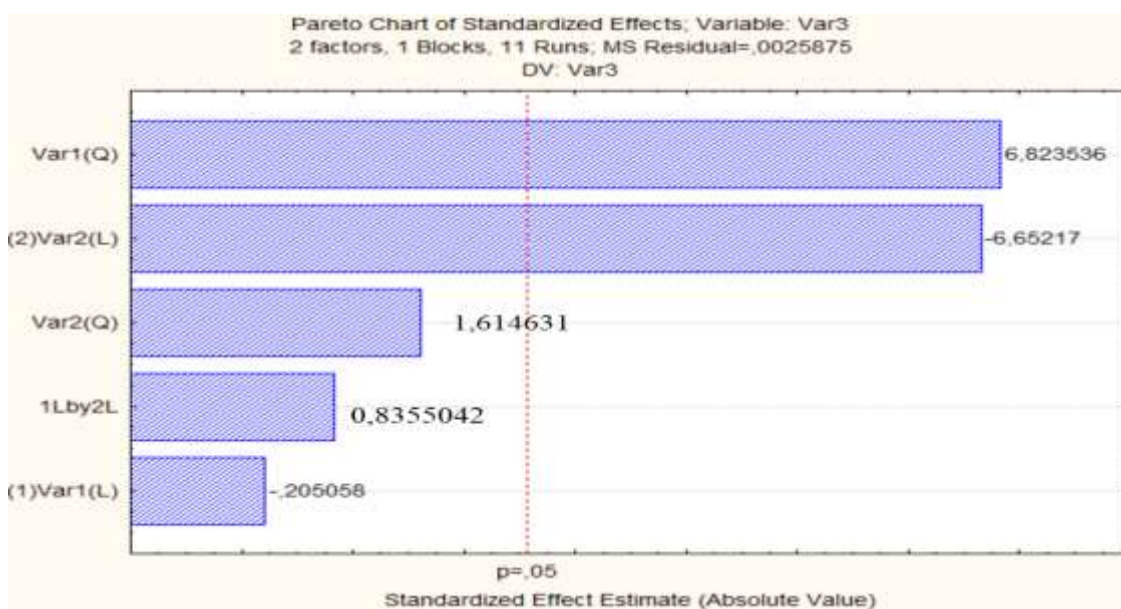
em U/mg de proteína. Esse perfil também é encontrado quando comparamos o ensaio 3 com o ensaio 4.

Observando-se o ensaio 5 e 7 temos um aumento de 1,4 vezes na atividade enzimática em U/mL e em U/mg de proteínas, quando mantemos constante a concentração de substrato e diminuimos a agitação do sistema.

A partir dos resultados obtidos com as dosagens enzimáticas os efeitos dos dois fatores estudados (RPM e concentração do substrato indutor) foram analisados no programa Statistica 8.0. Na análise dos fatores, foi possível notar claramente que a concentração do substrato, foi um fator determinante no aumento do rendimento enzimático como podemos observar nas figuras 4 e 5.

Podemos inferir que a maior produção do complexo enzimático foi obtida quando a rotação foi diminuída e a concentração foi aumentada (Fig. 3).

Figura 3: Gráfico de Pareto para significância dos fatores Concentração e RPM



Fonte: Autor. (V1 Quadrática) – Primeiro fator: Concentração; (V2 Linear) – Segundo fator: Rotação por minuto; 1Lby2L – Interação entre Concentração e rotação por minuto; p –Nível de significância.

Behere et.al. (2019) desenvolveram o estudo sobre otimização de componentes do meio para produção de quitinase por *Streptomyces chilikensis* utilizando diversas fontes de carbono (glicose, arabinose, galactose e rafinose), observaram que a menor concentração de rafinose (5%) obtiveram uma quantidade máxima de N-acetil- quito-oligossacarídeo no período de 72h.

Pasqualetti et. al. (2019) utilizaram subproduto da indústria de processamento de milho como alternativa para suplementação de meio cultura em uma concentração de 0,45% , obtendo um valor de 0,36 U/mL de enzima, sendo inferior ao presente trabalho

Sneha Jha e Modi (2018) em seu estudo sobre produção e quitinase por *Streptomyces rubiginosus* SP24 frente ao nematoide da gaia obtiveram uma atividade enzimática de 4,28 U/mL de enzima.

Bhaturiwala et. al. (2017) em seu estudo do perfil enzimático de Actinomyceto produtora de quitinase, conseguiram isolar 25 actinomycetos, porém apenas 23 conseguiram produzir a enzima como valor de 0,36 U/ml, confirmando que o microrganismo consegue produzir uma boa quantidade de enzima, sendo inferior presente estudo.

Sanghamitra; ghosh; saptarshi (2014) realizou fermentações com diferentes resíduos agrícolas (casca de arroz, farelo de trigo, farelo de milho, casca de lentilha amarela) como substratos para produção da L-asparaginase, por meio de *Aspergillus fumigatus*.

Nos gráficos de contorno tridimensional (3D) de superfície de resposta são representações gráficas do planejamento experimental, usados para investigar possíveis relações entre as variáveis. Estas representações gráficas são projetadas de dois fatores. Dessa forma, a região ótima pode ser encontrada através de uma inspeção visual das superfície (Haider, M. A.;Pakshirajan, K., 2007, Mosbah et al., 2015).

Figura 4: Gráficos de contorno 3D de superfície de resposta da produção de quitinase extracelular.

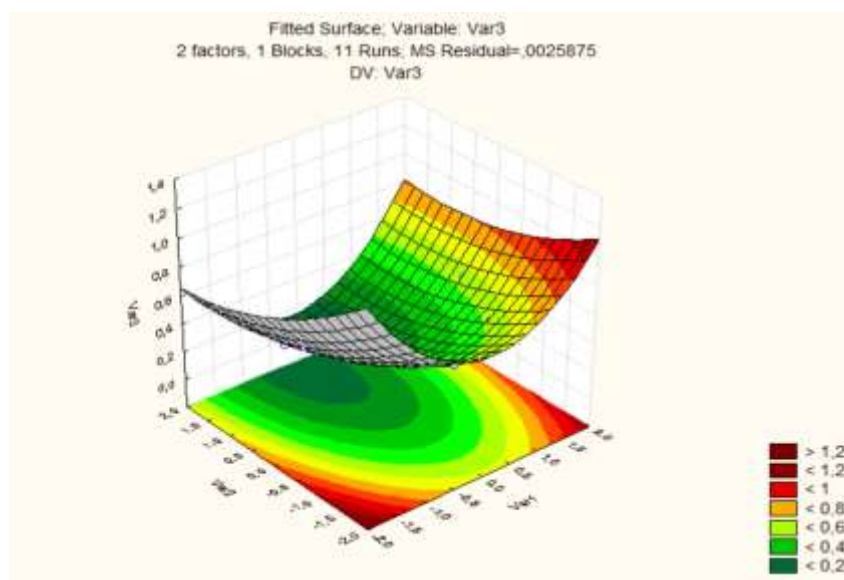
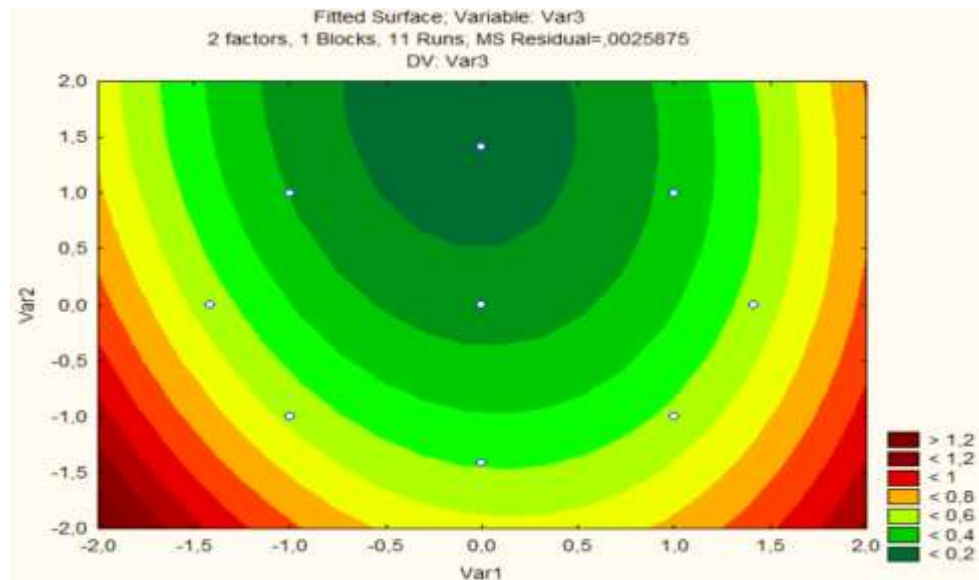


Figura 5 :Superfície de resposta da otimização de meio para produção da enzima quitinase, tendo valores da farinha da casca de camarão e rotação variáveis.



REFERÊNCIAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - **AOAC**, Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Ed. Washington, D.C., 2019.
- AZEVEDO M. S. P.; Processamento e Avaliação Nutricional da Farinha de Resíduos de Camarão para Frangos de Corte. 2014. 70f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2014.
- BAPTISTA, N. M. Q.; SANTOS, A. C.; ARRUDA, F. V. F.; GUSMÃO, N. B. Produção das Enzimas Lignina Peroxidase e Lacase por Fungos Filamentosos. *Scientia Plena*, v. 8, n. 1, 2012.
- BEHERA, H. T.; UPADHYAY, A. K., RAINA, V., RAY, L.; Optimization of media components for the production of N-acetylchitooligosaccharide from chitin by *Streptomyces chilikensis* through Taguchi experimental design. *Journal of Microbiological Methods* volume 159, April 2019, Pages 194-199.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. 72. 248–254, 1976.
- BRASILEIRO O. L.; CAVALHEIRO J. M. O.; PRADO J. P. S.; ANJOS A. G.; CAVALHEIRA T. T. B. Determination of the chemical composition and functional properties of shrimp waste protein concentrate and lyophilized flour. *Ciência Agrotécnica*. Lavras, v. 36, n. 2, p. 189 – 194, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Pescados e Derivados, C.7, seção 1. Diário Oficial da União. Brasília (DF), 29 de Mar. 2017.
- BHATURIWALA RA, JHA SC, JAIN NK, MODI HA. Enzyme profiling of selected chitinase producing Actinomycetes. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*. 2017;5(1):39–43.
- CELESTINO, J. R., DUARTE, A. C., SILVA, C. M. M., SENA, H H, FERREIRA, M. P. S. B. C., MALLMANN, N. H, LIMA, N. P. C., TAVARES, C. C., SOUZA, R. O. S., SOUZA, E. S.; SOUZA, J. V. B. 2014. *Aspergillus* 6V4, a strain isolated from manipueira, produces high amylases levels by using wheat bran as a substrate. *Enzyme Research*, v.1, n.4, 2014.
- CORRÊA N. C. F; MACEDO C. S; MORAES J. F. C; MACHADO N. T; FRANÇA L. F. Characteristics of the extract of *Litopenaeus vannamei* shrimp obtained from the cephalothorax using pressurized CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 66, p. 176–180, 2012.
- DAMASCENO, K. S. F. da S. C. Farinha dos resíduos do camarão *Litopenaeus vannamei*: caracterização e utilização na formulação de hambúrguer. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco – CCS – Nutrição. Recife, 2007.

DAMASCENO, K. S. F. da S. C.; ANDRADE, S. A. C.; STAMFORD, T. L. M. Aproveitamento do resíduo de camarão. B. CEPPA, Curitiba, v. 27, n. 2, p. 213-224, jul./dez. 2009

FOLCH, J; LEES, M; SLOANNE STANLEY, GH. A simple method for the isolation and purification of total lipide from animal tissues. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, 226: 497-509, 1957.

FERNANDES, T.M.; SILVA, J. A.; SILVA, A. H. A.; CAVALHEIRO, J. M. O.; CONCEIÇÃO, M. L. Flour production from shrimp by-products and sensory evaluation of flour-based products. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 48, n. 8, p.962-967, 2013

GUILHERME, R. F. ; CAVALHEIRO, J. M. O. ; SOUZA, P. A. S. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E PERFIL AMINOÁCIDICO DA FARINHA DE SILAGEM DE CABEÇA DE CAMARÃO. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 31, n. 3, p. 793-797, maio/jun., 2007.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos físico-químicos para análise de alimentos. ed., 1. ed. digital, São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

JESÚS E. MEJÍA-SAULÉS; KRZYSZTOF N. WALISZEWSKI; MIGUEL A. GARCIA ; RAMON CRUZ-CAMARILLO. The Use of Crude Shrimp Shell Powder for Chitinase Production by *Serratia marcescens* WF. **Food Technol. Biotechnol.** 44 (1) 95–100 (2006).

KARANAM, S.K. E MEDICHERLA, N.R. (2010) Application of Doehlert experimental design for the optimization of medium constituents for the production of L-asparaginase from Palm Kernal Cake (*Elaeis guineensis*). *J Microb Biochem Technol* 2, 1–6.

KUMAR, M.; BRAR, A.; VIVEKANAND, V.; PAREEK, N. Production of chitinase from thermophilic *Humicola grisea* and its application in production of bioactive chitooligosaccharides. *Int. J. Biol. Macromol.* 2017, 104, 1641–1647. [CrossRef]

MAIA JUNIOR, W. M. Adequação do processamento de silagens de resíduos de tilápia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757): caracterização química e funcional da fração seca em pó e lipídios. 1998. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1998.

MANNA, S.. SINHA, A., SADHUKHAN, R. E CHAKRABARTY, S.L. (1995) Purification, characterization and antitumor activity of L-Asparaginase isolated from *Pseudomonas stutzeri* MB-405. **Current Microbiol** 30, 291–298.

MENDES A. G.G; BANDEIRA M. G. A. Obtenção e caracterização físico-química de quitosana a partir de cascas de camarão cinza. In: XXV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. 2016,

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

MORAIS, K, F.; ARAÚJO, L, A, Cas. Elaboração De Produto Empanado Tipo Nugget A Partir Do Reaproveitamento Dos Resíduos De Camarão (*Litopenaeus*

Vannamei).2010. 7 f. Monografia (Especialização) - Curso de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceara, Sobral, 2010.

MULLER, H.J. E BOOS, J. (1998) Use of L-asparaginase in childhood ALL. *Crit Rev Oncol/Hematol* **28**, 97–113.

PASQUALETTI, M.; BARGHINI, P. , GIOVANNINI, V.; FENICE, M. High Production of Chitinolytic Activity in Halophilic Conditions by a New Marine Strain of *Clonostachys rósea*. *Molecules*. 2019, 24, 1880; doi:10.3390/molecules24101880.

REDDY, N. S.; NIMMAGADA, A.; SAMBASIVA RAC, R. S. An over view of the microbial alpha mylase minireview. *Afri J Biotechnol.*, v. 26, p. 45–48, 2003

SANGHAMITRA, D.; GHOSH, S.; SAPTARSHI, P. L Asparaginase and Lglutaminase from *Aspergillus fumigatus* WL002: Production and Some Physicochemical Properties1. *Applied Biochemistry and Microbiology*, West Bengal, v. 51, n. 4,p.425-431, nov. 2014.

SAVAY-DA-SILVA, L.K.; VIEIRA, S.G.A.; SANTOS-FILHO, L.A.; PEREIRA, A.M.L.; MAGALHÃES, J.A.; FOGAÇA, F.H.S. Qualidade nutricional da farinha de subprodutos de camarão *Litopenaeus vannamei*. In: VII SIMPÓSIO DE CONTROLE DE QUALIDADE DO PESCADO, 2016, São Paulo. Estratégias para aumentar o consumo de pescado: Anais... São Paulo, 2016.

SILVA, I.L., L.A.O. SILVA E L.C.B.B. COELHO. Otimização, purificação parcial e caracterização da L-asparaginase excretada por *Pseudomonas sp.* isolada da *Caesalpinia pyramidalis*.(artigo submentido ao Journal Applied Microbiology no ano de 2017).

SNEHA JHA ;H. A. MODI ; Statistical optimization of chitinase production by *Streptomyces rubiginosus* SP24 and efficacy of purified chitinase to control root-knot nematode infection in *Vigna radiata* under controlled conditions. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* December 2018, 5:20.SOUZA, E. O. Caracterização e utilização de silagem de cabeça de camarão marinho na elaboração de dietas para a criação de tilápia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757). 2002. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2002.

THEATER, R., WOOD, P. J., Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. 43: 777-780. 1982.

ZAIA D. A.M.; ZAIA C. T.B.V.; LICHTIG J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, vol. 21, n. 6, São Paulo, Nov./Dec. 1998

ARTIGO III

Avaliação da toxicidade do extrato bruto de *Aspergillus sp.* ao *Sitophilus zeamais* (gorgulho do milho)

Raphael Carlos Ferrer de Santana¹, Juliana Silva Santos¹; Aline Francisca de Lima¹, Thâmarah de Albuquerque Lima², Pérsio Alexandre da Silva¹; Thiago Henrique Napoleão²; Patrícia Maria Guedes Paiva²; Norma Buarque Gusmão¹; Leonor Alves de Oliveira da Silva¹, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho².

¹ Departamento de Antibióticos-CB, Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-901, Recife, Pernambuco, Brasil.

² Departamento de Bioquímica-CB, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420 Recife, Pernambuco, Brasil.

RESUMO

Considerando-se a grande riqueza metabólica dos fungos, principalmente isoladas de ambientes com condições extremas, bem como a necessidade de novos bioinseticidas, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade inseticida do *Aspergillus sp.* contra *Sitophilus zeamais*, inseto considerado como praga agrícola. Para isso, foram avaliados os ensaios de fumigação, toxicidade por contato e por ingestão do composto bioativo produzido da fermentação do microrganismo, além da identificação do microrganismo pela técnica de MALDI-TOF. O fungo apresentou um índice de deterrência moderada, causando distúrbios nutricionais ao inseto praga. A linhagem produtora do complexo bioativo foi identificada pela técnica de MALDI-TOF, sendo a espécie identificada como *Aspergillus fumigatus* com valores de registro (score) ≥ 2.0 . Trabalhos que avaliem o potencial de compostos bioativos com atividade inseticida são escassos. Assim, se faz necessária a realização de estudos posteriores, para identificar e isolar esses compostos com atividade inseticida presente.

Palavras chaves: *Sitophilus zeamais*. Fungos. Bioinseticidas

1 INTRODUÇÃO

Sitophilus zeamais (Coleoptera: Curculionidae), popularmente conhecido como gorgulho-do-milho, é uma espécie cosmopolita de regiões tropicais sendo considerada a mais importante praga primária de grãos armazenados no mundo (ADLER, 2011; LI et al., 2013; NUKENINE et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2017). A fêmea desta espécie perfura os grãos para ovipositar e as larvas eclodidas se alimentam das partes internas do grão levando a redução nos valores nutritivos e econômicos bem como na viabilidade da semente (WEI et al., 2014; SULEIMAN et al., 2015). É estimado que a produção brasileira de grãos na safra de 2016/2017, foi de 214,8 milhões de toneladas, destas mais de 68 milhões de toneladas de milho (BRASIL, 2018). Segundo a EMBRAPA (2017), a estimativa de perda de grãos armazenados fica em torno de 15% correspondendo a uma perda de 32,22 milhões de toneladas de grãos estocados, sendo 10,18 milhões de toneladas de milho. O controle de *S. zeamais* é feito, em maior escala, através da fumigação dos grãos com produtos à base de fosfato de alumínio e magnésio e inseticidas usado por contato (LORINI, 2010; BRASIL, 2015b). As desvantagens desses métodos incluem toxicidade a organismos não-alvo, seleção de indivíduos resistentes e risco de explosões em armazéns devido ao caráter inflamável (WHITE MARTINS, 2016). O brometo de metila é um agente fumigante comumente utilizado contra *S. zeamais* (LC₅₀ de 0,67 mg/L) e é extremamente tóxico para organismos não-alvo, como os seres humanos (LIU; HO, 1999). A resistência de *S. zeamais* aos inseticidas sintéticos e os riscos para a saúde humana associados a estes produtos, têm impulsionado a busca por métodos alternativos e biodegradáveis para o controle desta praga (SOUSA; FARONI; GUEDES, 2016).

Estudos envolvendo a produção de inseticidas biológicos têm sido considerando de extrema importância para controle de insetos vetores de doenças e pragas agrícolas, porém uma grande preocupação é a contaminação do meio ambiental, resíduos nos alimentos e efeitos prejudiciais sobre populações de insetos benéficos (GOMES et al., 2018; SUBBANNA, et al., 2018).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CONDIÇÕES DE CULTIVO DO COMPLEXO BIOATIVO

Para este trabalho o *Aspergillus sp.* isolado da água mineral natural comercializada em Recife-PE. O microrganismo foi semeado em placa de Petri contendo o meio ágar Sabouraud e mantido a 30°C durante 5 dias.

Após o crescimento da linhagem fúngica, 5 blocos de gelose (10 mm) foram transferidos para frascos de Erlenmeyer (125mL) contendo 30 mL do meio Czapeck modificado. A quantidade de blocos de gelose correspondeu à proporção de 10% do valor total de meio de cultivo utilizado em cada frasco (10% m/v). Após o término da fermentação (120 horas), o material foi centrifugado a 16.800G por 7 minutos, o sobrenadante foi concentrado em speedvac® (Express SC250EXP) e mantidos a uma temperatura de aproximadamente -2°C.

2.2 CRIAÇÃO DO INSETO

Foi estabelecida uma criação contínua de *S. zeamais* em condições de laboratório. O inseto foi acondicionado em frasco de vidro de 1,5 L, fechado com tampa plástica perfurada e revestida internamente com tecido fino (TNT) para permitir as trocas gasosas. A criação foi mantida em câmara climática tipo B.O.D, a 28±2 °C, 70±5% de UR e 24h de fotofase, sendo utilizado como substrato alimentar milho adquirido no Mercado Público de São José, com teor de umidade de 13% base úmida (b.u.).

2.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FUMIGANTE DO COMPLEXO BIOATIVO

O efeito fumigante do complexo bioativo de *Aspergillus sp.* realizou-se de acordo com a metodologia Chu et al. (2010). Na tampa dos potes foram colocados filtros de papel (5 x 2 cm) embebidos com 1 ml do complexo bioativo nas concentrações de 5,15 e 20 % v/v. No tratamento controle, o papel filtro foi embebido com água destilada. Em seguida, foram colocados 20 insetos nos recipientes e as tampas foram fechadas, para impedir a saída dos vapores. Passadas 48 horas após a montagem dos experimentos, foi avaliada a porcentagem de mortalidade dos insetos.

2.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE POR CONTATO DO COMPLEXO BIOATIVO

O ensaio de toxicidade de contato foi realizado de acordo com Liu e Ho (1999). O complexo bioativo de *Aspergillus sp.* foi utilizado nas concentrações de 5,15 e 20%. Alíquotas (0,5 μ l) das soluções teste foram aplicadas na superfície dorsal do tórax dos insetos usando uma micropipeta, e os insetos no controle negativo foram tratados com água destilada. Após este procedimento, os insetos foram transferidos para recipientes plásticos (diâmetro de 2,5 cm, comprimento de 5,5 cm) e a taxa de mortalidade foi registrada diariamente por 8 dias. Cada experimento teve cinco repetições.

2.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE POR INGESTÃO DO COMPLEXO BIOATIVO

A toxicidade por ingestão do complexo bioativo foi avaliada usando a metodologia adaptada de Xie et. al. (1996) descrita por Napoleão et. al. (2013) e Lira et. al. (2015). O alimento foi preparado a partir da suspensão de farinha de trigo autoclavada (2.0 g; Dona Benta®, Bunge Alimentos S.A.), em 5ml de água destilada para as concentrações de 5,15,20 % do extrato. Foi preparada uma suspensão de 1ml e aplicada em formato de disco em placa de petri. As placas contendo os discos da farinha foram deixadas em estufa a 50°C em over night. Em seguida, foram colocados 20 insetos de *Z. zeamais*, com peso conhecido, nas placas. A taxa de mortalidade e os pesos dos insetos e dos discos de farinha quebrados foram registrados no tempo de 7 e 15 dias.

O índice de deterrência alimentar (IDA) foi calculado segundo a fórmula:

$$IDA = \frac{[100 \times (C-T)]}{C}$$

Onde: C - Corresponde à massa da dieta controle ingerida e

T - Massa da dieta artificial testada ingerida.

De acordo com os valores de IDA, o efeito da dieta foi classificado como: não-deterrente ($IDA < 20\%$), deterrente fraco ($50\% > IDA \geq 20\%$), deterrente moderado ($70\% > IDA \geq 50\%$) ou deterrente forte ($IDA \geq 70\%$) (PROCÓPIO et al., 2015).

Também foram calculados os índices nutricionais: taxa de ganho relativo de biomassa (TGB) que corresponde a razão biomassa adquirida/(biomassa inicial dos insetos x dias), taxa de consumo relativo (TCR) que corresponde a razão massa ingerida/(biomassa inicial dos insetos x dias) e a eficiência na conversão de alimentos ingeridos (ECAI) que corresponde a razão biomassa adquirida pelo inseto (mg)/(massa do alimento ingerido (mg) x 100). Todos os resultados foram avaliados pela diferença significativa entre os grupos tratados e foram analisados pelo teste t Student ($p < 0,05$) usando programa Origin 6.0. Desvio-padrão (DP) foi calculado usando GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, California, USA) e os dados foram expressos como a média das replicatas \pm DP.

2.5 IDENTIFICAÇÃO PROTEÔMICA

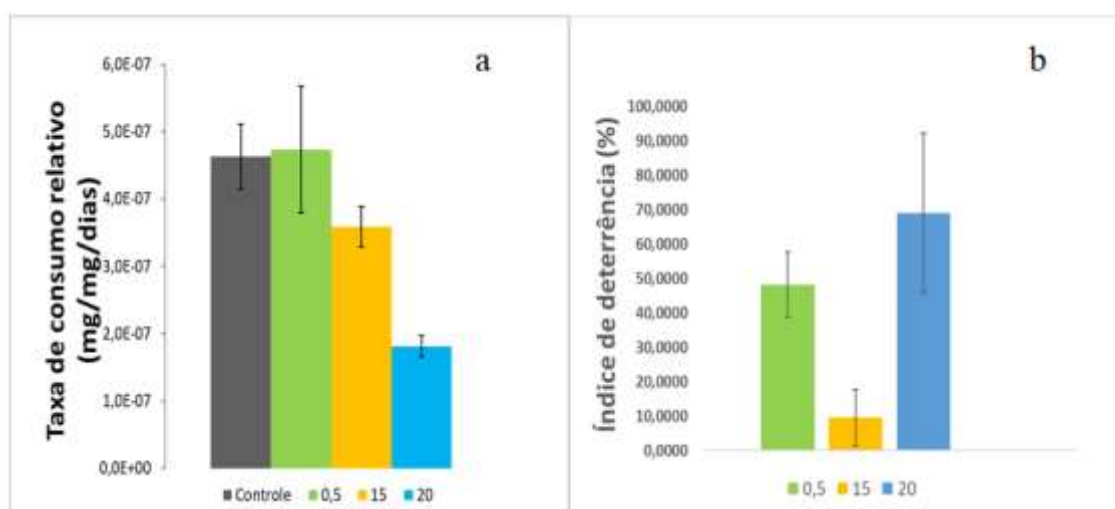
Os isolados serão submetidos à análise através da extração proteica por espectrometria de massas (MALDI-TOF Autoflex III Bruker Laser nd: yagsmartbeam, BrukerDaltonick Inc., USA/Germany) para identificação será utilizado o material superficial da colônia do *Aspergillus* (esporos e micélio). Sumariamente, após a extração protéica, 1 μ L do sobrenadante será colocado em duplicata sobre uma placa de aço, seco a temperatura ambiente a 25° C. Posteriormente, cada amostra será revestida com 1 μ L de solução de matriz, o qual consiste de uma solução saturada de α -ciano- Ácido 4 hidroxí-cinâmico (HCCA) em 50% de acetonitrila e 2,5% ácido trifluoroacético (concentração final: 10 mg HCCA/mL) e seca a temperatura ambiente a 25°C. A placa alvo em aço polido de MALDI-TOF MS será subsequentemente introduzida no espectrômetro de massas para obtenção dos espectros proteicos. Os espectros serão obtidos através de um laser de 1064nm, onde a intensidade do laser será ajustada ligeiramente acima do limiar para a produção de íons. Um kit protéico (proteincalibrationstandart I, BrukerDaltonics, Bilerica, MA, USA) com conhecidos valores de massa das proteínas, serão usadas para calibração. A variação de massa entre 2.000 a 20.000 Da será registrado usando modo linear com pulso de 104 ns em uma voltagem de +20 kV. A lista de picos obtidos foi exportada ao software Biotyper™ (Biotyper system, versão 3.0) onde as identificações finais serão determinadas.

6 RESULTADOS

O *Aspergillus sp.* foi cultivado sob agitação e, após o cultivo, o filtrado da cultura foi utilizado para avaliar o índice de fumigação, contato e ingestão contra *S. zeamais*. O rendimento do fermentado foi de 0,240g/ml de peso seco do extrato bruto. No ensaio de fumigação e de contato, após 48h, os 20 insetos de *S. zeamais* mantiveram-se vivos, indicado uma nula taxa de mortalidade. O ensaio de toxicidade de ingestão mostra que os insetos consumiram o alimento, porém o complexo bioativo não induziu a mortalidade e sim a repelência como mostra o índice de deterência (Figura 1b), fazendo os insetos perderem peso.

A atividade inseticida do extrato bruto do *Aspergillus fumigatus* em insetos não está necessariamente associada à sua morte, pois eles podem apresentar efeitos repelentes, deterrentes e antinutricionais que causam danos aos insetos. Nesse experimento (figura 1a), foi possível detectar que com o aumento da concentração do complexo bioativo houve uma diminuição na taxa de ganho relativa à biomassa do insetos (TGB). Esses resultados foram confirmados pelos índices de deterência mostrando valores de moderada a forte como observado na figura 1b.

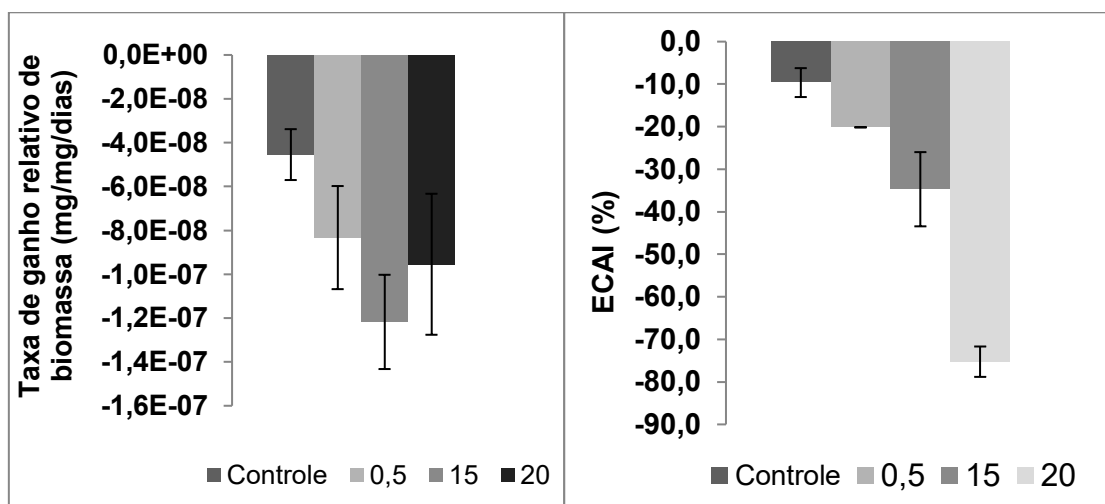
Figura - 1 Taxa de consumo relativo e índice de deterência alimentar de adultos tratados com dietas artificiais contendo água destilada como controle e o extrato bruto em concentrações finais de 5,15,20 %.



Durante a análise da mortalidade dos insetos por ingestão dos discos contendo o complexo bioativo, foi detectado distúrbios nutricionais, em todas as concentrações, detectado pela perda de massa em miligramas de cada inseto. Proporcionando uma queda na taxa de ganho relativa de biomassa (Figura 2a). Esses dados são

confirmados pela ECAI (eficiência de conversão do alimento ingerido), onde pode ser observado que o líquido metabólico promoveu uma redução dose dependente de conversão do alimento em biomassa (Figura 2b).

Figura - 2 Parâmetros nutricionais de *S. zeamais* adultos tratados com dietas artificiais contendo água destilada como controle e o extrato bruto em concentrações finais de 5,15,20 %.



O líquido metabólico alterou os parâmetros nutricionais, sendo capaz de causar deterrência e consequentemente perda de biomassa. Alguns compostos, presente no complexo bioativo, podem alterar a palatabilidade do alimento, causando deterrência, e/ou moléculas que atuem reduzindo a digestibilidade e absorção dos nutrientes (NAPOLEÃO et al., 2013).

Fouad e Camara (2017) demonstraram que os óleos essenciais de *Citrus aurantiifolia* e *Citrus reticulata* foram mais eficientes em promoveram a mortalidade no ensaio toxicidade por ingestão do inseto *S. zeamais*. O extrato metanólico de *Zanthoxylum rhoifolium* (Rutaceae) apresentou toxicidade de contato e ingestão contra *Atta sexdens* (Gomes et al., 2016).

A linhagem produtora do complexo bioativo, com atividade de toxicidade por ingestão foi identificada pela técnica de MALDI-TOF MS, a mesma ocorreu através dos espectros obtidos que foram analisados por um algoritmo, em seguida os espectros obtidos foram comparados com o banco de dados Biotyper™ versão 3.1, (BrukerDaltonics, Germany/USA), sendo a espécie identificada como *Aspergillus fumigatus* com valores de registro (score) ≥ 2.0 . Quando a identificação apresenta um score abaixo de 2.0, em seguida foi realizada nova extração proteica, do isolado, para confirmação do resultado. O relatório de identificação dos isolados de *Aspergillus*

fumigatus apresenta os melhores scores de 2,038 e 1,99 (Software MALDI Biotyper versão 3.1) como mostra a figura 3.

Figura 3: Resultado da identificação pelo MALDI Biotyper.

Result Overview

Analyte Name	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
e11.1 (++)(A)	Aspergillus fumigatus	2.038	Aspergillus fumigatus	1.99

Fonte: Software MALDI Biotyper versão 3.1

CONCLUSÃO

Os microrganismos são importantes fontes de moléculas como atividade inseticida. No presente trabalho, um fungo foi isolado da água mineral comercializada e testado frente a produção de compostos bioativos. A observação da mortalidade no bioensaio de toxicidade por ingestão revelou que o composto bioativo possui um índice de deterrência classificado de moderado a forte contra o inseto *S. zeamais* por promoverem efeitos anti-nutricionais. A cepa fúngica foi identificada pela técnica de MALDI-TOF como *Aspergillus fumigatus*. Pesquisas mais profundas no sentido de isolamento, caracterização e aplicação industrial do composto bioativo estão sendo realizadas.

REFERÊNCIA

- BARBA, F. J.; MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N.; MERCADANTE, A. Z.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; ORLIEN, V. Bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables after thermal and nonthermal processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 67, p. 195–206, 2017.
- BRASIL. **PORTARIA Nº 104**, de 25 de janeiro de 2011. Disponível em: . Acesso em: 22 jan. 2018.
- Chu, S.S., Liu, Q.R., Liu, Z.L., 2010. Insecticidal activity and chemical composition of the essential oil of *Artemisia vestita* from China against *Sitophilus zeamais*. *Biochem. Syst. Ecol.* 38, 489 -492.
- FOUAD, H. A.; CAMARA, C.A.G. Chemical composition and bioactivity of peel oils from *Citrus aurantiifolia* and *Citrus reticulata* and enantiomers of their major constituent against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, 73:30-36, 2017.
- GOMES, M. D. C. A. R. et al. Toxicity of plant extracts from Bahia, Brazil, to *Atta sexdens sexdens* workers (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, 63.2:770-776, 2016.
- GOMES, E. B.; DIAS, L. R. L.; MIRANDA, R. C. M. Actinomycetes bioactive compounds: Biological control of fungi and phytopathogenic insect. **African Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 17, p. 552-559, 2018.
- LI, S.-G. et al. Fumigant activity of *Illicium verum* fruit extracts and their effects on the acetylcholinesterase and glutathione S -transferase activities in adult *Sitophilus zeamais*. **Journal of Pest Science**, v. 86, n. 4, p. 677–683, 2013.
- Lira, C.S., Pontual, E.V., Albuquerque, L.P., Paiva, L.M., Paiva, P.M.G., Oliveira, J.V., Napoleão, T.H., Navarro, D.M.A.F. Evaluation of the toxicity of essential oil from *Alpinia purpurata* inflorescences to *Sitophilus zeamais* (maize weevil). *Crop Protection* 71 (2015) 95-100.

Liu, Z.L., Ho, S.H., 1999. Bioactivity of the essential oil extracted from *Evodia rutaecarpa* Hook f. et Thomas against the grain storage insects, *Sitophilus zeamais* Motsch. and *Tribolium castaneum* (Herbst). *J. Stored Prod. Res.* 35, 317- 328.

LORINI, I., KRZYZANOWSKI, F.C., FRANÇA-NETO, J.B., HENNING, A.A. **Principais Pragas e Métodos de Controle em Sementes durante o Armazenamento - Série Sementes**. Londrina: Embrapa Soja. Circular técnica, n. 73, 2010.

Napoleão, T.H., Belmonte, B.R., Pontual, E.V., Albuquerque, L.P., S a, R.A., Paiva, L.M., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G.. Deleterious effects of *Myracrodruon urundeuva* leaf extract and lectin on the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). *J. Stored Prod. Res.* 54, 26- 33, 2013.

NUKENINE, E. N.; TOFEL, H. K.; ADLER, C. Comparative efficacy of NeemAzal and local botanicals derived from *Azadirachta indica* and *Plectranthus glandulosus* against *Sitophilus zeamais* on maize. **Journal of Pest Science**, v. 84, n. 4, p. 479–486, 2011.

PROCÓPIO, T.F., BELMONTE, B.R., PAIVA, P.M.G., AGRA-NETO, A.C., PONTUAL, E.V., NAPOLEÃO, T.H. Interferência do extrato aquoso de folhas de *Tradescantia spathacea* na fisiologia nutricional do gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais*. **Arrudea**, v.1, p.023 e 027, 2015.

SOUSA, A. H.; FARONI, L. R. A.; GUEDES, R. N. C. Locomotor behavior of *Sitophilus zeamais* populations under sublethal ozone exposure. **Journal of Pest Science**, p. 1–9, 13, 2016..

SUBBANNA, A. R. N. S. RAJASEKHARA, H.; STANLEY, J.; MISHRA, K. K.; PATTANAYAK, A. Pesticidal prospectives of chitinolytic bacteria in agricultural pests management. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 116, p. 52-66, 2018.

SULEIMAN, R. et al. Is flint corn naturally resistant to *Sitophilus zeamais* infestation? **Journal of Stored Products Research**, v. 60, p. 19–24, 2015.

WHITE MARTINS. **Ficha de informações de segurança de produtos químicos. Produto fosfina. FISQP no.: P-4643-H.** Disponível em: [http://www.medigas.com/sa/br/WMSEGPPO.NSF/43419c9f92323ddf83257a8c004a0d1e/610b8927dc4e90bc832575ac0063af96/\\$FILE/P4643.pdf](http://www.medigas.com/sa/br/WMSEGPPO.NSF/43419c9f92323ddf83257a8c004a0d1e/610b8927dc4e90bc832575ac0063af96/$FILE/P4643.pdf). Acesso em: 19 de junho de 2019.

WEI, L. et al. Chemical Composition and biological activity of star anise *Illicium verum* extracts against maize weevil, *Sitophilus zeamais* adults. **Journal of Insect Science**, v. 14, n. 80, p. 1–13, jun. 2014.

Xie, Y.S., Bodnaryk, R.P., Fields, P.G. A rapid and simple flour-disk bioassay for testing substances active against stored-product insects. *Can. Entomol.* 128, 865-875;1996.

ARTIGO IV

Avaliação da Atividade Antioxidante do extrato bruto de *Aspergillus fumigatus*

Raphael Carlos Ferrer de Santana^a, Eduardo Marques de Araújo^a, Thales Henrique Barbosa de Oliveira^a, Norma Buarque de Gusmão^a, Pêrsio Alexandre da Silva^a; Leonor Alves de Oliveira da Silva^a, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^{b*}.

^aLaboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial – LAMAI, Departamento de Antibióticos, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil

^bLaboratório de Bioquímica de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, UFPE, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil

Resumo

Um fungo isolado da água mineral comercializada foi testado quanto a sua habilidade de produzir compostos bioativos com capacidade antioxidante. O fungo foi identificado com base na análise proteômica pela técnica de MALDI-TOF como *Aspergillus fumigatus*. A capacidade antioxidante *in vitro* foi avaliada por DPPH e ABTS. Os compostos bioativos foram parcialmente purificados em coluna cromatográfica. A fração com atividade antioxidante foi submetida ao CG-MS e identificada como sendo o ácido linoleico o composto majoritário (32,28%). Portanto, *Aspergillus fumigatus*, isolados de água mineral, possui uma ótima capacidade antioxidante podendo ser usado para combater radicais livres no setor farmacêutico e alimentício.

Palavras chaves: Maldi- Tof. Antioxidante. *Aspergillus fumigatus*

1 INTRODUÇÃO

Os antioxidantes são substâncias que evitam a ação deletéria dos radicais livres sobre as células sendo compostos capazes de inibir ou retardar o processo de oxidação no organismo, combatendo o envelhecimento precoce e prevenindo doenças (MOKRANI & MADONI, 2016). Os seres vivos o tempo todo são "combatidos" pelos antioxidantes, os quais podem ser produzidos pelos organismos vivos ou obtidos através de alimentos consumidos. Dependendo do local de atuação de um antioxidante e do mecanismo de inibição frente aos radicais livres os mesmos podem ser classificados em primários, sinergistas, removedores de hidrogênio, agentes biológicos, quelantes e mistos. Antioxidantes multifuncionais são antioxidantes que podem apresentar propriedades antioxidantes primárias e secundárias (RAWAT et al., 2015).

Os antioxidantes primários, os chamados antioxidantes que quebram a cadeia, são capazes de reagir diretamente com os radicais livres, transformando-os em produtos mais estáveis e não-radicaais. Assim, os antioxidantes primários desempenham um papel importante na oxidação lipídica porque eles podem reagir com os radicais lipídicos formados e convertê-los em não-radicaais e, assim, impedir a decomposição adicional dos lipídios (DEKKER, 2002)

Compostos fenólicos com mais de um grupo hidroxila (OH) são antioxidantes primários eficientes devido à sua capacidade de doar átomos de hidrogênio aos radicais livres, criando radicais fenoxila relativamente não-reativos devido à estabilização da ressonância. Os compostos fenólicos sintéticos, como o hidroxianisolbutilado (BHA) e o hidroxitoluenobutilado (BHT), são eficientes antioxidantes de quebra de cadeia e amplamente utilizados como conservantes de alimentos. Alguns compostos fenólicos que ocorrem naturalmente, como tocoferol, ácido ascórbico ou ácido cafeico, também são usados como antioxidantes que quebram a cadeia, mas são tipicamente menos eficientes comparados aos sintéticos, mas isso depende novamente do tipo de produto alimentício (CAROCHO, 2018).

Os antioxidantes secundários ou preventivos atuam indiretamente na limitação da oxidação lipídica. Vários mecanismos, incluindo a quelação de metais de transição, quenchingsinguleto-oxigênio (na fotooxidação), e eliminação de oxigênio podem ser exibidos por esses antioxidantes secundários (CAROCHO et al., 2018). Além disso, alguns antioxidantes secundários podem trabalhar sinergicamente regenerando

antioxidantes primários e, assim, restaurar a atividade antioxidante dos antioxidantes primários para garantir sua atividade antioxidante contínua. O ácido ascórbico é um exemplo disso. A capacidade de quelação de metais de um antioxidante secundário é uma propriedade importante para os antioxidantes nos sistemas alimentares porque a oxidação de lipídios induzida por metais é pronunciada em produtos alimentares devido à presença de, por exemplo, ferro. O EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) é um exemplo de um excelente antioxidante quelante de metal usado na indústria alimentícia (DEYA et al., 2016; HAAHR & JACOBSEN, 2008).

Outra classificação importante para os compostos designados antioxidantes, podendo ser os Enzimáticos que são enzimas produzidas pelo próprio organismo, e são as primeiras a agirem, para evitar o acúmulo do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio. E as Não-Enzimáticas que são antioxidantes obtidos a partir da nossa dieta. Existem na literatura diferentes técnicas para quantificar a atividade antioxidante em diferentes amostras. O teste de DPPH é um dos métodos indiretos para se determinar a atividade antioxidante mais antigo sendo sugerido originalmente em 1950 para se descobrir os doadores de hidrogênio em matérias naturais. Mais tarde foi quantificado para determinar o potencial antioxidante de compostos fenólicos isolados e alimentos tão bem como amostras biologicamente relevantes (ROGINSKY; LISSI, 2005). O método de DPPH. é muito utilizado para se determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas como: compostos fenólicos (SAHIDI; MBIGAIPALAN, 2015; SOUSA et al, 2007). Esse método consiste em avaliar a capacidade antioxidante via atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila – DPPH. O radical DPPH possui coloração púrpura absorvendo a um comprimento de onda máximo de aproximadamente 516 nm.

Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R.), o DPPH. é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional. O DPPH apresenta-se como um método simples podendo também ser usado para avaliar a atividade antioxidante de formas sintéticas (ex: nimesulida, dapsona e ácido acetilsalicílico), algas, quitosanas, etc. (SAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015 ; KIM; THOMAS, 2006).

energia laser para criar íons a partir de moléculas grandes com fragmentação mínima (Hillenkamp, 1991).

Nas últimas décadas, o MALDI TOF tornou-se uma das ferramentas mais poderosas para a análise de biomoléculas. O princípio geral da MS é produzir, separar e detectar íons em fase gasosa. O MALDI como princípio para análise de grandes biomoléculas foi introduzido por Karas e Hillenkamp. Em resumo, a amostra é incorporada na estrutura cristalina de pequenos compostos orgânicos (matriz) e depositada em um suporte de amostra condutor. Os cocteryis são irradiados com um raio laser de nanosegundo, por exemplo, um laser ultravioleta (UV) com um comprimento de onda de 266 ou 337 nm. As energias introduzidas estão na gama de $1 \times 10^7 - 5 \times 10^7 \text{ W / cm}^2$. A energia do laser causa a decomposição estrutural do cristal irradiado e gera uma nuvem de partículas (a pluma) a partir da qual os íons são extraídos por um campo elétrico. O mecanismo por trás do processo de dessorção não é totalmente compreendido. Pode ser mais bem descrito como uma conversão da energia do laser para a oscilação vibratória das moléculas de cristal. Isso resulta na desintegração do cristal. Após a aceleração através do campo elétrico, os íons derivam através de um caminho livre de campo e, finalmente, alcançam o detector (multiplicador de elétrons secundário ou placa de canal). As massas de íons (taxas de massa a carga $[m / z]$) são tipicamente calculadas medindo o TOF, que é mais longo para moléculas maiores do que para menores (desde que suas energias iniciais sejam idênticas). Como os íons predominantemente carregados, não fragmentados são gerados, as massas de íons parentais podem ser facilmente determinadas a partir do espectro resultante sem a necessidade de processamento de dados complexo. (Hillenkamp, 1991). As massas são acessíveis como dados numéricos para processamento direto e análise subsequente. Os TOF medidos durante um experimento típico MALDI estão no intervalo de vários microssegundos (BRUKER, 2013; Jurinke, 2004).

Segundo Garner et. al. (2014) a Dessorção a laser assistida por matriz ionizante- espectrometria de massa por tempo de voo (maldi-tof) identifica com precisão bactérias e fungos selecionados em situações clínicas selecionadas. Na qual no atual momento está sendo avaliada para uso rotineiro hospitalar.

Neste contexto o presente trabalho, teve por objetivo avaliar a produção de compostos bioativos por *Aspergillus sp*, investigar suas propriedades antioxidantes

bem como purificar parcialmente o extrato, e identificar a cepa produtora por análise proteômica através da técnica de MALDI-TOF.

2 METODOLOGIA

2.1 PREPARO DO EXTRATO

O fungo foi cultivado em Sabouraud Ágar a 30° C por 7 dias. O pré-inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL de Sabouraud caldo e mantido sob agitação de 140RPM por 48 horas. A fermentação para a obtenção dos metabólitos secundários foi realizada em frascos Erlenmeyer (500 mL) contendo 200 mL de Sabouraud caldo. O pré-inóculo foi transferido para os frascos Erlenmeyer na proporção de 10% v/v. Os frascos de Erlenmeyer foram incubados a 30°C sob agitação de 140 RPM por 48 horas. Após as 48 horas, o líquido metabólico foi separado da massa celular por centrifugação a 16.800G e posteriormente, filtrado à vácuo. O preparo do extrato bruto do *Aspergillus sp.* foi realizado segundo metodologia adaptada de (LYRA et al., 1964). Cada 1 mL do líquido metabólico foi extraído com 2 mL de acetato de etila PA. Incubada por 1h a 25 °C, posteriormente submetida ao sonicador (50%) por 1 minuto. Após essa etapa a amostra foi filtrada, rota-evaporada à 40° C e utilizada na determinação da capacidade antioxidante.

2.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A avaliação do potencial antioxidante foi aferida através da utilização do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), 2,2'-difênil-1-picri-hidrazilo (DPPH). Após a obtenção do extrato em acetato de etila a amostra foi avaliada a atividade antioxidante e detectado o IC50 através da redução do radical 2,2'-difênil-1-picri-hidrazilo (DPPH), bem como da utilização do perssulfato de potássio, com o objetivo de oxidar o ABTS ao radical catiônico.

2.2.1 Ensaio DPPH

A técnica baseia-se na transferência de elétrons onde, por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar, o DPPH que possui cor púrpura é reduzido formando difênil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da

absorbância a 517 nm. A partir dos resultados da absorbância obtidos determinou-se a porcentagem de atividade antioxidante de radicais livres. Para a realização da atividade antioxidante dilui-se 2 mg g de DPPH em 50ml de metanol e lemos no elisa, no comprimento de onda a 517 nm, onde a absorbância da solução tem que está entre 0,600 a 0,700. Em seguida, 0,416 mg do extrato foi diluído em 1ml de metanol, formando uma solução mãe, dessa solução foi realização uma diluição seriada para obtenção de 5 concentrações distintas 0,416; 0,208; 0,125; 0,083 e 0,041 mg/mL. O teste foi realizado em placa de 96 poços, adicionamos 40 µL de cada concentração com mais 250 µL da solução da DPPH, deixando-se em repouso por 30 minutos no escuro. Para a validação, o teste foi realizado dois controles (negativo e positivo) com metanol e ácido ascórbico. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição pela fórmula abaixo:

$$\text{Inibição(\%)} = \frac{\text{ABS CONTROLE} - \text{ABS AMOSTRAS}}{\text{ABS CONTROLE}} \times 100$$

Onde, Absc: absorbância controle ou branco; Abs: absorbância teste (amostra).

2.2.2 Ensaio ABTS

A técnica do radical livre ABTS⁺ foi realizada de acordo com Sánchez-González et al. (2005). A solução ABTS foi preparada em meio aquoso, o cátion ABTS⁺ foi produzido reagindo 7mM da solução estoque ABTS com 2,45mM de persulfato de potássio. A mistura foi armazenada em frasco âmbar e ficou em temperatura ambiente por 16 horas, antes do uso. A solução ABTS⁺ foi diluída com em etanol para uma absorbância de 0,700 a 730nm. Em seguida, 1mg do extrato foi diluído em 1 ml de etanol, formando uma solução mãe, dessa solução foi realização uma diluições seriada para obtenção de 5 concentrações distintas 0,5; 0,25; 0,125; 0,062 e 0,031 mg/mL; destas soluções foram retirados 20µL e adicionados em tubos de ensaio contendo 2 mL da solução ABTS⁺⁺ deixada em repouso no escuro por 6 minutos. As leituras de absorbância a 730nm foram realizadas após 6 minutos de reação. A curva padrão foi construída utilizando soluções de trolox nas concentrações 0,029; 0,058;

0,117; 0,237 e 0,314 mg/mL. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição pela fórmula abaixo:

$$\text{Inibição(\%)} = \frac{\text{ABS CONTROLE} - \text{ABS AMOSTRAS}}{\text{ABS CONTROLE}} \times 100$$

Onde: ABS controle é o radical com etanol e ABS amostras é o Radical com o extrato.

2.3 PRÉ-FRACIONAMENTO DO EXTRATO

A fim de obter um uma pré-separação de substâncias com atividades antioxidantes comprovadas nos ensaios anteriores através de suas polaridades, 1 ml do extrato obtidos da fermentação do *Aspergillus sp.*, foi submetido a uma coluna cromatográfica em coluna com sílica gel 60 (0,063-0,200 mm/ 70-230 mesh ASTM) da Macherey-Nagel como fase estacionária, empregando diferentes eluentes orgânicos iniciando com 30 ml hexano, em seguida elevou-se a polaridade com 30 mL de uma mistura de hexano/acetato de etila (50%) , posteriormente apenas acetato de etila (30mL), mais uma elevada de polaridade com 30 mL da mistura de acetato de etila e metanol a 50% e por fim elui-se com 30 ml de metanol. Foram coletadas 30 frações de 5 mL cada, e posteriormente submetidas a avaliação do potencial antioxidante pelo método DPPH, conforme descrito anteriormente. As frações que mostraram positivas foram submetidas a cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa (GC-MS).

2.4 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOMPLADA COM ESPCTROMETRIA DE MASSA (GC-MS)

Para análise da composição química do composto majoritário apresenta na fração com atividade antioxidante. Posteriormente, 1 mL da fração foi injetado em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas Shimadzu QP 5050A equipado com uma coluna DB-5 (Agilent J & W; 30 m 0,25 mm 0,25 mm). A amostra foi injetada no modo split (1:10). A temperatura do forno foi ajustada em 70°

C por 4 min, e aumentada em 4° C / min até 280 C, onde foi mantida a esta temperatura durante 15 min. O fluxo de gás de hélio foi mantido a 40 kPa com fluxo na coluna de 0,8 ml/min e fluxo total de 5,8ml/min. A interface com MS foi a 280° C e espectros de massa foram tomadas a 70 eV em modo de ionização por impacto de elétrons, com uma velocidade de scan / s de m / z 30 a 450. Os compostos eluídos foram identificados por comparação entre os espectros de massa e os espectros de massa dos padrões autênticos disponíveis na biblioteca de referência, NIST11 e, tudo integrado no software GCMS Postrun Analysis Shimadzu. As áreas de pico em cromatogramas foram integradas a fim de obter a sinal iônico total, e os valores foram usados para determinar a proporção relativa de cada composto.

2.5 IDENTIFICAÇÃO PROTEÔMICA

O isolado foi submetido à análise através da extração proteica por espectrometria de massas (MALDI-TOF Autoflex III Bruker Laser nd:yagsmartbeam, BrukerDaltonick Inc., USA/Germany). A identificação foi utilizado o material superficial da colônia do *Aspergillus* (esporos e micélio). Sumariamente, após a extração protéica, 1 µL do sobrenadante foi colocado em duplicata sobre uma placa de aço, seco a temperatura ambiente a 25° C. Posteriormente, a amostra foi revestida com 1 µL de solução de matriz, o qual consisti de uma solução saturada de α-ciano- Ácido 4 hidroxí-cinâmico (HCCA) em 50% de acetonitrila e 2,5% ácido trifluoroacético (concentração final: 10 mg HCCA/mL) e seca a temperatura ambiente a 25°C. A placa alvo em aço polido de MALDI-TOF MS foi subsequentemente introduzida no espectrómetro de massas para obtenção dos espectros proteicos. O espectro foi obtido através de um laser de 1064nm, onde a intensidade do laser foi ajustada ligeiramente acima do limiar para a produção de íons. Um kit protéico (protein calibration standart I, BrukerDaltonics, Bilerica, MA, USA) com conhecidos valores de massa das proteínas, foi usado para a calibração. A variação de massa entre 2.000 a 20.000 Da foi registrado usando modo linear com pulso de 104 ns em uma voltagem de +20 kV. A lista de picos obtidos foi exportada ao software Biotyper™ (Biotyper system, versão 3.0) onde a identificação final foi determinada.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os microrganismos, principalmente, os fungos, são utilizados em diversos processos fermentativos, pois são capazes de produzir compostos bioativos a baixo custo, com aplicabilidade no setor alimentício e farmacêutico, como os antioxidantes. Os antioxidantes removem os radicais livres, e tem a função de prevenção dos processos oxidativos e degenerativos que ocorrem no organismo. Os principais compostos são: vitamina C, vitamina E, carotenoides, precursores da vitamina A, flavonóides, isoflavonas, ômega 3 (SONATI e AFFONSO, 2007).

A identificação por MALDI-TOF MS da linhagem produtora de compostos bioativos utilizada neste trabalho, ocorreu através dos espectros obtidos que foram analisados por um algoritmo, em seguida os espectros obtidos foram comparados com o banco de dados Biotyper™ versão 3.1, (BrukerDaltonics, Germany/USA), sendo a espécie identificada como *Aspergillus fumigatus* com valores de registro (score) ≥ 2.0 . Quando a identificação apresenta um score abaixo de 2.0, é realizada nova extração protéica, do isolado, para confirmação do resultado. O relatório de identificação dos isolados de *Aspergillus fumigatus* apresenta os melhores scores de 2,038 e 1,99 (Software MALDI Biotyper versão 3.1). como mostra a figura .

Figura 2: Resultado da identificação pelo MALDI Biotyper.

Result Overview

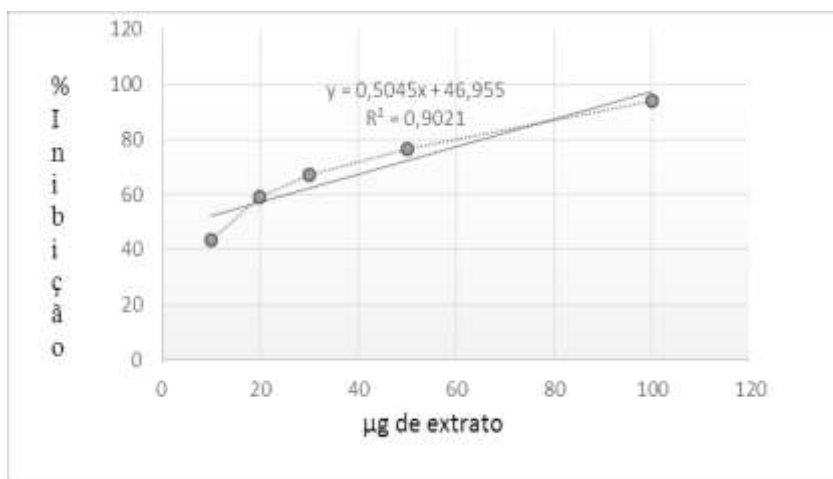
Analyte Name	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
#111 (++)(A)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2.038	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1.99

Fonte: Software MALDI Biotyper versão 3.1

Neste estudo, a atividade antioxidante do extrato em acetato de etila obtido do *Aspergillus fumigatus* isolado de água mineral em trabalho anteriormente realizados (Santana et. al. ,2019 – Submetido), foi expressa em CI_{50} , concentração mínima da amostra capaz de sequestrar 50% dos radicais, utilizando os ensaios com metodologias de DPPH e ABTS. Estes ensaios revelaram que o extrato acetato de etila apresentou boa atividade antioxidante utilizando DPPH como substrato (Figura

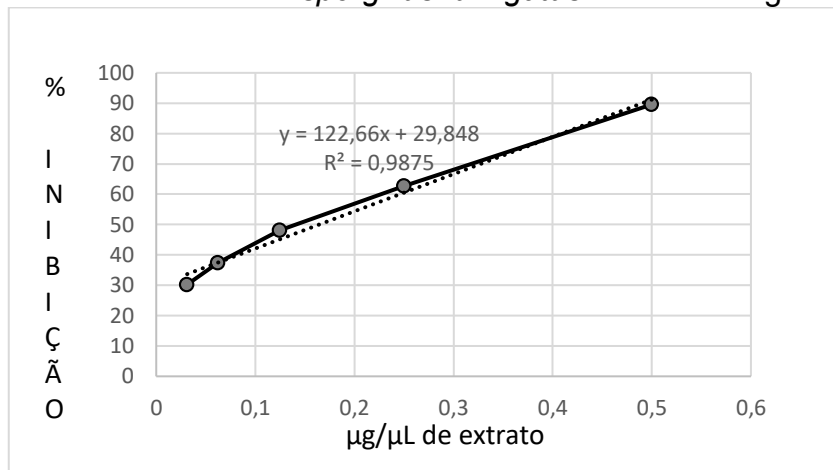
3), com $CI_{50} 6,03 \pm 0,02 \mu g$ de extrato enquanto que o ácido ascórbico obteve $CI_{50} \pm 1,06 \mu g$, o extrato obtido de *Aspergillus fumigatus* apresentou boa atividade contra o radical DPPH, neutralizando o radical livre da cor púrpura DPPH, seja pela transferência de átomos de elétrons ou hidrogênio para a molécula diamagnética de cor amarela, revelando propriedade doadora de compostos fenólicos presentes no extrato.

Figura 3- Valores do potencial de inibição de DPPH do extrato acetato de etila obtido do líquido metabolito do *Aspergillus fumigatus* isolado de água mineral.



Utilizando o método de ABTS (Figura 4), também foi possível detectar uma excelente atividade antioxidante como extrato acetato de etila obtido do líquido metabolito do *Aspergillus fumigatus* isolado de água mineral obtendo-se valores de $CI_{50} 0,164 \pm 0,01 \mu g/mL$ e 1,24 vezes superior ao $CI_{50} 0,204 \pm 0,02 \mu g/mL$ do padrão Trolox.

Figura 4- Valores do potencial de inibição de ABTS do extrato acetato de etila obtido do líquido metabolito do *Aspergillus fumigatus* isolado de água mineral



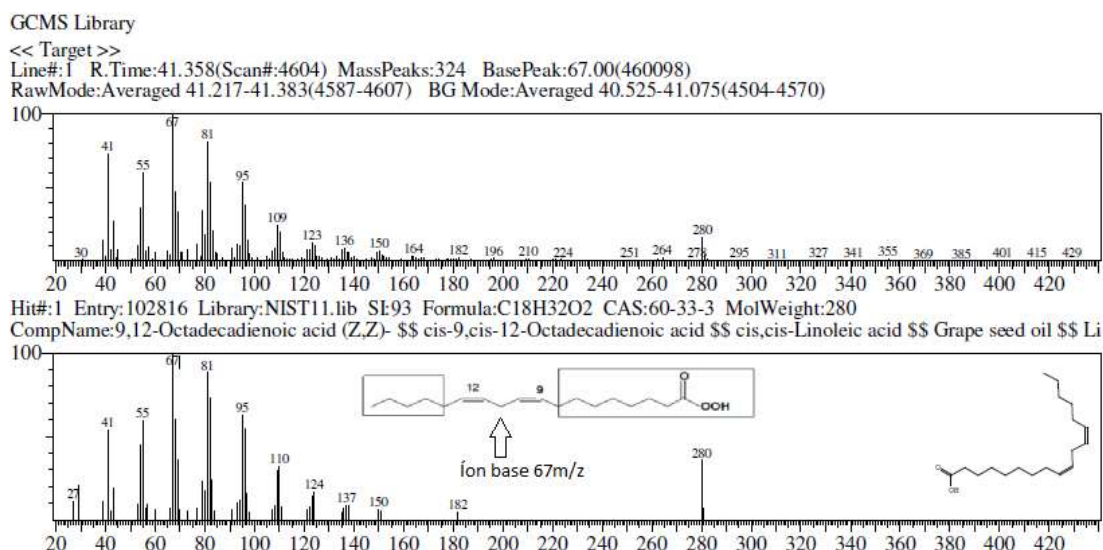
Os resultados obtidos indicam que o extrato acetato de etila obtido do líquido metabolito do *Aspergillus fumigatus* isolado de água mineral, apresenta compostos químicos com potente atividade antioxidantes com atuação frentes aos radicais livres DPPH e ABTS estando em consonância com estudos apresentados por Arora D.S. e Chandra p. (2011).

Vários métodos têm sido empregados para determinar a atividade antioxidante in vitro de extratos e substâncias isoladas. Um dos mais utilizados consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE50 e maior a sua atividade antioxidante. Uma vantagem desse método é o fato do radical ser estável e estar disponível comercialmente, evitando sua geração por formas diversas (como ocorre no ABTS), além de proporcionar de modo fácil e rápido a avaliação de vários produtos antioxidantes de uma só vez por espectrofotometria. Esse método tem sido muito empregado na análise do mecanismo de reação dos compostos polifenólicos com radicais livres (PREDOI, 2015), por isso foi o método selecionado para acompanhar o pré fracionamento do extrato, tendo o objetivo de caracterizar o principal componente bioativo presente no extrato em estudo.

O rendimento do fermentado foi de 0,240g/ml de peso seco do extrato bruto, o qual foi posteriormente submetido a uma coluna cromatográfica em coluna com sílica gel 60, e eluída com crescente gradiente de polaridade sendo coletadas 30 frações distintas onde apenas uma fração de número 22, apresentou atividade antioxidante frente ao Radical DPPH, a qual foi posteriormente submetida a uma cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS), na qual a análise, da fração

22, mostrou a presença de algumas substâncias de acordo com a figura 5, porém foi possível observar o composto majoritário (32,23%), identificado como o ácido linoléico. Verifica-se no espectro da figura abaixo, a presença de um íon base de 67 m/z e um íon molecular de 280 m/z.

Figuras 5 : Espectro do ácido linoléico da fração bioativa.



O ácido linoléico também conhecido como ômega 6, é um ácido graxo essencial poliinsaturado com duplas ligações nas posições 9 e 12 da sua cadeia carbônica. Com base em sua fórmula molecular que consiste de $C_{18}H_{32}O_2$, o ácido linoléico é classificado como um ácido graxo de cadeia longa, de acordo com (Bazinet, 2014).

Os ácidos graxos têm sido associados como compostos com considerável capacidade antioxidante (Villa-Rodriguez, 2011). Importantes na constituição de componentes celulares, esses compostos também podem desempenhar papéis relacionados aos processos inflamatórios, melhora da concentração e controle dos níveis sanguíneos de colesterol e no combate aos radicais livres gerados por fatores endógenos ou exógenos.

Além dos vegetais superiores, os microrganismos são conhecidamente importantes produtores de ácidos graxos. Estes compostos são usualmente utilizados na composição das membranas celulares ou armazenados como fonte de energia. Os fungos filamentosos têm sido reportados como uma boa fonte produtora de ácidos graxos (Bellou, 2016). Nestes organismos a síntese dos ácidos graxos é mediada pela ação das sintases de ácidos graxos (tipo 1 ou 2) a partir do acetil-CoA, seguida da

ação das dessaturases e elongases que catalisam as reações de insaturação e adição de carbonos à cadeia, (Gong, 2014).

Os ácidos graxos essenciais são nutrientes imprescindíveis para o funcionamento dos organismos. É primordialmente obtido através da dieta, sendo os peixes de águas frias a principal fonte. Nos últimos anos, é notável que a pesca predatória tem desencadeado um colapso nos ecossistemas marinhos. Os fungos filamentosos apresentam-se como uma fonte alternativa renovável de ácidos graxos, visto que, produzem esses compostos em condições basais, utilizando substratos de baixo custo (Francisco, 2017; Silveira, 2010).

CONCLUSÃO

Os microrganismos são importantes fontes de moléculas antioxidantes. No presente trabalho, um fungo foi isolado da água mineral comercializada e testado frente a produção de compostos bioativos. A cepa demonstrou capacidade de produção de compostos bioativos com atividade antioxidante bastante satisfatória. Os compostos produzidos foram parcialmente purificados por coluna cromatográfica, a fração com considerável atividade antioxidante foi submetida a análise de CG-MS e o composto majoritário foi identificado como ácido linoléico correspondendo a 32% da amostra. A cepa fúngica foi identificada pela técnica de MALDI-TOF como *Aspergillus fumigatus*. Pesquisas mais profundas no sentido de isolamento, caracterização e aplicação industrial e farmacológica do composto bioativo estão sendo realizadas.

REFERÊNCIAS

- ALAM, M. N., BRISTID N.J., RAFIQUZZAMAN M., Review on *in vivo* and *in vitro* methodsevaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal, V. 21, P.143-152, 2013. ALGABASE, 2019. Disponível em <<http://www.algaebase.org/browse/taxonomy/?id=5187> acessado no dia 08 de abril de 2019
- BAZINET, R. P., & LAYÉ, S. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(12), 771–785.doi:10.1038/nrn3820. 2014.
- BELLOU, S., TRIANTAPHYLLIDOU, I.-E., AGGELI, D., ELAZZAZY, A. M., BAESHEN, M. N., & AGGELIS, G. Microbial oils as food additives: recent approaches for improving microbial oil production and its polyunsaturated fatty acid content. *Current Opinion in Biotechnology*, 37, 24–35.doi:10.1016/j.copbio.2015.09.005. 2016.
- BRADFORD, M. M.. A Rapid And Sensitive Method For The Quantication Of Microgram Quantities Of Protein Utilizing The Principle Of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254, 1976.
- BRUKER- MALDI-TOF Mass Spectrometry: microflex LRF Operator Training, v.2, p. 1-49, 2013.
- CAROCHO, M.; FERREIRA. I. C. R. F.; MORALES, P.; SOKOVIĆ, M. Antioxidants and Prooxidants: Effects on Health and Aging. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 1-7, 2018.
- COOPER, E. L.; MA, M. J. Alzheimer Disease: Clues from traditional and complementary medicine.*Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7, 380, 2017.
- DEYA, T. P.; CHAKRABORTYA, S.; KAVJAINA, K. K.; SHARMAA, A.; KUHADAB, R. C. Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid state fermentation process: A review. **Trends in Food Science & Technology**v. 53, p. 60-74, 2016.
- FRANCISCO, M. R., SALDANHA, T., FRAGA, M. E. Fungi as an alternative to produce essential fatty acids. *Científica*. V.45, n.2, p. 123-129. 2017.
- GARNER O, MOCHON A, BRANDA J, BURNHAM CA, BYTHROW M, FERRARO M, GINOCCHIO C, JENNEMANN R, MANJI R, PROCOP GW, RICHTER S, RYCHERT J, SERCIA L, WESTBLADE L, LEWINSKI M. Multi-centre evaluation of mass spectrometric identification of anaerobic bacteria using the VITEK® MS system. *Clin Microbiol Infect*. 2014Apr; 20(4):335-9.
- GONG, Y., WAN, X., JIANG, M., HU, C., HU, H., & HUANG, F. *Metabolic engineering of microorganisms to produce omega-3 very long-chain polyunsaturated fatty acids*. *Progress in Lipid Research*, 56, 19–35.doi:10.1016/j.plipres.2014.07.001. 2014

JEUKENDRUP AE. Periodized nutrition for athletes. *Sports Medicine*; 47(1): 51-63, 2017.

KIM MM, VAN TA Q, MENDIS E, RAJAPAKSE N, JUNG WK, BYUN HG, et al. Phlorotannins in *Ecklonia cava* extract inhibit matrix metalloproteinase activity. *Life Sci*; 79(15):1436-43; 2006.

LIM S., CHOI AH., KWON M., JOUNG EJ., SHIN T., LEE SG., KIM NG., HYEUNG-KIM

R. valuation of antioxidant activities of various solvent extracts from *Sargassum serratifolium* and its major antioxidant components. *Food Chemistry*, 278, p.178-184, 2019.

MANSAUDA K.L.R., ANWAR E., NURHAYATI T. Antioxidant and Anti-Collagenase Activity of *Sargassum plagiophyllum* Extract as an Anti-Wrinkle Cosmetic Ingredient. *Pharmacogn J*. 10(5):932-936, 2018.

MOKRANI A., MADANI K. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. *Separation and Purification Technology*, v. 162, p. 6876, 2016.

PRIETO P, PINEDA M, AGUILAR M. Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem* 269: 337-341, 1999.

RAWAT D. S., JOSHI G., LAMBA B. Y., TIWARI A. K. KUMAR P. The effect of binary antioxidant proportions on antioxidant synergy and oxidation stability of Jatropha and Karanjabiobiodiesels. *Energy*, v. 84, p. 643-655, 2015.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, I. et al. In vitro antioxidant activity of brewed using different procedures: Italian, espresso and filter. *Food Chemistry*, Oxford, v. 90, n. 1/2, p. 133-139, Jan./ Feb. 2005.

SANTANA, R.C.F, OLIVEIRA, T. H. B., BORBA, C. B. A.; TEIXEIRA, L. M. C.; SILVA, P. B.; LINS E LINS, T.U., SILVA, L. A. O., COELHO, L. C. B. B. Hydrolytic activity of enzymes produced by fungi isolated from drinking mineral. Artigo submetido jornal Internacional: **Journal of Applied Biology and Biotechnology**. Ano 2019.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. **Journal of functional foods**, v. 18, p. 820-897, 2015.

SHANMUGAM S1 · SHANKAR K · RAMACHANDIRAN S., NAIDU K., KALIMUTHU K., MUTHUVE A. In Vitro Studies and Characterization of Tissue Protein from Green Mussel, *Perna viridis* (Linnaeus, 1758) for Antioxidant and Antibacterial Potential. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 21, 2019.

SOARES T.C., VILARINHO M.F.S.B., SOARES T.C, ROCHA L.A., SANTANA L.C.B., SILVA L.A.A., FARIAS R.K.C., SILVA N.C., SOUSA M.M.C., SILVA K.H.R., CÂMARA G.B., LIMA V.M., BARROS I.S., ROCHA G.C., OLIVEIRA V.A. Efeitos da suplementação das vitaminas C e E na prática de atividade física: uma revisão sistemática. *Revista Eletrônica Acervo Saúde / Electronic Journal Collection Health*, Vol. 11 (7), p.1-12, 2019.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v.30, n.2, p. 351-355, 2007.

Villa-Rodríguez, J. A., Molina-Corral, F. J., Ayala-Zavala, J. F., Olivas, G. I., & González-Aguilar, G. A. *Effect of maturity stage on the content of fatty acids and antioxidant activity of "Hass" avocado. Food Research International*, 44(5), 1231–1237. doi:10.1016/j.foodres.2010.11.012. 2011.

WANG, W.; YANG, X.; CHEN, S.; ZHANG, C.; CHEN, L. & XIE, W. Method for preparing biscuit from *Sargassum*. Patente no A21D13/08; A21D2/36; A23L1/164; A23L1/29; A23L1/337. *FamingZhuanliShenqingGongkaiShuomingshu*. pp. 1-6, 2008

CONCLUSÃO

O estudo realizado explorou o potencial biológico do complexo bioativo do *Aspergillus fumigatus* quanto à produção das enzimas (quitinases, amilase e xilanase), atividade inseticida e antioxidante. A linhagem 98 (identificada pela técnica de MALDI- TOF MS como *Aspergillus fumigatus*) foi escolhida para dar seguimento aos experimentos, por apresentar um melhor rendimento enzimático no ensaio de degradação.

Na produção do complexo quitinolítico, realizou-se um planejamento do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) para identificar fatores que influenciam no processo de otimização da produção (99,8% de confiabilidade do modelo estatístico) da enzima quitinase.

O complexo bioativo do *Aspergillus fumigatus*, apresentou potencial para uso no controle do inseto *Sitophilus zeamais* por apresentar efeito deterrente classificado de moderado a forte, impedindo que os adultos aproveitem uma determinada fonte de alimento e induzindo situação de inanição e efeitos deletérios na fisiologia dos insetos.

O *Aspergillus Fumigatus* demonstrou capacidade de produção de compostos bioativos com atividade antioxidante bastante satisfatória. Os compostos produzidos foram parcialmente purificados por coluna cromatográfica, a fração com considerável atividade antioxidante foi submetida a análise de CG-MS e o composto majoritário foi identificado como ácido linoléico correspondendo a 32% da amostra.

Os resultados obtidos neste trabalho foram relevantes para a área biotecnológica, além de reforçar a importância de pesquisar novas fontes de compostos bioativos produzidos por fungos.

REFERÊNCIAS

- ABROL, D.P., SHANKAR, U. Pesticides, Food Safety and Integrated Pest Management. Integrated Pest Management, Pesticide Problems, v. 3, p. 167-200, 2014.
- AGOSTINI-COSTA, T.S.; VIEIRA, R.F.; BIZZO, H.R.; SILVEIRA, D.; GIMENES, M.A. Secondary Metabolites. In: Dhanarasu, S. (Ed.). Chromatography and its Applications. [s.l.]: InTech, 2012.
- ALVES, C. Q.; BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. LIMA, L. S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonoides. *Diálogos e Ciência*, v. 12, 2007.
- ANTONINO, N.A. Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundos da indústria 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.
- ARZANLOU, M.; SAMADI, R.; FRISVAD, J. C.; HOUBRAKEN, J.; GHOSTA, Y. 2016. Two novel *Aspergillus* species from hypersaline soils of The National Park of Lake Urmia, Iran. *Mycol Progress* (2016) 15:1081–1092. DOI 10.1007/s11557-016-1230-8
- ASSIS, A. S.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M. Bioconversão de resíduos de camarão *Litopenaeus vannamei* para produção de biofilme de quitosana. *Revista Ibero-americana de Polímeros*, v. 9, n. 8, p. 480-499, 2008
- BAPTISTA, N. M. Q.; SANTOS, A. C.; ARRUDA, F. V. F.; GUSMÃO, N. B. Produção das Enzimas Lignina Peroxidase e Lacase por Fungos Filamentosos. *Scientia Plena*, v. 8, n. 1, 2012.
- BABIČ, M.N.; GUNDE-CIMERMAN, N.; VARGHA, M.; TISCHNER, Z.; MAGYAR, D.; VERÍSSIMO, C.; SABINO, R.; VIEGAS, C.; MEYER, W.; BRANDÃO, J. Fungal Contaminants in Drinking Water Regulation? A Tale of Ecology, Exposure, Purification and Clinical Relevance. **Int. J. Environ. Res. Public Health** 2017, 14, 636.
- BARBA, F. J.; MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N.; MERCADANTE, A. Z.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; ORLIEN, V. Bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables after thermal and nonthermal processing. *Trends in Food Science & Technology*, v. 67, p. 195–206, 2017.
- BETA, T., ISAAK, C. Grain production and consumption: overview. In: Encyclopedic of food grains. London, Elsevier Store, p. 349-358, 2016.
- BOTTON, M., I. LORINI, AFONSO, A. P. S. Ocorrência de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) danificando a cultura da videira no Rio Grande do Sul. **Neotrop. Entomol**, v. 34, p. 355-356, 2005.
- BOUWS, H. WATTENBERG, A., ZORN, H. Fungal secretomes—nature’s toolbox for white biotechnology. **Applied Microbiology Biotechnology**. 80: 381–388. 2008.

BRASIL. PORTARIA Nº 104, de 25 de janeiro de 2011. Disponível em: . Acesso em: 22 jan. 2018.

CAMAROTTI, J. R. S. L. ; OLIVEIRA, A. P. S. ; PAIVA, P. M. G. ; PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H. . Phytoinsecticides for controlling pests and mosquito vectors of diseases. In: Victor Green. (Org.). Biocontrol Agents: Types, Applications and Research Insights. 1ªed.New York: Nova Science Publishers, v. 5, p. 147-188, 2017.

CAROCHO, M.; FERREIRA. I. C. R. F.; MORALES, P.; SOKOVIĆ, M. Antioxidants and Prooxidants: Effects on Health and Aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2018, p. 1-7, 2018.

CARVALHO, E. V. M.; BEZERRA, R. F.; BEZERRA, R. S.; ARAUJO, J. M.; SANTOS, A. J. G.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Detection of the first lectin with antimicrobial activity present in serum of the Amazonian fish tambaqui *Colossoma macropomum*. *Fisheries Science*, v. 02, p. 01-25, 2012

DECARLI, S. Purificação, caracterização bioquímica, e potencial de aplicação biotecnológica de uma xilanase halotolerante e termoestável de *Colletotrichum graminicola*. **Dissertação de Mestrado**. 1-47. 2016.

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.

DUO-CHUAN, L. Review of fungal chitinases. *Mycopathologia*. 161:345-360, 2006. GARDNER, K. & BLACKWELL, J. 1975. Refinement of the structure of β -chitin. glycoside hydrolases. ***Current opinion in structural biology***, 7, 637-644.

DEACON, J.W. *Fungal Biology*. 4 ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2006. 371p.

FAZOLIN, M.; C. R., DE OLIVEIRA DAMACENO, J. E., DE ALBUQUERQUE, E. S., DA SILVA CAVALCANTE, A. S., ESTRELA, J. L. V. Fumigação de milho para o controle do gorgulho utilizando caule de *Tanaecium nocturnum* (Bignoniaceae). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 45, n. 1, p. 1-6, 2010.

FISHEL, F. M. Pesticide effects on nontarget organisms. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 2014.

FLEURAT-LESSARD, F. Stored-grain pest management. In: *Encyclopedia of food grains*. London, Elsevier Store, p. 127-139, 2016.

FRAZÃO, CARLOS AYDANO VIRGÍNIO. Scientific article plant parasitology resistance of maize cultivars to *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 85, p. 1–8, nov 2018.

GALLO, D., O. NAKANO, S. SILVEIRA NETO, R.P.L. CARVALHO, G.C. BAPTISTA, E. BERTI FILHO, J.R.P. PARRA, R.A. ZUCCHI, S.B. ALVES, J.D. VENDRAMIN, L.C. MARCHINI, J.R.S. LOPES; C. OMOTO. *Entomologia Agrícola*. FEALQ. 920p, 2002.

GETU, B. H. E. Host type and textures on the survival of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) parental and filial generations. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, v. 6, n. 1, p. 622-626, 2018.

GILDBERG, A.; STEMBERG, E. A new process for advanced utilization of shrimp waste. *Process Biochemistry*, v. 36, p. 809-812, 2001.

GOMES, E. B.; DIAS, L. R. L.; MIRANDA, R. C. M. Actinomycetes bioactive compounds: Biological control of fungi and phytopathogenic insect. *African Journal of Biotechnology*, v. 17, n. 17, p. 552-559, 2018.

GRECO, M.; KEMPPAINEN, M.; POSE, G.; PARDO, A. 2015. Taxonomic Characterization and Secondary Metabolite Profiling of *Aspergillus* Section *Aspergillus* Contaminating Feeds and Feedstuffs. *Toxins*, 7, 3512-3537; doi:10.3390/toxins7093512.

GRIMM, L. H., KELLY, S., KRULL, R., HEMPEL, D. C. Morphology and productivity of filamentous fungi. ***Applied Microbiology Biotechnology***. 69: 375–384. 2005.
HATTING, J. L.; MOORE, S. D.; MALAN, A. P. Microbial control of phytophagous invertebrate pests in South Africa: current status and future prospects. *Journal of invertebrate pathology*, 2018.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, New York, v.68, p.2831–2846, 2007.

HAMMEL, K. E. Fungal Degradation of Lignin. ***Plant Litter Quality and Decomposition***. CABI, Wallingford, USA. 1997.

HENRISSAT, B. & DAVIES, G. 1997. Structural and sequence-based classification of

HAWKSWORTH, D.L.; LÜCKING, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology Spectrum*, Washington, v.5, n.4, p.1-17, 2017.

HOELL, I. A., VAAJE-KOLSTAD, G. & EIJSINK, V. G. 2010. Structure and function of enzymes acting on chitin and chitosan. ***Biotechnology and Genetic Engineering Biopolymers***, 14, 1581-1595.

HILLENKAMP, F., KARAS, M., BEAVIS, R. C., & CHAIT, B. T. (1991). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Analytical chemistry*, 63(24), 1193A-1203A.

JONES, C. R., ADAMS, M. R., ZHDAN, P. A., CHAMBERLAIN, A. H. L. The role of surface physicochemical properties in determining the distribution of the

autochthonous microflora in mineral water bottles. **Journal Applied of Microbiology**. 86: 917-927, 1999.

JURINKE, Christian; OETH, Paul; VAN DEN BOOM, Dirk. MALDI-TOF mass spectrometry. *Molecular biotechnology*, v. 26, n. 2, p. 147-163, 2004.

LAZZARI, S. M.N., KARKLE, A.F., LAZZARI, F.A. Resfriamento artificial para o controle de Coleoptera em arroz armazenado em silo metálico. *Revista Brasileira de Entomologia*. v. 50, p. 293- 296, 2006.

LIANG, J., TANG, S., CHEKE, R.A. Beverton–Holt discrete pest management models with pulsed chemical control and evolution of pesticide resistance. *Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation*. v. 36, p. 327-341, 2016.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, v. 63, p. 1–10, 2013.

LORINI, I.; KRZYŻANOWSKI, F. C.; FRANÇA-NETO, J. B.; HENNING, F. A.; HENNING, A. A. **Manejo integrado de pragas de grãos e sementes armazenadas**. Embrapa, Brasília-DF. 2015. 88 p.

MORAES, C.S.; OLIVEIRA JUNIOR, F.O.R.; MASSON, G.; RABELO, K.M.; SANTOS, L.O.; BASTOS, N.F.P.; FARIA R.C.R. Métodos experimentais no estudo de proteínas. Rio de Janeiro: IOC, 84 p, 2013.

MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA, WITKOWSKA AM, ZUJKO ME. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Adv Med Sci*. 2018 Mar;63(1):68-78. Epub 2017 Aug 17.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NEUMANN, K., VERBURG, P.H., STEHFEST, E., MULLER, C. The yield gap of global grain production: A spatial analysis. *Agricultural Systems*. v. 103, p. 316-326, 2010.

NORAMBUENA, Carolina et al. Insecticidal activity of *Laureliopsis philippiana* (Looser) schodde (atherospermataceae) essential oil against *Sitophilus* spp. (coleoptera curculionidae). *Chilean journal of agricultural research*, v. 76, n. 3, set 2016.

O'BRIEN, J.; WRIGHT, D.G. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, London, v.22, n.4, p.552–558, 2011

KELLER, N.P. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery . *Nat Rev Microbiol*. 2019 March ; 17(3): 167–180. doi:10.1038/s41579-018-0121-1.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. 1988. A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing.

KNOB. A., TERRASAN, C. R. F., CARMONA, E. C. β -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. **World Journal Microbiology Biotechnology**. 26:389–407. 2010.

KWON-CHUNG, K. J. & SUGUI, J. A. *Aspergillus fumigatus* – What makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? *Plos Pathog.*, 9(12):e1003743, 2013

MAHR, D.L. ,NINO, RIDGWAY, P.W. Biological control of insects and mites: An introduction to beneficial natural enemies and their use in pest management. Extension Biological Control **Programs Department of Entomology University of Wisconsin-Madison** January 2008.

MENEZES, E. L. A. Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modos de ação e uso agrícola. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005.

MILANEZI, N. V. G. Purificação e Caracterização de uma ENDO-1,4- β -XILANASE produzida por *Aspergillus niger* com características de interesse industrial. **Dissertação de Mestrado**. 1-94. 2010.

MONDAL, M., KHALEQUZZAMAN, M. Toxicity of naturally occurring compounds of essential oil against *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Biological Science*, v. 10, p. 10-17, 2010.

MUZZARELLI, R. A.. Chitin nanostructures in living organisms. **Chitin. Springer**. 2011.

NAPOLEÃO, T.H., AGRA-NETO, A.C., PONTUAL, E.V., BELMONTE, B.R., PAI-VA, P.M.G. Biology, ecology and strategies for control of stored-grain beetles: a review. In: *Beetles: Biodiversity, ecology and role in the environment*. 1 ed. New York: Nova Science Publishers Inc., p. 105-122, 2015.

NOOMHORM, A., SRISOONTARALAK, P., URAICHUEN, J., AHMAD, I. Efficacy of atmospheric and pressurized carbon dioxide or air against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) in milled rice. *Journal of Stored Products Research*, v. 54, p. 48-53, 2013.

NAKAMURA, C. S. Uso de Defensivos Agrícolas Biológicos: uma Análise Técnica e de Mercado – Dissertação: Mestrado em Engenharia Bioquímica, Universidade de São Paulo – USP. 2014.

OLIVEIRA, A.P et al. Nanoformulation prototype of the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol to population management of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Industrial Crops and Products*, 107:198-205, 2017.

PAIVA, P.M.G., PONTUAL, E.V., NAPOLEÃO, T.H., COELHO, L.C.B.B. **Lectins and trypsin inhibitors from plants: biochemical characteristics and adverse effects on insect larvae**. Nova Science Publishers, Inc., New York, p.52, 2013.

PAULUSSEN, C., HALLSWORTH, J., ÁLVAREZ-PÉREZ, S., NIERMAN, W., HAMILL, P., BLAIN, D., REDIERS, H., LIEVENS, B. (2016). Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microbial Biotechnology* (IF: 3.99).

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Microbiologia: conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v. 1, p. 146-170; 290-329.

PETRINI, O. Fungal Endophytes of Tree Leaves. **Microbial Ecology of Leaves**. 179: 197. 1991. *Reviews*, 27, 331-366.

PATERSON, R. R. M.; LIMA, N. Thermophilic Fungi to Dominate Aflatoxigenic/Mycotoxigenic Fungi on Food under Global Warming. *Int J Environ Res Public Health*. 2017 Feb; 14(2): 199.

PRAKASH, B., SINGH, P., KEDIA, A., DUBEY, N.K. Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and in vivo efficacy in food system. **Food Res. Int.** 49, p.201,208, 2012b.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. 1965. The genus *Aspergillus*. pp.ix+686 pp. ref.55 pp.

REDDY, G.V.P., ANTWI, F.B. Toxicity of natural insecticides on the larvae of wheat head armyworm, *Dargida diffusa* (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 42, p. 156-162, 2016.

RINAUDO, M. 2006. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in polymer science**, 31, 603-632.

ROBERTS, G. A. F.; *CHITIN CHEMISTRY*, MC MILLAN PRESS LTD: London, 1992, cap 1.

ROMEIRO, R. da S. **Bactérias Fitopatogênicas**. Viçosa: UFV, 1995.

ROKAS, A.; GIBBONS, J. G.; ZHOU, X.; BEAUVAIS, A. & LATGÉ, J. P. The diverse applications of RNA-seq for functional genomic studies in *Aspergillus fumigatus*. *Ann N Y Acad Sci.*, 1273(1):25-34, 2012.

ROZE, L.V.; CHANDA, A.; LINZ, J.E. Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: a new understanding of established cellular processes. *Fungal Genetics and Biology*, Orlando, v.48, p.35-48, 2011.

SÁ, A.V.; SILVA, J.C.; PARANHOS, B.A.J.; GAVA, C.A.T.; produção de conídios dos fungos *Beau bassiana* LCB289 e *Matarhizium anisopliae* LCB255 em diferentes condições. Anais da XIII jornada de iniciação científica da Embrapa semiarido, 2018.

SABA, H. Trichoderma – a promising plant growth stimulator and biocontrol agente. *Mycosphere*, **Guiyang**, v. 3, n. 4, p. 524-531, 2014.

SAMSON, R. A.; VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S. B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; SUSCA, A.; TANNEY, J. B.; VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; SZIGETI, G.; YAGUCHI, T.; FRISVAD, J. C. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 78: 141–173.

SAMSON, R.A.; HOUBRAKEN, J.; THRANE, U.; FRISVAD, J.C.; ANDERSEN, B., Food and Indoor Fungi. Utrecht, The Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2010, 390p.

SANTOS, R. B.; BLANK, A. F.; PAULA, J. W. A.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; INNECCO, R. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de alecrim pimenta na época chuvosa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 46, Goiânia. Horticultura Brasileira. Brasília: ABH, v. 24. p. 2818-2821, 2006.

SALVADORI, J. R.; MASSARO JUNIOR, A. L.; LAU, D.; PEREIRA, P. R. V. S. Pragas e métodos de controle. Sistemas de Produção Embrapa – Embrapa Trigo. Disponível em:

https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistema_sd_eproducaolf6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column1&p_p_col_count=1&p_r_p_76293187_sistemaProducaold=3704&p_r_p_-996514994_topicold=1314. Acesso: dezembro, 2017.

SEIFRIED, H. E.; ANDERSON, D. E.; FISHER, E. I.; MILNER, J. A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. The Journal of Nutritional Biochemistry, v. 18, n. 9, p. 567–579, 2007.

SILVA ;L. R.; CANABARRO , A. M. C. A.; NASCIMENTO, M. B., JESUS, E. V. O.; SANTOS, T. M. C.; MELO ,I. L.; ALMEIDA; A. C. P. S.; SILVA, J. M. Bioativos antimicrobianos produzidos por fungos endofíticos associados a plantas do semiárido. Ciência Agrícola, Rio Largo, v. 16, número suplementar, p. 5-7, 2018.

SOUSA, A. H.; FARONI, L. R. A.; GUEDES, R. N. C. Locomotor behavior of Sitophilus zeamais populations under sublethal ozone exposure. Journal of Pest Science, p. 1–9, 13, 2016.

SOHAIL, M. A.; IQBAL, Z.; SHEENA, SHUJAU M. K., INAYAT U. R.; KHAN, W.; ASGHAR, A.; IMRAN U.; NUMAN, M. 2014. Antimicrobial activity of mycelial extracts of Rhizopus stolonifer against different fungal and bacterial pathogenic strains. International Journal of Biosciences. Vol. 4, No. 7, p. 276-281.

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.

SULEIMAN, R. et al. Is flint corn naturally resistant to Sitophilus zeamais infestation? Journal of Stored Products Research, v. 60, p. 19–24, 2015.

SUNNA, A., ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**. 17: 39-67. 1997.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Washington, v.67, p.491-502, 2003.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, Cincinnati, v.67, p.257-268, 2004

SULEIMAN, R. et al. Is flint corn naturally resistant to *Sitophilus zeamais* infestation? *Journal of Stored Products Research*, v. 60, p. 19–24, 2015.

TELES, S., PEREIRA, J.A., SANTOS, C.H.B., MENEZE, R.H., MALHEIRO, R., LUCCHESI, A.M., SILVA, F. Geographical origin and drying methodology may affect the essential oil of *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown. *Ind. Crop Prod*, v. 37, p.247–252. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.12.029>, 2012.

TENNYSON, S., RAVINDRAN, J., EAPEN, A., WILLIAM, J. Larvicidal activity of *Ageratum houstonianum* Mill. (Asteraceae) leaf extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**. v. 5, p. 73-76, 2015.

THENMOZHI, M.; GOPAL, J. V.; KANNABIRAN, K.; RAJAKUMAR, G.; VELAYUTHAM, K.; RAHUMAN, A. A. Eco-friendly approach using marine actinobacteria and its compounds to control ticks and mosquitoes. *Parasito Res*, v. 112, p. 719-729, 2013.

UDAY, U.S.P., CHOUDHURY, P., BANDOPADHYAY, T.K., BHUNIA, B. Classification, mode of action and production strategy of xylanase and its application for biofuel production from water hyacinth. **International Journal of Biological Macromolecules**. 82: 1041-1054. 2016.

URÍK, M.; HLODÁK, M.; MIKUŠOVÁ, P.; MATÚŠ, P. 2014. Potential of Microscopic Fungi Isolated from Mercury Contaminated Soils to Accumulate and Volatilize Mercury. *Water Air Soil Pollut* 225:2219.

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

VANDENKOORNHUYSE, P., BALDAUF, S. L., LEYVAL, C., STRACZEK, J., YOUNG, J. P. W. Extensive Fungal Diversity in Plant Roots. **Science**. 295:2051. 2002.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*, v. 26, p. 390-400, 2003.

WARD, O. P. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. **Biotechnology Advances**. 30: 1119–1139. 2012

WEI, L. et al. Chemical Composition and biological activity of star anise *Illicium verum* extracts against maize weevil, *Sitophilus zeamais* adults. *Journal of Insect Science*, v. 14, n. 80, p. 1–13, jun. 2014.

WHITE MARTINS. Ficha de informações de segurança de produtos químicos. Produto fosfina. FISQP no.: P-4643-H.

WU, J. Q., KOSTEN, T. R., & ZHANG, X. Y. Free radicals, antioxidant defence systems, and schizophrenia. *Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 46, 200–206, 2013.

YANG, X., SHI, P., HUANG, H., LUO, H., WANG, Y., ZHANG, W., YAO, B. Two xylose-tolerant GH43 bifunctional β -xylosidase/ α -arabinosidases and one GH11 xylanase from *Humicola insolens* and their synergy in the degradation of xylan. **Food Chemistry**. 148: 381–387. 2014.