



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE SÃO PAULO**

**CAMPUS AVARÉ**

**CURSO DE BACHARELADO EM ENGENHARIA DE BIODIVERSIDADE**

**Gleudson Luquezi Maciel**

**FERMENTAÇÃO DE MATERIAL QUITINOSO RESIDUAL DA CRIAÇÃO DE LARVAS  
DE BSF (*Hermetia illucens*) PARA OBTENÇÃO DE ENZIMAS QUITINOLÍTICAS E  
PROTEOLÍTICAS.**

**AVARÉ**

**2023**

**GLEIDSON LUQUEZI MACIEL**

**FERMENTAÇÃO DE MATERIAL QUITINOSO RESIDUAL DA CRIAÇÃO DE LARVAS DE BSF (*Hermetia illucens*) PARA OBTENÇÃO DE ENZIMAS QUITINOLÍTICAS E PROTEOLÍTICAS.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Biosistemas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo - *Campus Avaré*, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro de Biosistemas.

Orientador(a): Profa. Dra. Marcela Pavan Bagagli

AVARÉ  
2023

Catálogo na fonte  
Instituto Federal de São Paulo – Campus Avaré

Maciel, Gleidson Luquezi Maciel

Fermentação de material quitinoso residual da criação de larvas de BSF (*Hermetia illucens*) para obtenção de enzimas quitinolíticas e proteolíticas/ Gleidson Luquezi Maciel - Avaré, 2023. 58 p.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marcela Pavan Bagagli

Monografia (Graduação - Bacharelado em Engenharia de Biosistemas) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo - Campus Avaré, Avaré, 2023.

1. Microrganismos 2. Insetos 3. Controle Biológico I. Bagagli, Marcela Pavan. II. Título.

ATA N.º 19/2023 - CBEB-AVR/DAE-AVR/DRG/AVR/IFSP

**Ata de Defesa de Trabalho de Conclusão de Curso - Graduação**

No dia 27 de novembro de 2023 realizou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado **FERMENTAÇÃO DE MATERIAL QUITINOSO RESIDUAL DA CRIAÇÃO DE LARVAS DE BSF (*Hermetia illucens*) PARA OBTENÇÃO DE ENZIMAS QUITINOLÍTIAS E PROTEOLÍTIAS** apresentado pelo aluno **Gleudson Luquezi Maciel (AV3005313)** do Curso **SUPERIOR EM ENGENHARIA DE BIOSISTEMAS**, (Câmpus Campus Avaré). Os trabalhos foram iniciados às 14:00 pela Professora presidente da banca examinadora, constituída pelos seguintes membros:

Membros	IES	Presença (Sim/Não)	Aprovação/Conceito
Marcela Pavan Bagagli (Presidente/Orientador)	IFSP- Câmpus Avaré	Sim	Aprovado
Daniele de Souza Carvalho (Examinador 1)	IFSP - Câmpus Avaré	Sim	Aprovado
Ruann Janser Soares de Castro (Examinador 2)	FEA/ UNICAMP	Sim	Aprovado

**Observações:**

A banca examinadora, tendo terminado a apresentação do conteúdo da monografia, passou à arguição do candidato. Em seguida, os examinadores reuniram-se para avaliação e deram o parecer final sobre o trabalho apresentado pelo aluno, tendo sido atribuído o seguinte resultado:

[ X ] Aprovado(a)

[ ] Reprovado(a)

Nota Final: 9,8

O segundo examinador é avaliador externo:

[ X ] Sim [ ] Não

Proclamados os resultados pelo presidente da banca examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, eu lavrei a presente ata que assino juntamente com os demais membros da banca examinadora.

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica  
 Informar código 3A3EC8FE 63E746C1 917251AA BCC74D4D

ATA DECAN nº 4/2023

Campus Avaré,  
 28 de novembro de 2023

Documento assinado eletronicamente por:

- **Marcela Pavan Bagagli, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO**, em 28/11/2023 09:58:58.
- **Daniele Souza de Carvalho, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO**, em 28/11/2023 10:59:02.

Este documento foi emitido pelo SIJAP em 23/11/2023. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://sijap.ifsp.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 652197  
 Código de Autenticação: cc0108d0d9



ATA N.º 19/2023 - CBEB-AVR/DAE-AVR/DRG/AVR/IFSP

Documento assinado eletronicamente por **Ruann Janser Soares de Castro, PROFESSOR DOUTOR II**, em 04/12/2023, às 09:58 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:  
[sigad.unicamp.br/verifica](http://sigad.unicamp.br/verifica), informando o código verificador:  
**3A3EC8FE 63E746C1 917251AA BCC74D4D**



Dedico especialmente aos meus pais, Ester e Francisco.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, pela proteção e resiliência para superar todos os desafios durante a graduação, bem como por todas as oportunidades que me foram proporcionadas durante esta trajetória.

Agradeço aos meus pais, por todo o apoio emocional e financeiro, possibilitando esta grande conquista.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – Campus Avaré (IFSP), por todas as oportunidades proporcionadas durante o decorrer do curso, bem como o incentivo financeiro para realização destas oportunidades.

Aos professores, pela disposição a ajudar, preocupação com nosso aprendizado e por transmitir seus conhecimentos com qualidade e afabilidade, sempre acreditando no sucesso.

A professora, e minha orientadora, Marcela Pavan Bagagli, por todo cuidado, carinho, paciência, orientação e conhecimento compartilhado, pelos conselhos e preocupação com meu desempenho, contribuindo fortemente com o meu desenvolvimento acadêmico.

Aos meus amigos e pessoas que, de alguma forma, contribuíram para tornar esta trajetória um sucesso.

Ao CNPq por possibilitar o desenvolvimento do projeto de iniciação científica, e ao IFSP por dispor das estruturas laboratoriais onde foram realizadas as pesquisas, contribuindo para a realização da parte prática desta monografia.

A Agrin – Criação e Comercio de Insetos por fornecer o insumo necessário para a realização deste trabalho, bem como ao laboratório de bioquímica de alimentos (FEA – UNICAMP) por ceder o microrganismo *Cellulosimicobrium cellulans*.

Maravilhar-se é o primeiro passo para um descobrimento.

(Louis Pasteur, 1822-1895)

## RESUMO

A inserção de insetos na alimentação humana e animal como fonte de proteínas e a utilização dos lipídios na obtenção de biocombustíveis tem se apresentado como uma opção sustentável para alimentar e gerar energia para a crescente população mundial. A produção massiva de insetos contribui para a degradação de matéria orgânica residual, no entanto, ainda há a geração de resíduos, como as estruturas quitinosas liberadas durante o crescimento. Esse material, entre outras aplicações, pode ser utilizado no cultivo de microrganismos para produção de enzimas proteolíticas com aplicação em agentes biológicos de controle de pragas na agricultura e na obtenção de hidrolisados de quitina e proteínas com atividade biológica. Portanto, neste trabalho utilizou-se o material quitinoso oriundo da produção de larvas de mosca soldado negro (*Hermetia illucens*), conhecidas como BSF no cultivo de três linhagens de microrganismos para produção de enzimas quitinolíticas e proteolíticas por fermentação em estado sólido. O *Bacillus thuringiensis* demonstrou a maior capacidade de produção de protease, atingindo um notável valor de  $206,7 \pm 10,1$  U/g e a maior produção de quitinase foi obtida em material quitinoso acrescido de farelo, sendo  $0,49 \pm 0,05$  por *Bacillus thuringiensis*.

**Palavras-chave:** Microrganismos, Insetos, Controle Biológico.



## ABSTRACT

The inclusion of insects in human and animal food as a source of proteins and the use of lipids to obtain biofuels has been presented as a sustainable option to feed and generate energy for a growing world population. The massive production of insects contributes to the manipulation of residual organic matter, however, waste is still generated, such as chitinous structures released during growth. This material, among other applications, can be used in the cultivation of microorganisms to produce proteolytic enzymes with application in biological pest control agents in agriculture and in obtaining chitin hydrolysates and proteins with biological activity. Therefore, in this work, chitinous material from the production of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*), known as BSF, was used in the cultivation of three strains of microorganisms to produce chitinolytic and proteolytic enzymes by solid state fermentation. *Bacillus thuringiensis* demonstrated greater protease production capacity, reaching a notable value of  $206.7 \pm 10.1$  U/g and the highest chitinase production was obtained in chitinous material plus bran, being  $0.49 \pm 0.05$  by *Bacillus thuringiensis*.

**Key-words:** Microorganisms, Insects, Biological Control.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Evolução de produtos biológicos aprovado pela Anvisa no período de 2016-2022.....	20
Figura 2 – Processo de infecção de insetos por fungos entomopatogênicos.....	21
Figura 3 – Esporos e inclusões proteicas cristalinas bipiramidais de <i>B. thuringiensis</i> em microscopia de contraste de fase (A) e microscopia eletrônica de varredura (B).....	23
Figura 4 – Etapas do mecanismo de ação das toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> no intestino de insetos-alvo.....	24
Figura 5 – Insetos desidratados utilizados no projeto: (a) Exúvia liberada pela mosca BSF ( <i>Hermetia illucens</i> ) durante sua fase de crescimento, (b) produto, pós trituração e peneiramento.....	33
Figura 6 – (a) pesagem da quitina de crustáceo, (b) reação da quitina com HCl em banho-maria, (c) suspensão com água gelada, (d) recuperação via filtração.....	34
Figura 7 – (a) Fermentação de material quitinoso residual proveniente da produção de BSF por <i>B. bassiana</i> e (b) Fermentação de material quitinoso residual proveniente da produção de BSF com farelo de trigo por <i>B. bassiana</i> , em períodos anteriores à extração de enzimas extracelulares.....	40
Figura 8 – Atividade de protease média (unidades por grama de substrato seco) ao longo do tempo de fermentação para (a) <i>B. thuringiensis</i> e (b) <i>C. cellulans</i> e (c) <i>B. bassiana</i> .....	42
Figura 9 – Contagem de unidades formadoras de colônias médias por mL de extrato enzimático bruto para (a) esporos de <i>B. thuringiensis</i> e (b) <i>C. cellulans</i> ; contagem de esporos médios por mL de extrato enzimático bruto para (c) <i>B. bassiana</i> .....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Meios de cultivo para manutenção das linhagens de microrganismos.....	32
Tabela 2 – Tempo de incubação para cada microrganismos.....	35
Tabela 3 – Composição centesimal média do material quitinoso de BSF e do farelo de trigo em base seca.....	39
Tabela 4 – Maiores atividades médias de protease (unidades por grama de substrato seco) e taxa de produção de proteases (unidades por hora de fermentação) para cada um dos microrganismos nos dois substratos avaliados. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey.....	43
Tabela 5 – Maiores atividades médias de quitinase (unidades por grama de substrato seco) para cada um dos microrganismos nos dois substratos avaliados.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
FAO	Food and Agriculture Organization
ONU	Organização das Nações Unidas
mL	Mililitros
g	Gramas
L	Litro
U	Unidade de atividade enzimática
rpm	Rotações por minuto
vvm	Volume de ar por volume de meio
FEA	Faculdade de Engenharia de Alimentos
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
Min	Minuto
h	Hora
nm	Nanômetros
µL	Microlitros
UFC	Unidades formadoras de colônia
MQ	Material quitinoso
FT	Farelo de trigo

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	<u>1515</u>
2 OBJETIVOS.....	<u>1717</u>
2.1 Objetivo Geral .....	<u>1717</u>
2.2 Objetivos Específicos .....	<u>1717</u>
3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA .....	<u>1818</u>
3.1 Controle Biológico de pragas agrícolas.....	<u>1818</u>
3.1.1 Controle biológico de pragas agrícolas utilizando <i>Beauveria bassiana</i> .....	<u>2020</u>
3.1.2 Controle biológico de pragas agrícolas utilizando <i>Bacillus thuringiensis</i> <u>2222</u>	
3.2 Protease e Quitinase no controle de inseto-praga .....	<u>2525</u>
3.3 Meios de cultivo para produção de enzimas proteolíticas e quitinolíticas .....	<u>2727</u>
3.5 Produção massiva de insetos .....	<u>2929</u>
3.6 Uso de exoesqueleto de insetos em fermentações.....	<u>3030</u>
4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS .....	<u>3131</u>
4.1 Manutenção dos microrganismos.....	<u>3131</u>
4.2 Preparação do material quitinoso.....	<u>3232</u>
4.3 Preparo da quitina coloidal de crustáceo .....	<u>3333</u>

4.4 Fermentação dos meios.....	<u>3434</u>
4.5 Extração das enzimas celulares.....	<u>3535</u>
4.6 Quantificação da atividade proteolítica nos extratos enzimáticos .....	<u>3535</u>
4.7 Quantificação da atividade quitinolítica nos extratos enzimáticos.....	<u>3636</u>
4.8 Caracterização do material quitinoso e do farelo de trigo .....	<u>3636</u>
4.9 Quantificação dos microrganismos .....	<u>3838</u>
4.10 Análise estatística .....	<u>3838</u>
5 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	<u>3939</u>
5.1. Caracterização do material quitinoso e do farelo de trigo .....	<u>3939</u>
5.2. Obtenção dos extratos enzimáticos .....	<u>3939</u>
5.3. Quantificação de proteases nos extratos enzimáticos brutos .....	<u>4141</u>
5.4. Quantificação da atividade quitinolítica .....	<u>4444</u>
5.5. Quantificação de microrganismos nos extratos das fermentações .....	<u>4545</u>
6 CONCLUSÃO .....	<u>4747</u>
REFERÊNCIAS .....	<u>4848</u>

## 1. INTRODUÇÃO

A criação massiva de insetos para aplicação como fonte de proteína na alimentação humana ou animal, bem como na obtenção de biocombustíveis e bioinsumos para a agricultura, tem se apresentado como uma alternativa sustentável com impacto positivo para a segurança alimentar (FAO, 2015). No caso da criação das larvas de BSF (*Hermetia illucens*), há o potencial de aproveitamento de resíduos sólidos orgânicos (em decomposição ou não) que podem ser convertidos em proteínas e lipídios para alimentação humana e animal, para obtenção de biocombustíveis, fertilizantes, entre outros (Surendra *et al.*, 2020; Karthikeyan *et al.*, 2020).

Essa produção de insetos apresentam as exúvias e as casca de pupas gerados ao longo do desenvolvimento das larvas e após a pupa se tornar o inseto adulto, respectivamente, constituindo resíduos da criação (Soetemans *et al.*, 2020; Surendra *et al.*, 2020; Ravi *et al.*, 2020). Esses materiais são constituídos majoritariamente por proteínas, quitina e minerais e, no caso da BSF (*Hermetia illucens*), se apresentam como as estruturas com maior concentração de quitina ao longo do ciclo de vida do inseto (Soetemans *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2021).

Processos de conversão de resíduos ou subprodutos das agroindústrias é de grande interesse mercadológico, especialmente pensando em reduzir os impactos ambientais do descarte desses materiais e de aproveitamento energético extremo desses resíduos (Rosa *et al.*, 2011; Ravi *et al.*, 2022).

A quitina é um polímero formado por unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranos e 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranos unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4, constituindo o segundo polissacarídeo natural mais abundante na terra, estando atrás apenas da celulose (Lin *et al.*, 2021). Este polissacarídeo pode ser encontrado em insetos, crustáceos e na parede celular de fungos. Apresenta aplicações em diversas áreas, como na indústria de alimentos, farmacêutica, cosmética, na agricultura, entre outros (Azevedo *et al.*, 2007), sendo associada ao estímulo de mecanismos de defesa

de plantas contra o ataque de insetos e fungos fitopatogênicos (Iriti; Faoro, 2009; Ramíríz *et al.*, 2010).

Esse polímero, insolúvel em água, ácidos e solventes orgânicos, confere à parede celular de fungos e ao exoesqueleto de insetos uma estrutura rígida protetora contra o ataque de agentes de controle dos mesmos (Fontes; Valadares-Inglis, 2020). Neste contexto, enzimas quitinolíticas podem ser de grande utilidade para a inibição do desenvolvimento de fungos e insetos em culturas agrícolas, por exemplo (Ramíríz *et al.*, 2010; Fontes; Valadares-Inglis, 2020).

Algumas bactérias e fungos filamentosos podem produzir quitinases e proteases extracelulares que atuam na cutícula do exoesqueleto de insetos, em ovos de nematoides, ou ainda na parede celular de fungos, facilitando a colonização do fitopatógeno ou mesmo, o acesso de substâncias de controle (Halfeld *et al.*, 2016; Fontes; Valadares-Inglis, 2020; Boldoni *et al.*, 2020). Outras aplicações são encontradas para estas enzimas, como no caso da obtenção de compostos com atividade biológica, como oligossacarídeos e peptídeos (Azevedo *et al.*, 2007; de Castro *et al.*, 2018).

A produção de quitinases e proteases por microrganismos tem sido associada e aprimorada pela presença de indutores nos meios de cultivo, tanto em fermentações em estado sólido quanto em fermentações submersas (Fleuri; Sato, 2008; Boldoni *et al.*, 2020), sendo em geral utilizado quitina (hidrolisada, ou não) e fontes de proteínas específicas, respectivamente (Smith; Grula, 1983; de Castro; Pinto, 2009). O material quitinoso residual proveniente da criação de insetos pode ser uma alternativa de baixo custo capaz de induzir tanto a produção de quitinase quanto de protease.

*Beauveria bassiana*, um fungo entomopatogênico, é capaz de produzir quitinases e proteases em fermentações em estado sólido (Suresh; Chandrasekaran, 1999; Sala *et al.*, 2022), da mesma forma, os *Bacillus thuringiensis*, uma bactéria amplamente utilizada no controle biológico de insetos em produções agrícolas (Chaiharn *et al.*, 2013; Marínez-Zavala *et al.*, 2020), também são produtores das enzimas em fermentação em estado sólido.



Assim, a produção de enzimas protease e quitinase através do cultivo de microrganismos, empregando material quitinoso residual de exúvias de larvas e cascas de pupa da BSF (*Hermetia illucens*) como substrato, surge como uma estratégia promissora para atenuar significativamente os custos envolvidos na produção de enzimas, custos estes que podem responder por quase um terço do custo total (Ravindran *et al.*, 2018).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo deste projeto foi o de verificar a produção de enzimas quitinolíticas e proteolíticas por microrganismos cultivados em resíduo quitinoso da criação de larvas da mosca soldado negro (*Hermetia illucens*), usualmente chamada de BSF, colaborando com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da ONU, em especial o ODS 2 (Fome zero e agricultura sustentável) e ODS 12 (consumo e produção sustentáveis).

### **2.2 Objetivos Específicos**

- a) Preparar e caracterizar o material quitinoso proveniente da cultura massiva de larvas de BSF (*Hermetia illucens*);
- b) Cultivar e manter os microrganismos (*B. thuringiensis*, *B. bassiana*, *Cellulosimicrobium cellulans*) em meios de cultura específicos;
- c) Cultivar os microrganismos por fermentação em estado sólido, nas condições ótimas de crescimento de cada microrganismo, utilizando como substrato o material quitinoso;
- d) Quantificar a atividade enzimática de quitinases e proteases.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Controle Biológico de pragas agrícolas

O controle biológico de pragas agrícolas é uma metodologia empregada para reduzir a população de plantas, animais ou fitopatógenos que atingem os cultivos em níveis economicamente inaceitáveis, transformando-se em pragas. Nesse contexto, os inimigos naturais dessas pragas podem ser utilizados de forma eficaz e segura no manejo integrado de pragas, sendo introduzidos nos sistemas de cultivo como uma alternativa ao uso de produtos químicos (Fontes; Valadares-Inglis, 2020; Biomed, 2013).

O controle biológico já ocorre de forma natural nos ecossistemas, não sendo necessária a ação da atividade humana, no entanto, este pode ser manipulado pelo mesmo para solução dos problemas acentuados da agricultura, e dentre as estratégias que podem ser empregadas para manipulação do controle biológico, estão o controle por importação, aumento ou conservação dos inimigos naturais (Fontes; Valadares-Inglis, 2020; Biomed, 2013).

Desta forma, o controle biológico torna-se uma abordagem favorável para o manejo de pragas e doenças na agricultura, promovendo a sustentabilidade agrícola, e criando um ambiente ecologicamente correto (Tariq *et al.*, 2020).

No Brasil, o primeiro agente de controle de pragas foi introduzido por meio da importação do parasitoide *Prospaltella berlesei*, vindo dos Estados Unidos em 1921, para o controle de *Pseudaulacaspis pentagona*, conhecida como cochonilha escama-branca. Posteriormente, outros agentes de controle foram introduzidos por meio de diversos métodos de manipulação, como *Diachasmimorpha longicaudata*, introduzido em 1994 para o controle da mosca-da-fruta, e *Agenia spiscitrícola*, introduzido em 1997 para o controle do minador-dos-citros (Biomed, 2013).

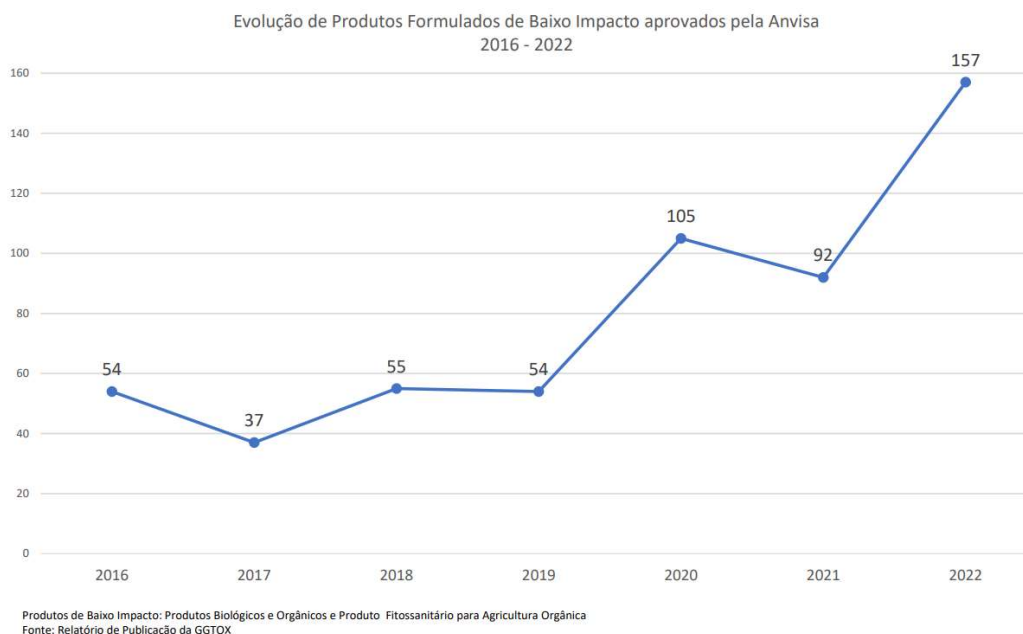
Atualmente, há evidências de diversos casos de sucesso no controle de pragas da agricultura utilizando inimigos naturais no Brasil, dentre eles podem ser citados o uso de *Diatrea saccharalis* com taquinídeos nativos e posteriormente com o parasitoide

introduzido de Trinidad-Tobago, *Cotesia flavipes*, para o controle biológico da broca da cana-de-açúcar, o controle da traça do tomateiro, *Tuta absoluta*, pelo parasitoide *Trichogramma pretiosum*, importado da Colômbia, como também a utilização de *Trissolcus basalis* e *Trichogramma spp.* para o controle de pragas de percevejo da soja, bem como diversos lepidópteros praga de diversas culturas (Capalbo; de Sá, 2006).

No âmbito dos inimigos naturais microbianos há exemplos de diversas aplicações com vírus, fungos e bactérias, por exemplos, o vírus *Bacilovirus anticarsia* para o controle de lagarta de soja, o *Erinyis ello* vírus do mandarová da mandioca e o vírus *Spodoptera frugiperda* da lagarta do cartucho-do-milho. Os fungos e bactérias entomopatogênicos também apresentam potenciais significativos no controle de pragas. No Brasil os principais fungos estudados são *Metarhizium anisopliae* e *B. bassiana* e, no caso das bactérias, *B. thuringiensis* (Capalbo; de Sá, 2006).

Segundo divulgação da Anvisa, publicado em janeiro de 2023, o número de aprovações de produtos biológicos para o controle de pragas e doenças da agricultura foram de 157 pedidos em 2022, um aumento de 70% quando comparado com os pedidos concluídos no ano anterior, crescimento expressivo, como pode ser demonstrado no Figura 1.

Figura 1 - Quantidade de produtos biológicos aprovado pela Anvisa no período de 2016-2022.



Fonte: Anvisa (2023)

Além do aumento expressivo de registros de produtos biológicos, há o avanço financeiro neste mercado, sendo que só em 2019 o mercado nacional movimentou R\$ 675 milhões, crescimento na ordem de 15 % maior em relação a 2018. Com resultados acima da expectativa média de crescimento internacional, e no mundo, a adoção de bio defensivos pelos agricultores, movimentou em 2020 mais 5 bilhões de dólares, com crescimento de 14,4% ao ano (Anvisa, 2023; CropLife, 2021).

### 3.1.1 Controle biológico de pragas agrícolas utilizando *Beauveria bassiana*

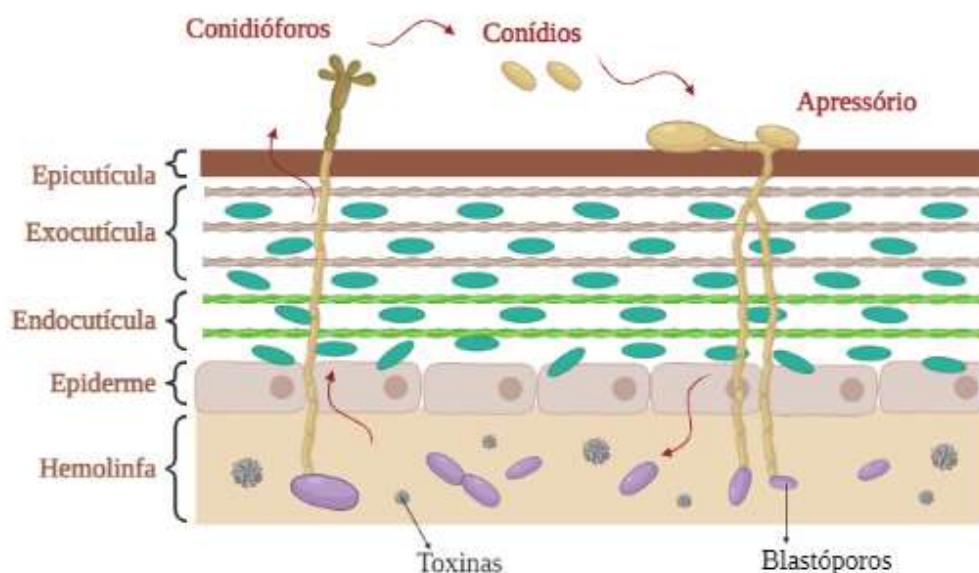
*B. bassiana* é um fungo entomopatogênico, com ciclo biológico que permite atuação como um parasita facultativo, possui utilização em escala comercial na produção

de bioinseticidas em países como Estados Unidos e México (Dalzoto; Uhry, 2009; Faria; Magalhães, 2001). No mercado brasileiro, até março de 2023, havia 95 produtos registrados como bioinseticidas à base de *B. bassiana* e 76 como bioacaricidas (Bettiol; Medeiros, 2023).

No Brasil, *B. bassiana* é utilizada para fazer o controle de diversas pragas-insetos, é naturalmente encontrada no ar e no solo e já foi relatada pela literatura científica que as diversas linhagens do fungo exercem controle de importantes pragas na agricultura (Dalzoto; Uhry, 2009).

O processo de infecção por *B. bassiana*, e em geral para os fungos entomopatogênicos, ocorre através do contato do conídio com o tegumento do hospedeiro, seguido pela germinação do conídio e formação do apressório, havendo, em seguida, a penetração da hifa, a qual se multiplica de forma rápida, atravessando a cutícula e atingindo a hemolinfa dos insetos. Atingida a colonização interna, inicia-se a degradação dos tecidos pelas toxinas produzidas pelos blastóporos, causando uma infecção generalizada, conforme expõe a figura 2 (Fontes; Valadares-Ingliš, 2020).

Figura 2 – Processo de infecção de insetos por fungos entomopatogênicos.



Fonte: Elaborado por Marcela Pavan Bagagli (2023), utilizando o BioRender.

Leite *et al.* (2003), utilizaram *B. bassina* para controle de *Hedypathes betulinus*, uma praga da cultura de erva-mate, em formulação em óleo com concentração de  $10^7$  esporos/mL, obteve resultado de 70,8 % de infectividade com tempo letal de 30,6 dias. Borges *et al.* (2011), também avaliou a eficácia de *B. bassina* para controle de *Hedypathes betulinus* concluindo que a utilização do fungo na concentração de  $10^7$  conídios/mL representa uma medida eficaz para o manejo das populações da praga em áreas de cultivos intensos de erva-mate.

BOVERIL WP, um bioinseticida registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sob o nº 4902, é um produto que possui como princípio ativo esporos do fungo *B. bassiana*, que atualmente possui atuação em culturas como morango, cana-de-açúcar, hortaliças, seringueiras e floricultura, dentre outras aplicações (Dalzoto; Uhry, 2009).

Soliman *et al.* (2010), realizaram testes utilizando BOVERIL SC, constatou, em ensaios laboratoriais, a capacidade do produto de realizar o controle biológico do percevejo-bronzeado (*Thaumastocoris peregrinus*), praga do eucalipto, cultura florestal, obtendo taxa de mortalidade de 97,5 % na concentração de  $10^8$  conídios/mL, a maior concentração do seu teste.

Lorencetti *et al.* (2018), que também avaliaram isolados de *B. bassiana* no controle biológico do percevejo-bronzeado, obtiveram resultados de taxa de mortalidade variando de 37 a 80,1 %.

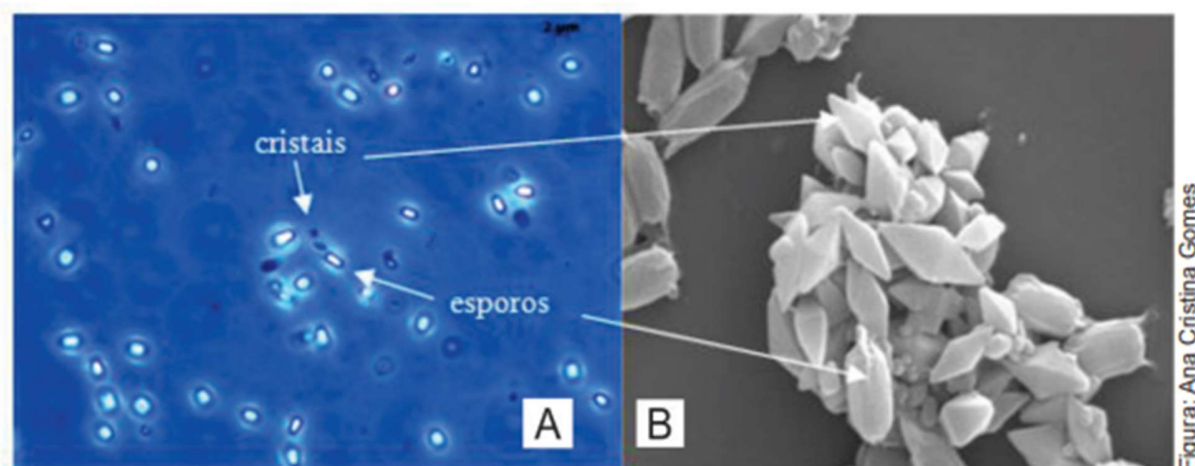
### **3.1.2 Controle biológico de pragas agrícolas utilizando *Bacillus thuringiensis***

*Bacillus* é um gênero de bactérias aeróbicas e esporuladas, sendo as mais utilizadas no controle biológico (Fontes, Valadaris-Inglis, 2020).

No Brasil, *B. thuringiensis*, uma das bactérias mais utilizada para o controle de pragas, representa 44 de 263 produtos registrados como bioinseticidas (Bettiol;

Medeiros, 2023), possuindo aplicação em diversas ordens, tais como Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera e Coleoptera, além de nematoides, ácaros e protozoários (Galzer; Azevedo-Filho, 2016; Bravo *et al.*, 2005). São naturalmente encontrados no solo, resíduos de grãos, matéria vegetal, insetos entre outros. É uma bactéria que produz cristais proteicos (Figura 3) durante a fase estacionária ou de esporulação.

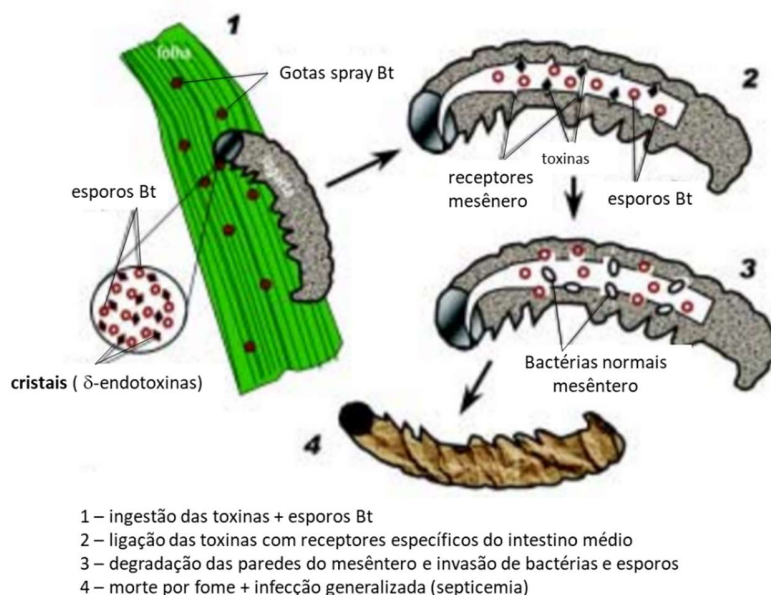
Figura 3 – Esporos e inclusões proteicas cristalinas bipiramidais de *B. thuringiensis* em microscopia de contraste de fase (A) e microscopia eletrônica de varredura (B).



Fonte: Monnerat *et al.* (2020)

Os cristais proteicos, também chamado de proteína cristal ou  $\delta$ -endotoxina, são os principais atuadores no controle de pragas, devido suas propriedades inseticidas específicas. Após a ingestão do cristal pelo inseto-alvo, estes se dissolvem, liberando proteínas que interagem com receptores específicos destruindo a membrana do intestino e permitindo a proliferação das bactérias, levando o inseto à morte por um processo de infecção generalizada, (Galzer; Azevedo-Filho, 2016; Valadares-Ingliš, 2020). O processo infeccioso pode ser observado na figura 4.

Figura 4 – Etapas do mecanismo de ação das toxinas de *Bacillus thuringiensis* no intestino de insetos-alvo.



Fonte: Loguercio; Carneiro; Carneiro (2002) com modificações

Além, dos cristais, o *B. thuringiensis* também produz um grande número de exoenzimas que possuem aplicação no controle de pragas agrícolas, desempenhando um papel importante na patogenicidade a insetos, dentre elas estão as quitinases e proteases (Galzer; Azevedo-Filho, 2016; Goldenberg *et al.*, 2007).

Becheleni; Campolino (2017) utilizaram *B. thuringiensis* no controle biológico de *Spodoptera frugiperda*, conhecida como lagarta do cartucho, aplicando a técnica de bioensaio com 24 cepas, avaliando as eficiências toxicológicas e biológicas. Uma cepa, dentre as 24, obteve virulência de 75%, indicando que nem todas as cepas são virulentas e, que neste caso, a cepa que obteve maior taxa de mortalidade poderia ser utilizada para o controle da lagarta do cartucho.

Brighenti *et al.* (2005) analisaram a eficiência da formulação comercial de *B. thuringiensis* var. *kurstak* no controle da traça da cera (*Galleria mellonella*) via



pulverização, imersão ou incorporação na dieta em diferentes concentrações. Para pulverização, o biocontrole apresentou eficiência da taxa de mortalidade atingindo níveis iguais ou superiores a 85 % quando utilizados 5 g/100 mL de água, via imersão nos favos, todas as concentrações testadas foram eficientes, com mortalidade variando entre 85,2 % e 100 %, e via incorporação à dieta artificial, o melhor resultado foi na concentrações de 10 g/60 g de dieta, com taxa de mortalidade 83,8 %.

### **3.2 Protease e Quitinase no controle de inseto-praga**

As proteases são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas de proteínas (Lima, 2016). Este mecanismo pode auxiliar no controle biológico de insetos, visto que as proteases podem digerir as proteínas presentes na cutícula e sistema digestório destes, sendo importantes no processo de penetração dos microrganismos entomopatogênicos (Fontes, Valadares-Inglis, 2020). Segundo Harrison; Bonning (2010), as proteases são candidatas lógicas para utilização como agentes inseticidas, tendo que a atividade proteolítica possa atingir e destruir proteínas e tecidos essenciais a ponto de resultar em mortalidade.

As proteases estão presentes em plantas, como mecanismo de defesas contra insetos, e em patógenos microbiológicos. Por este grupo de enzimas apresentar efeito toxicológico contra insetos, mesmo as proteases que não evoluíram para desempenhar esta função, quando em contato com insetos podem exercer efeito inseticida (Harrison; Bonning, 2010).

Lee *et al.* (2021) utilizaram subprodutos quitinosos da pesca em fermentação líquida para produção de protease por *Paenibacillus elgii* e aplicaram as proteases resultantes da sua fermentação em diversos substratos proteicos visando observar o grau de hidrólise obtido. Os resultados revelaram que o extrato enzimático demonstrou atividade variada em relação aos diferentes substratos. Apresentou alta especificidade para a caseína, alcançando 100%, seguido por 58,85% para a queratina. Já para o pó de casca de camarão, a especificidade foi baixa, atingindo 28,49%, enquanto para o pó de cabeça de camarão foi de 24,1%. Em relação ao pó de carne de camarão, a especificidade foi mediana, atingindo 44,5%.

As quitinases são enzimas que degradam a quitina, que é o polissacarídeo presente no exoesqueleto do inseto, logo as enzimas quitinolíticas apresentam uma grande possibilidade de utilização na produção de bioinseticidas e biofungicidas para controle biológico de inseto-praga (Baldoni, 2016; Fontes; Valadares-Ingliš, 2020).

Além de atuar contra insetos, as quitinases podem atuar também contra fungos patógenos de importância agrícola (Fleuri; Sato, 2005), visto que sua parede celular contém quitina. Desta forma, torna-se vantajoso desenvolver um produto capaz de combater simultaneamente insetos e fungos fitopatogênicos, (Nagpure; Choudhary; Gupta, 2013).

Zhang *et al.*, em 2014, conduziu um estudo sobre os efeitos parasitários e letais do *Trichoderma longibrachiatum* em *Heterodera avenae*, constatando seu potencial como agente de controle biológico contra nematoides formadores de galhas e nematoides formadores de cisto em cultura de trigo (*Triticum aestivum*), por meio de parasitismo direto em ovos e larvas. O estudo revelou um aumento nos níveis de enzimas extracelulares, como quitinase e protease, possibilitaram a penetração do fungo nos ovos e afetaram diretamente os componentes estruturais da casca, reduzindo, assim, a quantidade de ovos capazes de eclodir. O fungo demonstrou, também, um forte efeito inibitório na eclosão de cistos produzidos por *Heterodera avenae*, uma vez que os esporos cobrem completamente a superfície dessas estruturas, causando sua destruição. Isso provavelmente ocorre devido à produção de enzimas, como quitinases, que induzem alterações fisiológicas nos cistos. Nas aplicações com uma concentração de  $10^8$  esporos/mL, foi observada uma taxa de parasitismo superior a 90% após 18 dias de tratamento.

Sujayanand *et al.* (2016) também concluíram que as quitinases apresentam potencial contra insetos e nematoides, além de que, a associação com outras enzimas, tais como proteases, apoia ou aprimora a atividade das quitinases, melhorando a patogenicidade e a eficácia do biocontrole.

### 3.3 Meios de cultivo para produção de enzimas proteolíticas e quitinolíticas

Proteases e quitinases podem ser obtidas através de fermentação em estado sólido, semissólido e submersas (Baldoni, 2016; Castro *et al.*, 2009; Barroncas, 2013), por fungos e bactérias, apresentando vantagens para produtos formulados para realização do controle biológico (Fontes; Valadares-Ingliš, 2020).

Meios de culturas para intensificar a produção de enzimas proteolíticas tem como principal base fontes de proteínas, tais como caseína, peptona, gelatina, conforme demonstra o estudo de Lario *et al.* (2020), a fim de otimizar a produção de enzimas proteolíticas por *Rhodotorula mucilaginosa* através de fermentação em batelada em biorreatores de 3L, observaram o melhor resultado, em termos de atividade proteásica, utilizando meio que continha 2,5 g/L de triptona de caseína, 2,5 g/L de peptona de tecido animal e 2,5 g/L peptona da gelatina.

Como forma alternativa, a valorização de resíduos agroindustriais tem sido uma fonte viável para produção destas enzimas. Castro *et al.* (2015) avaliaram a produção de proteases por *Aspergillus niger*, utilizando resíduos agroindustriais, através de fermentação em estado sólido, bem como a variação das propriedades bioquímicas das proteases em resposta a cada substrato, e concluíram que a produção de protease por *A. niger* pode ser regulada pelo resíduo agroindustrial, e maiores teores de proteína neles mostraram-se como fator importante para indução na produção de protease nas primeiras 24h de fermentação.

Ferracini-Santos e Sato (2009) empregaram células secas de *Saccharomyces cerevisiae* como fonte de carbono e nitrogênio para o crescimento celular e produção de protease por *Cellulosimicrobium cellulans*, um microrganismo produtor de uma variedade de enzimas que degradam a parede celular de leveduras, incluindo  $\beta$ -1,3-glucanase, protease e quitinase. Como resultado, observou-se que o meio de cultura com máxima produção de protease, nas condições experimentais, foi de 0,2 g/L de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 2,0 g/L de  $(NH_4)_2SO_4$  e 8% de células secas de levedura em tampão fosfato 0,15 M a pH 8,0, com atividade de  $7,0 \pm 0,27$  U/mL.

Fernandes *et al.* (2012) analisaram a produção de enzimas extracelulares das linhagens de fungo *B. bassiana*, *Metarizhium anisopliae* e *Paecilomyces sp.* em diferentes substratos, não identificou produção de protease quando as cepas cresceram em meios contendo cutículas de inseto, com a premissa de que o resultado possa ser consequência da baixa concentração de células nas condições experimentais, e o mesmo identificou produção de protease utilizando 4% de gelatina como substrato, para as 3 linhagens de fungos.

Em contrapartida, Murad *et al.* (2006) utilizaram como substrato cutícula de *Callosobruchus maculatus* e conseguiu extrair enzimas proteolíticas produzidas *M. anisopliae*, evidenciando a possibilidade destas enzimas serem produzidas na presença de exoesqueleto de insetos.

Para a produção de enzimas quitinolíticas, os meios podem ser adequados com adições de substrato quitinosos para induzir a produção (Baldoni, 2016).

Guimarães *et al.* (2017) avaliaram a seleção de fungos filamentosos do bioma caatinga para produção de quitinases, cultivados em meio sintético, contendo 1% de quitina e 1,5% de Ágar, obteve resultados em que 45,3% dos 117 fungos avaliados apresentaram perfil de crescimento em meio de cultivo contendo quitina, sendo os 3 fungos com maior capacidade para produzir a enzima, apresentando índice enzimático entre 14,83 e 18.

A fim de avaliar a produção de quitinase por fungos de gênero *Trichoderma*, Coragem (2023) utilizou quitina coloidal como principal fonte de carbono no meio de cultivo para as 3 cepas das espécies, obtendo como resultado atividades entre 0,44 U/mL e 0,55 U/mL, em diferentes tempos de fermentação, para as diferentes espécies, mas com as três apresentando boa produção de quitinase.

Elawati *et al.* (2018) avaliaram a produção de quitinase por fermentação subersa utilizando *Beauveria bassiana*, isolada de insetos *Helopeltis antonii*, com objetivo de determinar a curva de crescimento e as atividades de quitinase em meio contendo 0,3 % de quitina coloidal como indutor. Os melhores resultados obtidos ocorreram após o

quarto dia de incubação (temperatura ambiente a 120 rpm), sendo a massa seca de 0,031 g para 100 mL de meio de cultivo e a atividade enzimática de 0,585 U/mL.

Fleuri *et al.* (2009) avaliaram a produção, purificação e aplicação da quitinase extracelular produzida pelo *Cellulosimicrobium cellulans* obtendo produção máxima de 6,9 U/mL em frascos agitados após 72 h de fermentação a 25 °C e 200 rpm. Quando avaliado em fermentador de 5 L, o resultado obtido foi de 4,19 U/mL após 168 h de fermentação a 25 °C e 200 rpm, utilizando aeração de 1,5 vvm. O aumento da aeração conduziu a pouco aumento na atividade (4,38 U/mL), mas antecipou a ocorrência do pico de atividade (144 h), aumentando a produtividade do processo.

Zhang *et al.* (2004) avaliaram a produção e propriedades da quitinase de *Beauveria bassiana* Bb174 através de fermentação em estado sólido. Os autores concluíram que o meio ótimo para produção da enzima foi constituído de farelo de trigo e crisálida de bicho-da-seda (*Bombyx mori*), na proporção de 4:1, suplementado de 1g de peptona e de minerais, resultando em uma atividade enzimática de 126 U/g de substrato seco após 2 dias de cultivo a 28 °C.

### **3.5 Produção massiva de insetos**

Os insetos são uma fonte potencial para alimentos e produção de ração animal, dado a sua capacidade nutricional (Rumpold; Schluter, 2013). Estudos indicam que são ricos em proteínas, gorduras saudáveis e podem apresentar outros nutrientes essenciais, como minerais e vitaminas (Rumpold; Schluter, 2013; Nowakowski e tal, 2021; Vilella, 2018; Costa-Neto, 2003), tornando-os uma fonte potencialmente valiosa de alimento para animais de criação, como para aves e peixes, que possuem grande aceitação (Rumpold; Schluter, 2013).

A produção de insetos é considerada uma alternativa sustentável à produção de proteínas animais convencionais. Insetos consomem menos recursos para produção de biomassa, produzem menos gases de efeito estufa e requerem menos terra e água para crescer (Niglio; Germer, 2022). Além disso, insetos têm ciclos de vida curtos, crescem e

se reproduzem facilmente e podem ser criados em alta densidade em ambientes controlados, permitindo uma produção rápida e eficiente (Vilella, 2018).

A criação de insetos produz resíduos orgânicos, como exoesqueletos, ricos em quitina, frass e lipídios, que podem ser aproveitados para conversação de produtos por fermentação, como a obtenção de enzimas, produção de quitosana, fertilizantes e biocombustíveis, por exemplo (Hahn *et al.*, 2020; Chavez, 2021; Bellaaj *et al.*, 2011).

### **3.6 Uso de exoesqueleto de insetos em fermentações**

Os fungos entomopatogênicos, quando em contato com o exoesqueleto de insetos, dão início a uma série de etapas bioquímicas, principalmente de sinalização, que em resposta a essa fonte potencial de substrato, começam a produzir enzimas como quitinases e proteases para degradar a quitina e as proteínas associadas ao exoesqueleto (Wiermann, 2022).

A quitina é um polissacarídeo linear que consiste em unidades de N-acetilglicosamina conectadas por ligações beta-1,4. Ela constitui a maior parte do exoesqueleto dos insetos, crustáceos e parede celular dos fungos (Fontes; Valadares-Inglis, 2020; Azevedo *et al.*, 2007), e sua presença pode atuar como um estímulo significativo para a produção de metabólitos enzimáticos, como quitinases e proteases, por microrganismos diversos (Baldoni, 2016; da Silva *et al.*, 2007).

A criação de insetos é muito utilizada para obtenção de insumos de alimentação animal, polinização e produção de mel, e no controle biológico (Nachtigal *et al.*, 2022). Os exoesqueletos de insetos, normalmente denominado exúvias, são compostos de alto teor de quitina, que podem ser metabolizados por um conjunto de microrganismos (Barragán-Fonseca *et al.*, 2022). O uso desses resíduos biológicos em fermentações pode ajudar a reduzir o desperdício e valorizar produtos que ainda podem ser processados, tornando a criação massal de insetos ainda mais sustentável.

Lee *et al.* (2021) indicaram como a valorização de resíduos pode ser eficiente, principalmente através de um método de conversão microbiana, aumentando seu valor

econômico e contribuindo com a sustentabilidade, observando a produção de enzimas proteases em meios contendo subprodutos quitinosos da pesca por *P. elgii* TKU051, uma cepa bacteriana produtora de protease.

Ghorbel-Bellaaj *et al.* (2011) utilizaram material quitinoso residual da indústria de camarão para otimização da produção de proteases e quitinases por *Bacillus cereus* SV1 através de fermentação submersa, resultando em atividades de 8.445,8 U/mL para protease, e 82,8 mU/mL para quitinase.

Bhattacharya *et al.* (2016) avaliaram a biossíntese, caracterização e antagonismo contra *Fusarium oxysporum* (um fungo fitopatogênico) de quitinase de *Bacillus pumilus* JUBCH08, por fermentação submersa. Meio complementados com 0,5 % de quitina e peptona, em pH 8,0, e incubado a 35 °C por 72 h, favoreceu a produção de quitinase, a qual foi termoestável e tolerante a álcalis, com atividade máxima em pH 8,0 a 70 °C e apresentou 45% de antagonismo contra *F. oxysporum*, indicando seu uso potencial como agente de biocontrole.

As fermentações que utilizam a quitina como parte do substrato são capazes de induzir a produção de enzimas quitinolíticas, como quitinases e N-acetilglucosaminidases. Aguiar (2020) utilizou diferentes fontes de quitina em fermentação submersa por *Trichoderma asperellum*, identificando a produção de quitinases e N-acetilglucosaminidases na proporção de 1.960 mU/mL e 5.790 mU/mL em meio contendo quitina triturada, 770 mU/mL e 3.060 mU/mL para meio contendo quitina de *R. microplus* e de 720 mU/mL e 4.100 mU/mL para meio de cultura contendo larvas de *A. aegypti*.

## **4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS**

### **4.1 Manutenção dos microrganismos**

O *B. thuringiensis* (Bt) e *B. bassiana* (Bb) utilizados neste trabalho foram adquiridos comercialmente da empresa AGRINOR, em formulação de inóculos para propagação “on farm” de agentes microbiológicos de controle. O *C. cellulans* (Cc) foi gentilmente

cedido pelo laboratório de bioquímica de alimentos (FEA – UNICAMP) através do grupo de pesquisa vinculado ao projeto universal CNPq (processo n. 403769/2021-3), do qual este projeto fez parte.

As linhagens foram conservadas em tubos de ensaio com *slants* de ágar conforme tabela 1 e mantidos a 5°C, sendo repicados a cada 6 meses.

Tabela 1 – Meios de cultivo para manutenção das linhagens de microrganismos.

<b>Microrganismo</b>	<b>Meio de cultivo</b>
<i>B. thurigiensis</i>	Agar nutriente (NA)
<i>B. bassiana</i>	Agar batata dextrose (PDA)
<i>C. cellulans</i>	Agar nutriente (NA)

#### **4.2 Preparação do material quitinoso**

O material quitinoso proveniente do cultivo de larvas de mosca soldado negro (*Hermetia illucens*), usualmente chamada de BSF, foi doado pela empresa Agrin - Criação e Comércio de Insetos (Avaré-SP). Este material foi composto por exúvias do crescimento das larvas e por exúvias pupal, em proporção aproximada de 2:1 (m:m), respectivamente. O material foi triturado em moinho multiuso e passado em peneira 600 µm, armazenado em saco plástico e posteriormente congelado a -18°C até o momento de uso. A figura 5 apresenta os processos de preparo do material quitinoso.



Figura 5 – Insetos desidratados utilizados no projeto: (a) Exúvia liberada pela mosca BSF (*Hermetia illucens*) durante sua fase de crescimento, (b) produto, pós trituração e peneiramento.

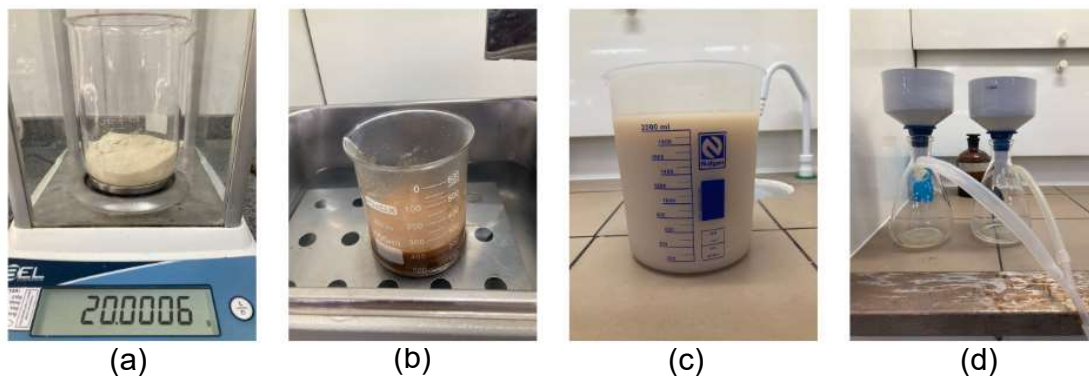


#### 4.3 Preparo da quitina coloidal de crustáceo

Nas análises de atividade quitinolítica foi utilizada quitina de crustáceo em estado coloidal. Para o preparo, a quitina de crustáceos foi misturada em HCl concentrado (1:10, m:v), sendo 20g de quitina de crustáceos e 200 mL de ácido utilizados para esta preparação e submetidos a 40°C por 15 min. A quitina foi precipitada como suspensão coloidal com a adição lenta de 2 L de água gelada e a recuperação do produto foi realizada a partir de filtração a vácuo em filtro de papel qualitativo. O material obtido foi lavado com água destilada até pH 5,0. Em seguida o material foi submetido a secagem a 60°C por 24 h e armazenado a 4°C até o momento de uso.

A figura 6 represa o passo a passo de preparação da quitina coloidal até a etapa de filtração.

Figura 6 – (a) pesagem da quitina de crustáceo, (b) reação da quitina com HCl em banho-maria, (c) suspensão com água gelada, (d) recuperação via filtração.



#### 4.4 Fermentação dos meios

Para as fermentações, dois meios foram preparados, um deles contendo 100% de material quitinoso MQ, e o outro 50% de material quitinoso com 50% de farelo de trigo (MQ + FT).

Inicialmente foi determinada a capacidade de retenção de água dos substratos (CR). Para tanto, uma porção de 1 g de material quitinoso foi colocado sobre um funil plástico com gaze e adicionou-se 5 mL de água destilada, sendo coletado o material excedente em uma proveta. Para o material quitinoso e o farelo de trigo a CR foi de (1:5), ou seja, 1 g de amostra para 5 mL de água destilada, totalizando 6g de amostra.

Para a realização da fermentação com a *B. bassiana*, *B. thuringiensis* e *C. cellulans*, o material quitinoso foi umedecido com água destilada na quantidade indicada pelo CR para 9 g da mistura foram transferidos para Erlenmeyers de 125 mL. Os frascos foram autoclavados a 121°C por 15 minutos e, após resfriados, foram inoculados com 2 cilindros de ágar (0,6 cm de diâmetro) com a superfície completamente recoberta pelos microrganismos, com os respectivos tempos de incubação apresentados na tabela 2, sendo que a extração de metabólitos extracelulares produzidos pelos microrganismos teve início apenas após o crescimento visível por todo o substrato.

Tabela 2 – Tempo de incubação para cada microrganismos.

<b>Microrganismo</b>	<b>Tempo de Fermentação (h)</b>
<i>B. bassiana</i>	120, 168 e 240
<i>B. thurigiensis</i>	240, 288 e 312
<i>C. cellulans</i>	240, 288 e 312

#### **4.5 Extração das enzimas celulares**

A extração das enzimas extracelulares foi realizada adicionando-se 25 mL de água destilada aos meios de cultivo, o qual foi homogeneizado com bastão de vidro e submetido à agitação de 100 rpm por 20 min a 28 °C. O extrato foi então filtrado em filtro a vácuo para remoção de sólidos. O filtrado denominou-se de extrato enzimático bruto (EEB) o qual foi mantido a -18 °C até o momento das análises.

#### **4.6 Quantificação da atividade proteolítica nos extratos enzimáticos**

A atividade de protease foi determinada utilizando como substrato da reação enzimática a azocaseína, de acordo com Charney e Tomarelli (1947), com modificações.

A mistura reacional contendo 0,5 mL de azocasein (Sigma) 0,5 % (m:v), pH 5,0, e solução enzimática, diluída, em tampão acetato pH 5 foi incubada por 20 minutos a 50 °C. A reação foi, então, paralisada com a adição de 0,5 mL de TCA 10 % (m:v) e o tubos de ensaio centrifugados a 8.000 x g por 15 min, 20 °C. Uma alíquota de 1,0 mL do sobrenadante foi, então, neutralizado com 1,0 mL de KOH 5 M. Uma unidade de atividade enzimática (U) definiu-se como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância a 428 nm de 0,01 nas condições experimentais.

#### **4.7 Quantificação da atividade quitinolítica nos extratos enzimáticos**

Para a quantificação da atividade quitinolítica foi utilizado o método de quantificação de açúcares redutores após hidrólise da quitina coloidal, de acordo com Schmaltz (2020), com modificações. A reação enzimática foi realizada em tubos de 5 mL contendo 500 µL de solução 1 % (m:v) de quitina coloidal em tampão acetato pH 5,0, aclimatado por 2 min a 40 °C e adicionado de 500 µL de extrato enzimático diluído adequadamente no mesmo tampão. A reação foi incubada por 90 min a 40 °C e interrompida em banho de gelo. Foi realizado um branco para cada extrato, sendo que os brancos não foram incubados, sendo diretamente submetidos ao método de quantificação de açúcares redutores.

Para a quantificação do teor de açúcares redutores liberados na reação de hidrólise enzimática, foi utilizado o método do DNS (MILLER, 1959), com adaptações. Em tubos de 5 mL, 190 µL de solução DNS foram misturadas com a alíquota de 190 µL da reação enzimática paralisada e submetidos a ebulição por 5 minutos, sendo a reação interrompida em banho de gelo, Em seguida, 1,2 mL de solução de tartarato de sódio e potássio foi adicionada e, por fim, foi feita a leitura de absorvância a 540 nm. As análises foram realizadas em triplicatas. A concentração de açúcares redutores foi calculada utilizando uma curva analítica, sendo o resultado expresso em glicose equivalente.

#### **4.8 Caracterização do material quitinoso e do farelo de trigo**

A composição centesimal do material quitinoso e do farelo de trigo foram avaliadas de acordo com os métodos de análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz (2008).

A umidade foi determinada pelo método de secagem em estufa a 105°C. Foi pesado 5 g de amostra em cápsulas de porcelana previamente limpas e secas. As amostras foram deixadas na estufa por 24 h. Após determinação da umidade, pesou-se 1 g de amostra que foi carbonizada em bico de Bunsen e incinerada à 550 °C por 6 h e o teor de cinzas foi quantificado.

O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método de micro Kjeldahl. O catalisador utilizado foi composto de sulfato de cobre e sulfato de sódio. A digestão foi realizada em 0,2 g de amostra a 400 °C (utilizando uma rampa de aumento gradativo de temperatura), sendo 100 °C por 20 min e 300 °C por 20 min. A destilação foi realizada em aparelho micro-Kjeldahl utilizando NaOH 40 % e a amônia formada foi coletada com ácido bórico 4 % contendo indicador de pH misto. O material foi titulado com ácido clorídrico 0,1 M até o ponto de viragem. A quantidade de nitrogênio total foi então calculada pela equação 1. Foi feito um branco sem a amostra. A quantidade de nitrogênio total foi, então, calculada e a quantidade de proteína foi estimada utilizando o fator de conversão de 4,38 para o MQ, valor ideal para matrizes com elevada quantidade de compostos nitrogenados não proteicos (Furlani et al., 2005) e de 5,70 para o farelo de trigo (Adolfo Lutz, 1985).

$$\%Proteínas = \frac{(V_{amostra} - V_{branco}) \times 0,14 \times f_{HCl}}{Massa_{amostra}} \quad \text{eq.[1]}$$

O teor de lipídeos foi determinado utilizando um extrator Soxhlet. Desta forma, 5g de material foi transferida para um papel filtro desengordurado. Em seguida, foi feito o procedimento de extração dos lipídios com hexano por 4 h. Após a eliminação do solvente residual em estufa, os frascos do extrator Soxhlet foram pesados e o cálculo feito de acordo com a equação 2.

$$\%Lipídios = \frac{Massa_{final} - Massa_{inicial} \times 100}{Massa_{amostra}} \quad \text{eq.[2]}$$

O teor de carboidratos totais foi determinado por diferença dos demais componentes analisados, seguindo a equação 3.

$$Carboidratos_{totais} = 100\% - \%proteínas - \%lipídios - \%cinzas \quad \text{eq.[3]}$$

#### 4.9 Quantificação dos microrganismos

A contagem de esporos para o *B. thurigiensis* foi executada conforme a metodologia proposta por Monnerat *et al.* (2020), com algumas modificações. Para isso, uma alíquota de 1 mL da amostra, sem diluição, foi transferida para um tubo Eppendorf. Esse tubo foi submetido a um choque térmico, sendo incubado em banho-maria a 80 °C por 12 min, seguido de resfriamento em banho de gelo por 5 min. Esse processo teve como objetivo eliminar as células vegetativas, mantendo somente os esporos. Posteriormente, a amostra foi submetida a diluições decimais seriadas em tubos contendo água destilada estéril. Foram, então, semeados 100 µL da diluição apropriada em duas placas de Petri contendo Ágar Nutriente. As placas foram incubadas em estufa a 28 °C por um período de 48 h, após o qual as unidades formadoras de colônias foram contadas e calculado a quantidade de unidades formadoras de colônia por mL de extrato.

No caso da *C. cellulans*, a mesma abordagem metodológica foi aplicada, com a exceção da etapa de choque térmico.

Para a avaliação da contagem de esporos da *B. bassiana*, foi realizada a contagem de esporos em câmara de Neubauer. Uma alíquota de 100 µL da amostra foi combinada com 100 µL de solução azul de algodão com lactofenol de Amann em um tubo Eppendorf. A homogeneização do conteúdo foi realizada, e uma alíquota dessa mistura foi retirada usando um capilar. A extremidade do capilar, contendo a solução, foi aplicada delicadamente na borda da lamínula, que por sua vez cobria uma área demarcada na câmara de contagem de Neubauer. Cuidadosamente, preencheu-se todo o espaço demarcado. Posteriormente, a área demarcada da câmara de contagem foi focalizada sob um microscópio óptico para a realização da contagem e posterior cálculo da quantidade de esporos por mL de extrato.

#### 4.10 Análise estatística

Os dados obtidos foram apresentados pela média e respectivo desvio-padrão e foram analisados através da ANOVA e teste Tukey de comparação de médias, com 95% de confiança, utilizando software R versão 4.1.0.

## 5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

### 5.1. Caracterização do material quitinoso e do farelo de trigo

A tabela 3 apresenta o resultado obtido da composição centesimal média do material quitinoso não fermentado de BSF.

Tabela 3 – Composição centesimal média do material quitinoso de BSF e do farelo de trigo em base seca.

	<i>Material Quitinoso</i> % (base seca) <sup>1</sup>	<i>Farelo de trigo</i> % (base seca) <sup>2</sup>
<i>Proteínas</i>	26,17 ± 0,15	19,15±0,30
<i>Lipídios</i>	3,37 ± 0,10	2,48±050
<i>Cinzas</i>	4,26 ± 0,09	5,17±016
<i>Carboidratos</i>	66,20	73,20

<sup>1</sup>fator de conversão de 4,38 (Furlani *et al.*, 2005).

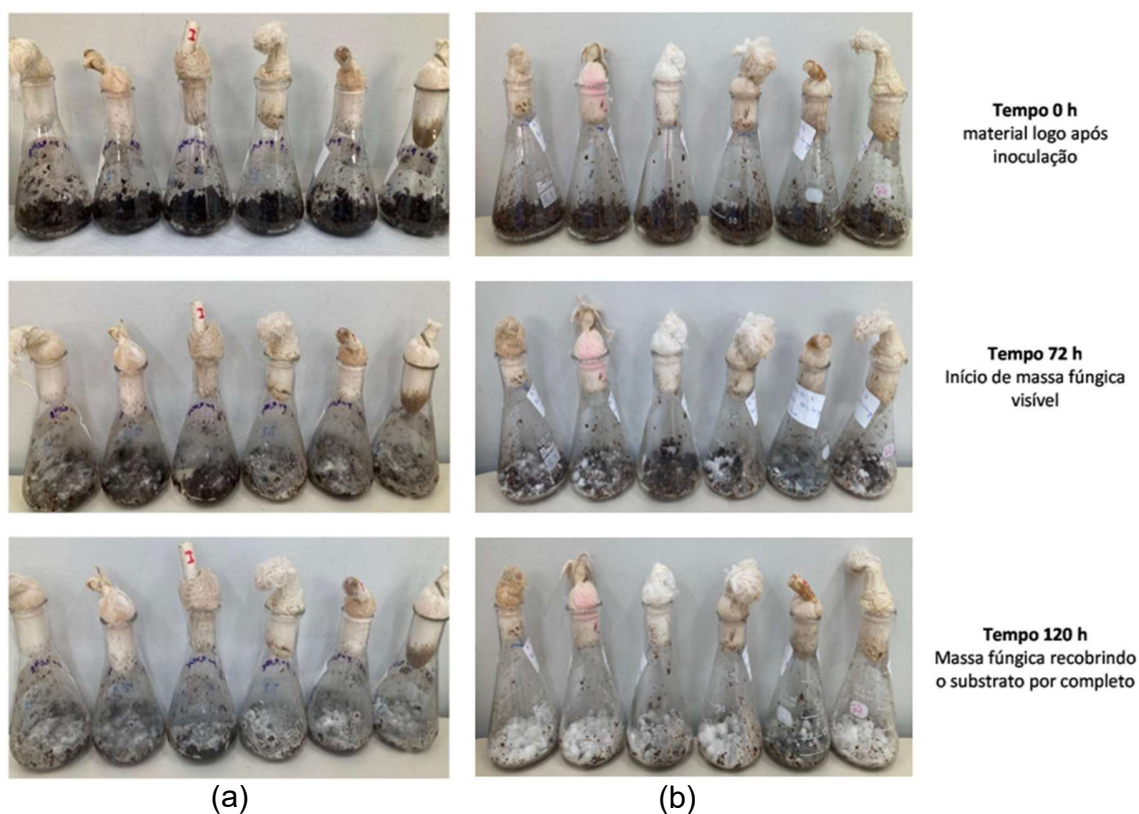
<sup>2</sup>fator de conversão de 5,7 (Adolfo Lutz, 1985).

Através da análise de composição centesimal, fica evidente que os materiais avaliados apresentam concentração significativa de carboidratos em sua composição, sendo que no material quitinoso esses carboidratos se constituem principalmente de quitina enquanto para o farelo trata-se principalmente de amido e fibras. Quanto às proteínas, o teor dos materiais também é elevado, sendo assim observado que os meios de cultivo apresentaram bom quantitativo de nutrientes, embora com disponibilidades à degradação pelos microrganismos diferentes.

### 5.2. Obtenção dos extratos enzimáticos

A figura 7 ilustra a fermentação do material quitinoso residual da produção de BSF e a fermentação do material quitinoso residual com farelo de trigo, por *B. bassiana*.

Figura 7 – (a) Fermentação de material quitinoso residual proveniente da produção de BSF por *B. bassiana* e (b) Fermentação de material quitinoso residual proveniente da produção de BSF com farelo de trigo por *B. bassiana*, em períodos anteriores à extração de enzimas extracelulares.



Notou-se que não ocorreu uniformidade no crescimento dos fungos entre os frascos, indicando que as variações no processo podem ser consideráveis. O crescimento do fungo embora tenha ocorrido, foi inferior ao observado em outros substratos para fermentação em estados sólido, como o arroz, conforme apresentado por Vidotto *et al.* (2022) que comparou dois meios de cultura aplicados na produção de *B. thuringiensis* para uso na agricultura e obteve como resultado elevada esporulação de *B. thuringiensis*, com contagem de esporos de  $5,95 \cdot 10^8$  UFC/mL.



### 5.3. Quantificação de proteases nos extratos enzimáticos brutos

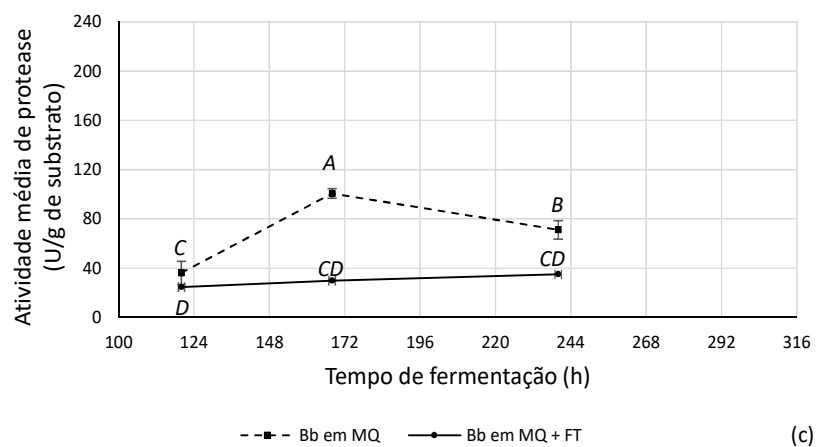
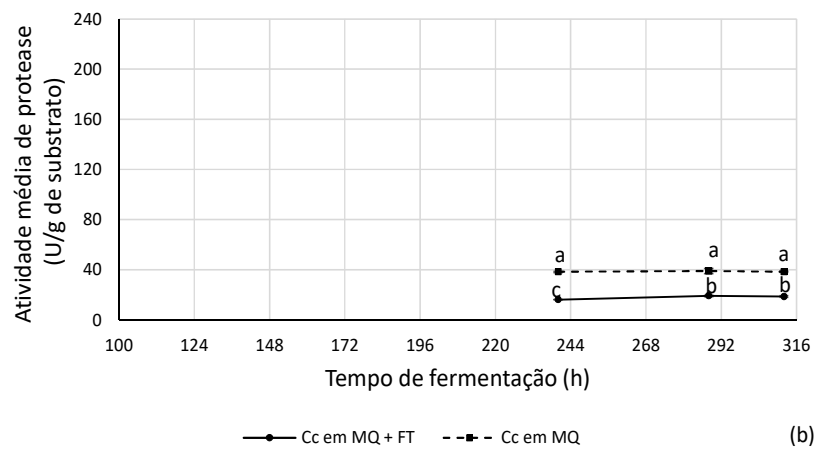
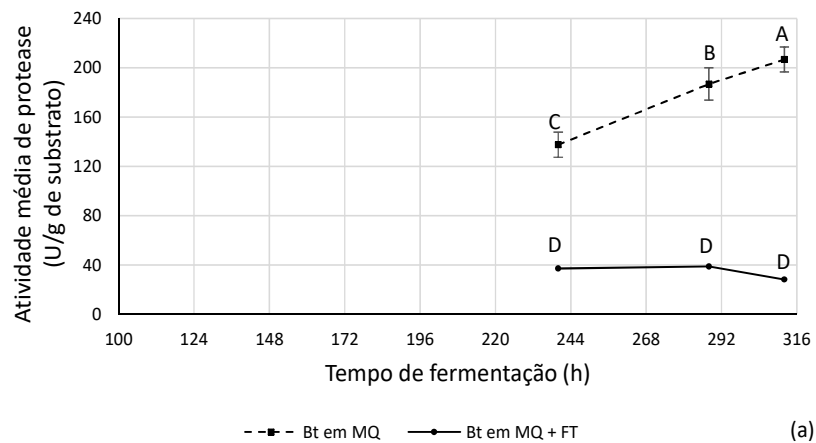
A figura 8 apresenta o resultado da atividade de proteases obtida através da fermentação do material quitinoso de BSF em comparação com acrescido de farelo de trigo para as três linhagens de microrganismos estudadas. Como o crescimento visual dos microrganismos foi distinto, os tempos de extração foram diferentes.

O *B. thuringiensis* atingiu a maior atividade média de proteases após 316 h de fermentação em material quitinoso, e sua atividade estava ainda se elevando, sugerindo que a produção enzimática poderia continuar. Em contraste, a *B. bassiana* alcançou seu pico de atividade média de protease em torno de 172 h em material quitinoso, porém depois desse ponto, a atividade declinou.

A *C. cellulans* demonstrou uma atividade média de protease constante, tanto em material quitinoso de BFS quanto em material quitinoso acrescido de farelo de trigo, sem diferenças significativas ao longo dos tempos de amostragem e inferiores aos valores dos outros microrganismos.

Quando consideramos a fermentação do material quitinoso de BFS com adição de farelo de trigo, observamos que tanto a linhagem de *B. thuringiensis* quanto a *B. bassiana* tiveram curvas com variações sutis em comparação à fermentação exclusiva com material quitinoso.

Figura 8 – Atividade de protease média (unidades por grama de substrato seco) ao longo do tempo de fermentação para (a) *B. thuringiensis* e (b) *C. cellulans* e (c) *B. bassiana*.



Analisando os gráficos apresentados na figura 8, fica evidente que as fermentações em material quitinoso para as três linhagens de microrganismos mantiveram atividades médias de proteases superiores às fermentações com adição de farelo de trigo. Isso sugere que, na presença de carboidratos adicionados além da quitina, os microrganismos tendem a produzir uma quantidade menor de protease, pressupondo que as fermentações exclusivas com matéria quitinosa nos meios de cultivo induzem a produção de protease.

A tabela 4, que apresenta as maiores atividades médias de protease e sua taxa de produção para cada linhagem de microrganismo nos dois substratos avaliados, evidência melhor esta diferença.

Tabela 4 – Maiores atividades médias de protease (unidades por grama de substrato seco) e taxa de produção de proteases (unidades por hora de fermentação) para cada um dos microrganismos no material quitinoso (MQ) e na mistura com farelo de trigo (MQ + FT). Letras iguais indicam que não houve diferença significativa ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey.

<i>Microrganismo</i>	<i>Substrato</i>	<i>Tempo de fermentação (h)</i>	<i>Atividade proteolítica (U/g)</i>	<i>Taxa de produção da enzima (U/h)</i>
<i>Bt</i>	MQ	312	206,7 ± 10,1 <sup>a</sup>	0,5 <sup>ab</sup>
	MQ + FT	240	37,0 ± 1,0 <sup>c</sup>	0,2 <sup>d</sup>
<i>Cc</i>	MQ	240	38,4 ± 0,9 <sup>c</sup>	0,2 <sup>cd</sup>
	MQ + FT	288	19,2 ± 0,5 <sup>d</sup>	0,1 <sup>d</sup>
<i>Bb</i>	MQ	168	100,6 ± 3,9 <sup>b</sup>	0,6 <sup>a</sup>
	MQ + FT	240	34,8 ± 1,1 <sup>c</sup>	0,4 <sup>bc</sup>

Através da tabela, podemos notar, também, que o *B. thurigiensis* apresentou o melhor resultado para a atividade de protease dentre as três linhagens, com atividade média de 206,7 U/g de substrato seco, resultado duas vezes superior ao obtido para a *B. bassiana*.

O valor da atividade proteolítica média obtida foi superior ao observado por Machado *et al.* (2022), que fermentaram farinha de *Tenebrio molitor* com *A. oryzae* e observaram atividade proteolítica de 112 U/g de substrato seco após 96h de fermentação.

#### 5.4. Quantificação da atividade quitinolítica

A atividades de quitinases não foram muito expressivas para os tempos observados. A tabela 5 apresenta os resultados das maiores atividades médias de quitinase obtidas para cada um dos microrganismos nos dois substratos avaliados.

Tabela 5 – Maiores atividades médias de quitinase (unidades por grama de substrato seco) para cada um dos microrganismos nos dois substratos avaliados. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey.

<i>Microrganismo</i>	<i>Substrato</i>	<i>Tempo de fermentação (h)</i>	<i>Atividade quitinolítica (U/g)</i>
<i>Bt</i>	MQ	312	0,19 ± 0,13 <sup>b</sup>
	MQ + FT	312	0,49 ± 0,05 <sup>a</sup>
<i>Cc</i>	MQ	-	-
	MQ + FT	288	0,27 ± 0,06 <sup>b</sup>
<i>Bb</i>	MQ	-	-
	MQ + FT	-	-

Evidencia-se que, no contexto do material quitinoso proveniente de BFS, a *C. cellulans* não manifestou atividade quitinolítica. A *B. bassiana* não demonstrou atividade em nenhum dos dois substratos investigados. Por outro lado, o *B. thuringiensis* exibiu uma atividade discreta nos dois substratos testados após 312 h de fermentação, enquanto o *C. cellulans* apresentou uma atividade leve na fermentação do material quitinoso misturado com farelo de trigo no tempo de fermentação de 288 h.

Dentre as condições experimentais, a atividade mais notável observada foi de 0,49 U/g, obtida pelo *B. thuringiensis*. Schmaltz (2020) avaliou a produção de quitinases por *B. bassiana* em cultivo submerso assistida por ultrassom e observou a produção de 1,43 U/mL após 72 h de cultivo.

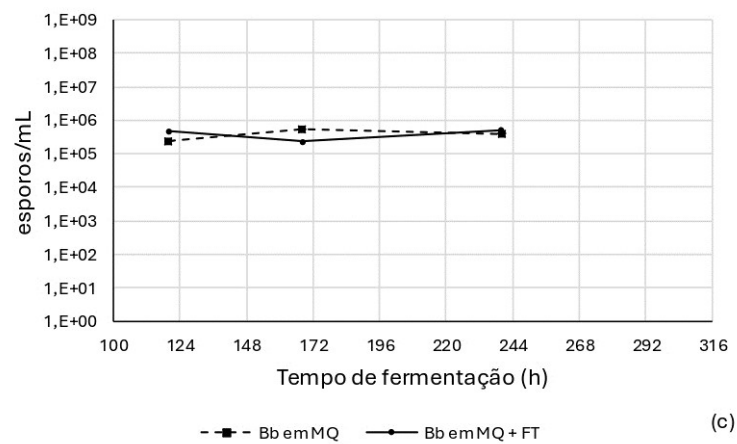
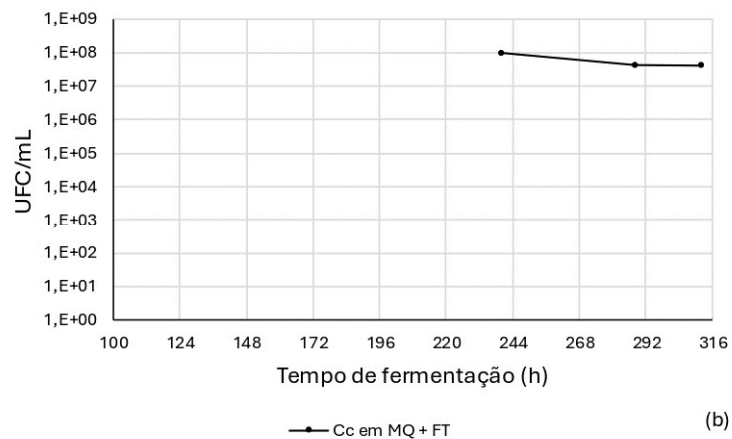
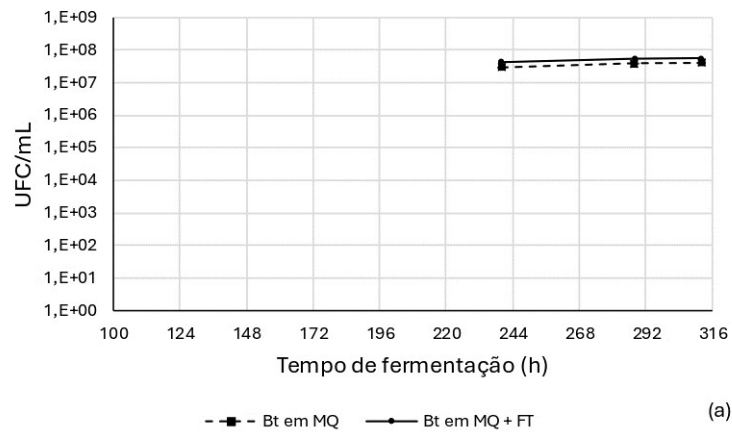
Há a necessidade de avaliar se a produção de quitinase acontece no início do crescimento do microrganismo, para que ele consiga utilizar os carboidratos e depois do esgotamento dos carboidratos haja a produção intensa de proteases.

As proteases são enzimas que atuam na hidrólise de ligações peptídicas (Nascimento *et al.*, 2021) e com o aumento significativo da produção de protease, elas podem ter atuado sobre as enzimas quitinolíticas, afetando sua atividade.

#### **5.5. Quantificação de microrganismos nos extratos das fermentações**

A figura 9 apresenta os resultados obtidos na quantificação de microrganismos para as três linhagens nos dois substratos avaliados.

Figura 9 – Contagem de unidades formadoras de colônias médias por mL de extrato enzimático bruto para (a) esporos de *B. thurigiensis* e (b) *C. cellulans*; contagem de esporos médios por mL de extrato enzimático bruto para (c) *B. bassiana*.



Observou-se que tanto o *B. thuringiensis* quanto a *B. bassiana* apresentaram esporulação em suas condições experimentais, demonstrando variações mínimas entre os dois tipos de substratos, alcançando concentrações na ordem de  $10^7$  UFC/mL e  $10^5$  UFC/mL, respectivamente. Isso sugere que ambos os microrganismos conseguiram crescer em ambos os substratos.

Vidoto *et al.* (2022) apresentou contagem de esporos para o *B. thuringiensis* de  $5,95 \cdot 10^8$  UFC/mL por fermentação em estado sólido, utilizando como substrato o arroz, indicando maior esporulação do microrganismo em meios mais nutritivos.

Em relação ao *C. cellulans* foi observada uma contagem significativa de unidades formadoras de colônias, com concentração na ordem de  $10^7$  UFC/mL para o meio contendo quitina acrescida de farelo de trigo. Para o meio exclusivamente quitinoso não foi registrada nenhuma contagem.

## 6 CONCLUSÃO

Conclui-se que a maior atividade proteolítica foi obtida pelo *B. thuringiensis* com atividade média de  $206,7 \pm 10,1$  U/g e o menor produtor foi o *C. cellulans* com atividade média de  $38,4 \pm 0,9$  U/g, em material exclusivamente quitinoso. A maior produção de quitinase foi obtida em material quitinoso acrescido de farelo, sendo  $0,49 \pm 0,05$  U/g para *B. thuringiensis*, enquanto *B. bassiana* não apresentou resultados para quitinase. Desta forma, o material quitinoso residual pode ser aplicado para obtenção de extratos fermentados com atividade proteolítica e contagem significativa de microrganismos de interesse para agricultura, e há a necessidade de mais estudos para verificar a produção de quitinase, visto a pequena atividade registrada.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, Jackeline de Paula Santana de Andrade. **Produção e caracterização de enzimas quitinolíticas produzidas pelo fungo *Trichoderma asperellum* e sua aplicação no biocontrole do carrapato *Rhipicephalus microplus* e do inseto *Aedes aegypti***. 2020. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2020. Disponível em: <Produção e caracterização de enzimas quitinolíticas produzidas pelo fungo *Trichoderma asperellum* e sua aplicação no biocontrole do carrapato *Rhipicephalus microplus* e do inseto *Aedes aegypti* (ufg.br)>.

ANVISA. **Anvisa divulga número de produtos de base biológica aprovados em 2022 para uso na agricultura**. ANVISA, 12 de jan. 2023. Disponível em: < Anvisa divulga número de produtos de base biológica aprovados em 2022 para uso na agricultura — Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa (www.gov.br)> Acesso em:15/10/2023.

AZEVEDO, V. V. C; CHAVES, S.A.; BEZERRA, D.C.; LIA-FOOK, M.V.L.; COSTA, A.C.F.M. **Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais**. Revista Eletrônica de Materiais e Processos, v. 2 n.3, p. 27-34, 2007.

BALDONI; Daiana Bortoluzzi. **Prospecção de fungos para produção de quitinases por fermentação em estado sólido**. 2016. 84 f. Dissertação (Doutorado) – Curso: Ciência do Solo, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2016. Disponível em: < BALDONI, DAIANA BORTOLUZZI.pdf (ufsm.br)>.

BALDONI, Daiana Bortoluzzi; ANTONIOLLI, Zaida Inês., MAZUTTI, Márcio Antônio. *et al.* **Chitinase production by *Trichoderma koningiopsis* UFSMQ40 using solid state fermentation**. Brazilian Journal of Microbiology, v. 51, p. 1897–1908, 2020. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00334-w>.

BARRAGÁN-FONSECA, Katherine Y.; NURFIKARI, Azkia; VAN DE ZANDE, Els M. *et al.* **Insect frass and exuviae to promote plant growth and health**. Trends in Plant Science, v. 27, n. 7. p. 646-654, 2022.



BARRONCAS, Jéssica Ferreira. **Proteases e quitinases de fungos anamórficos de insetos da Amazônia com uso potencial em biocontrole**. 2013. 64 f. Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013. Disponível em: < TEDE: Proteases e quitinases de fungos anamórficos de insetos da Amazônia com uso potencial em biocontrole (ufam.edu.br)>

BHATTACHARYA, S.; DAS, A.; SAMADDER, S. *et al.* **Biosynthesis and characterization of a thermostable, alkali-tolerant chitinase from *Bacillus pumilus* JUBCH08 displaying antagonism against phytopathogenic *Fusarium oxysporum***. 3 Biotech, v. 6, n. 1, p. 87, 2016. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0406-x>

BECHELENI, Franciyelli Regina Costa; SALES, Mariana Lázaro; CAMPOLINO, Mariana Lourenço. **Aplicação biotecnológica da bactéria *Bacillus thuringiensis* no controle biológico da lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda***. Revista Brasileira de ciências da Vida, v. 5, n. 1, 2017.

BELLAAJ, Olfa Ghorbel; MANNI, Laila; JELLOULI, Kemel; HMIDET, Noomen. *et al.* **Optimization of protease and chitinase production by *Bacillus cereus* SV1 on shrimp shell waste using statistical experimental design. Biochemical and molecular characterization of the chitinase**. Annals of Microbiology, v. 62, p. 1255-1268, 2011. [10.1007/s13213-011-0371-x](https://doi.org/10.1007/s13213-011-0371-x).

BETTIOL, Wagner; de MEDEIROS, Flávio H. V. **Como o Brasil se tornou o maior produtor e consumidor de produtos de biocontrole**. Embrapa Meio Ambiente, 2023. Disponível em: < Artigo: Como o Brasil se tornou o maior produtor e consumidor de produtos de biocontrole - Portal Embrapa> Acesso em: 02/10/2023.

BIOMED. **Aula controle biológico**. Universidade Federal do Paraná, 2013. Disponível em: < pH (ufpr.br)> Acesso em: 26/08/2023.

BORGES, Larissa Rolim; LAZZARI, Sônia Maria Noemberg; ARRIAGADA, Livia Rolim Borges-Arriagada; IEDE, Edson Tadeu. **Eficácia de *Beauveria bassiana* para o controle biológico de *Hedypathes betulinus* em erva-mate, *Ilex paraguariensis***. Floresta, Curitiba, PR, v. 41, n. 2, p. 313-320, 2011.

BRAVO, Alejandra; SARJEET, S. Gill; SOBERÓN, Mario. **Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control**. *Toxicon*, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>.

BRIGHENTI, Deodoro Magno; CARVALHO, César Freire; CARVALHO, Geraldo Andrade; BRIGHENTI, Carla Regina G. **Eficiência do *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) no controle da traça da cera *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae)**. *Ciencia e Agrotecnologia - CIENC AGROTEC*, v. 29, n. 1, p. 60-68, 2005.

CAMPOS, Alex Machado. **Relatório processo nº 25351.922252/2023-37**. ANVISA, 2023. Disponível em: < processo-25351922252202337 (www.gov.br)> Acesso em: 15/10/2023.

CAPALBO, Deise M. F.; de SÁ, Luiz Alexandre Nogueira. **CONTROLE BIOLÓGICO NO BRASIL – Avanços, desenvolvimento, recomendações**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2006.

CHAIHARN, Mathurot, LUMYONG, Saisamorn, HASAN, Najmul *et al.* **Solid-state cultivation of *B. thuringiensis* R 176 with shrimp shells and rice straw as a substrate for chitinase production**. *Annals of Microbiology*, v. 63, p. 443–450, 2013. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0488-6>

CHARNEY, Jesse; TOMARELLI, Rudolph M. **A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice**. *Journal Biological Chemistry*, v. 170, p. 501-505, 1947.

CHAVEZ, Maria. **The sustainability of industrial insect mass rearing for food and feed production: zero waste goals through by-product utilization**. *Current Opinion in Insect Science*, v. 48, p. 44-49, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2021.09.003>.

CORAGEM, Rafaela Dourado. **Produção de quitinase por fungos do gênero *Trichoderma***. 2023. 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas com

ênfase em Ciências Ambientais) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023. Disponível em: <TCC Rafaela Dourado Coragem.pdf (ufpe.br)>.

COSTA-NETO, Eraldo Medeiros. **Insetos como fontes de alimentos para o homem: Valoração de recursos considerados repugnantes**. INCI, Caracas, v. 28, n. 3, p. 136-140, 2003.

CROPLIFE. **Cresce a adoção de produtos biológicos pelos agricultores brasileiros**. CropLife Brasil, 03 de jul. de 2021. Disponível em: < Cresce a adoção de produtos biológicos pelos agricultores brasileiros - (croplifebrasil.org)> Acesso em: 02/10/2023

DALZOTO P. R.; UHRY K. F. **Controle biológico de pragas no Brasil por meio de *Beauveria bassiana* (BALS.) Vuill.** *Biológico*, São Paulo, v. 71, n. 1, p. 37-41, 2009.

da SILVA, Maria Luiza Ribeiro Bastos. **Avaliação bioquímica da diversidade genética de linhagens de *Chromobacterium violaceum* e caracterização molecular do gene de quitinase**. 2007. 132 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007. Disponível em: < RI UFPE: Avaliação bioquímica da diversidade genética de linhagens de *Chromobacterium violaceum* e caracterização molecular do gene de quitinase>.

de CASTRO, Ruann Janser Soares; ABREU, Rosa Ferreira Araújo; PINTO, Gustavo Adolfo Saavedra. **Estudos das condições de Recuperação de proteases produzidas por fermentação semi-sólida**. XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Natal, RN, 2009.

de CASTRO, Ruann Janser Soares; OHARA, André; AGUILAR, Jessika G. dos Santos; DOMINGUES, Maria A. Fontenele **Nutritional, functional and biological properties of insect proteins: processes for obtaining, consumption and future challenges**. *Trends in Food Science & Technology* v. 76, p. 82-89, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.04.006>

de CASTRO, Ruann Janser Soares; OHARA, André; NISHIDE, Tânia Goia. *et al.* **A new approach for proteases production by *Aspergillus niger* based on the kinetic and**

**thermodynamic parameters of the enzymes obtained.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology v.4, n.2, p. 199-207, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.04.006>

de CASTRO, Ruann Janser Soares; PINTO, G.A.S. **Estudo comparativo da produção de protease por *Aspergillus oryzae* em fermentação semi-sólida utilizando tortas de girassol.** Anais do XVII Simpósio nacional de bioprocessos, Natal, RN, 2009.

ELAWATI, N. E.; PUJIYANTO, S.; KUSDIYANTINI, E. **Produção de quitinase extracelular de *Beauveria bassiana* sob condições de fermentação submersa.** Journal of Physics, conf. Série 1025, 2018.

FAO, 2015. A contribuição dos insetos para a segurança alimentar, subsistência e meio ambiente. Available at: <http://www.fao.org/docrep/018/i3264e/i3264e00.pdf>.

FARIA, Marcos; MAGALHÃES, B.P. **O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil.** Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, v. 22, p. 18-21, 2001.

FERNANDES, E. G.; VALÉRIO, H. M.; FELTRIN, T.; SAND, S. T. V. D. **Variability in the production of extracellular enzymes by entomopathogenic fungi grown on different substrates.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 43, n. 2, p. 827–833, 2012.

FERRACINI-SANTOS, Luciana; SATO, Hélia H. **Production of Alkaline Protease from *Cellulosimicrobium cellulans*.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 40, p. 54-60, 2009.

FLEURI, Luciana Francisco; SATO, Hélia Harumi. **Estudo da influência de diferentes parâmetros na produção de enzimas líticas.** Ciência e Tecnologia de alimentos, v. 28, n. 2, p. 299-310, 2008.

FLEURI, Luciana Francisco; SATO, Hélia Harumi. **Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas.** Química Nova, v. 28, n. 5, p. 871–879, 2005.

FLEURI, Luciana Francisco; KAWAGUTI, Haroldo Y.; SATO, Hélia H. **Production, purification and application of extracellular chitinase from *Cellulosimicrobium cellulans* 191.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 40, n. 3, p. 623–630, 2009. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000300026>

FONTES, Eliana Maria Gouveia; VALADARES-INGLIS, Maria Cleria. **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2020. 510p.

GALZER, Elisângela; AZEVEDO-FILHO, Wilson. **Utilização do *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas**. Revista Interdisciplinar de Ciência Aplicada, v. 1, p. 13-16, 2016.

GOLDENBERG, C. S.; DUMAS, V. F.; MELO, F. R.; MARTINS E. S.; PRAÇA, L. B.; MONNERAT, R. G. **Avaliação da atividade quitinásica e celulásica de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas a *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatilis***. Anais do X Simpósio de controle biológico, Brasília, DF, 2007.

GUIMARÃES, J. R.; CORDEIRO, L. S.; ARAÚJO, E. C. O.; SILVA, I. R.; GONÇALVES, R. J. S. **Seleção de fungos filamentosos do bioma caatinga para a produção de quitinase**. XII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, p. 1145-1150, 2017. 10.5151/chemeng-cobeqic2017-209.

HALFELD-VIEIRA, B.A.; MARINHO-PRADO, J.S.; NECHET, K.L.; MORANDI, M.A.B.; BETTIOL, W. **Defensivos agrícolas naturais: uso e perspectivas**. Brasília, DF: Embrapa, 2016.

HAHN, T.; TAFI, Elena; PAUL, A.; SALVIA, R.; FALABELLA, P.; ZIBEK, S. **Current state of chitin purification and chitosan production from insects**. J Chem Technol Biotechnol, v. 95, p. 2775-2795, 2020. <https://doi.org/10.1002/jctb.6533>

HARRISON, Robert L.; BONNING, Bryony C. **Proteases as Insecticidal Agents**. Toxins 2010, 2, 935-953. <https://doi.org/10.3390/toxins2050935>

IRITI, Marcello; FAORO, Franco. **Chitosan as a MAMP, searching for a PRR**. Plant Signaling & Behavior, v. 4, n. 1, p. 66-68, 2009. <https://doi.org/10.4161/psb.4.1.7408>

LARIO, Luciana Daniela; PILLACA-PULLO, Omar Santiago; SETTE, Lara Durães; CONVERTI, Attilio. *et al.* **Optimization of protease production and sequence analysis of the purified enzyme from the cold adapted yeast *Rhodotorula mucilaginosa***

**CBMAI** 1528, Biotechnology Reports, v. 28, 2020.  
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00546>.

LEE, Dan-Hsin; DOAN, Chien Thang; TRAN, Thi Ngoc; NGUYEN, Van Bon. *et al.* **Proteases Production and Chitin Preparation from the Liquid Fermentation of Chitinous Fishery By-Products by *Paenibacillus elgii***. *Marine drugs*, v. 19, n. 9, p. 477, 2021. <https://doi.org/10.3390/md19090477>

LEITE, M. S. P.; PENTEADO, S. R. C.; DE OLIVEIRA, S. **Eficiência do fungo *Beauveria bassiana* (BALS.) Vuill. no controle de *Hedypathes betulinus* (KLUG, 1825) (COLEOPTERA: CERAMBYCIDAE), em campo**. Embrapa Florestas, 2003.

LIMA; Emmly Ernesto. **Produção, Caracterização, Bioquímica de Proteases Produzidas por Fungos Filamentosos e Aplicação Biotecnológica**. 2016. 92 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2016. Disponível em: < Dissertação-final-Emmly.pdf (ufms.br)>.

LIN Y-S, LIANG S-H, LAI W-L, LEE J-X, WANG Y-P, LIU Y-T, WANG S-H, LEE M-H. **Sustainable Extraction of Chitin from Spent Pupal Shell of Black Soldier Fly**. *Processes*; v. 9, n. 6, p. 976, 2021. <https://doi.org/10.3390/pr9060976>

LOGUERCIO, L. L.; CARNEIRO, N. P.; CARNEIRO, A. A. **Milho Bt - alternativa biotecnológica para controle biológico de insetos-praga**. *Biociência*, v. 24, p. 46-52, 2002.

LORENCETTI, Grasielle A. Toscan; POTRICH, Michele; MAZARO, Sergio Miguel; LOZANO, Everton Ricardi. *et al.* **Eficiência de *Beauveria bassiana* VUILL. e *Isaria sp.* para o controle de *Thaumastocoris peregrinus* Carpinteiro & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae)**. *Ciência Florestal*, v. 28, 2018.  
<https://doi.org/10.5902/1980509831612>

MACHADO, J.; PORFÍRIO, J.C.; KOIKE, M.A.; BAGAGLI M.P. **Antioxidant activity of *Gryllus assimilis* meal hydrolysed by *Aspergillus oryzae* proteases.** Journal of Insects as Food and Feed, 2022.

MARTÍNEZ-ZAVALA, S.A.A.; BARBOZA-PÉREZ, U.E.; HERNÁNDEZ-GUZMÁN G.; BIDESHI DENNIS K., BARBOZA-CORONA, J. E. **Chitinases of *Bacillus thuringiensis*: Phylogeny, Modular Structure, and Applied Potentials.** Frontiers in Microbiology, 10, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03032>

NACHTIGAL, Gláucia de Figueiredo; GONÇALVES, Rafael da Silva; NORBERG, Sandro Daniel; NAVA, Dori Edson. **Criação de insetos: fonte de soluções sustentáveis para a agricultura e pecuária.** Alternativas para Diversificação da Agricultura familiar de Base Ecológica, 2022.

NAGPURE, Anand; CHOUDHARY Bharti, GUPTA Rajinder K. **Chitinases: in agriculture and human healthcare.** Crit Rev Biotechnol, v. 34, n. 3, p. 215-32, 2014. DOI: 10.3109/07388551.2013.790874.

Do NASCIMENTO, Maria Clara; ALENCAR, Viviane do Nascimento e Silva; NASCIMENTO, Thiago Pejaú *et al.* **Proteases e suas aplicações biotecnológicas nas indústrias alimentícias.** CIAGRO - Congresso Internacional da Agroindústria, 2021. DOI: <https://doi.org/10.31692/IICIAGRO.0076>

NIGLIO, Fabiana Sabadini Rezende; GERMER, Silvia Pimentel Marconi. **Insetos: a proteína do mundo sustentável.** SciELO em Perspectiva | Press Releases, 2022. Disponível em: <<https://pressreleases.scielo.org/blog/2022/07/08/insetos-a-proteina-do-mundo-sustentavel/>>.

NOWAKOWSKI, Abby C.; MILLER, Abbey C.; MILLER, M. Elizabeth; XIAO, Hang; WU, Xian. **Potential health benefits of edible insects, Critical Reviews in Food Science and Nutrition,** v. 62, n.13, p. 3499-3508, 2022. DOI: 10.1080/10408398.2020.1867053

TARIQ, Moh; KHAN, Amir; ASIF, Mohd; KHAN, Faryad; ANSARI, Taruba *et al.* **Biological control: a sustainable and practical approach for plant disease**

**management.** Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science, v. 70, n. 6, p. 507-524, 2020. DOI: 10.1080/09064710.2020.1784262

MONNERAT, R.; MONTALVÃO, S.; QUEIROZ, E. M.; QUEIROZ, P. M.; SILVA, E. Y. Y.; GARCIA, A.; CASTRO, M.; ROCHA, G. T.; FERREIRA, A. D. C.; GOMES, A. C. M. M. Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília/DF, 2020

MÜLLER, Ludwig E. **Manual de laboratorio de fisiología vegetal.** Turrialba: Instituto Interamericano de Cooperacion para la Agricultura (IICA), 1964. 165 p.

MURAD, A. M.; LAUMANN, R. A.; LIMA, T. A.; SARMENTO, R. B. C.; NORONHA E. F.; ROCHA, T. L.; VALADARES-INGLIS, M. C.; FRANCO, O. L. **Screening of entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* isolates and proteomic analysis of secretion synthesized in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoskeleton.** Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 142, p. 365-370, 2006.

RAMÍREZ, M.Á.; RODRÍGUEZ, Aida T.; ALFONSO, L.; PENICHE, C. **Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications.** Biotecnología Aplicada, v. 27, p. 270-276, 2010.

RAVI H.K., DEGROU A., COSTIL J., TRESPEUCH C., CHEMAT F., VIAN M.A. **Larvae Mediated Valorization of Industrial, Agriculture and Food Wastes: Biorefinery Concept through Bioconversion, Processes, Procedures, and Products.** *Processes*, v. 8, n. 7, p. 857, 2020. <https://doi.org/10.3390/pr8070857>

RAVINDRAN, Rajeev; HASSAN Shady S.; WILLIAMS Gwilym A.; JAISWAL Amit K. **A Review on Bioconversion of Agro-Industrial Wastes to Industrially Important Enzymes.** Bioengineering (Basel), v.5, n. 4, p.93, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/bioengineering5040093>

ROBERTS, W.K., SELITRENNIKOFF, C.P. **Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity.** J. Gen. Microbiol, v. 134, n. 1, p. 169–176, 1988.



ROSA, M.F., SOUZA FILHO, M.S.M., FIGUEIREDO, M.C.B., MORAIS, J.P.S., SANTAELLA, S.T., LEITÃO, R.C. **Valorização de Resíduos da Agroindústria**. II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais, v.I (palestras), 2011.

RUMPOLD, Birgit A.; Oliver K. Schlüter. **Potential and challenges of insects as an innovative source for food and feed production**. Innovative Food Science & Emerging Technologies, v. 17, p. 1-11, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.11.005>.

SALA, A.; ECHEGARAY, T.; PALOMAS, G.; BOGGIONE, M.J.; TUBIO, G.; BARRENA, R. **Insights on fungal solid-state fermentation for waste valorization: Conidia and chitinase production in different reactor configurations**. Sustainable chemistry and pharmacy, 26, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100624>

SCHMALTZ, S. **Produção de enzimas hidrolíticas por *B. bassiana* em fermentação submersa assistida por ultrassom**. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2020.

SMITH, Rebecca J.; GRULA, E.A. **Chitinase is na inducible enzyme in *B. bassiana***. Journal of invertebrate pathology, v. 42, n. 3, p. 319-326, 1983. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(83\)90170-2](https://doi.org/10.1016/0022-2011(83)90170-2).

SOETEMANS, Lise; UYTTEBROEK, Maarten; BASTIAENS, Leen. **Characteristics of chitin extracted from black soldier fly in diferente life stages**. International jornal of biological macromolecules, v. 165, p. 3206-3214, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.041>

SOLIMAN, E. P.; ZACHÉ, B.; DIAS, T. K. R.; BARBOSA, L. R.; WILCKEN, C. F. **Cálculo da CL50 e TL50 de *Beauveria bassiana* para controle de percevejo bronzeado *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE)**. Embrapa Florestas, 2010. 1p.

Sujayanand, G. K.; Pandey, S.; Jagadeeswaran, R.; Dubey, J. (2019). **Chitinase: A novel biopesticide for insect and nematode pest management**. Indian Farmer v. 6, n. 9, p. 599-603.

SURENDRA, K.C.; TOMBERLIN, Jeffery K.; VAN HUIS, Arnold; CAMMACK, Jonathan A.; HECKMANN, Lars-Henrik L.; KHANAL, S.K. **Rethinking organic wastes bioconversion: evaluation the potential of the black soldier fly (*Hermetia illucens* (L.)) (Diptera: Stratiomyidae) (BSF)**. Waste management, v. 117, p. 58-80, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.07.050>

SURESH, P.V.; CHANDRASEKARAN, M. **Impact of process parameters on chitinase production by an alkalophilic marine *B. bassiana* in solid state fermentation**. Process biochemistry, v. 34, n. 257-267, 1999. [https://doi.org/10.1016/s0032-9592\(98\)00092-2](https://doi.org/10.1016/s0032-9592(98)00092-2).

VIDOTTO, J.; FERREIRA, D.; MOREIRA, V.; AGUIAR, A.; BAGAGLI, M. **Comparação entre meios de cultura aplicados na produção de bactérias *B. thurigiensis* para uso na agricultura**. CONICT - Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia, Brasil, 2022. Disponível em: <<https://ocs.ifsp.edu.br/conict/xiiiconict/paper/view/8377/2815>>. Data de acesso: 29 Aug. 2023.

VILELLA, Lucas de Marques. **Produção de insetos para uso na alimentação**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Zootecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

WIERMANN, Isabela Santos de Melo. **Metabólitos com atividade inseticidas produzidas por fungos entomopatogênicos**. 2022. 32 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Biotecnologia, Universidade Federal de São João del-Rei, São João del Rei, 2022. Disponível em: < TCC Isabela Wiermann.pdf (ufsj.edu.br)>.

ZHANG, Jie; CAI, Jingmin; WU, Ke; JIN, Shengxian; PANELA Renrui; Fan M. **Produção e propriedades da quitinase de *Beauveria bassiana* Bb174 em fermentação em estado sólido**. Ying Yong Sheng Tai Xue Bao, v. 15, n. 5, p. 863-6, 2004.

ZHANG, Shuwu; Yantai Gan, Bingliang Xu, Yingyu Xue. **The parasitic and lethal effects of *Trichoderma longibrachiatum* against *Heterodera avenae***. *Biological Control*, v. 72, p. 1-8, , 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.01.009>.