

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**Atividade enzimática micelial e conidial de isolados
de *Metarhizium anisopliae* s.l. e virulência para
*Rhipicephalus microplus***

Maria Clemente de Freitas

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**Atividade enzimática micelial e conidial de isolados de
Metarhizium anisopliae s.l. e virulência para *Rhipicephalus microplus***

Maria Clemente de Freitas

Sob a Orientação da Professora
Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt

Sob a Co-Orientação da Doutora
Mariana Guedes Camargo

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre** em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Junho de 2018

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Freitas, Maria Clemente de , 1991-

F862a Atividade enzimática micelial e conidial de isolados de
Metarhizium anisopliae s.l. e virulência para Rhipicephalus
microplus / Maria Clemente de Freitas. - 2018.

88 f.: il.

Orientadora: Vânia Ritas Elias Pinheiro Bittencourt .

Coorientadora: Mariana Guedes Camargo.

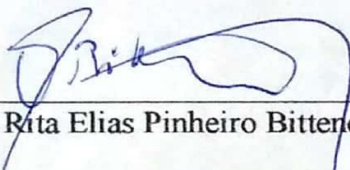
Dissertação (Mestrado). - Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Pós Graduação em Ciências Veterinárias,
2018.

1. Controle Biológico. 2. Fungos artropodopatogênicos. 3.
Rhipicephalus microplus. I. Bittencourt, Vânia Rita Elias
Pinheiro, 1959-, orient. II. Camargo, Mariana Guedes, 1985-
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Pós
Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

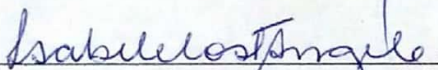
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

MARIA CLEMENTE DE FREITAS

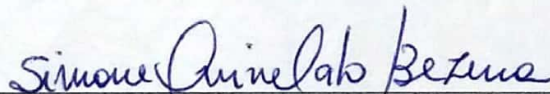
Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**
no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.



Vânia Rita Elias Pinheiro Bittercourt (UFRRJ)



Isabele da Costa Angelo (UFRRJ)



Simone Quinelato Bezerra (FIOCRUZ)

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus, muito nos aproxima.”

Louis Pasteur

**Dedico este trabalho aos meus amados pais, aos meus irmãos,
sobrinhos e a minha querida avó!**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora, meus guias e protetores, foram Eles que me ajudaram durante toda a minha caminhada, sempre me dando a força necessária para vencer cada barreira e para me manter de pé nos momentos mais difíceis.

Agradeço ao meu paizinho e a minha mãezinha, os grandes amores da minha vida, obrigada por, mais uma vez, confiarem em mim e pelo grande apoio que nunca me negaram. Obrigada meu pai por me ajudar tanto, me dando sempre o que eu mais precisava, obrigada por apoiar as minhas escolhas e se orgulhar delas, às vezes até mais do que eu. Obrigada minha mãe pelas orações, pelas palavras de sabedoria que tanto me confortaram nos momentos em que eu achava que não ia conseguir. Eu me orgulho dos senhores, e todas as minhas conquistas eu dedico a vocês.

Agradeço a minha vozinha, a senhora muito me ajudou, eu sempre tive a certeza de que nada de ruim iria me atingir, porque eu tinha um escudo de proteção formado pelas suas orações. E a cada visita que eu fazia à senhora, o seu beijo dava sentido a minha luta.

Agradeço aos meus irmãos por todo o apoio e por cuidarem dos meus pais enquanto estava ausente. Em especial gostaria de agradecer ao Zezé, a Mônica e ao Beto, vocês três sempre demonstraram um carinho tão grande e me fizeram sentir importante, sentir que valia a pena seguir nessa caminhada.

Agradeço aos meus sobrinhos, os filhos do meu coração, o amor e o respeito que vocês têm por mim me fazem querer ser cada dia melhor e assim poder ser exemplo para vocês e ajudá-los em tudo o que precisarem, em especial agradeço minhas sobrinhas Malu, meu anjo bom, com quem eu sempre posso contar pra tudo e me conhece melhor que até eu mesma, você muito me ajudou, muito mais que você imagina, me disse as palavras que eu precisava mais ouvir. Agradeço também a Mariana e Leticia, as minhas princesas, mesmo de longe vocês me trouxeram muitas alegrias e sorrisos, amo muito vocês.

Agradeço ao Henrique, e a toda sua família. Agradeço por todo seu companheirismo, apoio, amizade e amor, você me ajuda muito, me faz ser mais forte, obrigada por tudo.

Agradeço a minha orientadora, Vânia Bittencourt, a senhora me deu uma chance única e serei eternamente grata por sempre ter me tratado tão bem, obrigada por acreditar em mim.

Agradeço a todos do Laboratório de Controle Microbiano, a ajuda de vocês foi essencial para que eu pudesse concluir o mestrado. Em especial gostaria de agradecer aos que muito mais que colegas de trabalho se

tornaram meus amigos: Caio, Jéssica, Allan, Mariana, Michel, Andreia, Emily, Laura, Thais, Amanda, Julie, Ricardo, Fernanda, Taiana, Keity, Samara, Vitória, Fillipe, Didi, Simone, Patrícia e Isabele, e também a Cristiana que fez parte do LCM por um tempo, obrigada pelas brincadeiras, pelos cafés na cozinha junto ao bate papo, obrigada por fazerem meus dias menos cansativos e muito mais alegres.

Agradeço aos meus amigos, principalmente aqueles que a Rural me deu de presente: Marcela, Eveline, Paulinha, Paola, Jéssica, Tatiana, Gabriel. Mas não poderia deixar de agradecer aqueles que mesmo longe sempre se fizeram presentes: Gleice, Sehany, Matheus, Polly, vocês são anjos que Deus colocou em meu caminho.

Agradeço a toda equipe da Clínica Valverde e VetCenter, obrigada por me darem a chance de vivenciar minha profissão, sentir na pele todos os percalços que temos nessa jornada, mas também todas as alegrias que esta linda profissão nos proporciona, a ajuda de vocês foi essencial não só para o meu crescimento profissional, mas também para o meu crescimento pessoal.

Não poderia deixar de agradecer a todos os funcionários desta Instituição, principalmente aos funcionários da Estação parasitológica, em especial ao Zeca, o nosso braço forte na lida com os bezerros e ao Adonís a ajuda de vocês foi fundamental nesta realização.

Quero agradecer também aos meus amigos Boiadeiros, vocês foram excelentes companheiros, nunca me esquecerei de tudo o que aprendi com vocês, principalmente das nossas risadas, das brincadeiras, dos momentos de descontração, agradeço em especial aos professores coordenadores: Marco e Rodinelli, obrigada por toda paciência e dedicação conosco, aprendemos muito com vocês e nos espelhamos nos grandes profissionais e amigos que são. Tenho muito orgulho de ter feito parte desta família.

E por fim, agradeço aos animais, as minha filhinhas do coração, minhas três bebes: Cherry, Narizinho preto e Narizinho rosa, houveram dias que a única coisa que me fez sorrir foi lembrar de vocês. Agradeço também aos que se foram: Florzinha, Mimo e Brutus, sei que vocês são anjos no céu dos animais, sinto muito a falta de vocês. Obrigada também aos bezerros da estação experimental, sem vocês eu não teria uma dissertação, Joe, Magaiver, Negresco e Xororó, vocês foram as minhas pedras preciosas.

BIOGRAFIA

Maria Clemente de Freitas, filha de João de Freitas Clemente e Geralda Ferreira de Freitas, nascida em 18 de Setembro de 1991, em Caratinga, Minas Gerais.

Concluiu o ensino médio em 2008 e o curso Técnico Agrícola com Habilitação em Agropecuária em 2010 no Instituto Federal de Minas Gerais-Campus São João Evangelista, localizado no município de São João Evangelista- MG.

Ingressou em agosto de 2011 na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no curso de Medicina Veterinária, tendo concluído o mesmo em junho de 2016. Em junho de 2013 ingressou como estagiária no Laboratório de Controle Microbiano da mesma Universidade, sob orientação da professora Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt, tornando-se bolsista de Iniciação Científica, FAPERJ, de 2013 a 2016. Recebeu o XIV Premio Tokarnia em 2014 e o Prémio de Melhor Trabalho na XXIV Jornada de Iniciação Científica no mesmo ano.

Foi estagiária do Hospital Veterinário de Grandes Animais da UFRRJ por dois anos, 2012 e 2015 e do setor de Reprodução Animal em 2015 e 2016. Participou do Grupo de Estudos em Equinos: Equi-Rural e Grupo de estudos em Bovinos: Boiadeiros Rural desde 2014 até 2017. Participou da organização de minicursos, palestras e simpósios nessa área. Em 2015 passou em primeiro lugar no concurso para monitoria de Doenças Infecciosas, exercendo a função de monitora voluntária desde abril daquele ano até a conclusão da graduação. Em 2016 realizou o estágio curricular obrigatório em duas Instituições: Universidade Federal de Viçosa e Universidade Federal de Minas Gerais na área de clínica e cirurgia de animais de produção e clínica médica de ruminantes, respectivamente.

Em junho de 2016 iniciou o Mestrado no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Em setembro de 2017 foi contemplada com programa de Internacionalização da UFRRJ, realizando missão de estudos na Universidade de Santiago de Compostela, em Lugo-Espanha. Durante todo o período de vida acadêmica, participou de Congressos e Simpósios, tendo publicado, junto ao grupo de pesquisa, resumos e trabalhos científicos em revistas especializadas.

RESUMO

FREITAS, Maria Clemente de. **Atividade enzimática micelial e conidial de isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. e virulência para *Rhipicephalus microplus***. 2018. 73p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Metarhizium spp. é um fungo patogênico para diversos artrópodes, com utilização consolidada no controle de pragas agrícolas, sendo considerado um agente promissor no controle de carrapatos como *Rhipicephalus microplus*. O presente estudo avaliou características morfológicas, produção conidial, rendimento em meio de cultivo sólido (crescimento em arroz), virulência para fêmeas de *R. microplus* e atividades enzimáticas (proteases, Pr1, Pr2, lipases e enzimas oxidativas) de quatro isolados brasileiros de *M. anisopliae* sensu lato (s.l.) (IBCB 116, IBCB 383, IBCB 410 e IBCB 481). Os isolados foram crescidos em meio batata-dextrose-ágar (BDA) durante 15 dias, realizando a partir de então a quantificação conidial. O rendimento foi determinado a partir do crescimento em arroz e da pesagem da massa de conídios produzidos. Já a virulência foi avaliada a partir de acompanhamento dos parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* após imersão em suspensões aquosas (1×10^7 e 1×10^8 conídios mL^{-1}) de cada isolado. Para os estudos enzimáticos, extrações proteicas foram realizadas em conídios (superfície e fração intracitoplasmática) e micélios (secretado micelial e fração intracitoplasmática). Os dados paramétricos foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey e não paramétricos pelo teste de Kruskal Wallis seguido de Student-Newman-Keuls (SNK) com nível de significância de 5%. Foi observado variação na produção de conídios/cm² entre os isolados. IBCB 383 foi aquele que apresentou maior produção conidial tanto em BDA quanto em arroz, e IBCB 116 o menor produtor. Em relação à virulência, quando avaliadas a maior concentração (1×10^8 conídios mL^{-1}), IBCB 481 apresentou maior percentual de controle para fêmeas de *R. microplus* (44%) e IBCB 116 o menor percentual (14%). Quanto às enzimas, no geral, as atividades de proteases totais, Pr1, Pr2 e lipases foram superiores nos isolados mais virulentos. Em destaque, IBCB 481, quando comparado a IBCB 116, apresentou atividade de Pr1 superior em aproximadamente 2,8 vezes na superfície conidial e 2,5 vezes para o secretado micelial, além de atividade lipolítica cerca de cinco vezes superior na fração intracitoplasmática conidial. A atividade das enzimas oxidativas apresentou variações entre os isolados, corroborando os achados de virulência, IBCB 481 exibiu as maiores atividades de superóxido desmutase, catalase e peroxidase na maioria das análises. Portanto, conclui-se que a associação de estudos morfológicos com análises de virulência e caracterizações enzimáticas são ferramentas importantes a serem utilizadas na seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l., especialmente para programas visando o biocontrole do carrapato *R. microplus*.

Palavras-chave: controle biológico, fungo artropodopatogênico, carrapato dos bovinos, fator de virulência, enzimas.

ABSTRACT

FREITAS, Maria Clemente de. **Mycelial and conidial enzymatic activity of isolates of *Metarhizium anisopliae* s.l. and virulence for *Rhipicephalus microplus***. 2018. 73p. Dissertation (Master of Science). Institute of Veterinary Medicine, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Metarhizium spp. is a pathogenic fungus applied to several arthropods, being globally used for control of agricultural pests and considered a promising agent to ticks such as *Rhipicephalus microplus*. The present study assessed the macromorphology, conidial production, rice yield, virulence for engorged *R. microplus* females and enzymatic activities (proteases, Pr1, Pr2, lipases and oxidative enzymes) in four Brazilian *M. anisopliae* sensu lato (s.l.) isolates (IBCB 116, IBCB 383, IBCB 410 and IBCB 481). Fungal growth was performed in potato-dextrose-agar media (PDA) for 15 days. Descriptions of the colony and spots from media, with consequent quantification, were performed for the analysis of morphology and conidiogenesis. The yield was determined after growth in rice and conidia mass were individually weight. Virulence was evaluated by following the biological parameters of engorged *R. microplus* females after immersion in aqueous suspensions (1×10^7 and 1×10^8 conidia mL^{-1}) of each isolate. Forenzymatic activities, protein extractions were carried out in conidia (surface and intracytoplasmic fraction) and mycelia (mycelial secretion and intracytoplasmic fraction). Parametric data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test and non-parametric by Kruskal Wallis test followed by Student-Newman-Keuls (SNK) ($p < 0.05$). Differences number of conidia/ cm^2 were observed among the isolates. IBCB 383 presented the highest conidial production in both BDA and rice, while the lowest number was observed in IBCB 116. When the highest concentration (1×10^8 conidia mL^{-1}) was evaluated, IBCB 481 showed a higher control percentage for engorged *R. microplus* females (44%) and IBCB 116 again the lowest (14%). For enzymes, in general, all activities (proteases, Pr1, Pr2 and lipases) were higher in the most virulent isolates. When comparing IBCB 481 and IBCB 116, Pr1 activity was considered superior for IBCB 481 in almost 2.8 times for the conidia surface and 2.5 times for the micelial secretion, besides lipolytic activity was 5 times higher in the intracytoplasmic conidia fraction. The oxidizing activity presented variations among the isolates and in accordance with the virulence findings, formost of the analyzes, IBCB 481 exhibited the highest activities of SOD, catalase and peroxidase. Therefore, it is concluded that the association among morphological studies, virulence analysis and enzymatic characterization are important tools to be used in the selection of *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates, especially for programs aiming the biocontrol of ticks such as *R. microplus*.

Keywords: biological control, arthropodpathogenic fungus, bovine tick, virulence factor, enzymes.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Isolados brasileiros de <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l., substrato/hospedeiro de isolamento e regiões geográficas de origem.....	21
Tabela 2 -Valor médio e desvio padrão do Peso Inicial da Fêmea (P.I.F.), Peso Total da Massa de Ovos (P.T.M.O.), Percentual de Eclosão das Larvas (P.E.L.), Índice de Produção de Ovos (I.P.O.), Índice Nutricional (I.N.) e Percentual de Controle (% Controle) de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> tratadas por imersão em suspensão aquosa de 1×10^7 e 1×10^8 conídios mL^{-1} dos diferentes isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l. e mantidas a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e U.R. $\geq 80\%$	34
Tabela 3 – Média e desvio padrão da atividade de Pr1 (U/ μg) de conídios (superfície e fração intracitoplasmática conidial) e micélio (secretado e fração intracitoplasmática micelial) de isolados brasileiros de <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l. crescidos sob condições controladas de temperatura e umidade ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} \geq 80\%$).....	37
Tabela 4 – Média e desvio padrão da atividade de Pr2 (U/ μg) de conídios (superfície e fração intracitoplasmática conidial) e micélio (secretado e fração intracitoplasmática micelial) de isolados brasileiros de <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l. crescidos sob condições controladas de temperatura e umidade ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} \geq 80\%$).....	38
Tabela 5 – Média e desvio padrão da atividade lipolítica (U/ μg) de conídios (superfície e fração intracitoplasmática conidial) e micélio (secretado e fração intracitoplasmática micelial) de isolados brasileiros de <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l. crescidos sob condições controladas de temperatura e umidade ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} \geq 80\%$).....	39
Tabela 6 – Média e desvio padrão da atividade de superóxido dismutase (U / μg) de conídios (superfície e fração intracitoplasmática conidial) e micélio (secretado e fração intracitoplasmática micelial) de isolados brasileiros de <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l. crescidos sob condições controladas de temperatura e umidade ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} \geq 80\%$).....	40
Tabela 7 - Média e desvio padrão da atividade de catalase (U/ μg) de conídios (superfície e fração intracitoplasmática conidial) e micélio (secretado e fração intracitoplasmática micelial) de isolados brasileiros de <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l. crescidos sob condições controladas de temperatura e umidade ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} \geq 80\%$).....	41
Tabela 8 - Média e desvio padrão da atividade de peroxidase (U/ μg) de conídios (superfície e fração intracitoplasmática conidial) e micélio (secretado e fração intracitoplasmática micelial) de isolados brasileiros de <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l. crescidos sob condições controladas de temperatura e umidade ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} \geq 80\%$).....	41

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Ciclo de infecção de fungos artropodopatogênicos (MASCARIN; PAULI, 2010-Adaptado). 12
- Figura 2:** Esquema das camadas da cutícula do artrópode, detalhando a penetração 14
- Figura 3:** Média e desvio padrão da produção conidial dos isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l. crescidos em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), durante 15 dias sob condições controladas de temperatura e umidade ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $\text{UR}\geq 80\%$). Média seguida da mesma letra não difere significativamente entre si no teste de Kruskal-Wallis seguido do teste Student-Newman-Keuls ($p\geq 0,5$) 31
- Figura 4:** Atividade proteolítica geral com azocaseína ($\text{U}/\mu\text{g}$) de conídios dos diferentes isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l. da superfície conidial (**A**) e da porção intracitoplasmática conidial (**B**) após crescimento em meio de cultivo sólido (arroz) acrescido de 0,5% de peptona caseinada. Médias seguidas das mesmas letras no mesmo gráfico não diferem significativamente entre si através da análise de variância (ANOVA) seguida do teste Tukey ($P\geq 0,01$). 35
- Figura 5:** Atividade proteolítica geral com azocaseína ($\text{U}/\mu\text{g}$) de micélios dos diferentes isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l. a partir do secretado micelial (**A**) e da porção intracitoplasmática micelial (**B**) após 72 horas de crescimento em meio mínimo líquido contendo 1% de cutícula do carrapato *Rhipicephalus microplus*. Médias seguidas das mesmas letras no mesmo gráfico não diferem significativamente entre si através da análise de variância (ANOVA) seguido do teste Tukey ($p\geq 0,01$). 36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	A Bovinocultura no Brasil	3
2.2	<i>Rhipicephalus microplus</i>	4
2.3	Controle Microbiano Utilizando Fungos Artropodopatogênicos	6
2.4	<i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.	8
2.5	Infecção de Artrópodes	11
2.6	Fatores Relacionados a Virulência de Fungos Artropodopatogênicos	15
2.7	Proteases	16
2.8	Lipases	19
2.9	Enzimas oxidativas	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	Local de Realização dos Experimentos	21
3.2	Obtenção e Seleção dos Isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.	21
3.3	Manutenção dos isolados fúngicos	22
3.4	Infecção <i>in vitro</i> de Fêmeas Ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	22
3.4.1	Preparo das suspensões fúngicas e viabilidade dos conídios	22
3.4.2	Obtenção das fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	22
3.4.3	Ensaio biológico com fêmeas ingurgitadas	23
3.4.4	Reisolamento fúngico	23
3.4.5	Análise estatística	24
3.5	Avaliação da produção conidial	24
3.5.1	Produção conidial em meio de cultura batata-dextrose-ágar	24
3.5.2	Produção dos conídios em arroz	25
3.6	Estudos enzimáticos	25
3.6.1	Extração proteica conidial	25
3.6.2	Extração proteica micelial	26
3.6.3	Determinação da concentração de proteínas totais	27
3.6.4	Determinação da atividade proteolítica total	27
3.6.5	Determinação da atividade proteolítica de Pr1	28
3.6.6	Determinação da atividade proteolítica de Pr2	28
3.6.7	Determinação da atividade lipolítica	28
3.6.8	Determinação de Superóxido Dismutase	29
3.6.9	Determinação de Catalase	29
3.6.10	Determinação de Peroxidase	29
4	RESULTADOS	31
4.3	Avaliação da Produção Conidial	31
4.4	Viabilidade dos conídios	32
4.5	Bioensaio com fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	32

4.6	Atividade Enzimática	35
4.6.1	Atividade proteolítica geral (azocaseína)	35
4.5.2	Atividade proteolítica específica de Pr1	36
4.5.3	Atividade proteolítica específica de Pr2	37
4.5.4	Atividade lipolítica	38
4.5.5	Atividade de enzimas oxidativas	39
5	DISCUSSÃO	42
6	CONCLUSÕES	49
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura no Brasil é responsável por quase 6% do PIB nacional, sendo um dos setores que mais contribuem para o crescimento do agronegócio no país. Tanto o setor de gado de corte quanto o de gado de leite fornecem empregos para diversas famílias e colaboram com crescimento econômico do país.

Contudo, esta atividade sofre com as perdas provocadas pelas mais diversas parasitoses, sendo o carrapato *Rhipicephalus microplus* o ectoparasito que mais causa prejuízo aos produtores devido aos danos à saúde dos animais. Este carrapato é responsável pela transmissão de agentes infecciosos, como as babesias e as riquetsias, além de provocarem anemia nos animais pela perda de sangue durante o hematofagismo. Além disso, os animais diminuem seu desempenho, perdendo peso e reduzindo a produção. Os gastos com acaricidas são exorbitantes, até mesmo porque muitas das bases químicas disponíveis no mercado não apresentam a eficácia desejada pelo fato dos carrapatos estarem resistentes a estes produtos.

Como alternativa, a utilização de fungos artropodopatogênicos no controle de ectoparasitos apresentam excelentes resultados. Estes microrganismos estão presentes no solo, nas raízes de plantas e infectando naturalmente artrópodes. O uso destes patógenos para o controle de pragas da agricultura, que há anos são alvos de estudo, já está bastante consolidado, não tendo demonstrado, até então, ser prejudicial para o meio ambiente, ser humano e animais, além de não gerar desequilíbrio nas populações de artrópodes não alvos.

Dentre os artropodopatógenos mais estudados e utilizados atualmente, encontra-se o fungo *Metarhizium* sp. Este gênero merece destaque por apresentar resultados satisfatórios no controle de *R. microplus*, tanto em testes laboratoriais quanto sob condições naturais. Além disso, são fungos que também apresentam resposta positiva quando associados a produtos químicos, aumentando a eficácia, possibilitando assim o melhor controle deste ectoparasito.

Uma das principais vantagens do uso dos fungos artropodopatogênicos para o controle de parasitos é a sua forma de infecção, eles apresentam a capacidade de penetrar via cutícula íntegra dos seus hospedeiros e infectá-los. É através do conídio que se inicia a infecção do artrópode: após interação direta com a cutícula do hospedeiro, acontece a fixação e germinação do conídio sob a superfície cuticular, iniciando o processo de penetração.

A cutícula dos carrapatos é composta por proteínas, quitina e lipídios, sendo basicamente formada por duas camadas: epicutícula e procutícula. Para atravessar estas camadas o fungo utiliza basicamente dois mecanismos de ação: a pressão mecânica exercida

por estruturas que são formadas a partir do conídio (grampo e apressório) e a degradação das camadas da cutícula através de enzimas hidrolíticas como proteases, quitinases e lipases. A ação enzimática é o que possibilita a internalização fúngica, através da qual, dentro da hemocele do artrópode, o fungo inicia o processo de colonização, com a formação inicial de blastosporos após driblar a resposta imunológica do hospedeiro.

Neste contexto, uma série de enzimas oxidativas, que atuam principalmente na detoxificação de radicais oxidantes e redutores, são excretadas na tentativa de reduzir processos de fagocitose, agregação celular e melanização. Na sequência, após completa colonização, hifas são formadas e externalizadas, dando origem assim a novos conídios, a fim de facilitar a dispersão para novos hospedeiros em potencial. Durante a manutenção dos conídios no ambiente, a produção de proteases e lipases apresenta também função de nutrição e proteção dos conídios além de auxiliarem na etapa inicial de fixação à superfície cuticular do carrapato.

As enzimas oxidativas por sua vez, além de atuarem contra o sistema imune do hospedeiro, protegem o conídio contra espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidos pela radiação solar. Assim, a caracterização e o estudo enzimático podem atuar como importantes fatores na determinação da eficácia fúngica, auxiliando diretamente na escolha de isolados que possuam boa prospecção para formulação de produtos biológicos.

Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram determinar a atividade proteolítica, lipolítica e oxidativa das enzimas obtidas da superfície e porção intracitoplasmática conidial dos isolados após crescimento em arroz; avaliar as mesmas atividades enzimáticas dos diferentes isolados para o secretado e porção intracitoplasmática dos micélios obtidos a partir do crescimento em meio mínimo líquido; relacionar os dados obtidos sobre a virulência de *Metarhizium anisopliae* s.l. para *Rhipicephalus microplus* com as atividades enzimáticas avaliadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Bovinocultura no Brasil

Os primeiros bovinos chegaram ao Brasil no ano de 1533, vindo junto das grandes navegações oriundas de Cabo Verde e Açores, transportados na caravela Galga, sendo conduzidos a Salvador, capital da colônia naquela época. No século XVI, muitos animais já se encontravam no litoral brasileiro e em todas as Capitânicas Portuguesas, no qual a corte teve importante papel no incentivo à importação de bovinos, que inicialmente chegavam ao Recôncavo Baiano e eram transportados e distribuídos através do Rio São Francisco para as demais regiões brasileiras, iniciando assim a criação em território nacional (SILVA; BOAVENTURA; FIORAVANTI, 2012). Em meados de 1970, a bovinocultura já era considerada uma das mais importantes atividades econômicas da agropecuária brasileira (MIELITZ NETTO, 1995). Entretanto, somente a partir dos anos 90, se tornou mais competitiva, aumentando a produção e a qualidade dos produtos, passando a atender o mercado interno. Este fato está relacionado com grande disponibilidade de recursos ambientais, extensas áreas de pastagens e de tecnologias exclusivas para sistemas de produção tropicais (BARCELLOS; OLIVEIRA; MARQUES, 2016).

Atualmente, o rebanho bovino brasileiro é de cerca de 215 milhões de cabeças de gado, sendo este valor superior ao número de habitantes no Brasil (IBGE, 2017). Este fato é tão expressivo que faz com que o país possua o segundo maior rebanho bovino do mundo, sendo o primeiro em termos de rebanho comercial. Além disso, o Brasil é o maior exportador de carne bovina e o 5º maior produtor de leite em nível internacional, ficando atrás apenas da Índia, Estados Unidos da América (EUA), China e Paquistão (FAO, 2016; IBGE, 2017). O leite é um dos seis produtos mais importantes da agropecuária brasileira, essencial para a geração de emprego e renda, além de ser suprimento de alimentos à população (EMBRAPA, 2016). Do mesmo modo, o setor de bovinocultura de corte tem uma importante contribuição na economia brasileira, tendo atingindo uma receita de US\$ 5,3 bilhões em 2016, dando emprego a 1,6 milhões de brasileiros envolvidos na produção (ABIEC, 2016; IBGE, 2017).

Contudo, os mercados da carne e do leite são bastante exigentes com relação à segurança alimentar, principalmente no âmbito de resíduos encontrados nos produtos cárneos e lácteos. No ano de 2010, EUA, Japão e alguns países da Europa embargaram a importação de carne bovina do Brasil por terem identificado resíduos em níveis acima dos aceitáveis de

antiparasitários, como a ivermectina (EC, 2010; AGÊNCIA ESTADO, 2011). Deste modo, para que o leite e a carne bovina brasileira possam efetivamente ganhar o mercado consumidor, tanto o mercado externo, quanto aumentar o consumo interno é de fundamental importância que os produtores tenham à sua disposição produtos que apresentem maior segurança alimentar e ambiental.

2.2 *Rhipicephalus microplus*

O carrapato *Rhipicephalus microplus* Canestrini, 1888 (Acari: Ixodidae) (MURREL; BARKER, 2003) originou-se no continente Asiático, com descrições iniciais na Ilha de Java e Índia (WHARTON, 1974). Acredita-se que sua disseminação pelo mundo se deu através das expedições exploratórias, uma vez que nestas embarcações transportavam-se animais e mercadorias (MATTHYSSE, 1984; GONZALES, 1993). Com o passar dos tempos por toda América Central, América do Sul, Austrália, Oriente, Sul da Flórida e África este artrópode passou a ser encontrado (GONZÁLES, 2002).

O bovino é o hospedeiro preferencial de *R. microplus*, porém este carrapato pode parasitar outros animais, inclusive o homem. Algumas raças apresentam maior predisposição ao parasitismo, sendo os bovinos da espécie *Bos taurus* mais acometidos que os da espécie *Bos indicus*, uma vez que, quanto maior o grau de sangue zebuíno, maior a resistência ao parasitismo por carrapatos (OLIVEIRA; ALENCAR, 1990; SILVA et al., 2010).

Acredita-se que *R. microplus* tenha sido introduzido no Brasil em princípios do século XVIII, através da importação de bovinos do Chile, que entraram no Estado do Rio Grande do Sul. Atualmente, encontra-se distribuído por todo o país, e a incidência varia de acordo com as condições climáticas e as raças bovinas que são criadas (GONZÁLES, 1995).

Esta espécie de carrapato apresenta um único hospedeiro durante sua fase parasitária, caracterizando-a como monoxeno. Após a quitinização do aparelho bucal, as larvas sobem nos bovinos geralmente enquanto estão pastejando. No corpo do hospedeiro elas se fixam nas regiões mais quentes e sensíveis do animal (onde o couro é mais macio), como úbere, bolsa escrotal, períneo e virilha. As larvas passam à ninfas e posteriormente a adultos, macho e fêmea. Acontece então à cópula e as fêmeas ingerem sangue até sua completa repleção, quando se desprendem do hospedeiro e caem ao solo. Cerca de três dias após a queda inicia-se a postura dos ovos, que eclodem dando origem a larvas que somente se tornam infectantes

após quitinização do aparelho bucal, este fato acontece cerca de 7 a 10 dias após a eclosão. O período entre o desprendimento da fêmea ingurgitada, realização da postura, eclosão das larvas e início da fase parasitária compreende a fase de vida livre ou não parasitária do carrapato (DOUBE; KEMP, 1979; FURLONG, 1993; SONENSHINE, 1993). Durante sua permanência no hospedeiro, cada fêmea ingurgitada ingere cerca de três mililitros de sangue e transforma em torno de 60% de sua massa corporal em ovos. Cada grama de ovos produz em torno de 20.000 larvas (GONZALES, 1993).

O parasitismo do carrapato *R. microplus* provoca diversos danos ao hospedeiro e ao produtor, uma vez que o hábito hematofágico do carrapato causa anemia, além de possibilitar a transmissão de diversos hemoparasitos, o que pode levar o animal a óbito. A fixação do carrapato no hospedeiro causa espoliação do couro, predispondo a infecções secundárias e a miíases, desvalorizando o produto (HORN; ARTECHE, 1985; GONZALES; SERRA-FREIRE, 1992). Reck et al. (2014), investigaram a associação entre os ectoparasitos *R. microplus* e *Cochliomyia hominivorax*. Estes autores reportaram que bovinos altamente parasitados por *R. microplus* apresentam cerca de quatro vezes mais risco de terem miíase que animais com baixa carga parasitária.

Pesquisas relataram que no Brasil, os prejuízos causados pelos danos diretos e indiretos dos carrapatos aos bovinos tenham aumentado de 2,0 para 3,24 bilhões de dólares anuais (GRISI et al., 2002; 2014). Segundo Jonsson et al. (1998), um grupo de vacas livres de carrapatos produziu 2,86 litros de leite e 0,14 kg de gordura no leite por dia a mais em relação a um grupo que estava parasitado por *R. microplus*, além disso, ao fim de 15 semanas, animais não parasitados ganharam 10,6 kg de peso vivo a mais em relação as vacas infestadas. Rodrigues e Leite (2013) realizaram um estudo com 74 animais na região central de Minas Gerais e estimaram a redução de 90,24 litros de leite por vaca em lactação, o que corresponde a uma redução de 2,75% da produção.

Para evitar o parasitismo, o uso de produtos químicos vem sendo a principal medida de controle de *R. microplus*. Existem diversas bases acaricidas no mercado, porém, mesmo com tamanha variedade, as populações de carrapatos estão apresentando resistência aos produtos utilizados, principalmente por causa de seu mau uso (PEREIRA; LABRUNA, 2008). A aplicação indiscriminada dessas substâncias leva ao aparecimento de resíduos químicos nos produtos de origem animal, principalmente leite e carne, além da poluição ambiental (BULLMAN; MUNÕS CABENAS, M.E.; AMBRÚSTOLO, 1996).

Em virtude da problemática em questão, existem formas alternativas que reduzem o uso dos carrapaticidas químicos, visando um controle estratégico a partir de técnicas como: seleção de bovinos resistentes aos carrapatos; cultivo de pastagens que dificultam a sobrevivência das larvas (SUTHERST et al., 1982); rotação de pastejo (ELDER et al., 1980); controle através do manejo de predadores naturais, como *Egretta ibis* (garça-vaqueira) (ALVES-BRANCO et al., 1983) e formigas (GONZALES, 1995); controle microbiano: uso de patógenos como os fungos *Beauveria bassiana* (CORDOVÉS, 1997), *Metarhizium anisopliae* s.l. (BITTENCOURT; MASSARD; LIMA, 1994) e bactérias como *Cedecea lapagei* (BRUM, 1988) ou ainda o uso de vacinas anti-carrapato *R. microplus* (WILLADSEN, 2006).

2.3 Controle Microbiano Utilizando Fungos Artropodopatogênicos

Por definição, controle biológico é a ação de parasitoides, predadores e patógenos na manutenção da densidade de outro organismo a um nível mais baixo do que aquele que normalmente ocorreria nas suas ausências (DEBACH, 1968). Nessa ótica, Cruz (1995) afirma que o controle biológico é um fenômeno natural que ocorre quando a redução de indivíduos de uma praga acontece pela ação de um inimigo natural, dirigida ou causada pela interferência do homem, fazendo com que tal praga deixe de ser um problema econômico.

Segundo Baker e Cook (1974), o controle biológico sempre deve atuar de forma que se mantenha o equilíbrio ecológico, pois de outra maneira as chances de sucesso são menores. São do século XVIII os primeiros relatos de microrganismos infectando insetos. Em 1726, Réaumur, relatou que o fungo *Cordyceps* sp. estava infectando larvas de lepidópteros (Lepidoptera: Noctuidae) (MARANHÃO; MARANHÃO, 2009).

Os fungos artropodopatogênicos são responsáveis por cerca de 80% das doenças causadas em insetos (CARDOSO et al., 2003). Existem cerca de 90 gêneros e mais de 700 espécies de fungos descritos como sendo patogênicos a invertebrados (ALVES, 1998). Assim, são importantes alvos de estudos e estão apresentando excelentes resultados no controle de diversos artrópodes. No Brasil, os primeiros estudos com fungos artropodopatogênicos são datados como sendo de 1923, quando Pestana identificou duas espécies de cigarrinhas naturalmente infectadas por *M. anisopliae*, identificado como *Penicillium anisopliae* naquele tempo. O primeiro trabalho a nível de campo foi realizado utilizando *M. anisopliae* no combate da cigarrinha *Tomaspis liturata* (ALVES; FARIA, 2003).

Diversos foram os trabalhos realizados a partir de então e os fungos *Beauveria* e *Metarhizium* se tornaram os gêneros mais conhecidos e utilizados para o controle de artrópodes (MASCARIN et al., 2018). Este fato pode ser atribuído à ampla distribuição geográfica destes agentes, a grande variedade de hospedeiros naturais e pela capacidade em infectarem todos os estágios evolutivos do hospedeiro (ALVES, 1998). Além disso, são microrganismos de fácil isolamento, podendo ser isolados tanto de artrópodes quanto de partes de plantas ou do solo.

Como vantagens da utilização de fungos para o controle biológico de artrópodes, há o fato de não serem poluentes, não são tóxicos para o homem, animais e para o meio ambiente, não provocarem desequilíbrios biológicos, além de poderem ser aplicados com as máquinas convencionais após pequenas adaptações (ALVES; ALMEIDA, 1997). Atrelado aos fatos, apresentam também especificidade e seletividade do patógeno em relação ao artrópode-alvo; capacidade de multiplicação e dispersão no ambiente; possibilidade de associação do patógeno a produtos químicos; facilidade de aplicação e, além disso, possuem a capacidade de gerar efeitos nas gerações subseqüentes (ALVES, 1998).

Sobretudo, a principal vantagem no que diz respeito à utilização de fungos no controle biológico de artrópodes pragas está na facilidade de produção das suas unidades infectivas em grande escala atendendo à produção comercial, somado à fácil aplicação em condições de campo (pastagens) e reduzido impacto ambiental comprovado nos programas de controle de pragas utilizando agentes biológicos estabelecidos até então na agricultura (ORLANDELLI; PAMPHILE, 2011). Geralmente, em laboratório a manutenção dos fungos é realizada em placas de Petri, através de repique contínuo, porém, para produção em larga escala dos conídios, diversos substratos podem ser usados como o sorgo, aveia e o arroz, sendo este último o mais utilizado (ALVES; FARIA, 2010).

Fungos artropodopatogênicos possuem a capacidade de penetrar ativamente via cutícula dos hospedeiros pela ação mecânica e enzimática (CHARNLEY; ST. LEGER, 1991; WANG et al., 2002). Esta propriedade favorece a sua utilização como agentes no controle microbiano, uma vez que os mesmos conseguem infectar o artrópode independente da sua atividade alimentar (BITTENCOURT et al., 1995a, b; 1999a; TIAGO; FURLANETO, 2003).

Contudo, ainda existem limitações para a utilização destes microrganismos em sistemas agropecuários, devido ao fato de sofrerem intensa ação de fatores bióticos e abióticos que influenciam na sobrevivência dos fungos a campo, sua distribuição e a sua habilidade de

causar doenças (INGLIS et al., 2001). Para tanto, os trabalhos envolvendo o uso destes fungos a campo precisam considerar fatores como temperatura, umidade relativa e radiação UV, afim de que a capacidade de infecção dos artrópodes, assim como a virulência do fungo não sejam alteradas (ROBERTS; YENDOL, 1971; THOMAS; JENKINS, 1997; GOETTEL; INGLIS; WRAIGHT, 2000). Uma das estratégias utilizadas a campo para auxiliar o fungo a manter a virulência é o uso de adjuvantes como óleo mineral e vegetal em formulações fúngicas, protegendo assim os conídios das condições ambientais desfavoráveis (CAMARGO et al., 2014). Ainda neste contexto, estudos recentes reportam que a eficácia de *M. anisopliae* s.l. no controle de *R. microplus* em bovinos em condições naturais é potencializada a partir da adição de adjuvantes como o óleo mineral (CAMARGO et al., 2016).

Diversos autores demonstraram o potencial dos fungos artropodopatogênicos no controle de *R. microplus* em testes *in vitro* e *in vivo* (BITTENCOURT; MASSARD; LIMA, 1994; FERNANDES et al., 2004; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008; BAHIENSE et al., 2008; CAMPOS et al., 2010; KAAYA et al., 2011; CAMARGO et al., 2016). Deste modo, o uso destes agentes no controle de carrapatos se mostra promissor.

2.4 *Metarhizium anisopliae* s.l.

Em 1879, Metschnikoff descreveu o fungo *Entomophthora anisopliae* e o utilizou para controle das larvas de *Cleonus punctiventris*, uma praga muito importante no cultivo da beterraba, sendo este o primeiro trabalho envolvendo um fungo no controle de um artrópode. Posteriormente, SOROKIN (1883) descreveu o novo gênero *Metarhizium*, que possuía conídios do mesmo tamanho dos descritos anteriormente.

Porém, em 2009, Bischoff, Rehner e Humber, através de estudos filogenéticos, morfológicos e moleculares, concluíram que a espécie *M. anisopliae* é na verdade um complexo formado por nove espécies, sendo elas: *M. pingshaense*, *M. anisopliae*, *M. robertsii*, *M. brunneum*, *M. majus*, *M. lepidiotae*, *M. acridum*, *M. globosum* e *M. guizhouense*.

Para os isolados de *M. anisopliae* que não passaram pela reclassificação, de acordo com Bischoff, Rehner e Humber, (2009), sugere-se que sejam considerados pertencentes a um complexo de espécies e que sejam identificados da seguinte maneira: *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s.l.).

Recentemente Lopes et al., (2018) incluíram uma nova espécie de *Metarhizium* ao complexo *M. anisopliae*: o fungo CG 1123, isolado do solo de uma plantação de banana no Ceará, foi batizado como *Metarhizium alvesii* após estudos morfológicos e moleculares que comprovaram que o táxon deste isolado não se encaixava dentro dos táxons do complexo de espécies de *Metarhizium* descritos até então.

Metarhizium anisopliae s.l., é um ascomiceto pertencente à classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales, família Clavicipitaceae, apresenta-se como fungo filamentoso de micélio hialino e septado, conídios cilíndricos de coloração esverdeada que medem geralmente 3 a 18 µm de comprimento e que se formam sobre conidióforos também cilíndricos (BISCHOFF, REHNER, HUMBER, 2009). Em seus hospedeiros, esse fungo causa uma doença conhecida como muscardine verde, pois os cadáveres ficam enrijecidos e com uma coloração verde, variando desde tons claros a escuros, devido à conidiogênese (WANG et al., 2002; ZIMMERMANN, 2007a).

Além disso, este fungo é mesofílico, tendo sua atividade desenvolvida em uma faixa de temperatura entre 15 e 35°C, sendo sua temperatura ótima de germinação e crescimento em torno de 25 e 30°C (EKESI et al., 1999; MILNER et al., 2003). Porém, a temperatura de germinação e crescimento variam de acordo com as necessidades específicas de cada isolado de *Metarhizium* spp, por exemplo, em um estudo realizado por Yip et al. (1992), isolados que apresentaram crescimento a 5°C não cresceram a 37 °C e aqueles que cresceram a 37°C não cresceram em baixas temperaturas. Entretanto, a temperatura de 25°C foi considerada ótima para a germinação e crescimento micelial de *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* (DIMBI et al., 2004; DEVI et al., 2005).

O patógeno *M. anisopliae* s.l. é considerado um agente valioso para o controle microbiano de artrópodes, uma vez que apresenta potencial para atacar um grande número de parasitos, possui vasta distribuição global, ocorrendo em diferentes solos e diferentes climas do planeta, além de apresentar pouca exigência em relação à fonte nutritiva (ROBERTS, ST LEGER, 2004; ALVES; LOPES, 2008).

Há décadas que fungos do gênero *Metarhizium* estão sendo utilizados no controle de diversas pragas da agricultura. No Nordeste, *M. anisopliae* s.l. foi utilizado com grande sucesso no controle da cigarrinha *Mahanarva posticata*. No Estado de São Paulo este mesmo microrganismo foi utilizado para o controle de *Mahanarva fimbriolata* cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar (LOUREIRO et al., 2005a, 2005b). Espécies de *M. anisopliae* s.l. também

apresentam ação no controle da cigarrinha-das-pastagens (gêneros *Deois* e *Zulia*), principais pragas das pastagens brasileiras (ALVES, 1998).

Neste contexto, fungos deste gênero são alguns dos microrganismos mais estudados e bem descritos a nível de controle biológico e de suas características bioquímicas e moleculares (FARIA; WRAIGHT, 2007; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010; ST LEGER; WANG; FANG; 2011). Encontram-se amplamente distribuídos, sendo observados desde regiões tropicais a temperadas, e é possível realizar o isolamento a partir de amostras do solo, da rizosfera de plantas, de materiais em decomposição (como saprófitas) ou parasitando insetos (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009).

A infecção por *M. anisopliae* em diversas espécies de insetos, como gafanhotos (*Locusta migratoria*, *Chortoicetes terminifera*), mosquitos (*Aedes aegypti*, *Anopheles* sp.) e cigarrinhas da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata*, *Mahanarva fimbriolata*) (SCHOLTE et al., 2005; SOUZA, 2007; RAMANUJAM et al., 2014), além de carrapatos como *R. microplus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma variegatum* e *Dermacentor nitens* foi descrita na literatura (ARRUDA et al., 2005; FERNANDES; BITTENCOURT; ROBERTS; 2012).

Em 1994, Bittencourt, Massard e Lima, relataram a patogenicidade de isolados do gênero *Metarhizium* sob *R. microplus*, demonstrando o potencial deste fungo no controle de artrópodes de importância veterinária, sendo a patogenicidade de *Metarhizium* também testada posteriormente em outras espécies de carrapatos, como, *R. sanguineus*, *R. appendiculatus*, *D. nittens*, *Ixodes scapularis*, *Amblyomma sculptum* (= *Amblyomma cajennense*), *A. variegatum*, *A. maculatum*, *A. americanum*, entre outros (KAAYA; MWANGI; OUNA, 1996; SOUZA; REIS; BITTENCOURT, 1999; BENJAMIN; ZHIOUA; OSTFELD, 2002; MONTEIRO; BAHIANSE; BITTENCOURT, 2003; HORNBOSTEL et al., 2004; KIRKLAND; CHO; KEYHANI, 2004; LOPES et al., 2007; FISCHHOFF; KEESING; OSTFELD, 2017).

Estudos demonstraram que apesar deste microrganismo ser patogênico para artrópodes ele não apresenta efeito nocivo para mamíferos e outros vertebrados (SHADDUCK; ROBERTS; LAUSE, 1982; HALL; ZIMMERMANN; VEY, 1982, et al., 1982; LAIRD; LACEY; DAVIDSON, 1990; SAIK; LACEY; LACEY, 1990; ZIMMERMANN, 1993, 2007a, 2007b; VESTERGAARD et al., 2003), ressaltando assim uma segurança para a utilização deste fungo no controle de artrópodes. Fischhoff, Keesing e Ostfeld (2017)

realizaram um estudo utilizando *M. brunneum* no controle de *I. scapularis* levando em consideração a ação do fungo em artrópodes não alvos. Este estudo demonstrou que, a utilização desta espécie de biocontrolador em ambientes naturais não foi capaz de causar redução relevante nas populações de artrópodes não alvos.

Além disso, há anos que diferentes isolados de *Metarhizium* são utilizados como biocontroladores de artrópodes, portanto o ambiente já foi por diversas vezes exposto à ação destes patógenos. No que diz respeito à sua produção ou uso como produtos de controle microbiano, apenas as alergias foram relatadas e nenhum outro efeito adverso foi registrado (SIEGEL; SHADDUCK, 1990; ZIMMERMANN, 1993; COOK et al., 1996).

Outra vantagem do uso de fungos artropodopatogênicos no controle de pragas é a possibilidade de associá-los a produtos químicos, potencializando assim o efeito dos mesmos. Bahiense et al., 2008, avaliaram *in vitro* a associação entre Deltametrina e o fungo *M. anisopliae* s.l. sobre larvas de *R. microplus* resistentes a piretróide e os resultados demonstraram que as taxas de mortalidade foram elevadas quando a base química foi associada com fungo. Outro trabalho neste sentido foi o de Fiorotti et al.(2016), onde demonstraram a eficiência da associação de *M. anisopliae* s.l. com a base química cipermetrina no controle de estágios imaturos de *R. microplus*.

Neste contexto, o uso de fungos artropodopatogênicos no controle de pragas é uma ferramenta que deve ser utilizada, principalmente por ser considerado um produto seguro, com riscos muito baixos a vertebrados, humanos e ao meio ambiente (ZIMMERMANN, 2007b).

2.5 Infecção de Artrópodes

Os fungos artropodopatogênicos possuem a capacidade de penetrar ativamente na cutícula dos artrópodes e mesmo que ela esteja íntegra a colonização da hemocele do hospedeiro se torna possível, diferentemente de outros patógenos que penetram preferencialmente através de rupturas na cutícula ou quando ingeridos, tornando o uso destes fungos como agentes de biocontrole mais vantajoso quando comparado com outros microrganismos (MADELIN; ROBINSON; WILLIAMS, 1967).

Zimmermann (2007a), divide a infecção dos artrópodes em etapas, sendo elas: “1) fixação dos conídios na cutícula, 2) germinação, 3) penetração através da cutícula, 4)

superação da defesa imunológica do hospedeiro, 5) proliferação no interior do hospedeiro, 6) crescimento sobre o hospedeiro morto e 7) produção de conídios” (Figura 1).

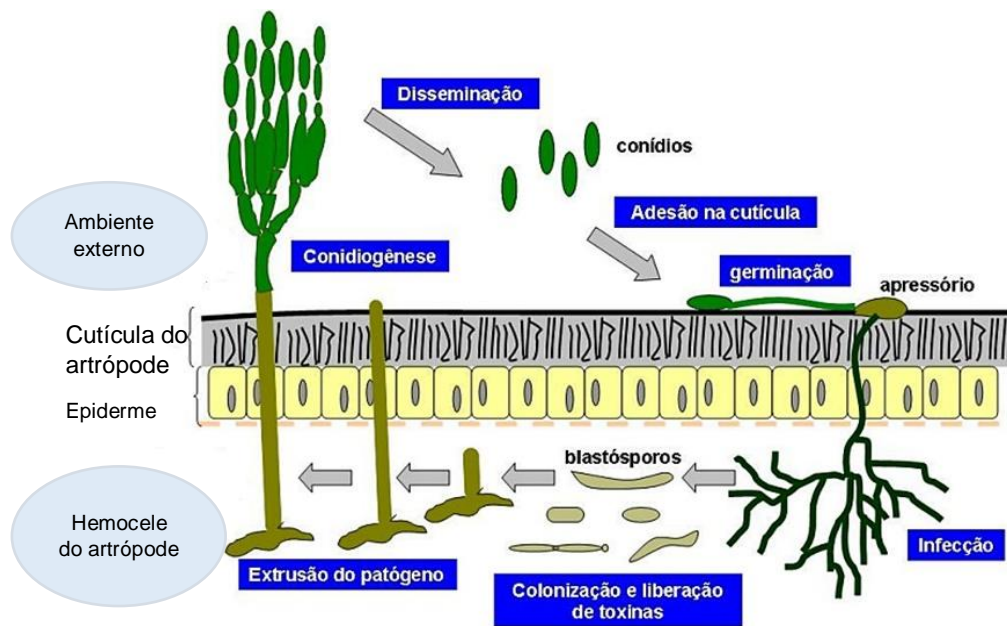


Figura 1: Ciclo de infecção de fungos artrópodos patogênicos (MASCARIN; PAULI, 2010- Adaptado).

Para que aconteça a fixação ou adesão dos conídios à cutícula dos hospedeiros, algumas interações proteicas e enzimáticas devem ocorrer. Ecto-enzimas como catalases (CAKMAK; MARSCHNER, 1992), peroxidases (VIEIRA; LUPETTI; FATIBELLO-FILHO, 2003) e superóxido dismutase (BEYER; FRIDOVICH, 1987) já foram descritas como as responsáveis por manter a integridade de conídios de *M. anisopliae* no ambiente. A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), encontrada na superfície de conídios de *Metarhizium*, apresenta uma grande importância para a interação da superfície conidial com o artrópode alvo (BROETTO et al., 2010). Wang e St. Leger (2007) avaliaram a presença de uma proteína do tipo adesina 1 (MAD 1) em conídios de *M. anisopliae*, e observaram que quando esta proteína foi suprimida, a germinação foi atrasada e não houve a formação de blastosporo, dessa forma, a virulência do fungo para lagartas de *Manduca sexta* foi reduzida. A presença de algumas enzimas, como esterases e proteases, que ocorrem na superfície dos conídios não germinados, são muito importantes nessa etapa, pois elas alteram a superfície do tegumento do hospedeiro, favorecendo a nutrição e a germinação do fungo (ST LEGER et al., 1991).

Além disso, a atividade de enzimas do tipo lipases, que também podem estar presentes na superfície de conídios de *M. anisopliae*, aumenta as interações hidrofóbicas, uma vez que a exocutícula dos artrópodes é composta quase que em sua totalidade por lipídios, liberando ácidos graxos que favorecem a adesão (SILVA et al., 2010). Beys-da-Silva (2009) descreveram pela primeira vez uma lipase presente na superfície do conídio de *M. anisopliae* capaz de hidrolisar diferentes substratos lipídicos, portanto, favorecendo a interação do fungo com a epicutícula, visto que a mesma é formada exclusivamente por lipídios.

Uma vez estabelecida à adesão dos conídios, e em condições favoráveis de temperatura, umidade e luz, inicia-se a germinação que ocorre em até 24 horas (BITTENCOURT et al., 1999a; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). O conídio germinado forma o tubo germinativo através da dilatação da extremidade distal das hifas, formando uma estrutura especializada na penetração, denominada apressório, o qual dará origem ao grampo de penetração, que de forma mecânica adentra a superfície cuticular do hospedeiro (ARRUDA et al., 2005). Atrelado à pressão física do grampo de penetração ocorre também degradação enzimática, mecanismo químico envolvendo a secreção de enzimas hidrolíticas, como proteases, quitinases e lipases que são responsáveis pela degradação dos principais constituintes da cutícula (SOUZA, 2007; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010).

As proteases estão envolvidas nos processos de formação e germinação dos conídios e hidrólise das cadeias polipeptídicas em moléculas menores, que serão absorvidas pelas células e as quitinases hidrolizam a quitina presente na cutícula. As lipases fracionam os lipídios existentes na superfície dos artrópodes, para posterior metabolização pelos microrganismos (ARRUDA, 2005). Desta forma, sugere-se que a ação das lipases preceda a das proteases, uma vez que a epicutícula dos artrópodes apresenta lipídios em sua composição e esta é a primeira barreira a ser quebrada (ST LEGER; COOPER; CHARNLEY, 1986). A última enzima a atuar é a quitinase, uma vez que é necessária a ação da atividade proteolítica para hidrolisar a estrutura física da cutícula de artrópodes, que é recoberta por uma matriz de natureza proteica, sendo as fibras de quitina as responsáveis por ancorar essas proteínas (BIDOCHKA; ST LEGER; ROBERTS, 1997). Em resumo, para transpor a epicutícula, o principal mecanismo utilizado pelo fungo é o químico, enquanto que para a transposição da procutícula, camada mais profunda da cutícula, ambos os mecanismos, químico e físicos, estão envolvidos (GOETTEL et al., 1989) (Figura 2).

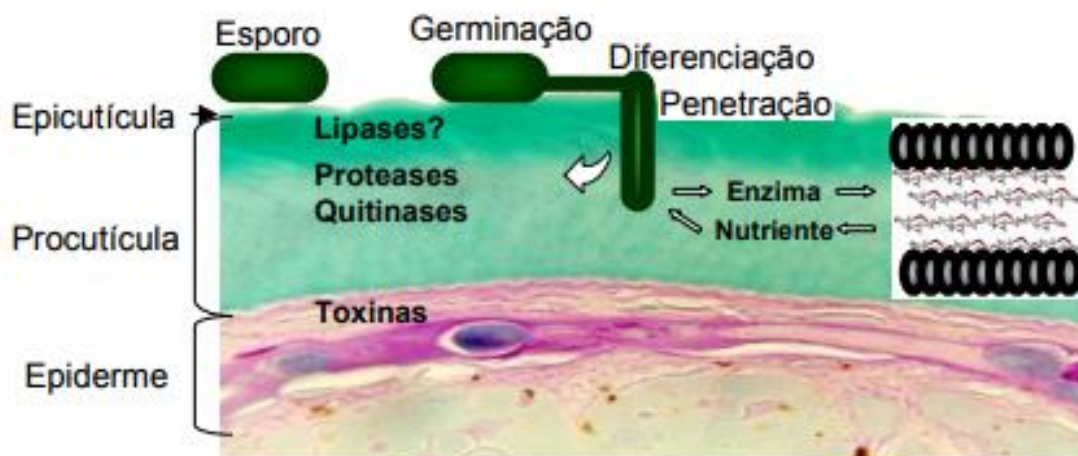


Figura 2: Esquema das camadas da cutícula do artrópode, detalhando a penetração do fungo, bem como as enzimas envolvidas neste processo (BEYS-SILVA, 2009).

Após a penetração, o fungo precisa driblar o sistema imunológico do hospedeiro. Nesta fase são utilizadas duas estratégias principais para o sucesso da colonização, a primeira trata-se da diferenciação em células que não são reconhecidas pelo sistema imune e a segunda o fungo produz substâncias imunomoduladoras que suprimem o sistema de defesa do hospedeiro, acarretando em diminuição das células da resposta imune celular (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010; FREITAS et al., 2015; FIOROTTI et al., 2018).

Na hemocele do hospedeiro, o fungo desenvolve uma estrutura denominada de blastosporo que é derivada das hifas (CHO et al., 2006). Nessa fase, acontece a liberação de toxinas e o esgotamento dos nutrientes que são utilizados como fonte de alimento para o fungo, resultando na morte do hospedeiro (SOUZA et al., 2007; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). Os fungos do gênero *Metarhizium* podem secretar uma enzima chamada de trealose ácida, responsável pela hidrólise da trealose que é o principal açúcar presente na hemolinfa e é utilizada pelo hospedeiro como fonte de nutriente, desse modo, os fungos consomem a trealose esgotando as reservas nutricionais do artrópode (XIA; CLARKSON; CHARNLEY, 2002). Além disso, alguns fungos artropodopatogênicos são conhecidos por produzirem toxinas denominadas de destruxinas, que afetam o sistema de defesa do hospedeiro e ainda causam danos no sistema muscular e túbulos de Malpighi, de modo que os sistemas de excreção, alimentação e mobilidade ficam prejudicados (PAL; ST LEGER; WU, 2007; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010).

A morte do hospedeiro infectado por fungos artropodopatogênicos geralmente acontece em até 10 dias, sendo provocada principalmente pela ação combinada das toxinas fúngicas, pela invasão dos órgãos, obstrução física da circulação, diminuição dos nutrientes e perda de água (CHANDLER et al., 2000). Após a morte, acontece a esporulação do fungo na superfície do cadáver (HARTELT et al., 2008) e segundo Goettel e Inglis (1997), um fungo apenas se exterioriza no cadáver de seu hospedeiro e esporula caso possua condições apropriadas de temperatura e umidade para o seu desenvolvimento. A esporulação ou produção de conídios na superfície do cadáver dá início à etapa de disseminação dessa estrutura pelo ambiente, para que assim outros artrópodes possam ser infectados, dando continuidade ao seu ciclo de vida (SOUZA et al., 2007).

Desta forma, o modo de colonização destes patógenos é alvo de muita pesquisa, visando principalmente caracterizar os fatores de virulência para que assim possam melhorar este processo de infecção fúngica (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010).

2.6 Fatores Relacionados a Virulência de Fungos Artropodopatogênicos

A patogenicidade de um microrganismo está relacionada a capacidade de induzir morbidade e influir na mortalidade de hospedeiros ou em população de hospedeiros (FERREIRA; CHIEFFI; ARAUJO, 2012). Entretanto, quando atribuído um grau a esta patogenicidade usamos o termo virulência (CHANG et al., 2003). Deste modo, um patógeno pode ser muito ou pouco virulento, uma vez que a virulência está relacionada com fatores microbiológicos, patológicos, ecológicos e evolucionários, influenciando em como o fungo expressa sua patogenicidade (CASADEVALL; PIROFSKI, 1999).

A produção de toxinas e a secreção de enzimas hidrolíticas são importantes fatores de virulência de *M. anisopliae*s.l. (CLARKSON; CHARNLEY, 1996). A micotoxina mais importante produzida por este fungo é a destruxina (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010), os isolados de *Metarhizium* que possuem uma maior produção de destruxina tendem a ser mais virulentos (SREE; PADMAJA; MURTHY, 2008). Entretanto, St Leger, Cooper, Charnley (1993) afirmaram que a virulência de um isolado não está relacionada a apenas um componente fúngico.

Com relação as enzimas secretadas por *M. anisopliae* s.l., as proteases desempenham funções essenciais na virulência deste patógeno. É por meio da ação destas enzimas que o fungo consegue penetrar na cutícula íntegra de seus hospedeiros, após a degradação

enzimática desta primeira barreira (ST LEGER et al., 1991; ST LEGER; COOPER; CHARNLEY, 1993; FREIMOSER et al., 2003). Outra enzima fortemente relacionada a virulência dos fungos artropodopatogênicos é a lipase, essa enzima aumenta a adesão dos conídios à superfície dos hospedeiros para assim iniciar a infecção, além de atuar na degradação da epicutícula dos artrópodes que é composta basicamente por lipídios, auxiliando também na penetração do fungo (STHR et al., 2003). Neste contexto, isolados altamente virulentos apresentam quantidades consideráveis de proteases, quitinases e lipases, sendo estas enzimas muito ativas e muito necessárias para a penetração na epicutícula hidrofóbica e na cutícula altamente proteica (ROBERTS; GUPTA; ST LEGER, 1992).

Entretanto, existem alguns fatores que podem ser negativos para os fungos, como por exemplo, a expressão diferenciada das superóxido-dismutases (SODs) que são enzimas que atuam como um sistema de defesa contra espécies reativas de oxigênio (SCHRANK et al., 1993; BITTENCOURT, 1998) e a presença de micovírus com genoma de dsRNA (GIMÉNEZ-PECCI et al., 2002; TIAGO et al., 2004) podem influenciar negativamente na virulência de *M. anisopliae*, s.l., reduzindo seu potencial.

Além dos fatores intrínsecos, a adição de substâncias às suspensões fúngicas podem aumentar a virulência deste microrganismo. Diversos trabalhos demonstraram que a adição de óleos e espalhantes adesivos a suspensões fúngicas aumentam a ação destes patógenos no controle de *R. microplus* (ANGELO et al., 2010; MARCIANO et al., 2013; CAMARGO et al., 2014; CAMARGO et al., 2016). Já que estes adjuvantes aumentam a interação entre os conídios do fungo e a cutícula dos carrapatos (CAMARGO et al., 2012), aumentando assim o potencial patogênico do fungo.

2.7 Proteases

Proteases são enzimas capazes de hidrolisar as cadeias polipeptídicas em cadeias menores, para que sejam absorvidas pelas células. Elas estão envolvidas nos processos de formação e germinação dos conídios e na degradação de constituintes da cutícula (ST LEGER et al., 1987; TIAGO; SILVA, 2007).

As proteases são consideradas como essenciais no processo de infecção de *Metarhizium*, por participarem ativamente da hidrólise da porção proteica da cutícula (ST LEGER; BIDOCHKA; ROBERTS, 1994). Além da função de auxiliar na penetração da

cutícula, as enzimas permitem a utilização das proteínas do hospedeiro na nutrição e agem em resposta às defesas do artrópode através da hidrólise de peptídeos antimicrobianos e inibidores de proteases (VILCINSKAS, 2010).

Durante o processo infeccioso, pelo menos três tipos diferentes de enzimas são produzidas, sendo elas as serino-proteases do tipo subtilisina (Pr1), tripsina (Pr2) e uma metaloprotease (ST LEGER; BIDOCHKA; ROBERTS, 1994). As tripsinas e subtilisinas pertencem a superfamílias distintas de serino-proteases, pois apesar de apresentarem mecanismos catalíticos similares, elas evoluíram de maneira independente. Em um estudo que avaliava o modo de infecção do fungo, pelo menos 14 isoformas de proteases foram detectadas por zimogramas (ST LEGER; JOSHI; ROBERTS, 1998).

Análises de etiquetas de sequência expressas (ESTs) indicaram a presença de 11 isoformas de Pr1, que foram classificadas de Pr1A a Pr1K, a maior quantidade já observada em fungos (FREIMOSER et al., 2003; BAGGA et al., 2004). Dentre as isoformas de Pr1, a primeira, Pr1A, merece destaque durante o processo de infecção. Em um experimento realizado, St Leger et al. (1996a), os mesmos observaram que linhagens com super expressão dessa isoforma reduziram o tempo de morte de larvas de *Manduca sexta* em até 25%, ocorrendo também redução no consumo de alimentos em 40% enquanto vivos.

Além disso, a protease Pr1A é uma das primeiras a ser secretada durante o processo de degradação da cutícula (BAGGA et al., 2004; FREIMOSER; HU; ST LEGER, 2005). Em estudos proteômicos, esta isoforma de Pr1 foi detectada no processo de infecção de diversos hospedeiros, dentre eles *R. microplus* (SANTI et al., 2010) e *Dysdercus peruvianus* (BEYS-DA-SILVA et al., 2014), demonstrando que a Pr1A não está relacionada com a especificidade ao hospedeiro, mas com a infecção de modo geral.

Javar et al. (2015) avaliaram a Pr1A na infecção de *Spodoptera exigua* e observaram que esta protease demonstra um aumento gradual na sua expressão nos estágios iniciais de infecção e atinge um pico de aumento 1.000 vezes maior na etapa de conidiogênese, em relação ao início do processo. Desta forma, sugere-se que essa isoforma também tem funções no processo de extrusão das hifas nos estágios finais, possivelmente disponibilizando nutrientes. Do mesmo modo, em *Galleria mellonella*, Smalle Bidochka (2005), verificaram uma superexpressão de Pr1A no início da infecção (formação de apressórios) e na conidiogênese.

Entretanto, outras isoformas de Pr1 também se mostraram importantes nos estágios iniciais do processo de infecção. Análises proteômicas de *M. anisopliae* s.l. durante a infecção de *Dysdercus peruvianus*, realizadas por Beys-da-Silva et al. (2014), demonstraram a superexpressão de Pr1A, Pr1B, Pr1C e Pr1I, além de subexpressão de Pr1J nos estágios iniciais de infecção (48h) e que mesmo após 96 horas do início da infecção, a Pr1B continuava superexpressa. Experimentos de RNA-Seq a partir de RNA extraído de culturas de *M. anisopliae* s.l. em cutículas de *R. microplus* evidenciam superexpressão das isoformas de Pr1 sendo elas Pr1C, Pr1I, Pr1J e Pr1K nas primeiras 48 horas após o início do processo, voltando a níveis basais passadas 144h (STAATS et al., 2014).

Juntamente com as Pr1, as proteases do tipo tripsina, ou Pr2, são importantes para transpor a cutícula do hospedeiro. Acredita-se que a atividade da tripsina possa ser complementar à Pr1, desencadeando uma cascata de reações que facilitam a penetração do fungo no hospedeiro (ST. LEGER et al., 1996a; MANALIL et al., 2010). St. Leger et al. (1996b) reportam que duas isoformas de Pr2 encontradas a partir do crescimento fúngico em meio mínimo podem estar associadas à formação do apressório e que por este motivo, estas proteases encontram-se sempre presentes nos primeiros estágios da colonização dos artrópodes. Além disso, Gillespie, Bateman e Charnley (1998) demonstraram que esta enzima é uma das primeiras a surgir durante o crescimento *in vitro* de *M. anisopliae* s.l., e que supostamente teria função de produzir peptídeos que induzem o surgimento de Pr1.

Apesar da função individual de cada protease ainda não ser totalmente conhecida, acredita-se que elas se complementam durante o processo de infecção e que são importantes fatores de virulência do fungo *Metarhizium* (ST LEGER et al., 1996a; VILCINSKAS, 2010; ROSAS-GARCÍA et al., 2014). Entretanto, as proteases não atuam sozinhas no processo de colonização dos seus hospedeiros. Elas também precisam interagir de maneira sinérgica com outras enzimas degradadoras de cutícula, para assim hidrolisar de maneira mais eficiente os componentes cuticulares (BAGGA et al., 2004; LI et al., 2010; BUTT et al., 2016).

2.8 Lipases

Lipases são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações éster de lipídios gerando álcoois e ácidos graxos (BEYS-DA-SILVA, 2009). Os fungos filamentosos, como *Metarhizium anisopliae* s.l., apresentam grande capacidade em produzir lipases (CARDENAS et al., 2001).

Já foram reportadas por Beys-da-Silva et al. (2014), duas enzimas relacionadas com a degradação de lipídios, a lactonohidrolase e a ceramidase, estas lipases foram identificadas em secretoma de *M. anisopliae* s.l. e apresentam alta especificidade. A cutícula dos artrópodes possui diferentes composições de lipídios, alguns muito complexos, deste modo, enzimas altamente específicas são importantes para degradação das frações lipídicas da cutícula do hospedeiro. Sendo assim, o fungo *Metarhizium* é capaz de produzir lipases induzidas por diferentes lipídios como fonte de carbono (SILVA et al., 2005).

Acredita-se que as enzimas lipolíticas são as primeiras a serem secretadas para penetração do fungo, tendo em vista que a epicutícula dos artrópodes é composta basicamente por lipídios (BEYS-DA-SILVA et al., 2010a). Além da degradação da camada lipídica, a secreção destas enzimas favorece a aderência do conídio, através da liberação de ácidos graxos livres aumentando a hidrofobicidade e disponibiliza nutrientes iniciais que são utilizados no início da germinação do conídio auxiliando na formação do tubo germinativo (BEYS-DA-SILVA et al., 2010a).

Além disso, Santi et al. (2010) detectaram lipases durante as primeiras seis horas de infecção e na superfície de conídios. Desta forma, acredita-se que a atividade destas enzimas é essencial para desencadear todo o processo infectivo. Beys-da-Silva et al., (2010b), reportaram que, quando a atividade da lipase foi bloqueada utilizando um inibidor específico, o controle do carrapato *R. microplus* não foi efetivo, demonstrando a importância desta classe de enzimas no início do processo de infecção.

2.9 Enzimas oxidativas

Em resposta à colonização fúngica, o sistema imunológico do artrópode ativa substâncias como a profenoxidase, que atuam na cutícula e na hemolinfa desencadeando uma série de reações que resultam na produção de melanina (LOVETT; ST LEGER, 2014). A partir de então se inicia um processo de melanização para tentar proteger o hospedeiro

infectado, produzindo espécies reativas de oxigênio que são metabólitos tóxicos para o fungo (BOGDAN; RÖLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000; KOMAROV et al., 2009).

Diante disto, diversos autores reportaram a presença de proteínas relacionadas com a detoxificação/proteção do fungo contra espécies reativas de oxigênio, que são enzimas oxidativas, sendo elas: Superóxido Dismutases (SOD), Catalases e Peroxidases (FREIMOSER et al., 2003; 2005; DUTRA et al., 2004; SANTI et al., 2009; SANTI et al., 2010; BEYS-DA-SILVA et al., 2014).

As SODs são metaloenzimas antioxidantes que catalisam a redução desproporcional (dismutação) de radicais superóxido (O_2^-). Esta enzima foi isolada em 1938 por Mann e Keilin, mas apenas em 1969 Mccord e Fridovich descobriram a função das SODs. Para o fungo *M. anisopliae* s.l. foi descrita a presença de três SODs, denominadas: CuZnSOD, MnSOD e FeSOD (BASSANESSI, 1992; SCHRANK et al., 1993; WAGNER et al., 2001).

Catalases e peroxidases são as enzimas que degradam H_2O_2 em água e oxigênio, diminuindo assim os níveis intracelulares de peróxido de hidrogênio (WANG; ST LEGER, 2007). Essas enzimas, juntamente com as superóxido dismutases, são os mecanismos de defesa primários da célula contra as espécies reativas de oxigênio. Miller et al. (2004), demonstraram haver um aumento da atividade de catalase durante a germinação e crescimento de *M. anisopliae* s.l.

Li et al. (2017), realizaram um estudo utilizando uma cepa mutante de *Metarhizium acridum* que possuía um gene análogo ao gene que está ligado com a produção de catalases e peroxidases, este gene mutante (*MakatG1*) reduz a produção destas enzimas. Ao expor ninfas de *Locusta migratoria* a cepa selvagem e a cepa mutante, observaram que o gene mutante diminuiu a virulência, germinação e formação do apressório, quando comparado com a cepa selvagem.

Outra função importante das enzimas antioxidantes é a proteção dos conídios no ambiente contra as espécies reativas de oxigênio formadas pela radiação solar ultravioleta (UV-A e UV-B). Sendo a alta tolerância à radiação UV muito importante para o sucesso de *Metarhizium* como agente comercial para controle de pragas (SANTI et al., 2010).

Deste modo, as enzimas oxidativas são favoráveis ao fungo durante os processos de penetração e colonização, assim como na manutenção da virulência destes microrganismos no ambiente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de Realização dos Experimentos

Os experimentos foram realizados de janeiro/2017 a março/2018 nas instalações do Laboratório de Controle Microbiano (LCM) localizado na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas Wilhemn Otto Neitz (EPPWON) do Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Instituto de Veterinária (IV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica - RJ, Brasil.

3.2 Obtenção e Seleção dos Isolados de *Metarhizium anisopliae*.1.

Para a realização dos experimentos foram utilizados quatro isolados brasileiros (IBCB 116, IBCB 383, IBCB 410 e IBCB 481) do fungo *Metarhizium anisopliae* s.l. (Tabela 1). Os isolados foram gentilmente cedidos à UFRRJ pelo Instituto de Biologia de São Paulo aos cuidados da professora Dr^a Vania R. E. P. Bittencourt.

Tabela 1 – Isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l., substrato/hospedeiro de isolamento e regiões geográficas de origem.

Isolado	Substrato de isolamento	Origem geográfica
IBCB 116	Solo	Contagem--MG
IBCB 383	<i>Mahanarva fimbriolata</i> (Homoptera: Cercopidae)	Água Branca -- SP
IBCB 410	Lepidoptera	Petar-Iporanga - SP
IBCB 481	Solo	Campinas - SP

A escolha dos isolados foi baseada em um estudo prévio realizado por Quinelato et al. (2012) que demonstrou variação na virulência entre 30 isolados de *Metarhizium* spp. para larvas de *R. microplus*.

3.3 Manutenção dos isolados fúngicos

Os isolados encontravam-se preservados em óleo mineral na micoteca do LCM. Para recuperação, todos foram inicialmente repicados em placas de Petri (90 x 15 mm – Prolab[®]) contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) (Kasvi[®]) e mantidos em câmara climatizada do tipo B.O.D. (Biological Oxygen Demand) a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura e UR $\geq 80\%$ por 15 dias.

3.4 Infecção *in vitro* de Fêmeas Ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*

3.4.1 Preparo das suspensões fúngicas e viabilidade dos conídios

A elaboração das suspensões foi realizada a partir das placas com os respectivos isolados. Os conídios de cada isolado fúngico foram raspados da superfície do meio de cultura e suspensos em água destilada estéril acrescida de Tween[®] 80 (Vetec[®]) a 0,01%.

As suspensões iniciais foram elaboradas na concentração de 1×10^8 conídios mL^{-1} e quantificadas com auxílio de câmara de Neubauer (Kasvi[®]) e microscópio óptico (Nikon[®]) segundo Alves (1998). Na sequência, foi realizada uma diluição decimal seriada para a obtenção das suspensões na concentração de 1×10^7 conídios mL^{-1} .

Uma alíquota da suspensão contendo 1×10^7 conídios mL^{-1} de cada isolado de *M. anisopliae* s.l. foi depositada em placa de Petri contendo meio BDA, sendo incubadas sob temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e U.R. $\geq 80\%$ durante 24 horas. A determinação do percentual de germinação dos conídios foi realizada segundo Alves (1998).

3.4.2 Obtenção das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*

Para a obtenção das fêmeas ingurgitadas, três bezerros foram artificialmente infestados por três dias consecutivos com larvas provenientes de 500 mg de ovos previamente separados. Todo o procedimento antes de sua execução foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)-da UFRRJ tendo como número de protocolo 113/2014. Após 21 dias da infestação, as fêmeas totalmente ingurgitadas que se desprendiam dos animais foram coletadas do chão das baias. No laboratório, as mesmas foram lavadas em água corrente e

higienizadas com solução de hipoclorito de sódio a 0,05% por três minutos para a assepsia externa da cutícula. Cada fêmea foi individualmente pesada e separada em classes de peso segundo a formula de Yule (SAMPAIO, 2002) para assim formarem os grupos de carrapatos.

3.4.3 Ensaio biológico com fêmeas ingurgitadas

Para o ensaio biológico, foram formados nove grupos contendo dez fêmeas cada: um grupo controle, que recebeu tratamento com água destilada estéril e Tween[®] 80 a 0,01%, quatro grupos tratados com suspensão aquosa na concentração de 1×10^7 conídios mL^{-1} e quatro grupos tratados com suspensão na concentração de 1×10^8 conídios mL^{-1} , sendo um grupo para cada isolado de *Metarhizium*. Os ensaios foram repetidos duas vezes.

O tratamento foi realizado a partir da imersão individual das fêmeas em um mL da suspensão fúngica do respectivo isolado ou água destilada estéril e Tween[®] 80 a 0,01% (controle) durante três minutos. Após o tempo de tratamento, foi retirado o excesso de suspensão, sendo cada fêmea fixada em decúbito dorsal nas placas de Petri contendo fita adesiva e mantidas em B.O.D. a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} \geq 80\%$ para a observação dos parâmetros biológicos. Diariamente, a postura de cada fêmea foi pesada e armazenada em frascos de vidro, mantidos sob as mesmas condições descritas acima, para a determinação do percentual de eclosão das larvas. Ao final do experimento, o peso residual de cada fêmea do grupo também foi determinado com auxílio de balança de precisão (Shimadzu[®]).

Os parâmetros biológicos avaliados foram Peso Total da Massa de Ovos (P.T.M.O.), Índice de Produção de Ovos (I.P.O.), Percentual de Eclosão das Larvas (P.E.L.) e Índice Nutricional (I.N.) de acordo com as fórmulas descritas por Bennett (1974). Para a determinação da eficácia do tratamento *in vitro* foram calculados também a Eficiência Reprodutiva (E.R.) e o Percentual de Controle (% Controle) baseado nas fórmulas de Drummond et al. (1971).

3.4.4 Reisolamento fúngico

Após avaliação dos parâmetros biológicos das fêmeas ingurgitadas dos grupos tratados e controle foram incubadas em câmara úmida e mantidas em B.O.D. a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} \geq 80\%$

para facilitar o desenvolvimento e externalização do fungo e posterior confirmação de suas características macro e micromorfológicas (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009).

3.4.5 Análise estatística

A estatística dos ensaios biológicos foi realizada a partir do programa BioEstat 5.3 (Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá), sendo os dados paramétricos avaliados pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey (comparação entre as médias) e não paramétricos pelo teste de Kruskal Wallis seguido de Student-Newman-Keuls (SNK) (comparação entre as ordenações médias) com nível de significância de 5% ($p > 0,05$).

3.5 Avaliação da produção conidial

3.5.1 Produção conidial em meio de cultura batata-dextrose-ágar

Para a realização da quantificação da produção conidial dos isolados foram preparadas quatro suspensões fúngicas na concentração de 1×10^6 conídios mL^{-1} (uma suspensão para cada isolado fúngico). Cinco microlitros (μL) de cada suspensão foram inoculados no centro de placas de Petri de 90×15 mm de diâmetro contendo meio de cultura BDA, sendo feitas seis réplicas. Após a inoculação do fungo, as placas foram mantidas em câmaras com temperatura e umidade controladas ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} \geq 80\%$) durante 15 dias.

Em cada colônia, foram realizados três cortes de $0,7 \text{ cm}^2$ de uma amostra do centro, uma da porção mediana e uma da periferia da colônia. Na sequência, os cortes foram ressuspensos em tubos contendo dez mL de água destilada estéril e Tween[®] 80 a 0,1%, sendo agitados vigorosamente em aparelho do tipo vórtex (Kasvi[®]) por 1 minuto. A quantificação foi realizada a partir de $10 \mu\text{L}$ de suspensão através da observação direta em microscópio óptico com auxílio de câmara de Neubauer. Com base nos valores obtidos calculou-se a quantidade de conídios produzidos por área (cm^2) (adaptado de FREGONESI; MOCHI; MONTEIRO, 2016).

A análise estatística foi realizada utilizando o programa Bio Estat 5.3, utilizando o teste de Kruskal Wallis seguido de Student-Newman-Keuls (SNK) (comparação entre as ordenações médias) com nível de significância de 95% ($p < 0,05$). Os gráficos foram produzidos utilizando o programa GraphPad[®] Prism 5.

3.5.2 Produção dos conídios em arroz

A partir dos conídios obtidos do cultivo em meio de cultura artificial, foram preparadas suspensões aquosas de cada isolado fúngico na concentração de 1×10^8 conídios mL^{-1} , que foram quantificadas com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico segundo Alves (1998). Em capela de fluxo laminar (Airstream®), um mL de suspensão de cada isolado foi inoculado em sacos de polipropileno de 36 x 40 x 0,01cm, contendo 500 g de arroz parboilizado e 150 mL de solução peptonada a 0,5% previamente autoclavados (Adaptado de SANTI et al., 2010). Os sacos foram identificados e devidamente vedados com auxílio de fita adesiva. Posteriormente, foram armazenados em B.O.D a temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e U.R. $\geq 80\%$ por 20 dias. Durante todos os dias do experimento os sacos foram manualmente agitados para a fragmentação de agregados e dispersão do fungo por todo substrato.

Após os vinte dias, os sacos com os substratos foram retirados da B.O.D e colocados em estufa com temperatura de 28°C durante três dias para reduzir a umidade relativa. Na sequência, o arroz foi peneirado para a retirada dos conídios com auxílio de peneirador automático (Bertel® Indústria Metalúrgica Ltda). A produção conidial total foi pesada e calculado o percentual de rendimento levando em consideração a produção de conídios (g) em 100 g de arroz (ALVES, 1998). Após pesagem, os conídios foram conduzidos para a realização dos estudos enzimáticos (Adaptado de SANTI et al., 2010).

3.6 Estudos enzimáticos

3.6.1 Extração proteica conidial

Para a realização da extração das proteínas da superfície conidial (PSC) e das proteínas intracitoplasmáticas conidiais (PIC) foram utilizados conídios provenientes do crescimento em arroz (item 3.5.2). Inicialmente, para cada um grama (1g) de conídios, foram adicionados 2,5 mL de tampão de extração (Tris-HCl 50mM pH 8,0 + Triton X-100 a 0,25%).

Na obtenção de PSC, os conídios foram vigorosamente agitados por cinco minutos em vórtex (Kasvi®), sendo sequencialmente separados da fração líquida com o auxílio de centrifuga refrigerada (Hettich®) a 5000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante obtido foi filtrado

com filtro Millex 0,22 μm (Millipore[®]), dividido em alíquotas e armazenados a -20°C até a realização dos ensaios enzimáticos (SANTI et al., 2010).

Após a extração da PSC, o sedimento obtido na centrifugação foi utilizado para obtenção da PIC. Para a ruptura da parede conidial, os conídios foram transferidos para cadinhos estéreis de porcelana e macerados com auxílio de pistilo em nitrogênio líquido. Assim como para PSC, as fases de extração, centrifugação, filtração e armazenamento foram realizadas como descrito anteriormente pra PSC.

3.6.2 Extração proteica micelial

Para a extração das proteínas miceliais, os isolados fúngicos foram crescidos em meio mínimo líquido (0,6% de NaNO_3 ; 0,05% de KH_2PO_4 e 0,05% de MgSO_4). Um mL de cada suspensão fúngica na concentração de 1×10^6 conídios mL^{-1} foi introduzido em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL de meio mínimo enriquecido com 1% de cutícula de fêmeas de *R. microplus* e 1 % de estearato de colesterol (Sigma[®]) (BEYS-DA-SILVA et al., 2010b). Todos os isolados foram crescidos em triplicata e incubados em agitador orbital a 25°C e 150 rpm por 72 horas.

A obtenção das proteínas do secretado micelial (PSM) foi obtida a partir da adição de 250 μL de tampão de extração (SILVA et al., 2005) nos frascos contendo os isolados fúngicos crescidos em meio mínimo e agitação manual durante cinco minutos. Na sequência, o micélio foi separado da fração líquida usando papel de filtro (Whatman[®] n° 1) com auxílio de bomba de vácuo (Neuoni[®]). O líquido obtido foi filtrado por sistema de microfiltração (Millex 0,22 μm Millipore[®]) e aliqotado em microtubos, sendo mantido armazenado a -20°C até a realização dos ensaios enzimáticos.

Para a obtenção das proteínas intracitoplasmáticas miceliais (PIM), os micélios de cada isolado obtidos após extração de PSM foram pesados individualmente, transferidos para cadinhos estéreis e macerados em nitrogênio líquido. Na sequência, foram adicionados tampão de extração na proporção 1:2,5 (p/v) e o macerado mais o tampão de extração foram transferidos para tubos de polipropileno de fundo cônico, sendo agitados com auxílio de vórtex (KASVI[®]) por cinco minutos. O PIM foi separado do sedimento com auxílio de centrífuga refrigerada (5000 rpm por 3 minutos). A fração líquida foi filtrada por sistema de microfiltração (Millex 0,22 μm Millipore[®]) sendo aliqotada e também armazenada a -20°C até a realização dos experimentos.

3.6.3 Determinação da concentração de proteínas totais

A determinação da quantidade de proteína total ($\mu\text{g/mL}$) de PSC, PIC, PSM e PIM foi realizada segundo o método de Lowry modificado (MARKWELL et al., 1978), sendo a curva padrão elaborada a partir de diluições seriadas (de 0,5 a 5 $\mu\text{g/mL}$) de albumina sérica bovina (Sigma[®]) como padrão. A absorbância das amostras e da curva padrão foram mensuradas em triplicata com auxílio de espectrofotômetro (Boeco Germany[®]) a 595 nm. Os valores da concentração de proteínas totais foram utilizados para realizar as correções dos valores das atividades enzimáticas.

3.6.4 Determinação da atividade proteolítica total

A atividade proteolítica total foi caracterizada a partir da hidrólise da azocaseína (Sigma[®]) (SANGORRÍN et al., 2001). Em microtubos de 1,5 mL de volume, 100 μL de amostra, 100 μL de solução de azocaseína a 2% e 200 μL de tampão fosfato de sódio (Merck[®]) a 50 mM e pH 7,9 foram incubados em banho-maria (Quimis[®]) a 50°C por 15 minutos. Para a realização do branco, foram utilizados somente o tampão fosfato de sódio e o substrato de azocaseína. Após incubação, a reação foi paralisada com a adição de 800 μL de ácido tricloroacético (Merck[®]) a 20%. As amostras foram centrifugadas a 4000 \times g por 5 minutos e a absorbância determinada por leitura em espectrofotômetro (Boeco Germany[®]) a 400 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos três vezes para ambos os grupos.

Uma unidade enzimática específica (U específica) foi definida como a quantidade capaz de aumentar a absorbância em 0.1 unidade quando comparado ao branco (controle) durante uma hora em função da concentração de proteínas totais obtidas (U/ μg) (SANTI et al., 2010).

3.6.5 Determinação da atividade proteolítica de Pr1

A atividade enzimática da serino protease tipo subtilisina (Pr1) foi determinada pela hidrólise de 5 μ L do substrato cromogênico N-suc-ala-ala-pro-phe- ρ NA (Sigma[®]) 1 mM. Cinco microlitros de cada amostra foram incubados com o substrato em 90 μ L de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 (Sigma[®]). Os ensaios foram mantidos a 37°C por 30 minutos e a absorbância mensurada em espectrofotômetro (ThermoCientific[®]) equipado com termostato e agitador a 405 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos três vezes para ambos os grupos.

A atividade enzimática foi calculada a partir da curva padrão de ρ -nitroanilina, sendo considerada uma U específica a quantidade de enzima capaz de produzir um ρ mol de ρ -nitroanilina por hora por micrograma de proteína (U específica) (U/ μ g) (SANTI et al., 2010).

3.6.6 Determinação da atividade proteolítica de Pr2

A atividade enzimática da serino protease do tipo tripsina (Pr2) foi determinada pela hidrólise de 5 μ L do substrato cromogênico Bz-phe-val-arg- ρ NA (Sigma[®]) a 1 mM. Assim como para Pr1, tanto a realização do ensaio enzimático quanto o cálculo das U específicas enzimáticas seguiram a metodologia descrita no tópico 3.6.5.

3.6.7 Determinação da atividade lipolítica

A atividade lipolítica foi determinada pela hidrólise do substrato cromogênico ρ -nitrofenol palmitato (ρ NPP) (Sigma[®]) (BEYS-DA-SILVA et al., 2010a). Para a preparação do substrato, foi elaborada uma emulsão na proporção de 1:9 da solução A (1:3 p/v de ρ NPP em isopropanol) com a solução B (450 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (Sigma[®]); 0,5 g de goma arábica (Tonbras[®]) e 2 g de Triton X-100 (Impex[®])). Para o ensaio enzimático foram adicionados 10 μ L de amostra e 90 μ L de emulsão em microplacas de 96 poços (TPP[®]).

As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro (ThermoScientific[®]) a 410 nm no tempo zero (T0), que marca o tempo imediato após a aplicação da emulsão sobre a amostra, e 30 minutos após incubação das mesmas a 37°C (T30). A atividade enzimática lipolítica foi determinada pela subtração dos valores de

absorbância de T20 – T0 e os valores foram calculados em função de uma curva de p-nitrofenol previamente elaborada.

A definição de uma U específica de lipase foi determinada como a quantidade de enzima necessária para liberar um pmol de p-nitrofenol por hora por micrograma de proteína nas condições supracitadas. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos três vezes para todos os grupos, tendo o branco sido descontado do valor das absorbâncias de cada amostra (SANTI et al., 2010).

3.6.8 Determinação de Superóxido Dismutase

O ensaio de superóxido dismutase (SOD) foi realizado de acordo com metodologia proposta por Beyer e Fridovich (1987). Um mL de solução contendo tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,8; L-metionina 13 mM; nitroblue tetrazólio cloreto (NBT) 75 mM; 0,1 mM de EDTA e 0,025% de Triton X-100 foi adicionado em tubos de ensaio. Para início das reações, a amostra e riboflavina 10 mM foram adicionados junto à solução ao mesmo tempo, sendo os tubos acondicionados sob luz fluorescente por 15 minutos. Após esse período, a absorbância foi determinada a 560 nm. Uma unidade específica de SOD foi caracterizada como a redução de NBT por mL por hora em função da concentração de proteínas totais da respectiva amostra.

3.6.9 Determinação de Catalase

A atividade de catalase foi determinada usando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como substrato (CAKMAK; MARSCHNER, 1992). Vinte e cinco microlitros de cada amostra foram adicionados em dois mL de tampão fosfato a 25 mM pH 8,0 acrescido de 10 mM de H₂O₂, sendo a atividade enzimática estimada durante três minutos a 240 nm. Uma unidade de catalase (U específica) foi caracterizada como a redução na absorbância por hora em função da concentração de proteínas totais amostradas (SANTI et al, 2010).

3.6.10 Determinação de Peroxidase

A atividade da peroxidase foi determinada a partir da formação de tetraguaiacol (VIEIRA; LUPETTI; FATIBELLO-FILHO, 2003). A reação foi caracterizada a partir da

inclusão de 100 μ L de amostra em tampão fosfato 0,1 M pH 6,5 acrescido de guaiacol (50mM) e H_2O_2 (10,3 mM). A variação foi monitorada durante cinco minutos a 470 nm, no qual uma U específica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento de 0,001 na absorbância por hora por μ g de proteína sob as condições descritas acima (SANTI et al., 2010).

4 RESULTADOS

4.3 Avaliação da Produção Conidial

A produção de conídios em meio BDA variou de acordo com cada isolado (Figura 4). O isolado IBCB 383 apresentou a maior concentração de conídios por área ($10,4 \times 10^6$ conídios/cm²), considerada significativa ($p \leq 0,05$), quando comparado com 116 ($3,52 \times 10^6$ conídios/cm²), IBCB 410 ($4,72 \times 10^6$ conídios/cm²) e IBCB 481 ($6,05 \times 10^6$ conídios).

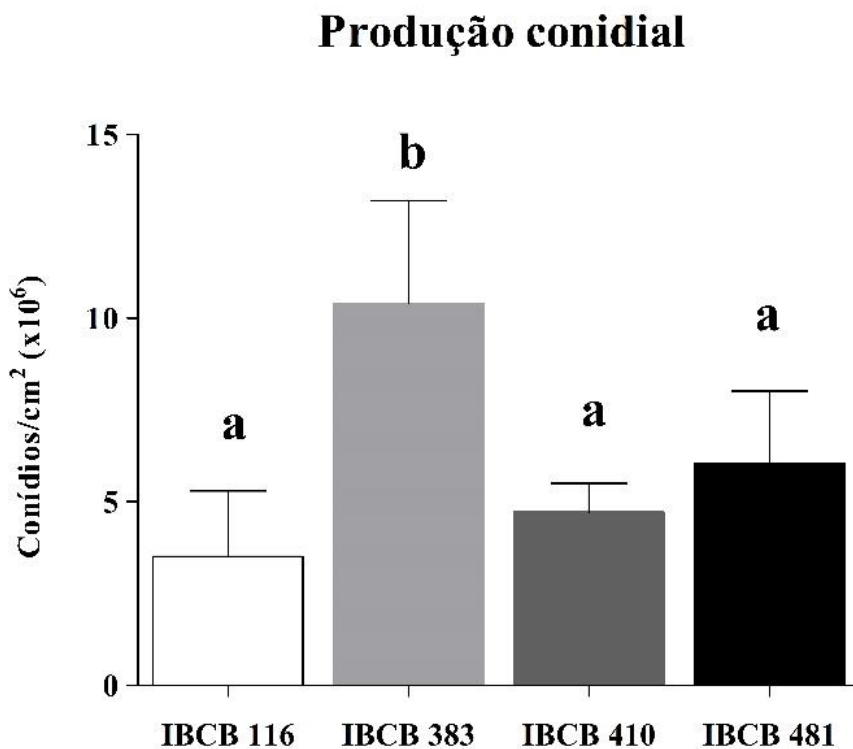


Figura 3: Média e desvio padrão da produção conidial dos isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l. crescidos em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), durante 15 dias sob condições controladas de temperatura e umidade ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} \geq 80\%$). Média seguida da mesma letra não difere significativamente entre si no teste de Kruskal-Wallis seguido do teste Student-Newman-Keuls ($p \geq 0,5$)

Com relação à produção conidial após crescimento em arroz, o rendimento foi determinado em porcentagem para cada um dos isolados. Assim como em meio de cultura artificial o isolado IBCB 383 apresentou a maior conidiogênese, apresentando rendimento

superior (10%) aos demais (7% para IBCB 481, 6% para IBCB 410 e 0,2% para IBCB 116), produzindo cerca de até 0,1 g de conídios por g de arroz processado.

4.4 Viabilidade dos conídios

Em todos os isolados de *M. anisopliae* s.l. estudados, o percentual de germinação dos conídios foi superior a 98% após 24 horas de incubação em BOD a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e U.R. $\geq 80\%$.

4.5 Bioensaio com fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*

Todos os parâmetros biológicos avaliados a partir do tratamento de fêmeas de *R. microplus* encontram-se dispostos na Tabela 3. Não houve diferença estatística no P.I.F. das fêmeas entre os grupos, de modo que todas as alterações encontradas nos parâmetros biológicos foram causadas pelo tratamento fúngico. Em relação ao P.T.M.O., os isolados IBCB 383, IBCB 410 e IBCB 481, somente na maior concentração testada (10^8 conídios mL^{-1}), foram capazes de reduzir significativamente em torno de 21%, 31% e 33%, respectivamente, o peso médio de ovos obtidos até o final da postura das fêmeas quando comparados ao grupo controle.

Para o P.E.L., com exceção de IBCB 116, os demais isolados reduziram significativamente a eclodibilidade das larvas de *R. microplus* quando comparados ao grupo controle, com reduções variando entre 7,1% (IBCB 383 - 10^7 conídios mL^{-1}) e 18,9% (IBCB 410 - 10^8 conídios mL^{-1}).

Em relação ao I.P.O., três isolados fúngicos foram capazes de alterar este parâmetro. Na concentração de 10^8 conídios mL^{-1} , os isolados IBCB 383, IBCB 410 e IBCB 481 reduziram significativamente em torno de 22%, 32% e 34%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle, entretanto, na concentração 10^7 conídios mL^{-1} , apenas os IBCB 410 e IBCB 481 apresentaram redução significativa deste parâmetro.

Já para o I.N., todos os isolados, na maior concentração testada (10^8 conídios mL^{-1}) e os isolados IBCB 410 e 481 também com a menor concentração (10^7 conídios mL^{-1}), apresentaram redução significativa quando comparados ao grupo controle, registrando diminuições entre 12% (IBCB 410 - 10^7 conídios mL^{-1}) e 27% (IBCB 481 - 10^8 conídios mL^{-1}) do parâmetro em questão.

Para os quatros isolados avaliados, o percentual de controle variou entre 14% a 44%, sendo o IBCB 116 o isolado que apresentou os menores percentuais, mesmo na maior concentração. Para os demais isolados, as maiores porcentagens foram registradas para fêmeas tratadas com suspensões na concentração de 10^8 conídios mL^{-1} , sendo IBCB 481 considerado o mais eficaz dentre os isolados testados.

Tabela 2 -Valor médio e desvio padrão do Peso Inicial da Fêmea (P.I.F.), Peso Total da Massa de Ovos (P.T.M.O.), Percentual de Eclosão das Larvas (P.E.L.), Índice de Produção de Ovos (I.P.O.), Índice Nutricional (I.N.) e Percentual de Controle (% Controle) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão em suspensão aquosa de 1×10^7 e 1×10^8 conídios mL^{-1} dos diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. e mantidas a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e U.R. $\geq 80\%$.

Grupo	P.I.F. (g)	P.T.M.O. (g)	P. E.L. (%)	I.P.O.	I.N.	% Controle
CTR	0,2536 \pm 0,0200 a	0,1482 \pm 0,0200 a	99,40 \pm 0,92 a	58,49 \pm 4,41 a	70,11 \pm 7,17 a	-
IBCB 116 10⁷	0,2563 \pm 0,0232 a	0,1309 \pm 0,0269 ac	97,30 \pm 3,00 ac	51,24 \pm 9,74 ac	61,45 \pm 8,73 ac	14,42
IBCB 116 10⁸	0,2558 \pm 0,0228 a	0,1311 \pm 0,0183 ac	97,40 \pm 1,68 ad	51,28 \pm 5,27 ac	61,01 \pm 6,66 bc	14,19
IBCB 383 10⁷	0,2563 \pm 0,0219 a	0,1355 \pm 0,0162 ac	92,30 \pm 4,58 bcd	53,18 \pm 7,24 ac	64,67 \pm 7,36 ac	15,76
IBCB 383 10⁸	0,2555 \pm 0,0214 a	0,1165 \pm 0,0338 bc	92,10 \pm 8,62 bcd	45,48 \pm 12,47 bcd	56,58 \pm 13,19 bc	26,25
IBCB 410 10⁷	0,2561 \pm 0,0223 a	0,1296 \pm 0,0169 ac	89,40 \pm 8,59 bcd	50,71 \pm 5,90 bc	61,08 \pm 4,99 bc	21,81
IBCB 410 10⁸	0,2561 \pm 0,0219 a	0,1013 \pm 0,0304 bd	80,60 \pm 28,54 bd	39,69 \pm 11,82 d	52,59 \pm 13,16 bd	40,71
IBCB 481 10⁷	0,2561 \pm 0,0230 a	0,1270 \pm 0,0258 ac	87,40 \pm 19,68 bcd	49,59 \pm 9,67 bc	60,51 \pm 8,66 bc	25,53
IBCB 481 10⁸	0,2562 \pm 0,0232 a	0,0993 \pm 0,0167 d	84,00 \pm 12,21 b	38,82 \pm 6,08 d	50,84 \pm 6,93 d	44,67

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si ($p \geq 0,05$). Os resultados foram avaliados usando o teste Kruskal-Wallis seguido de SNK. O ensaio biológico foi repetido duas vezes.

4.6 Atividade Enzimática

4.6.1 Atividade proteolítica geral (azocaseína)

A atividade proteolítica referente à hidrólise da azocaseína encontra-se disposta na Figura 6. Quando analisadas as atividades conidiais, em relação à superfície conidial (Figura 5A), IBCB 481 e IBCB 410 foram aqueles que apresentaram os maiores números de unidades enzimáticas por micrograma de proteína ($60,06 \pm 1,27$ U e $18,51 \pm 0,75$ U, respectivamente) diferindo significativamente dos demais isolados. Já quanto à porção intracitoplasmática (Figura 5B), novamente os conídios de IBCB 481 apresentaram atividades superiores aos demais isolados ($58,95 \pm 2,49$ U), seguidos do isolado IBCB 116 ($35,67 \pm 1,08$ U).

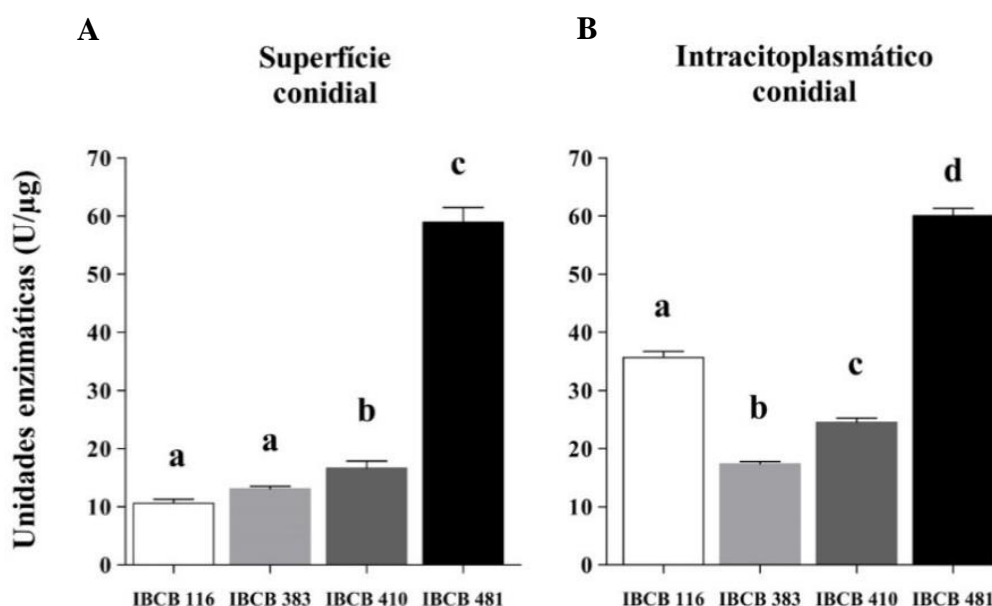


Figura 4: Atividade proteolítica geral com azocaseína (U/μg) de conídios dos diferentes isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l. da superfície conidial (A) e da porção intracitoplasmática conidial (B) após crescimento em meio de cultivo sólido (arroz) acrescido de 0,5% de peptona caseinada. Médias seguidas das mesmas letras no mesmo gráfico não diferem significativamente entre si através da análise de variância (ANOVA) seguida do teste Tukey ($P \geq 0,01$).

Em relação ao secretado micelial (Figura 6A), IBCB 481 apresentou $7,25 \pm 1,62$ U após 72 horas de crescimento, secretando entre duas e cinco vezes mais unidades enzimáticas do que os demais isolados. Em contrapartida, quando analisadas as porções intracitoplasmáticas (Figura 6B), IBCB 116 foi o único isolado a apresentar alta atividade proteolítica ($10,96 \pm 1,62$ U) quando comparado aos demais.

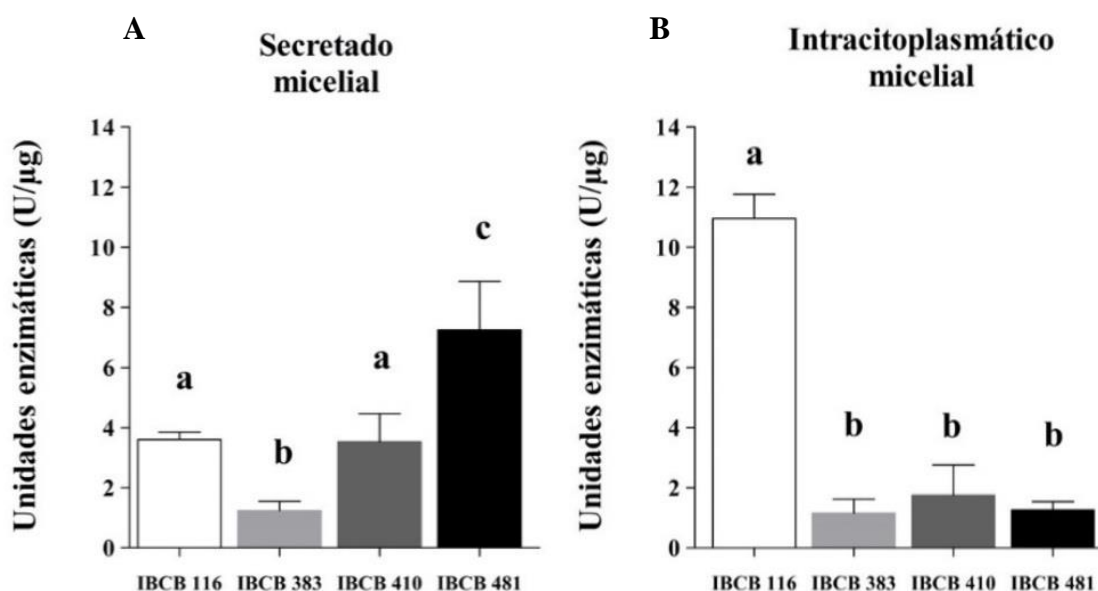


Figura 5: Atividade proteolítica geral com azocaseína (U/μg) de micélios dos diferentes isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l. a partir do secretado micelial (A) e da porção intracitoplasmáticamicelial(B) após 72 horas de crescimento em meio mínimo líquido contendo 1% de cutícula do carrapato *Rhipicephalus microplus*. Médias seguidas das mesmas letras no mesmo gráfico não diferem significativamente entre si através da análise de variância (ANOVA) seguido do teste Tukey ($p \geq 0,01$).

4.5.2 Atividade proteolítica específica de Pr1

A atividade proteolítica específica de Pr1 encontra-se disposta na Tabela 4. Na superfície conidial, o número de unidades enzimáticas variou entre 3,03 U e 8,71 U, com IBCB 481 e IBCB 410 apresentando maior atividade ($8,71 \pm 0,79$ e $5,15 \pm 0,47$, respectivamente). Já na porção intracitoplasmática do conídio, a variação registrada foi entre 10,67 U e 13,79 U, no qual IBCB 383 foi o único isolado a apresentar diferença significativa quando comparado aos demais ($13,79 \pm 0,29$ U).

Com relação ao secretado micelial, IBCB 116 e IBCB 383 apresentaram atividade enzimática semelhante, assim como IBCB 410 e IBCB 481, entretanto estes dois últimos isolados foram os que alcançaram maiores valores de atividade enzimática ($12,85 \pm 0,68$ U e $14,21 \pm 0,92$ U, respectivamente). Por fim, quando avaliada a fração intracitoplasmática micelial, a atividade variou entre 0,92 U e 2,00 U, sendo os isolados IBCB 481 e IBCB 383 aqueles que demonstraram as maiores atividades proteolíticas.

Tabela 3– Média e desvio padrão da atividade de Pr1 (U/ μ g) de conídios (superfície e fração intracitoplasmática conidial) e micélio (secretado e fração intracitoplasmática micelial) de isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l. crescidos sob condições controladas de temperatura e umidade ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} \geq 80\%$).

	Conídio (U/ μ g)		Micélio (U/ μ g)	
	Superfície conidial	Intracitoplasmático conidial	Secretado micelial	Intracitoplasmático micelial
IBCB 116	$3,03 \pm 0,29$ a	$10,67 \pm 0,86$ a	$5,63 \pm 0,09$ a	$0,92 \pm 0,02$ a
IBCB 383	$4,36 \pm 0,55$ ac	$13,79 \pm 0,29$ b	$7,25 \pm 0,16$ a	$1,91 \pm 0,03$ bc
IBCB 410	$5,15 \pm 0,47$ bc	$11,20 \pm 0,60$ a	$12,85 \pm 0,68$ b	$1,20 \pm 0,02$ ac
IBCB 481	$8,71 \pm 0,79$ b	$11,00 \pm 0,64$ a	$14,21 \pm 0,92$ b	$2,00 \pm 0,15$ b

Médias seguidas das mesmas letras na mesma coluna não diferem significativamente entre si através da análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($P \geq 0,05$).

4.5.3 Atividade proteolítica específica de Pr2

Os resultados da atividade específica de Pr2 estão representados na Tabela 5. Com relação ao conídio, tanto para a superfície conidial quanto para a fração intracitoplasmática, IBCB 481 apresentou atividade superior a IBCB 116 e IBCB 383, e atividade proteolítica semelhante a IBCB 410.

No secretado micelial, IBCB 383 ($9,67 \pm 0,26$ U) e 481 ($9,28 \pm 0,33$ U) foram semelhantes com as maiores atividades. Nesta mesma condição, IBCB 116 foi o isolado que apresentou a menor atividade enzimática dentre os isolados ($7,41 \pm 0,36$ U). Para a fração intracitoplasmática, IBCB 116 se manteve registrando a menor atividade proteolítica intracelular ($6,10 \pm 0,41$ U), se diferenciando dos demais isolados, que apresentaram atividade numericamente semelhante.

Tabela 4– Média e desvio padrão da atividade de Pr2 (U/μg) de conídios (superfície e fração intracitoplasmática conidial) e micélio (secretado e fração intracitoplasmática micelial) de isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae s.l.* crescidos sob condições controladas de temperatura e umidade (25±1°C e UR≥80%).

	Conídio (U/μg)		Micélio (U/μg)	
	Superfície conidial	Intracitoplasmático conidial	Secretado micelial	Intracitoplasmático micelial
IBCB 116	0,41 ± 0,07 ab	0,17 ± 0,08 a	7,41 ± 0,36 a	6,10 ± 0,44a
IBCB 383	0,26 ± 0,06 b	0,40 ± 0,09 ac	9,67 ± 0,26 b	8,82 ± 0,46 b
IBCB 410	0,95 ± 0,16 c	1,15 ± 0,11 bc	8,51 ± 0,22 c	7,97 ± 0,50 b
IBCB 481	1,90 ± 0,34 c	2,23 ± 0,21 b	9,28 ± 0,33 bc	8,17 ± 0,61 b

Médias seguidas das mesmas letras na mesma coluna não diferem significativamente entre si através da análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($P \geq 0,05$).

4.5.4 Atividade lipolítica

Os resultados da atividade lipolítica encontram-se dispostos na Tabela 6. Em relação aos conídios, tanto para superfície conidial quanto para fração intracitoplasmática, IBCB 410 e IBCB 481 foram aqueles que apresentaram as maiores atividades dentre os isolados estudados, registrando resultados superiores aos observados para IBCB 116 e IBCB 383.

Em relação a análise do micélio, novamente o isolado IBCB 481 (0,207 ± 0,018), registrou o maior número de unidades enzimática. Tanto no secretado quanto na fração intracitoplasmática micelial, o isolado IBCB 116 apresentou a menor atividade (0,086 ± 0,018 U e 0,027 ± 0,008 U, respectivamente), sendo semelhante, ou seja, não se diferenciou estatisticamente do isolado IBCB 410 (0,149 ± 0,038) no secretado micelial e ao IBCB 383 (0,023 ± 0,006) na fração intracitoplasmática.

Tabela 5– Média e desvio padrão da atividade lipolítica (U/ μ g) de conídios (superfície e fração intracitoplasmática conidial) e micélio (secretado e fração intracitoplasmática micelial) de isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l. crescidos sob condições controladas de temperatura e umidade ($25\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR}\geq 80\%$).

	Conídio (U/ μ g)		Micélio (U/ μ g)	
	Superfície conidial	Intracitoplasmático conidial	Secretado micelial	Intracitoplasmático micelial
IBCB 116	$0,035 \pm 0,006$ a	$0,573 \pm 0,084$ a	$0,086 \pm 0,018$ a	$0,027 \pm 0,008$ a
IBCB 383	$0,021 \pm 0,007$ a	$0,155 \pm 0,023$ b	$0,168 \pm 0,015$ b	$0,023 \pm 0,006$ a
IBCB 410	$0,055 \pm 0,012$ b	$1,839 \pm 0,062$ c	$0,149 \pm 0,038$ ab	$0,062 \pm 0,019$ b
IBCB 481	$0,066 \pm 0,016$ b	$2,865 \pm 0,024$ d	$0,207 \pm 0,018$ b	$0,092 \pm 0,023$ c

Médias seguidas das mesmas letras na mesma coluna não diferem significativamente entre si através da análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($P \geq 0,05$).

4.5.5 Atividade de enzimas oxidativas

A atividade de superóxido dismutase (SOD) está representada na Tabela 7. Para as análises conidiais, o ensaio enzimático realizado só foi capaz de detectar atividade em três (IBCB 383, IBCB 410 e IBCB 481) dos quatro isolados testados. IBCB 481 foi o isolado com maior atividade ($24,99 \pm 1,69$ U), com resultados cerca de 1,3 a 2,4 vezes superiores a IBCB 383 e IBCB 410, respectivamente. Em contrapartida, quando avaliadas a fração intracitoplasmática, IBCB 116 apresentou a maior média de unidades enzimáticas ($104,51 \pm 6,28$ U), registrando resultados superiores aos demais isolados de aproximadamente 1,4 vezes (IBCB 383), 2,2 vezes (IBCB 410) e 1,3 vezes (IBCB 481).

Quanto à fração micelial, IBCB 383 ($137,62 \pm 8,10$ U) e IBCB 481 ($103,00 \pm 10,29$ U) apresentam maior atividade oxidativa no secretado micelial. Para a porção intracitoplasmática, novamente IBCB 383 foi o que apresentou uma das maiores atividades de SOD ($99,69 \pm 5,95$ U), juntamente com IBCB 116 ($101,27 \pm 10,02$ U).

Tabela 6– Média e desvio padrão da atividade de superóxido dismutase (U / μ g) de conídios (superfície e fração intracitoplasmática conidial) e micélio (secretado e fração intracitoplasmática micelial) de isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l. crescidos sob condições controladas de temperatura e umidade ($25\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR}\geq 80\%$).

	Conídio (U/ μ g)		Micélio (U/ μ g)	
	Superfície conidial	Intracitoplasmático conidial	Secretado micelial	Intracitoplasmático micelial
IBCB 116	*	104,51 \pm 6,28 a	43,30 \pm 3,56 a	101,27 \pm 10,02 a
IBCB 383	19,38 \pm 1,36 a	71,99 \pm 3,47 b	137,62 \pm 8,10 b	99,69 \pm 5,95 a
IBCB 410	10,61 \pm 1,19 b	46,15 \pm 3,76 c	64,47 \pm 9,25 c	79,61 \pm 5,21 b
IBCB 481	24,99 \pm 1,69 c	79,13 \pm 2,86 b	103,00 \pm 10,29 b	31,89 \pm 2,58 c

Médias seguidas das mesmas letras na mesma coluna não diferem significativamente entre si através da análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($P \geq 0,05$).

(*) Atividade enzimática não detectada nas condições experimentais avaliadas.

Os resultados da análise de catalase estão reportados na Tabela 8. Com relação à superfície conidial a atividade variou de 4,69 a 21,31 U. Com menor atividade dentre os demais, a atividade catalítica de IBCB 116 foi considerada cerca de cinco vezes inferior aos isolados com maior atividade (IBCB 383 e IBCB 481). Para a porção intracitoplasmática, novamente IBCB 116 apresentou a menor atividade catalítica (6,32 \pm 0,51 U), diferindo-se dos demais com resultados cerca de 8 a 10 vezes inferiores a IBCB 383, IBCB 410 e IBCB 481.

Já para o secretado micelial, a atividade de IBCB 116 e IBCB 383 foram semelhantes, sendo que o isolado que apresentou maior atividade (IBCB 410), registrou cerca de cinco vezes mais unidades enzimáticas do que o isolado com menor atividade catalítica (IBCB 481). Na fração intracitoplasmática, a variação de unidades ocorreu entre 0,49 U e 0,95 U, sendo IBCB 116 e IBCB 410 os isolados com maiores atividades catalíticas intracelulares (0,95 \pm 0,06 U e 0,84 \pm 0,04 U, respectivamente).

Tabela 7- Média e desvio padrão da atividade de catalase (U/ μ g) de conídios (superfície e fração intracitoplasmática conidial) e micélio (secretado e fração intracitoplasmática micelial) de isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l. crescidos sob condições controladas de temperatura e umidade ($25\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR}\geq 80\%$).

	Conídio (U/ μ g)		Micélio (U/ μ g)	
	Superfície conidial	Intracitoplasmático conidial	Secretado micelial	Intracitoplasmático micelial
IBCB 116	$4,69 \pm 0,43$ a	$6,32 \pm 0,51$ a	$0,57 \pm 0,06$ a	$0,95 \pm 0,06$ a
IBCB 383	$22,46 \pm 2,23$ b	$66,10 \pm 6,33$ b	$0,41 \pm 0,08$ a	$0,49 \pm 0,04$ b
IBCB 410	$16,79 \pm 1,60$ c	$52,70 \pm 5,66$ b	$1,72 \pm 0,16$ b	$0,84 \pm 0,04$ c
IBCB 481	$21,31 \pm 1,76$ b	$57,76 \pm 3,74$ b	$0,33 \pm 0,04$ c	$0,51 \pm 0,05$ b

Médias seguidas das mesmas letras na mesma coluna não diferem significativamente entre si através da análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($P \geq 0,05$)

Os resultados da atividade de peroxidase estão representados na Tabela 9. Em relação à atividade conidial, na maioria dos isolados, a peroxidação intracitoplasmática foi superior à registrada na superfície conidial. Como destaque, IBCB 116 apresentou os maiores números de U específica, tanto para análises da superfície conidial quanto da fração intracitoplasmática (603 ± 62 U e 803 ± 84 U, respectivamente).

Para as análises miceliais, IBCB 116 registrou menor atividade no secretado micelial (1474 ± 231 U) em comparação aos demais isolados. Já na porção intracitoplasmática, o mesmo isolado apresentou entre 2 a 3 vezes mais unidades enzimáticas do que IBCB 383 e IBCB 481.

Tabela 8- Média e desvio padrão da atividade de peroxidase (U/ μ g) de conídios (superfície e fração intracitoplasmática conidial) e micélio (secretado e fração intracitoplasmática micelial) de isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l. crescidos sob condições controladas de temperatura e umidade ($25\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR}\geq 80\%$).

	Conídio (U/ μ g)		Micélio (U/ μ g)	
	Superfície conidial	Intracitoplasmático conidial	Secretado micelial	Intracitoplasmático micelial
IBCB 116	603 ± 62 a	803 ± 84 a	1474 ± 231 a	1200 ± 28 a
IBCB 383	113 ± 20 b	242 ± 43 b	4803 ± 305 b	528 ± 59 b
IBCB 410	150 ± 32 b	312 ± 42 b	4593 ± 494 b	936 ± 48 a
IBCB 481	431 ± 59 a	264 ± 34 b	5198 ± 630 b	350 ± 88 b

Médias seguidas das mesmas letras na mesma coluna não diferem significativamente entre si através da análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($P \geq 0,05$).

5 DISCUSSÃO

Fungos artropodopatogênicos são os patógenos mais estudados, especialmente no Brasil, para controle de pragas agrícolas. Aproximadamente 50% dos biopesticidas registrados até então são provenientes de fungos (MASCARIN et al., 2018). Numa menor escala, porém de projeção significativa, os estudos envolvendo a patogenia e a eficácia sobre os diferentes estágios de carrapatos vêm crescendo com o passar dos anos (FERNANDES; BITTENCOURT; ROBERTS, 2012). *Metarhizium* é um dos gêneros fúngicos que tem sido amplamente investigado tanto a nível morfológico/molecular (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009; LOPES et al., 2018) quanto bioquímico (SANTI et al., 2010; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010; LOVETT; ST LEGER, 2014).

Por ser caracterizado como um deuteromiceto, nos meios de cultivo convencionais, como BDA, *Metarhizium* apresenta duas fases de desenvolvimento distintas: vegetativa (produção hifal) e reprodutiva (indução da conidiogênese) (KAMP; BIDOCHKA, 2002). Liu et al. (2003) e Fernandes et al. (2011), observaram que a produção de conídios apresentava variação para diferentes isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Quinelato et al., (2012), ao avaliarem a produção conidial de diversos isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l., observaram que IBCB 116, IBCB 383 e IBCB 481 apresentavam alto potencial de produção de conídios em meio de cultivo sintético (BDA), embora não tenham observado relação direta do número de conídios produzidos e a virulência para larvas de *R. microplus*, assim como observado neste trabalho. No presente estudo, IBCB 116 apresentou menor produção conidial por cm² de área analisada, evidenciando assim possíveis dificuldades de desenvolvimento. Passagens sucessivas em meios de cultura artificiais, especialmente para manutenções em laboratório, influenciam negativamente a produção de conídios por isolados fúngicos e até mesmo a virulência (SAFAVI, 2012; SANTORO et al., 2014; JIRAKKAKUL et al., 2018). Como alternativa, passagens por hospedeiros-alvo podem reduzir estes efeitos, inclusive aumentar a virulência do isolado. Num experimento que avaliou o efeito de sucessivas passagens de *M. anisopliae* em *R. microplus*, observou-se que a concentração letal (CL 50) foi drasticamente reduzida em função do número de ciclos de crescimento no hospedeiro (ADAMES et al., 2011).

No Brasil, em escala comercial, o crescimento em massa de *Metarhizium* baseia-se na utilização de meios sólidos. A produção do fungo em grão de arroz foi comprovada por Guagliumi, Marques e Vilas Boas (1974), Costa e Magalhães (1974) e Villacorta (1977), sendo considerado o principal substrato de crescimento fúngico das biofábricas nacionais (ALVES; PEREIRA, 1989). Do ponto de vista industrial, o rendimento é um importante parâmetro para determinar a produtividade conidial (FREITAS et al., 2014). Após crescimento em arroz, a maioria dos isolados do presente estudo apresentou bom rendimento (g de conídios/g de arroz), com exceção de IBCB 116. Alves e Pereira (1989) relataram que, para produções comerciais, o rendimento em torno de 11% é considerado satisfatório. Sabe-se que, exigências nutricionais, como requerimento de carbono e nitrogênio, podem modular a conidiogênese e limitar o crescimento em massa (KAMP; BIDOCHKA, 2002; FARIA; WRAIGHT, 2007). Deste modo, a baixa produção do isolado em questão pode estar relacionada com diversos fatores, como o tipo de substrato, baixa atividade enzimática na catabolização de nutrientes e/ou maior susceptibilidade aos fatores abióticos (ALVES, 1998).

Diversos isolados de *Metarhizium* spp. são virulentos para carrapatos (FERNANDES; BITTENCOURT, 2008; KAAYA et al., 2011; SAMISH et al., 2014). No presente estudo, três isolados (IBCB 383, IBCB 410 e IBCB 481) apresentaram ação sob fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, sendo os melhores percentuais de controle registrados nas maiores concentrações conidiais (10^8 conídios mL⁻¹). Estes achados corroboram diversos estudos (BAHIENSE et al., 2008; GARCIA et al., 2011; CAMARGO et al., 2014; CAMARGO et al., 2016; PERINOTTO et al., 2017) que demonstram que a eficácia fúngica se relaciona com a concentração conidial usada durante o tratamento (GINDIN et al., 2002). Quinelato et al., (2012), ao testar a virulência dos mesmos isolados para larvas de *R. microplus*, observaram percentuais de mortalidade de até 100% (IBCB 481) após 20 dias de exposição das larvas a *M. anisopliae* s.l. Em concordância, neste estudo, o mesmo isolado foi considerado um dos mais eficazes no controle de fêmeas ingurgitadas, com percentuais de controle de aproximadamente 45%. Variações em eficácia são visualizadas para os diferentes estágios evolutivos, no qual, estágios mais jovens (ovos e larvas), seja em estudos laboratoriais ou a campo, tendem a ser mais sensíveis do que estágios adultos (machos e fêmeas) (OJEDA-CHI et al., 2010; CAMARGO et al., 2012). A expressão da virulência

de *M. anisopliae* s.l. é considerada multifatorial, no qual fatores ambientais (umidade, temperatura, radiação UV-A e UV-B etc) e biológicos (vigor, idade, presença de nutrientes, produção de toxinas e secreção enzimática etc) modulam as atividades de penetração e colonização nos hospedeiros-alvo (LOVETT; ST LEGER, 2014; FARIA et al., 2015).

Neste estudo, a atividade de diversas enzimas hidrolíticas, tanto de conídio quanto de micélio (frações intra e extracitoplasmáticas), foram caracterizadas com a finalidade de relacionar a eficácia fúngica com a produção de metabólitos celulares. Estudos proteômicos que avaliaram um isolado de *Metarhizium anisopliae* (Ma1291), através de gel 2-D e MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time-of-Flight*), identificaram cerca de 900 proteínas em conídio e mais de 1000 proteínas em micélio, no qual apresentavam perfil de similaridade de 28% (SU et al., 2013). Nos ensaios proteolíticos realizados no presente estudo, os isolados que apresentaram as melhores resultados no controle de *R. microplus*, foram aqueles que apresentaram as maiores atividades enzimáticas conidiais e miceliais (atividade geral, Pr1 e Pr2). Diversos autores afirmam que a virulência de um patógeno está diretamente associada à intensidade da produção de peptidases, durante a germinação dos conídios, juntamente a outros fatores (ST. LEGER; COOPER; CHARNLEY, 1987; ST LEGER et al., 1989). A partir destes resultados, acredita-se que os conídios de isolados mais virulentos mantenham maior número de unidades enzimáticas na superfície celular no intuito de facilitar os processos iniciais de interação com a cutícula do hospedeiro. Pr1 é considerada uma das enzimas imprescindíveis durante a fase de internalização cuticular (SMALL; BIDOCHKA, 2005), sendo sua atividade na superfície conidial positivamente correlacionada com a virulência (SHAH et al., 2007; WU et al., 2010), modulando em até 78% a síntese proteica para sua produção (ST LEGER et al., 1988). Em concomitância, as maiores reservas citoplasmáticas também foram observadas nos isolados mais virulentos (IBCB 410 e IBCB 481). A formação do apressório, que se caracteriza pelo espessamento da extremidade do tubo germinativo e acúmulo de enzimas hidrolíticas, é realizada a partir da translocação do conteúdo citoplasmático do conídio (MOINO JR et al., 2002). Levando em consideração o curto ciclo de vida de *R. microplus*, com média de duração de 21 dias (GONZALES, 1993), acredita-se que

maiores reservas celulares fúngicas, especialmente aquelas relacionadas as proteases, podem facilitar a colonização do artrópode e assim modular a virulência.

Em relação ao micélio, diferenças expressivas foram observadas entre as frações intracitoplasmáticas e suas respectivas secreções miceliais para Pr1. Gupta et al. (1994) e Perinotto et al. (2014) reportaram maiores atividades secretoras em *Beauveria bassiana* s.l. para larvas de *Galleria mellonella* e *Metarhizium anisopliae* s.l. para *R. microplus*, respectivamente, para os isolados mais virulentos. A excreção de Pr1 pode ser modulada em função da disponibilidade de nutrientes, registrando maiores atividades sob situação de estresse fúngico (ST. LEGER; STAPLES; ROBERTS, 1991; WANG; TYPAS; BUTT, 2002; FREIMOSER; HU; ST. LEGER, 2005; REZENDE, 2009). Com condições próximas às registradas durante a infecção (meio mínimo acrescido de cutícula e fonte lipídica), uma menor atividade intracelular e uma maior secreção extracitoplasmática podem estar associadas ao estímulo realizado pela presença da cutícula de carrapatos no meio, modulando positivamente a secreção de enzimas, especialmente aquelas envolvidas na colonização do hospedeiro (GUPTA et al., 1992; CAMPOS et al. 2005; ROHDE et al, 2006).

Para os conídios, seja intra ou extracelular, as atividades de Pr2 foram inferiores às registradas para Pr1. Os resultados corroboram os achados de superfície conidial (SANTI et al., 2010) descritos para o isolado E6 de *M. anisopliae*, no qual Pr2 possui atividade quatro vezes inferior a Pr1 (SANTI et al., 2010). No crescimento micelial, a atividade de Pr2 parece não ser influenciada pela presença de cutícula do hospedeiro, visto que resultados encontrados entre as porções intra e extracelulares foram similares. Assim, acredita-se que os níveis de Pr2 intracelulares possam atuar na indução de Pr1. Com isoformas associadas à formação apressorial (ST LEGER et al., 1996b) a função real da Pr2 ainda é desconhecida, trabalhos relacionam que esta enzima atua na indução de peptídeos responsáveis pela produção de Pr1 (SMITHSON et al. 1995; GILLESPIE et al. 1998).

Lipases são serino hidrolases muito importantes durante a colonização de artrópodes. Para *M. anisopliae*, uma importante lipase extraconidial foi caracterizada e relacionada às fases iniciais do desenvolvimento fúngico (BEYS-DA-SILVA et al., 2009). Em geral, possuem suas atividades moduladas em função das constituições lipídicas da cutícula dos hospedeiros (BEYS-DA-SILVA et al., 2010a). Os isolados

mais virulentos no presente estudo foram também aqueles que apresentaram as maiores atividades lipásicas na superfície conidial. A importância de enzimas lipolíticas em fungos artropodopatogênicos já foi descrita anteriormente, sendo que para *R. microplus*, uma lipase extracitoplasmática foi caracterizada como fator de virulência (BEYS-DASILVA et al., 2010b). Sabe-se que para células eucarióticas, os lipídios, além de atuarem como estruturadores das membranas celulares e produção energética modulam sinalizações intracitoplasmáticas e atuam na transcrição gênica (STEHR et al., 2003). Além disto, os lipídios são constantemente reportados como influenciadores da germinação (COCHRANE et al., 1963). Em *Metarhizium*, o armazenamento é realizado através de gotículas, que se encontram revestidas por proteínas denominadas de perilipinas. A depleção do gene MPL1 que regula a expressão de perilipinas modula a formação de reservas intracitoplasmáticas lipídicas e influencia na formação do apressório e conseqüentemente na virulência (WANG; ST LEGER, 2007). Neste estudo, as maiores atividades observadas foram relacionadas ao citoplasma conidial (enzimas intracitoplasmáticas), no qual os isolados mais virulentos, apresentaram as maiores atividades lipásicas (IBCB 410 e IBCB 481). Assim, acredita-se que um maior número de unidades enzimáticas no citoplasma celular pode contribuir positivamente, auxiliando tanto na formação do apressório, como incrementando a virulência. Outro fator contribuinte seria o substrato no qual os isolados foram crescidos. Na literatura, estudos reportam que diferentes meios de cultivo podem influenciar tanto na concentração conidial quanto micelial de lipídios (PUPIN et al., 2000; BEYS-DASILVA et al., 2010a). Salleh et al., (1993) ao analisarem as lipases intra e extracelulares de micélio do fungo termofílico *Rhizopus oryzae*, detectaram que diversas fontes de carbono eram capazes de reduzir a secreção micelial e aumentar a produção intracitoplasmática. Usado como meio de cultivo, o arroz, fonte rica em carbono, pode atuar modulando a produção extra e aumentando a produção intracelular. Os relatos de lipases miceliais são frequentes para fungos (ST LEGER; COOPER; CHARNLEY, 1986; STEHR et al., 2003; ZIBAEAA; SADEGHI-SEFIDMAZGIB; FAZELI-DINAN, 2011). As atividades enzimáticas do secretado micelial foram superiores à produção intracelular para todos os isolados. Semelhante aos resultados encontrados no presente trabalho, Perinotto et al., (2014), ao avaliarem após 72 horas de crescimento, a atividade lipolítica de isolados de *M. anisopliae* s.l. em meio líquido acrescido de cutícula de

carrapato e estearato de colesteril, observaram as maiores atividades lipásicas para os isolados mais virulentos. Neste contexto, acredita-se que as possíveis secreções externas sejam superiores devido à necessidade de digestão do substrato (cutícula) para obtenção de carbono necessária para o desenvolvimento fúngico.

Enzimas oxidativas são proteínas hidrolíticas que atuam na remoção de radicais como ânions superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), moléculas de oxigênio (O_2) e radicais hidroxil (OH^-) (CAMPA-CORDOVA; HERNANDEZ-SAAVEDRA; ASCENCIO, 2002). Para fungos, em muitos momentos, encontram-se relacionadas com a proteção intra e extracitoplasmática, atuando na linha de frente na detoxificação de EROs (FREIMOSER et al., 2003; 2005; DUTRA et al., 2004; SANTI et al., 2009). No presente trabalho, em conídios, as atividades oxidativas foram superiores na porção intracitoplasmática em relação à fração extracelular. Estudos prévios já detectaram a presença de enzimas oxidantes na superfície conidial de *M. anisopliae* e *B. bassiana* e relacionaram à resistência a radiação UV-B, temperatura e virulência (SANTI et al., 2010; ALI et al., 2012; WANG et al., 2013). No presente estudo, os isolados eficazes no controle de *R. microplus* foram os mesmos que apresentaram altas atividades de catalase interna e externamente e os únicos a apresentarem atividade de SOD na superfície do conídio, fato que corrobora os estudos que relacionaram respostas oxidativas com aumento de virulência (XIE et al., 2012). A germinação conidial é considerada um fator determinante da eficácia fúngica, tendo um aumento significativo no consumo de oxigênio nas primeiras horas, com registros de atividade oxidativa exponenciais em função da proliferação celular (BRAGA; DESTÉFANO; MESSIAS, 1999). Entretanto, a atividade oxidativa tende a regressar a valores basais após o período de estresse, uma vez que altas taxas de enzimas oxidativas por longos períodos de tempo podem acarretar em efeitos deletérios ao desenvolvimento fúngico. Experimentos que avaliaram a ação do oxigênio durante o crescimento fúngico detectaram redução de atividade de catalases e germinação conidial devido à exposição prolongada a altas concentrações de O_2 . Assim como análises de *overexpression* do gene *cat1* demonstraram que os isolados mutantes de *Metarhizium* germinavam mais rápido, com maior atividade de catalase, do que as cepas selvagens (HERNANDEZ et al., 2010). Portanto, acredita-se que a determinação do vigor de isolados fúngicos (percentual de germinação em função do tempo) junto à caracterização de atividades oxidativas conidiais, possam auxiliar na

seleção de isolados que possuam resistência aos fatores abióticos e maior eficácia em testes de patogenicidade.

Assim como em conídios, para o crescimento micelial, o desenvolvimento de hifas necessita de demandas crescentes de oxigênio. Com germinação a partir de meios suplementados com cutícula de *R. microplus*, diversas respostas oxidativas são desencadeadas na tentativa de obter especialmente carbono como fonte nutricional para o desenvolvimento. Em insetos, durante a penetração, EROs são produzidas a partir da digestão de hidrocarbonetos ocorrida na β -oxidação peroxissomal (PEDRINI et al., 2013). Aqui, IBCB 481 apresentou as maiores atividades de SOD e peroxidase ao analisar o secretado micelial, após 72hs de crescimento. Tais achados corroboram os relatos de Miller et al. (2004) que caracterizaram um aumento da atividade de catalase e peroxidase durante o desenvolvimento de hifas.

O presente estudo demonstrou variações significativas na virulência e atividade enzimática entre isolados de *Metarhiziumanisopliae* s.l. Os isolados IBCB 410 e 481 apresentaram potencial para serem usados em programas de controle de carrapatos, tendo demonstrado boa produção de propágulos, bom percentual de controle para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e alta atividade enzimática relacionada a virulência, Pr1 e lipase, bem como as relacionadas à proteção contra estresse oxidativo (catalases, superóxido desmutase e peroxidases). Assim sendo, tais resultados reforçam a idéia de que a eficácia fúngica no controle de artrópodes é multifatorial.

Neste contexto, estudos moleculares que envolvam a expressão ou silenciamento de genes relacionados aos fatores enzimáticos de virulência, podem auxiliar no estabelecimento de correlações mais estreitas entre atividade enzimática e virulência, de modo que, ensaios bioquímicos para análises enzimáticas possam ser vinculados à seleção de isolados fúngicos para programas de controle de artrópodes, uma vez que são análises rápidas, de fácil reprodução e baixo custo.

6 CONCLUSÕES

Após as análises realizadas neste trabalho, foi possível concluir que:

- Os isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l avaliados no presente trabalho apresentam diferença na virulência para fêmeas de *Rhipicephalus microplus*, assim como, na conidiogenese e diferença na produção enzimática.

- Existe uma relação positiva entre a virulência e atividade enzimática de proteases e lipases. Isolados mais virulentos, IBCB 410 e IBCB 481 foram também os que tiveram maior produção destas enzimas.

- A atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e peroxidase, variou entre os isolados, demonstrando que não há relação entre estas enzimas e virulência de *Metarhizium anisopliae* s.l.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE, 2016. Pecuária Brasileira, Disponível em <http://www.abiec.com.br/exportaçãodecarne>, Acesso em: 20 de outubro, 2017.

ADAMES, M.; FERNÁNDEZ, M.; PEÑA, G.; HERNÁNDEZ, V.M. Effects of passages through a suitable host of the fungus, *Metarhizium anisopliae*, on the virulence of acaricide-susceptible and resistant strains of the tick, *Rhipicephalus microplus*. **Journal of Insect Science**, 11:21, available online: insectscience.org/11.21, 2011.

AGÊNCIA ESTADO. Exportação perde US\$ 104 mi por causa da ivermectina na carne. 2011. Disponível em: <http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2011/11/exportacao-perde-us104-mi-por-causa-da-ivermectina-na-carne.html> Acesso em: 10 nov. 2017.

ALI, S.; XIA, J.; REN, S.; HUANG, Z. Catalase Production Influences Germination, Stress Tolerance and Virulence of *Beauveria bassiana* Conidia. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 44, p. 537-544, 2012.

ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA, A. Banco de microrganismos entomopatogênicos, **Biotecnologia Ciências**, v. 20, p. 31-33, 2001.

ALVES-BRANCO, F.P.J.; ECHEVARRIA, F.A.M.; SIQUEIRA, A.S. Garça vaqueira, (*Egretta ibis*) e o controle biológico do carrapato (*Boophilus microplus*). Bagé: **EMBRAPA-UEPAE**, 1983, 4 p.

ALVES, R. T.; FARIA, M.R. Situação atual do uso de fungos entomopatogênicos no Brasil, 2003 (Parte I - 10/11/2003). Disponível em: <http://www.clubedofazendeiro.com.br/Cietec/artigos/ArtigosTexto> Acesso em: 18/12/2017.

ALVES, S. B.; PEREIRA, R.M. Produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill em bandejas. **Ecossistema**, v.14, p.188-192, 1989.

ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M. Controle biológico das pragas das pastagens, In: SIMPÓSIO SOBRE ECOSSISTEMA DE PASTAGENS, 3, 1997, Jaboticabal, **Anais**. Jaboticabal, p. 318-341, 1997.

ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**, Piracicaba, SP: FEALQ, 1998, 1163p.

ALVES, S.B.; LOPES, R.B. **Controle microbiano de pragas na América Latina avanços e desafios**, Piracicaba FEALQ, 2008, 414p.

ALVES, R.T.; FARIA, M. **Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos**. DF: Embrapa Cerrado, 2010, 50p.

ANGELO, I.C.; FERNANDES, E.K.K.; BAHIANSE, T.C.; PERINOTTO, W.M.S.; MORAES, A.P.R.; TERRA, A.L.M.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*, **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 317-322, 2010.

ARRUDA, W. **Caracterização molecular e morfofisiológica de diferentes isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e análise morfológica do processo de infecção em *Boophilus microplus***. 2005. 145p. (Tese de Doutorado-Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

ARRUDA, W.; BECK, I.L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks, **Experimental and Applied Acarology**, v. 37, p. 231–244, 2005.

BAGGA, S.; HU, G.; SCREEN, S.E.; ST. LEGER, R. J. Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Gene**, v. 324, p. 159–169, 2004.

BAHIANSE, T.C.; FERNANDES, E.K.K.; ANGELO, I.C.; PERINOTTO, W.M.S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Performance of *Metarhizium anisopliae* and its combination with Deltamethrin against a pyrethroid-resistant strain of *Boophilus microplus* in a stall test, **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1149, p. 242–245, 2008.

BAKER, K.F.; COOK, R.J. **Biological control of plant pathogens**, San Francisco: W.H. Freeman, 1974, 433p.

BARCELLOS, J.O.J.; OLIVEIRA, T.E.; MARQUES, C.S.S. Apontamentos estratégicos sobre a bovinocultura de corte brasileira. **Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal**, v. 24, p. 173-182, 2016.

BASSANESSI, M.C. **Superóxido dismutases em *Metarhizium anisopliae***. Dissertação de mestrado. 1992. 137p. Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica. UFRGS. Porto Alegre, 1992.

BENJAMIN, M.A.; ZHIOUA, E.; OSTFELD, R.S. Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 39, p. 723- 728, 2002.

BENNETT, G. F. Ovoposition of *Boophilus microplus* (CANESTRINI) (ACARIDA: IXODIDAE) I. Influence of tick size on egg production. **Acarologia**, v. 16, 1974.

BEYER, W.F.; FRIDOVICH, I. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. **Analytical Biochemistry**, v. 161, p. 559-566, 1987.

BEYS-DA-SILVA, W. O. **O complexo lipolítico de *Metarhizium anisopliae* e sua relação com o processo de infecção de hospedeiros artrópodes**. 2009. 165p. (Tese de Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

BEYS-DA-SILVA, W.O. B; SANTI, L.; BERGER, M.; PINTO, A. F.M. ; GUIMARÃES, J. A.; SCHRANK, A.; Vainstein, M. Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 829-834, 2009.

BEYS-DA-SILVA, W.O.; SANTI, L.; CORRÊA, A.P.F.; SILVA, L.A.; BRESCIANI, F.R.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Metarhizium anisopliae* s.l. can modulate the secretion of lipolytic enzymes in response to different substrates including components of arthropod cuticle. **Fungal Biology**, v. 114, p. 911-916, 2010a.

BEYS-DA-SILVA, W. O.; SANTI, L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infection. **Fungal Biology**, v. 114, p.10-15, 2010b.

BEYS-DA-SILVA, W.O.; SANTI, L.; BERGER, M.; CALZOLARI, D.; PASSOS, D.O.; GUIMARÃES, J.A.; MORESCO, J.J.; YATES, J.R. Secretome of the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae* induced by the cuticle of the cotton pest *Dysdercus peruvianus* reveals new insights into infection. **Journal of Proteome Research**, v. 13, p. 2282-2296, 2014.

BIDOCHKA, M.J.; ST. LEGER, R.J.; ROBERTS, W.D. Mechanisms of Deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, v. 171, p. 213-224, 1997.

BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage, **Mycologia**, v. 101, p. 512-530, 2009.

BITTENCOURT, S.E.T. **Purificação, caracterização parcial e localização de cobre zinco superóxido dismutase (CnZnSOD) do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae***. 1998. 77p. Dissertação de mestrado. Curso de Pós Graduação em Biologia Molecular. Brasília, UnB. 1998.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico de *Boophilus microplus*. **Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, v. 16, p. 49-55, 1994.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Dinâmica da infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887), **Revista Universidade Rural - Série Ciências da Vida**, v. 17, p. 83-88, 1995a.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA A.F.; VIEGAS, E.C. Isolamento e produção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, a partir de 67 *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887), **Revista Universidade Rural - Série Ciências da Vida**, v.17, p. 55-60, 1995b.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASCARENHAS, A.G.; FACCINI, J.L.H. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições Experimentais. **Ciência Rural**, v. 29, p. 351-354, 1999a.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; SOUZA, E.J.; PERALVA, S.L.F.S.; REIS, R.C.S. Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 em teste de campo com bovinos infestados por carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae), **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 20, p. 78-82, 1999b,

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, p. 64-76. 2000.

BRAGA, G. U. L.; DESTÉFANO, R. H. R; MESSIAS, C. L. Oxygen Consumption by *Metarhizium anisopliae* during Germination and Growth on Different Carbon Sources. **Journal Of Invertebrate Pathology**, v. 74, p.112-119, 1999.

BRIDGE, P.D.; PRIOR, C.; SAGBOHAN, J.; LOMER, C.J.; CAREY, M.; BUDDIE, A. Molecular characterization of isolates of *Metarhizium* from locusts and grasshoppers. **Biodiversity and Conservation**, v. 6, p. 177-189, 1997.

BROETTO, L.; BEYS-DA-SILVA, W.O.; BAILÃO, A.M; DE ALMEIDA, S.C.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: cell-surface localization and role in host adhesion. **FEMS Microbiology Letters**, v. 312, p. 101-109, 2010.

BRUM, J.G.W. **Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecea lapagei* (Grimont et al., 1981): etiopatogenia e sazonalidade**, 1988, 95p.

Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1988.

BULLMAN, G.M.; MUNÕS CABENAS, M.E.; AMBRÚSTOLO, R.R. El impacto ecológico de las lactonas macrocíclicas (endectocidas): una actualización comprensiva y comparativa, **Veterinária Argentina**, v. 8, p. 3-15, 1996.

BUTT, T.M.; COATES, C.J.; DUBOVSKIY, I.M.; RATCLIFFE, N.A. Entomopathogenic Fungi: New Insights into Host–Pathogen Interactions. **Advances in Genetics**.v. 94, p. 307-364, 2016.

CAKMAK, I.; MARSCHNER, H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. **Plant Physiology**, v. 98, p. 1222-1227, 1992.

CAMARGO, M.G.; GOLO, P.S.; ANGELO, I.C.; PERINOTTO, W.M.S.; SÁ, F.A.; QUINELATO, S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 188, p. 140–147, 2012.

CAMARGO, M.G.; MARCIANO, A.F.; SÁ, F.A.; PERINOTTO, W.M.S.; QUINELATO, S.; GOLO, P.S.; ANGELO, I.C.; PRATA, M.C.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Commercial formulation of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Rhipicephalus microplus* in a pen study. **Veterinary Parasitology**, v. 205, p. 271–276, 2014.

CAMARGO, M. G.; NOGUEIRA, M.R.S.; MARCIANO, A.F.; PERINOTTO, W.M.S.; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B.; SCOTT, F.B.; ANGELO, I.C.; PRATA, M.C.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P. *Metarhizium anisopliae* for controlling *Rhipicephalus microplus* ticks under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 223, p. 38-42, 2016.

CAMPA-CÓRDOVA, A.I; HERNÁNDEZ-SAAVEDRA, N.Y; ASCENCIO, F. Superoxide dismutase as modulator of immune function in American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 133, p.557-565, 2002.

CAMPOS, R.A.; ARRUDA, W.; BOLDO, J.T.; SILVA, M.V.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. **Current Microbiology**, v. 50, p. 257-261, 2005.

CAMPOS, R.A.; BOLDO, J.T.; PIMENTEL, I.C.; DALFOVO, V.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; VAINSTEIN, M.H.; BARROS, N.M. Endophytic and entomopathogenic strains of *Beauveria* sp to control the bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p. 1421-1430, 2010.

CARDENAS, F.; CASTRO, M.S.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; SINISTERRA, J.V.; VALMASEDA, M.; ELSON, S.W.; ALVAREZ, E. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. **Enzymes and Microbial Technology**, v. 28, p. 145-154, 2001.

CARDOSO, E.R.; DE FREITAS, S.; NUNES, H.T.; PESSOA, I.G.A. Seletividade de fungos entomopatogênicos para larvas de primeiro ínstar de *Ceraeochrysa cincta* (Neuroptera: Chrysopidae) utilizando torre de Potter. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.70, p.167, 2003.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 3703-3713, 1999.

CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; PELL, J.K.; BALL, B.V.; SHAW, K.; SUNDERLAND, K.D. Fungal Biocontrol of Acari. **Biocontrol Science and Technology**, v. 10, p. 357-384, 2000.

CHANG, K.P.; REED, S.G.; MCGWIRE, B.S.; SOONG, L. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. **Acta Tropica**, v. 85, p. 375-390. 2003.

CHARNLEY, A.K.; ST LEGER, R.J. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In: **COLE, G.T.; HOCH, H.C. The fungal spore and diases initiation in plants and animals**. New York: Plenum Press, p. 267-286, 1991.

CHO, E. M.; LIU, L.; FARMERIE, W.; KEYHANI, N. O. EST analysis of cDNA libraries from the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana*. I. Evidence for stage-specific gene expression in aerial conidia, in vitro blastospores and submerged conidia. **Microbiology**, v. 152, p. 2843–2854, 2006.

CLARKSON, J.; CHARNLEY, K. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends Microbiology**, v. 4, p. 197-203, 1996.

COCHRANE, V.W.; COCHRANE, J. C.; COLLINS, C.B.; SERAFIN, F.G. Spores germination and metabolism in *Fusarium solani*. **American Journal of Botany**, v. 50, p. 806- 814, 1963.

COOK, R.J.; BRUCKART, W.L.; COULSON, J.R.; GOETTEL, M.S.; HUMBER, R.A.; LUMSDEN, R.D.; MADDOX, J.V.; MCMANUS, M.L.; MOORE, L.; MEYER, S.F.

Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: a framework for scientific evaluation. **Biological Control**, v. 7, p. 333-351, 1996.

CORDOVÉS, C.O. **Carrapato: controle ou erradicação**, 2ed, Guaíba: Agropecuária, 1997, 177 p.

COSTA, M.D.M.; MAGALHÃES, C.D. Um novo meio de cultura para o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok., parasito da cigarrinha das pastagens. **Boletim do Instituto Biológico da Bahia**, Salvador, v.13, p.57-60, 1974.

CRUZ, I. Manejo integrado de pragas do milho com ênfase para o controle biológico, In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS. Campinas. **Anais**, Campinas: SEB, p. 48-92, 1995.

DEBACH, P. **Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas**. México: Editora Continental, 1968, 927p,

DEVI, K.U.; SRIDEVI, V.; MOHAN, CH.M.; PADMAVATHI, J. Effect of high temperature and water stress on *in vivo* germination and growth in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 88, p. 181-189, 2005.

DIMBI, S.; MANIANIA, N.K.; LUX, S.A.; MUEKE, J.M. Effect of constant temperatures and germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. **Biocontrol**, v. 49, p. 83-94, 2004.

DOUBE, M.B.; KEMP, D.H.; The influence of temperature, relative humidity and host factors on the attachment and survival of *Boophilus microplus* (Canestrini) larvae to skin slices. **International Journal for Parasitology**, v. 9, p. 449-454, 1979.

DRUMMOND, R. O.; GLADNEY, W. J.; WHETSTONE, T. M.; ERNST, S. E. Laboratory testing of insecticides for control of the winter tick. **Journal Economic Entomology**, v. 64, p. 686-688, 1971.

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

DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; BROETTO, L.; SILVEIRA SCHRANK, I.; HENNING VAINSTEIN, M.; SCHRANK, A. Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. **Research Microbiology**, v. 155, p. 245-251, 2004.

EC. EUROPEAN COMMISSION. The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) Annual Report 2010. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/docs/rasff_annual_report_2010_en.pdf Acessado em: 10 nov. 2017.

EKESI, S.; MANIANIA, N.K.; AMPONG-NYARKO, K. Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 9, p.177-185, 1999.

ELDER, J. K.; WATERS, K. S.; DUNWELL, G. H.; EMMERSON, F. R.; KEARNAN, J. F.; MORRIS, R. S.; KNOTT, S. G. A survey concerning cattle tick control in Queensland, 4, Use of resistance cattle and pasture spelling, **Australian Veterinary Journal**, v. 56, p. 219-231, 1980.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA, Gado do Leite – Importância Econômica, 2016 Disponível em <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/importancia.html>> Acesso em 08 de outubro 2017.

FARIA, M.; WRAIGHT, S.P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, p. 237-256, 2007.

FARIA, M.; LOPES, R. B.; SOUZA, D. A.; WRAIGHT, S. P. Conidial vigor vs. viability as predictors of virulence of entomopathogenic fungi. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 125, p. 68-72, 2015.

FERNANDES, E.K.K.; COSTA, G.L.; MORAES, A.M.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Entomopathogenic potential of *Metarhizium anisopliae* isolated from engorged females and tested in eggs and larvae of *Boophilus microplus*, **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, p. 270-274, 2004.

FERNANDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Entomopathogenic fungi against south American tick species. **Experimental and Applied Acarology**, v. 46, p.71–93, 2008.

FERNANDES, E.K.K.; KEYSER, C.A.; RANGEL, D.E.N.; FOSTER R.N.; ROBERTS, D.W. CTC medium: A novel dodecane-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. **Biological Control**, v. 54, p. 197-205, 2010.

FERNANDES, E. K. K.; ANGELO, I. C.; RANGEL, D. E. N.; BAHIENSE, T. C.; MORAES, A. M. L.; ROBERTS, D. W.; BITTENCOURT, V. R. E. P. An intensive

search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 182, p. 307-318, 2011.

FERNANDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; ROBERTS, D.W. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. **Experimental Parasitology**, v. 130, p. 300-305, 2012.

FERREIRA, L.F.; CHIEFFI, P.P.; ARAUJO, A. Parasitismo não é doença parasitária. **Norte Ciência**, v. 3, p. 200-221, 2012.

FIOROTTI, J.P.; FERREIRA, J.R.T.; MARCIANO, A.F.; FREITAS, M.C.; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B.; CAMARGO, M.G.; ANGELO, I.C.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; GOLO, P.S. Associação de *Metarhizium anisopliae* sensu lato e cipermetrina para o controle de *Rhipicephalus microplus*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 38, p. 66-74, 2016.

FIOROTTI, J.P.; CAMARGO, M. G.; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B.; MARCIANO, A. F.; FREITAS, M. C.; MESQUITA, E. S. ; GÔLO, P. S.; SPADACCI-MORENA, D. D. ; ANGELO, I. C.; BITTENCOURT, V. R. E. P. *Rhipicephalus microplus* infected by *Metarhizium*: unveiling hemocyte quantification, GFP-fungi virulence, and ovary infection. **Parasitology Research**, v. 117, p. 1847-1856, 2018.

FISCHHOFF, I.R.; KEESING, F.; OSTFELD, R.S. The tick biocontrol agent *Metarhizium brunneum* (= *M. anisopliae*) (strain F52) does not reduce non-target arthropods, **Plos One**, v. 12, 2017.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), Dairy Production and Products – Milk Production, 2016. Disponível em <<http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-production/en/#,V3AZwbgrLIV>> Acesso em 08 de outubro, 2017.

FREGONESI, A.F.; MOCHI, D.A.; MONTEIRO, A.C. Compatibilidade de isolados de *Beauveria bassiana* a inseticidas, herbicidas e maturadores em condições de laboratório, **Arquivos do Instituto Biológico (online)**, v. 83, p. 1-8, 2016.

FREIMOSER, F.M.; SCREEN, S.; BAGGA, S.; HU, G.; ST LEGER, R.J. Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. **Microbiology**, v. 149, p. 239– 247, 2003.

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**, v. 151, p. 361–371, 2005.

FREITAS, A. F.; LOUREIRO, E. S.; ALMEIDA, M. E. B.; PESSOA, L. G. A. Rendimento de conídios e germinação de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Ascomycota: Clavicipitaceae) cultivados em arroz. **Agricultural Entomology**, v.81, p. 75-78, 2014.

FREITAS, M.C.; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B.; PERINOTTO, W.M.S.; NOGUEIRA, M.R.S.; CHAGAS, T.T.; MARCIANO, A.F.; CAMARGO, M. G.; QUINELATO, S.; GÓLO, P. S.; SÁ, F.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Quantificação de hemócitos de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* infectadas por *Beauveria bassiana* sl. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 37, p. 63–70, 2015.

FURLONG, J. Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária UFMG**. v. 8, p. 49-61, 1993.

GANDARILLA-PACHECO, F.L.; ARÉVALO-NIÑO, K.; GALÁN-WONG, L.J.; CORONADO, C. F. S.; QUINTERO-ZAPATA, I. Evaluation of conidia production and mycelial growth in solid culture media from native strains of entomopathogenic fungi isolated from citrus-growing areas of México. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 14453-14460, 2012.

GARCIA, M.V.; MONTEIRO, A.C.; SZABO, M.P.J.; MOCHI, D.A.; SIMI, L.D.; CARVALHO, W.M.; TSURUTA, S.A.; BARBOSA, J.C. Effect of *Metarhizium anisopliae* fungus on off-host *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from tick-infested pasture under cattle grazing in Brazil, **Veterinary Parasitology**, v.181, p. 267-273, 2011.

GILLESPIE J.P.; BATEMAN R.; CHARNLEY A.K. Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* sp. for the desert locust, *Schistocerca gregaria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 71, p.128-137, 1998.

GIMÉNEZ-PECCI, M.P.; BOGO, M.R.; SANTI, L.; MORAES, C.K.; CORRÊA, C.T.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. Characterization of mycoviruses and analyses of chitinases secretion in the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae*. **Current Microbiology**, v. 45, p.334-339, 2002.

GINDIN, G.; SAMISH, M.; ZANGI, G.; MISHOUTCHENKO, A.; GLAZER, I., The susceptibility of different species and stages of ticks to entomopathogenic fungi. **Experimental and Applied Acarology**, v. 28, p. 283–288. 2002.

GOETTEL, M.S.; ST LEGER, R.J.; RIZZO, N.W.; STAPLES, R.C.;ROBERTS, W. Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca Sexta*) cuticle.**Journal of General Microbiology**, v. 135, p. 2233–2239, 1989.

GOETTEL, M.S.; INGLIS, G.D. Fungi: Hyphomycetes, In: Lacey, L.A. (Ed.), **Manual of Techniques in Insect Pathology**, Academic Press, San Diego, p, 213–249, 1997.

GOETTEL, M.S.; INGLIS, G.D.; WRAIGHT, S.P. **Fungi**, In: LACEY, L.A.; KAYA, H.K. Field manual of techniques in invertebrate pathology, Dordrecht: **Kluwer Academic Publishers**, p. 255-282, 2000.

GONZÁLES, J.C.; SERRA-FREIRE, N.M. O couro dos bovinos no Rio Grande do Sul: riqueza há muito maltratada.**Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 12, p. 14-16, 1992.

GONZALES, J.C. **O controle do carrapato do boi**, Porto Alegre: Editora Universidade Passo Fundo, 1993, 80p.

GONZALES, J.C.**O controle do carrapato do boi**, 2, ed, Porto Alegre: Sulina, 1995, 235 p.

GONZÁLES, J.C. O carrapato dos bovinos *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Revisão histórica e conceitual).**A Hora Veterinária**, v.21, p. 23-28, 2002.

GRISI, L.; MASSARD, C.L.; BORJA, G.E.M.; PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil, **A Hora Veterinária**, v.21, p. 23-28, 2002.

GRISI, L.; MARTINS, J.R.; BARROS, A.T.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P.H.; LEÓN, A.A.; PEREIRA, J.B.; VILLELA, H.S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 150-156, 2014.

GUAGLIUMI, P.; MARQUES, E.J.; VILAS BOAS, A.M. Contribuição ao estudo da cultura e aplicação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. no controle da cigarrinha da folha *Mahanarva posticata* (Stal) no Nordeste do Brasil. **Boletim Técnico da CODECAP**, Recife.v.3, 54p., 1974.

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, p. 132-137, 1992.

GUPTA S. C.; LEATHERS T. D.; EL-SAYED G. N.; IGNOFFO C. M. Relationships among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria basiana* infections of

Galleria mellonella and *Trichoplusia ni*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 64, p. 13-17, 1994.

HALL, R.A.; ZIMMERMANN, G, VEY, A. Guidelines for the registration of entomogenous fungi as insecticides. **Entomophaga**, v. 27, p. 121-127, 1982.

HARTELT, K.; WURST, E.; COLLATZ, J.; ZIMMERMANN, G.; KLEESPIES, R.G.; OEHME, R. M.; KIMMIG, P. ; STEIDLE, J. L.M.; MACKENSTEDT, U. Biological control of the tick *Ixodes ricinus* with entomopathogenic fungi and nematodes: Preliminary results from laboratory experiments, **International Journal of Medical Microbiology**, v. 298, p. 314–320, 2008.

HERNANDEZ, C. E. M.; GUERRERO, I.E.P.; HERNANDEZ, G. A. G.; SOLIS, E. S.; GUZMAN, J. C. T. Catalase overexpression reduces the germination time and increases the pathogenicity of the fungus *Metarhizium anisopliae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 1033–1044, 2010.

HORN, S.C.; ARTECHE, C.C.P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. **A Hora Veterinária**, v.4, p. 12-32, 1985.

HORNBOSTEL, V.L.; OSTFELD, R.S.; ZHIOUA, E.; BENJAMIN, M.A. Sublethal effects of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) on engorged larval, nymphal, and adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 41, p. 922-929, 2004.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal**, 2017. Rio de Janeiro: IBGE.

INGLIS, G.D.; GOETTEL, M.S.; BUTT, T.M.; STRASSER, H. **Use of Hyphomycetous fungi for managing insect pests**, In: BUTT, T.M., JACKSON, C.W, Y MAGAN, N, *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potencial*, CABI Internacional, Wallingford, U,K, 2001, p. 23-69.

JAVAR, S.; MOHAMED, R.; SAJAP, A. S.; LAU, W.-H. Expression of pathogenesis-related genes in *Metarhizium anisopliae* when infecting *Spodoptera exigua*. **Biological Control**, p.8530–36, 2015.

JIRAKKAKUL, J.; ROYTRAKUL, S.; SRISUKSAM, C.; SWANGMANEECHARERN, P.; KITTISENACHAIB, S.; JARESITTHIKUNCHAIB, J. PUNYA, J.; PROMMEENATE, P.; SENACHAK, J.; SO, L.; TACHALEAT, A.; TANTICHAROEN, M.; CHEEVADHANARAK, S.; WATTANACHAISAEEREEKULA, S.; AMNUAYKANJANASIN, A. Culture degeneration in conidia of *Beauveria bassiana* and virulence determinants by proteomics. **Fungal Biology**, v. 122, p.156-171, 2018.

JONSSON, N.N.; MAYER, D.G.; MATSCHOSS, A.L.; GREEN, P.E.; ANSELL, J. Production effects of cattle tick *Boophilus microplus* infestation of high yielding dairy cows. **Veterinary parasitology**, v.78, p. 65-77, 1998.

KAAYA, G.P.; MWANGI, E.N.; OUNA, E.A. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 67, p. 15-20, 1996.

KAAYA, G.P.; SAMISH, M.; HEDIMBI, M.; GINDIN, G.; GLAZER, I. Control of tick populations by spraying *Metarhizium anisopliae* conidia on cattle under field conditions, **Experimental and Applied Acarology**, v. 55, p. 273-281, 2011.

KAMP, A.M.; BIDOCHKA, M.J. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 74–77, 2002.

KIRKLAND, B. H.; CHO, E.; KEYHANI, N. O. Differential susceptibility of *Amblyommamaculatum* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidea) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Biological Control**, v. 31, p. 414- 421, 2004.

KOMAROV, D.A.; RYAZANOVA, A.D.; SLEPNEVA, I.A.; KHRAMTSOV, V.V.; DUBOVSKIY, I.M.; GLUPOV, V.V. Pathogen-targeted hydroxyl radical generation during melanization in insect hemolymph: EPR study of a probable cytotoxicity mechanism. **Applied Magnetic Resonance**, v. 35, p.495–501, 2009.

KRULL, R.; WUCHERPFENNING, T.; ESFANDABADI, M. E.; WALISKO, R.; MELZER, G.; HEMPEL, D. C.; KAMPEN, I.; KWADE, A.; WITTMANN, C. Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. **Journal Biotechnology**, v.3, p. 112–123, 2013.

LAIRD, M; LACEY, L.A.; DAVIDSON, E.W. **Safety of microbial insecticides**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990, p 259.

LI, G; FAN, A.; PENG, G.O.N.K. XIN, J; CAO, Y.; XIA, Y. A bifunctional catalase-peroxidase, MakatG1, contributes to virulence of *Metarhizium acridum* by overcoming oxidative stress on the host insect cuticle. **Environmental Microbiology**, v. 19, p. 4365–4378, 2017.

LI, J.; YU, L.; YANG, J.; DONG, L.; TIAN, B.; YU, Z.; LIANG, L.; ZHANG, Y.; WANG, X.; ZHANG, K. New insights into the evolution of subtilisin-like serine protease genes in Pezizomycotina. **BMC Evolutionary Biology**, v.10, p. 68, 2010.

LIU, H.; SKINNER, M.; BROWNBIGDE, M.; PARKER, B.L. Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.82, p.139- 147, 2003.

LOPES, R.B.; ALVES, S.B.; PADULLA, L.F.L.; PÉREZ, C. A. Eficiência de formulações de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle de ninfas de *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, p.27-31, 2007.

LOPES, R.B.; SOUZA, D.A.; ROCHA, L.F.N., MONTALVA, C.; LUZ, C.; HUMBER, R.A.; FARIA, M. *Metarhizium alvesii* sp. nov.: A new member of the *Metarhizium anisopliae* species complex. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 151, p. 165-168, 2018.

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

LOUREIRO, E.S.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; PESSOA, L.G.A. Produção de isolados de *Metarhizium anisopliae*, selecionados para o controle da *Mahanarva fimbriolata* (STAL, 1854), **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, p. 459-472, 2005b.

LOVETT, B; ST. LEGER, R.J. Stress is the rule rather than the exception for *Metarhizium*. **Current Genetics**, v. 261, p. 253–261, 2014.

MADÉLIN, M.F.; ROBINSON, R.K.; WILLIAMS, R.J. Apressoriumlike structures in insects parasiting deuteromycetes, **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 9, p. 404–412, 1967.

MANALIL, N.S.; JUNIOR TEO, V.S.; BRAITHWAITE, K.; BRUMBLEY, S.; SAMSON, P.; HELENA NEVALAINEN, K.M.H. Comparative analysis of the *Metarhizium anisopliae* secretome in response to exposure to the greyback cane grub and grub cuticles. **Fungal Biology**, v. 114, p. 637-645, 2010.

MANN, T.; KLEILIN, D. Homocuprein and heptacuprein, copper-protein compounds of blood and liver in mammals. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological**, v. 126, p. 303-315, 1938.

MARANHÃO, E.A.A.; MARANHÃO, E.H.A. Hongos entomopatogénos: importante ferramenta para el control de “moscas blancas” (Homoptera: Aleyrodidae), **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 5-6, p. 209-242, 2009.

MARCIANO, A.F.; FIOROTTI, J.P.; SOUZA, L.A.; CAMARGO, M.G.; PERINOTTO, WENDELL M.S.; ANGELO, I.C.; GÔLO, PS.; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B.; SÁ, F.A.; QUINELATO, S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Eficiência in vitro de uma formulação oleosa de *Metarhizium anisopliae* sensu lato no controle de *Rhipicephalus microplus*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 35, p. 28-34, 2013.

MASCARIN, G.M.; PAULI, G. Bioprodutos à base de fungos entomopatogênicos. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T J. de; PALLINI, A. (Coord.). Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica. Viçosa, MG: **Epamig**, v. 4, p. 169–195. 2010.

MASCARIN, G. M.; LOPES, R. B.; DELALIBERA, I.; FERNANDES, E. K.K.; LUZ, C.; FARIA, M. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. In Press, **Journal of Invertebrate Pathology**, 2018.

MARKWELL, M.A.K.; HAAS, S.M.; BIEBER, L.L.; TOLBERT, N.E. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. **Analytical Biochemistry**, v.87, p. 206–210, 1978.

MATTHYSSE, J.G. Recent changes in relative abundance and distribution of *Boophilus decoloratus*, *B. geigyianus*, and *B. annulatus* (Ixodoidea: Ixodidae) in Mali, West Africa. **Acarology VI**, v.2, p.1247-1251, 1984.

McCORD, J.M. e FRIDOVICH, I. (1969) Superoxide dismutase, an enzymatic function for erythrocyte. **The Journal of Biological Chemistry**, v.244, p. 6049-6055, 1969.

MIELITZ NETTO, C.G.A. A modernização da bovinocultura de corte brasileira, **Ensaio FEE**, v.16, p. 66-104, 1995.

MILLER C.D.; RANGEL D.; BRAGA G.U.; FLINT S.; KWON S.I.; MESSIAS C.L.; ROBERTS D.W.; ANDERSON A.J. Enzyme activities associated with oxidative stress in *Metarhizium anisopliae* during germination, mycelial growth, and conidiation and in response to near-UV irradiation. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 41–49, 2004.

MILNER, R.J.; LOZANO, L.B.; DRIVER, F.; HUNTER, D. A comparative study of two Mexican isolates with an Australian isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* strain characterisation, temperature profile and virulence for wingless grasshopper, *Phaulacridium vittatum*. **Biocontrol**, v. 48, p. 335-348, 2003.

MOINO JR., A.; ALVES, S. B.; LOPES, R. B.; NEVES, P. M. O. J.; PEREIRA, R. M.; VIEIRA, S. A. External development of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the subterranean termite *Heterotermes tenuis*. **Scientia Agricola**, v.59, p.267-273, 2002.

MONTEIRO, S.G.; BAHIANSE, T.C.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Ação do fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 sobre a fase parasitária do carrapato *Anocentor nittens* (Neumann, 1897) Schulze, 1937 (Acari: Ixodidae). **Ciência Rural**, v. 33, p.559-563, 2003.

MURREL, A.; BARKER, S.C. Synonymy of *Boophilus* Crutice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae), **Systems Parasitology**, v. 56, p. 169-172, 2003.

OJEDA-CHI, M.M.; RODRIGUEZ-VIVAS, R.I.; GALINDO-VELASCO, E.; LEZAMA-GUTIERREZ, R. Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in the Mexican tropics. **Veterinary Parasitology**, v.170, p.348-354, 2010.

OLIVEIRA, G.P.; ALENCAR, M.M. Resistência de bovinos de seis graus de sangue Holandês-Guzerá ao carrapato (*Boophilus microplus*) e ao berne (*D. hominis*), **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 42, p. 127-35, 1990.

ORLANDELLI, R.C.; PAMPHILE, J.A. Fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* como agente de controle biológico de insetos pragas, SaBios: **Revista Saúde e Biologia**, v.6, p.79-82, 2011.

PAL, S.; ST LEGER, R.J.; WU, L.P. Fungal peptide destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 8969-8977, 2007.

PEDRINI, N.; ORTIZ-URQUIZA, A.; HUARTE-BONNET, C.; ZHANG, S.; KEYHANI, N.O. Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host epathogen interaction. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 24, 2013.

PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, In: **Pereira MC, Labruna MB, Szabo MPJ, Klafke GM (eds) Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência**, MEDVET, São Paulo, p 15-56, 2008.

PERINOTTO, W.M.S.; GÔLO, P.S.; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B.; SÁ, F.A.; SANTI, L.; BEYS-DA-SILVA, W.O.; JUNGES, A.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A.; SALLES, C.M.C.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Enzymatic activities and effects of

mycovirus infection on the virulence of *Metarhizium anisopliae* in *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 203, p. 189-196, 2014.

PERINOTTO, W.M.S.; ANGELO, I.C.; GOLO, P.S. ; CAMARGO, M.G. ; QUINELATO, S. ; SA, F.A. ; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B. ; MARCIANO, A.F.; MONTEIRO, C.M.O. ; BITTENCOURT, V.R.E.P. In vitro pathogenicity of different *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates in oil formulations against *Rhipicephalus microplus*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 27, p. 338/1360-0478-347, 2017.

PUPIN, A. M.; MESSIAS, C. L.; PIEDRABUENA, A. E.; ROBERTS, D. W.; Total lipids and fatty acids of strains of *Metarhizium anisopliae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 121-128, 2000.

QUINELATO, S. B. **Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. para o controle biológico de *Rhipicephalus microplus* a partir da caracterização morfológica e molecular e testes de Patogenicidade**. 2012. 99p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária. Seropédica. 2012.

QUINELATO, S.; GOLO, P. S. ; PERINOTTO, W. M.S.; SÁ, F. A.; CAMARGO, M. G.; ANGELO, I. C.; MORAES, A. M.L.; BITTENCOURT, V. R.E.P. Virulence potential of *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p. 556-565, 2012.

RAMANUJAM, B.; RANGESHWARAN, R.; SIVAKMAR, G.; MOHAN, M.; YANDIGERI, M. S. Management of Insect Pests by Microorganisms. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, v. 80, p. 455-471, 2014.

RECK, J.; MARKS, F.S.; RODRIGUES, R.O ; SOUZA, U.A.; WEBSTER, A.; LEITE, R.C.; GONZALES, C.; KLAFKE, M.; MARTINS, J.R. Does *Rhipicephalus microplus* tick infestation increase the risk for myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* in cattle? **Preventive Veterinary Medicine**, v. 113, p. 59-62, 2014.

REZENDE, M.J. **Influência da qualidade de diferentes tipos de arroz e inibidores de proteinases no rendimento e na virulência de conídios do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Mestch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales)**. 111p., 2009. Dissertação de mestrado (Mestre em Ciências. Área de concentração: Entomologia). Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2009.

ROBERTS, D.W.; YENDOL, W.G. Use of microbial control of insects, **In: BURGESS, H.D. Microbial control of insects and mites**, New York: Academic Press, p, 125-149, 1971.

ROBERTS, D.W.; GUPTA, S.; ST. LEGER, R.J. Metabolite Production by Entomopathogenic Fungi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, p. 325-347, 1992.

ROBERTS, D.W.; ST LEGER, R.J. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect pathogenic fungi: mycological aspects, **Advances in Applied Microbiology**, v. 54, p. 1-51, 2004.

RODRIGUES, D.S.; LEITE, R.C. Economic impact of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: estimate of decreased milk production on a dairy farm. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 1570-1572, 2013.

ROHDE, C.; ALVES, L.F. ; BRESSAN, D. ; NEVES, P.M.O.J. ; SILVA, E.R. ; ALVES, S.B. ; ALMEIDA, J.E.M. . Seleção de isolados de fungos para o controle do cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, v. 35, p. 231-240, 2006.

ROSAS-GARCÍA, N.M.; AVALOS-DE-LEÓN, O.; VILLEGAS-MENDOZA, J.M.; MIRELES-MARTÍNEZ, M.; BARBOZA- TAÑECORONA, J.E.; CASDA-RAMÍREZ, J.C. Correlation between Pr1 and Pr2 gene content and virulence in *Metarhizium anisopliae* strains. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 24, p. 1495–502, 2014.

SAFAVI, S.A. Attenuation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* following serial in vitro transfers. **Biologia**, v. 67, p. 1062-1068, 2012.

SAIK, J.E.; LACEY, L.A.; LACEY, C.M. Safety of microbial insecticides to vertebrates domestic animals and wildlife. In: Laird M, Lacey LA, Davidson EW, editors. **Safety of Microbial Insecticides**. Boca Raton, FL: CRC Press. 1990. p. 115-132.

SALLEH, A.B.; MUSANI, R.; BASRI, M.; AMPON, K.; YUNUS, W.M.Z.; RAZAK, C.N.A. Extra- and intra-cellular lipases from a thermophilic *Rhizopus oryzae* and factors affecting their production. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 978-981, 1993.

SAMISH, M.; ROT, A.; MENT, D.; BAREL, S.; GLAZER, I.; GINDIN, G. Efficacy of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* in controlling the tick *Rhipicephalus annulatus* under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 206, p. 258–266, 2014.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**, FEPMVZ Editora, Belo Horizonte , 2002.

SANGORRÍN, M.P.; FOLCO, E.J.; MARTONE, C.M.; SÁNCHEZ, J.J. Purification and characterization of a protease inhibitor from white croaker skeletal muscle

(*Micropogon opercularis*). **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 33, p. 691-699, 2001.

SANTI, L.; BEYS-DA-SILVA, W.O.B.; PINTO, A.F.M. ; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Differential immunoproteomics enables identification of *Metarhizium anisopliae* proteins related to *Rhipicephalus microplus* infection. **Research in Microbiology**, v. 160, p. 824-828, 2009.

SANTI, L.; BEYS DA SILVA, W.; BERGER, M.; GUIMARÃES, J.A., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. **Toxicon**, v. 55, p. 874–880, 2010.

SANTORO, P.H.; ZORZETTI, J.; CONSTANSKI, K.; NEVES, P. M. O. J. Conidial production, virulence, and stress tolerance of *Beauveria bassiana* conidia after successive in vitro subculturing. **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 40, p. 85-90, 2014.

SCHRANK, A.; BASSANESI, M.C.; PINTO JR,H.; COSTA, S.V.; BOGO, M.; SILVA, M.S.N. Superoxide dismutases in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Ciência e Cultura**, v. 45, p.200-205, 1993.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon**,v.56, p. 1267-1274, 2010.

SCHOLTE, E.J.; NG'HABI, K.; KIHONDA, J.; TAKKEN, W.; PAAIJMANS, K.P. ABDULLA, S.; KILLEEN, G.F.; KNOLS, B.G. An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. **Science**, v. 308, p. 1641–1642, 2005.

SHADDUCK, J.A.; ROBERTS, D.W.; LAUSE, S. Mammalian safety tests of *Metarhizium anisopliae*. Preliminary results. **Environmental Entomology**, v.11, p.189-192, 1982.

SHAH, F.A.; ALLEN, N.; WRIGHT, C. J.; BUTT, T. M. Repeated in vitro subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. **Microbiology Lett**, v. 276, p. 60–66, 2007.

SMALL, C.L.N.; BIDOCHKA, M.J. Up-regulation of Pr1, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, v. 109, p. 307–313, 2005.

SMITHSON S.L.; PATERSON I.C.; BAILEY A.M.; SCREEN S.E.; HUNT B.A.; COBB B.D.; COOPER R.M.; CHARNLEY A.K.; Clarkson J.M. (1995). Cloning and

characterization of a gene encoding a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Gene**, v. 166, p. 161-165.

SIEGEL, J.P.; SHADDUCK, J.A. Safety of microbial insecticides to vertebrates/humans. In: Laird, M; Lacey, L.A.; Davidson, E.W. editors. **Safety of microbial insecticides**. Boca Raton, CA: CRC Press: 1990. p. 101-113.

SILVA, M.V.; SANTI, L.; STAATS, C.C.; COSTA, A.M.; COLODEL, E.M.; DRIEMEIER, D.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 382-392, 2005.

SILVA, A.M.; ALENCAR, M.M.; REGITANO, L.C.A.; OLIVEIRA, M.C.S. Infestação natural de fêmeas bovinas de corte por ectoparasitas na Região Sudeste do Brasil, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 1477-1482, 2010.

SILVA, M.C.; BOAVENTURA, V.M.; FIORAVANTI, M.C.S. **História do povoamento bovino no Brasil central**, Universidade Federal de Goiás: UFG, 2012. Disponível em: <http://www.proec.ufg.br/revista_ufg/dezembro2012/arquivos_pdf/05.pdf>, Acesso em: 04/10/2017.

SONENSHINE, D.E. **Biology of ticks**. 2. Ed. New York: Oxford University Press, 1993. 465p.

SOUZA, E.J.; REIS, R.C.S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Evaluation of in vitro effect of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on eggs and larvae of *Amblyomma cajennense*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 8, p. 127-131, 1999.

SOUZA, T.S.F. **Análise funcional do gene *chit1* do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae***. 79p, 2007. Dissertação de mestrado. (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SREE, K.S.; PADMAJA, V.; MURTHY, Y.L. Insecticidal activity of destruxin, a mycotoxin from *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales), against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) larval stages. **Pest Management Science**, v. 64, p.119-125, 2008.

STAATS, C.C.; JUNGES, A.; GUEDES, R. L. M.; THOMPSON, C.E.; DE MORAIS, G. L.; BOLDO, J. T.; DE ALMEIDA, L. G. P.; ANDREIS, F.C.; GERBER, A. L.; SBARAINI, N.; DA PAIXÃO, R. L. DE A.; BROETTO, L.; LANDELL, M.; SANTI, L.; BEYS-DA-SILVA, W.O.; SILVEIRA, C.P.; SERRANO, T.R.; DE OLIVEIRA,

E.S.; KMETZSCH, L.; VAINSTEIN, M. H.; DE VASCONCELOS, A. T. R.; SCHRANK, A. Comparative genome analysis of entomopathogenic fungi reveals a complex set of secreted proteins. **BMC Genomics**, v. 15, p. 822, 2014.

ST. LEGER, R.J.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 48, p. 85-95, 1986.

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 *Colliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. **Journal of General Microbiology**, v. 133, p. 1371-1382. 1987.

ST. LEGER, R.J.; DURRANDS, P.K.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.52, p.285-293, 1988.

ST LEGER, R. J.; GOETTEL, M.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. Penetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, p.168-179, 1991.

ST LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. Analysis of aminopeptidase and ipeptidylpeptidase IV from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 237-243, 1993.

ST. LEGER, R. J.; BIDOCHKA, M.J.; ROBERTS, D.W. (Isoforms of the cuticle-degrading Pr1 proteinase and production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.313, p. 1-7, 1994.

ST. LEGER, R. L.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; ROBERTS, D. W. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 93:6349-6354. 1996a.

ST LEGER, R.J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, R.J.; RIZZO, N.W.; ROBERTS, D.W. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1257-1264, 1996b.

ST LEGER, R. J.; JOSHI, L.; ROBERTS, D. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 709-713, 1998.

ST LEGER, R.J.; WANG, A. C.; FANG, W. New perspectives on insect pathogens. **Fungal Biology Reviews**, v. 25, p. 84-88, 2011.

- STEHR, F.; KRETSCHMAR, M.; KROGER, C.; HUBE, B.; SCHAFER, W. Microbial lipases as virulence factors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.**, v. 22 p. 347-355, 2003.
- SU, Y.; GUO, Q.; TU, J.; LI, X.; MENG, L.; CAO, L.; DONG, D.; QIU, J.; GUAN, X. Proteins differentially expressed in conidia and mycelia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* sensu stricto. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 59, p. 443–448, 2013.
- SUTHERST, R.W.; JONES, R.J.; SCHNITZERLING, H.J. Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks, **Nature**, v. 295, p. 320-321, 1982.
- THOMAS, M.B.; JENKINS, N.E. Effects of temperature on growth of *Metarhizium flavoviride* and virulence to the variegated grasshopper, *Zonocerus variegatus*, **Mycological Research**, v. 101, p. 1469-1474, 1997.
- TIAGO, P.V.; FURLANETO, M.C. O papel de proteases degradadoras de cutícula, **Revista do Programa de Ciências Agro-Ambientais**, v. 2, p. 40-51, 2003.
- TIAGO, P.V.; FUNGARO, M.H.; de FARIA, M.R.; FURLANETO, M.C. Effects of double-stranded RNA in *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* and *Paecilomyces fumosoroseus* on protease activities, conidia production, and virulence. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 335-339. 2004.
- TIAGO, P.V.; SILVA, R. J. Atividade proteolítica de isolados de *Metarhizium anisopliae* sobre substratos cuticulares e não cuticulares. **Ciência Rural** (UFSC, Impresso), Santa Maria-RS, v. 37, p. 26-30, 2007.
- TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. **Transaction of the British Mycological Society**, v.66, p. 407-411, 1976.
- VESTERGAARD, S.; CHERRY, A.; KELLER, S.; GOETTEL, M. Safety of hyphomycete fungi as microbial control agents. In: Hokkanen, H.M.T.; Hajek, A.E.; editors. **Environmental impacts of microbial insecticides**. Dordrecht, NL: Kluwer Academic Publishers. 2003, p. 3562.
- VIEIRA, I.C.; LUPETTI, K.O.; FATIBELLO-FILHO, O. Determination of paracetamol in pharmaceutical products using a carbon paste biosensor modified with crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*). **Química Nova**, v. 26, p. 39-43, 2003.
- VILCINSKAS, A. Coevolution between pathogen-derived proteinases and proteinase inhibitors of host insects. **Virulence**, v. 1, p. 206–214, 2010.

VILLACORTA, A. Technique for the mass culture of the entomophagous fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin in granular form. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Piracicaba, v.5, p.101-104, 1977.

XIA, Y.; CLARKSON, J.M.; CHARNLEY, A.K. Trehalose-hydrolysis enzymes of *Metarhizium anisopliae* and their role in pathogenesis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 80, p. 139–147, 2002.

XIE, X.Q.; LI, F.; YING, S.H.; FENG, M.G. Additive contributions of two manganese-colored superoxide dismutases (MnSODs) to antioxidation, UV tolerance and virulence of *Beauveria bassiana*. **Plos One**, v.7, p. 30298, 2012.

WAGNER, S.; SOWKA, S.; MAYER, C.; CRAMERI, R.; FOCKE, M.; KURUP, V.P.; SCHEINER O.; BREITENEDER, H. Identification of a *Hevea brasiliensis* Latex Manganese Superoxide Dismutase (Hev b 10) as a Cross-Reactive Allergen. **International Archives of Allergy and Immunology**, v.125, p. 120–127, 2001.

WANG, C.; TYPAS, M.A.; BUTT, T.M. Detection and characterization of pr1 virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 213, p. 251-255, 2002.

WANG, C.; ST. LEGER, R. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. **Eukaryotic Cell**. v. 6, p. 808-816, 2007.

WANG, Z.L., ZHANG, L.B., YING, S.H., FENG, M.G. Catalases play differentiated roles in the adaptation of a fungal entomopathogen to environmental stresses. **Environmental Microbiology**, v. 15, p. 409–418, 2013.

WHARTON, R.H. **Ticks with special emphasis on *Boophilus microplus***. In: PAL, R.; WHARTON, R.H. Control of arthropods of medical and veterinary importance. New York, Plenum Publishing, 1974, p. 36-52.

WILLADSEN, P. Tick control: thoughts on a research agenda. **Veterinary Parasitology**, v. 138, p. 161-168, 2006.

WU, J.; ALI, S.; HUANG, Z.; REN, S.; CAI, S. Media Composition Influences Growth, Enzyme Activity and Virulence of the Entomopathogen *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). **Pakistan Journal of Zoology**, v. 42, p. 451-459, 2010.

YIP, H.; RATH, A.C.; KOEN, T.B. Characterization of *Metarhizium anisopliae* isolates from Tasmanian pasture soils and their pathogenicity to redheaded cockchafer (Coleoptera: Scarabaeidae: *Adoryphorus couloni*). **Mycological Research**, v. 96, p. 92-96, 1992.

ZIBAE, A.; SADEGHI-SEFIDMAZGI, A.; FAZELI-DINAN, M. Properties of a lipase produced by *Beauveria bassiana*: purification and biochemical studies, **Biocontrol Science and Technology**, v. 21, p. 317-331, 2011.

ZIMMERMANN, G. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. **Pesticide Science**, v. 37, p. 375-379, 1993.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, p. 553-596, 2007a.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, p. 879-920, 2007b.