



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOTECNOLOGIA APLICADA À AGROPECUÁRIA**

**MAYARA PIMENTEL FIGUEIREDO**

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO USO DE FILTRADOS DE *Trichoderma asperellum* COM INDUÇÃO DE QUITINASES E PROTEASES NO CONTROLE DE LARVAS DE *Tenebrio molitor* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)**

ertação  
5677  
5 Ex: 01

**BELÉM  
2015**

7-06.50600  
7-C 52189

30  
Universidade Federal Rural  
da Amazônia  
BIBLIOTECA

MAYARA PIMENTEL FIGUEIREDO

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO USO DE FILTRADOS DE *Trichoderma asperellum* COM INDUÇÃO DE QUITINASES E PROTEASES NO CONTROLE DE LARVAS DE *Tenebrio molitor* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia como parte das exigências do curso de Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, como requisito para obtenção do título de Mestre.  
Área de concentração: Biotecnologia  
Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Gisele Barata da Silva  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Telma Fátima Vieira Batista

Dissertação  
579.5677  
F 473  
Ex: 01



BELÉM  
2015

Universidade Federal Rural da Amazônia  
**BIBLIOTECA**

nr 3430 Data 11/02/2016

---

Figueiredo, Mayara Pimentel

Potencial biotecnológico do uso de filtrados de *Trichoderma asperellum* com indução de quitinases e proteases no controle de larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) / Mayara Pimentel Figueiredo. - Belém, 2015.

49 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2015.

Orientador: Gisele Barata da Silva

1. *Trichoderma asperellum* – controle biotecnológico 2. Fungo entomopatogênico 3. Proteases – indução 4. Quitinases – indução 5. Inseto – controle biotecnológico I. Silva, Gisele Barata da (Orient.)

II. Título

---

CDD – 579.5677

MAYARA PIMENTEL FIGUEIREDO

**POENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO USO DE FILTRADOS DE *Trichoderma asperellum* COM INDUÇÃO DE QUITINASES E PROTEASES NO CONTROLE DE LARVAS DE *Tenebrio Molitor* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do curso de Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Gisele Barata da Silva

Aprovado em 26 de junho de 2015.

BANCA EXAMINADORA



---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Gisele Barata da Silva – Presidente  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA



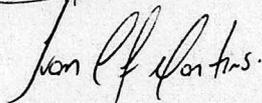
---

Prof. Dr. Hugo Alves Pinheiro – 1º Examinador  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA



---

Prof. Dr. Paulo Roberto Silva Farias – 2º Examinador  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA



---

Prof. Dr. Ivan Carlos Fernandes Martins – 3º Examinador  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

*A Deus por seu imenso amor e fidelidade.  
Ao meu esposo Junior por tão grande amor,  
incentivo e companheirismo.  
Aos meus amáveis pais Alceno e Vera por  
toda dedicação e incentivo dado em grandes  
etapas da vida.  
Aos meus familiares, amigos e irmãos em  
Cristo pela força.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida, por sua fidelidade, força e coragem nos momentos mais difíceis em que achei que não iria conseguir e por me fazer confiar em ti e entender que tudo tem um propósito.

Ao meu esposo por sua dedicação, compreensão, ajuda e amor dedicados, por estar ao meu lado em varias etapas da minha vida, por me incentivar a não desistir dos meus sonhos, por lutar junto comigo por eles, por sorrir e chorar em vários momentos, pelas noites mal dormidas, pela ajuda na montagem e avaliações de diversos ensaios.

Aos meus amados, queridos Pais, por me incentivarem a lutar, acreditarem em mim, por não medirem esforços e me fazerem chegar a onde estou, sem a educação e amor dado não seria o que sou hoje.

Ao meu avô e vó Inês (In memória), tias, tios, primos, primas e de mais familiares que sempre torceram por mim.

À minha amiga Denise, por sua amizade fiel, orações e encorajamentos, por seu apoio, incentivo e força, por ser a irmã que nunca tive e por estar ao meu lado compartilhando de mais uma etapa da minha vida.

Aos meus irmãos em Cristo por suas orações e encorajamento.

As minhas amigas desde a graduação, Christiane e Monique pela grande amizade, em especial Camila e Catiane, pelos momentos de alegria e tristeza compartilhados todos estes anos e mais esses dois no mestrado. As minhas amigas e irmãs em Cristo Marcela e Sheila que sempre me apoiaram e torceram por mim.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária pela oportunidade na realização deste curso e a FAPESPA pelo apoio financeiro.

À minha orientadora, Professora Dra. Gisele Barata da Silva, pelos ensinamentos e orientação.

À minha co-orientadora, Professora Dra. Telma Fátima Vieira Batista pela oportunidade, ensinamento, paciência, compreensão dedicados desde a graduação e por sua competente orientação.

Aos amigos do laboratório Cyntia, Carol, Bruno, Thais, Marcela, Monick, Gledson e Dalton pela ajuda e amizade.

Aos estagiários do LPP que me ajudaram muito no desenvolvimento da minha dissertação, Andre, Aline, Igor, Tainara, em especial a Samanda por sua grande ajuda.

Aos amigos e colegas da pós-graduação, em especial a Bruna e a Keity pela amizade.

Obrigado a todas as pessoas que contribuíram para meu sucesso e para meu crescimento como pessoa. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Média de mortalidades de em porcentagem (%) de *Tenebrio molitor* após aplicação de suspensão de conídios de *Trichoderma asperellum* .....29
- Figura 2- Média de mortalidade em porcentagem (%) de *Tenebrio molitor* após aplicação de filtrado enzimático com e sem quitinase produzido por *Trichoderma asperellum* .....32
- Figura 3- Médias de mortalidade em porcentagem (%) de *Tenebrio molitor* após aplicação de filtrado enzimático com e sem protease produzido por *Trichoderma asperellum* .....34
- Figura 4- Larva de *Tenebrio molitor* escurecida e seca após a aplicação de filtrados com quitinase e protease produzido por *Trichoderma asperellum*.....35,36
- Figura 5- Placa condensada contendo larvas de *Tenebrio molitor* após aplicação de filtrados enzimáticos produzido por *Trichoderma asperellum*.....37
- Figura 6- A. Cutícula de larvas de *Tenebrio molitor* após aplicação de filtrados de quitinase e protease de *Trichoderma asperellum*. B. Cutícula de inseto controle com aplicação de água destilada.....37
- Figura 7- Cutícula de *T. molitor*. A- Cutícula necrosada após aplicação de filtrados enzimáticos de *Trichoderma asperellum*, B- Cutícula de inseto controle (1mm).....39
- Figura 8- Cutícula de *T. molitor*. A- Cutícula necrosada após aplicação de filtrados enzimáticos de *Trichoderma asperellum*, B- Cutícula de inseto controle (1mm).....40

## SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT .....	12
<b>1 CONTEXTUALIZAÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
1.1.1 <i>Tenebrio molitor</i> (Coleoptera: Tenebrionidae) .....	14
1.1.2 Fungo <i>Trichoderma asperellum</i> (Hypocreales: Hypocreaceae).....	15
1.1.3 Quitinase.....	16
1.1.4 Protease.....	17
1.1.5 Ação das enzimas entomopatogênicas sobre os insetos .....	18
<b>2 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO USO DE FILTRADO DE <i>Trichoderma asperellum</i> COM INDUÇÃO DE QUITINASES E PROTEASES NO CONTROLE DE LARVAS DE <i>Tenebrio molitor</i> (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE).....</b>	<b>20</b>
RESUMO.....	20
ABSTRACT .....	21
2. 1. <b>Introdução</b> .....	22
2.2. <b>Material e Métodos</b> .....	23
2.2.1 Criação das Larvas de <i>T. molitor</i> .....	23
2.2.1 Cultivo e Produção dos isolados de <i>T. asperellum</i> .....	23
2.2.3 Pré-seleção dos isolados de <i>T. asperellum</i> (“screening”) com potencial efeito entomopatogênico.....	24
2.2.4 Preparo do filtrado enzimático com quitinase .....	24
2.2.5 Preparo do filtrado enzimático com protease .....	25
2.2.6 Preparo dos filtrados enzimáticos autoclavado e não-autoclavado .....	25
2.2.7 Aplicação dos filtrados enzimáticos e aplicação dos filtrados autoclavados e não-autoclavados sobre <i>T. molitor</i> .....	25
2.2.8 Quantificação da atividade enzimática .....	26
2.2.8.1 Quitinases .....	26
2.2.8.2 Proteases .....	26
2.2.9 Peso das larvas.....	27
2.2.10 Microscopia Eletrônica.....	27
2.2.10.1 Microscopia óptica .....	27

2.2.10.2 Microscopia Eletrônica de varredura (MEV) .....	27
2.2.11 Análise Estatística .....	27
<b>2.3 Resultados e Discussão</b> .....	<b>28</b>
2.3.1 Pré-seleção dos isolados de <i>T. asperellum</i> (“Screening”) com potencial efeito entomoptogênico .....	28
2.3.2 Ação das enzimas sobre a cutícula das larvas de <i>T. molitor</i> .....	30
2.3.2.1 Efeito das quitinases sobre larvas de <i>T. molitor</i> .....	30
2.3.2.2 Efeito das proteases sobre larvas de <i>T. molitor</i> .....	33
2.3.3 Efeito dos filtrados enzimáticos de quitinase e protease autoclavado e não-autoclavado .....	35
2.3.4 Efeito das enzimas produzidas pelo fungo <i>T. asperellum</i> sobre o tegumento e cutícula das larvas de <i>T. molitor</i> .....	36
2.3.4.1 Tegumento das larvas .....	36
2.3.4.2 Perda de água para o meio .....	37
2.3.5 Fotos de Microscopia eletrônica da cutícula das larvas de <i>T. molitor</i> .....	39
2.3.5.1 Fotos Microscópio óptico .....	39
2.3.5.2 Fotos Microscópio eletrônico de varredura (MEV) .....	39
<b>2.4 Conclusão</b> .....	<b>40</b>
<b>2.5 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>41</b>
<b>REFERENCIAS GERAIS</b> .....	<b>46</b>
<b>ANEXO</b>	

## Resumo

O *Trichoderma* sp. é utilizado mundialmente no controle de diversos fungos causadores de doenças de plantas, mas, poucos trabalhos reportam sua ação inseticida. A espécie *Trichoderma asperellum* apesar de presente em muitos solos tropicais, ainda é estudada com baixa frequência. Seis isolados de *T. asperellum* da Amazônia Brasileira foram selecionados após screening toxicológico e avaliados quanto à ação inseticida sobre larvas do besouro *Tenebrio molitor*, são insetos bastante utilizadas como referência em laboratório para testes com agentes biológicos. Neste trabalho utilizou-se o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* como controle positivo e água destilada como controle negativo em comparação aos isolados de *T. asperellum*. Analisaram-se suspensões de esporos na concentração de  $10^8$  conídios/mL, filtrados com e sem indução enzimática de quitinase e protease após crescimento do *T. asperellum* e *B. bassiana* em Meio líquido Mínimo (MM), sobre larvas de 3º instar de *T. molitor* e atividade enzimática dos filtrados, e também os filtrados foram autoclavados em temperatura de 120°C para comprovar se há ação das enzimas no meio. Os isolados de *T. asperellum* que se destacaram com filtrados contendo quitinase foram: UFRA T192, UFRA T166 e UFRA T57, pois causaram mortalidades de 100, 77,5 e 77,5%, respectivamente, diferindo do controle positivo *B. bassiana* que causou 50% mortalidade e do controle negativo com água destilada estéril com 2,5%. Todos os tratamentos de *T. asperellum* com indução de protease causaram 100% de mortalidade igual ao controle positivo com *B. bassiana*. As maiores atividades quitinolíticas foram observadas para os isolados de *T. asperellum* UFRA T127, UFRA T57, UFRA T166 e UFRA T175, com 0,21208, 0,18598, 0,18036 e 0,1704 U/mL, enquanto que *B. bassiana* obteve atividade menor 0,1536 U/mL. A maior atividade proteolítica obtida foi do isolado de *T. asperellum* UFRA T175 com 0,54214 U/mL e *B. bassiana* 0,10899 U/mL. As larvas de *T. molitor* reduziram de peso após aplicação dos tratamentos com as enzimas. Os filtrados dos isolados que foram autoclavados apresentaram baixas taxas de mortalidade quando comparados com os filtrados não-autoclavável. Conclui-se que o *T. asperellum* produz quitinases e proteases, e essas enzimas estão envolvidas na ação inseticida semelhante ao que ocorre com os fungos entomopatogênicos.

Palavras chave: Inseto, Fungo entomopatogênico, Proteases, Quitinases

## Abstract

*Trichoderma* sp. it is widely used for controlling various fungi that cause plant diseases, but few studies report their insecticide action. The *Trichoderma asperellum* species although present in many tropical soils, is still studied with low frequency. Six isolates of *T. asperellum* the Brazilian Amazon were selected after toxicology screening and evaluated for insecticidal activity against larvae of the beetle *Tenebrio molitor*, insects are often used as a reference laboratory for testing with biological agents. In this work we used the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as positive control and distilled water as negative control in comparison to isolates of *T. asperellum*. Analyzed spore suspensions at a concentration of 108 spores/mL, filtered with and without enzyme induction of chitinase and protease after *T. asperellum* growth and *B. bassiana* in liquid Minimum Medium (MM), on larvae of 3<sup>o</sup> instar *T. molitor* and enzymatic activity of filtered, and also the filtered were autoclaved at 120 ° C temperature to see if there is action of enzymes in the middle. The isolates of *T. asperellum* that stand out with chitinase containing filtrates were UFRA T192, T166 UFRA UFRA and T57, as caused mortality of 100, 77,5 and 77,5%, respectively, differing from the positive control causing *B. bassiana* 50% mortality, and the negative control with sterile distilled water to 2,5%. All treatments *T. asperellum* protease induction caused 100% mortality equal to the positive control with *B. bassiana*. The highest chitinolytic activities were observed for the *T. asperellum* UFRA T127, T57 UFRA, UFRA UFRA T166 and T175, with 0,21208, 0,18598, 0,18036 and 0,1704 U / ml, whereas *B. bassiana* had lower activity 0,1536 U / mL. Most proteolytic activity obtained was isolated from *T. asperellum* UFRA T175 with 0, 54214 U/mL and *B. bassiana* 0,10899 U/ml. The *T. molitor* reduced weight after application of treatments with enzymes. The filtrates were autoclaved isolates that showed lower mortality rates when compared with non-filtered autoclavable. It is concluded that *T. asperellum* produce chitinases and proteases, and these enzymes are involved in insecticide similar to what occurs with the entomopathogenic fungi.

Keywords: insecta, entomopathogenic fungus, chitin, protease

## 1 CONTEXTUALIZAÇÃO

Os processos biotecnológicos têm se destacado cada vez mais no desenvolvimento tecnológico mundial, pois exibem características econômicas e operacionais que lhe conferem vantagens em relação aos processos químicos convencionais. O uso desses processos possibilita a produção de um grande número de metabólitos de interesse industrial, que inclui enzimas, hormônios, ácidos orgânicos, agentes de controle biológico de pragas, antibióticos, etc. Alguns desses bioprodutos podem ser obtidos a partir de microrganismos como, por exemplo, os fungos.

O uso de agentes de controle biológico tem sido uma alternativa promissora aos produtos químicos (ALABOUVETTE et al., 2006), com isso tem-se procurado obter produtos eficientes no controle de pragas, principalmente por meio de microrganismos (VILAS-BOAS et al., 1992).

A especificidade de microrganismos entomopatogênicos e a sua persistência no ambiente tem sido uma alternativa muito promissora no controle de insetos. O elevado potencial dos fungos entomopatogênicos, baseia-se principalmente em sua grande variabilidade genética, largo espectro de hospedeiros e a não necessidade de ingestão por parte dos insetos que se deseja controlar, pois sua infecção é, geralmente, via tegumento, diferente de bactérias e vírus cuja infecção dá-se exclusivamente por ingestão (ALVES, 1998).

A ação de *Trichoderma* sp, no biocontrole de doenças de plantas tem sido relatado,mas poucos trabalhos reportam sua ação no controle de insetos. Essa atividade antagonista tem sido atribuída à produção de enzimas líticas extracelulares degradadoras da parede celular de muitos fungos, tais como celulasas, quitinases,  $\beta$ -1-D-glucanases,  $\beta$ -1,4-glucosidases e proteases (CORABI-ADELL et al., 2002). E a ação dessas enzimas também têm sido relacionadas com a degradação da cutícula de insetos a partir do cultivo de *B. bassiana* (GUPTA et al., 1992).

Estudos com ação de microorganismos tem sido cada vez mais constante pesquisas com metabólitos, como enzimas, produzidas por fungos e outros. Diante disso a utilização do microrganismo *Trichoderma* sp. que produz as mesmas enzimas que os fungos entomopatogênicos, como as quitinases, glucanases e proteases; que são degradadoras de quitina, se torna um importante agente de controle biológico de insetos.

As larvas de *Tenebrio molitor* são muito utilizadas como referência em laboratório para testes com agentes biológicos (RICHARDS e DAVIES, 1983) e também sua fácil manipulação e criação em laboratório para avaliação de experimentos.

A espécie de besouro *Tenebrio molitor* (LINNAEUS, 1758) frequentemente coabita em silos de grãos armazenados em regiões tropicais (HILL et al, 2002).

O presente estudo teve como objetivo estudar a ação de enzimas como as quitinases e proteases produzidas pelo fungo *Trichoderma asperellum* no controle do besouro *Tenebrio molitor*.

## 1.1 Revisão de literatura

### 1.1.1 *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae)

A ordem Coleoptera, com cerca de 370.000 espécies descritas constitui o maior grupo conhecido de insetos, o que corresponde, aproximadamente, a 40% da Classe Insecta e a 30% do Reino Animalia (Pereira et al., 2001). Além disso, essa ordem abrange a maioria das espécies pragas de produtos armazenados. Os insetos que vivem em produtos armazenados apresentam características para adaptação neste tipo de ambiente.

O ciclo reprodutivo do *T. molitor* se completa em seis meses, estando, no entanto, muito sujeito às condições de temperatura, umidade, nutrição e iluminação. É de hábito noturno, não suportando a luz solar. Baixas temperaturas poderão retardar ou até mesmo impedir seu desenvolvimento. A temperatura ideal para o seu desenvolvimento fica entre 28 e 32°C (Gallo et al., 2002). Os besouros apresentam dimorfismo sexual evidente, estão maduros sexualmente no décimo dia e vivem por cerca de 60 dias. Uma fêmea pode efetuar a postura de cerca de 300 ovos que se aderem às partículas do substrato e eclodem após 15 dias (GALLO et al., 2002).

A duração da fase larval é de aproximadamente 90 dias e uma larva pode atingir 3 cm de comprimento. No final do seu desenvolvimento, sobem para a superfície do substrato e mudam de fase, quando são chamadas de pupas. As pupas não se alimentam e movimentam-se apenas por contorções dorso-ventrais quando estimuladas pelo toque. Permanecem nesse estágio por 15 dias, quando viram adultos (GALLO et al., 2002).

Suas larvas são bastante utilizadas como referência de laboratório para testes com agentes biológicos (Richards e Davies, 1983) ou produtos químicos. Essa espécie se caracteriza pela alta taxa de reprodução, cerca de 500 ovos por ovoposição. Prefere sempre ambientes secos e escuros. São exigentes por calor e tem desenvolvimento ideal entre 26°C e 32°C (Potrich et al, 2007).

#### 1.1.2 Fungo *Trichoderma* sp. (Hypocreales: Hypocreaceae)

O gênero *Trichoderma* pertencente ao grupo dos fungos filamentosos, e foi descrito primeiramente por Persoon e Gray, em 1801. São considerados fungos saprófitos mesofílicos pertencentes à divisão Ascomycota, à ordem Hypocreales e à família Hypocreaceae. Quando cultivado estaticamente, o aspecto observado é verde brilhante, devido a grupos de conídios presentes nas extremidades das hifas aéreas (SILVEIRA, 1995). Fungos *Trichoderma* spp. são colonizadores onipresentes de materiais celulósicos e podem frequentemente ser encontrados em materiais vegetais em decomposição disponíveis na natureza (JAKLITSCH, 2009), bem como na rizosfera de plantas, onde podem induzir resistência sistêmica a patógenos.

Várias espécies de *Trichoderma*, tais como *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. polysporum*, *T. viride* e *T. virens* têm sido utilizados com sucesso como agentes de controle biológico contra uma variedade de fungos fitopatogênicos (ALMEIDA et al., 2007).

Usualmente podemos destacar a ação do *Trichoderma* spp. sobre uma grande diversidade de fungos fitopatogênicos (QUALHATO et al. 2013) em que *T. asperellum* foi um antagonista eficaz contra *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Outro relato é a interação de micoparasitismo de *T. asperellum* com *R. solani* que envolve o crescimento ao longo das hifas de acolhimento e enrolamento (HARMAN et., 2004). Segundo Melo e Faul (2000), essa relação de hospedeiro-parasita é geralmente se da por um período relativamente longo de contato, que pode ser físico ou metabólico com digestão por enzimas hidrolíticas, como quitinases, proteases, glucanases e lípases. O uso de *Trichoderma harzianum*, *T. polysporum* e *Scytalidium lignicola* em larvas de quinto instar de *S. scolytus* e *S. multistriatus* criados no meio artificial, causou um aumento de 80% na mortalidade das larvas (JASIM et al.,1990). Mais ainda não se tem estudos específicos relatando a ação de *T. asperellum* sobre

insetos.

Estudos com microscopia eletrônica analisou a morfologia de *T. asperellum* (T00) e observou intensas zonas de conidiação, os conidióforos apresentando fiáides pareadas e relativamente ampuliformes, típicas desta espécie (LIMA, 2002).

A ação de *Trichoderma* sp tem sido intensamente estudada e deve-se, sobretudo a produção de enzimas líticas extracelulares degradadoras da parede celular de muitos fungos, tais como celulasas, quitinasas,  $\beta$ -1-D-glucanases,  $\beta$ -1,4-glucosidases e proteases (CORABI-ADELL et al., 2002). Segundo Viterbo et al. (2004), relata a presença de enzimas como as proteases, duas proteases aspárticas Papa e PAPB de *T. asperellum* T-203 foram identificadas por SDS-PAGE e análises de sequência de peptídio.

Segundo Bokhari (2009), as enzimas produzidas como proteases, quitinasas e glucanases também podem degradar a cutícula dos insetos, que é composta principalmente de quitina.

### 1.1.3 Quitinasas

A quitina é um homopolímero linear composto de resíduos de  $\beta$ , 1-4 N-acetilglicosamina. É o mais difundido amino polissacarídeo natural na natureza, alguns autores a consideram como derivado da celulose, devido a sua semelhança na estrutura molecular, sendo o biopolímero mais abundante na natureza depois de celulose (MERZENDORFER, 2003). Ela está presente também na bainha de microfilárias, nematóides e parasitas e o revestimento dos aparelhos digestivos de muitos insetos (IKE et al., 2006). Atuam nestes organismos como componentes estruturais de suporte celular e de superfície do corpo (MERZENDORFER, 2003).

Segundo Cabib (1987), estudos através da análise de difração de raios-X, revelaram a existência de três formas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) de interação intercadeias das moléculas de quitina, as quais são estabilizadas através de pontes de H. A  $\alpha$ -quitina é a forma mais comum, presente na parede celular de fungos e na cutícula de artrópodes. A  $\beta$ -quitina apresenta estrutura diferente da  $\alpha$ -quitina no que se refere a sua capacidade de hidratação e é encontrada apenas em organismos aquáticos. A  $\gamma$ -quitina é encontrada apenas em membranas periotróficas de insetos, todas diferem entre si pelos tipos e

formas de cadeias. A mais comum na natureza é a  $\alpha$ -quitina, mais tanto  $\beta$ -quitina quanto a  $\gamma$ -quitina tendem a ser convertida em  $\alpha$ -quitina.

As enzimas responsáveis pela degradação da quitina são as quitinases, que são glico-hidrolases que catalisam e degradam hidroliticamente a quitina. Elas clivam as ligações glicosídicas  $\beta$  1-4 presentes nos polímeros N-acetilglicosamina e é encontrado em uma ampla variedade de organismos, incluindo bactérias, fungos, invertebrados, plantas e animais. (GOODAY, 1990).

Por apresentarem a capacidade de degradar a parede celular de vários fungos e insetos tem tido diversas aplicações no controle de pragas (YANO et al, 2004). Essas enzimas são produzidas por vários microrganismos, tais como *Cellulosimicrobium cellulans* (FLEURI, 2003), *Trichoderma harzanium* (NAMPOOTHIRI et al, 2004) e *Penicillium aculeatum* (BINOD et al, 2005) entre outros.

#### 1.1.4 Proteases

Enzimas denominadas proteases catalisam a quebra hidrolítica de ligações peptídicas. Algumas proteases rompem somente a ligação peptídica adjacente a resíduos de aminoácidos específicos, e assim fragmentam um polipeptídeo de uma forma reproduzível e previsível. (LEHNINGER et al., 2011).

Segundo St. Leger et al. (1986c), os principais constituintes da cutícula de artrópodes são as proteínas (55-80%), dessa forma, acredita-se que provavelmente as proteases tenham papel principal durante a sua degradação.

Estudos relataram que muitos fungos produzem proteases capazes de hidrolisar suas próprias proteínas. E foi observado também, que em isolados de *T. harzianum*, a produção de proteases em meio de cultura líquido, apresentou propriedade de hidrolisar a parede celular de fungos fitopatogênicos (KREDICS et al., 2005).

St. Leger et al. (1987a, b e c), detectou alta atividade proteolítica e uma ampla variedade de proteases e peptidases em filtrados de culturas de *M. anisopliae* quando suplementadas com cutículas de artrópodes, sugerindo uma papel chave para esse tipo de enzima na penetração da cutícula.

St. Leger et al. (1986a), também verificou que a protease Pr1 de *M. anisopliae* var. *anisopliae* foi capaz de remover 25-30% das proteínas cuticulares, demonstrando assim que as proteases estariam envolvidas na hidrolise da cutícula, facilitando a

penetração através do tegumento. Outro estudo feito relatou a atividade lipolítica e proteolítica relacionando com a patogenicidade de *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre insetos de broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) (GIRALDO et al., 2001).

#### 1.1.5 Ação das enzimas entomopatogênicas sobre os insetos

As enzimas proteases e quitinases têm sido aceitas como os principais fatores determinantes da virulência dos fungos entomopatogênicos (ST. LEGER et al., 1986b), pois hidrolisam os principais polímeros constituintes da cutícula, proteínas e quitina, organizados em camadas denominadas exo e endocutícula.

Segundo Gallo et al. (2002), o tegumento do inseto é composto por três partes principais: a membrana basal, que é constituída por uma camada de polissacarídeos que separa a epiderme do hemocele; a epiderme, constituída de células epiteliais intermeadas com células especializadas de vários tipos e é responsável direta ou indiretamente pela formação de toda a cutícula; e a cutícula, que é a ultima camada do tegumento e é formada na superfície externa, e solidificando-se para forma o exoesqueleto. Esta última dividi-se em duas partes: a epicutícula, de espessura delgada, que não apresenta quitina na sua constituição, é estruturada por lipoproteínas e cadeias de ácidos graxos embebidas em um complexo de proteínas e polifenóis e tem como principal função evitar a perda de água; e a procutícula (exocutícula e endocutícula) que é composta de quitina sempre associada a proteína, a diferença básica entre essas duas camadas esta justamente na relação do complexo quitina-proteína. As principais funções atribuídas ao tegumento são: promover a proteção mecânica, química e biológica, evitar perda excessiva de água, possibilitar à sustentação dos músculos e órgãos e servir de ponto de ligação às pernas, asas e outros apêndices.

O tegumento dos insetos constitui-se em uma barreira físico-química altamente eficiente contra a penetração de muitos agentes entomopatogênicos. Este tegumento compreende a epicutícula e procutícula. A epicutícula é composta por lipídios (95%), aminoácidos e aminoaçúcares que servem como fonte de nutrientes para a germinação do fungo. Já na procutícula as proteínas são os componentes predominantes (61%), seguida de quitina (30%) e lipídios (7%) (BIDOCHKA et al., 1997).

Na maioria dos fungos a penetração ocorre via tegumento, ao contrário de bactérias e vírus que precisam ser ingeridos para poder causar doença no hospedeiro, o

que os coloca em vantagem quando comparados a estes microrganismos (FANG et al., 2009).

Segundo Ito et al. (2007), a patogênese tem início com a adesão do conídio à cutícula do inseto através da secreção de substâncias adesivas durante a pré-germinação. Após a adesão ocorre a formação do apressório onde dará início ao surgimento do tubo germinativo que irá colonizar o corpo do inseto, através da ação de enzimas degradadoras de cutículas e força mecânica das hifas, depois inicia-se o processo de colonização do hospedeiro e penetração.

A ação de proteases, quitinases e lipases têm sido relacionadas à degradação da cutícula de insetos a partir do cultivo de *B. bassiana* (GUPTA et al., 1992) e *Metarhizium anisopliae* (ST LEGER, 1986a).

## 2 Potencial biotecnológico do uso de filtrados de *Trichoderma asperellum* com indução de quitinases e proteases no controle de larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae)<sup>1</sup>

Mayara Pimentel Figueiredo <sup>1</sup>, Gisele Barata da Silva <sup>1</sup>, Telma Fátima Vieira Batista <sup>1</sup>,  
Samantha Pereira da Silva<sup>1</sup>

1 Plant Protection Laboratory, Institute of Agrarian Sciences, Federal Rural University of Amazon (Laboratório de Proteção de Plantas, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal Rural da Amazônia), Campus Belém, Pará, Brazil. E-mail: agromay-figueiredo@hotmail.com

Corresponding author: Gisele Barata da Silva. E-mail: gisele.barata@ufra.edu.br (55-91-3210-5191)

### Resumo

O *Trichoderma* sp. é um fungo utilizado no controle de diversos fungos causadores de doenças de plantas, mas, poucos trabalhos reportam sua ação inseticida. Seis isolados de *Tichoderma asperellum* foram selecionados após screening e avaliados quanto à ação inseticida sobre larvas do besouro *Tenebrio molitor*. Neste trabalho utilizou-se o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* como controle positivo e água destilada como controle negativo em comparação aos isolados de *T. asperellum*. Analisaram-se suspensões de esporos na concentração de 10<sup>8</sup> conídios/mL, filtrados com e sem indução enzimática de quitinase e protease e os mesmos autoclavado a 120°C e não-autoclavado, após crescimento do *T. asperellum* e *B. bassiana* em Meio líquido Mínimo (MM), sobre larvas de 3º instar de *T. molitor* e atividade enzimática dos filtrados. Os isolados de *T. asperellum* que se destacaram com filtrados contendo quitinase foram: UFRA T192, UFRA T166 e UFRA T57, pois causaram mortalidades de 100, 77,5 e 77,5%, respectivamente, diferindo do controle positivo *B. bassiana* que causou 50% mortalidade e do controle negativo com água destilada estéril com 2,5%. Todos os tratamentos de *T. asperellum* com indução de protease causaram 100% de mortalidade igual ao controle positivo com *B. bassiana*. As maiores atividades quitinolíticas foram observadas para os isolados de *T. asperellum* UFRA T127, UFRA T57, UFRA T166 e UFRA T175, com 0,21208, 0,18598, 0,18036 e 0,1704 U/mL, enquanto que *B. bassiana* obteve atividade menor 0,1536 U/mL. A maior atividade proteolítica obtida foi do isolado de *T. asperellum* UFRA T175 com 0,54214 U/mL e *B. bassiana* 0,10899 U/mL. As larvas de *T. molitor* reduziram de peso após aplicação dos tratamentos com as enzimas. Os filtrados dos isolados autoclavados apresentaram baixas taxas de mortalidade quando comparados com os filtrados não-autoclavavel. Conclui-se que o *T.*

<sup>1</sup> Este capítulo segue as normas de apresentação da Biotechnology Advances, ANEXO A

*asperellum* produz quitinases e proteases, além de outros metabólitos e estão envolvidas na ação inseticida semelhante ao que ocorre com os fungos entomopatogênicos.

Palavras chave: Inseto, Fungo entomopatogênico, Proteases, Quitinases

#### Abstract

*Trichoderma* sp. a fungus is used for controlling fungi causing various plant diseases, but few studies report their insecticidal action. Six isolates of *Tichoderma asperellum* were selected after screening and evaluated for insecticidal activity against larvae of the beetle *Tenebrio molitor*. In this work we used the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as positive control and distilled water as negative control in comparison to isolates of *T. asperellum*. They were analyzed spore suspensions at a concentration of 108 conidia/mL, filtered with and without enzyme induction of chitinase and protease and the same autoclaved at 120°C and non-autoclaved after growth of *T. asperellum* and *B. bassiana* in liquid medium minimum (MM), on 3° instar larvae of *T. molitor* and enzymatic activity of the filtered. The isolates of *T. asperellum* that stand out with chitinase containing filtrates were UFRA T192, T166 UFRA UFRA and T57, as caused mortality of 100, 77,5 and 77,5%, respectively, differing from the positive control causing *B. bassiana* 50% mortality, and the negative control with sterile distilled water to 2,5%. All treatments *T. asperellum* protease induction caused 100% mortality equal to the positive control with *B. bassiana*. The highest chitinolytic activities were observed for the *T. asperellum* UFRA T127, T57 UFRA, UFRA UFRA T166 and T175, with 0,21208, 0,18598, 0,18036 and 0,1704 U / ml, whereas *B. bassiana* had lower activity 0,1536 U/mL. Most proteolytic activity obtained was isolated from *T. asperellum* UFRA T175 with 0, 54214 U/mL and *B. bassiana* 0,10899 U/ml. The *T. molitor* reduced weight after application of treatments with enzymes. The filtrates of autoclaved isolates showed lower mortality rates when compared with non-filtered autoclavable. It is concluded that *T. asperellum* produce chitinases and proteases, and other metabolites and are involved in insecticide similar to what occurs with the entomopathogenic fungi.

Keywords: insecta, entomopathogenic fungus, chitin, protease

## 2.1 Introdução

*Trichoderma* sp. é um dos mais estudados gêneros visando o controle de diversos fungos causadores de doenças de plantas em todo mundo, porque apresenta atividade antagonista a vários fungos fitopatogênicos (Rajendiran et al., 2010). Várias espécies de *Trichoderma*, tais como *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. polysporum*, *T. viride* e *T. virens* têm sido utilizados com sucesso para esse fim conforme trabalhos de Harman et al., (2004), Benitez et al., (2004), Almeida et al., (2007), Kaewchai et al., (2009), Hermosa et al., (2013) e Qualhato et al. (2013).

A atividade antagonista de *Trichoderma* sp. tem sido atribuída à produção de enzimas líticas extracelulares degradadoras da parede celular de muitos fungos, tais como celulasas, quitinases,  $\beta$ -1-D-glucanases,  $\beta$ -1,4-glucosidases e proteases (Corabiadell et al., 2002). A presença de enzimas proteolíticas como aspárticas Papa e PAPB de *T. asperellum* T-203 foram identificadas por SDS-PAGE e análises de sequência de peptídeo já foram feitas por Viterbo et al. (2004).

Apesar do potencial de uso no controle de fungos fitopatogênicos, poucos trabalhos reportam a entomopatogenicidade de *Trichoderma*. Jassim et al. (1990), estudaram os efeitos de *Trichoderma harzianum*, *T. polysporum* e *Scytalidium lignicola* sobre larvas de quinto instar dos besouros *Scolytus scolytus* e *S. multistriatus* criados em meio artificial, demonstraram que a mortalidade das larvas foi aumentada em 80% por meio da inoculação do fungo nas larvas. Entretanto, ainda não se tem estudos específicos relatando a ação inseticida de *T. asperellum*, pois, as enzimas proteases, quitinases e glucanases podem degradar a cutícula dos insetos, que é composta principalmente de quitina (Bokhari et al., 2009). A ação das lipases também têm sido correlacionada à degradação da cutícula de insetos a partir do cultivo de *Beauveria bassiana* (Gupta et al., 1992) e *Metarhizium anisopliae* (St leger et al., 1986a).

As quitinases são enzimas responsáveis pela degradação da quitina. Elas clivam as ligações glicosídicas  $\beta$  1-4 presentes nos polímeros N-acetilglicosamina e é encontrado em uma ampla variedade de organismos, incluindo bactérias, fungos, invertebrados, plantas e animais. (Gooday, 1990). E segundo (Yano et al. 2004), por apresentarem essa capacidade de degradar a parede celular de vários fungos e insetos, tem tido diversas aplicações no controle de pragas.

As proteases apresentam a capacidade catalisar a quebra hidrolítica de ligações peptídicas. Algumas proteases rompem somente a ligação peptídica adjacente aos resíduos de aminoácidos específicos, e assim fragmentam um polipeptídeo de uma forma reproduzível e previsível (Lehninger et al., 2011).

Os principais constituintes da cutícula de artrópodes são as proteínas (55-80%), dessa forma, acredita-se que provavelmente as proteases tenham papel importantíssimo durante a degradação (St. Leger et al. 1986c). Foi observado em estudos que a produção de proteases em meio de cultura líquido a partir de isolados de *T. harzianum* apresentou propriedade de hidrolisar a parede celular de fungos fitopatogênicos (De Marco e Felix, 2002 e KREDICS et al., 2005). Portanto, as enzimas produzidas possuem a ação degradadora da parede celular de fungos fitopatogênicos como da cutícula de insetos.

Objetivou-se neste estudo maior conhecimento da ação de filtrados enzimáticos de quitinases e proteases produzidas pelo fungo *T. asperellum* na mortalidade de larvas do besouro *T. molitor*.

## 2.2 Material e Métodos

### 2.2.1 Criação das larvas de *T. molitor*

Larvas e adultos de *T. molitor* são criadas no Laboratório de Proteção de Plantas da Universidade Federal Rural da Amazônia em caixas de plásticos de 50x30 cm, os insetos são alimentados com farelo de milho, trigo, fatias de batata, chuchu e pedaços de pão.

### 2.2.2 Cultivo e produção dos isolados de *T. asperellum*

Os isolados são oriundos da mata atlântica, foram repicados e armazenados no banco de microrganismos do Laboratório de Proteção de Plantas da Universidade Federal Rural da Amazônia, foram repicados em placas de petri de 15 x 60mm, acondicionadas em estantes de crescimento sobre iluminação constante durante 7 dias em temperatura ambiente e depois armazenadas em geladeiras em temperatura de 10°C e constantemente são repicados para novas placas para manutenção das culturas puras.

### 2.2.3 Pré-seleção dos isolados *T. asperellum* (“screening”) com potencial efeito entomopatogênico.

Inicialmente foi realizado screening toxicológico com 15 isolados de *T. asperellum*, os quais cultivados em placas de petri contendo meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Agar), após o crescimento, bioensaios com utilização de suspensões de esporos na concentração  $10^8$  conídios/mL foram avaliados. As larvas foram acondicionadas em placas de petri de 15 x 60 mm, forradas com papel de filtro e retirados 24 horas após a aplicação da suspensão. A inoculação se deu com 1 mL de suspensão/placa, aplicado com borrifador de 20 mL. As placas foram mantidas em câmaras climatizadas a 26°C e fotoperíodo de 24hs. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 15 tratamentos, quatro repetições e 10 larvas do besouro de 3º instar/tratamento. As avaliações foram feitas de cinco em cinco dias ao longo de 20 dias.

Os isolados que causaram as maiores mortalidades foram selecionados para os bioensaios seguintes.

### 2.2.4 Preparo do filtrado enzimático com quitinase

Utilizou-se o método proposto por Ramírez et al. (2004) com modificações. A quitina coloidal foi preparada com: 4g de quitina cristalina (p) (Sigma) foi incubada com 40 mL de ácido clorídrico (37% p/v) por 50 minutos em temperatura ambiente sobre agitação constante na incubadora Shaker em 155 rpm. Após o processo de incubação, a solução de quitina+ácido clorídrico foi transferida para um bécker contendo 1 L de água. A solução foi centrifugada em tubos falcon de 50 mL por 10 minutos em agitação de 2.700 rpm em temperatura ambiente, depois filtrada em papel de filtro para retirada da água e lavada três vezes em solução tampão de fosfato de sódio a 0,1M pH=7,4 por meio de centrifugação ( $10.000g \times 25^\circ C \times 10min$ ) até neutralizar o pH. Depois foi realizado uma última lavagem com água destilada para retirar o tampão fosfato. O volume final da solução foi definida quando a quitina coloidal preparada em solução aquosa estivesse na concentração de 15 mg/mL.

Preparo do Meio Mínimo (MM) proposto por Freimoser et al. (2005). Foi utilizado 0,18g ( $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$  e NaCl) e 0,12g de extrato de levedura, em 600 ml

água destilada, com e sem a adição de 10 ml da quitina coloidal. No meio foi acrescentado 5 círculos contendo colônias dos isolados de *T. asperellum* e *B. bassiana*. O crescimento foi em agitador horizontal por 5 dias a 180 rpm, em temperatura de 26°C. O filtrado foi coletado pelo método proposto por (Alves, 1998).

#### 2.2.5 Preparo do filtrado enzimático com protease

Foi preparado o Meio Mínimo (M.M) sem e com indução de protease adaptado de Sena et al. (2006): 7g  $H_9N_2O_4P$ ; 1,5g  $K_2HPO_4$ ; 0,4g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; 0,5g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 5g de leite desnatado (fonte de proteína); 100ml de glicose a 30% e 2,5 ml de sais (0,1g de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  + 0,1g  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  + 0,1g  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  diluído em 100 ml de água destilada). Todos os reagentes foram diluídos em 1000 ml de água. Cinco discos de colônia de cada isolado selecionado foram colocados para crescimento em elermmeyers de 50 ml, durante 10 dias em incubadora a 26 °C. O filtrado foi coletado método proposto por (Alves, 1998).

#### 2.2.6 Preparo dos filtrados enzimáticos autoclavados e não-autoclavado

Foi retirado 5 mL de cada um dos filtrados com indução de quitinase e protease dos isolados de *T. asperellum* e *B. bassiana* e autoclavados em ependoffe à 120° C e comparados com os filtrados não-autoclavado para verificar se as enzimas ou outros metabólitos estavam envolvidas na mortalidade.

#### 2.2.7 Aplicação dos filtrados enzimáticos e aplicação dos filtrados autoclavados e não-autoclavados sobre *T. Molitor*

A ação inseticida de *T. asperellum* foi avaliada através da mortalidade dos insetos, causada pelos líquidos indutores e não indutores, além disso, foi avaliado também mortalidade causada pelos filtrados autoclavados e não-autoclavados. O experimento constou de aplicação de 1 mL dos filtrados sobre 10 insetos com borrifadores de 20 mL, com 4 repetições, mantidos em placas de petri de 60x15mm e incubados em câmaras do tipo BOD a 26°C, e alimentados com batata. A observação de mortalidade foi feita durante 15 dias.

## 2.2.8 Quantificação da atividade enzimática

### 2.2.8.1 Quitinases

Foi verificado pelo método de detecção de grupos redutores formado pela hidrólise do substrato, conforme Noelting e Bernfeld (1948). A determinação da atividade enzimática de quitinase dos isolados de *T. asperellum* e *B. bassiana* foi utilizando-se 100  $\mu\text{L}$  do filtrado enzimático incubados em um MIX de 1:1 de 50  $\mu\text{L}$  de quitina coloidal + 50  $\mu\text{L}$  de tampão citrato-fosfato de sódio 0,2M pH= 4,0. As amostras foram levadas ao aquecimento em Bloco seco por 60 minutos a 30°C, em seguida acrescentado 200  $\mu\text{L}$  de DNS (Ácido 3,5 dinitrossalicílico), para a formação dos grupos redutores. As amostras foram aquecidas novamente em Bloco Seco em 100°C por 5 min e resfriadas em temperatura ambiente, após foi adicionado 1.600  $\mu\text{L}$  de água milliQ e lidas em placas de Elisa (Multiskan Go, Thermo Scientific ) regulado no comprimento de onda de 550 nm. A curva padrão de glicose foi utilizada como referência para calcular a atividade enzimática (U=  $\mu\text{mol}$  de grupo redutor liberado/min).

### 2.2.8.2 Proteases

Os filtrados dos isolados foram obtidos pelo método proposto por Sena et al. (2006) e filtrados conforme o método adaptado proposto por (Alves,1998).

A determinação da atividade proteolítica dos isolados de *T. asperellum* foi feito pelo método proposto por Hutadilok-Towatana et al. (1999). Foi utilizado um sistema de reação contendo 125  $\mu\text{L}$  de solução de azocaseína a 0,5% m/v, em tampão Tris-HCL 100 mM pH=8,0 e 75  $\mu\text{L}$  do filtrado dos isolados . Após 20 min de incubação a 40°C a reação foi interrompida pela adição de 600  $\mu\text{L}$  de TCA 10% (m/v). As amostras foram centrifugadas em 60 rpm por 5 min em temperatura de 4°C, e 600  $\mu\text{L}$  de cada reação foi transferido para novos ependoffes. Aos ependoffes foram acrescentados 700  $\mu\text{L}$  de NaOH 1M e absorvância lida em Leitor de elisa a 440 nm.

### 2.2.9 Peso das larvas

Para verificar se ocorre perda de água das larvas de *T. molitor* após aplicação dos filtrados contendo quitinase e protease, dois isolados de *T. asperellum* UFRA T175, UFRA T166, foram selecionados, mais o tratamento controle negativo com água destilada estéril e tratamento positivo com *B. bassiana*. Cinco larvas/tratamento foram pesadas em balança digital de precisão, antes da aplicação dos tratamentos e após mortalidade. Cada larva foi considerada uma repetição.

### 2.2.10 Microscopia eletrônica

#### 2.2.10.1 Microscopia óptica

As fotos foram feitas em microscopio optico modelo Motic BA400 no laboratório de Proteção de Plantas da Universidade Federal Rural da Amazonia, para observar os segmentos das larvais de *T. molitor*, no tratamento controle com água destilada esteril e sob efeito dos tratamentos com os filtrados.

#### 2.2.10.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Fotos dos segmentos dos aneis das larvas de *T. molitor*, foram feitas em um Microscopio de Varredurara (MEV) de bancada da marca HITACHI modelo TM 3030, nas escalas de 1mm.

### 2.2.11 Análise Estatística

Foi utilizado o programa estatístico ASSISTAT 7.7 Beta, e as comparações das médias pelo teste de “Scott-knott” ao nível de 5% de significância e o calculado o desvio padrão. Para a seleção dos isolados foi utilizado o programa estatístico Análise de Agrupamento SSPS através da análise de Cluster das distancias euclidianas entre os pontos.

## 2.3 Resultados e Discussão

### 2.3.1 Pré-seleção dos isolados de *T. asperellum* (“Screening”) com potencial efeito entomopatogênico.

A análise quantitativa (Distância euclidiana) agrupou com maior similaridade os isolados que causaram mortalidades mais próximas. Esta análise de agrupamento demonstrou que os isolados de *T. asperellum* formaram quatro grupos distintos, onde o Grupo 1 ficou o tratamento controle com água destilada, UFRA T132, UFRA T129, UFRA T49, UFRA T195, UFRA T139, UFRA T150, UFRA T149, UFRA T34, UFRA T166, UFRA T175 com médias de mortalidades de 1,75 a 6, Grupo 2 os isolado UFRA T283 e UFRA T57 com médias de mortalidade de 6,75 e 8,25, Grupo 3 com UFRA T192 com médias de mortalidade de 8 larvas e o Grupo 4 UFRA T127 que causou média de mortalidade de 9 larvas de *T. molitor* (Fig. 1). Foram selecionados os seguintes isolados UFRA T129, UFRA T57, UFRA T166, UFRA T127, UFRA T192 e UFRA T175.

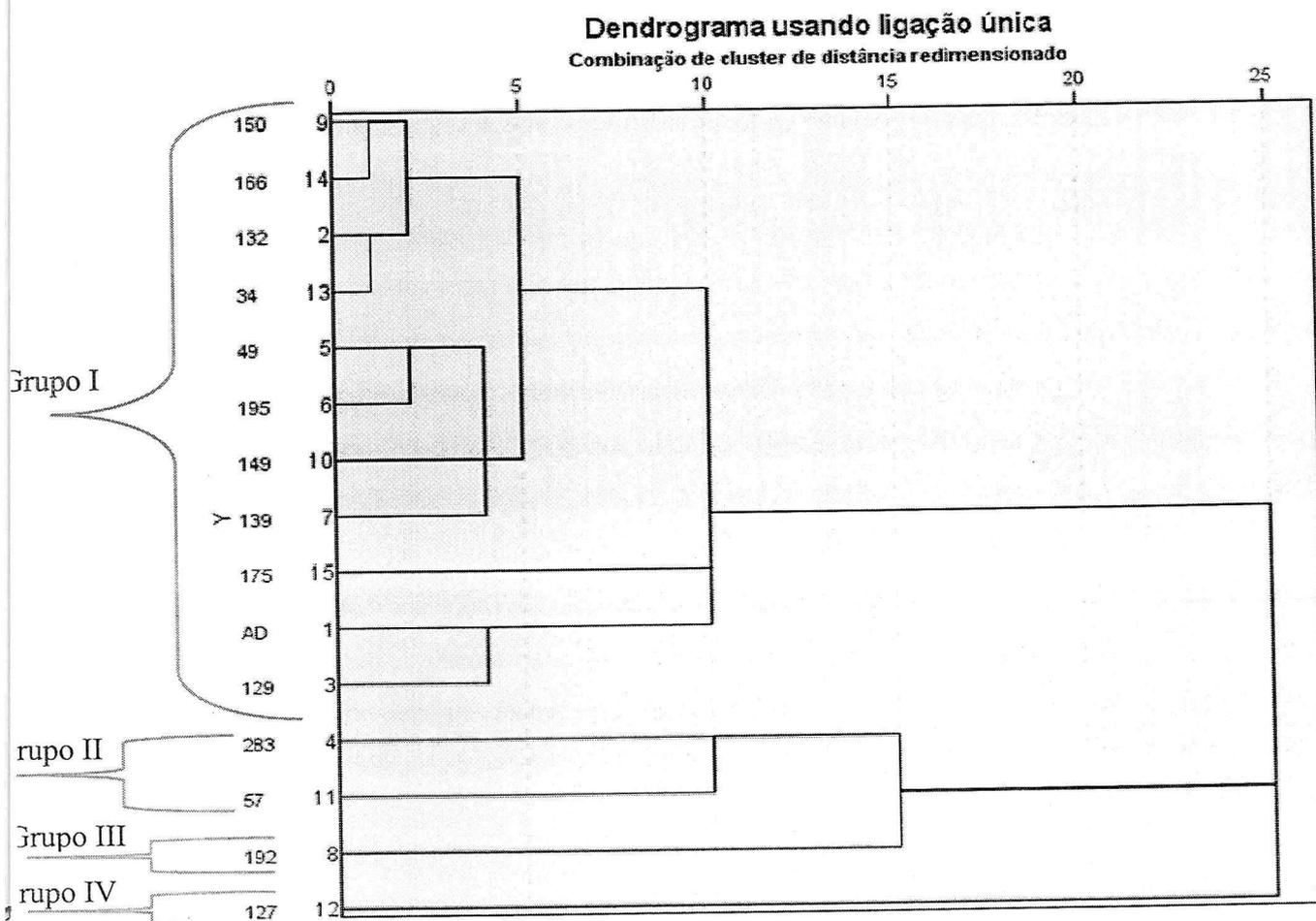


Fig. 1 – Dendrograma de agrupamento dos isolados de *Trichoderma asperellum* segundo a análise de Cluster.

A utilização da suspensão de conídios de *T. asperellum* demonstrou que, apesar de ser pouco utilizado no controle de insetos, apresentou potencial ação inseticida. Resultado semelhante foi encontrado por Jassim et al., (1990) que verificou o aumento da mortalidade em 80% nas larvas do 5º instar dos besouros *S. scolytus* e *S. multistriatus*.

Foi observado neste trabalho pouca esporulação do *T. asperellum* sobre o tegumento das larvas de *T. molitor*, não foi verificada penetração cuticular nem colonização interna das larvas como ocorre com os fungos entomopatogênicos, indicando que enzimas como proteases, quitinases e  $\beta$ -glucanases estão envolvidas nesse processo de parasitismo, e segundo (Bokhari 2009), estas enzimas podem degradar a cutícula dos insetos, diferindo do parasitismo típico dos fungos entomopatogênicos, haja vista que estes no ato da entomopatogenicidade os conídios

aderem, germinam e formam um tubo germinativo que se diferencia em apressório e libera enzimas hidrolíticas que vão favorecer a penetração do fungo sobre o hospedeiro e por fim colonização, reprodução e disseminação (St. leger et al., 1986, Bidochka et al., 1997).

Modo de ação ocorre diferente com *Trichoderma* sp, que no processo de parasitismo com fungos fitopatogênicos, as hifas crescem em direção ao hospedeiro enrolam-se na nas hifas do fungo alvo e começam a degradar (perfurar) a parede celular dos fungos através de uma série de processos enzimáticos, onde enzimas como quitinases, proteases, glucanases e celulases quebram as estruturas dos fungo e em seguida absorvem todos os nutrientes necessários para sua sobrevivência (Thrane et al, 2000).

### 2.3.2 Ação das enzimas sobre a cutícula das larvas de *T.molitor*

#### 2.3.2.1 Efeito das quitinases sobre *T. molitor*

Os resultados de mortalidade do bioensaio com o filtrado com quitinase mostrou que as maiores médias de mortalidade foram causadas pelos isolados UFRA T192 com 100%, UFRA T166 com 80% e UFRA T57 com 77,5% (Fig. 2.A) e aumento nas atividades quitinolíticas de 0,1545 U/mL, 0,18036 U/mL e 0,18598 U/mL, respectivamente (Fig. 2.B), assim como, (Mondejar et al. 2011), obteve aumento da atividade de quitinase em isolados T-30 e T-78 de *T.harzianum* sobre *Fusarium oxysporum*, mais houve diferença nas atividades apesar dos isolados serem da mesma espécie e segundo (González et al., 2012) é comum ocorrer essas diferenças em suas atividades, e tais diversidades entre isolados podem demonstrar níveis diferentes de desempenho e expressão das enzimas hidrolíticas, quando utilizados como agentes de controle biológico tanto para fungos quanto para insetos.

No extrato controle negativo com a água a mortalidade foi baixa com apenas 2,5% no entanto no controle positivo com *B. bassiana* a mortalidade foi de 50% e sua atividade quitinolítica 0,1536 U/mL (Fig. 2 A e B), reforçando que a presença da quitina induziu a produção da enzima e aumentou patogenicidade do fungo. Jeuniaux et al. (1966), descreveu em seu trabalho que uma ampla gama de microrganismos eucariótico como fungos e bactérias como *Serratia marcescens* que apresentavam grande

potencial para produzir enzimas quitinolíticas quando a quitina está presente no meio. Outro trabalho que reforça ainda mais a ideia de que a presença da quitina no meio degrada a cutícula do inseto, foi descrito por St. Leger et al. (1991), e verificou que no processo de parasitismo do fungo *M. anisopliae* sobre os insetos a presença das enzimas quitinases estavam envolvidas nesse processo, onde estirpes de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, e *Verticillium lecanii*, foram cultivadas em culturas líquidas contendo cutícula de gafanhoto triturada, e as enzimas quitinases produzidas foram capazes de hidrolisar completamente a quitina do tegumento do inseto, clivando as ligações glicosídicas  $\beta$  1-4 presentes nos polímeros N-acetilglicosamina.

Em isolados de *B. bassiana* URM2915 e URM4548 incubados com Meio Mínimo + cutícula de *Diatraera saccharalis*, foi detectada atividade quitinolítica logo após as 24hs, com isso Svedese et al. (2013), sugere que há uma correlação entre o aumento da atividade enzimática de quitinase com o tempo de incubação e a presença da cutícula no meio e sugere mais ainda que a enzima pode ser induzida especificamente por algum componente da cutícula.

Silva et al (2013), confirma a produção de enzimas quitinolicas por *T. asperellum*, quando verificou que a presença de 0,5% de quitina no meio TLE (Meio líquido), que induziu produção de quitinase e N-acetilglucosaminidase, no primeiro dia de incubação com 8046 U/mL e 15656 U/mL, respectivamente, contra os fungos *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp e *Sclerotinia sclerotiorum*. Esses fatores sugerem que o metabolismo da quitina é um excelente alvo para controlo seletivo de pragas.

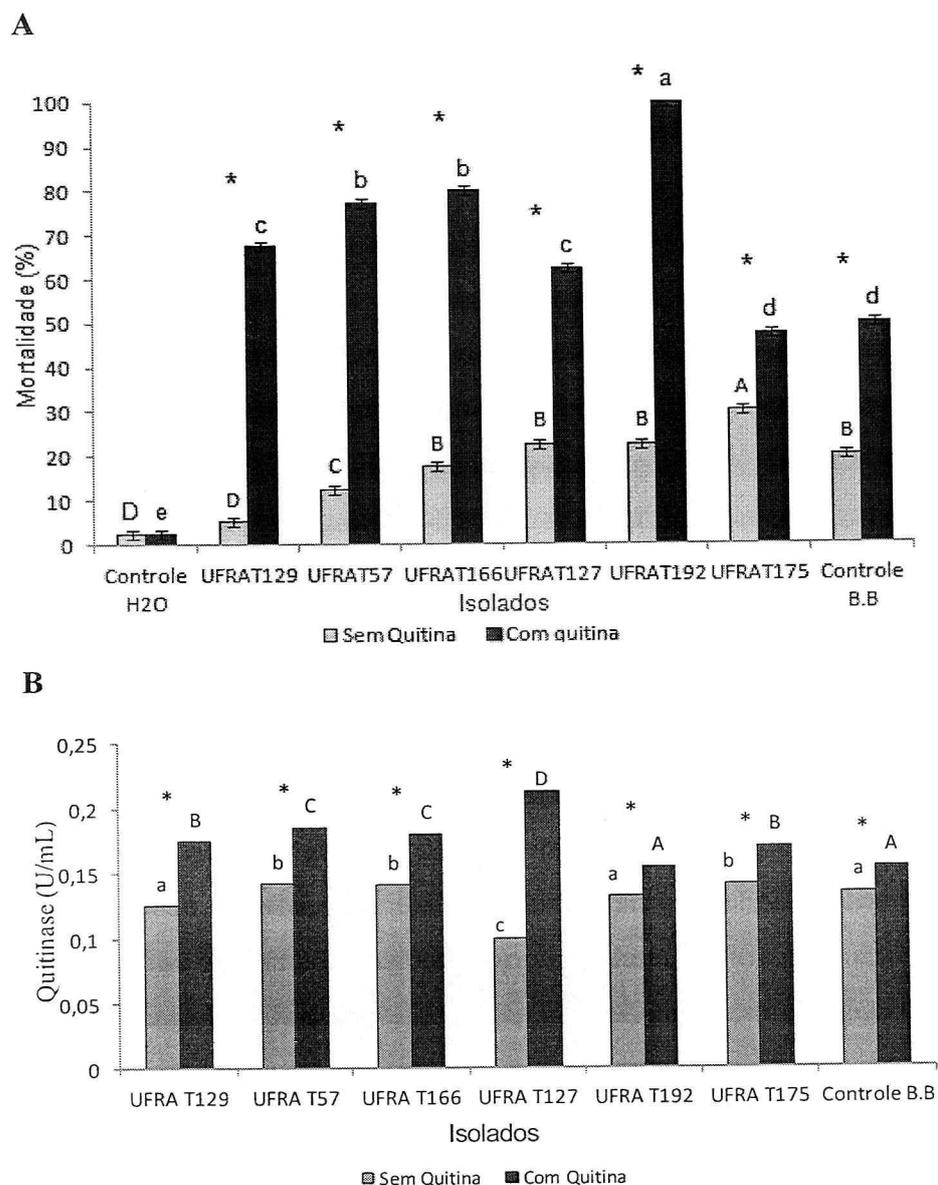


Figura 2. A. Média de mortalidade em porcentagem (%) de *Tenebrio molitor* após aplicação de filtrado enzimático com e sem quitinase produzido por *Trichoderma asperellum*. B. Atividade enzimática.

Médias de mortalidade seguidas de letras maiúsculas diferem significativamente sem indução de quitinase e medias seguidas de letras minúsculas diferem significativamente entre os tratamentos com indução de quitinase pelo teste de Scot-knott ao nível de 5% de probabilidade, (\*) há diferença estatística entre os isolados.

### 2.3.2.2 Efeito das proteases

Todos os isolados induzidos à produção de protease UFRA T175, UFRA T166, UFRAT 129, UFRA T127, UFRA T57 e UFRA T192 causaram 100% de mortalidade (Fig. 3A), enquanto que os filtrados sem indução tiveram mortalidades mais baixas, em no máximo 40%. St Leger et al. (1987a, b, c) observaram que a alta atividade proteolítica em filtrados obtidos de culturas de *M. anisopliae* quando suplementados com cutícula de artrópodes, causou mortalidades parecidas em *Manduca sexta*.

A atividade proteolítica foi maior para os isolados UFRA T175, UFRA T166 e *B. bassiana* (controle positivo) com 0,54214, 0,10899 e 0,10796 U/mL, respectivamente (Fig 3B), resultados semelhantes foram encontrados por Dias et al., (2008) em meios suplementados com a cutícula do besouro *Hypothenemus hampei*, onde a atividade de duas protease (Pr2) subtilisina-like e (Pr1) tripsina produzidas por *B. bassiana* foi mais elevada do que em meios sem cutícula.

Dhar et al. (2010), verificou elevação da atividade proteolítica em três isolados de *B. bassiana* UB8, UB10 e UB 14 0,58, 0,60 e 0,52 U / mL, respectivamente, logo após o segundo dia de incubação, até ao oitavo dia, reforçando a ação entomopatogênica de isolados de *B. bassiana*.

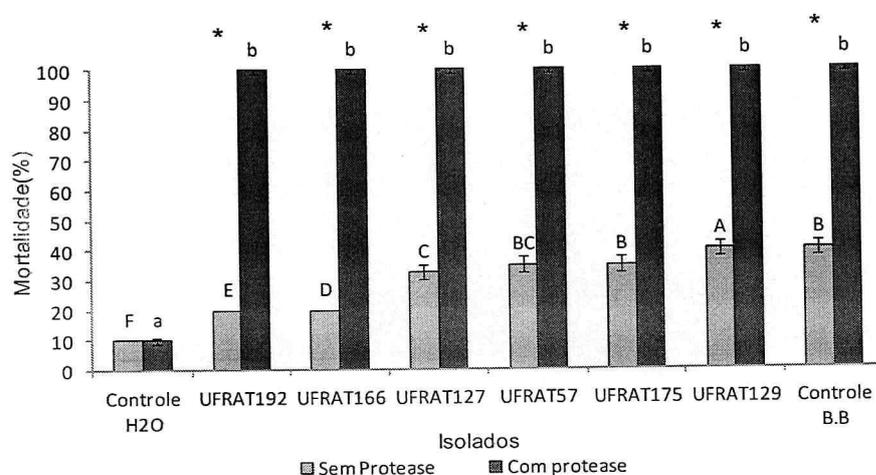
A protease é uma enzima importante durante ação entomopatogênica. Entretanto, altas taxas de mortalidade também se deve ao fato da constituição da cutícula do inseto que também apresentam proteínas principalmente na região da epicutícula que é a camada mais externa, mais também as proteínas estão presentes na camada mais interna da procutícula que constitui a maior parte da cutícula onde esta localizada as quitinases embebidas em uma matriz proteica (Galo, 2002). Esse processo ocorre devido às proteases catalisarem a quebra hidrolítica de ligações peptídicas, formando resíduos de Aminoácidos (Lehninger, 2011). Possivelmente a enzima participa da infecção nos estágios iniciais sobre o hospedeiro quando os compostos metabolizáveis são extremamente baixos.

Essa atividade enzimática de protease do isolado de *T. harzianum* T-57 aumenta logo após 24h de incubação, em estudo contra *Fusarium oxysporum* (Mondejar et al 2011).

Estudos confirmam a produção de enzimas proteolíticas por *T. asperellum*, quando verificaram que a presença de 0,5% de quitina no meio TLE (Meio líquido)

induziu produção de quitinases, N-acetilglucosaminidase e protease, no primeiro dia de incubação, com 10,00 U/mL de atividade de protease, no controle dos fungos *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp e *Sclerotinia sclerotiorum*. (Silva et al. 2013).

A



B

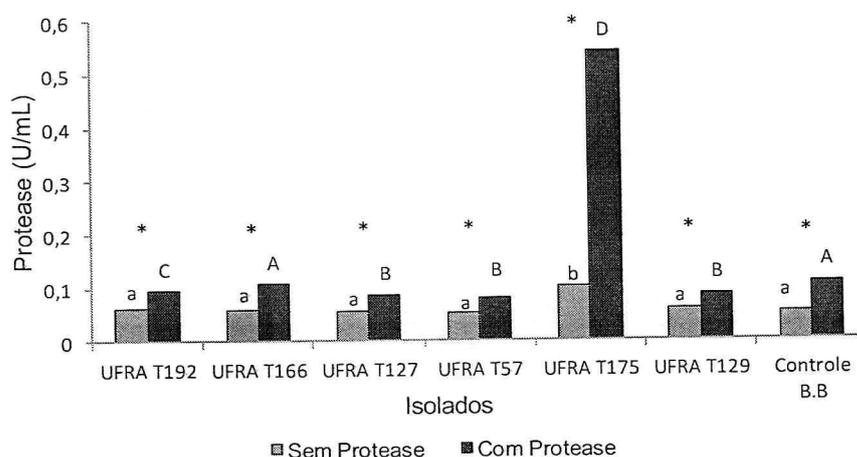
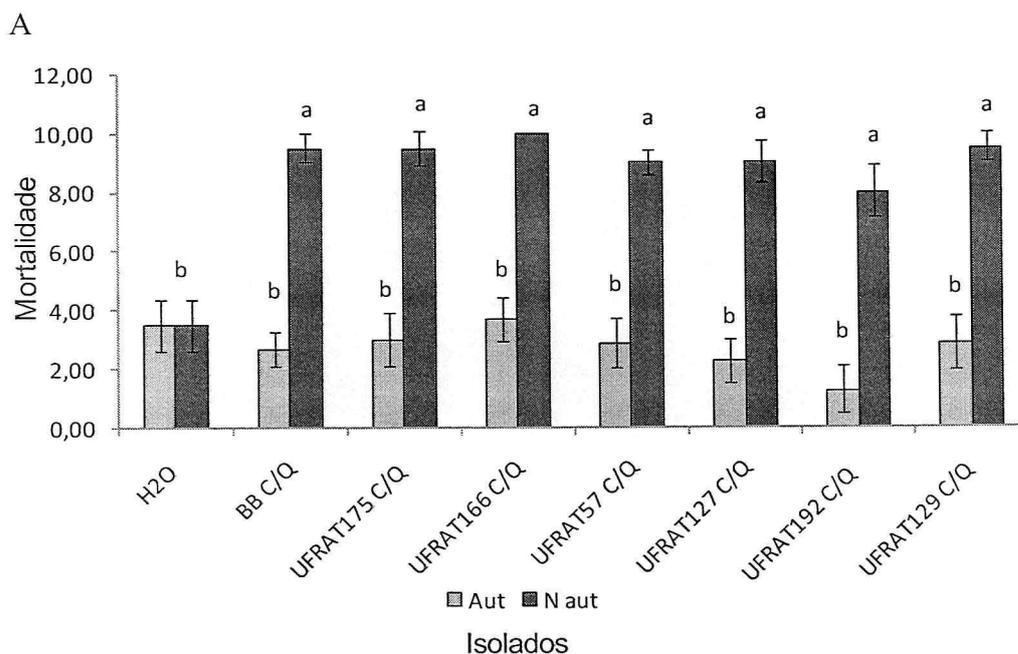


Figura 3. 3A. Médias de mortalidade em porcentagem (%) de *Tenebrio molitor* após aplicação de filtrado enzimático com e sem protease produzido por *Trichoderma asperellum*. B. Atividade enzimática.

Médias de mortalidade seguidas de letras maiúsculas diferem significativamente sem indução de protease e médias seguidas de letras minúsculas diferem significativamente entre os tratamentos com indução de protease pelo teste de Scot-knott ao nível de 5% de probabilidade, (\*) há diferença estatística entre os isolados.

### 2.3.3 Efeito dos filtrados enzimáticos de quitinase e protease autoclavado e não-autoclavado

Após 15 dias de avaliação os filtrados dos isolados de quitinase e protease não-autoclavado apresentaram maior índice de mortalidade, como comprovados nas análises anteriores e nesta (Fig. 4A). Já os filtrados de quitinase e protease autoclavado, ou seja, os que foram submetidos à alta temperatura de 120°C em autoclave causaram as menores taxas de mortalidade, esse fato ocorreu devido à elevação da temperatura que desnaturou as enzimas presentes nesse meio degradando suas estruturas, no caso da quitinase provavelmente não suporta a elevação de temperatura acima de 100°C, e a protease provavelmente também não suporta temperaturas acima de 40°C, no entanto o que se observa é que mesmo o meio sendo submetido à alta de temperatura existe outros metabólitos presentes no meio que suportam a elevação de temperatura e causaram mortalidade das larvas, de forma igual ao controle negativo com a água (Fig. 4B).



B

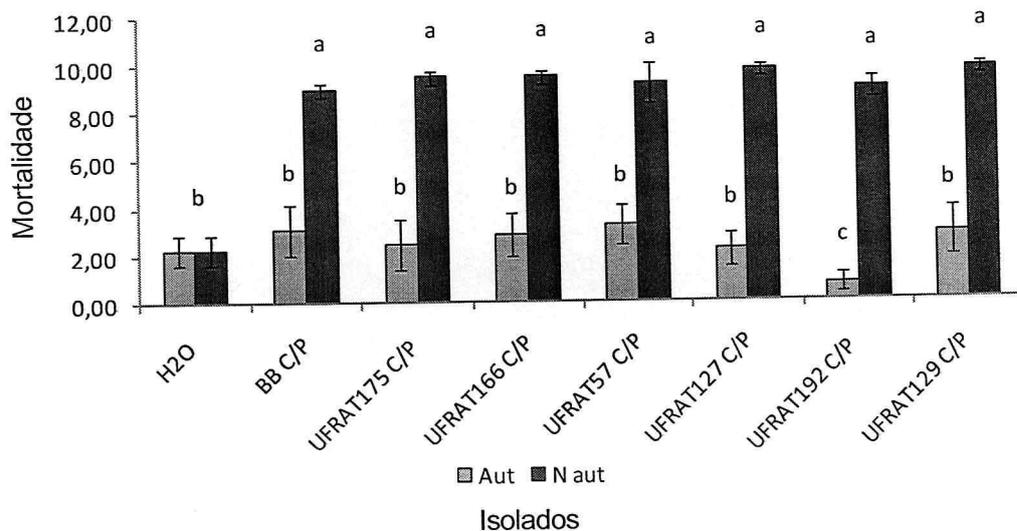


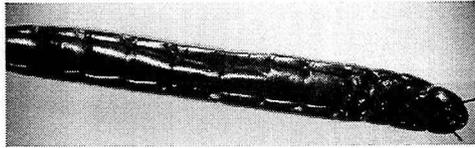
Figura 4. 4A. Médias de mortalidade de *Tenebrio molitor* após aplicação de filtrado enzimático com quitinase não-autoclavável e autoclavável produzido por *Trichoderma asperellum*. B. Médias de mortalidade de *Tenebrio molitor* após aplicação de filtrado enzimático com protease não-autoclavável e autoclavável produzido por *Trichoderma asperellum*.

Médias de mortalidade seguidas de letras minúsculas diferem significativamente entre os tratamentos com indução de protease e quitinase autoclavável e não-autoclavável pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

### 2.3.4 Efeito das enzimas produzidas pelo fungo *T. asperellum* sobre o tegumento e cutícula das larvas de *T. Molitor*

#### 2.3.4.1 Tegumento das larvas

Observou-se que as larvas *T. molitor* tratadas com os filtrados enzimáticos de quitinases e proteases, após crescimento do *T. asperellum*, morreram totalmente secas e escurecidas (Fig.5), esse fato reforça que o modo de ação é diferente dos fungos entomopatogênicos tradicionalmente já descritos.



Fonte: Autora (2015)

Figura 5. Larva de *Tenebrio molitor* escurecida e seca após a aplicação de filtrados com quitinases e proteases produzido por *Trichoderma asperellum*

#### 2.3.4.2 Perda de água para o meio

Foi observado que as larvas de *T. molitor* após a aplicação dos filtrados com indução de quitinases e proteases perderam água para o meio, pois muitas placas ficaram totalmente condensadas (Fig. 6), outro fato que reforça essa hipótese é que houve variação no peso das larvas de *T. molitor*, pesos diminuíram após aplicação dos tratamentos com os filtrados enzimáticos de *T. asperellum*, enquanto os pesos das larvas com o tratamento controle negativo com água destilada estéril aumentou, devido o crescimento das larvas, não havendo perda de água do inseto para o meio ambiente (Tabela1), essa observação reforça a hipótese de que ocorrem alterações na cutícula do inseto e morrem por acentuada desidratação.



Fonte: Autora (2015)

Fig. 6. Placa condensada contendo larvas de *Tenebrio molitor* após aplicação de filtrados enzimáticos produzido por *Trichoderma asperellum*

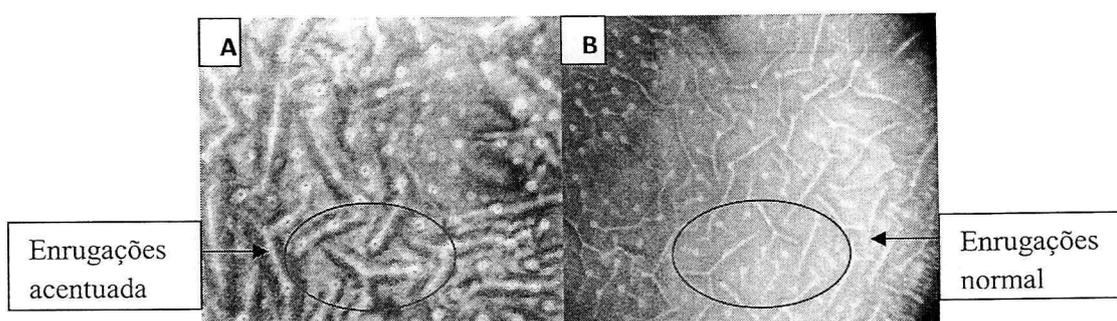
Tabela 1. Peso fresco (g) de larvas de *Tenebrio molitor* antes e após aplicação dos filtrados de quitinases e proteases dos isolados de *Trichoderma asperellum* e tratamento controle negativo com água destilada e tratamento controle positivo com o fungo *B.bassiana*, e quanto houve de perda de massa.

Peso fresco (g)						
Tratamentos	Quitinase			Protease		
	Antes da aplicação do filtrado	Após a aplicação do filtrado	Redução da massa	Antes da aplicação do filtrado	Após a aplicação do filtrado	Redução da massa
H <sub>2</sub> O	0,046 ± 0,001	0,051 ± 0,001	<u>Ganho</u> <u>de massa</u>	0,046 ± 0,001	0,051 ± 0,001	Ganho de massa
<i>B. bassiana</i>	0,053 ± 0,002	0,032 ± 0,004	0,021 ± 0,04	0,052 ± 0,002	0,018 ± 0,001	0,034 ± 0,002
UFRA T166	0,057 ± 0,001	0,049 ± 0,002	0,0083± 0,0017	0,054 ± 0,002	0,026 ± 0,001	0,028 ± 0,003
UFRA T175	0,054 ± 0,003	0,044 ± 0,003	0,0101± 0,0018	0,047 ± 0,001	0,017 ± 0,001	0,030 ± 0,001
UFRA T192	0,064 ± 0,003	0,050 ± 0,003	0,014 ± 0,004	0,054 ± 0,001	0,017 ± 0,001	0,037± 0,001
UFRA T57	0,045 ± 0,002	0,015 ± 0,001	0,030 ± 0,001	0,046 ± 0,001	0,017 ± 0,001	0,029 ± 0,002
UFRA T127	0,056 ± 0,002	0,021 ± 0,002	0,035 ± 0,001	0,051 ± 0,002	0,037 ± 0,002	0,014 ± 0,002
UFRA T129	0,074 ± 0,003	0,037 ± 0,003	0,037 ± 0,004	0,050 ± 0,001	0,031 ± 0,001	0,019 ± 0,002

## 2.3.5 Fotos de microscopia eletrônica da cutícula das larvas de *T. molitor*

### 2.3.5.1 Fotos microscópio óptico

As fotos em microscopia óptica mostra um enrugamento acentuado da cutícula do *T. molitor* (Fig. 7A), após a aplicação dos filtrados enzimáticos de quitinases e proteases de *T. asperellum*, diferindo do tratamento controle (Fig.7 B) em que foi observado enrugações normais da cutícula. Esse sintoma pode indicar a perda de água do corpo do inseto.

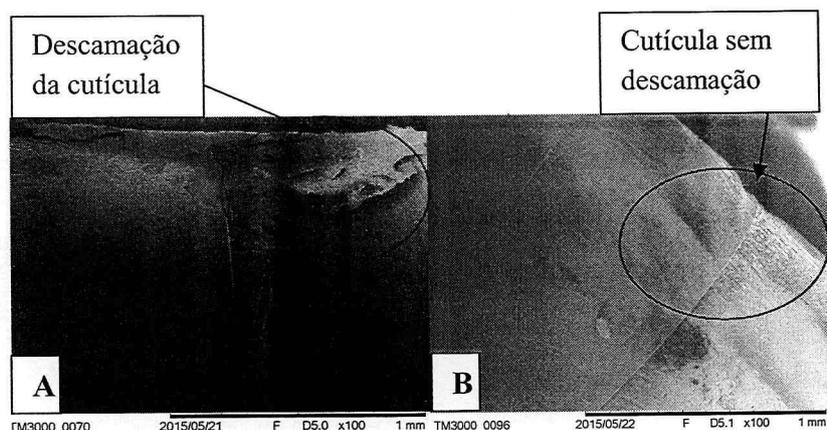


Fonte: Autora (2015)

Figura 7. A. Cutícula de larvas de *Tenebrio molitor* após aplicação de filtrados de quitinase e protease de *Trichoderma asperellum*. B. Cutícula de inseto controle com aplicação de água destilada

### 2.3.5.2 Fotos Microscópio eletrônico de varredura (MEV)

As fotos em microscopia eletrônica de varredura demonstraram a ocorrência de áreas de necrose sobre o tegumento das larvas que receberam tratamento com os filtrados contendo quitinases e proteases tanto de *B. bassiana* como do *T. asperellum*. As placas observadas destacam-se do tegumento e apresentaram perfurações (Fig. 8A), o que pode ter favorecido a perda de água do corpo do inseto, entretanto, o tegumento das larvas controle não foi observado perfurações e nem descamação destaque na região de inserção dos anéis que compõem o tegumento da larva, ou seja, apresenta tegumento mais liso e sem nenhuma descamação (Fig. 8B).



Fonte: Autora (2015)

Figura 8- Cutícula de *T. molitor*. A- Cutícula necrosada após aplicação de filtrados enzimáticos de *Trichoderma asperellum*, B- Cutícula de inseto controle (1mm).

## 2.4 Conclusão

Conclui-se que o *Trichoderma asperellum* produz enzimas quitinases e proteases, e outros metabólitos e esses possuem ação inseticida semelhante ao que ocorre com fungo entomopatogênico *B. bassiana*. A atividade enzimática produzida não está relacionada à mortalidade. As enzimas causam necroses na cutícula e o inseto morre com elevada desidratação.

## 2.5 Referências

- Almeida FB, Cerqueira FM, Silva Rdo N, Ulhoa CJ, Lima AL. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters* 2007; 29: 1189-1193.
- Alves SB, Pádua LEM, Azevedo EMVM, Almeida LC. Controle da broca da cana-de-açúcar pelo uso de *Beauveria bassiana*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 1985; 20: 403-406.
- Alves SB, Leucona R E. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos, In: Alves, S.B. Controle microbiano de insetos. Piracicaba;1988.
- Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Codón AC. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 2004; 7: 249-260.
- Bidochka MJ, St Leger RJ, Roberts DW. Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. *Memo Entomol Soc. Can.* 1997a; 171:213-224.
- Bokhari F. Efficacy of some *Trichoderma* species in the control of *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne javanica*. *Arch Phytopathol Plant Prot.* 2009; 42(4): 361-9.
- Corabi-Adell, C, Lucon CM M. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* no estado de São Paulo – Aspectos enzimáticos e potencial biocontrolador. *Arquivos do Instituto Biologico* 2002; 69: 1–306.
- Cohen-Kupiec R, Chet, I. The molecular biology of chitin digestion. *Current Opinion Biotechnology advances* 1988; 9: 270-277.
- Dhar Priyanka, Kaur Gurvinder. Production of cuticle-degrading proteases by *Beauveria bassiana* and their induction in different media. *African Journal of Biochemistry Reserarch* 2010, 4:65-72.

- De Marco JL, Felix CR. Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* which controls cocoa plant witches broom disease. *BMC Biochemistry* 2002; 3:1471-2091.
- Dias BA, NEVES PMOJ, Furlaneto M L, Furlaneto MC. Cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. *Journal of Microbiology* 2008; 39: 301-306.
- Faria LLF de, Oliveira JV; Barros R. Patogenicidade do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) sob condições de laboratório. *Caderno Ômega* 1992; 4: 207-217.
- Freimoser F M, Hu G, St leger R J. Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation in vitro. *Microbiology* 2005; 151: 361–371.
- Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, Baptista GC, Filho EB, Parra JRP, Zucchi RA, Alves SB. *Entomologia Agrícola*. Piracicaba; 920, 2002.
- Gooday G W. The ecology of chitin decomposition. *Advances in Microbial Ecology* 1990; 11: 387-430.
- González I, Infante D, Martínez B, Arias Y, González N, Miranda I, Peteira B. Induction of chitinases and glucanases in *Trichoderma* spp. strains intended for biological control. *Biotechnología Aplicada* 2012; 29:12-16.
- Gupta S C, Leathers T D, El-sayed G N, Ignoffo C M. insect cuticle-degrading enzymes from the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*. *Experimental Mycology* 1992; 16: 132-137.
- Harman GE, Howell CR, Viterbo, A, Chet I, Lorito M. Espécies de *Trichoderma* oportunistas, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology* 2004; 2: 43–56.
- Hermosa R, Rubio MB, Cardoza R E, Nicolás C, Monte E, Gutiérrez S. The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *International Microbiology* 2013;16: 69-80.

- Hutadilok T N, Painupong A, Suntainalert P. Purification and characterization of an Extracellular protease from Alkaliphilic and Thermophilic *Bacillus* sp PS719. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 1999;87:581-587.
- Jassim HK, Foster HA, Fairhurst PB. Controle biológico de doença do olmo holandês: atividade larvívica de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma polysporum* e *Scytalidium lignicola* em *Scolytus scolytus* e *Scotylus multistriatus* criados em cultura artificial. *Annals of Applied Biology* 1990; 117: 187-196.
- Jeuniaux C. Chitinases. *Methods in Enzymology* 1966; 8: 644-650.
- Kaewchai S, Kaewchai K, Soyong, H KD. Mycofungicidas e biofertilizantes fúngicas. Os mergulhadores fúngicas, v.38, p. 25-50, 2009.
- Lecuona RE, Milani M S, DIAS B M. Characterization and pathogenicity of *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis*(F.) (Lepidoptera: Pyralidae) in Argentina. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 1996; 25: 299-307.
- Lehninger, A. L. Princípios de Bioquímica. 5ª Ed. Porto Alegre; 2011.
- Mondéjar-López R, Ros M, Pascual J A. Mycoparasitism-related genes expression of *Trichoderma harzianum* isolates to evaluate their efficacy as biological control agent. *Biological Control* 2011;56:59-66.
- Monreal J, Reese E T. The chitinase of *Serratia marcescens*. *Canadian Journal of Microbiology* 1969;15: 689-696.
- Paterson IC. Specific induction of a cuticle-degrading protease of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Microbiology* 1994;140:185-189.
- Qualhato TF, Lopes FA, Steindorff AS, Brandão RS, Jesuino RS, Ulhoa CJ. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production *Biotechnology Letters* 2013; 35: 1461-1468.

Rajendiran R, Jegadeeshkumar D, Sureshkumar, BT, Nisha T. In vitro assessment of antagonistic activity of *Trichoderma viride* against post harvest pathogens. Journal of Agricultural Technology 2010; 6: 31-35.

Ramirez L, Marin C MC, Huerta S, Revah S, Shirai K. Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases. Process Biochemistry 2006 41; 1106-1110.

Sena AR, Koblitz MG, Goés Neto A, Uetanabaro APT. Seleção de fungos do semi-árido baiano secretores de hidrolases em alimentos. Sitientibus 2006; 35: 91-98.

Silva, R.B.Q, Veiga AFSL. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sobre *Castnia icarus* (Cramer, 1775). Revista Agrícola 1998; 73: 119-127.

Silva BDS, Ulhoa CJ, Batista KA, Yamashita F, Fernandes KF. Potential fungal inhibition by immobilized hydrolytic enzymes from *Trichoderma asperellum*. Journal of Agricultura and Food Chemistry 2011;59:8148-8154.

St.leger R J, Cooper R M, Charnley A K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. 1986a; 47: 167-177.

St.leger RJ, Cooper RM, Charnley AK. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. Journal of Invertebrate Pathology 1986c; 47: 167-177.

St. Leger RJ, Charnley AK, Cooper R M. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. Arch Biochem Biophys 1987a; 253:221-232.

St. Leger RJ, Cooper R M, Charnley A K. Production of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. Journal General Microbiology 1987b; 133:1371-1382.

St. Leger RJ, Cooper R M, Charnley AK. Distribution of chymoelastases and trypsin-like enzymes in five species of entomopathogenic Deuteromycetes. Arch Biochem Biophys 1987c; 258:121-131.

St. Leger RJ. Regulation of production of proteolytic enzymes by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Archives of Microbiology 1988; 150: 413-416.

St Leger R J, Cooper R M, Charnley A K. Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology 1991; 58: 415-426.

Svedese VM, Tiago PV, Bezerra JDP, Paiva LM, Lima EALA, Porto ALF. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and production of cuticle-degrading enzymes in the presence of *Diatraea saccharalis* cuticle. Academic Journals 2013; 12: 6491-6497.

Thrane C, Funck J D, Tronsmo A. Substrate colonization, strains competition, enzyme production in vitro, and biocontrol of *Pythium ultimum* by *Trichoderma* spp. Isolates P1 and T3. European Journal of Plant Pathology 2000;106: 215-20.

Viterbo A, Viterbo M, Harel, I. O isolamento de duas proteases de aspartato de *Trichoderma asperellum* expressa durante a colonização de raízes de pepino FEMS Microbiol Lett 2004;238:151-158.

## REFERÊNCIAS GERAIS

- ALABOUVETTE, C., OLIVAIN, C., STEINBERG, C. Biological control plant diseases: the European situation. **European Journal of Plant Pathology**, v. 114, p. 329–341, 2006.
- ALMEIDA, F.M., CERQUEIRA, R.N., SILVA, C. J. ULHOA, LIMA, A.L. Estudos micoparasitismo de *Trichoderma harzianum* cepas contra *Rhizoctonia solani*: Avaliação de enrolamento e produção de Enzimas hidrolíticas. **Biotechnology**, v.29, p. 1189-1193, 2007.
- ALVES, S. B. Fungos Entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba: FEALQ, p. 289- 381, 1998.
- BINOD, P.; PUSZTAHELYI, T.; NAGY, V.; SANDHYA, C.; SZAKACS, G.; POCSI, I.; PANDEY, A. Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 under solid-state fermentation. **Enzyme Microbial Technology**. n.36, p. 880-887, 2005.
- BOKHARI. Eficácia de algumas espécies de *Trichoderma* no controle de *Rotylenchulus reniformis* e *Meloidogyne javanica*. **Arch Prot Usina Phytopathol.**,v. 42,p. 361-369, 2009.
- BIDOCHKA, M. J.; KHACHATOURIANS, G. G. Purification and Properties of an Extracellular Protease Produced by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. Washington, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 7, p. 1679-1684, 1987.
- CABIB, E. The synthesis and degradation of chitin. **Advances in Enzymology**, v.59,p.59-101,1987.
- CHET, I.; INBAR, J. Controle biológico de fitopatógenos. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 48, p. 37-43, 1994.
- CORABI-ADELL, C. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* no estado de São Paulo – aspectos enzimáticos e potencial biocontrolador. **Arq.Inst.Biol.**, v. 69, p.1306, 2002.
- FANG, W., FENG,J.; FAN, Y.; ZANGH, Y.; BIDOCHKA, M.J.; St. LEGER, R. J.;PEI,Y. Expressing a fusion protein with protease and chitinase activities increases the virulence of the insect pathogen *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, n. 112, p.155-159, 2009.
- FLEURI, L.F. Produção de  $\beta$ -1,3 glucanases, proteases liticas e quitinases por microrganismos e aplicação na lise de leveduras. 141 f. 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Unicamp, Campinas,2003.

- GALLO, D., NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S., BAPTISTA, G.C., FILHO, E.B., PARRA, J.R.P., ZUCCHI, R.A., ALVES, S.B., **Entomologia Agrícola**. Piracicaba-FEALQ, p. 920, 2002.
- GIRALDO-CARDOZO, E. M.; LOPEZ-F, Y.; DELGADO, B. F.; VÉLEZ-A, P. E. Actividad lipolítica y proteolítica de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* y su relación con la patogenicidad sobre *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Revista Colombiana de Entomología**, v. 27, n. 2, p. 61- 65, 2001.
- GOODAY GW. The ecology of chitin decomposition. **Adv Microb Ecol**, v.11: p.387-430, 1990.
- GUPTA, S. C.; LEATHERS, T. D.; EL-SAYED, G. N.; IGNOFFO, C. M. Insect cuticle-degrading enzymes from the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*. **Experimental Mycology**, v. 16, n. 4, p. 132-137, 1992.
- HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. Espécies de *Trichoderma* oportunistas, avirulent plant symbionts. **Nature Review Microbiology**, v. 2, p.43-56, 2004.
- HILL, D.S. Pest of stored foodstuffs and their control. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2002.
- IKE M, NAGAMATSU K, SHIOYA A, NOGAWA M, OGASAWARA W, OKADA H, MORIKAWA, Y. Purification, characterization, and gene cloning of 46 kDa chitinase (*Chi46*) from *Trichoderma reesei* PC-3-7 and its expression in *Escherichia coli*. **Applied Microbiol Biotechnology**, v.71:p. 294-303, 2006.
- JASSIM, HK, FOSTER, HA, FAIRHURST, PB, Controle biológico de doença do olmo holandês: atividade larvicida de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma polysporum* e *Scytalidium lignicola* em *Scolytus scolytus* e *Scotylus multistriatus* criados em cultura artificial. **Annals of Applied Biology**. v.117, p.187-196, 1990.
- JAKLITSCH, W.M. European species of *Hypocrea*. Part I. The green-spored species, **Stud Mycol**, v. 63, p.1-91, 2009.
- KREDICS L.; ANTAL Z. S.; SZEKERES A.; HATVANI L.; MANCZINGER L.; VAGVOLGYI C.; NAGY, E. Extracellular proteases of *Trichoderma* species: A review. **Acta microbiologica et immunologica hungarica**, v.52, p.169-184, 2005.
- KULLNIG, C.; MACH, R.L.; LORITO, M.; KUBICEK, P.B. Difusão de enzima de *Trichoderma atroviride* (1/4T. *harzianum* P1) em *Rhizoctonia solani* é um pré-requisito para o desencadeamento de *Trichoderma* ch42 expressão do gene antes do contato microparasitismo. **Appl. Meioron. Microbiol**, v. 66, p. 2232-2234, 2000.
- LAWRENCE, J.F.. E.B. BRITTON., Coleoptera. **Cornell University**, p.543-683, 1991.

- LIMA, A.L. Caracterização morfológica, molecular e bioquímica de *Trichoderma* spp. isolados de solo do cerrado brasileiro. 2002. 73 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2002.
- MELO, I.S.; FAULL, J.L. Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. **Scientia Agrícola**, v. 57, p. 55-59, 2000.
- MERZENDORFER H. e ZIMOCH L. Insect Chitin synthases: review. **J. Exp. Biology**, v.206, p.43930-4412, 2003.
- NAMPOOTHIRI, K.M.; BAIJU, T.V.; SANDHYA, C.; SABU, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. **Process Biochemical**, v. 39, p.1583- 1590, 2004.
- PEREIRA, P. R. V. S., ALMEIDA, L. M., Chaves para identificação dos principais Coleoptera inseto associados com produtos armazenados. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.18, p. 271-283, 2001
- POTRICH, T.D.; LORINI, I.; VOSS, M.; STEFFENS, M.C.S.; PAVANI, D.P. Metodologia de criação de *Tenebrio molitor* em laboratório para obtenção de larvas. Passo Fundo: Embrapa Trigo, Circular técnica, v.82, 2007.
- PUZZI, D. Os insetos que atacam grãos armazenados. Em: Manual de Armazenamento de Grãos – Armazéns e Silos. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, p 405, 1977.
- QUALHATO, T. QUALHATO, F., LOPES, A., STEINDORFF, BRANDÃO R., JESUÍNO R., C. Estudos micoparasitismo de espécies *Trichoderma* contra três fungos fitopatogênicos: avaliação de antagonismo e de produção de enzimas hidrolíticas **Biotechnol Lett**, v. 35 9, p. 1461-1468, 2013.
- RICHARDS, O.W., DAVIES, R.G. Imms General textbook of entomology, v. 10, Chapman, p. 1.354, 1983.
- SILVEIRA, V.D. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições Ltda. Micologia 5ª Edição, 1995.
- St LEGER, R.J.; CHARNLEY, K.; COOPER, R. M. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 48, n. 1, p. 85-95, 1986a.
- ST. LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARLEY, A. K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.47, p.167-177, 1986b.
- ST.LEGER R.J., COOPER, R. M., Charnley, A.K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. **J Invert Pathol**, v. 47, p. 167-177, 1986c.

ST.LEGER R.J., CHARNLEY, A.K., COOPER, R. M. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Arch Biochem Biophys**, v.253, p. 221-232, 1987a.

ST.LEGER R.J., COOPER, R. M. CHARNLEY, A.K. Production of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. **J. Gen Microbiol**, v.133:1371-1382, 1987b.

ST.LEGER R.J., COOPER, R. M. CHARNLEY, A.K. Distribution of chymoelastases and trypsin-like enzymes in five species of entomopathogenic Deuteromycetes. **Arch Biochem Biophys**, v.258:p. 121-131, 1987c.

YANO, S. et al. A chitinase indispensable for formation of protoplast of *Schizophyllum commune* in basidiomycete-lytic enzyme preparation produced by *Bacillus circulans* KA-304. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, n.68, v.6, p. 1299-1305, 2004.

VILAS BOAS, A. M.; PACCOLA MEIRELLES, L.D.; LUNA ALVES LIMA, E. A. Desenvolvimento e aperfeiçoamento de inseticidas biológicos para o controle de pragas. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v.35, n.4, p.749-761, 1992.

## ANEXO A

### NORMAS DA REVISTA

AUTHOR INFORMATION PACK 23 Aug 2015 [www.elsevier.com/locate/biotechadv](http://www.elsevier.com/locate/biotechadv)

#### **Article structure:**

The corresponding author should ensure that the text structure for section heading and subheadings is correct.

**Subdivision - numbered sections** Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### **Introduction**

State the objectives of the review. Provide an adequate background of the review.

#### **Results and discussion**

Include an appropriate amount of detailed surveys of the literature and other relevant materials such as patents, reports and books, under various related sections and subsections to address the review objectives.

#### **Conclusions**

The main conclusions of the review may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone.

#### **Appendices**

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on.

#### **Essential title page information**

- **Title Concise and informative.** Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.

• **Present/permanent address.** *If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.*

### **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords Immediately after the abstract, provide a maximum of 10 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### **Electronic artwork General points**

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version
- Submit each illustration as a separate file. A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics". TIFF: color or grayscale

photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi. TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required. DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not: Supply embedded graphics in your word processor (spreadsheet, presentation) document Supply files that are optimized for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low Supply files that are too low in resolution Submit graphics that are disproportionately large for the content. AUTHOR INFORMATION PACK 23 Aug 2015 [www.elsevier.com/locate/biotechadv](http://www.elsevier.com/locate/biotechadv) 8 Color artwork Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.

Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References Citation in text Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples: **Reference to a journal publication:** Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J SciCommun* 2010;163:51-9.

**Reference to a book:** Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

**Reference to a chapter in an edited book:** Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*. New York: E-Publishing Inc; 2009. p. 281-304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51-9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by "et al." For further details you are referred to "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" (*J Am Med Assoc* 1997;277:927-34) (see also [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)).