

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

**TESE**

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA E PATOGÊNICA DE ISOLADOS  
BRASILEIROS DE *Metarhizium anisopliae* s.l. NO CONTROLE  
BIOLÓGICO DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

**Wendell Marcelo de Souza Perinotto**

**2013**



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

**ESTUDO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E PATOGÊNICA DE  
ISOLADOS BRASILEIROS DE *Metarhizium anisopliae* s.l.  
VISANDO O USO NO CONTROLE BIOLÓGICO DE  
*Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

**Wendell Marcelo de Souza Perinotto**

*Sob a Orientação da Professora*

**Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt**

*e Co-orientação dos Professores*

**Dra. Cristiane Martins Cardoso de Salles e Dr. Walter Orlando Beys da  
Silva**

Tese submetida como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Ciências**, no Curso de  
Pós-Graduação em Ciências  
Veterinárias, Área de Concentração  
em Parasitologia Animal.

Seropédica, RJ  
Março de 2013

579.5  
P445a  
T

Perinotto, Wendell Marcelo de  
Souza, 1983-

Atividade enzimática e  
patogênica de isolados brasileiros  
de *Metarhizium anisopliae* s.l. no  
controle biológico de *Rhipicephalus*  
(*Boophilus*) *microplus* / Wendell  
Marcelo de Souza Perinotto - 2013.

78 f. : il.

Orientador: Vânia Rita Elias  
Pinheiro Bittencourt.

Tese (doutorado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro,  
Curso de Pós-Graduação em Ciências  
Veterinárias.

Bibliografia: f. 53-67.

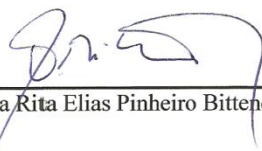
1. Fungos - Teses. 2. Fungos  
patogênicos - Teses. 3. *Boophilus*  
*microplus* - Controle biológico. 4.  
Carrapato - Controle - Teses. I.  
Bittencourt, Vânia Rita Elias  
Pinheiro, 1959-. II. Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Curso de Pós-Graduação em Ciências  
Veterinárias. III. Título.

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

**WENDELL MARCELO DE SOUZA PERINOTTO**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**,  
no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em  
Parasitologia Veterinária.

TESE APROVADA EM 05/03/2013



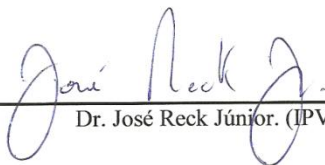
---

Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt. UFRRJ (Orientadora)



---

Dra. Gisela Lara da Costa. Fiocruz



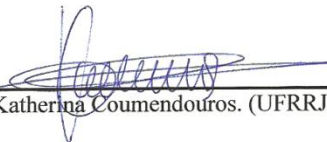
---

Dr. José Reck Júnior. (IPVDF)



---

Dra. Kátia Maria Famadas. (UFRRJ)



---

Dra. Katherina Coumendouros. (UFRRJ)

*Dedicatória:*

*A Deus, aos meus pais, aos meus familiares, aos amigos, a comissão orientadora, a Marcela e a todos que confiaram em mim!*

## AGRADECIMENTOS

Sei que tudo o que sou e o que sei devo a Deus e é a ele que agradeço em primeiro lugar por mais essa vitória em minha vida.

Aos meus queridos pais, cujas palavras me faltam para expressar o quanto sou grato por tudo o que sempre fizeram por mim, mesmo com tantas dificuldades me possibilitaram chegar até aqui.

Aos meus tios Edinho e Maria Helena que me acolheram e me deram todo apoio para que eu pudesse realizar este sonho e a todos meus familiares por compartilharem comigo os desafios desta caminhada.

A professora Vânia que sempre me ajudou nesta minha vida acadêmica desde a bolsa de alimentação até aqui. Foram muitos anos de orientação, ensinamento, paciência e amizade, que juntos possibilitaram o meu crescimento acadêmico e pessoal.

A Marcela por todo carinho, companheirismo, incentivo e compreensão por todos estes anos me estimulando a concretizar meus objetivos.

Aos amigos do Laboratório de Controle Microbiano (LCM): Isabele da Costa Ângelo, Patrícia da S. Golo, Mariana G. Camargo, Simone Quinelato Bezerra, Caio Márcio de oliveira Monteiro, Ana Paula Moraes, Fillipe Araújo de Sá, Sabrina Rita da Fonseca Rezende, Caio Junior Balduino Coutinho Rodrigues, Jéssica Fiorotti de Paulo, Allan Felipe Marciano e Luciana Aparecida de Souza, por todo companheirismo nas horas de alegria e tristeza, pela participação neste trabalho, por auxiliarem na minha aprendizagem e por todos os momentos vividos no laboratório.

Aos amigos que passaram pelo LCM: Éverton K. K. Fernandes, Thiago C. Bahiense, Andréia Terra, Rosana Colatino, Denise Melo e Sandra Borges.

Aos amigos Thiago Marques, Huarrisson A. Santos, Marcus S. Pires, Maristela Peckle e Cláudia Bezerra por todos os momentos vividos e cafezinhos bebidos na estação de pesquisas parasitológicas W. O. Neitz da UFRRJ.

Aos amigos Walter O. Beys da Silva, Lucélia Santi, Leonardo Broetto, Ângela Junges e todos os alunos dos laboratórios 214, 217 e 220, do CBIot da UFRGS, por toda ajuda, aprendizado e companheirismo.

Aos professores Dr. Augusto Schrank, Dra. Marilene H. Vaisntein e Dr. Jorge Guimarães da UFRGS, Dr. Carlos Luiz Massard e Dr. Adivaldo H. da Fonseca da UFRRJ, pela disponibilidade da utilização dos seus laboratórios.

A Dra. Gisela Lara Costa, Dra. Kátia Maria Famadas, Dra. Katherina Coumendouros, Dra. Áurea L. Moraes, Dr. José Reck Júnior, Dr. João Luiz Horacio Faccini, pela participação como membros de avaliação da minha tese e pelas sugestões que engrandeceram este trabalho.

Aos meus co-orientadores e amigos Dra. Cristiane M. C. de Salles e Dr. Walter O. Beys da Silva pela paciência e ensinamento das técnicas bioquímicas.

Aos amigos Hermes, Gabriel, Gideão, Cássio, Matheus, Caio, Júlio, Vinícius, Fábio, Fabiano, Sandro, Neto, Marcus, enfim, todos do time de futsal da pós (2010-2013), pelos momentos de descontração. Ps: pena que só fomos vice em todos os campeonatos.

Aos funcionários Maurício, Ivan, Arthur, pela disponibilidade nas horas que precisei e pela amizade adquirida ao longo desses anos de curso.

A todos os professores do curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ e aos colegas de turma pelos conhecimentos trocados nas salas de aulas.

A Capes pelo auxílio financeiro.

## **BIOGRAFIA**

Wendell Marcelo de Souza Perinotto, filho de Luiz Antônio Valentin Perinotto e Helena Maria de Souza Perinotto, nasceu na cidade de Casa Branca-SP, no dia 29 de março de 1983.

Cursou o ensino fundamental na Escola Estadual de Primeiro e Segundo Grau Professora Rita de Macedo Barreto, na cidade de Itobi-SP. Concluiu o ensino Médio e técnico na E.T.A.E. “Dr. Carolino da Mota e Silva”, formando em Técnico em Agropecuária no ano de 2000.

Ingressou na faculdade no curso de Zootecnia em outubro de 2002. Porém no ano de 2004, através de um processo seletivo interno, transferiu-se para o curso de Medicina Veterinária que foi concluído em dezembro de 2007, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ.

Durante todo o período da graduação foi bolsista no Laboratório de Controle Microbiano, participando de artigos científicos, congressos e eventos locais.

Em março de 2008 iniciou o curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Parasitologia Animal, ao nível de Mestrado, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob orientação da Dra. Vânia R. E. P. Bittencourt. O mestrado foi concluído em fevereiro de 2010.

Em março de 2010 iniciou o doutorado no mesmo curso e instituição, sendo orientado pela professora Dra. Vânia R. E. P. Bittencourt e co-orientado pela Dra. Cristiane M. C. de Salles e Dr. Walter O. B. da Silva.

Durante os cursos de pós-graduação participou de congressos e simpósios, bancas de conclusão de curso e publicou artigos científicos em periódicos nacionais e internacionais.

## RESUMO

PERINOTTO, Wendell Marcelo de Souza. **Estudo da atividade enzimática e patogênica de isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l. visando o uso no controle biológico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.** 2013. 85 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

O fungo *Metarhizium anisopliae* sensu lato é um dos micro-organismos mais promissores a ser utilizado no controle de carrapato, e por isso, vem sendo estudado em todo o mundo, demonstrando potencial acaricida, principalmente em testes *in vitro*. Entretanto, tem sido observada variação na virulência entre diferentes isolados deste fungo. Nessa perspectiva, o presente estudo teve como objetivos verificar a ação patogênica em suspensões aquosas e em diferentes formulações oleosas e também analisar a ação enzimática de isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. com a finalidade de selecionar isolados mais virulentos para utilização em futuros programas de biocontrole de carrapatos. Além disso, pesquisar a presença de partículas virais de dsRNA e associar as atividades enzimáticas, inclusive da subtilisina Pr 1 secretadas pelos isolados de *M. anisopliae* s.l. com os percentuais de controle, visando estabelecer marcadores moleculares de virulência específicos para o carrapato *R. microplus*. Para tanto, cinco linhagens de *M. anisopliae* s.l. isolados de diferentes estados brasileiros foram analisadas. Primeiramente foi realizado um bioensaio para testar a virulência destes isolados sobre fêmeas alimentadas de *R. microplus*. Concomitantemente foram realizados ensaios enzimáticos para quantificar as atividades de lipases, proteases e quitinases secretadas pelos diferentes isolados de *M. anisopliae* s.l. cultivados em meio líquido contendo cutícula de carrapato e estearato de colesteril, através da utilização de substratos cromogênicos e fluorescentes. Para a pesquisa de micovírus, foi realizada a extração do ácido nucléico total que foi submetido à digestão por uma endonuclease S1 e uma RNase A e posteriormente visualizado em gel de agarose. Além desses ensaios, foi realizado um bioensaio utilizando diferentes formulações oleosas, uma a base de óleo vegetal e outra com óleo mineral, ambas a 10%. Neste experimento, fêmeas de *R. microplus* completamente alimentadas foram imersas por três minutos nos respectivos tratamentos, a eficácia dos tratamentos foi avaliada através de alterações provocadas nos parâmetros reprodutivos destas fêmeas. O estudo demonstrou que há variação na virulência entre os isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. para fêmeas alimentadas de *R. microplus*, além disso, ficou evidenciado que os isolados que apresentaram os maiores percentuais de controle foram também os que tiveram as maiores atividade lipolítica, proteolítica e quitinolítica. Pelo fato da enzima Pr 1 ser sabidamente envolvida no processo de infecção de *M. anisopliae* s.l., os resultados aqui encontrados demonstraram a possibilidade de usar a atividade desta enzima como um potencial marcador molecular para *R. microplus*, visto que os isolados que apresentaram maior atividade de Pr 1 foram os mais virulentos para esta espécie de carrapato. Entretanto, não foi evidenciada nenhuma relação entre a virulência com a infecção por partículas de dsRNA, sendo que dos cinco isolados testados, somente um não estava infectado. A partir do bioensaio utilizando formulações oleosas, ficou evidenciada que as formulações contendo óleo mineral foram mais eficientes do que as que continham óleo vegetal, proporcionando os melhores percentuais de controle. Além disso, pode-se concluir que os isolados CG 148 e CG 629 quando em formulação de óleo mineral apresentam alto potencial de controle para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

**Palavras-chave:** fungos artropodopatogênicos, virulência e controle biológico.



## ABSTRACT

PERINOTTO, Wendell Marcelo de Souza. **Study of the enzymatic activity and pathogenic of *Metarhizium anisopliae* s.l. Brazilian isolates targeting the biological control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.** 85 p. Thesis (Doctor Science in Veterinary Science, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

The fungus *Metarhizium anisopliae sensu lato* (s.l.) is one of the most promising microorganisms to be used in the biological control of ticks. This fungus has been studied worldwide showing accurate acaricidal potential, especially in *in vitro* tests. However, a large variation on the virulence of different fungal isolates has been observed. From this perspective, the present study aimed to verify the pathogenic action of different fungal formulations (oil-based and aqueous) on ticks and also analyze the enzymatic action of *M. anisopliae* s.l. isolates from different Brazilian geographical regions in order to select the most virulent isolates for further use in programs of biological control of ticks. The presence of dsRNA viral particles (mycovirus) associated to the fungal enzymatic activities was also studied. Among the studied enzymes was the subtilisin Pr 1; whose enzymatic activity was associated with the percentage of tick control caused by the fungi aiming establish virulence markers specific for *Rhipicephalus microplus* ticks. Five *M. anisopliae* s.l. isolates from different Brazilian states were analyzed. First, a bioassay was performed on *R. microplus* engorged females to test the virulence of these fungal isolates. Concomitant assays were performed to quantify the enzymatic activity of lipases, proteases and chitinases secreted by the same *M. anisopliae* s.l. isolates. Fungi were grown in liquid medium containing ticks' cuticle and cholesteryl stearate; fluorescent and chromogenic substrates were used to quantify the enzymatic activity. Mycovirus survey was carried out following steps of total nucleic acid extraction before an endonuclease S1 and RNase A digestion and consecutive visualization on agarose gel. Furthermore, a bioassay was conducted using different oil formulations (10 % vegetable oil and 10% mineral oil). In this experiment, *R. microplus* engorged females were immersed in the respective formulations for three minutes. The efficacy of the treatments was assessed through analysis in the females' reproductive parameters. The present study showed that there is variation in the virulence among *M. anisopliae* s.l. isolates against *R. microplus*, moreover, it was evident that the isolates that yielded the highest tick control percentages were also those which had the highest lipolytic, proteolytic and chitinolytic activities. Pr1 is known to be involved in the infection process of *M. anisopliae* s.l.; accordingly the present results demonstrate that this enzyme can be used as a molecular marker for *R. microplus*, since the isolates that showed higher Pr 1 activity were also the most virulent for this tick species. However, there was no evident analogy between the infection with dsRNA virulent particles and the enzymatic activity levels of the five isolates tested, considering that only one was not infected. Regarding the bioassay with oil-based formulations, it was clear that formulation containing mineral oil were more effective than those containing vegetable oil which provided low percentage of tick control. Furthermore, it can be concluded that the isolates GC 148 and GC 629 have a high potential to control *R. microplus* engorged females when formulated in mineral oil.

**Key-words:** arthropod-pathogenic fungi, virulence and biological control.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

- Tabela 1.** Média  $\pm$  Desvio padrão do peso da massa de ovos (P.P.); percentual de eclosão de larvas (P.E.); índice de produção de ovos (I.P.O.), índice nutricional (I.N.) e percentual de controle de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com suspensão aquosa na concentração de  $10^8$  conídios/mL de cinco isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. .... 22
- Tabela 2.** Atividade de lipase (U) ( $\mu\text{Mol/mL/min}$ ) de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. cultivados em meio líquido contendo 1% de cutícula de carrapato associado a 1% de estearato de colesteril..... 23
- Tabela 3.** Atividade de protease de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. cultivados em meio líquido contendo 1% de cutícula de carrapato associado a 1% de estearato de colesteril..... 23
- Tabela 4.** Atividade de quitinase (U) ( $\mu\text{Mol/mL/min}$ ) de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. cultivados em meio líquido contendo 1% de cutícula de carrapato associado a 1% de estearato de colesteril..... 27

### CAPÍTULO II

- Tabela 1.** Média  $\pm$  Desvio padrão do percentual de mortalidade de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* após o tratamento com suspensão aquosa na concentração de  $10^8$  conídios/mL de cinco isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. .... 36
- Tabela 2.** Atividade de Pr 1 (U) ( $\mu\text{Mol/mL/min}$ ) de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. cultivados em meio líquido contendo 1% de cutícula de *Rhipicephalus microplus* associado a 1% de estearato de colesteril..... 37

### CAPÍTULO III

- Tabela 1.** Média  $\pm$  Desvio padrão do peso da massa de ovos (P.P.); percentual de eclosão de larvas (% P.E.); índice de produção de ovos (I.P.O.), índice nutricional (I.N.) e percentual de controle de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com formulação de óleo vegetal a 10% na concentração de  $10^8$  conídios/mL de cinco isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. .... 41
- Tabela 2.** Média  $\pm$  Desvio padrão do peso da massa de ovos (P.P.); percentual de eclosão de larvas (% P.E.); índice de produção de ovos (I.P.O.), índice nutricional (I.N.) e percentual de controle de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com formulação de óleo mineral a 10% na concentração de  $10^8$  conídios/mL de cinco isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. .... 47

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1.** Fêmea ingurgitada de *Rhipicephalus microplus* ..... 2
- Figura 2.** Esquema do ciclo biológico de *Rhipicephalus microplus* ..... 4
- Figura 3.** Foto de microscopia eletrônica mostrando o ciclo de infecção de *Metarhizium anisopliae* no hospedeiro *Rhipicephalus microplus*..... 7

### CAPÍTULO I

- Figura 1.** Zimograma de protease em gel de poliacrilamida (12%) contendo gelatina 0,1 % como substrato. M: padrão de peso molecular; CG 112, CG 347, CG 148, CG 629 e CG 32, cultivados por 24 horas..... 24
- Figura 2.** Zimograma de protease em gel de poliacrilamida (12%) contendo gelatina como substrato. M: padrão de peso molecular; CG 112, CG 347, CG 148, CG 629 e CG 32, cultivados por 48 horas..... 25
- Figura 3.** Zimograma de protease em gel de poliacrilamida (12%) contendo gelatina como substrato. M: padrão de peso molecular; CG 112, CG 347, CG 148, CG 629 e CG 32, cultivados por 72 horas..... 26
- Figura 4.** Eletroforese em gel de agarose (1,2%) dos ácidos nucléicos totais dos diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l..... 27

### CAPÍTULO II

- Figura 1.** Fêmeas de *Rhipicephalus microplus* no oitavo dia após o tratamento com diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l..... 37

### CAPÍTULO III

- Figura 1.** Fêmeas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com formulação de *Metarhizium anisopliae* s.l. em óleo vegetal..... 41
- Figura 2.** Fêmeas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com formulação de *Metarhizium anisopliae* s.l. em óleo mineral..... 47

## LISTA DE ABREVIACOES, SÍMBOLOS E UNIDADES

<b>s.l.</b>	Sensu lato
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µL</b>	Microlitro
<b>µM</b>	Micromolar
<b>g</b>	Gramas, giros
<b>dsRNA</b>	Ácido ribonucléico “double-strand”: “fita dupla”
<b>p:v</b>	Peso por volume
<b>mL</b>	Mililitro
<b>NK</b>	Células Natural Killer
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>UR</b>	Umidade Relativa
<b>KDa</b>	Quilodaltons = 1000 daltons
<b>pI</b>	Ponto isoelétrico
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>BDA</b>	Batata Dextrose Ágar
<b>nm</b>	Nanômetros
<b>U</b>	Unidade de atividade enzimática
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida
<b>DEPC</b>	Dietil-pirocarbonato
<b>OD</b>	Densidade ótica
<b>Tris</b>	2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
<b>Triton X-100</b>	Éter octilfenólico de decaetilenoglicol
<b>MUF</b>	Metilumbeliferil
<b>ρNP</b>	Paranitrofenil
<b>MAD</b>	Proteína tipo Adesina de <i>Metarhizium</i>

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	1
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	2
<b>CAPÍTULO I</b>	
ESTUDO ENZIMÁTICO E PESQUISA DE MICOVÍRUS EM DIFERENTES ISOLADOS BRASILEIROS DE <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l. RELACIONADOS COM VIRULÊNCIA PARA <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	14
Resumo	15
Abstract	16
1. Introdução	17
2. Material e Métodos	17
3. Resultados	22
4. Discussão	27
<b>CAPÍTULO II</b>	
ATIVIDADE DE PROTEASE PR1 EM <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.: MARCADOR MOLECULAR DE VIRULÊNCIA SOBRE O CARRAPATO BOVINO <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	31
Resumo	32
Abstract	33
1. Introdução	34
2. Material e Métodos	34
3. Resultados	36
4. Discussão	38
<b>CAPÍTULO III</b>	
ESTUDO DA PATOGENICIDADE <i>IN VITRO</i> DE DIFERENTES ISOLADOS BRASILEIROS DE <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l. EM FORMULAÇÕES OLEOSAS SOBRE <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	40
Resumo	41
Abstract	42
1. Introdução	43
2. Material e Métodos	43
3. Resultados	45
4. Discussão	48
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b>	50
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	51
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	53

## INTRODUÇÃO GERAL

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Canestrini, 1887 (Murrel e Barker, 2003) (Acari: Ixodidae) apresenta grande importância em medicina veterinária por promover danos diretos e indiretos aos animais. Este carrapato está envolvido na transmissão de agentes patogênicos causadores da Tristeza Parasitária Bovina, que é um complexo de doenças de alta morbidade, como por exemplo, Babesiose e Anaplasmose. Essas doenças são responsáveis por grandes prejuízos econômicos devido à morte de animais, queda na produtividade de leite e de carne, além dos gastos com controle e profilaxia.

O uso de acaricidas químicos é a principal forma de controle de carrapatos nos rebanhos bovinos, porém a utilização indiscriminada pode predispor a contaminação do meio ambiente, intoxicação de mamíferos e seleção de cepas resistentes. Com intuito de minimizar esses danos e produzir carne e leite livres de resíduos químicos, medidas alternativas de controle têm sido propostas.

Um método alternativo que vem sendo amplamente estudado no controle destes ectoparasitas é o biológico. Neste contexto, os fungos filamentosos artropodopatogênicos destacam-se como os micro-organismos mais promissores, devido à capacidade de penetração direta pela cutícula dos hospedeiros, facilitando sua aplicação a campo através de aspersão sobre os animais infestados.

Dentre os fungos estudados no controle de carrapatos, uma das espécies de maior destaque é *Metarhizium anisopliae sensu lato*, que tem demonstrado resultados satisfatórios principalmente em testes *in vitro*. Por esse motivo, as pesquisas com o intuito de selecionar isolados de maior virulência vêm aumentando e, conseqüentemente, tem possibilitado a descoberta de novos potenciais biocontroladores provenientes de diversas regiões e com especificidade a diferentes hospedeiros.

Os fungos penetram nos artrópodes pela associação de fatores físicos como a pressão do tubo germinativo sobre o tegumento, juntamente com uma degradação química da cutícula exercida por enzimas hidrolíticas. Vários estudos vêm sendo realizados com intuito de estabelecer a interação fungo-artrópode e esclarecer a importância das enzimas secretadas durante a infecção. As proteases Pr 1 foram as primeiras enzimas que tiveram o papel esclarecido na penetração, seguidas pelas quitinases; e mais recentemente foi demonstrada a importância das lipases durante a infecção. As proteases subtilisinas Pr1 possuem várias isoformas e estão intimamente relacionadas com a virulência para os artrópodes.

Atualmente existem muitas linhagens de *M. anisopliae* s.l. isoladas de diferentes substratos e hospedeiros que estão armazenadas em diversas coleções no mundo. Quando estas são testadas sobre diferentes espécies de artrópodes, geralmente há variação na virulência. Estudos têm demonstrado que existe variação na secreção de proteases, quitinases e lipases entre isolados de *M. anisopliae* s.l., podendo, desta maneira, afetar a virulência sobre os artrópodes.

Outro fator que vem sendo relacionado com a virulência dos fungos artropodopatogênicos é a infecção por micovírus que são vírus de RNA fita dupla (dsRNA), frequentemente encontrados infectando vários gêneros de fungos. Apesar da maioria dessas infecções ser latente, em alguns casos, a presença destas partículas pode interferir no fenótipo do hospedeiro, alterando a morfologia da colônia e diminuição na taxa de crescimento e esporulação fúngica. Existem estudos que demonstram que a infecção por esses vírus promove hipovirulência do fungo.

A busca de isolados com maior potencial de virulência é de extrema importância, pois um dos entraves da utilização destes micro-organismos a campo é o tempo de ação sobre o hospedeiro. Desta maneira, quanto mais virulento for o isolado, menor será o tempo

necessário para a infecção e morte do hospedeiro, aumentando a chance de sucesso comercial do biocontrole.

Vários estudos demonstram a ação patogênica de *M. anisopliae* s.l. sobre carrapatos em testes *in vitro*. Entretanto, em testes a campo, há um decréscimo na patogenicidade sobre o artrópode, porque os fungos sofrem influência de diversos fatores ambientais, principalmente radiação solar, temperatura e umidade. Desta forma, a utilização de formulações baseadas nestes organismos pode aumentar a estabilidade dos conídios, prolongar sua persistência a campo e, inclusive, aumentar sua virulência para carrapatos.

Assim, o presente estudo teve como objetivos verificar o potencial patogênico *in vitro* de diferentes isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. formulados ou não em óleo mineral e/ou vegetal, sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, além de relacionar as atividades de lipases, proteases, quitinases e também a infecção por micovírus com a virulência destes isolados, com o intuito de estabelecer marcadores moleculares de virulência desta espécie fúngica para o carrapato dos bovinos.

## REVISÃO DE LITERATURA

### *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

O carrapato *R. microplus* (Figura 1) pertence ao Filo Artropoda, Classe Aracnida, Subclasse Acari, Ordem Ixodida, Subordem Metastigmata e Família Ixodidae (FLECHTMANN, 1990). Recentemente, através de estudos morfológicos e moleculares, Murrel e Barker (2003) propuseram que as cinco espécies do gênero *Boophilus* fossem transferidas ao gênero *Rhipicephalus*, devido à similaridade filogenética entre os gêneros *Boophilus* e *Rhipicephalus*. Desta forma, foi estabelecida uma nova classificação e partir disso, *Boophilus* passou a ser considerado subgênero de *Rhipicephalus*.



**Figura 1.** Fêmea adulta de *R. microplus* completamente ingurgitada (Foto cedida por Fillipe Araújo de Sá).

A palavra de origem grega *Boophilus* foi designada em 1891 por Curtice e significa “amigo do boi”, devido a sua alta especificidade pelos bovinos. Esta especificidade também resultou no nome popular “carrapato dos bovinos” dado a espécie *R. microplus*. Em rebanhos bovinos, as maiores infestações ocorrem em animais da espécie *Bos taurus* (taurinos) e as menores em *Bos indicus* (zebuínos) (GONZALES, 1975). Bovinos taurinos apresentam, em média, 10,5 vezes mais carrapatos que os de cruzamentos com zebuínos (FRANCIS; LITTLE, 1964). Segundo Gomes (1995), esta resistência se deve à seleção natural pelo tempo maior que *B. indicus* conviveu com os carrapatos. Além dos bovinos, outros animais, em épocas de grande infestação nas pastagens, podem servir de hospedeiros, como, por exemplo, ovelhas, cavalos, veados, cães, cabras, homem (GONZALES, 1974), búfalos, gatos, coelhos, cangurus, porcos e onças (PEREIRA, 1980).

Segundo Wharton (1974), *R. microplus* é originário da Ásia, mais especificamente da Índia e da Ilha de Java. Sua distribuição pelas regiões tropicais e subtropicais ocorreu devido à movimentação de animais e mercadorias na época das expansões territoriais no século XVI. *R. microplus* está presente em praticamente todos os países compreendidos entre os paralelos 32° de latitude norte e 32° de latitude sul, podendo ter alguns focos no paralelo 35° sul, sendo o ectoparasita de maior relevância econômica na pecuária desses países (NUÑEZ et al., 1982).

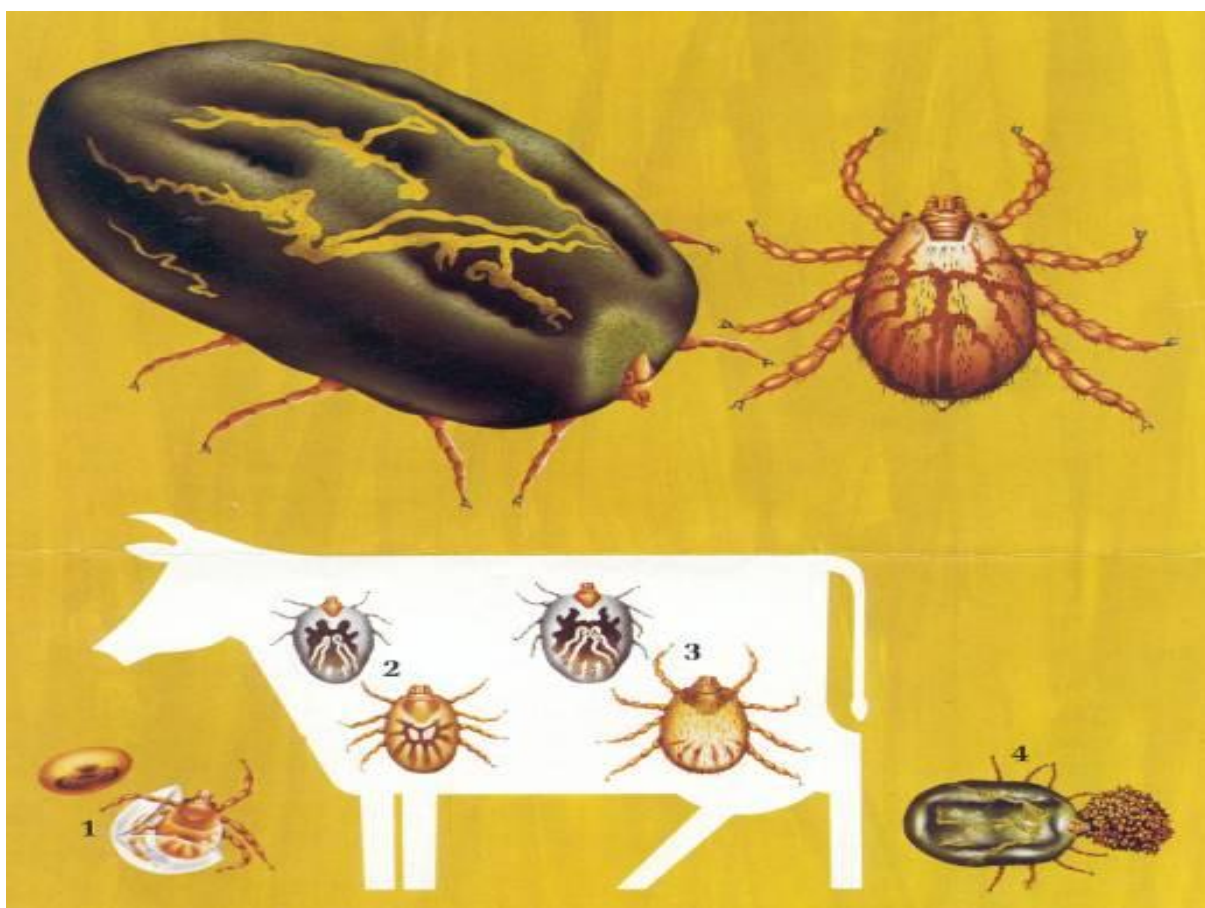
No Brasil, acredita-se que *R. microplus* foi introduzido por animais comprados do Chile no início do século XVIII (GONZALES, 1995), adaptando-se perfeitamente ao nosso clima (BARCI, 1997). O parasitismo deste carrapato em bovinos no Brasil é favorecido por fatores climáticos (com exceção do período do inverno na região sul do país), principalmente pelo calor e umidade, e também pela exploração de raças mais sensíveis, como as raças européias taurinas e seus cruzamentos (GRISI et al., 2002). Os prejuízos econômicos ocasionados por *R. microplus* gira em torno de 2 bilhões de dólares por ano, devida a compra de carrapaticidas, mão de obra para sua administração e pela perda na produtividade do rebanho Grisi et al. (2002).

Uma fêmea de *R. microplus* pode ingerir de 0,5 a 3,0 mL de sangue durante a fase parasitária, podendo inclusive causar anemia nos hospedeiros em altas infestações (GONZALES, 1993). Durante o repasto sanguíneo, o carrapato provoca intenso desconforto aos bovinos que, conseqüentemente, diminuem a ingestão de alimento (JONSSON, 2006), a taxa diária de conversão do alimento em carne e/ou leite, promovendo o enfraquecimento generalizado dos animais e deixando-os mais susceptíveis a contrair doenças (FURLONG, 1993). Através de um estudo realizado na Austrália, foi estimado que cada fêmea de *R. microplus* seria responsável pela queda de produção diária de aproximadamente 8,9 mL de leite e de 1,0 g de peso corporal (JONSSON et al., 1998). No momento de sua alimentação, o carrapato inocula saliva no seu hospedeiro. A saliva contém inúmeras proteínas com funções específicas que podem inibir a cascata do complemento, causar enfraquecimento da função das células *natural killer* (NK), células dendríticas e neutrófilos e bloquear a atividade quimiotática, ou seja, a saliva possui ação imunossupressora (HOVIUS, 2009). Além disso, pode transmitir os agentes do complexo da tristeza parasitária, que causam doença com elevado grau de morbidez, podendo levar o animal a morte (PETER et al., 2005).

Os pontos de parasitismo causados pelos carrapatos resultam em lesões da pele, que, além de serem prejudiciais à produção de couro, promovendo a desvalorização no preço final do produto, predis põem o animal a infecções por bactérias e a outros parasitas como larvas de moscas (HORN; ARTECHE, 1985). A distribuição do carrapato no corpo do hospedeiro não é homogênea, sendo a parte posterior do animal (virilha, úbere e traseira) a região mais infestada, seguida da região anterior (cabeça e parte escapular) e por último a região mediana (pós escapular) (OLIVEIRA et al., 1989).



O ciclo de vida do carrapato *R. microplus* (figura 2) divide-se em fase de vida livre ou não parasitária, que se inicia com o desprendimento da teleóquina (fêmea completamente ingurgitada) do hospedeiro e a sua queda ao solo; e a de vida parasitária, que se inicia quando a larva se fixa no hospedeiro. Na fase de vida livre, são necessários em torno de três dias para a pré-postura e 15 dias para a postura. Geralmente a massa total de ovos equivale a 52% do peso inicial da teleóquina e a cada postura uma fêmea produz de 2000 a 3000 ovos, com período de incubação de 22 a 30 dias, e, após a eclosão das larvas, são necessários seis dias para o fortalecimento de suas cutículas, transformando-as em larvas infestantes (FURLONG, 1993). Segundo Sonenshine (1993), as larvas de *R. microplus* possuem geotropismo negativo, permanecem na parte posterior da pastagem para alcançar os hospedeiros, que geralmente são localizados pelo odor, pelas vibrações, pelo sombreamento, por estímulos visuais e pelo gradiente de concentração de CO<sub>2</sub>. Na fase parasitária são necessários, em média, de 18 a 26 dias para a fixação, alimentação, troca de cutícula, fase adulta e acasalamento, assim como para a alimentação, ingurgitamento e queda das fêmeas. Os machos permanecem mais tempo sobre o bovino e podem acasalar com outras fêmeas (FURLONG, 1993). Segundo Faccini e Barros-Batesti (2006), as fases do ciclo de *R. microplus* geralmente se sobrepõem, sendo possível observar infestações com novas larvas antes do ingurgitamento total e queda das teleóquinas.



**Figura 2.** Esquema do ciclo biológico de *R. microplus*. 1: eclosão da larva no ambiente; 2: ninfas; 3: adultos e 4: fêmeas alimentadas realizando postura no ambiente. (Fonte: <http://www.engormix.com>).

No Brasil, o carrapato *R. microplus* representa um grande problema na produção de bovinos em diferentes regiões e o uso de acaricidas químicos vem sendo a medida de controle

profilático e terapêutico mais comum contra esse ectoparasito. A maioria dos produtores continua combatendo o carrapato da forma “tradicional”, com uso intenso e desordenado de produtos comerciais que são empregados de 12 a 24 vezes ao ano (ROCHA, 1996). Esse uso inadequado de produtos carrapaticidas, além de acarretar em prejuízos econômicos, favorece a seleção de carrapatos resistentes (LEITE, 1988).

O controle dos carrapatos é extremamente complexo devido a vários fatores, como, por exemplo, a grande quantidade de ovos que uma fêmea produz e que posteriormente se transformam em larvas infestantes (KETTLE, 1995), a falta de conhecimentos dos pecuaristas e peões que lidam com o rebanho (ROCHA et al., 2006).

Devido à complexidade do controle de *R. microplus* e os efeitos adversos causados pelos acaricidas químicos, como por exemplo, a contaminação do meio ambiente, intoxicação de mamíferos, acúmulo de resíduos nos alimentos (carne e leite) e principalmente a seleção de cepas resistentes a diversas bases químicas, o controle biológico está sendo cada vez mais atrativo, pois causa menos danos ao meio ambiente, além disso, a população humana segue uma tendência crescente no consumo de produtos orgânicos (SAMISH et al., 2004).

### ***Metarhizium anisopliae* s.l.**

Entre os fungos utilizados no controle biológico de pragas de importância agrícola e veterinária, o fungo *M. anisopliae* s.l. destaca-se como um agente microbiano de extrema importância. Seu mecanismo de ação é amplamente estudado e conhecido, este fungo filamentososo pode ser encontrado naturalmente em diversas regiões, no solo, na rizosfera de plantas e em cadáveres de artrópodes, desde ambientes de clima temperado até clima tropical (ZIMMERMAN, 2007 b). *Metarhizium anisopliae* s.l. pertence à classe Deuteromycetes, ordem Moniliales, família Moniliaceae e foi descrito por Metschnikoff em 1879 pela primeira vez como *Entomophthora anisopliae*. Este pesquisador realizou o primeiro trabalho de controle microbiano utilizando este fungo para o controle de larvas do besouro *Anisopliae austriaca*; posteriormente esta espécie foi classificada por Sorokin em 1883 como *Metarhizium anisopliae* (TULLOCH, 1976). A partir de então, este patógeno vêm sendo estudado no controle de muitas espécies de insetos e ácaros, apresentando um imenso potencial biocontrolador tendo como hospedeiros mais de 300 espécies de artrópodes (ALVES, 1998).

A classificação atual de *Metarhizium* sp. foi proposta por Bischoff et al. (2009) utilizando análises filogenéticas multigênicas. Segundo os autores, as evidências filogenéticas e morfológicas afirmam o caráter monofilético dos nove táxons terminais do complexo *M. anisopliae*, reconhecendo como espécies: *M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. acridum*, *M. lepidiotae*, *M. majus* e *M. brunneum* e descrevendo também duas novas espécies, *M. globosum* e *M. robertsii*. Desta forma, as espécies ainda não reclassificadas de acordo com a metodologia de Bischoff et al. (2009), devem ser consideradas pertencentes ao complexo *M. anisopliae* e referenciadas como *M. anisopliae sensu lato* (s.l.). Além da forma assexuada (anamórfica), *Metarhizium* apresenta a forma sexuada (teleomórfica), denominada *Cordyceps*. Atualmente são descritas três espécies teleomórficas: *C. brittlebankisoides* (LIU et al., 2001), *C. campsosterni* (ZHANG et al., 2004) e *C. taii* (LIANG et al., 1991). Sung et al. (2007) propuseram uma nova nomenclatura do gênero *Metarhizium* na forma teleomórfica de *Cordyceps* para *Metacordyceps*.

*M. anisopliae* s.l. é um fungo de cultivo simples, necessitando basicamente de uma fonte de amido, desenvolve-se em diversos meios de cultura (AZEVEDO, 1998), é cosmopolita e apresenta grande potencial como artropodopatógeno, pois segundo Goettel et al. (1990) pode infectar uma gama de hospedeiros tais como: Symphyla, Orthoptera, Dermaptera, Isoptera, Homoptera, Heteroptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera,

Siphonaptera, Lepidoptera, Acari, Ephemeroptera, Dermaptera e Heteroptera. Por isso, é um dos fungos que mais tem sido estudado em programas de manejo biológico de pragas (ONOFRE et al., 2002).

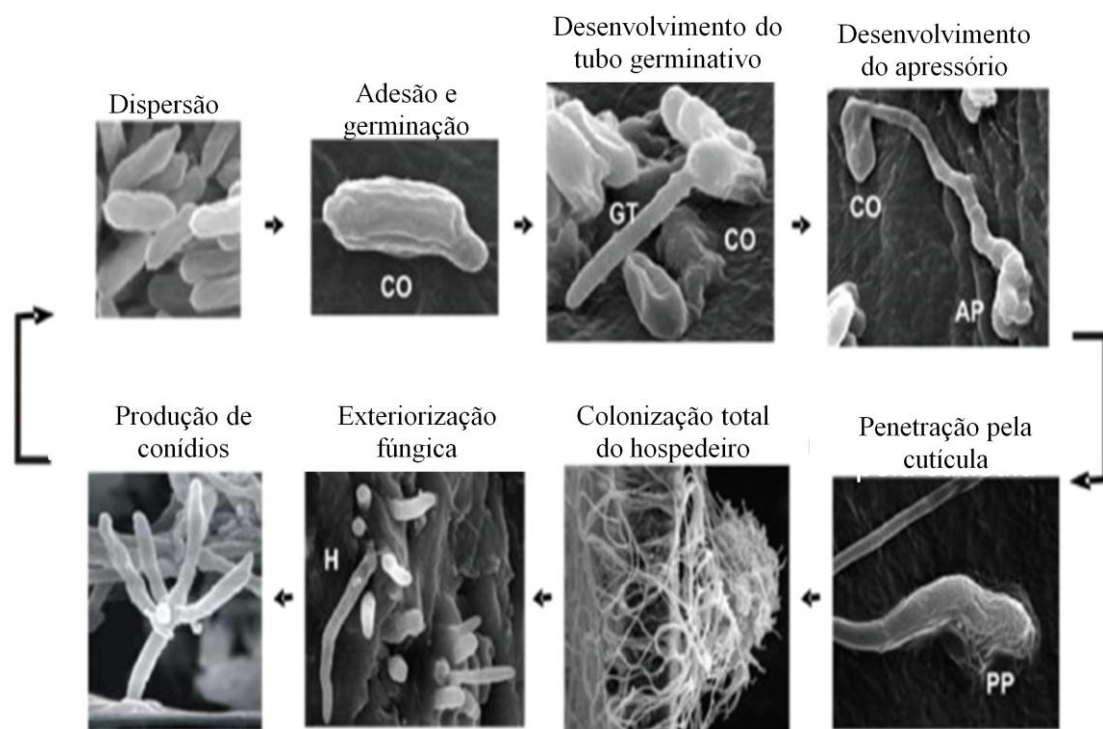
No Brasil os principais projetos de controle de pragas envolvendo *M. anisopliae* s.l. são: cigarrinhas da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata* e *M. fimbriolata*), cigarrinhas das pastagens (*Deois flavopicta* e *Zulia entreriana*), cupim das pastagens (*Cornitermes cumulans*), cupim da cana-de-açúcar (*Heterotermes* sp.), broca-da-bananeira (*Cosmopolites sordidus*), broca-dos-citros (*Diploschema rotundicolle*), percevejo-do-colmo do arroz (*Tibraca limbativentris*) e a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) (ALVES, 1998). Além destes projetos, *M. anisopliae* s.l. vem sendo amplamente estudado em ensaios laboratoriais no controle de carrapato e tem demonstrado eficiência sobre várias espécies como *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor nitens*, *Amblyomma variegatum*, *Amblyomma Cajennense*, *R. microplus* (KAAYA et al., 1996; MONTEIRO et al., 1998; BITTENCOURT et al., 1999; BITTENCOURT, 2000; PAIÃO et al., 2001; GARCIA et al., 2004; LOPES et al., 2007; PERINOTTO et al., 2012 a). Vale ressaltar que no Brasil, já foram encontrados isolados de *M. anisopliae* s.l. infectando naturalmente fêmeas de *R. microplus* (COSTA et al., 2002).

Uma das maiores preocupações na escolha de micro-organismos a serem utilizados no controle de pragas é a patogenicidade aos mamíferos e contaminação ambiental. Entretanto, estudos demonstraram que *M. anisopliae* s.l. pode ser considerado seguro a vertebrados, humanos e ao meio ambiente (ZIMMERMANN, 2007 b). Devido aos bons resultados em experimentos de patogenicidade, facilidade de cultivo e segurança ao meio ambiente, atualmente existem vários produtos micopesticidas disponíveis no mercado mundial a base de *M. anisopliae* s.l. Segundo Faria e Wraight (2007) dentre as centenas de micopesticidas destinadas ao controle de artrópodes, 33,9% são à base deste fungo.

### **Controle microbiano de carrapatos utilizando fungos artropodopatogênicos**

Os fungos artropodopatogênicos são os agentes microbianos mais promissores como método alternativo ao controle químico dos carrapatos. Isso se deve a capacidade destes organismos em penetrar diretamente pela cutícula do artrópode, sem precisar ser ingerido pelo hospedeiro para iniciar o processo de infecção. Outra vantagem é a grande variabilidade genética apresentada por esses micro-organismos, que possibilita a seleção de isolados fúngicos altamente virulentos, mais específicos e tolerantes as condições climáticas para serem utilizados como acaricidas microbianos (ALVES, 1998).

O processo de infecção dos fungos artropodopatogênicos em seus hospedeiros ocorre pela combinação de fatores físicos e químicos (ARRUDA et al., 2005), como pode ser observado na figura 3.



**Figura 3.** Foto de microscopia eletrônica mostrando o ciclo de infecção de *M. anisopliae* no hospedeiro *R. microplus*. CO: conídio; GT: tubo germinativo; AP: apressório; PP: penetração; H: hifa. (BEYS DA SILVA et al., 2013)

A primeira etapa do processo de penetração é a adesão. Estudos têm demonstrado a participação de enzimas secretadas por *M. anisopliae* s.l. na adesão dos conídios. Uma destas enzimas é uma ecto-fosfatase, cuja função principal seria a liberação de energia, pois, neste estágio o fungo ainda não é totalmente ativo metabolicamente (MANNERS, 1966). Segundo Consentino-Gomes et al. (2013) quando há a inibição desta proteína, ocorre uma menor adesão conidial. A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) também está relacionada com a adesão dos conídios à superfície do hospedeiro, pois de acordo com Broetto et al. (2010), além desta proteína estar presente na superfície do conídio, sua inibição diminui consideravelmente a adesão conidial. Outras proteínas importantes são as adesinas, como por exemplo, a MAD 1 (*Metarhizium adesin-like protein*) (BARELLI et al., 2011) e também hidrofobinas (FANG et al., 2007). Além destas enzimas, Beys da Silva et al. (2009) fizeram a inferência da participação de esterases e lipases nesta fase, devido à composição estrutural da epicutícula dos artrópodes, que é formada basicamente por lipídios. Estas enzimas hidrolisam componentes do tegumento do hospedeiro promovendo alterações na topologia da cutícula, liberando nutrientes que favorecerão a germinação do fungo.

Uma vez aderido à cutícula do hospedeiro, o conídio inicia o processo de germinação. Essa etapa sofre influência de fatores externos, como por exemplo, umidade, temperatura, pH, O<sub>2</sub>, nutrientes, podendo ainda ser afetada pela presença de substâncias químicas da superfície do artrópode e pela microbiota saprofítica (ARRUDA, 2005). Em condições ideais ocorre a germinação, que é caracterizada pela formação de uma estrutura denominada tubo germinativo, que posteriormente sofre alterações morfológicas na extremidade posterior formando uma estrutura dilatada conhecida por apressório. Nessa etapa ocorre migração de conteúdo citoplasmático, como mitocôndrias e ribossomos para o apressório, promovendo alta atividade metabólica (ZACHARUK, 1970). Além disso, há também um acúmulo de açúcares

responsáveis pela liberação de energia e pela pressão osmótica no processo de penetração (WANG; ST LEGER, 2007). Posteriormente forma-se uma saliência na parte inferior do apressório denominada grampo de penetração; esta estrutura é afilada e fica em contato com a cutícula dando início ao processo de penetração (CLARKSON; CHARNLEY, 1996).

A etapa de penetração propriamente dita ocorre pela pressão mecânica da hifa terminal, facilitada pela degradação enzimática promovida por hidrolases secretadas pelo fungo na cutícula do artrópode. Dentre estas, são sabidamente conhecidas as proteases que são responsáveis pela hidrólise de cadeias polipeptídicas para formação de moléculas menores capazes de serem absorvidas pelas células; as lipases, que fracionam os lipídios presentes na epicutícula e as quitinases responsáveis pela hidrólise da quitina presente na cutícula (ARRUDA, 2005). Após transpor a cutícula, há um espessamento das hifas e a formação de blastosporos responsáveis pela nutrição do fungo com a degradação das fontes de carbono da hemolinfa dos hospedeiros (BEYS DA SILVA, 2009). No interior da hemocele, o fungo se multiplica provocando a morte do hospedeiro, geralmente dentro de três a dez dias após a infecção. A morte do artrópode se dá pelo desequilíbrio hídrico, devido à perda de água, privação de nutrientes, danos mecânicos, como por exemplo, a compressão de órgãos, e químicos pela ação de toxinas. Após a morte do hospedeiro, tendo condições favoráveis de temperatura e umidade, o fungo se exterioriza e inicia a conidiogênese sobre o cadáver do artrópode, para posterior disseminação dos conídios sobre outros hospedeiros, e desta forma dão continuidade ao ciclo na natureza (CHANDLER et al., 2000).

O controle biológico de carrapatos utilizando fungos artropodopatogênicos tem apresentado resultados potencialmente satisfatórios. A utilização de fungos no controle de carrapatos data do início de 1990, quando Bittencourt et al., (1992) estudaram o efeito de *M. anisopliae* s.l. sobre fêmeas de *R. microplus*, e foi observado alto percentual de controle em teste laboratorial. Dentre os fungos estudados, *B. bassiana* s.l. e *M. anisopliae* s.l. são os que têm apresentado resultados mais satisfatórios em condições laboratoriais, demonstrando-se patogênicos para várias espécies de carrapatos, como *Amblyomma cooperi*, (REIS et al., 2003), *A. cajennense* (REIS et al., 2004), *A. variegatum* (MARANGA et al., 2005), *R. sanguineus* (GARCIA et al., 2004) e *R. microplus* (BITTENCOURT et al., 1992).

Fernandes e Bittencourt (2008) fizeram um levantamento da utilização de fungos artropodopatogênicos no controle de carrapatos na América do Sul. Nesta revisão foi demonstrada que em testes laboratoriais, a fase mais susceptível é a larval, entretanto, vários isolados de *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* s.l. demonstraram alta virulência para todos os estágios de carrapato. Além disso, foi observado que a maioria dos testes a campo apresentou resultados menos satisfatórios do que os testes em laboratório. Segundo os autores, em experimentos *in vivo*, as condições ambientais (temperatura, umidade relativa, radiação solar, entre outras) podem influenciar no desenvolvimento dos fungos, podendo inibir a germinação dos conídios, diminuir a penetração no hospedeiro, promovendo, desta maneira, menores níveis de infecção. Visando minimizar esses problemas, estudos vêm sendo realizados testando fungos artropodopatogênicos em diferentes formulações, com intuito de proteger e potencializar a ação destes micro-organismos em condições a campo (KAAYA et al., 2011).

### **Formulações fúngicas**

A utilização de fungos artropodopatogênicos no controle biológico de carrapatos é uma alternativa promissora ao controle químico. Porém, a maioria dos testes que foram realizados em nível de campo com fungos artropodopatogênicos no controle de carrapatos na América do Sul demonstrou baixa eficácia (FERNANDES; BITTENCOURT, 2008), com exceção de uma formulação de gel de celulose polimerizada e conídios de *B. bassiana* s.l. aplicada diretamente nas orelhas dos equinos para reduzir a infestação de *Dermacentor*

(*Anocentor nitens*) (SOUZA et al., 2009). A baixa eficiência dos fungos em testes de campo está relacionada a fatores bióticos e abióticos que podem influenciar na sua sobrevivência, propagação e infecção do hospedeiro (GOETTEL et al., 2000). Os fatores abióticos são essenciais para a sobrevivência dos fungos, dentre estes, a radiação solar UV é considerada a de maior importância (CAGAN; SVERCEL, 2001), pois pode inativar o conídio, ocasionando danos letais ao DNA e mutações gênicas (NICHOLSON et al., 2000). Outros fatores de extrema importância para os fungos são a temperatura e umidade que podem influenciar na longevidade dos conídios (ALVES et al., 2002). Segundo Alves (1998), a temperatura pode afetar a germinação, crescimento e viabilidade dos fungos, devido a alterações metabólicas nestes organismos. A maioria dos fungos artropodopatogênicos é mesófilo, com crescimento entre 10 e 40 °C, sendo a temperatura ótima entre 25 e 35 °C (COONEY; EMERSON, 1964; ROBERTS; CAMPBELL, 1977). Com relação a umidade relativa (U.R.), Walstad et al. (1970) demonstraram que *M. anisopliae* s.l teve maior percentual de germinação em 100% de U.R. Entretanto, existem estudos que demonstram que os fungos entomopatogênicos podem infectar insetos em condições entre 60 e 70% de U.R. (ZIMMERMANN, 2007 a).

Sobre a influência de fatores bióticos no desenvolvimento fúngico, Groden e Lockwood (1991) relataram que micro-organismos presentes na microbiota do solo exercem ação fungistática inibindo a atividade ou sobrevivência dos fungos artropodopatogênicos. Além da interferência dos fatores bióticos e abióticos, outro fator que influencia na utilização em larga escala dos fungos artropodopatogênicos, é o tempo necessário para causar mortalidade no hospedeiro (SANTI et al., 2011).

Uma possibilidade de minimizar a interferência dos fatores ambientais na eficácia e potencializar a ação dos fungos artropodopatogênicos seria a utilização destes micro-organismos em formulações. De acordo com Alves (1998), formular um artropodopatógeno é acrescentar a ele determinados compostos que melhoram o seu desempenho a campo, facilita a aplicação e, principalmente, permite o armazenamento sob condições nas quais se minimiza o custo, com perda mínima na qualidade do produto. Além do potencial de uso do agente selecionado, a análise econômica da formulação também deve ser criteriosa, uma vez que na comercialização, o preço final do produto é extremamente importante.

Os componentes presentes na formulação devem contribuir para o incremento da estabilidade, virulência e eficácia do agente biocontrolador (ALVES, 1998). Vários estudos têm demonstrado resultados satisfatórios na utilização de fungos artropodopatogênicos em formulações oleosas para o controle *in vitro* de carrapatos (POLAR et al., 2005; LEEMON et al., 2008; ANGELO et al., 2010; CAMARGO et al., 2012). Quando utilizado em associação com fungos artropodopatogênicos, o óleo aumenta a adesão dos conídios à superfície dos artrópodes, os protegendo contra as condições ambientais adversas (ALVES, 1998). Entretanto, o tipo de óleo utilizado na formulação é importante podendo refletir na eficácia e também no preço final do produto.

Os óleos vegetais e minerais têm sido amplamente testados como adjuvantes em formulações fúngicas, pois proporcionam menor dose letal, menor efeito evaporativo sobre o produto aplicado, propriedades quitinofílicas que favorecem a adesão e a infectividade, e maior tempo de armazenamento do produto formulado quando comparado à suspensões aquosas (PRIOR et al., 1988). Segundo Alves e Faria (2010), existem muitas diferenças entre óleo vegetal e mineral. De acordo com estes autores, os óleos vegetais possuem como principais vantagens: a certificação e utilização em cultivos orgânicos, são mais viscosos e dão maior adesividade à superfície dos organismos alvos e plantas, não são inflamáveis, conferem maior proteção aos esporos contra a radiação ultravioleta e apresentam menor evaporação. Este tipo de óleo tem como principal desvantagem, a possibilidade de diminuição da viabilidade durante o armazenamento em temperatura ambiente, pois pode ocorrer a germinação dos conídios se estes tiverem teor de água acima de 10%, através da utilização de

resíduos de nutrientes presentes no óleo vegetal. Já os óleos minerais têm como vantagem a manutenção da viabilidade por maior tempo em temperatura ambiente, mesmo se os conídios tiverem mais de 10% de teor de água, visto que não contêm resíduos de nutrientes. Entretanto, estes óleos não podem ser utilizados e certificados em cultivos orgânicos. Alguns óleos minerais ainda podem ser inflamáveis, não proteger os conídios contra a radiação ultravioleta e também evaporar mais rápido. Além disso, o valor do óleo vegetal custa em média um terço do óleo mineral, possibilitando uma redução do preço do produto final.

Com relação à eficácia das formulações contendo diferentes tipos de óleo, Polar et al. (2005) demonstraram que o tempo médio para o fungo formulado provocar a morte do carrapato, tanto em óleo mineral quanto em vegetal, foi muito próximo, em torno de 4 dias, enquanto que o grupo tratado com suspensão aquosa levou 8 dias. Porém, estes mesmos autores observaram que o tempo de germinação do fungo em formulação de óleo mineral foi menor (24 horas) do que o óleo vegetal (48 horas).

A escolha do óleo a ser utilizado na formulação tem que ser criteriosa, visto que existem óleos que podem ocasionar efeitos tóxicos aos artropodopatogênicos, como foi observado por Aguda et al. (1986) que verificaram queda na produção de conídios em laboratório quando *M. anisopliae* s.l. foi associado com óleo de Nim (*Azadirachta indica*) em concentrações  $\geq 5\%$ . Outro fator a ser considerado para formulação de fungos artropodopatogênicos em óleos é a viabilidade. Stathers et al. (1993) estudaram o efeito de vários óleos de origem vegetal no armazenamento de conídios de *M. flavoviridae* e encontraram que, com exceção do óleo de soja, todos os óleos vegetais avaliados reduziram a viabilidade dos conídios para menos de 40%, após quatro semanas. Além da toxicidade para os fungos, alguns óleos têm demonstrado efeito tóxico também sobre os artrópodes (ABDEL-SHAFTY; SOLIMAN, 2004). Isto pode ser utilizado como uma ferramenta de controle suplementar se o óleo não for prejudicial ao fungo, promovendo efeito sinérgico.

Através de um estudo realizado por Peng e Xia (2011) foi evidenciado que a utilização de agentes surfactantes na forma de uma emulsão, para diluir as formulações oleosas de *M. anisopliae* s.l., facilita a homogeneização da suspensão e potencializa a virulência do fungo em condições de baixa umidade, devido a disponibilização de água necessária para a germinação do conídio.

De maneira geral, quando se pensa em controle biológico de carrapato a campo utilizando fungos artropodopatogênicos, é imprescindível a utilização de formulação. Até o momento, vários estudos têm demonstrado resultados promissores. Porém, mais estudos ainda são necessários para chegar a um produto que atenda as recomendações fiscais e que possa então ser utilizado de maneira comercial no nosso país.

### **Fatores de virulência em *M. anisopliae* s.l.**

De acordo com Shapiro-Ilan et al. (2005), virulência é um termo quantitativo relacionado com a capacidade de um organismo em provocar doenças dentro de um grupo ou espécies. A variação da virulência entre diferentes linhagens de *M. anisopliae* s.l., de acordo com Bidochka e Khachatourians (1990), pode estar relacionada com a produção de enzimas hidrolíticas, que se inicia com a adesão do conídio fúngico à superfície do artrópode, através da expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na penetração (FREIMOSER et al., 2003), dentre elas lipases, proteases e quitinases.

As lipases são enzimas que catalisam, entre outras reações, a hidrólise das ligações éster de lipídios gerando álcoois e ácidos graxos (BEYS DA SILVA, 2009). A atividade lipolítica ocorre na interface óleo-água, devido às características estruturais destas enzimas (JAEGER et al., 1999; UEDA et al., 2002; REIS et al., 2009). O sítio ativo das lipases é composto por serina, histidina e aspartato, e é protegido por um oligopeptídeo helicoidal, que

funciona como uma “tampa”, e somente é exposto quando há interação com uma superfície hidrofóbica, permitindo desta maneira o contato com o substrato (JOSEPH et al., 2008). Beys da Silva et al. (2009) purificaram e caracterizaram uma lipase de aproximadamente 66 kDa e pI 5,6 extraída da superfície de conídios de *M. anisopliae* s.l. No processo de infecção de *M. anisopliae* s.l sobre artrópodes, as lipases estão relacionadas com a hidrólise de lipídios presentes na epicutícula, a primeira barreira do artrópode contra os micro-organismos, reforçando desta maneira a importância das lipases (SILVA et al., 2005; BEYS DA SILVA et al., 2010). O trabalho realizado por Piyaporn et al. (2010), demonstrou que uma lipase extracelular purificada de *Nomuraea rileyi* quando foi adicionada a suspensão fúngica proporcionou uma diminuição no tempo de mortalidade de larvas de *Spodoptera litura*. Os produtos da hidrólise de lipídios da epicutícula apresentam funções importantes na infecção fúngica, como por exemplo, o reconhecimento do hospedeiro e a utilização como nutrientes que darão suporte energético ao início da germinação (BEYS DA SILVA et al., 2009).

Após a degradação da epicutícula, o fungo se depara com a procutícula, porção que compreende a maior fração da cutícula dos artrópodes, cuja composição é basicamente proteína e quitina (CLARKSON; CHARNLEY, 1996). As proteases são responsáveis pela hidrólise protéica. Um estudo realizado por St. Leger et al., (1986 a) confirmou a participação de uma protease (Pr1) na hidrólise da cutícula, removendo 25 - 30% das proteínas cuticulares. Em outro estudo, St. Leger et al. (1998), observaram que durante o processo infectivo em *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae), *M. anisopliae* s.l. secretou 14 isoformas de proteases que foram detectadas em zimogramas. Destas proteases secretadas por *M. anisopliae* s.l., a maior parte são serino endopeptidases semelhantes à subtilisinas, que tem o sítio ativo composto por serina, ácido aspártico e histidina. Estas enzimas são importantes para hidrolisar as proteínas e fornecer nutrientes para o desenvolvimento fúngico. Bagga et al. (2004) demonstraram a diversidade destas enzimas tipo subtilisinas produzidas por um isolado de *M. anisopliae* s.l. durante o crescimento na cutícula de insetos, sendo estas classificadas de Pr1 A a Pr 1 K, totalizando 11 isoformas. Estes mesmos autores, concluíram que as diferenças entre as isoformas de Pr1 ocorrem pelas especificidades de substrato secundário, propriedades de adsorção na cutícula e estabilidade alcalina, indicativas das diferenças funcionais. Em *M. anisopliae* s.l. a protease Pr 1 A tem importância confirmada experimentalmente no processo de infecção em artrópodes. Isto foi observado em um estudo conduzido por St. Leger et al. (1996) ao superexpressarem o gene *pr1* em *M. anisopliae* s.l., observando um aumento da eficiência no processo de infecção em larvas de *M. sexta*, quando comparadas com a linhagem selvagem.

Além de Pr 1, outras proteases foram caracterizadas em sobrenadante de cultivo de *M. anisopliae* s.l., entre estas estão as serino proteases semelhante as quimotripsinas (SCREEN; ST LEGER, 2000), cisteíno-proteases (Pr 4) (COLE et al., 1993), metaloproteases (ST LEGER et al., 1994 a), carboxipeptidases (ST LEGER et al., 1994 b), e as proteases do tipo tripsina, denominadas de Pr 2 (ST LEGER et al., 1996). A função de Pr 2 no processo de infecção ainda não está completamente elucidada. Paterson et al. (1994) relataram que Pr 2 estaria envolvida na ativação ou indução de Pr 1 em *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Esta hipótese foi reforçada pelo fato de que em cultivo, Pr 2 ocorre anteriormente a Pr 1 (GILLESPIE et al., 1998). Estes autores investigaram a produção de Pr 1 e Pr 2 em 19 isolados de *M. anisopliae* s.l. A atividade de Pr 1 foi observada após 72 horas de incubação, enquanto a atividade Pr 2 foi detectada, na maioria dos isolados, após 48 horas, sugerindo que Pr 2 atuaria precocemente na cutícula com liberação de peptídios indutores de Pr 1. St Leger et al. (1994) através de um estudo de eletroforese de focalização isoelétrica observaram a ocorrência de três isoformas de Pr 2. A presença destas isoformas variou conforme o meio de cultura e tempos de cultivo, sugerindo que elas podem ser diferentemente expressadas



conforme o meio de cultivo. No estudo realizado por Santi et al. (2010 a), foram encontradas cinco isoformas de proteases presentes na superfície de conídios de *M. anisopliae* s.l., capazes de hidrolisar diferentes tipos de substratos, garantindo desta forma sua manutenção tanto em ambiente saprófita quanto em parasitismo. Com relação a testes utilizando substratos específicos para Pr 1 e Pr 2 extraídas da superfície dos conídios, foi verificada que a Pr 1 possui atividade quatro vezes maior do que a Pr 2, confirmando a sua importância na infecção fúngica (SANTI et al., 2010 a).

Concomitantemente com a hidrólise protéica na procutícula, ocorre degradação da quitina, que é um polímero linear composto por unidades de N- acetilglucosamina (monossacarídeos derivados da glicose), unidas por ligações  $\beta$ -1-4 (DAHIYA et al., 2005). A quitina é o componente mais abundante na composição da parede celular dos fungos e também está presente na cutícula de artrópodes, proporcionando defesa mecânica e estrutural. As quitinases atuam nas ligações  $\beta$ -1-4 presentes entre as subunidades de N-acetilglucosamina. De acordo com o local da clivagem, as quitinases são classificadas em: (i) endoquitinases, quando clivam a quitina em sítios aleatórios no interior do polímero; (ii) exoquitinases, que clivam a quitina na extremidade (DUO-CHUAN, 2006) e (iii) endo-exo-quitinases, que possuem as duas atividades (SILVA et al., 2005). As principais funções das quitinases já estabelecidas em fungos artropodopatogênicos são: degradação da quitina exógena presente em fragmentos de hifas autolizadas e no exoesqueleto de artrópodes mortos, para uso como fonte de nutriente; remodelamento da parede celular durante o ciclo de vida do fungo (morfogênese); participação como fatores de virulência em fungos entomopatogênicos (SEIDL, 2008; BOLDO et al., 2009). As quitinases são agrupadas em duas famílias, 18 e 19, das glicosil-hidrolases, com base na conservação da sequência de aminoácidos e na estrutura da proteína (HENRISSAT, 1991). De acordo com Seidl et al. (2005), *M. anisopliae* s.l secreta 23 quitinases pertencentes à família 18, e separadas em subgrupos A, B, C (SEIDL et al., 2005). Porém, recentemente, a partir de um estudo filogenético, Junges (2010) propôs a formação do subgrupo D, onde seriam agrupadas três quitinases que ficaram em uma ramificação separada quando comparada com a análise de Seidl et al. (2005).

Em *M. anisopliae* s.l., os primeiros estudos com quitinases foram realizados por St. Leger et al. (1987) que detectaram atividade quitinolítica em sobrenadante de cultura contendo cutícula do gafanhoto *Schistocerca gregaria*. Posteriormente, esses mesmos pesquisadores purificaram duas quitinases, uma endoquitinase de 33 KDa e uma exoquitinase de 110 KDa em sobrenadante de cultivo de *M. anisopliae* s.l. enriquecido com quitina. Em um isolado brasileiro de *M. anisopliae* s.l., a primeira quitinase foi purificada por Pinto et al. (1997), caracterizando a enzima como uma endo-exo-quitinase de aproximadamente 30KDa, nomeada como CHIT30. Atualmente, três genes que codificam quitinases foram isolados e caracterizados: *chit1* e *chi3* (BOGO et al., 1998) e *chi2* (FREIMOSER et al., 2003). De acordo com Silva et al. (2005) é o gene *chi3* que codifica a quitinase CHIT30, esta endo-exo-quitinase foi detectada em condições de infecção na cutícula de *R. microplus* através de análises imunocitoquímicas, sugerindo então sua participação na infecção deste artrópode. Reforçando a importância desta enzima, Staats (2007) observou que a deleção do gene *chi3* em *M. anisopliae* s.l. diminuiu a virulência em um bioensaio sobre *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). Nesse mesmo raciocínio, quando Fang et al. (2005) superexpressaram o gene que codifica a quitinase Bchit1 de *B. bassiana* s.l. foi observado um aumento de 50% da virulência para *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). Esses estudos demonstram a importância das quitinases no processo de infecção em artrópodes.

Outro fator que vem sendo relacionado com a virulência de *M. anisopliae* s.l. é a infecção por micovírus dsRNA (LEAL et al., 1994; FRAZZON et al., 2000). A presença de RNA fita dupla no genoma de fungos é um indicativo comum da presença de micovírus (ARRUDA, 2005). Os micovírus são partículas ribonucleoprotéicas intracelulares contendo

um genoma (dsRNA), incluso dentro de um capsídio com cobertura protéica (CASTRO et al., 1999). Segundo Melzer e Bidochka (1998) a infecção por essas partículas virais em *M. anisopliae* s.l. é latente, pois muitos fungos infectados não apresentam sintomas, embora já tenham ocorrido alterações no crescimento da colônia, produção de conídios e diminuição da virulência sobre insetos. A transmissão desses vírus pode ocorrer durante a produção de conídios, sendo dessa forma vertical (MELZER et al., 1997), ou transmissão horizontal, quando há a fusão de células entre linhagens geneticamente compatíveis (BUCK, 1998). Em um estudo realizado por Bogo et al. (1996) foi observada a presença de dsRNA em três de sete isolados de *M. anisopliae* s.l. analisados em eletroforese de gel de agarose. O padrão de dsRNA ocorreu tanto em micélio quanto em conídio, confirmando a presença dos micovírus durante o desenvolvimento do fungo. A partir de um estudo realizado por Day et al. (1977) propôs-se a associação da infecção por micovírus com a hipovirulência em fungos. Neste estudo, os autores observaram que isolados de *Endothia parasitica* infectados com dsRNA apresentaram alterações morfológicas e foram menos virulentos quando comparados a isolados livres da infecção. A presença de micovírus em *M. anisopliae* s.l. já foi observada por vários autores (BOGO et al., 1996; MELZER; BIDOCHKA, 1998; MARTINS et al., 1999; FRAZZON et al., 2000; GIMÉNEZ-PECCI et al., 2002). No trabalho realizado por Melzer e Bidochka (1998) foi verificado que 28 de 73 (38,4%) isolados de *M. anisopliae* s.l. e 2 de 12 (16,7%) isolados de *B. bassiana* s.l. coletados de solo estavam infectados com dsRNA. Neste mesmo estudo, os autores observaram que não houve diferença no grau de crescimento, na produção de conídios e virulência sobre inseto, quando isolados infectados com dsRNA foram comparados com isolados livres de dsRNA. Entretanto, ao compararem duas linhagens isogênicas, uma infectada e outra livre de dsRNA, esses autores verificaram um aumento na produção de conídios e no grau de virulência dos isolados livres de dsRNA. Além disso, Giménez-Pecci et al. (2002) ao analisarem a secreção de quitinases entre diferentes isolados de *M. anisopliae* s.l., observaram que todos isolados infectados apresentaram menor atividade quitinolítica do que os isolados livres de dsRNA. Com relação à secreção de proteases, Tiago et al. (2002) compararam linhagens isogênicas de *M. anisopliae* s.l. e *Paecilomyces fumosoroseus*, e não observaram correlação entre presença ou ausência de dsRNA com a secreção de proteases.

De modo geral, a infecção por dsRNA relacionada com fator de virulência em *M. anisopliae* s.l. ainda é bastante controversa, visto que há estudos que evidenciam diminuição da virulência (FRAZZON et al., 2000) e outros que demonstram que não há alteração alguma em linhagens infectadas por dsRNA (MARTINS et al., 1999). Por este motivo, devido a grande importância de *M. anisopliae* s.l. no contexto do controle biológico, torna-se relevante estudos que visem associar a infecção por micovírus com outros possíveis fatores de virulência entre diferentes isolados, buscando, desta maneira, potenciais biocontroladores para serem utilizados no controle de *R. microplus*.

## CAPÍTULO I

**ESTUDO ENZIMÁTICO E PESQUISA DE MICOVÍRUS EM DIFERENTES ISOLADOS BRASILEIROS DE *Metarhizium anisopliae* s.l. RELACIONADOS COM VIRULÊNCIA PARA *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo verificar o potencial patogênico dos isolados brasileiros CG 112, CG 347, CG 32, CG 148 e CG 629 de *Metarhizium anisopliae* s.l a partir da relação entre diferentes fatores de virulência como a secreção de enzimas hidrolíticas (lipases, proteases e quitinases) e a infecção por micovírus com o percentual de controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. O bioensaio *in vitro* foi realizado com fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* expostas à suspensão aquosa dos diferentes isolados de *M. anisopliae* s.l. As atividades lipolítica e proteolítica foram avaliadas usando substratos cromogênicos  $\rho$ -Nitrofenol Palmitato ( $\rho$ NPP) e Azocaseína, respectivamente, e a atividade quitinolítica foi determinada pela hidrólise do substrato fluorescente 4- Metilumbeliferil-triacetilquitotriose. No ensaio de protease, foi realizada também a atividade proteolítica em gel de poliacrilamida contendo gelatina como substrato, para verificar a presença de isoformas destas enzimas. Para a pesquisa de dsRNA, as amostras sofreram digestão enzimática por S1 endonuclease e RNase e posteriormente foram migradas por eletroforese em gel de agarose. Os cinco isolados testados foram patogênicos para fêmeas de *R. microplus*, porém, os isolados CG 629 e CG 148 mostraram os maiores percentuais de controle. Os resultados dos ensaios enzimáticos demonstraram que os isolados mais virulentos para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram os que apresentaram as maiores atividades enzimáticas (lipolítica, proteolítica e quitinolítica). Com relação à pesquisa de dsRNA, quatro dos cinco isolados testados estavam infectados com micovírus, o único livre da infecção foi o isolado CG 347, que no presente estudo demonstrou baixo percentual de controle para *R. microplus*, não demonstrando desta maneira, nenhuma associação com a virulência. A partir destes resultados, foi possível concluir que a atividade enzimática de lipases, proteases e quitinases dos isolados de *M. anisopliae* s.l. estudados estão diretamente relacionadas com a virulência para fêmeas de *R. microplus*.

**Palavras-chave:** lipases, proteases, quitinases, micovírus e controle biológico.

## ABSTRACT

The present study aimed to determine the virulence potential of CG 112, CG 347, CG 32, CG 148 and CG 629 of *Metarhizium anisopliae sensu lato* isolates based on the relation between different virulence factors, such as the secretion of hydrolytic enzymes (lipases, proteases and chitinases) and the presence of mycovirus infection, with the control percentage of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks. The *in vitro* bioassay was performed with *R. microplus* engorged females exposed to aqueous fungal suspensions of different *M. anisopliae* s.l. isolates. The lipolytic and proteolytic activities were evaluated using the following chromogenic substrates:  $\rho$ -Nitrophenol Palmitate ( $\rho$ NPP) and azocasein, respectively; and the chitinolytic activity was determined by the hydrolysis of the fluorescent substrate 4 - methylumbelliferyl-triacetilquitotriose. In the assay of protease was also performed proteolytic activity in polyacrylamide gel containing gelatin as a substrate, to verify the presence of isoforms of these enzymes. The detection of dsRNA was performed through enzymatic digestion using RNase and S1 endonuclease; samples were subsequently migrated by electrophoresis in agarose gel. The five tested isolates were pathogenic for *R. microplus* females, although the isolates CG 629 and CG 148 caused the highest percentages of control. The most virulent isolates for *R. microplus* females also showed the highest enzymatic activities whether compared with the less virulent isolates. Regarding the dsRNA search, four of the five tested isolates were infected with mycovirus; the only one free of infection was CG 347 isolate, which in this study showed a low percentage of *R. microplus* control, demonstrating accordingly that mycovirus infection has no association with fungal virulence against ticks. Based on these results, it was concluded that the enzymatic activity of lipases, proteases and chitinases of *M. anisopliae* s.l. isolates studied are directly related to the virulence for females of *R. microplus*.

**Key words:** lipases, proteases, chitinases, mycovirus and biological control.

## 1 INTRODUÇÃO

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é considerado um dos principais ectoparasitas dos bovinos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (POWEL; REID, 1982), acarretando queda na produtividade (JONSSON, 2006) e conseqüentemente, prejuízos econômicos (GRISI et al., 2002). Além disso, esse carrapato pode ser vetor de agentes patogênicos aos bovinos, responsáveis por causar doenças de alta morbidade como Babesiose e Anaplasmose (JONSSON et al., 2008).

A utilização de fungos acaripatogênicos no controle de carrapatos vem sendo estudada a pelo menos duas décadas (BITTENCOURT et al., 1992). Dentre os fungos utilizados, *Metarhizium anisopliae* é a espécie que tem demonstrado maior potencial, sendo capaz de infectar várias espécies de carrapatos, inclusive *R. microplus* (FERNANDES; BITTENCOURT, 2008). A capacidade de penetrar na cutícula dos artrópodes é o que torna viável a utilização destes micro-organismos no controle biológico (ALVES, 1998). O processo de penetração via cutícula ocorre pela adesão dos conídios, seguida pela germinação, modificação e especialização do conídio formando tubo germinativo e posterior liberação de enzimas (lipases, proteases, quitinases, entre outras) que hidrolisam componentes da cutícula deixando-a friável, concomitantemente o tubo germinativo exerce uma pressão física e o fungo invade a hemocele (BITTENCOURT et al., 1999; ARRUDA et al., 2005).

Vários estudos vêm sendo realizados com intuito de estabelecer a interação fungo-artrópode e esclarecer a importância das enzimas secretadas durante a infecção (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). As proteases Pr 1 foram as primeiras que tiveram o papel esclarecido na penetração (ST LEGER et al., 1996), seguidas pelas quitinases (SILVA et al., 2005) e mais recentemente Beys da Silva et al. (2010 a) demonstraram a importância das lipases durante a infecção.

Atualmente existem muitas linhagens de *M. anisopliae* s.l. isoladas de diferentes substratos e hospedeiros armazenadas em diversas coleções no mundo. Quando estas são testadas sobre carrapatos geralmente há muita variação na virulência (QUINELATO et al., 2012). Estudos têm demonstrado ampla variação na secreção de enzimas entre diferentes isolados de *M. anisopliae* (MUSTAFA; KAUR, 2009), podendo desta maneira, influenciar na virulência sobre os artrópodes. Outro fator que vem sendo relacionado com o grau de virulência dos fungos fito e acaripatogênicos, é a infecção destes com vírus de RNA fita dupla (dsRNA) cuja presença pode diminuir a capacidade infectiva (MC CABE et al., 1999). Esses micovírus são frequentemente encontrados infectando vários gêneros de fungos (FRAZZON et al., 2000). A maioria das infecções por micovírus é latente, porém, em alguns casos, pode interferir no fenótipo do fungo, alterando a morfologia da colônia e diminuindo a taxa de crescimento e esporulação (MELZER; BIDOCHKA, 1998; CHU et al., 2002; TSAI et al., 2004). Com relação ao gênero *Metarhizium* ainda há controvérsias sobre a relação da infecção por esses vírus com a virulência, pois existem trabalhos que demonstraram que isolados infectados podem ser mais ou menos virulentos a artrópodes (MARTINS et al., 1999; FRAZZON et al., 2000).

Visto o exposto, foi elaborado um estudo, cujos objetivos foram verificar o potencial patogênico de diferentes isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, verificar se há associação entre as atividades enzimáticas (lipolítica, proteolítica e quitinolítica) e a infecção por micovírus com o percentual de controle e estabelecer marcadores moleculares de virulência desta espécie fúngica para *R. microplus*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção dos isolados de *M. anisopliae* s.l. e manutenção das colônias

Para a realização do experimento foram utilizados cinco isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. (CG 32, *Mahanarva posticata* (Homoptera: Cercopidae), Bahia, 1984; CG 112, Distrito Federal, *Deois flavopicta* (Homoptera: Cercopidae), 1988; CG 148, *Deois flavopicta* (Homoptera: Cercopidae), Mato Grosso do Sul, 1982; CG 347, Solo, Goiás, 1991; CG 629, *Mahanarva posticata* (Homoptera: Cercopidae), Alagoas, 1997), cedidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, Brasil. A escolha destes isolados foi a partir de um estudo prévio realizado por Quinelato et al. (2012), que demonstrou variação na virulência entre 30 isolados de *M. anisopliae* s.l. A partir deste estudo, foram selecionados dois isolados mais virulentos, dois menos e um intermediário. Esses isolados foram cultivados em meio batata, dextrose e ágar (BDA) (Himedia, Mumbai, Índia) em temperatura de  $25 \pm 1$  °C e umidade relativa  $\geq 80\%$ , por 15 dias. Para a manutenção das colônias, os isolados foram mantidos em BDA sob refrigeração no Laboratório de Controle Microbiano da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

## **2.2 Preparo das suspensões fúngicas**

Os conídios de cada isolado fúngico foram raspados da superfície do meio de cultura, suspensos em solução de água destilada estéril e Tween 80 a 0,01% (Sigma) (LUZ et al., 1998) e quantificados com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico, segundo Alves (1998). A partir da suspensão na concentração de  $10^8$  conídios/mL obteve-se a concentração de  $10^6$  conídios/mL, através de diluição seriada.

## **2.3 Viabilidade dos conídios**

Uma alíquota da suspensão  $10^8$  conídios/mL de cada isolado de *M. anisopliae* s.l. foi depositada em placa de Petri contendo meio BDA e incubadas sob temperatura de  $25 \pm 1$  °C e umidade relativa  $\geq 80\%$  durante 24 horas. O cálculo da germinação dos conídios foi realizado segundo Alves (1998).

## **2.4 Infecção *in vitro* de *R. microplus***

### **2.4.1 Autorização pelo comitê de ética para utilização de animais em experimentação**

O experimento faz parte de um projeto aprovado pelo Comitê de Ética (COMEP) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no processo número 23083.009241/2011-16 e com o protocolo de aprovação 154/2011.

## **2.5 Bioensaio com fêmeas ingurgitadas**

Após a coleta em bezerros artificialmente infestados, as fêmeas ingurgitadas foram imersas em solução de hipoclorito de sódio a 1% por três minutos para assepsia da superfície externa do carrapato; em seguida, foram pesadas e distribuídas homogeneamente de acordo com o peso, em seis grupos contendo 10 fêmeas cada.

No tratamento, as fêmeas ingurgitadas foram imersas (uma em cada tubo de ensaio) durante três minutos em um mL da suspensão fúngica e/ou controle (água destilada estéril e Tween 80 0,01%). Posteriormente, os carrapatos foram fixados em fita adesiva dupla face, no interior de placas de Petri, e mantidos em câmara climatizada sob temperatura de  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa  $\geq 80\%$ . Os parâmetros avaliados foram: peso da massa de ovos, percentual

de eclosão das larvas, índices de produção de ovos e nutricional, utilizando as fórmulas segundo Bennet (1974).

$$\text{IPO} = \frac{\text{peso da massa de ovos (g)}}{\text{peso inicial da fêmea ingurgitada (g)}} \times 100$$

$$\text{IN} = \frac{\text{peso da massa de ovos (g)}}{\text{peso da teleógina (g)} - \text{peso da quenógina (g)}} \times 100$$

Além disso, foi calculado o percentual de controle de *R. microplus* exercido pelos diferentes isolados de *M. anisopliae*, de acordo com a fórmula de Drummond et al. (1971).

$$\text{RE} = \frac{\text{peso da massa de ovos (g)} \times \% \text{ eclosão larvas} \times 20000}{\text{peso da teleógina (g)}}$$

$$\text{Percentual de controle} = \frac{\text{média RE (controle)} - \text{média RE (tratado)}}{\text{média RE (controle)}} \times 100$$

## 2.6 Reisolamento fúngico

As fêmeas ingurgitadas dos grupos tratados e controle foram colocadas em câmara úmida e incubadas em câmara climatizada sob temperatura de  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa  $\geq 80\%$  para facilitar o desenvolvimento do fungo e posterior confirmação de suas características (SAMSON; EVANS, 1982).

## 2.7 Cultivo dos isolados para os ensaios enzimáticos

Para os bioensaios enzimáticos, um mL de suspensão fúngica na concentração de  $10^6$  conídios/mL dos diferentes isolados foram cultivados em frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de meio mínimo líquido (BEYS DA SILVA et al., 2010b), enriquecido com cutícula de teleóginas de *R. microplus* 1 % e estearato de colesterol 1 % (Sigma Chem., Co., St. Louis, USA). As culturas foram incubadas em agitador orbital a 150 rpm e 25 °C durante 24, 48 e 72 horas. Para extração das enzimas foram adicionados 250  $\mu$ L de Triton X-100 a 10% (SILVA et al., 2005), agitado manualmente durante um minuto; posteriormente o micélio foi filtrado em papel Whatman nº1 com auxílio de bomba de vácuo. O sobrenadante foi recuperado e armazenado à -80 °C até a realização do ensaio.

### 2.7.1 Determinação da atividade lipolítica

A análise lipolítica foi realizada pela hidrólise do substrato cromogênico *p*-nitrofenol palmitato (*p*NPP) (Sigma Chem., Co., St. Louis, USA) na forma de emulsão na proporção de 1:9 de solução A (1: 3 p:v de *p*NPP em isopropanol) e solução B (450 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8,0; 0,5 g de goma arábica e 2 g de Triton X-100) (BEYS DA SILVA et al., 2010 b). O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços contendo 10  $\mu$ L de amostra ( $\pm 0,16$   $\mu$ g de proteínas totais) e 90  $\mu$ L de emulsão contendo o substrato. Foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro Spectramax (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) a 410 nm no tempo zero, imediatamente após a adição da amostra (T0), e logo após o tempo reacional, 30 minutos (T30), incubados a 37 °C. A atividade lipolítica foi calculada pela subtração dos valores de absorbância de T30 – T0, e esses valores foram aplicados na curva de *p*-Nitrofenol para o cálculo da atividade. Uma unidade de lipase (U) foi definida como a quantidade necessária de enzima para liberar 1  $\mu$ mol de *p*-Nitrofenol por minuto nas



condições descritas acima. Os experimentos foram feitos em triplicata e o branco do ensaio foi realizado com adição de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 ao invés de amostra.

### **2.7.2 Determinação da atividade proteolítica**

A atividade proteolítica foi determinada pela hidrólise de azocaseína (Sigma). O ensaio foi realizado com a adição de 100 µL amostra ( $\pm 1,6$  µg de proteínas totais) em 100 µL de solução de azocaseína a 2% misturadas a 200 µL de tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,9 (SANGORRIN et al., 2001). Os ensaios foram incubados a 50 °C por 15 minutos e a reação foi parada com adição de 800 µL de ácido tricloroacético (Merk) 20%. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 4000 g por 5 minutos e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 400 nm. A atividade enzimática foi calculada como descrito por Sangorrin et al. (2001). Os experimentos foram feitos em triplicata e o branco da reação foi realizado com adição de tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,9 ao invés de amostra.

### **2.7.3 Determinação da atividade quitinolítica**

A atividade quitinolítica foi determinada pela hidrólise do substrato fluorescente 4-Metilumbeliferil-triacetilquitotriose. Para tanto, 20 µL de amostra ( $\pm 0,32$  µg de proteínas totais) foram adicionadas em 5 µL de substrato a 0,08 mM mais 80 µL de tampão citrato fosfato 0,1 M pH 5,0 e foram incubadas por 30 minutos a 37 °C. Após esse período foram adicionados 120 µL de tampão glicina NaOH a 1M e pH 10,6, seguido de mais 5 minutos de incubação a 37 °C para parar a reação. A fluorescência foi medida em fluorímetro (Spectramax), com excitação a 355 nm e emissão a 460 nm (SANTI et al., 2010). O cálculo da atividade foi realizado a partir de uma curva de metilumbeliferona. Uma unidade de quitinase (U) foi definida como a quantidade necessária de enzima para liberar 1 µmol de 4-Metilumbeliferona por mL por minuto nas condições descritas acima. Os ensaios foram realizados em triplicata e o branco da reação foi realizado com adição de tampão citrato fosfato 0,1 M pH 5,0 ao invés de amostra.

### **2.8 Determinação da concentração de proteínas**

A determinação da quantidade de proteína total foi feita de acordo com o método de Bradford (1976), usando concentrações conhecidas de albumina sérica bovina como padrão.

### **2.9 Zimograma de proteases**

Como azocaseína é um substrato hidrolisado por várias proteases, foi utilizada a técnica de atividade de proteases em gel, através de eletroforeses em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% contendo 0,1% de gelatina ultrapura (Sigma), com intuito de estabelecer o tamanho aproximado das enzimas secretas em meio extracelular por *M. anisopliae* s.l. A quantidade de proteína utilizada foi de 50 µg por poço. Como padrão de peso molecular, foi utilizado o marcador “Prestained SDS-PAGE Standards<sup>®</sup>” (Bio-rad). Após a eletroforese, os géis ficaram incubando com agitação em tampão tris-HCl 50 mM pH 8,0 + 2,5% Triton X-100 (Merck) durante 16 horas à 37 °C. Em seguida, foram corados com Coomassie Brilliant Blue (Sigma) a 0,1% por cerca de uma hora e descorados com solução de metanol (Merck): ácido acético (Merck): água na proporção de (3: 1: 6) (v: v: v).

### **2.10 Detecção da infecção por micovírus**

### **2.10.1 Cultivo dos isolados e extração do ácido nucléico total para detecção de dsRNA**

Frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de Meio de Cove líquido ( $\text{NaNO}_3$  0,6%, glicose 1%, peptona 0,2%, extrato de levedura 0,05% e caseína 0,15%), foram inoculados com 1 mL de suspensão fúngica na concentração de  $10^6$  conídios/mL. As culturas foram incubadas em agitador orbital por 72 horas a 28 °C e 150 rpm. Após esse período, o micélio foi coletado por filtração em papel Whatman nº1 estéril, com auxílio de uma bomba de vácuo.

Para a extração dos ácidos nucléicos totais, o micélio foi congelado em nitrogênio líquido e macerado utilizando grau e pistilo. Posteriormente, dois gramas de micélio macerado foram homogeneizados em 5 mL de tampão de lise (água Milli-Q tratada com DEPC (Sigma); 100 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 0,6 M NaCl e 4% SDS), e permaneceram em “banho-maria” por uma hora a 65 °C. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL de fenol e 2,5 mL de clorofórmio, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por dez minutos a 4000 g. Após a centrifugação, a fase aquosa foi coletada e acondicionada em um novo frasco. Para retirar o excesso de fenol, foram adicionados 2,5 mL de clorofórmio e centrifugou-se por dez minutos a 4000 g. Novamente coleou-se a fase aquosa e adicionou-se 105  $\mu\text{L}$  de NaCl (200 mM) e 5 mL de etanol absoluto gelado. As amostras ficaram precipitando durante 30 minutos à -80 °C. Decorrido este tempo, foram centrifugadas por 15 minutos a 4000 g e o sobrenadante foi desprezado. O “pellet” formado foi lavado com 5 mL de etanol 70% e centrifugado por cinco minutos na mesma rotação descrita acima. Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e o pellet ficou secando por três horas em temperatura ambiente e em seguida foi ressuspenso em 200  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q tratada com DEPC (ZHANG et al., 1996), com algumas modificações. O material obtido foi alíquotado em microtubos e armazenado a -80 °C.

### **2.10.2 Digestão enzimática**

Para digestão de RNA de fita simples foram utilizados 0,5  $\mu\text{L}$  de nuclease S1 (100 U/ $\mu\text{L}$ ) (Sigma Chem. Co., St Louis, MO, U.S.A.), 5  $\mu\text{L}$  de ácido nucléico total (contendo aproximadamente 200 ng), 2  $\mu\text{L}$  de tampão da enzima nuclease S1 (10x), (2,8 M de NaCl, 300 mM de acetato de sódio pH 4,5 e 10 mM de  $\text{ZnSO}_4$ ) (Sigma) e 12,5  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q tratada com DEPC (Sigma). A reação foi incubada a 37 °C por 1 hora, em seguida as amostras foram colocadas em gelo para parar a reação (ARRUDA, 2005)

Para digestão de todo RNA presente na amostra, tanto de fita simples como de fita dupla, foi realizada a digestão de 5  $\mu\text{L}$  de ácido nucléico total, 0,2  $\mu\text{L}$  de RNase A (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Invitrogen) e 4,8  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q tratada com DEPC. A reação foi incubada a 37 °C por 30 minutos, em seguida as amostras foram colocadas em gelo para parar a reação. Os produtos obtidos de ambos os tratamentos enzimáticos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com 0,5  $\mu\text{g}$  de brometo de etídio (ARRUDA, 2005).

### **2.11 Análise estatística**

Para análise dos dados paramétricos (peso da massa de ovos, índices de produção de ovos e nutricional, ensaios enzimáticos) foi realizada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para comparação entre as médias, com nível de significância de 5%. Os dados não paramétricos (percentuais de eclosão das larvas) foram submetidos à análise de Kruskal-Wallis, seguida pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK) para comparação entre as ordenações médias, com nível de significância de 5% (SAMPAIO, 2002).

### 3 RESULTADOS

Através do teste de viabilidade, foi possível observar que todos os isolados fúngicos utilizados no experimento estavam viáveis, demonstrando percentual de germinação de 100% após 24 horas.

No bioensaio com fêmeas ingurgitadas, todos isolados foram capazes de promover alterações na maioria dos parâmetros avaliados. Ao se avaliar a ação dos fungos na oviposição das fêmeas, os isolados CG 148 e CG 629 foram capazes de promover redução de aproximadamente 58% no peso médio total da massa de ovos, quando comparados com o grupo controle. Os isolados CG 112 e CG 347 também diferiram do controle diminuindo 28% da massa total de ovos. Já o isolado CG 32 não diferiu estatisticamente do controle e nem dos isolados CG 112 e CG 347.

Na análise do percentual de eclosão das larvas oriundas da oviposição das fêmeas expostas aos diferentes isolados, observou-se que o isolado CG 32 foi o que mais interferiu neste parâmetro, reduzindo aproximadamente 32% da eclosão das larvas de *R. microplus*. Porém, vale ressaltar que todos isolados diminuíram a eclosão, quando comparados ao grupo controle.

Com relação ao índice de produção de ovos, que é o parâmetro que relaciona o peso total da massa de ovos com o peso inicial das fêmeas ingurgitadas, foi verificado que os isolados CG 148 e CG 629 foram capazes de reduzir em 53% a capacidade de oviposição das fêmeas, quando comparados ao controle. Os demais isolados também foram capazes de diminuir esse parâmetro, porém em proporções menores.

Resultados similares foram observados ao se avaliar o índice nutricional, que é a relação do peso total da massa de ovos com a quantidade de sangue ingerido pela fêmea, onde os isolados CG 148 e CG 629 diminuíram aproximadamente 59% da capacidade da metabolização do alimento para utilização na oviposição. Os isolados CG 112, CG 347 e CG 32 também diminuíram esse parâmetro significativamente quando comparados ao controle. Desta forma, a partir da análise de todos estes parâmetros que estão diretamente relacionados com a capacidade reprodutiva das fêmeas de carrapato, pode-se dizer que os isolados CG 148 e CG 629 foram os que proporcionaram os melhores resultados, alcançando percentuais de controle de 61,5 e 66,9%, respectivamente. O isolado CG 32 teve uma eficácia intermediária promovendo 43,4 % de percentual de controle, enquanto os isolados CG 112 e CG 347 foram considerados os menos eficazes para *R. microplus*, ambos apresentando em torno de 30% de percentual de controle, como pode ser observado na tabela 1.

**Tabela 1.** Média  $\pm$  Desvio padrão do peso da massa de ovos (P.P.); percentual de eclosão de larvas (P.E.); índice de produção de ovos (I.P.O.), índice nutricional (I.N.) e percentual de controle de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com suspensão aquosa na concentração de  $10^8$  conídios/mL de cinco isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. Os experimentos foram conduzidos a  $27 \pm 1$  °C e RH  $\geq$  80% (\*).

Tratamentos	P.P (mg)	P.E. (%)	I.P.O. (%)	I.N. (%)	% Controle
<b>Controle</b>	134,9 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	98,6 $\pm$ 0,51 <sup>a</sup>	58,1 $\pm$ 2,39 <sup>a</sup>	72,3 $\pm$ 5,99 <sup>a</sup>	-
<b>CG 112</b>	93,9 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	91,0 $\pm$ 5,67 <sup>b</sup>	43,4 $\pm$ 13,46 <sup>b</sup>	52,2 $\pm$ 12,8 <sup>b</sup>	30,9
<b>CG 347</b>	105,9 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	83,0 $\pm$ 11,10 <sup>b</sup>	45,6 $\pm$ 12,18 <sup>ab</sup>	53,4 $\pm$ 13,95 <sup>b</sup>	31,5
<b>CG 32</b>	109,0 $\pm$ 0,02 <sup>ab</sup>	67,5 $\pm$ 2,11 <sup>c</sup>	48,8 $\pm$ 11,27 <sup>ab</sup>	57,4 $\pm$ 11,82 <sup>b</sup>	43,4
<b>CG 148</b>	62,8 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	83,8 $\pm$ 12,59 <sup>bc</sup>	26,15 $\pm$ 9,19 <sup>c</sup>	31,1 $\pm$ 9,50 <sup>c</sup>	61,5
<b>CG 629</b>	56,1 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	75,0 $\pm$ 24,60 <sup>bc</sup>	25,7 $\pm$ 8,72 <sup>c</sup>	30,3 $\pm$ 9,24 <sup>c</sup>	66,39

(\* Média seguida da mesma letra na mesma coluna, não diferem significativamente entre si (P  $\geq$  0.05).

No ensaio lipolítico, observou-se que com 24 horas de cultivo os isolados CG 629, CG 32 e CG 148 apresentaram as maiores atividades. Com 48 horas de cultivo, o isolado que apresentou a maior atividade lipolítica foi o CG 629, seguido pelos CG 148 e CG 347. Ao analisar os dados obtidos com 72 horas de cultivo, observou-se que os isolados com maiores atividades foram o CG 629, CG 148 e CG 347. Com relação à análise da atividade de cada isolado de acordo com o tempo de cultivo, pode-se dizer que não houve um padrão que demonstrasse aumento ou diminuição da atividade, afinal, dos cinco isolados, somente o CG 347 teve aumento significativo na atividade lipolítica progressivamente em relação ao tempo de cultivo. De maneira geral, como pode ser verificado na tabela 2, os isolados que foram mais virulentos, tiveram altas atividades já com 24 horas de cultivo. Nos isolados considerados menos virulentos, foi verificado que o CG 347 teve aumento significativo da atividade lipolítica de acordo com o tempo de cultivo, já o CG 112 apresentou baixa atividade em todos os tempos.

**Tabela 2.** Atividade de lipase (U) ( $\mu\text{Mol}/\text{mL}/\text{min}$ ) de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. cultivados em meio líquido contendo 1% de cutícula de carrapato associado a 1% de estearato de colesteril (\*).

Isolados	Tempo de cultivo em horas		
	24	48	72
CG 112	$0,12 \pm 0,004^{aA}$	$0,12 \pm 0,002^{aA}$	$0,12 \pm 0,003^{aA}$
CG 347	$0,13 \pm 0,002^{aA}$	$0,27 \pm 0,003^{bB}$	$0,49 \pm 0,008^{bC}$
CG 32	$0,27 \pm 0,011^{bA}$	$0,10 \pm 0,003^{aB}$	$0,12 \pm 0,003^{aB}$
CG 148	$0,26 \pm 0,020^{bA}$	$0,32 \pm 0,004^{bA}$	$0,33 \pm 0,003^{bA}$
CG 629	$0,39 \pm 0,002^{bA}$	$0,42 \pm 0,008^{cA}$	$0,25 \pm 0,008^{bB}$

\*Unidade enzimática seguida da mesma letra minúscula na mesma coluna e maiúscula na mesma linha, não diferem significativamente entre si ( $P \geq 0,05$ ).

No ensaio proteolítico utilizando azocaseína como substrato, pode se observar que com 24 horas de cultivo, todos os isolados apresentaram atividade. Entretanto, o CG 32 teve atividade significativamente maior quando comparado aos demais. Já com 48 e 72 horas de cultivo, o isolado CG 148 foi o que apresentou a maior atividade, seguido pelos isolados CG 629 e CG 32. Neste ensaio, ficou evidenciado um aumento progressivo da atividade de cada isolado com relação ao tempo de cultivo, principalmente entre os tempos de 24 e 48 horas, onde foi observada diferença significativa em todos os isolados, como demonstra a tabela 3.

**Tabela 3.** Atividade de protease de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. cultivados em meio mínimo contendo 1% de cutícula de carrapato e 1% de estearato de colesteril (\*).

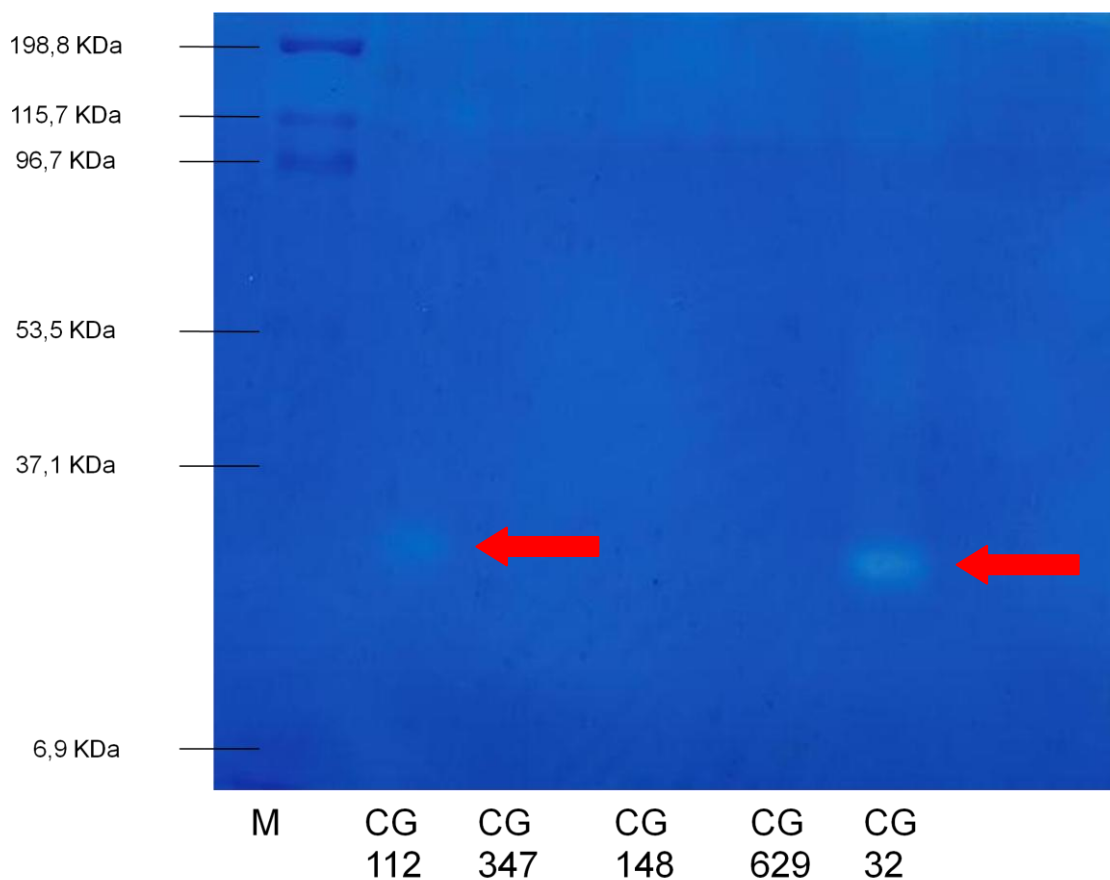
Isolados	Tempo de cultivo em horas		
	24	48	72
CG 112	$0,20 \pm 0,006^{aA}$	$17,60 \pm 0,030^{aB}$	$19,55 \pm 0,029^{aB}$
CG 347	$0,47 \pm 0,002^{aA}$	$4,75 \pm 0,007^{bB}$	$5,28 \pm 0,064^{bB}$
CG 32	$4,32 \pm 0,025^{bA}$	$27,05 \pm 0,134^{acB}$	$29,08 \pm 0,082^{cB}$
CG 148	$0,57 \pm 0,015^{aA}$	$33,47 \pm 0,079^{cB}$	$36,68 \pm 0,055^{cB}$
CG 629	$0,14 \pm 0,001^{aA}$	$23,56 \pm 0,119^{acB}$	$35,44 \pm 0,006^{cC}$

\* Unidade enzimática seguida da mesma letra na mesma coluna, não diferem significativamente entre si ( $P \geq 0,05$ ).

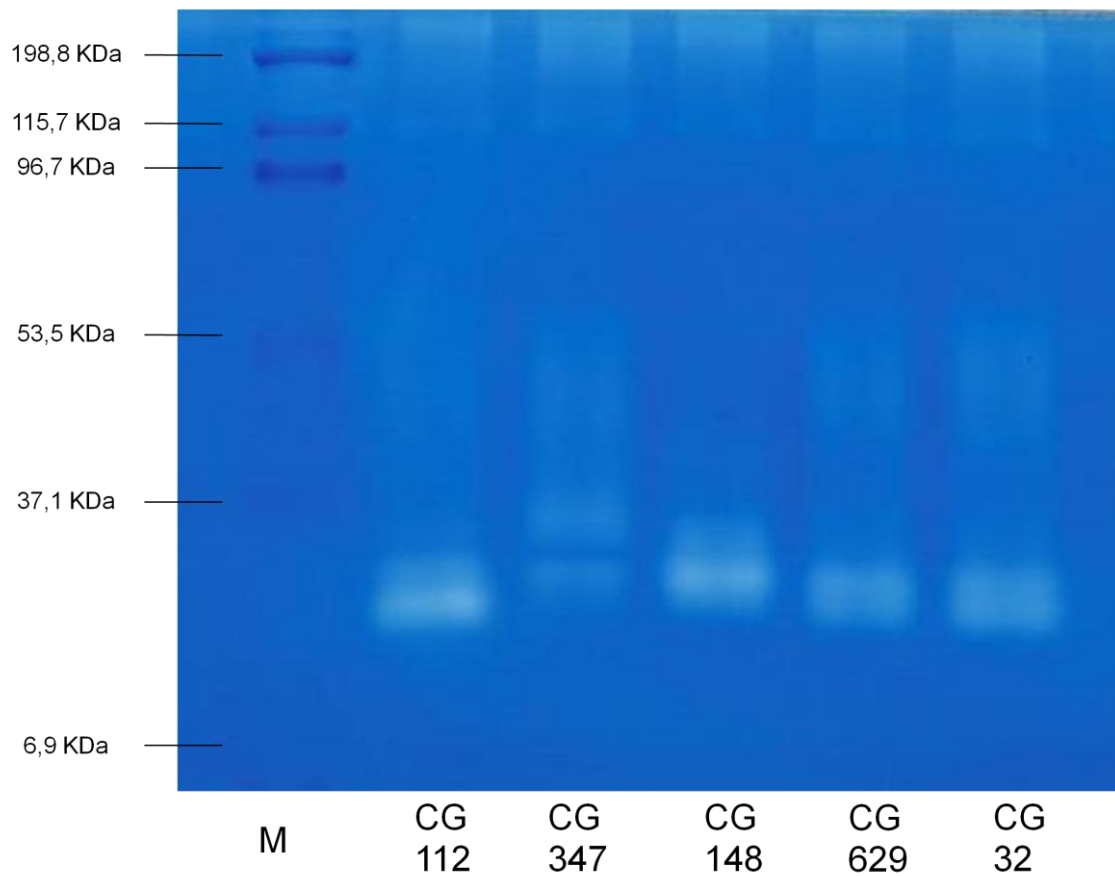
Com intuito de verificar a diversidade de proteases secretadas pelos diferentes isolados de *M. anisopliae* s.l., foi realizada a análise de zimograma em gel contendo gelatina como

substrato. Através da visualização dos géis, foi possível perceber que houve aumento da atividade proteolítica de acordo com o progresso do tempo de cultivo. Sendo que, no zimograma com amostras cultivadas por 24 horas, foram detectadas somente duas bandas, uma ocasionada pelo isolado CG 112, porém muito fraca, já a demonstrada pelo isolado CG 32 foi facilmente visível no gel, como demonstra a figura 1. Já com 48 e 72 horas de cultivo, todos isolados apresentaram bandas de atividade proteolítica, corroborando desta forma, com a análise dos ensaios utilizando azocaseína como substrato.

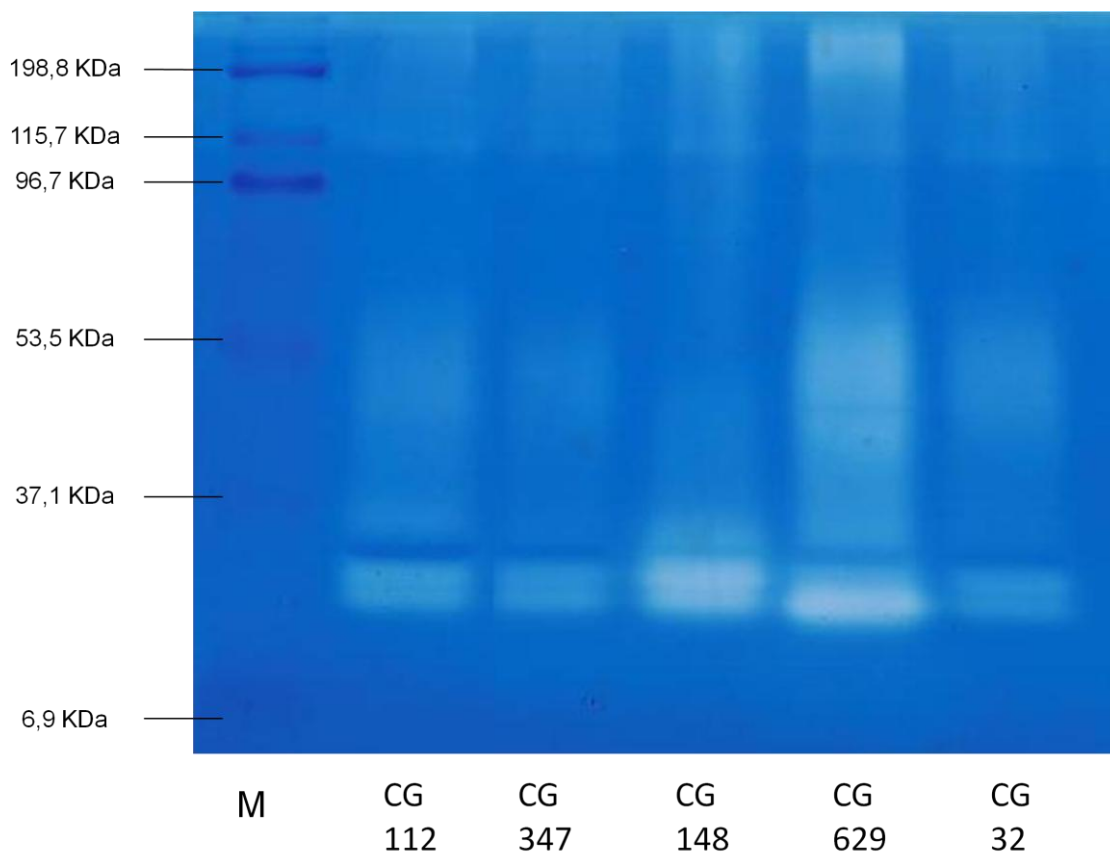
A partir do padrão de massa molecular, estima-se que as bandas mais intensas de atividade proteolítica observadas nos géis tinham aproximadamente 30 KDa. Essas proteases estavam presentes nas amostras de todos os isolados testados, como demonstram as figuras 2 e 3. Entretanto, foi possível observar maior digestão do substrato por estas proteases nos isolados CG 148 e CG 629, quando cultivados por 72 horas.



**Figura 1.** Zimograma de protease em gel de poliacrilamida (12%) contendo gelatina 0,1 % como substrato. M: peso padrão de massa molecular; CG 112, CG 347, CG 148, CG 629 e CG 32, cultivados por 24 horas.



**Figura 2.** Zimograma de protease em gel de poliacrilamida (12%) contendo gelatina como substrato. M: peso padrão de massa molecular; CG 112, CG 347, CG 148, CG 629 e CG 32, cultivados por 48 horas.



**Figura 3.** Zimograma de protease em gel de poliacrilamida (12%) contendo gelatina como substrato. M: peso padrão de massa molecular; CG 112, CG 347, CG 148, CG 629 e CG 32, cultivados por 72 horas.

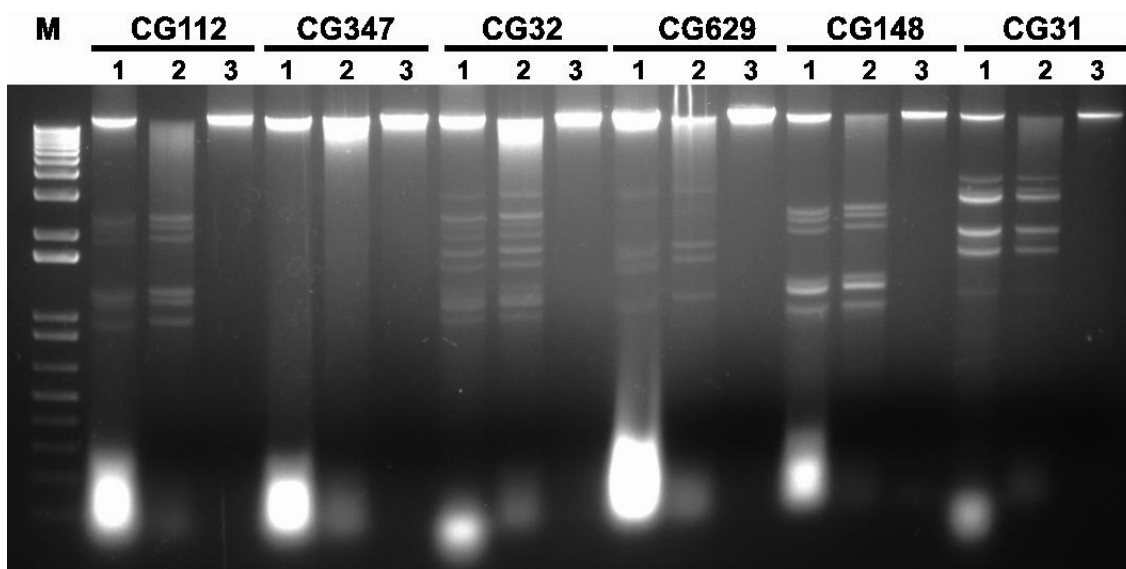
No ensaio quitinolítico utilizando amostras de 24 horas de cultivo, foi verificado que os isolados CG 148 e CG 629 apresentaram atividades significativamente maiores do que os outros isolados. Com 48 e 72 horas, a maior atividade novamente foi promovida pelo isolado CG 629 seguida pelo CG 148. De maneira geral, o isolado CG 32 demonstrou atividade quitinolítica intermediária e os isolados CG 112 e CG 347 foram os que tiveram as menores atividades. Ao relacionar a atividade com o tempo de cultivo, foi observado aumento crescente nos isolados CG 347 e CG 32. O isolado CG 148 manteve atividades similares entre os tempos de 24 e 48 horas de cultivo, apresentando um aumento significativo com 72 horas. Já o isolado CG 629 aumentou a atividade entre os tempos de 24 e 48 horas e se manteve estável com 72 horas de cultivo. Por fim, o isolado CG 112 apresentou baixa atividade em todos os tempos não demonstrando diferença significativa entre os tempos de cultivo, como pode ser visto na tabela 4.

**Tabela 4.** Atividade de quitinase (U) ( $\mu\text{Mol/mL/min}$ ) de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. cultivados em meio mínimo contendo 1% de cutícula de carrapato e 1% de estearato de colesterol (\*).

Isolados	Tempo de cultivo em horas		
	24	48	72
<b>CG 112</b>	1,04 $\pm$ 0,004 <sup>aA</sup>	1,39 $\pm$ 0,002 <sup>aA</sup>	1,77 $\pm$ 0,003 <sup>aA</sup>
<b>CG 347</b>	2,83 $\pm$ 0,007 <sup>aA</sup>	5,14 $\pm$ 0,001 <sup>bB</sup>	7,84 $\pm$ 0,002 <sup>bC</sup>
<b>CG 32</b>	5,01 $\pm$ 0,002 <sup>bA</sup>	7,56 $\pm$ 0,001 <sup>bB</sup>	12,82 $\pm$ 0,002 <sup>cC</sup>
<b>CG 148</b>	10,40 $\pm$ 0,002 <sup>cA</sup>	12,52 $\pm$ 0,001 <sup>cA</sup>	19,47 $\pm$ 0,009 <sup>dB</sup>
<b>CG 629</b>	11,88 $\pm$ 0,002 <sup>cA</sup>	24,97 $\pm$ 0,008 <sup>dB</sup>	27,34 $\pm$ 0,003 <sup>eB</sup>

\* Unidade enzimática seguida da mesma letra na mesma coluna, não diferem significativamente entre si ( $P \geq 0.05$ ).

No ensaio para detecção de moléculas de dsRNA, o ácido nucléico total foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, e foi observado a presença de moléculas que migraram mais rápido do que o DNA cromossômico. A presença dessas bandas foi analisada após o tratamento com enzimas endonuclease S1 e RNase A. A resistência a endonuclease S1 e a sensibilidade a RNase A sugerem a infecção por partículas virais dsRNA. Dos cinco isolados testados, somente o isolado CG 347 não apresentou essas moléculas, como pode ser observado na figura 1.



**Figura 4.** Eletroforese em gel de agarose (1,2%) dos ácidos nucléicos totais dos diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. M: marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder (Promega); 1: Ácido nucléico total sem nenhum tratamento; 2: Tratamento com endonuclease S1 e 3: Tratamento com RNase A. O isolado CG 31 foi utilizado como controle positivo.

#### 4 Discussão

No bioensaio com fêmeas ingurgitadas, os cinco isolados de *M. anisopliae* s.l. foram capazes de infectar *R. microplus* provocando alterações significativas nos parâmetros reprodutivos. Já as fêmeas do grupo controle, realizaram postura normalmente e os ovos estavam viáveis, de acordo com o padrão dos valores normais em condições laboratoriais (temperatura  $27 \pm 1$  °C e UR  $\geq 80\%$ ) para esta espécie de carrapato (GLÓRIA et al., 1993).



Além disso, os fungos foram re-isolados, confirmando a infecção. Por isso, pode-se dizer que as alterações observadas sobre os parâmetros biológicos de *R. microplus* foram ocasionadas pela ação dos isolados de *M. anisopliae* s.l. testados.

Ainda neste bioensaio, foi demonstrado que todos isolados fúngicos reduziram o peso total da postura e interferiram na viabilidade dos ovos, diminuindo a eclosão das larvas. Além disso, foi possível verificar que estes isolados são capazes de interferir também no processo de digestão e metabolização do sangue ingerido pelas fêmeas, que posteriormente seriam utilizados como nutrientes para a formação dos ovos. A patogenicidade *in vitro* de *M. anisopliae* s.l. para carrapatos já foi demonstrada por outros autores (BITTENCOURT et al., 1992; PERINOTTO et al., 2012 a), que também observaram influência deste fungo na vida reprodutiva de *R. microplus*, através da diminuição do número total de ovos e menor eclodibilidade das larvas. Essa redução da capacidade reprodutiva juntamente com diminuição da viabilidade dos ovos e larvas, favorece o controle deste carrapato, visto que pode promover uma redução na quantidade de larvas infestantes nas pastagens.

Entretanto, no presente estudo foi evidenciada a diferença no percentual de controle entre os isolados de *M. anisopliae* s.l. A variação na virulência para carrapatos entre isolados fúngicos da mesma espécie vem sendo relatada frequentemente (LEEMON et al., 2008; ÁNGEL-SAHAGÚN et al., 2010; FERNANDES et al., 2011; QUINELATO et al., 2012). Estudos prévios têm atribuído essa variação a diversos fatores, como por exemplo: a origem geográfica e tipo de substrato do qual o fungo foi isolado (VICENTINI et al., 2001), variabilidade genética (FERNANDES et al., 2011), sucessivas passagens em meio artificial (FARGUES; ROBERT, 1983), susceptibilidade do hospedeiro (FERNANDES et al., 2011; PERINOTTO et al., 2012), variação na secreção de proteases, quitinases e lipases (MUSTAFA; KAUR, 2009) e infecção por micovírus (FRAZZON et al., 2000). Por isso, testes para selecionar isolados mais virulentos se tornam cada vez mais necessários, visto que, a escolha da linhagem fúngica pode refletir diretamente no sucesso do controle da praga alvo.

Pode-se observar que de maneira geral, os isolados de *M. anisopliae* s.l. testados que promoveram os maiores percentuais de controle sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram os que apresentaram as maiores atividades hidrolíticas das enzimas diretamente envolvidas na infecção. Em um estudo similar, utilizando diferentes isolados de *B. bassiana*, Pelizza et al (2012), verificaram que os isolados que tinham maior atividade de quitinase, eram os mais patogênicos para o gafanhoto *Tropidacris collaris* (Orthoptera: Romaleidae) e com isso estabeleceram a possibilidade de usar os ensaios de quitinase como característica para a seleção prévia de isolados de *B. bassiana* mais virulentos no controle deste gafanhoto. Os fungos artropodopatogênicos produzem enzimas extracelulares capazes de hidrolisar lipídios, proteínas e quitina, componentes da cutícula dos artrópodes, facilitando desta forma a penetração no hospedeiro (FRAZZON et al., 2000; ARRUDA et al., 2005). A mensuração das atividades enzimáticas de *M. anisopliae* s.l. vem sendo amplamente estudada visando esclarecer a interação patógeno-hospedeiro e também elucidar o papel de cada grupo de enzimas no processo de infecção (SILVA et al., 2005; BOLDO et al., 2009; SANTI et al., 2010 a,b; BEYS DA SILVA et al., 2010 a,b).

Os ensaios enzimáticos realizados neste estudo demonstraram que há variação na atividade lipolítica, proteolítica e quitinolítica entre os isolados de *M. anisopliae* s.l. Resultados similares foram observados por St Leger et al. (1986) quando analisaram a atividade destas mesmas enzimas em diferentes isolados de *M. anisopliae* s.l. cultivados em meio contendo cutícula de gafanhoto. De acordo com estes autores, essa variação pode ser em decorrência da diferença no grau de crescimento entre os isolados e a consequente liberação de enzimas para hidrólise de substratos e obtenção de nutrientes para o desenvolvimento fúngico.

Os fungos artropodopatogênicos utilizam os componentes da cutícula dos artrópodes desde a primeira etapa do processo de infecção, a adesão. Nesta fase, estão envolvidas enzimas como as ectofosfatases (CONSENTINO-GOMES et al., 2013), GAPDH (BROETTO et al., 2010), adesinas (BARELLI et al., 2011), hidrofobinas (FANG et al., 2007) e possivelmente as esterases e lipases (BEYS DA SILVA et al., 2009). De acordo com Beys da Silva et al. (2009), o caráter hidrofóbico das lipases e dos ácidos graxos liberados na hidrólise dos lipídios podem auxiliar na adesão, além disso, os lipídios presentes na epicutícula ao serem hidrolisados servem de nutrientes para germinação dos conídios fúngicos e reconhecimento dos hospedeiros. No presente estudo foi verificada a atividade de lipases secretadas por diferentes isolados de *M. anisopliae* s.l. e observado que os isolados que promoveram os maiores percentuais de controle para *R. microplus* tiveram também altas atividades lipolíticas com apenas 24 horas de cultivo. Isso corrobora os resultados encontrados por Beys da Silva et al (2010 a,b) que demonstraram a importância das lipases secretadas por *M. anisopliae* s.l. na fase inicial do processo de penetração, afinal a composição da face mais externa da cutícula, a epicutícula dos artrópodes, é formada basicamente por lipídios (SANTI et al, 2010 a).

No ensaio proteolítico foi constatado que os isolados mais virulentos para *R. microplus* também apresentaram maior atividade de protease, sendo que os maiores valores foram obtidos com amostras cultivadas por 48 e 72 horas. Em um estudo realizado por GUPTA et al (1994), que visou associar o percentual de mortalidade de larvas de *Galleria mellonella* com a atividade proteolítica de cinco isolados de *B. bassiana*, ficou evidenciado que os isolados que tinham maior atividade proteolítica eram os mais virulentos. Os resultados da análise da atividade proteolítica através do tempo de cultivo fúngico aqui observados, corroboram com o estudo realizado por Arruda et al (2005), que demonstraram que a penetração de *M. anisopliae* s.l. no carrapato ocorre mais intensamente com 72 horas após o contato.

A atividade exercida pelo complexo proteolítico está intimamente relacionada com a hidrólise de proteínas que compõe a procutícula (ST LEGER et al., 1986). Estudos prévios analisando a secreção de enzimas extracelulares presentes na superfície de conídios, demonstraram que existem várias isoformas de proteases, dentre elas, uma de aproximadamente 30 KDa, do tipo subtilisina denominada Pr 1 (SANTI et al., 2010 a). Esta protease é sabidamente envolvida no processo de penetração fúngica nos hospedeiros artrópodes, sendo responsável pela hidrólise de aproximadamente 30% de toda proteína da procutícula, e por isso, são consideradas importantes na virulência de *M. anisopliae* s.l. (ST LEGER et al., 1996). No presente estudo, através da zimografia em gel com gelatina, foram observadas proteases com massa molecular em torno de 30 KDa, principalmente nos tempos de 48 e 72 horas, sendo que com as amostras de 72 horas de cultivo ficou evidente maior atividade de proteases pelos isolados mais virulentos, CG 148 e CG 629. Desta forma, pode-se inferir a participação dessas enzimas na virulência sobre carrapatos.

No ensaio quitinolítico pode se observar que os isolados que foram mais virulentos também apresentaram as maiores atividades de quitinases. Além disso, foi demonstrado um aumento progressivo na atividade de quitinases com o decorrer do tempo. De acordo com St Leger et al (1996), *M. anisopliae* s.l. secreta diversas quitinases que estão envolvidas tanto no crescimento fúngico como na degradação da cutícula do artrópode hospedeiro, isto explica o aumento expressivo da atividade com o maior tempo de cultivo observada no presente estudo. As quitinases são as enzimas responsáveis pela hidrólise da quitina constituinte da procutícula dos artrópodes, por isso, acredita-se que a ação destas enzimas ocorra concomitantemente com as proteases. Isso pode ser observado no presente estudo, cujas maiores atividades proteolíticas e quitinolíticas ocorreram a partir de 48 e 72 horas de cultivo.

Além das atividades enzimáticas, a infecção por micovírus também tem sido associada à virulência dos fungos artropodopatogênicos. Os resultados encontrados não permitem associar

a infecção de partículas virais dsRNA com a virulência dos isolados de *M. anisopliae* s.l., visto que, tanto os isolados mais virulentos (CG 148 e CG 629) quanto os menos (CG 112 e CG 32) estavam infectados, e somente o isolado CG 347 (considerado menos virulento) não apresentou infecção. Resultados similares foram encontrados por Martins et al. (1999) e Arruda (2005), que não observaram nenhuma associação da presença das partículas de dsRNA viral com a hipovirulência de *Metarhizium* spp.

Day et al, (1977) demonstraram, em outros estudos utilizando fungos fitopatogênicos, que a infecção por micovírus estava intimamente relacionada com a virulência, além de causar alteração na morfologia da colônia, coloração e tamanho dos conídios. Entretanto, Melzer e Bidochka (1998), concluíram que a infecção por micovírus pode ser latente em algumas espécies fúngicas e não promover nenhum tipo de alteração na morfologia fúngica. Os isolados utilizados no presente estudo foram analisados morfologicamente por Quinelato (2012), e não foi verificada diferença no tamanho dos conídios, que tiveram entre 7,54 x 2,52 µm e 8,55 x 2,63 µm. Outros aspectos relacionados à virulência dos fungos com a infecção por micovírus é a interferência na secreção das enzimas hidrolíticas. Segundo Giménez-Pecci et al. (2002) a atividade de quitinases entre diferentes isolados de *M. anisopliae* s.l., foi menor em todos os isolados infectados quando comparados com os isolados livres de dsRNA. Com relação à secreção de proteases, Tiago et al. (2002) compararam linhagens isogênicas de *M. anisopliae* s.l. e *Paecilomyces fumosoroseus*, e não observaram correlação entre presença ou ausência de dsRNA com a secreção de proteases. No presente estudo também não houve nenhuma associação da infecção com a atividade das enzimas hidrolíticas secretadas, afinal os isolados que apresentaram as maiores atividades enzimáticas apresentaram partículas virais.

Os resultados aqui encontrados reforçam a hipótese da importância das enzimas de *M. anisopliae* s.l. para infectar o carrapato dos bovinos, e permitem inferir a possível sequência da secreção destas hidrolases. Através disso, pode-se sugerir a possibilidade de utilizar essas técnicas de quantificação de atividade enzimática (lipolítica, proteolítica e quitinolítica) como ferramentas úteis de marcadores moleculares de virulência de *M. anisopliae* s.l. para *R. microplus*, visto que são técnicas rápidas, de fácil reprodutibilidade e de preço moderado. Além disso, pode-se concluir que a presença de dsRNA em *M. anisopliae* s.l. não influencia na virulência de *R. microplus*. Entretanto, mais estudos devem ser realizados com intuito de verificar o comportamento dessas partículas virais no genoma dos fungos artropodopatogênicos. Com relação ao estudo de patogenicidade sobre fêmeas ingurgitadas, conclui-se que, dentre os isolados estudados, CG 148 e CG 629 são os mais indicados para serem utilizados em testes futuros que visam o controle biológico de *R. microplus*.

## CAPÍTULO II

**ATIVIDADE DA PROTEASE PR1 EM *Metarhizium anisopliae* s.l.: MARCADOR MOLECULAR DE VIRULÊNCIA PARA O CARRAPATO BOVINO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade da subtilisina Pr 1 dos isolados CG 112, CG 347, CG 32, CG 148 e CG 629 de *M. anisopliae* s.l., associando esta atividade com o potencial de virulência destes isolados sobre fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. O bioensaio foi formado com fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e a atividade de Pr 1 foi avaliada usando o substrato cromogênico N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe  $\rho$ -nitroanilide. Todos os isolados testados foram patogênicos para fêmeas de *R. microplus*, porém, os isolados CG 629, CG 148 e CG 32 causaram maiores percentuais de mortalidade ( $P \leq 0.05$ ) do que os isolados CG 112 e CG 347, oito dias após o tratamento. No grupo controle não houve mortalidade das fêmeas. Os dados do ensaio enzimático demonstraram que os isolados CG 629, CG 148 e CG 32 cultivados por 48 e 72 horas apresentaram maior atividade do que os isolados CG 112 e CG 347. A partir destes resultados, foi possível concluir que a atividade de Pr 1 de *M. anisopliae* s.l. pode ser utilizada como um potencial marcador molecular de virulência sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, considerando que os isolados que apresentaram a maior atividade de Pr 1 foram também os mais virulentos para este carrapato.

**Palavras-chave:** carrapatos, fungos artropodopatogênicos, protease, subtilisina.

## ABSTRACT

The present study aimed to evaluate a subtilisin-like protease Pr1 activity from CG 112, CG 347, CG 32, CG 148 and CG 629 of *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates, associating this activity to the isolates' virulence potential on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females. Bioassays were performed with engorged females and Pr1 activity was evaluated using the chromogenic substrate N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide. All isolates were virulent to *R. microplus*; although, the isolates CG 629, CG 148 and CG 32 caused higher mortality percentages ( $P \leq 0.05$ ) than the isolates CG 112 and CG 347 eight days after treatment. The control group yielded no mortality. Data from enzymatic assays showed that isolates CG 629, CG 148 or CG 32 cultivated for 48 h and 72 h presented more activity than the isolates CG 112 or CG 347. From the obtained results, it is possible to conclude that Pr1 activity of *M. anisopliae* s.l. may be used as a potential molecular marker of virulence on *R. microplus* females, considering the isolates with more enzymatic activity were also more virulent to this tick.

**Key words:** tick, arthropodpathogenic fungi, protease, subtilisin.

## 1 INTRODUÇÃO

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Canestrini, 1887 (Acari: Ixodidae) (MURREL; BARKER, 2003), é um ectoparasita de importância em medicina veterinária por promover danos diretos e indiretos aos animais (DE CASTRO; NEWSON, 1993), além disso, acarreta perdas econômicas refletindo diretamente no preço final da produção. Este carrapato se adaptou bem em áreas de climas tropicais e subtropicais (POWELL; REID, 1982), onde é considerada a principal praga da pecuária nestas regiões, causando prejuízos econômicos em torno de dois bilhões de dólares por ano (GRISI et al., 2002).

Um método alternativo que vem sendo amplamente estudado no controle destes ectoparasitas é o biológico, tendo os fungos como os micro-organismos mais promissores, devido a capacidade de penetração direta pela cutícula do hospedeiro alvo, facilitando sua aplicação a campo através de aspersão sobre os animais infestados (ALVES, 1998).

Dentre os fungos estudados no controle de carrapatos, as espécies de maior destaque são *Metarhizium anisopliae* s.l. e *Beauveria bassiana* s.l., que tem demonstrado resultados satisfatórios, principalmente em testes *in vitro* (FERNANDES; BITTENCOURT, 2008). Por esse motivo, as pesquisas com o intuito de selecionar isolados de maior virulência vêm aumentando, conseqüentemente tem possibilitado a descoberta de novos potenciais biocontroladores fúngicos provenientes de diversas regiões e com especificidade a diferentes hospedeiros.

Os fungos penetram nos artrópodes pela associação de fatores físicos como a pressão hifal sobre o tegumento, juntamente com uma degradação química exercida por enzimas (BITTENCOURT et al., 1999, ARRUDA et al., 2005). No caso de *M. anisopliae* s.l., já se sabe da importância de determinadas proteínas no processo de infecção do hospedeiro, como por exemplo, lipases, quitinases e proteases (SCHARANK; VAINSTEIN, 2010; SANTI et al., 2010; BEYS DA SILVA et al., 2010a), e dentre essas, umas das mais estudadas são as proteases tipo subtilisinas Pr1, que segundo St. Leger et al. (1988) possuem várias isoformas e estão intimamente relacionadas com a virulência. Isso foi confirmado pelo estudo de St. leger et al (1996 a), através da construção genética de cepas de *M. anisopliae* s.l. super expressando o gene de Pr1, os autores evidenciaram que essa cepa modificada teve ação mais rápida sobre *Manduca sexta* em relação a cepa selvagem. Por outro lado, quando se diminuiu a expressão do gene de Pr1, foi observada uma redução na atividade letal sobre *Tenebrio molitor* (WANG et al., 2002). Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade de Pr1 de diferentes isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. associando a atividade desta enzima com o potencial virulento para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção e manutenção dos isolados de *M. anisopliae* s.l.

Para o experimento foram utilizados cinco isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. (CG 32, Bahia, 1984; CG 112, Distrito Federal, 1988; CG 148, Mato Grosso do Sul, 1982; CG 347, Goiás, 1991; CG 629, Alagoas, 1997), cedidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, Brasil. Esses isolados foram cultivados em meio batata, dextrose e ágar (BDA) (Himedia, Mumbai, Índia) em temperatura de 25°C ± 1 °C e umidade relativa ≥ 80%, por 15 dias.

Para o bioensaio enzimático, um mL de suspensão fúngica a 10<sup>6</sup> conídios/mL dos diferentes isolados foram cultivados em erlenmeyer contendo 50 ml de meio mínimo líquido (BEYS DA SILVA et al., 2010b), enriquecido com cutícula de *R. microplus* 1 % e estearato de colesteril 1 % (Sigma). As culturas foram agitadas a 150 rpm a 25° C durante 24, 48 e 72

horas. Para extração das enzimas foram adicionados 250 µL de Triton X-100 a 10%, agitado manualmente por um minuto e posteriormente o micélio foi filtrado em papel Whatman nº1 com auxílio de bomba a vácuo, o sobrenadante foi recuperado e armazenado à -80 °C até a realização do ensaio.

## **2.2 Preparo das suspensões fúngicas**

Os conídios fúngicos foram raspados da superfície do meio de cultura, suspensos em solução de água destilada estéril e Tween 80 0,01% (Sigma) (LUZ et al., 1998) e quantificados com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico, segundo Alves (1998). A partir da suspensão na concentração de  $10^8$  conídios/ml obteve-se a concentração de  $10^6$  conídios/ml, através de diluição seriada.

## **2.3 Viabilidade dos conídios**

Uma alíquota da suspensão  $10^8$  conídios/mL de cada isolado de *M. anisopliae* s.l. foi depositada em placa de Petri contendo meio BDA e incubadas sob temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $\geq 80\%$  durante 24 horas. O cálculo da germinação dos conídios foi realizado segundo Alves (1998).

## **2.4 Infecção *in vitro* de *R. microplus***

### **2.4.1 Autorização pelo comitê de ética para utilização de animais em experimentação**

O experimento faz parte de um projeto aprovado pelo Comitê de Ética (COMEP) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no processo número 23083.009241/2011-16 e com o protocolo de aprovação 154/2011.

## **2.5 Bioensaio com fêmeas ingurgitadas**

Após a coleta em bezerros artificialmente infestados, as fêmeas ingurgitadas foram imersas em solução de hipoclorito de sódio a 1% por três minutos, para fazer assepsia da cutícula, em seguida foram pesadas e distribuídas homoganeamente em seis grupos contendo 60 fêmeas em cada.

No tratamento, as fêmeas ingurgitadas foram imersas durante três minutos na suspensão fúngica e/ou controle (água destilada estéril e Tween 80 a 0,01%), posteriormente foram acondicionadas em placas de Petri, e mantidas em câmara climatizada sob temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $\geq 80\%$  (PERINOTTO et al., 2012 b). O parâmetro avaliado foi o percentual de mortalidade, que foi avaliado a cada dois dias.

## **2.6 Reisolamento fúngico**

As fêmeas ingurgitadas dos grupos tratados e controle foram colocadas em câmara úmida e incubadas em câmara climatizada sob temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $\geq 80\%$  para facilitar o crescimento dos fungos e posterior confirmação de suas características (SAMSON; EVANS, 1982).

## **2.7 Determinação da atividade proteolítica**



A atividade proteolítica foi determinada pela hidrólise de 5 µL de N-suc-ala-ala-prohe-pNA (Sigma) 1 mM, 5 µL de amostra ( $\pm 0,08$  µg de proteínas totais), 90 µL de tampão a 0,1 M tris/HCl pH 8,0 (SANTI et al., 2010 a). Os ensaios foram incubados a 37 °C por 30 minutos e em seguida medida a absorbância em espectrofotômetro a 405 nm. A atividade enzimática foi calculada a partir de uma curva padrão de p-nitroanilina, expressa em µMol por minuto de reação por mg de proteína. Os experimentos foram feitos em triplicata.

A determinação da quantidade de proteína total foi feita de acordo com o método de Bradford (1976), usando concentrações conhecidas de albumina sérica bovina como padrão.

## 2.8 Análise estatística

Para o estudo estatístico dos dados da atividade enzimática, foi realizada análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ), através do software Bioestat 4.0 (AYRES et al., 2003). Os dados não paramétricos (percentual de mortalidade de fêmeas ingurgitadas) foram submetidos à análise de Kruskal-Wallis, seguida pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK) para comparação entre as ordenações médias, com nível de significância de 5% (SAMPAIO, 2002).

## 3 RESULTADOS

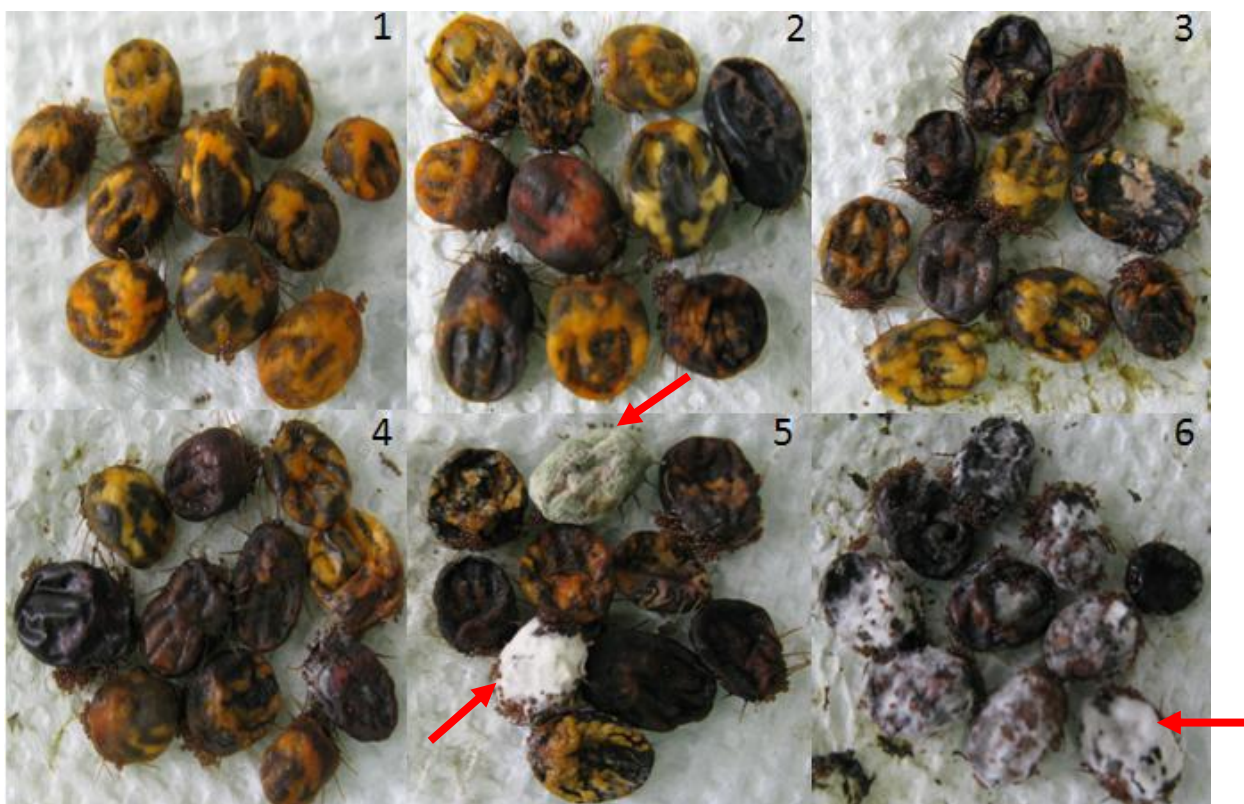
As suspensões conidiais dos cinco isolados de *M. anisopliae* s.l. apresentaram 100% de viabilidade. Isso demonstrou que todos isolados estavam aptos a serem utilizados no experimento, possibilitando atribuir alterações aos grupos tratados à ação fúngica.

No bioensaio com fêmeas ingurgitadas, pode-se observar que todos os isolados testados foram patogênicos para *R. microplus*. Entretanto, os isolados CG 629, CG 148 promoveram percentuais de mortalidade significativamente maiores já a partir do quarto dia após o tratamento. Neste experimento foi observado que os isolados CG 112 e CG 347 também são capazes de matar as fêmeas de *R. microplus*, porém necessitam de um tempo maior, quando comparado com os isolados CG 629, CG 148 e CG 32, como demonstram a tabela 1 e a figura 1.

**Tabela 1.** Média  $\pm$  Desvio padrão do percentual de mortalidade de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* após o tratamento com suspensão aquosa na concentração de  $10^8$  conídios/mL de cinco isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. Os experimentos foram conduzidos a  $27 \pm 1$  °C e RH  $\geq 80\%$  (\*).

	<b>Dia 2</b>	<b>Dia 4</b>	<b>Dia 6</b>	<b>Dia 8</b>
Controle	$0 \pm 0^a$	$0 \pm 0^a$	$0 \pm 0^a$	$0 \pm 0^a$
CG 112	$0 \pm 0^a$	$10 \pm 8,94^b$	$30 \pm 7,21^b$	$50 \pm 5,16^b$
CG 347	$0 \pm 0^a$	$10 \pm 6,32^b$	$40 \pm 7,53^b$	$45 \pm 13,78^b$
CG32	$0 \pm 0^a$	$20 \pm 7,21^{bc}$	$60 \pm 6,32^c$	$70 \pm 8,94^c$
CG 148	$0 \pm 0^a$	$30 \pm 10,95^c$	$70 \pm 7,53^c$	$90 \pm 7,53^d$
CG 629	$0 \pm 0^a$	$50 \pm 6,32^d$	$90 \pm 5,16^d$	$100 \pm 0^d$

(\*) Média e Desvio Padrão seguidos da mesma letra na mesma linha não diferem entre si ( $P \geq 0,05$ ).



**Figura 1.** Fêmeas de *Rhipicephalus microplus* no oitavo dia após o tratamento com diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l.: (1) Controle; (2) CG 112; (3) CG 347; (4) CG 32; (5) CG 148; (6) CG 629. (\*): as setas vermelhas demonstram a conidiogênese na superfície externa de cadáveres de *R. microplus* tratadas com os diferentes isolados de *M. anisopliae* s.l.

No ensaio enzimático não houve diferença significativa entre os isolados quando se avaliou a atividade proteolítica de Pr1 entre os grupos cultivados por 24 horas em meio contendo cutícula a 1% + estearato de colesterol a 1%. Porém, após 48 e 72 horas de cultivo, os isolados CG 629, CG 148 e CG 32 apresentaram maior atividade proteolítica do que os isolados CG 112 e CG 347, como demonstra a tabela 2.

**Tabela 2.** Atividade de Pr 1 (U) ( $\mu\text{Mol} / \text{mL} / \text{min}$ ) de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. cultivados em meio líquido contendo 1% de cutícula de *Rhipicephalus microplus* associado a 1% de estearato de colesterol (\*).

Isolados	Tempo de Cultivo (horas)		
	24	48	72
CG 112	0,07 ± 0,010 <sup>aA</sup>	1,14 ± 0,010 <sup>bA</sup>	1,90 ± 0,060 <sup>aB</sup>
CG 347	0,19 ± 0,010 <sup>aA</sup>	0,57 ± 0,001 <sup>aB</sup>	1,32 ± 0,010 <sup>aC</sup>
CG 629	0,29 ± 0,001 <sup>aA</sup>	4,61 ± 0,010 <sup>cC</sup>	5,06 ± 0,001 <sup>bD</sup>
CG 148	0,20 ± 0,001 <sup>aA</sup>	5,74 ± 0,001 <sup>cC</sup>	5,25 ± 0,010 <sup>bC</sup>
CG 32	0,20 ± 0,001 <sup>aA</sup>	4,55 ± 0,010 <sup>cB</sup>	4,41 ± 0,001 <sup>bB</sup>

\*Unidade enzimática seguida da mesma letra minúscula na mesma coluna e maiúscula na mesma linha, não diferem significativamente entre si ( $P \geq 0,05$ ).

#### 4 DISCUSSÃO

*Metarhizium anisopliae* s.l. vem sendo amplamente estudado como agente biológico no controle de diversas pragas, principalmente pela habilidade de penetrar a cutícula destes artrópodes (ALVES, 1998). O início do processo de penetração se dá pela adesão dos conídios no tegumento (BITTENCOURT et al., 1999; ARRUDA et al., 2005) e posterior germinação quando o ambiente for favorável. Sendo assim, o teste de germinação é de extrema importância, visto que reflete diretamente na infecção do fungo no hospedeiro. No presente estudo, os cinco isolados testados tiveram percentuais de germinação de 100% após 24 horas de crescimento. Além disso, no re-isolamento fúngico foram confirmadas as características macro e microscópicas de *M. anisopliae* s.l., por isso, os efeitos deletérios observados nas fêmeas de *R. microplus* foram atribuídos a ação dos isolados testados.

No bioensaio com fêmeas ingurgitadas foi observado variação no percentual de mortalidade entre os isolados, fato já demonstrado em outros estudos, como o de Ángel-Sahagún et al. (2010), que ao estudarem 30 isolados de *M. anisopliae* s.l. e 23 isolados de *Isaria fumosorosea*, observaram grande variação no percentual de mortalidade de larvas de *R. microplus* de acordo com o isolado utilizado. Resultados similares foram encontrados por Leemon et al. (2008) quando estudaram 31 isolados de *M. anisopliae* s.l., e também observaram variação na virulência entre os isolados fúngicos. Acredita-se que esta variação ocorra por vários fatores, como por exemplo: origem geográfica e tipo de substrato do qual foi isolado (VICENTINI et al., 2001), variabilidade genética (FERNANDES et al., 2011), sucessivas passagens em meio artificial (FARGUES; ROBERT, 1983). Em um estudo realizado por Shah et al. (2007), ficou evidenciado que cultivos sucessivos do fungo em meio de cultura, diminuem a virulência de *M. anisopliae* s.l. Segundo esses autores, isso ocorre por mudanças na superfície dos esporos, diminuindo a capacidade de adesão, hidrofobicidade e produção de Pr1. Além disso, trabalhos recentes demonstram que a variação no nível de virulência possa estar relacionada com a susceptibilidade do hospedeiro (FERNANDES et al., 2011; PERINOTTO et al., 2012 a).

No ensaio de endoprotease tipo subtilisina Pr 1 foi observado que os fungos cultivados em meio contendo cutícula de carrapato + estearato de colesteril, apresentaram alta atividade proteolítica. Nunes et al. (2010), observaram que a atividade de Pr 1 foi bem maior quando o fungo *Nomuraea* spp. foi cultivado em meio contendo cutícula de *Anticarsia gemmatalis* do que em meio desprovido deste substrato, sugerindo então que esta enzima é induzida pela presença da cutícula do artrópode. Beys da Silva et al. (2010b), ao testarem diferentes substratos para cultivo de *M. anisopliae* s.l., observaram que o fungo, quando crescido em meio contendo cutícula de carrapato mais estearato de colesteril, produziu mais micélio e também teve maior atividade lipolítica, sugerindo que estes substratos juntos por conter constituintes específicos, que são facilmente reconhecidos pelo fungo e induzem a produção enzimática. Por outro lado, em um estudo realizado por St. Leger et al. (1988b), foi observado que em meios contendo fontes simples de carbono e nitrogênio, há uma repressão na síntese de Pr1, isso se dá pelo excesso de produto final no meio levando a inibição de síntese enzimática. Recentemente, através de um estudo de imunoproteômica, foi observada claramente a diferença na produção de proteínas em meio mimetizando a interação parasito-hospedeiro, utilizando cutícula como fonte de carbono, quando comparado com meio contendo glicose (SANTI et al. 2010 b). De acordo com St. Leger et al. (1987), Pr 1 está intimamente relacionada com o mecanismo de infecção de *M. anisopliae* s.l. no hospedeiro. O papel desta enzima na degradação de proteínas cuticulares foi descrito por St. Leger et al.

(1988a) que observaram que a presença de inibidor ou anticorpo Ig G específico para Pr 1 durante a infecção em *Manduca sexta* por *M. anisopliae* s.l., reduziu a taxa de mortalidade do artrópode. Sendo assim, a ação desta enzima é essencial para que o fungo possa penetrar no artrópode (WANG et al, 2002; MOHANTY et al, 2008).

No presente estudo, pode se observar que os isolados mais virulentos a fêmeas de *R. microplus* foram os que tiveram as maiores atividades de Pr 1, demonstrando a associação desta enzima à virulência destes isolados. Resultados similares foram encontrados por Gupta et al. (1994), que ao estudarem cinco isolados de *Beauveria bassiana* s.l., observaram relação positiva entre atividade proteolítica de Pr 1 e mortalidade em larvas de *Galleria mellonella*, onde os isolados que tinham maior atividade de Pr 1 matavam as larvas mais rápido.

A Pr1 atua nos estágios iniciais do processo de penetração no hospedeiro (SMALL; BIDOCHKA, 2005), sendo capaz de hidrolisar diversos substratos presentes na epicutícula dos artrópodes (SEGERS et al., 1995), liberando nutrientes para germinação dos conídios, causando alterações tegumentares e posterior infecção. Com isso, quanto maior a atividade de Pr 1, mais rápida a infecção no hospedeiro. Pelo fato de *R. microplus* ter um ciclo curto, em torno de 21 dias, quanto mais rápido o fungo agir, maior será sua eficácia no controle deste carrapato. Portanto, os resultados aqui encontrados são extremamente importantes, pois ajudam no entendimento da relação parasito-hospedeiro, fortalecem a influência das enzimas Pr1 no mecanismo de infecção e possibilitam a seleção de isolados de *M. anisopliae* s.l. mais virulentos a este carrapato. Além disso, os resultados obtidos permitem concluir que a atividade de Pr1 de *M. anisopliae* pode ser utilizada como potencial marcador molecular de virulência para fêmeas de *R. microplus*, haja visto que os isolados com maior atividade enzimática apresentaram maior virulência. A utilização desta técnica facilitaria a busca por isolados mais eficientes no controle de artrópodes já que o ensaio proteolítico de Pr 1 é uma técnica rápida, fácil de reproduzir e de custo moderado. Vale ressaltar que este é um trabalho pioneiro na utilização de Pr1 como marcador de virulência de *M. anisopliae* s.l. sobre *R. microplus*.

## **CAPÍTULO III**

**ESTUDO DA PATOGENICIDADE *IN VITRO* DE DIFERENTES ISOLADOS  
BRASILEIROS DE *Metarhizium anisopliae* s.l. EM FORMULAÇÕES OLEOSAS  
SOBRE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito patogênico *in vitro* dos isolados brasileiros CG 112, CG 347, CG 32, CG 148 e CG 629 de *Metarhizium anisopliae* s.l., e também testar a associação dos isolados CG 148 e CG 629 em formulações a base de óleo vegetal e mineral sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. O bioensaio foi realizado com fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* que foram imersas por três minutos em formulações contendo 10 % de óleo (vegetal ou mineral), para análise do efeito patogênico dos diferentes isolados avaliou-se os parâmetros reprodutivos das fêmeas (peso da massa total de ovos, percentual de eclosão, índices de produção de ovos e nutricional e percentual de controle). No presente estudo pode-se observar que todos os isolados testados, inclusive a associação, tanto em formulações de óleo vegetal como de óleo mineral foram capazes de influenciar nos parâmetros biológicos das fêmeas de *R. microplus*. Porém, foi evidenciada que as formulações contendo óleo mineral foram mais eficientes do que as que continham óleo vegetal, pois proporcionaram os melhores percentuais de controle. A associação dos isolados CG 148 e CG 629, não promoveu diferenças significativas nos parâmetros avaliados quando comparada a estes isolados formulados separadamente. A partir destes resultados, foi possível concluir que há variação no grau de virulência entre diferentes isolados de *M. anisopliae* s.l. e também em diferentes tipos de óleo. Além disso, pode-se concluir que os melhores isolados foram CG 148 e CG 629, pois quando em formulação de óleo mineral apresentam alto potencial de controle para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

**Palavras-chave:** formulação, controle biológico e carrapatos.

## ABSTRACT

The current study aimed to evaluate the *in vitro* pathogenic effects of CG 112, CG 347, CG 32, CG 148 and CG 629 of *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates, and also test the association between the CG 148 and CG 629 isolates, formulated in the vegetable or in mineral oils on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. The bioassay was performed with *R. microplus* engorged females. Ticks were immersed for three minutes in oil-based formulations containing 10% oil (mineral or vegetable). The effect of the different fungal isolates was evaluated analyzing the females' reproductive parameters (total weight of egg mass, hatching percentage, egg production index and nutrient index). The present study showed that all tested isolates, including the association, in both vegetable and mineral oil changed the biological parameters of *R. microplus* females. Although it was demonstrated that the mineral oil formulation was more effective than the vegetable oil formulation, since the first showed higher tick control percentage. The association between the CG 148 and CG 629 isolates, did not cause significant differences in treatments and in some parameters, was even worse than these isolated separately. Accordingly, based on the results of the present study, besides the variation in the virulence among different *M. anisopliae* s.l. isolates there is also variation in the virulence when different types of oil are used. Furthermore, it was concluded that the isolates GC 148 and GC 629 formulated in mineral oil have a better potential to control *R. microplus* engorged females.

**Key-words:** formulation, biological control and ticks.

## 1 INTRODUÇÃO

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é responsável por perdas econômicas na pecuária brasileira estimadas em dois bilhões de dólares por ano (GRISI et al., 2002). Os prejuízos econômicos são decorrentes da ação espoliativa sobre o hospedeiro, da predisposição ao aparecimento de miíases, da desvalorização do couro, do retardo no desenvolvimento dos animais, diminuição da produção, excessivos gastos com mão-de-obra e carrapaticidas e pela transmissão de patógenos causadores de doenças como anaplasmose e babesiose (HORN; ARTECHE, 1985; GUIMARÃES et al., 1998; HEUCHERT et al., 1999). O controle da fase parasitária de *R. microplus* é feito basicamente por aplicação de carrapaticidas no rebanho. Contudo, os frequentes tratamentos com produtos químicos e o manejo inadequado tem conduzido o desenvolvimento de populações de carrapatos resistentes.

A redução da população de carrapatos no rebanho pode ser alcançada melhorando a eficácia no seu controle através da seleção e aplicação correta do carrapaticida e utilizando o sistema estratégico de controle associado a outras práticas de manejo (FURLONG et al., 2004). Desta maneira, o controle microbiano utilizando fungos artropodopatogênicos vem se tornando uma alternativa promissora para o controle de carrapatos. Os fungos artropodopatogênicos foram os primeiros patógenos utilizados no controle microbiano e atualmente são os agentes de biocontrole mais estudados e empregados mundialmente no controle de pragas (FARIA; WRAIGHT, 2007), devido a sua maior eficiência em causar a morte de seu hospedeiro, a sua grande variabilidade genética que permite selecionar isolados altamente virulentos para o controle de um grande número de pragas, e sua relativa segurança ambiental e para humanos (ALVES, 1998; THOMAS; READ, 2007; ZIMMERMANN, 2007 a).

A virulência destes agentes biocontroladores para *R. microplus* já foi demonstrada em diversos estudos *in vitro* (FERNANDES; BITTENCOURT, 2008; FERNANDES et al., 2012; ANGELO et al., 2012; PERINOTTO et al., 2012 a, b), sendo as espécies *Metarhizium anisopliae* s.l. e *Beauveria bassiana* s.l. as mais utilizadas no controle de artrópodes em geral. No entanto, a eficácia dos fungos artropodopatogênicos depende de fatores ambientais tais como umidade, temperatura e radiação solar (HUANG; FENG, 2009; MENT et al., 2010; PENG; XIA, 2011).

Quando utilizado em associação com fungos artropodopatogênicos, o óleo mineral ou vegetal aumenta a adesão dos conídios à superfície dos artrópodes, os protegendo contra as condições ambientais adversas (ALVES, 1998). Desta forma, a utilização de formulações oleosas destes entomopatógenos pode aumentar a estabilidade dos conídios, prolongar sua persistência a campo (JACKSON et al., 2010) e aumentar sua virulência para carrapatos (ANGELO et al., 2010; CAMARGO et al., 2012).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a patogenicidade *in vitro* de diferentes isolados brasileiros de *Metarhizium anisopliae* s.l. formulados em óleo vegetal ou mineral no controle de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, bem como verificar o efeito da associação dos isolados CG 148 e CG 629 nestas formulações.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção de *R. microplus*

Para realização dos bioensaios, fêmeas totalmente ingurgitadas foram coletadas de bovinos infestados artificialmente e sem contato recente com carrapaticidas químicos. Vale ressaltar que este experimento faz parte de um projeto aprovado e submetido à Comissão de



Ética da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob o número de protocolo 185/2011. Antes da exposição fúngica realizou-se a assepsia da cutícula das fêmeas utilizando hipoclorito de sódio a 1%, por três minutos, em seguida estas foram lavadas duas vezes em água destilada estéril.

## **2.2 Obtenção dos isolados fúngicos**

Para o experimento foram utilizados cinco isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. (CG 32, Bahia, 1984; CG 112, Distrito Federal, 1988; CG 148, Mato Grosso do Sul, 1982; CG 347, Goiás, 1991; CG 629, Alagoas, 1997), cedidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, Brasil. Esses isolados foram cultivados em meio batata, dextrose e ágar (BDA) (Himedia, Mumbai, Índia) em temperatura de  $25 \pm 1$  °C e umidade relativa  $\geq 80\%$ , por 15 dias.

## **2.3 Preparo das suspensões fúngicas e formulações oleosas**

Com auxílio de uma lâmina de bisturi estéril, os conídios foram raspados da superfície do meio de cultura e suspensos em uma solução de água destilada estéril e espalhante adesivo Tween 80 0,01% (LUZ et al., 1998). A suspensão aquosa foi quantificada utilizando uma câmara de Neubauer e microscópio óptico, segundo Alves (1998) e ajustada para concentração de  $1,0 \times 10^8$  conídios/mL, tendo como volume final 20 mL de suspensão aquosa de cada isolado.

Para associação fúngica foram misturados 4,45 mL da suspensão aquosa de cada isolado (CG 148 e CG 629). Esses isolados foram selecionados a partir de estudos prévios (Capítulo I desta tese), onde demonstraram os maiores percentuais de controle sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus in vitro* em suspensões aquosas.

As formulações oleosas foram feitas na concentração de 10% tanto de óleo vegetal (soja) (Cargil, Brasil) como de óleo mineral (Vetec Química Fina Ltda., Brasil), ambos foram esterilizados em autoclave por 121 °C por 20 minutos. Para elaborar as formulações foram seguidas as seguintes proporções: 8,9 mL de suspensão conidial aquosa + 1 mL de óleo (vegetal; mineral) + 0,1 mL de Tween 80 (Vetec Química Fina Ltda., Brasil). Como controles foram formados os seguintes grupos: Controle aquoso (10 mL de solução de água destilada estéril e Tween 80 a 0,01% ), Controle óleo vegetal e/ou mineral a 10% (8,9 mL de solução de água destilada estéril + 1 mL de óleo vegetal e/ou mineral + 0,1 mL de Tween 80), totalizando 15 grupos experimentais.

## **2.4 Viabilidade das suspensões conidiais**

Uma amostra de 10 µL de cada suspensão conidial foi colocada em placas de Petri contendo meio BDA para avaliação da viabilidade dos fungos. As placas foram mantidas em câmara climatizada sob temperatura de  $25 \pm 1$ °C e umidade relativa  $\geq 80\%$  e avaliadas 24 horas após. O cálculo da germinação dos conídios foi realizado segundo Alves (1998).

## **2.5 Bioensaio com Fêmeas Ingurgitadas**

No bioensaio com fêmeas, estas foram separadas em grupos homogêneos quanto ao peso e em seguida imersas em um mL de suspensão fúngica por três minutos, cada grupo foi composto por dez fêmeas. Após o tratamento, foram fixadas pelo dorso em placas de Petri contendo fita adesiva e mantidas em câmara climatizada sob temperatura de 27 °C e umidade relativa do ar  $\geq 80\%$ . Quando se iniciou a oviposição, os ovos foram coletados, pesados e

acondicionados em tubos de ensaio (Pirex<sup>®</sup>, Corning<sup>®</sup>, NY) medindo 16 X 125 mm e mantidos em câmara climatizada para posterior avaliação do percentual de eclosão das larvas.

Os parâmetros biológicos utilizados para avaliar o efeito dos diferentes tratamentos dos isolados de *M. anisopliae* s.l. sobre fêmeas ingurgitadas foram: peso inicial das fêmeas, peso da massa de ovos, percentual de eclosão das larvas e peso residual das fêmeas.

Esses parâmetros foram observados para permitir o cálculo dos Índices de Produção de Ovos (IPO) e Nutricional (IN), que foram obtidos utilizando as equações segundo Bennett (1974). Para a obtenção do Percentual de controle de *R.(B.) microplus* exercido por *M. anisopliae* s.l., foi calculada a Reprodução Estimada (RE), de acordo com Drummond et al., (1971).

## 2.6 Análises estatísticas

Para análise dos dados paramétricos (peso inicial das fêmeas, peso da massa de ovos, peso residual das fêmeas, índices de eficiência reprodutiva e nutricional) foi realizada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para comparação entre as médias, com nível de significância de 5% ( $P \leq 0,05$ ). O dado não paramétrico (percentual de eclosão) foi submetido à análise de Kruskal Wallis, seguida pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK) para comparação entre as ordenações médias, com nível de significância de 5% ( $P \leq 0,05$ ) (SAMPAIO, 2002).

## 3 RESULTADOS

Quando se avaliou o percentual de germinação dos isolados de *M. anisopliae* s.l. 24 horas após sua elaboração, os conídios apresentaram 100% de germinação, sob temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $\geq 80\%$ , demonstrando que os fungos estavam aptos a serem utilizados.

Pode-se observar que todos os isolados testados, inclusive a associação, tanto em formulações de óleo vegetal como de óleo mineral foram capazes de causar alterações nos parâmetros biológicos das fêmeas de *R. microplus*.

Ao avaliar o peso total da massa de ovos das fêmeas tratadas com as formulações de óleo vegetal, o isolado CG 629 foi considerado o mais eficiente, reduzindo significativamente em 65% o peso da postura, quando comparado ao controle aquoso. Os demais tratamentos utilizando conídios fúngicos e óleo vegetal, não diferiram entre si, porém, foram significativamente menores do que o grupo controle. Na análise do percentual de eclosão das larvas oriundas dos ovos ovipostos pelas fêmeas tratadas com as formulações de óleo vegetal, foi verificado que os isolados CG 148, CG 629 e também a associação entre eles, reduziram significativamente em média 47% da eclosão das larvas. Enquanto que os isolados CG 32, CG 112 e CG 347 reduziram em média 27%.

Com relação ao índice de produção de ovos, o isolado CG 629 foi o tratamento que mais interferiu neste parâmetro, diminuindo significativamente em média 65% a capacidade de ovipor destas fêmeas, quando comparado com o grupo controle aquoso. Na avaliação do índice nutricional pode-se observar que todos os isolados testados reduziram significativamente a capacidade de metabolização das fêmeas de *R. microplus*.

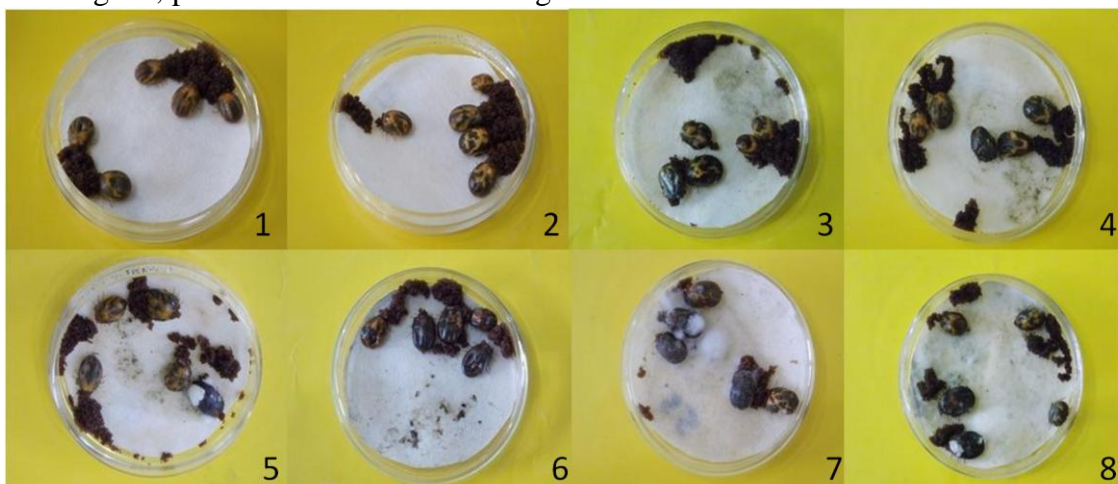
A partir da análise desses parâmetros, foi calculado o percentual de controle, que podem ser visualizados na tabela 1. Vale ressaltar que o grupo controle contendo 10% de óleo vegetal mesmo não diferindo estatisticamente do controle aquoso, teve todos os valores dos parâmetros reprodutivos diminuídos, acarretando um efeito tóxico às fêmeas de *R. microplus*, cujo percentual de controle foi de 10,73 %.

**Tabela 1.** Média  $\pm$  Desvio padrão do peso da massa de ovos (P.P.); percentual de eclosão de larvas (% P.E.); índice de produção de ovos (I.P.O.), índice nutricional (I.N.) e percentual de controle de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com formulação de **óleo vegetal a 10%** na concentração de  $10^8$  conídios/mL de cinco isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. Os experimentos foram conduzidos a  $27 \pm 1$  °C e  $RH \geq 80\%$  (\*).

Tratamentos	P.P.	% P.E.	I.P.O.	I.N.	% CTR
CTR Água	131,2 $\pm$ 4,03 <sup>a</sup>	98,2 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>	54,12 $\pm$ 1,66 <sup>a</sup>	89,23 $\pm$ 4,91 <sup>a</sup>	-
CTR Óleo	119,2 $\pm$ 4,17 <sup>ab</sup>	96,5 $\pm$ 1,64 <sup>ab</sup>	49,15 $\pm$ 1,67 <sup>ab</sup>	81,25 $\pm$ 4,83 <sup>ab</sup>	10,73
CG 112	73,25 $\pm$ 15,18 <sup>c</sup>	71,7 $\pm$ 9,83 <sup>c</sup>	29,96 $\pm$ 6,16 <sup>cd</sup>	59,07 $\pm$ 8,70 <sup>bc</sup>	59,4
CG 347	76,25 $\pm$ 31,61 <sup>c</sup>	76,7 $\pm$ 23,38 <sup>bc</sup>	31,40 $\pm$ 13,12 <sup>c</sup>	66,07 $\pm$ 15,61 <sup>bc</sup>	50,48
CG 32	99,7 $\pm$ 7,28 <sup>bc</sup>	70,0 $\pm$ 6,32 <sup>c</sup>	40,70 $\pm$ 3,89 <sup>bc</sup>	71,07 $\pm$ 7,17 <sup>bc</sup>	46,49
CG 148	79,9 $\pm$ 14,15 <sup>c</sup>	44,2 $\pm$ 21,54 <sup>d</sup>	32,89 $\pm$ 5,68 <sup>c</sup>	54,57 $\pm$ 11,98 <sup>c</sup>	73,34
CG 629	46,2 $\pm$ 15,65 <sup>d</sup>	61,0 $\pm$ 31,93 <sup>cd</sup>	19,08 $\pm$ 6,46 <sup>d</sup>	51,91 $\pm$ 8,13 <sup>c</sup>	79,88
CG 148 + 629	73,7 $\pm$ 0,07 <sup>c</sup>	53,1 $\pm$ 24,92 <sup>cd</sup>	28,3 $\pm$ 13,79 <sup>cd</sup>	36,2 $\pm$ 16,15 <sup>c</sup>	71,8

(\*) Média e Desvio Padrão seguidos da mesma letra na mesma linha não diferem entre si ( $P \geq 0,05$ ).

Os efeitos dos tratamentos utilizando os isolados de *M. anisopliae* s.l. em formulação com óleo vegetal, podem ser visualizados na figura 1.



**Figura 1.** Fêmeas de *R. microplus* tratadas com formulação de *M. anisopliae* s.l. em óleo vegetal. 1: Controle aquoso; 2: Controle oleoso; 3: CG 112; 4: CG 347; 5: CG 32; 6: CG 148; 7: CG 629.

Ao avaliar o peso total da massa de ovos das fêmeas tratadas com as formulações de óleo mineral, todos os isolados testados, reduziram significativamente o peso da postura quando comparados aos grupos controles. Entretanto, destes, o isolado CG 148 foi o que mais interferiu neste parâmetro, reduzindo significativamente em 88% o peso da massa de ovos.

Na análise do percentual de eclosão das larvas oriundas dos ovos ovipostos pelas fêmeas tratadas com as formulações de óleo mineral, foi verificado que não houve diferença significativa entre os isolados quando comparados aos controles. Porém, dentre os isolados utilizados neste bioensaio, o isolado CG 629 foi o que apresentou a maior influência neste parâmetro, diminuindo em 62% o percentual de eclosão das larvas.

Com relação ao índice de produção de ovos, pode-se observar que todos isolados foram capazes de reduzir significativamente este parâmetro, quando comparado aos controles. Porém, ao se analisar numericamente, o isolado CG 148 foi o que mais interferiu, diminuindo em 88% a capacidade de oviposição das fêmeas de *R. microplus*.

Na avaliação do índice nutricional pode-se observar que todos os isolados testados reduziram significativamente a capacidade de metabolização das fêmeas de *R. microplus*.

Entretanto, o isolado CG 148 foi responsável por maior diminuição, reduzindo em 85% a capacidade de utilização do sangue ingerido para ser utilizado na oviposição.

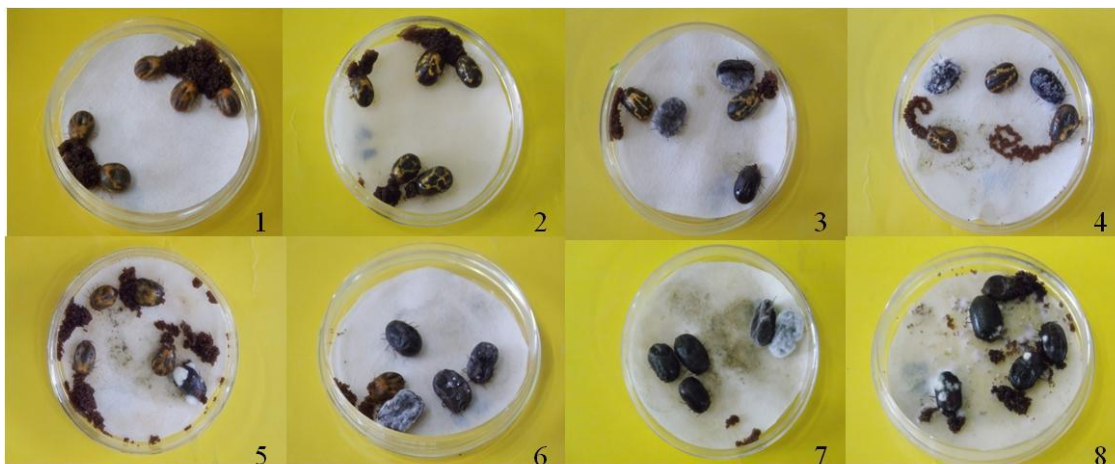
A partir da análise desses parâmetros, foi calculado o percentual de controle, podem ser visualizados na tabela 2. Vale ressaltar que o grupo controle contendo 10 % de óleo mineral mesmo não diferindo estatisticamente do controle aquoso, teve todos os valores dos parâmetros reprodutivos diminuídos, acarretando um efeito tóxico às fêmeas de *R. microplus*, cujo percentual de controle foi de 13,11 %.

**Tabela 2.** Média  $\pm$  Desvio padrão do peso da massa de ovos (P.P.); percentual de eclosão de larvas (% P.E.); índice de produção de ovos (I.P.O.), índice nutricional (I.N.) e percentual de controle de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com formulação de óleo mineral a 10% na concentração de  $10^8$  conídios/mL de cinco isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. Os experimentos foram conduzidos a  $27 \pm 1$  °C e RH  $\geq$  80% (\*).

Tratamentos	P.P.	% P.E.	I.P.O.	I.N.	% CTR
CTR Água	131,2 $\pm$ 4,03 <sup>a</sup>	98,2 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>	54,12 $\pm$ 1,66 <sup>a</sup>	89,23 $\pm$ 4,91 <sup>a</sup>	-
CTR Óleo	116,9 $\pm$ 11,59 <sup>a</sup>	95,5 $\pm$ 1,22 <sup>ab</sup>	48,31 $\pm$ 4,66 <sup>a</sup>	79,19 $\pm$ 20,17 <sup>ab</sup>	13,11
CG 112	30,45 $\pm$ 23,25 <sup>b</sup>	70,8 $\pm$ 19,60 <sup>bc</sup>	12,58 $\pm$ 9,58 <sup>b</sup>	54,65 $\pm$ 16,89 <sup>bc</sup>	83,47
CG 347	29,2 $\pm$ 12,62 <sup>b</sup>	58,3 $\pm$ 25,63 <sup>c</sup>	12,0 $\pm$ 5,13 <sup>b</sup>	39,65 $\pm$ 8,91 <sup>cd</sup>	86,65
CG 32	18,16 $\pm$ 8,05 <sup>b</sup>	62,5 $\pm$ 33,72 <sup>c</sup>	7,52 $\pm$ 3,32 <sup>b</sup>	27,9 $\pm$ 7,18 <sup>de</sup>	91,47
CG 148	16,1 $\pm$ 3,05 <sup>b</sup>	45,8 $\pm$ 25,38 <sup>c</sup>	6,62 $\pm$ 1,28 <sup>b</sup>	13,88 $\pm$ 2,97 <sup>e</sup>	94,25
CG 629	18,05 $\pm$ 17,31 <sup>b</sup>	38,0 $\pm$ 13,04 <sup>c</sup>	7,39 $\pm$ 7,04 <sup>b</sup>	29,0 $\pm$ 23,48 <sup>ce</sup>	93,8
CG 148 + 629	29,9 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	43,3 $\pm$ 11,55 <sup>c</sup>	10,8 $\pm$ 20,70 <sup>b</sup>	14,6 $\pm$ 27,96 <sup>de</sup>	91,20

(\*) Média e Desvio Padrão seguidos da mesma letra na mesma linha não diferem entre si ( $P \geq 0,05$ ).

Os efeitos dos tratamentos utilizando os isolados de *M. anisopliae* s.l. em formulação com óleo mineral, podem ser visualizados na figura 1.



**Figura 2.** Fêmeas de *R. microplus* tratadas com formulação de *M. anisopliae* s.l. em óleo mineral. 1: Controle aquoso; 2: Controle oleoso; 3: CG 112; 4: CG 347; 5: CG 32; 6: CG 148; 7: CG 629.

De maneira geral, os isolados CG 148 e CG 629 foram os mais virulentos, proporcionando os maiores percentuais de controle para fêmeas de *R. microplus*. Entretanto, quando esses isolados foram associados, observou-se uma pequena diminuição da eficácia nos parâmetros avaliados, quando comparado com os resultados sem a associação, entretanto, sem diferença significativa na maioria das vezes.

## 4 DISCUSSÃO

Os principais entraves do uso dos fungos artropodopatogênicos a campo são os fatores ambientais, principalmente a radiação solar, umidade e temperatura (MENT et al., 2010). Por isso, se preconiza o uso dos conídios fúngicos em formulações (ALVES, 1998). Os óleos vegetais e minerais vêm sendo utilizados em formulações fúngicas com intuito de proteger os conídios de dessecação e também por proporcionar um efeito sinérgico, melhorando a eficiência dos fungos sobre a praga alvo (ALVES, 1998). Segundo Prior et al. (1988), concentrações de 5% ou mais de óleo melhoram a adesão dos conídios fúngicos a cutícula do artrópode, devidas características cutinofílicas do óleo e hidrofóbicas da cutícula.

No presente estudo, com intuito de verificar o efeito de diferentes formulações oleosas, ficou evidenciado um aumento no potencial patogênico dos isolados de *M. anisopliae* s.l. formulados na concentração de 10% de dois tipos de óleo (vegetal e mineral). Os melhores resultados foram encontrados nos grupos expostos a formulação de óleo mineral, cujos percentuais de controle de fêmeas de *R. microplus* foram próximos a 95% em três dos cinco isolados testados. Até os dois isolados que no experimento utilizando suspensão aquosa tinham sido considerados menos virulentos, através da formulação com óleo mineral, tiveram altos percentuais de controle, em torno de 85%. Nos grupos tratados com a associação de dois isolados não foi observado nenhum resultado relevante, visto que o percentual se manteve próximo dos valores obtidos quando os isolados foram testados separadamente, com isso pode-se dizer que não houve sinergismo e nem antagonismo. Vale ressaltar que o grupo controle contendo 10% de óleo mineral foi capaz de influenciar nos parâmetros reprodutivos de *R. microplus* atingindo percentual de controle de 13,6%.

De acordo com Abdel-Shafy e Soliman (2004), alguns óleos apresentam características tóxicas a carrapatos, provavelmente pelos componentes presentes na sua composição. Com relação à toxicidade de óleo mineral, Camargo et al. (2012), observaram que há variação entre os estágios, onde as larvas são mais sensíveis ao efeito do óleo a medida que se aumenta o tempo de exposição. Essa característica de toxicidade dos óleos sobre os carrapatos e o sinergismo com os fungos artropodopatogênicos, tem proporcionado resultados promissores no controle de diversas espécies de carrapatos, tais como: *Amblyomma variegatum* (MARANGA et al., 2005), *R. microplus* (LEEMON et al., 2008; ANGELO et al., 2010; CAMARGO et al., 2012), *Amblyomma cajennense* (LOPES et al., 2007). Além de potencializar a ação dos fungos e melhorar a virulência, os óleos minerais possuem a vantagem de manter a viabilidade dos conídios por longo tempo em temperatura ambiente, mesmo se os conídios tiverem mais de 10% de teor de água, visto que não contém resíduos de nutrientes, sendo desta maneira, um excelente coadjuvante para formulações fúngicas.

Outro fator que deve ser considerado nas formulações oleosas é a concentração de óleo a ser utilizada, pois pode refletir no custo do produto, na aplicação, na homogeneização e na toxicidade, tanto do micro-organismo (AGUDA et al., 1986) como do artrópode (ABDEL-SHAFY; SOLIMAN, 2004). Nesta perspectiva, alguns estudos contendo diversas concentrações de óleo mineral foram desenvolvidos sobre diferentes espécies de fungos para o controle de *R. microplus*, como por exemplo, *Lecanicillium lecanii* em formulação contendo 15% de óleo mineral que promoveu percentual de controle de 97,6% (ANGELO et al., 2010), *B. bassiana* s.l. em formulações contendo 10, 15 e 20% de óleo mineral proporcionando 18,07, 0,71 e 21,67 % de percentual de controle, respectivamente (CAMARGO et al., 2012), *M. anisopliae* s.l. a 10, 15 e 20% de óleo mineral acarretando percentuais de controle de 58,12, 93,69 e 87,54 %, respectivamente (CAMARGO et al., 2012).

Com relação às formulações com óleo vegetal, estudos previos têm demonstrado aumento na eficácia dos tratamentos quando comparado com suspensões aquosas (KAAYA; HASSAN, 2000). No presente estudo, pode se dizer que houve também um aumento no

potencial patogênico dos diferentes isolados nas formulações utilizando óleo vegetal, porém menor do que óleo mineral. Todavia, vale enfatizar que os isolados CG 148 e CG 629 mantiveram altos percentuais de controle, em torno de 75%. Esse resultado é extremamente relevante dentro do contexto de controle microbiano, onde se busca diminuir a carga parasitária a níveis que não gerem prejuízos econômicos aos proprietários e ainda permitem o desenvolvimento da estabilidade enzoótica dos animais aos agentes da tristeza parasitária bovina.

A partir dos resultados do presente estudo, pode se concluir que dos cinco isolados, o CG 148 e CG 629 são os que apresentaram o maior potencial sobre esta espécie de carrapato, sendo a formulação com óleo mineral a mais indicada. Com relação à associação entre os isolados CG 148 e CG 629, conclui se que não houve interação nem positiva e nem negativa e por isso, não é recomendado esse tipo de associação.

Desta forma, levando se em consideração a eficácia das formulações testadas neste trabalho, são recomendados mais estudos utilizando estes isolados em formulações em testes futuros em condições a campo, para desta forma, estabelecer o uso destes fungos no controle biológico de *R. microplus* de uma maneira aplicada.

## CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos no presente estudos permitem elaborar as seguintes conclusões:

1. Os isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. CG 112, CG 347, CG 32, CG 148 e CG 629 são capazes de infectar *in vitro* fêmeas de *R. microplus*.
2. Há diferença na virulência para *R. microplus* entre os cinco isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l. avaliados neste estudo.
3. Os isolados CG 112 e CG 347 são pouco virulentos para *R. microplus*, quando utilizados em suspensão aquosa.
4. O isolado CG 32 apresentou virulência considerável para *R. microplus*, quando utilizado em suspensão aquosa.
5. Os isolados CG 148 e CG 629 são virulentos para *R. microplus*, quando utilizados em suspensão aquosa.
6. Existe diferença na atividade das enzimas hidrolíticas entre os isolados brasileiros de *M. anisopliae* s.l.
7. Os isolados que apresentaram as maiores atividades enzimáticas foram os mais virulentos para fêmeas de *R. microplus*.
8. A infecção com partículas virais não está associada com a virulência nos isolados de *M. anisopliae* s.l.
9. A atividade de Pr 1 é considerada um marcador molecular de virulência de *M. anisopliae* s.l. para *R. microplus*.
10. Os óleos vegetal e mineral potencializam o efeito de todos isolados de *M. anisopliae* s.l. testados sobre *R. microplus*.
11. Os isolados quando formulados em óleo mineral apresentam maior potencial de controle de *R. microplus*.
12. Não é recomendada a utilização da formulação contendo associação entre os isolados CG 148 e CG 629.
13. Os isolados com maior potencial para esta espécie de carrapato foram CG 148 e CG 629, sendo desta maneira, os mais indicados para testes futuros.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca por isolados fúngicos com alto potencial de virulência para artrópodes vem sendo intensa, visando à utilização destes micro-organismos em programas integrados de controle de pragas: agrícolas, veterinárias e de saúde pública. Dentre as espécies de fungo utilizadas neste tipo de controle, *M. anisopliae* s.l. merece destaque, sendo juntamente com *B. bassiana* s.l., as mais estudadas. Os resultados encontrados nestes estudos demonstram que há variação de virulência entre diferentes isolados fúngicos, mesmo sendo da mesma espécie.

Visando verificar o grau de virulência dos isolados brasileiros CG 112, CG 347, CG 32, CG 148 e CG 629 de *M. anisopliae* s.l. foi feita a pesquisa da atividade de lipases, proteases, incluindo a tipo subtilisina Pr 1, quitinases e a infecção por micovírus. Concomitantemente, foram feitos também testes *in vitro* de patogenicidade com fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Desta forma, foi possível verificar que os isolados mais virulentos a esta espécie de carrapato foram os que tiveram as maiores atividades enzimáticas. A partir destes resultados, pode-se considerar que a avaliação da atividade destas enzimas pode ser utilizada como marcadores moleculares de virulência para *R. microplus*.

Ao se avaliar a ação de cada grupo de enzimas (lipases, proteases e quitinases), foi possível verificar que os isolados considerados mais virulentos, CG 148 e CG 629, tiveram alta atividade lipolítica quando cultivados por 24 horas em meio contendo cutícula de carrapato e estearato de colesteril. Isso reforça a importância das lipases na fase inicial do mecanismo de infecção, cuja primeira barreira a ser ultrapassada é a epicutícula, cuja composição estrutural é basicamente lipídios. Com relação à ação das proteases e quitinases, ficou evidenciado que as maiores atividades ocorrem a partir de 48 horas e aumentam com 72 horas de cultivo. Esses resultados corroboram com a maioria dos estudos que associam a ação dessas hidrolases com a capacidade de infectar os artrópodes. Esse conhecimento fortalece a importância destas hidrolases no processo de infecção do fungo no artrópode hospedeiro e auxilia no esclarecimento deste processo, considerado altamente complexo.

A utilização de marcadores de virulência pode servir como “*screening*” ou seleção prévia, com intuito de acelerar o processo de escolha de isolados com potencial para serem utilizados no controle biológico de pragas, visto que, atualmente existem muitos isolados armazenados em diversas coleções fúngicas pelo mundo a serem estudados. Levando-se em consideração o método mais comum de testes de virulência para carrapatos, que é o bioensaio para larvas, o tempo necessário para conhecer o efeito do isolado leva em torno de dez dias, já com os testes enzimáticos, são necessários no máximo três. Além disso, vale ressaltar que, por não precisar de grande quantidade de carrapatos para testes de seleção de isolados, a utilização de animais (bovinos) para manutenção de colônia diminui. Este fator é extremamente relevante, visto que tem aumentado a preocupação com os maus tratos de animais na pesquisa.

Com relação à infecção por micovírus, não foi verificada associação da infecção destes vírus com a virulência dos isolados fúngicos testados. Porém, o que pode-se observar é que estas partículas virais são comuns em *M. anisopliae* s.l. Por isso, mais estudos devem ser desenvolvidos visando estabelecer realmente a interação entre esses micovírus com o fungo.

A utilização de fungos artropodopatogênicos no controle de carrapato em testes com condições controladas (*in vitro*), tem demonstrado resultados promissores. Entretanto, em testes *in vivo*, há uma diminuição expressiva da ação destes fungos, principalmente em regiões tropicais como o Brasil. Essa queda na efetividade está relacionada com a interferência de fatores bióticos e abióticos, que influenciam diretamente na viabilidade e desenvolvimento dos conídios. Desta forma, estudos utilizando diversos tipos de substâncias adjuvantes que permitam não só a proteção, mas também proporcione efeito potencializador dos conídios fúngicos sobre a praga alvo, vem sendo amplamente desenvolvidos. No presente



estudo, foi verificado o efeito de dois tipos de óleo (vegetal e mineral) formulados com conídios de cada isolado brasileiro de *M. anisopliae* s.l. A partir dos resultados obtidos, foi verificado que ambos os óleos potencializam a ação de todos os isolados. Entretanto, os melhores resultados foram alcançados com a formulação em óleo mineral. Este óleo protege os conídios e favorece a adesão dos conídios na cutícula dos artrópodes, porém, a utilização do óleo mineral eleva o custo final da formulação fúngica. Por isso, a busca por formulações com preços mais acessíveis aos produtores é recomendada.

Dentre os isolados testados, foram os CG 148 e CG 629 que demonstraram os maiores potenciais de controle para *R. microplus*, sendo desta forma os mais indicados a serem utilizados em testes futuros *in vivo*.

Levando se em consideração os resultados observados, este trabalho pode servir como ferramenta para estudos futuros, demonstrando a importância do conhecimento dos fatores de virulência relacionada com a patogenicidade para esta espécie de carrapato, podendo ser expandida para outros artrópodes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-SHAIFY, S.; SOLIMAN, M.M.M. Toxicity of some essential oils on eggs, larvae and females of *Boophilus annulatus* (Acari: Ixodida: Amblyommidae) infesting cattle in Egypt. **Acarologia**. v. 44, p. 23–30, 2004.

AGUDA, R.M.; ROMBACH, M.C.; SHEPARD, B.M. Effect of nim oil on germination and sporulation of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. **International Rice Research New**. v. 11, p. 34 – 35, 1986.

ALVES, R.T.; BATEMAN, R.P.; GUNN, J.; PRIOR, C.; LEATHER, S.R. Effects of different formulations on viability and medium-term storage of *Metarhizium anisopliae* conidia. **Neotropical Entomology**. v. 31, p. 91-99, 2002.

ALVES, R.T.; FARIA, M. **Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos**. 1 Ed. Planaltina: Embrapa, 2010. 50p.

ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2. Ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.

ÁNGEL-SAHAGÚN, C.A.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; MOLINA-OCHOA, J.; PESCADOR-RUBIO, A.; SKODAH, S.R.; CRUZ-VÁZQUEZ, C.; LORENZONI, A.G.; GALINDO-VELASCO, E.; FRAGOSO-SÁNCHEZ, H.; FOSTER, J.E., Virulence of Mexican isolates of entomopathogenic fungi (Hypocreales: Clavicipitaceae) upon *Rhipicephalus = Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) larvae and the efficacy of conidia formulations to reduce larval tick density under field conditions. **Veterinary Parasitology**. v. 170, p. 278-286, 2010.

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.

ANGELO, I.C.; FERNANDES, E. K. K.; BAHIANSE, T.C.; PERINOTTO, W. M. S.; GÔLO, P. S.; MORAES, A. P. R.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Virulence of *Isaria* sp. and *Purpureocillium lilacinum* to *Rhipicephalus microplus* tick under laboratory conditions. **Parasitology Research**. v. 111, p. 1473-1480, 2012.

ARRUDA, W. **Caracterização molecular e morfofisiológica de diferentes isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e análise morfológica do processo de infecção em *Boophilus microplus***. 2005.144p. (Tese de Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

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

AYRES, M.; AYRES JR.; M., AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. **Bioestat. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas**. 1 Ed. Belém: Pará, 2003, 364 p.

AZEVEDO, J.L. Engenharia genética aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 239-268.

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.

BARCI, L.A.G. Controle biológico do carrapato dos bovinos *Boophilus microplus* (ACARI: IXODIDAE) no Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**. v. 64, p. 95-101, 1997.

BARELLI, L.; PADILLA-GUERREIRO, I.E.; BIDOCHKA, M.J. Differential expression of insect and plant specific adhesin genes, Mad1 and Mad2, in *Metarhizium robertsii*. **Fungal Biology**. v. 115, p. 1174-1185, 2011.

BENNETT, G.F. Ovoposition of *Boophilus microplus* (CANESTRINI) (ACARIDA: IXODIDAE). Influence of tick size on egg production. **Acarologia**. v. 16, p. 53-61, 1974.

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.; 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, 2010 a.

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, 2010 b.

BIDOCHKA, M.J.; KHACHATOURIANS, G.G. Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 56, p. 362-370, 1990.

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, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Uso do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Arquivo da Universidade Rural do Rio de Janeiro**, v. 15, p. 197-202, 1992.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; SOUZA, E.J. de; 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, 1883) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v.20, n.2, p.78-82, 1999.

BITTENCOURT, V.R.E.P. Controle Biológico. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle biológico de carrapatos**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2000, p.145-175.

- BOGO, M. R.; QUEIROZ, M. V.; SILVA, D. M.; GIMENEZ, M. P.; AZEVEDO, J. L.; SHRANK, A. Double-stranded RNA and isometric virus-like particles in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**. v.100, p. 1468-1472, 1996.
- BOGO, M.R.; ROTA, C.A.; PINTO, J.R.; CAMPOS, M.; CORREA, C.T.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. A chitinase encoding gene (chit1 gene) from the 126 entomopathogenic *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. **Current Microbiology**. v. 37, p. 221-225, 1998.
- BOLDO, J.T.; JUNGES, A.; AMARAL, K.B.; STAATS, C.C.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. **Current Genetics**. v. 55, p. 551-560, 2009.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.
- BROETTO, L; DA SILVA, W.O.B.; 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.101-10, 2010.
- BUCK, K.W. Molecular variability of viruses of fungi. In: BRIDGE, P.D.; COUTEAUDIER, Y.; CLARKSON, J.M. **Molecular Variability of Fungal Pathogens**. Wallingford: CAB International. 1998, p. 53-72.
- CAGAN, L; SVERCEL, M. The influence of ultraviolet light on pathogenicity of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin to the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* HBN. (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Central European Agriculture**. v. 2, p. 119-125, 2001.
- CAMARGO, M.G.; GÔLO, P. S.; ANGELO, I.C.; PERINOTTO, W. M. S.; SA, 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.
- CASTRO, M.; KRAMER, K.; VALDIVIA, L.; ORTIZ, S.; BENAVENTE, J.; CASTILHO, A. A new double-stranded RNA mycovirus from *Botrytis cinerea*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 175, p. 95-99, 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.
- CHU, Y.M.; JEON, J.J.; YEA, S.J.; KIM, Y.H.; YUN, S.H.; LEE, Y.M.; KIM, K.H. Double-stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*. **Applied Environmental Microbiology**. v. 68, p. 2529-2534, 2002.

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

COLE, S.C.J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Purification and partial characterisation of a novel trypsin-like cysteine proteinase from *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 113, p. 189-196, 1993.

COSENTINO-GOMES, D.; ROCCO-MACHADO, N.; SANTI, L.; BROETTO, L.; VAINSTEIN, M.H.; MEYER-FERNANDES, J.R.; SCHRANK, A.; BEYS DA SILVA, W.O. Inhibition of Ecto-Phosphatase Activity in *Conidia* Reduces Adhesion and Virulence of *Metarhizium anisopliae* on the Host Insect *Dysdercus peruvianus*. **Current Microbiology**. v. 66, p. 1-8, 2013.

COONEY, D.G.; EMERSON, R. **Thermophilic fungi. An account of their biology, activities and classification**. Londres: W.H. Freeman, 1964. 188p.

COSTA, M.; SARQUIS, MIM.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro state, Brazil. **Mycopathologia**. v. 154, p. 207-209, 2002.

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; HOONDAL, G.S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology and Technology**. v. 71, p. 773-782, 2005.

DAY, P.R.; DOODS, J.A.; ELLISTON, J.E.; JAYNES, R.A. Double-stranded RNA in *Endothia parasitica*. **Phytopathology**. v. 67, p. 1393-1396, 1977.

DE CASTRO, J.J.; NEWSON, R.M. Host resistance in cattle tick control. **Parasitology Today**. v. 9, p. 13-17, 1993.

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

DUO-CHUAN, L. Review of fungal chitinases. **Mycopathologia**. v. 161, p. 345-360, 2006.

FACCINI, J.L.H.; BARROS-BATTESTI, D.M. Aspectos gerais da biologia e identificação e carrapatos. In: BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. **Carrapatos de importância médico veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. 1. Ed. São Paulo: Instituto Butantan, 2006. p. 05-12.

FANG, W.; LENG, B.; XIAO, Y.; JIN, K.; MA, J.; FAN, Y.; FENG, J.; YANG, X.; ZHANG, Y.; PEI, P. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bchit1* and its application to improve fungal strain virulence. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 71, p. 363-370, 2005.

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

FARIA, M.R.; 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.

FARGUES, J.F.; ROBERT, P.H. Effects of passing through scarabeid hosts on virulence and host specificity of two strains of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 29, p. 576–583, 1983.

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, É.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.

FLECHTMANN, C.H.W. **Ácaros de importância médico veterinária**. 3 Ed. São Paulo: Nobel, 1990. 192 p.

FLECHTMANN, C.A.W. **Ácaros de importância médico-veterinária**. 3.ed. São Paulo: Nobel, 1990. 192 p.

FRANCIS, J.; LITTLE, D. A. Resistance of droughtmaster cattle to tick infestation and babesiosis. **Australian Veterinary Journal**. v. 40, p. 247-253, 1964.

FRAZZON, A.P.G.; VAZ JUNIOR, I.; MASUDA, A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**. v. 94, p. 117-125, 2000.

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.

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.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S.; PRATA, M.C.A. Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Veterinária**. v. 23, p. 53-56, 2004.

GARCIA, M.V.; MONTEIRO, A.C.; SZABÓ, M.P.J. Colonização e lesão em fêmeas ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* causadas pelo fungo *Metarhizium anisopliae*. **Ciência Rural**. v. 34, p. 1513-1518, 2004.

GILLESPIE, J.P.; BATEMAN, R.; CHARNLEY, A.K. Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locusts, *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.

GLÓRIA, M.A.; FACCINI, J.L.H.; DAEMON, E.; GRISI, L. Biologia comparativa da fase não parasitária de estirpes de *B. microplus* (Can., 1887) resistente e sensível a carrapaticida em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 2, p. 79-84, 1993.

GOETTEL, M.S.; POPRAWski, T.J.; VANDENBERG, J.D. **Safety of nontarget invertebrates to fungal biocontrol agents**. In: LAIRD, M.; LACEY, L.A.; DAVIDSON, E.W. Safety of Microbial Insecticides. Boca Raton: CRC Press Inc, 1990, p. 115-132.

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. 2000, p.255- 282.

GOMES, A. **Dinâmica populacional de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1987) (Acari: ixodidae) em bovinos nelore (*Bos indicus*) e cruzamentos em infestações experimentais**. 1995. 120 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1995.

GONZÁLES, J.C. **O carrapato do boi: vida, resistência e controle**. São Paulo: Mestre Jou, 1974. 101p.

GONZALES, J.C. **O controle dos carrapatos dos bovinos**. Porto Alegre: Sulina, 1975. 104p.

GONZALES, J.C. **O controle do carrapato do boi**. Porto Alegre: Mestre Jou, 1993. 79p.

GONZALES, J. C. **O controle dos carrapatos do boi**. 2. Ed. Porto Alegre: Edição do Autor, 1995. 79p.

GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA-BORJA, G.E.; PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 21, p. 8-10, 2002.

GRODEN, E.; LOCKWOOD, J.L. Effects of soil fungistasis on *Beauveria bassiana* and its relationship to disease incidence of the colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, in Michigan and Rhode Island soils. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 57, p. 7-16, 1991.

GUIMARÃES, A.M.; LIMA, J.D.; RIBEIRO, M.F.B. Sporogony and experimental transmission of *Babesia equi* by *Boophilus microplus*. **Parasitology Research**. v. 84, p. 323-327, 1998.

GUPTA, S.C.; LEATHERS, T.D.; EL-SAYED, G.N.; IGNOFFO, C.M. Relation-ships among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria bassiana* infections of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 64, p. 13–17, 1994.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. **Biochemical Journal**. v. 280, p. 309-316, 1991.

HEUCHERT, C.M.; DE, G.V.JR.; DE ATHAIDE, D.F.; BOSE, R.; FRIEDHOFF, K.T. Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 85, p.1-11, 1999.

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

HOVIUS, J.W.R. Spitting image: tick saliva assists the causative agent of Lyme disease in evading host skin's innate immune response. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 129, p. 2337-2339, 2009.

HUANG, B.F.; FENG, M.G. Comparative tolerances of various *Beauveria bassiana* isolates to UV-B irradiation with a description of a modeling method to assess lethal dose. **Mycopathologia**. v. 168, p. 145–152, 2009.

JACKSON, M.A.; DUNLAP, C.A.; JARONSKI, S.T. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. **BioControl**. v. 55, p. 129–145, 2010.

JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications. **Annual Review of Microbiology**. v. 53, p. 315-351, 1999.

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.

JONSSON, N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**. v. 137, p. 1-10, 2006.

JONSSON, N.N.; BOCK, R.E.; JORGENSEN, W.K. Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. **Veterinary Parasitology**. v. 155, p. 1-9, 2008.

JOSEPH, B.; RAMTEKE, P.W.; THOMAS, G. Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments. **Biotechnology Advances**. v. 26, p. 457- 470, 2008.

JUNGES, A. *Metarhizium anisopliae*: Expressão de proteína tóxica de origem vegetal e análise genômica de quitinases. 2010. 127p. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

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.; HASSAN, S. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. **Experimental and Applied Acarology**. v. 24, p. 913-926, 2000.

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 Applied Acarology**. v. 55, p. 273-281, 2011.

KETTLE, D.S. **Ixodida-Ixodidae (Hard ticks)**. In: KETTLE, D.S. Medical and Veterinary entomology. 2. Ed. CAB International: Wellingford, 1995. p.423-450.

LEAL, S.C.M.; BERTIOLI, D.J.; BUTT, T.M.; PEBERDY, J.F. Characterization of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* by RAPD-PCR. **Mycological Research**. v. 98, p. 1077-1081, 1994.

LEEMON, D.M.; TURNER, L.B.; JONSSON, N.N. Pen studies on the control of cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). **Veterinary Parasitology**. v. 156, p. 248-260, 2008.

LEITE, R.C. ***Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) - Susceptibilidade, uso atual e retrospectivo de carrapaticidas em propriedades das regiões fisiográficas da Baixada do Grande Rio e Rio de Janeiro. Uma abordagem epidemiológica**. 1988. 151p. (Tese, Doutorado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1988.

LIANG, Z.Q.; LIU, A.Y.; LIU, J.L. A new species of the genus *Cordyceps* and its *Metarhizium* anamorph. **Acta Mycologica Sinica**. v. 10, p. 257-262, 1991.

LIU, Z.Y.; LIANG, Z.Q.; WHALLEY, A.J.S.; YAO, Y.J.; LIU, A.Y. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, p. 178-182, 2001.

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.

LUZ, C.; TIGANO, M.S.; SILVA, I.G.; CORDEIRO, C.M.T.; ALJANABI, S.M. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates to control *Triatoma infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 93, p. 839-846, 1988.

MANNERS, J.G. Assessment of germination. In: MADELIN, M.F. (1 Ed) **The fungus spore**. London: Butterworth & Co, 1966, p. 165-173.

MARANGA, R.O.; KAAIA, G.P.; MUEKE, J.M.; HASSANALI, A. Effects of combining the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the mortality of the tick *Amblyomma variegatum* (Ixodidae) in relation to seasonal changes. **Mycopathologia**. v. 159, p. 527-532, 2005.

MARTINS, M.K.; FURLANETO, M.C.; SOSA-GOMEZ, D.R.; FARIA, M.R.; FUNGARO, M.H.P. Double-strand RNA in the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride*. **Currents Genetics**. v. 36, p. 94-97, 1999.

MCCABE, P. M.; PFEIFFER, P.; ALFEN, N.K.V. The influence of dsRNA viruses on the biology of plant pathogenic fungi. **Trends in Microbiology**. v. 7, p. 377-381, 1999.

MELZER, M. S.; DUNN, M.; ZHOU, T.; BOLAND, G. J. Assessment of hypovirulent isolates of *Cryphonectria parasitica* for potential in biological control of chestnut blight. **Canadian Journal of Phytopathology**. v. 19, p. 69-77, 1997.

MELZER, M.J.; BIDOCHKA, M.J. Diversity of double-stranded viruses within populations of entomopathogenic fungi and potential implications for fungal growth and virulence. **Mycologia**. v. 90, p. 586-594, 1998.

MENT, D.; GINDIN, G.; GLAZER, I.; PERL, S.; ELAD, D.; SAMISH, M. The effect of temperature and relative humidity on the formation of *Metarhizium anisopliae* chlamydospores in tick eggs. **Fungal Biology**. v. 114, p. 49-56, 2010.

MOHANTY, S.S.; KAMARAJU, R.; PRADEEP, K.M.; ADYTIA, P.D. Efficacy of culture filtrations of *Metarhizium anisopliae* against larvae of *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v. 35, p. 1199-1202, 2008.

MONTEIRO, A.C.; FIORIN, A.C.; CORREIA, A. do C.B. Pathogenicity of isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin towards the cattle tick *Boophilus microplus* (can.) (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Revista de Microbiologia**, v.29, p.109-112, 1998.

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

MUSTAFA, U.; KAUR, G. Extracellular Enzyme Production in *Metarhizium anisopliae* Isolates. **Folia Microbiologica**. v. 54, p. 499-504, 2009.

NICHOLSON, W.L.; MUNAKATA, N.; HORNECK, G.; MELOSH, H.J.; SETLOW, P. Resistance of Bacillus endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 64, p. 548-672, 2000.

NUNES, A.R.F.; MARTINS, J.N.; FURNALETO, N.C.; BARROS, N.M. Production of cuticle-degrading proteases by *Nomuraea rileyi* and its virulence against *Anticarsia gemmatalis*. **Ciência Rural**. v. 40, p. 1853-1859, 2010.

NUÑEZ, J.L.; MUÑOZ-COBENAS, M.E.; MOLTEDO, H.L. **Boophilus microplus la garrapata comum del ganado vacuno**. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur, 1. ed., 1982. 184p.

OLIVEIRA, G.P.; ALENCAR, M.M.; FREITAS, A.R.. Resistência de bovinos ao carrapato *Boophilus microplus*. II. Infestação natural. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 24, p. 1267-1271, 1989.

ONOFRE, S.B.; VARGAS, L.R.B.; ROSSATO, M.; BARROS, N.M.; BOLDO, J.T.; NUNES, A.R.F.; AZEVEDO, J.L. Controle biológico de pragas na agropecuária por meio de fungos entomopatogênicos. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J.L.

**Biotecnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria.** Caxias do Sul: EDUCS. 2002. p. 295-317.

PAIÃO, J.C.V.; MONTEIRO, A.C.; KRONKA, S.N. Susceptibility of the cattle tick of the *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) to isolates of the fungus *Beauveria bassiana*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 27, p. 245- 251, 2001.

PATERSON, I.C.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M.; CLARKSON, M. Partial characterization of specific inducers of a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Microbiology**. v. 140, p. 3153-3159, 1994.

PELIZZA, S.A.; ELÍADES, S.A.; SCORSETTI, A.C.; CABELLO, M.N. LANGE, C.E. Entomopathogenic fungi from Argentina for the control of *Schistocerca cancellata* (Orthoptera: Acrididae) nymphs: fungal pathogenicity and enzyme activity. **Biocontrol Science and Technology**. v. 22, p. 1119-1129, 2012.

PENG, G.; XIA, Y. The mechanism of the mycoinsecticide diluent on the efficacy of the oil formulation of insecticidal fungus. **Biocontrol**. v. 56, p. 893–902, 2011.

PEREIRA, M.C. *Boophilus microplus*: **Revisão taxionômica e morfo-biológica**. 1980. 126f. Tese (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1980.

PERINOTTO, W. M. S.; ANGELO, I. C.; GOLO, P. S.; QUINELATO, S. B.; CAMARGO, M. G.; SA, F. A.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. **Experimental Parasitology**, v. 130, p. 257-260, 2012 a.

PERINOTTO, W. M. S.; TERRA, A.L.M.; ANGELO, I.C.; FERNANDES, E.K.K.; GOLO, P.S.; CAMARGO, M.G.; BITTENCOURT, V.R.E.P. *Nomuraea rileyi* as biological control agents of *Rhipicephalus microplus* tick. **Parasitology Research**. v. 111, p. 1743-1748, 2012 b.

PETER, R.J.; BOSSCHE, P.V.D.; PENZHORN, B.L.; SHARP, B.: Tick, fly, and mosquito control-Lessons from the past, solutions for the future. **Veterinary Parasitology**. v. 132, p. 205-215, 2005.

PINTO, A.S.; BARRETO, C.C.; SCHRANK, A.; ULHOA, C.J.; VAINSTEIN, M.H. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 43, p. 322-327, 1997.

PIYAPORN, S.; AMARET, B.; CHANPEN, W. Characterization of an extracellular lipase from the biocontrol fungus, *Nomuraea rileyi* MJ, and its toxicity toward *Spodoptera litura*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 105, p. 228-235, 2010.

POLAR, P.; KAIRO, M.T.K.; MOORE, D.; PEGRAM, R.; JOHN, S.; Comparison of water, oils and emulsifiable adjuvant oils as formulating agents for *Metarhizium anisopliae* for use in control of *Boophilus microplus*. **Mycopathologia**. v. 160, p. 151–157, 2005.

POWELL, R.T.; REID, T.J. Project tick control. **Queensland Agricultural Journal**. v. 108, p. 279-300, 1982.

PRIOR, C.; JOLLANDS, P.; LE PATOUREL, G. Infectivity of oil and water formulation of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 52, p. 66–72, 1988.

QUINELATO, S.; GOLO, P. S.; PERINOTTO, W. M. S.; SÁ, F. A., CAMARGO, M. G.; ANGELO, I. C.; MORAES, A. M.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Virulence Potencial of *Metarhizium anisopliae* isolates on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. **Veterinary Parasitology**. v. 194, p. 556-565, 2012.

RATH, A.C.; KOEN, T.B.; YIP, H.Y. The influence of abiotic factors on the distribution and abundance of *Metarhizium anisopliae* in Tasmanian pasture soils. **Mycology Research**. v. 96, p. 378-384, 1992.

REIS, R.C.S.; CHACON, S.C.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; FACCINI, J.L.H. Efeito dos fungos *Beauveria bassiana* (Balsamo) e *Metarhizium anisopliae* Sorokin, 1883 na ecdise ninfal de *Amblyomma cooperi* (Nuttal; Warbuton, 1908) (Acari-Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 12, p. 68-70, 2003.

REIS, R.C.S.; MELO, D.R.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Efeitos de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsc) Sorok sobre fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) em condições de laboratório. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 56, p. 788-791, 2004.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M.E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: a review. **Advances in Colloidal and Interface Science**. v. 147-148, p. 237-250, 2009.

ROBERTS, D.W.; CAMPBELL, A.A. Stability of entomopathogenic fungi. In: IGNOFFO, C.M.; HOSTETTER, D.L. **Environmental Stability of Microbial Insecticides**. Lanham: Entomological Society of America, 1977. p.19-76.

ROCHA, C.M.B.M. **Caracterização da percepção dos produtores do município de Divinópolis/MG sobre a importância do carrapato *Boophilus microplus* e fatores determinantes das formas de combate utilizadas**. 1996. 205p. (Dissertação, Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 1996.

ROCHA, C.M.B.M.; OLIVEIRA, P.R.; LEITE, R.C.; CARDOSO, D.L.; CALIC, S.B.; FURLONG, J. Percepção dos produtores de leite do município de Passos, MG, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae), 2001. **Ciência Rural**. v. 36, p. 1235-1242, 2006.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**. v. 129, p. 389-413, 2004.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 1 Ed. Belo Horizonte: Fepmvz, 2002. 221 p.

SAMSON, R.A.; EVANS, H.C. Two new *Beauveria* spp. from South America. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 39, p. 93-97, 1982.

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.; BERGER, M.; GUIMARÃES, J.A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae* s.l.: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. **Toxicon**. v. 55, p. 874-880, 2010 a.

SANTI, L.; BEYS-DA-SILVA, W.O.; PINTO, A.F.M.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Metarhizium anisopliae* host-pathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the infection process of arthropods. **Fungal Biology**. v. 114, p. 312-319, 2010 b.

SANTI, L.; SILVA, L.A.D.; SILVA, W.O.B.; CORRÊA, A.P.F.; RANGEL, D.E.N.; CARLINI, C.R.; SCHRANK, A. Virulence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* using soybean oil formulation for control of the cotton stainer bug, *Dysdercus peruvianus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 27, p. 2297-2303, 2011.

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

SCREEN, S.E.; ST LEGER, R.J. Cloning, expression, and substrate specificity of a fungal chymotrypsin. Evidence for lateral gene transfer from an actinomycete bacterium. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 275, p. 6689-6694, 2000.

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

SEIDL, V. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. **Fungal Biology Reviews**. v. 22, p. 36-42, 2008.

SEGERS, R.; BUTT, T.M.; KEEN, J.N.; KERRY, B.R.; PEBERDY, J. The subtilisins of the invertebrate mycopathogens *Verticillium chlamydosporium* and *Metarhizium anisopliae* are serologically and functionally related. **Microbiology**. v. 126, p. 227-232, 1995.

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**. v. 276, p. 60-66, 2007.

SHAPIRO-ILAN, D.I.; FUXA, J.R.; LACEY, L.A.; ONSTAD, D.W.; KAYA, H.K. Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 88, p. 1-7, 2005.

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

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

SOUZA, E.J.; COSTA, G.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; FAGUNDES, A.S. Ação do fungo *Beauveria bassiana* associado a gel polimerizado de celulose no controle do carrapato *Anocentor nitens* em teste de campo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 61, p. 163-169, 2009.

STATHERS, T.E.; MOORE, D.; PRIOR, C. The effect of different temperatures on the viability on *Metarhizium flavoviridae* conidia stored in vegetable and mineral oils. **Journal Invertebrate Pathology**. v. 62, p. 111-115, 1993.

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

STAATS, C.C.; JUNGES, A.; FITARELLI, M.; FURLANETO, M.C.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungi *Metarhizium anisopliae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 76, p. 945-950, 2007.

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 a.

ST LEGER, R.J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Characterization of cuticledegrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 253, p. 221-232, 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 a.

ST. LEGER, R.J., DURRANDAS, P.K.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K.; Regulation of production of proteolytic enzymes by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Microbiology**. v. 150, p. 413-416, 1988 b.

ST LEGER, R.J.; BUTT, T.M.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Second messenger involvement in differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of General Microbiology**. v. 136, p. 1779-1789, 1990.

ST LEGER, R.J.; ROBERTS, D.W.; STAPLES, R.C. A model to explain differentiation of appressoria by germlings of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 57, p. 299-310, 1991.

ST LEGER, R.J.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Cloning and regulatory analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. **Gene**. v. 120, p. 119-124, 1992.

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 a.

ST LEGER R.J.; BIDOCHKA, M.J.; ROBERTS, D.W. Characterization of a novel carboxypeptidase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 314, p. 392-398, 1994 b.

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, 1996 a.

ST LEGER, R.J.; JOSHI, L.; ROBERTS, D.W. 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.

SUNG, G.H.; HYVEL-JONES, N.L.; SUNG, J.M.; LUANGSA-ARD, J.J.; SHERTHRA, B.; SPATAFORA, J.W. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. **Studies in Mycology**. v. 57, p. 1-59, 2007.

THOMAS, M.B.; READ, A.F. Can fungal biopesticides control malaria? **Nature Reviews Microbiology**. v. 5, p. 377-383, 2007.

TIAGO, P.V.; FUNGARO, M.H.P.; FURNALETO, M.C. Cuticle-degrading proteases from the entomopathogen *Metarhizium flavoviride* and their distribution in secreted and intracellular fractions. **Letter in Applied Microbiology**. v. 34, p. 91-94, 2002.

TSAI, P. F.; PEARSON, M. N.; BEEVER, R. E. Mycoviruses in *Monilinia fructicola*. **Mycology Research**. v. 108, p. 907-912, 2004.

TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. **Transaction of the British Mycological Society**, v. 66, p. 407-411, 1976.

UEDA, M.; TAKAHASHI, S.; WASHIDA, M.; SHIRAGA, S.; TANAKA, A. Expression of *Rhizopus oryzae* lipase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymology**. v. 17, p. 113-124, 2002.

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

WANG, C.; ST LEGER, R.J. 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.

WALSTAD, J.D.; ANDERSON, R.F.; STAMBOUGH, W.J. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 16, p. 221-226, 1970.

- 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.
- VICENTINI, S.; FARIA, M.R.; OLIVEIRA, M.R.V. Screening of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates against nymphs of *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) with description of a new bioassay method. **Neotropical Entomology**. v. 30, p. 97–103, 2001.
- ZACHARUK, R.Y. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera): II. Conidial germ tubes and appressoria. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 15, p. 81-91, 1970.
- ZHANG, D.; YANG, Y.; CASTLEBURY, L. A.; CERNIGLIA, C. E. A method for the large scale isolation of high transformation efficiency fungal genomic DNA. **FEMS Microbiology Letters**. v. 145, p. 261-265, 1996.
- ZHANG, W.M.; LI, T.H.; CHEN, Y.Q.; QU, L.H. *Cordyceps campsosterna*, a new pathogen of *Campsosternus auratus*. **Fungal Diversity**. v. 17, p. 239-242, 2004.
- ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 9, p. 553-596, 2007 a.
- ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**. v. 17, p. 879-920, 2007 b.