

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

**DISSERTAÇÃO**

**Avaliação da morfologia, virulência e atividades  
proteolítica e lipolítica de isolados de *Beauveria*  
*bassiana* s.l. antes e após reisolamento em  
*Rhipicephalus microplus***

**Caio Junior Balduino Coutinho Rodrigues**

**2015**



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

**AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA, VIRULÊNCIA E ATIVIDADES  
PROTEOLÍTICA E LIPOLÍTICA DE ISOLADOS DE *Beauveria bassiana*  
s.l. ANTES E APÓS REISOLAMENTO EM *Rhipicephalus microplus***

**CAIO JUNIOR BALDUINO COUTINHO RODRIGUES**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt**

*E Coorientação do Professor*  
**Wendell Marcelo de Souza Perinotto**

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

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2015

571.29

R696a

T

Rodrigues, Caio Junior Balduino Coutinho, 1988-  
Avaliação da morfologia, virulência e  
atividades proteolítica e lipolítica de isolados  
de *Beauveria bassiana* s.l. antes e após  
reisolamento em *Rhipicephalus microplus* / Caio  
Junior Balduino Coutinho Rodrigues. - 2015.  
56 f.: il.

Orientador: Vânia Rita Elias Pinheiro  
Bittencourt.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação  
em Ciências Veterinárias, 2015.

Bibliografia: f. 46-56.

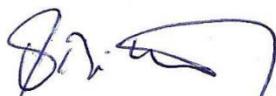
1. Fungos - Morfologia - Teses. 2. Fungos  
patogênicos - Teses. 3. Carrapato - Controle  
biológico - Teses. 4. Enzimas de fungos - Teses.  
5. Parasitologia veterinária - Teses. I.  
Bittencourt, Vânia Rita Elias Pinheiro, 1959-  
II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Curso de Pós-Graduação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

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

**CAIO JUNIOR BALDUINO COUTINHO RODRIGUES**

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 11/02/2015.



---

Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt (UFRRJ)



---

Dra. Isabele da Costa Angelo (UFRRJ)



---

Dra. Simone Quinelato Bezerra (FIOCRUZ)

“[...]

*Mas nós, vibramos em outra frequência*

*Sabemos que não é bem assim*

*Se fosse fácil achar o caminho das pedras*

*Tantas pedras no caminho não seria ruim ...”*

(Engenheiros do Hawaii – Outras Frequências)

“ [..]

*Olha só o que eu escrevi,*

*É preciso força,*

*Pra sonhar,*

*E perceber,*

*Que a estrada vai,*

*Além do que se vê ...”*

(Los Hermanos – Além Do Que Se Vê)

“[...]

*Mas pra quem tem pensamento forte*

*O impossível é só questão de opinião...”*

(Charlie Brown Jr – Só Os Loucos Sabem)

“[...]

*Cada um terá razões ou arpões*

*Dediquei-me às suas contradições, fissões, confusões*

*Meu desejo e o seu bom senso, raivosos feito cães*

*E a manhã nos proverá outros pães...”*

(Skank – Três Lados)

*Dedico este trabalho aos meus pais, à minha família e aos meus amigos, que por mais que as coisas dificultassem, nunca me deixaram sentir sozinho e nem desistir de caminhar.*

## AGRADECIMENTOS

“Todo homem de bem deve ser educado, humilde e grato!”

Primeiramente agradeço a *Deus*, por andar ao meu lado, conduzir meus passos, amparar minhas quedas, enaltecer minhas vitórias e permitir mais essa vitória. À *Nossa Senhora*, pela eterna intercessão e proteção com seu manto sagrado durante a minha jornada.

Aos meus pais *Altamir* e *Lucineia*, por toda a dedicação a mim, sempre acreditando nos meus sonhos, compreendendo as minhas ausências e por possibilitarem que eu cresça cada vez mais. O meu amor por vocês transcende qualquer palavra que eu possa falar.

Às minhas madrinhas *Marlene* e *Neuza*, ao meu padrinho *Germano* e à minha tia *Olinda* pelo amor despretensioso dedicado a mim por toda essa vida. Em especial, à tia *Jandira* e ao meu tio *Márcio* por sempre me incluírem em suas orações. Aos demais familiares, tios e tias, primos e primas por me incentivarem sempre. Às minhas cadelas *Preta* e *Natasha* (*in memoriam*), que indiretamente mostraram o amor que teria à minha profissão.

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> *Dra. Vânia Bittencourt*, por acreditar no meu trabalho, pelo estímulo, pela amizade, e principalmente, por todos os conselhos profissionais e pessoais sempre muito pontuais e pertinentes. Ao meu coorientador Prof. Dr. *Wendell Perinotto*, pela amizade de anos, os momentos de descontração, a paciência e por sempre acreditar em mim.

À comissão avaliadora formada pela *Dra. Simone Quinelato Bezerra* e pela *Dra. Isabele da Costa Angelo*, por agregarem valor a este trabalho com considerações pontuais e concisas.

Ao *Colégio Agrícola Nilo Peçanha* por direcionar minha formação e me agraciar com amigos vitalícios. À *Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro* por todo o ensinamento pessoal, durante os anos de convivência em Seropédica, e profissional, nos diferentes ramos da Medicina Veterinária.

Ao *Laboratório de Bioquímica de Vetores* da UFRRJ por dar início à minha curiosidade científica.

Ao *Laboratório de Controle Microbiano* por possibilitar meu desenvolvimento, complementando sempre a minha formação e principalmente, trazendo as dúvidas necessárias para me impulsionar neste mundo chamado “Pesquisa Científica”.

Ao *Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos* da FIOCRUZ, especialmente à *Dra. Aurea Maria Lage de Moraes*, *Dra. Simone Quinelato* e *Fernanda Santos*, pela ajuda na parte morfológica deste trabalho.

Ao *Laboratório de Proteínas Tóxicas* do Centro de Biotecnologia da UFRGS, em especial ao *Walter Orlando Beys da Silva*, *Lucélia Santi* e *Markus Berger*, pela ótima receptividade, pelo churrasco gaúcho, pela amizade estabelecida, além de todos os conhecimentos transmitidos ao longo da minha pequena estadia em Porto Alegre.

Ao *Laboratório de Hemoparasitas e Vetores* e todos os seus integrantes que sempre auxiliaram com equipamentos e conhecimento nas diferentes etapas deste projeto. E sem esquecer dos encontros sempre muitos animados na cozinha da Estação!!

Aos meus eternos amigos, médicos veterinários formados pela UFRRJ e em breve futuros pesquisadores *Jessica Ferreira*, *Juliana Macedo* e *George Kluck*, por estarmos juntos desde o início dessa jornada, seja dentro ou fora dos laboratórios, sempre acreditando um no potencial do outro. Obrigado por estarem por perto as vezes que precisei e principalmente por fazerem da nossa amizade algo especial que perdura por todos estes anos.

Aos antigos e atuais companheiros do LCM *Jôsie Albuquerque, Allan Marciano, Fillipe Sá, Jéssica Fiorotti, Luciana Souza, Maria Clemente, Thamiris Tavares, Michel Nogueira, Isabelle Campos, Aleana Souza, Olívia Zen, Patrícia Gôlo, Mariana Camargo, Caio Monteiro, Simone Quinelato, Sabrina Rezende, Wendell Perinotto e Isabele Angelo* pelos trabalhos em equipe, por todos os momentos de descontração, o companheirismo, os churrascos, os cafezinhos da tarde, os mutirões de coleta e processamento das amostras, além das intermináveis ajudas durante os experimentos.

Aos meus amigos pessoais *Túlio Reis, Adriana Fortes, Tiago Marinho, Murilo Thuller, Ana Helena Dias, Tainah Carvalho, Gleiciane Soledade, Lucimara Alexandre, Luciana Alexandre, Danielle Godinho, Talita Natário, Ana Paula Moura e Marcelle Calixto* por todo o apoio, a convivência, pelas histórias e alegrias compartilhadas fora do ambiente de trabalho.

Aos *amigos da turma 2007-II de Medicina Veterinária* da UFRRJ, pelas inúmeras histórias que sempre serão contadas aos risos e com saudade, os dias à toa, os dias de estudo, as festas e pela amizade que prevalece.

Aos colegas do *Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias*, em especial a turma de Mestrado do período de 2013-2015, pelos momentos vividos, pelos sempre animados encontros de corredor e pelas dificuldades e dúvidas compartilhadas.

Aos professores do PPGCV por todos os ensinamentos transmitidos.

Aos funcionários da *Estação Experimental Wilhelm Otto Daniel Martin Neitz* e do *Departamento de Parasitologia Animal* da UFRRJ que contribuíram para a minha formação.

Ao *CNPq* por todos estes anos ter fornecido a mim as bolsas de Iniciação Científica e Mestrado.

E, por fim, a todos que de certa forma ajudaram direta ou indiretamente na elaboração deste manuscrito.

Muito obrigado por tudo.

## **BIOGRAFIA**

Caio Junior Balduino Coutinho Rodrigues, filho de Altamir José Rodrigues e Lucineia Balduino Coutinho Rodrigues, nasceu em 11 de Outubro de 1988, no município de Volta Redonda, RJ.

Estudou de 2004 a 2006 no Colégio Agrícola Nilo Peçanha – UFF, localizado no município de Pinheiral - RJ, tendo concluído concomitantemente o Ensino Médio e o Curso de Técnico em Agropecuária.

Em Setembro de 2007 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no curso de Medicina Veterinária, tendo concluído o mesmo em Janeiro de 2013. Nos anos de 2008 e 2009 foi estagiário no setor de Bioquímica do Departamento de Química e no Hospital Veterinário de Grandes Animais da UFRRJ. A partir de 2010 ingressou como estagiário no Laboratório de Controle Microbiano da mesma Universidade, sob orientação da professora Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt, tornando-se bolsista de Iniciação Científica (PIBIC-CNPq) de 2010 a 2013.

Em Março de 2013 iniciou o Mestrado no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Durante todo o período de vida acadêmica, participou de Congressos e Simpósios, tendo publicado junto ao grupo de pesquisa resumos e trabalhos científicos em revistas especializadas.

## RESUMO

COUTINHO-RODRIGUES, Caio Junior Balduino. **Avaliação da morfologia, virulência e atividades proteolítica e lipolítica de isolados de *Beauveria bassiana* s.l. antes e após reisolamento em *Rhipicephalus microplus***. 2015. 56 p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

*Beauveria bassiana* sensu lato (s.l.) é um fungo cosmopolita de grande importância agrícola. Seu uso na pecuária como biocontrolador de *Rhipicephalus microplus* apresenta bons resultados. Dentro deste contexto, estudos que associem a análise do desenvolvimento e do metabolismo fúngico permitem selecionar isolados de melhor potencial artropodopagênico. O presente estudo avaliou a morfologia, virulência e atividades enzimáticas de dez isolados brasileiros de *B. bassiana* s.l. antes (grupo Micoteca) e após reisolamento (grupo Reisolado) através de um ciclo de crescimento sobre *R. microplus*. Para a morfologia, foram realizadas análises macromorfológicas, através de ponto único de inóculo; micromorfológicas, a partir do cultivo entre lâmina e lamínula, e avaliação da produção de conídios. A virulência foi avaliada a partir da observação dos parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* após imersão em suspensões aquosas de *B. bassiana* s.l. ( $10^8$  e  $10^7$  conídios/mL). As atividades proteolítica (semi-quantitativa, total, Pr1 e Pr2) e lipolítica ( $\rho$ -nitrofenil palmitato) foram realizadas após 72 horas de crescimento dos fungos em meio mínimo. A estatística dos experimentos foi realizada comparando os dados antes e após reisolamento para determinar os isolados de maior potencial patogênico, além de observar o efeito de uma passagem sobre um hospedeiro em potencial. Os dados paramétricos foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey e os não paramétricos pelo teste de Kruskal Wallis seguido de Student-Newman-Keuls (SNK) com nível de significância de 5%. Quando comparados entre si antes do reisolamento, foram observadas diferenças morfológicas, de virulência e atividades enzimáticas entre os isolados. CG 481 e CG 206 apresentaram os maiores percentuais de controle (65,75% e 61,65%, respectivamente), embora não tenham demonstrado alta atividade enzimática. Quanto ao reisolamento fúngico, o processo alterou em pequena escala a morfologia e a virulência. Em relação à atividade enzimática, a maioria dos isolados elevaram a atividade proteolítica específica Pr2 e a atividade lipolítica. Isolados como Bb 02 e CG 500 foram aqueles que mais sofreram influência após um ciclo de crescimento. Bb 02 aumentou em 1,9 vezes o percentual de controle (15,8% para 30,6%), elevando a produção de conídios e tornando as colônias mais pulverulentas. Além do mais, foi evidenciado também o aumento de todas as atividades enzimáticas (6,3 vezes para Pr1; 2,4 vezes para Pr2 e 9 vezes para atividade lipásica). Em contrapartida, CG 500 reduziu em 4,8 vezes o percentual de controle, além de alterar macromorfológicamente as colônias. As atividades enzimáticas também foram reduzidas em 3,6 vezes para Pr1; 1,2 vezes para Pr2 e 1,6 vezes para a atividade lipásica. Portanto, conclui-se que um ciclo de crescimento de *B. bassiana* s.l. sobre *R. microplus* foi capaz de alterar alguns dos isolados avaliados, embora mais passagens pelo hospedeiro sejam necessárias para propiciar resultados mais relevantes. Além disto, o estudo de outras enzimas como as quitinases, a produção de toxinas e a hidrofobicidade dos conídios devem ser considerados na determinação da eficácia fúngica.

**Palavras-chave:** fungo artropodopatogênico; carrapato dos bovinos; reisolamento; virulência; atividade enzimática.

## ABSTRACT

COUTINHO-RODRIGUES, Caio Junior Balduino. **Morphology, virulence and proteolytic and lipolytic activities of *Beauveria bassiana* s.l. isolates before and after reisolation in *Rhipicephalus microplus***. 2015. 56p. Dissertation (Master Science in Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

*Beauveria bassiana* sensu lato (s.l.) is a cosmopolitan fungus of great importance in agriculture. Good results are obtained when this microorganism is used as a biocontrol of *Rhipicephalus microplus*. In this context, studies involving the analysis of the development and fungal metabolism enable to select arthropodopatogenic isolates with better potencial. The aim of this study was to evaluate the morphology, virulence and enzymatic activities of ten *B. bassiana* s.l. isolates before (Micoteca group) and after reisolation (Reisolado group) through one passage (one cycle) on *R. microplus*. For morphology was analyzed: macromorphology, performed using the single point of inoculum; micromorphology, with cultivation between slide and cover slip and conidia production. The virulence before and after reisolation was evaluated by observing the biological parameters of *R. microplus* engorged females after immersion in *B. bassiana* s.l. aqueous suspensions ( $10^8$  and  $10^7$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ). The proteolytic (semi-quantitative, total, Pr1 and Pr2) and lipolytic activities ( $\rho$ -nitrophenyl palmitate) were performed after 72 hours of fungal growth on minimal medium. The statistical analysis of the experiments was performed by comparing the data before and after reisolation for determining isolates with greater pathogenic potential and observing the effect of one passage to the potential host. Parametric data were evaluated by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test and nonparametric data by Kruskal-Wallis test followed by Student-Newman-Keuls test (SNK) with 5% significance. When compared to each other before reisolation, morphological, virulence and enzymatic activities differences were observed among the isolates. CG 481 and CG 206 showed the highest control percentage (65.75% and 61.65%, respectively), although do not show the highest enzyme activity. After fungal reisolation, the process changed in small-scale the morphology and virulence. In enzymatic activity, most isolates increased the Pr2 and the lipase activities. Isolates as Bb 02 and CG 500 were those who suffered most influence after growth cycle. Bb 02 increased 1.9 times the control percentage (15.8% to 30.6%), incrementing the conidia production and making colonies that are more powdery. For this isolate was also evidenced an increase in all the enzyme activities (6.3 times to Pr1; 2.4 times to Pr2 and 9 times to lipase activity). Differently, CG 500 reduced 4.8 times the control percentage and changed the macromorphology. The enzymatic activities were also reduced by 3.6 times to Pr1; 1.2 times to Pr2 and 1.6 times to lipase activity. Therefore, the study concluded that one *B. bassiana* s.l. passage on *R. microplus* was able to change some of the isolates, although more passes by the host are necessary to provide relevant results with other isolates. Moreover, the study of enzymes such as chitinases, production of toxins and hydrophobicity of conidia should be considered to determine the fungal effectiveness.

**Keywords:** arthropodopatogenic fungi, cattle tick, re-isolation, virulence, enzymatic activity

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Isolados de *Beauveria bassiana* s.l., hospedeiros de isolamento, regiões geográficas de origem e ano de isolamento. .... 15
- Tabela 2** - Características macromorfológicas dos diferentes isolados de *Beauveria bassiana* s.l. dos grupos Micoteca (M) e Reisolado em *Rhipicephalus microplus* (R) crescidos a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e U. R.  $\geq 80\%$  em BDA (10 dias). .... 23
- Tabela 3** - Média e desvio padrão das medidas ( $\mu\text{m}$ ) de comprimento (C) e largura (L) de conídios dos isolados de *Beauveria bassiana* s.l. dos grupos Micoteca e Reisolado em *Rhipicephalus microplus* crescido a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e U. R.  $\geq 80\%$  em BDA (10 dias). .... 25
- Tabela 4** - Valor médio e desvio padrão do Peso Inicial da Fêmea (P. I. F.), Peso Total da Massa de Ovos (P. T. M. O.), Percentual de Ecloração (%), Índice de Produção de Ovos (I. P. O.), Índice Nutricional (I. N.) e Percentual de Controle (% Controle) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão em suspensão aquosa de  $10^8$  conídios/mL (Micoteca) dos diferentes isolados de *Beauveria bassiana* s.l. .... 28
- Tabela 5** - Valor médio e desvio padrão do Peso Inicial da Fêmea (P. I. F.), Peso Total da Massa de Ovos (P. T. M. O.), Índice de Produção de Ovos (I. P. O.), Índice Nutricional (I. N.), Eficiência Reprodutiva (E. R.) e Percentual de Controle (% Controle) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão em suspensões aquosas acrescida de Tween 80 0,01% ( $10^8$  e  $10^7$  conídios/mL) dos isolados de *Beauveria bassiana* s.l. (Micoteca e Reisolado), mantidas sob temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e Umidade Relativa  $\geq 80\%$ . .... 29
- Tabela 6** – Índice de Relação Enzimática (IRE) relacionado à atividade proteolítica semi-quantitativa de isolados de *Beauveria bassiana* s.l. do grupos Micoteca e Reisolado em *Rhipicephalus microplus* - incubação em Meio Mínimo Sólido (MMS) acrescido de gelatina a 1%. .... 32
- Tabela 7** - Atividade proteolítica geral com azocaseína (U) dos diferentes isolados de *Beauveria bassiana* s.l. dos grupos Micoteca e Reisolado após 72 horas de crescimento em meio mínimo líquido contendo 1% de cutícula do carrapato *Rhipicephalus microplus*. .... 34
- Tabela 8** - Atividade de Pr1 (U específica) ( $\mu\text{mol/mL/min}$ ) dos diferentes isolados de *Beauveria bassiana* s.l. dos grupos Micoteca e Reisolado após 72 horas de crescimento em meio mínimo líquido contendo 1% de cutícula do carrapato *Rhipicephalus microplus*. .... 35
- Tabela 9** - Atividade de Pr2 (U específica) ( $\mu\text{mol/mL/min}$ ) dos diferentes isolados de *Beauveria bassiana* s.l. dos grupos Micoteca e Reisolado após 72 horas de crescimento em meio mínimo líquido contendo 1% de cutícula do carrapato *Rhipicephalus microplus*. .... 35
- Tabela 10** - Atividade de lipase (U específica) ( $\text{pmol/mL/min}$ ) dos diferentes isolados de *Beauveria bassiana* s.l. dos grupos Micoteca e Reisolado após 72 horas de crescimento em meio mínimo líquido contendo 1% de cutícula do carrapato *Rhipicephalus microplus*. .... 36
- Tabela 11** - Análise morfológica, de virulência e enzimática dos isolados brasileiros de *Beauveria bassiana* antes (M) e após (R) reisolamento em *Rhipicephalus microplus*. .... 38

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1 - A** - Fotomicrografia do tegumento do carrapato *Rhipicephalus microplus* evidenciando as diferentes camadas da cutícula. **B** - Fotomicrografia da cutícula do carrapato *R. microplus* infectado com *Metarhizium anisopliae*. Aumento de 640x. **EPI**: epicutícula. **EXO**: exocutícula. **ENDO**: endocutícula. **PRO**: procutícula. **CE**: células epidérmicas. Seta amarela (**B**) indicando a penetração hifal pelas diferentes camadas cuticulares. Coloração (PAS-verde luz) – (ARRUDA, 2005)..... 9

**Figura 2** - Ciclo esquemático de microscopia eletrônica de varredura representando o processo de infecção de *Metarhizium anisopliae* no hospedeiro *Rhipicephalus microplus*. **CO**: conídio; **GT**: tubo germinativo; **AP**: apressório; **PP**: grampo de penetração; **H**: hifa. (Esquema elaborado por BEYS-DA-SILVA et al., 2013 – fotografias de ARRUDA, 2005)..... 10

**Figura 3** - Colônias dos diferentes isolados de *Beauveria bassiana* s.l. dos grupos Micoteca (1) e Reisolado em *Rhipicephalus microplus* (2) (10 dias). **Bb 02** (A); **Esalq 986** (B); **CG 154** (C); **CG 206** (D); **CG 234** (E); **CG 471** (F); **CG 478** (G); **CG 479** (H); **CG 481** (I) e **CG 500** (J). Notar exsudação hialina do isolado CG 471 em ambas as condições de estudo (seta vermelha). ..... 22

**Figura 4** - Isolados de *Beauveria bassiana* s.l. corados com azul de algodão sob microscopia óptica (aumento de 1000X). Barras = 10 µm. **A** – Presença de densos cachos de células conidiogênicas ao longo do seguimento hifal (CG 471); **B** – Conídios desprendidos de formato variado (globoso, subgloboso e elipsoide) (CG 234); **C** – Presença de hifas septadas e de coloração hialina (CG 500); **D** – Formação do conidióforo a partir da hifa principal (Bb 02); **E** – Presença de células laterais surgindo do conidióforo (CG 206 - seta preta); **F** – Conidióforo em formação com presença de conídios dispostos aos pares (CG 206 - seta amarela)..... 24

**Figura 5** – Isolado de *Beauveria bassiana* s.l. (Bb 02) Micoteca (A) e Reisolado em *Rhipicephalus microplus* (B). Barras = 10 µm. Notar a manutenção das características micromorfológicas através da presença de conidióforo, fiálides e conídios de formato arredondado dispostos aos pares (seta)..... 25

**Figura 6** - Média e erro padrão da produção de conídios pelos diferentes isolados de *Beauveria bassiana* s.l. dos grupos Micoteca e Reisolado em *Rhipicephalus microplus* cultivados em meio BDA acrescido de 0,1% de extrato de levedura a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e U. R.  $\geq 80\%$  durante 20 dias. .... 26

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>3</b>
2.1	<i>Rhipicephalus microplus</i>	3
2.2	Controle Microbiano Utilizando Fungos Artropodopatogênicos	4
2.3	<i>Beauveria bassiana</i> s.l.	4
2.4	Patogenicidade de <i>Beauveria</i> spp. para Diferentes Ixodídeos	6
2.5	Obtenção e Manutenção de Fungos Artropodopatogênicos em Laboratório	6
2.6	Estudo e Seleção de Isolados Artropodopatogênicos	7
2.7	Constituição da Cutícula dos Artrópodes	8
2.8	Colonização de Artrópodes	9
2.9	Fatores Relacionados a Virulência de Fungos Artropodopatogênicos	11
2.9.1	Proteases	12
2.9.2	Lipases	13
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>15</b>
3.1	Localização de Realização do Experimento	15
3.2	Obtenção e Seleção dos Isolados de <i>Beauveria bassiana</i> s.l.	15
3.3	Manutenção, Reisolamento e Formação dos Grupos Experimentais	16
3.4	Morfologia dos Isolados de <i>B. bassiana</i> s.l. Antes e Após Reisolamento	16
3.4.1	Avaliação macromorfológica	16
3.4.2	Avaliação micromorfológica	16
3.4.3	Avaliação da produção de conídios	16
3.5	Infecção <i>In Vitro</i> de Fêmeas Ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	17
3.5.1	Preparo das suspensões fúngicas e viabilidade dos conídios	17
3.5.2	Delineamento experimental	17
3.5.3	Ensaio biológico com fêmeas ingurgitadas	17
3.5.4	Parâmetros biológicos	18
3.5.5	Reisolamento fúngico	18
3.5.6	Análise estatística	18
3.6	Avaliação da Atividade Enzimática	18
3.6.1	Análise semi-quantitativa em meio mínimo sólido	18
3.6.2	Cultivo em meio mínimo líquido	19
3.6.3	Determinação da concentração de proteínas totais	19
3.6.4	Determinação da atividade proteolítica total	19
3.6.5	Determinação da atividade proteolítica de Pr1	20
3.6.6	Determinação da atividade proteolítica de Pr2	20
3.6.7	Determinação da atividade lipolítica	20
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>21</b>
4.1	Avaliação Morfológica	21
4.1.1	Macromorfologia	21
4.1.2	Micromorfologia	21
4.1.3	Avaliação da produção de conídios	26
4.2	Avaliação da Virulência	26
4.2.1	Antes do reisolamento (grupo Micoteca)	26
4.2.2	Após o reisolamento (grupo Reisolado)	27
4.3	Atividade Enzimática	32
4.3.1	Atividade proteolítica semi-quantitativa em meio mínimo sólido	32

4.3.2	Atividade proteolítica geral (azocaseína)	33
4.3.3	Atividade proteolítica específica de Pr1	34
4.3.4	Atividade proteolítica específica de Pr2	34
4.3.5	Atividade lipolítica	35
<b>4.4</b>	<b>Avaliação individual dos isolados antes e após o reisolamento</b>	<b>36</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>46</b>

## 2 INTRODUÇÃO

Atualmente, o crescimento exponencial da pecuária brasileira tem exercido forte influência econômica no Produto Interno Bruto (PIB) nacional. Porém, diversos fatores podem afetar negativamente o desenvolvimento dos sistemas de produção. O parasitismo é considerado um dos principais responsáveis por tais prejuízos, em que ectoparasitas como os carrapatos ganham notável destaque. O hematofagismo realizado por *Rhipicephalus microplus* acarreta danos aos animais como espoliação do couro, estresse, predisposição a infecções secundárias e transmissão de patógenos como os hemoparasitas causadores da Tristeza Parasitária Bovina, diminuindo assim a produção de carne e leite.

De maneira geral, o controle de ixodídeos é baseado na aplicação de produtos químicos. Porém, o uso indiscriminado e inadequado de acaricidas químicos tem gerado problemas de contaminação ambiental e desenvolvimento de populações resistentes às principais bases farmacológicas presentes no mercado. Na busca por soluções alternativas e por métodos complementares de tratamento, estudos com enfoque central no controle microbiano de artrópodes têm avançado, estando cada vez mais difundidos no meio científico. Neste âmbito, nematoides, bactérias, fungos, vírus e protozoários são micro-organismos que tem sua eficácia consolidada para o controle de diversas pragas agrícolas.

Em relação à agropecuária, fungos artropodopatogênicos como *Metarhizium anisopliae* s.l. e *Beauveria bassiana* s.l. estão envolvidos em diversos estudos que comprovam sua ação *in vitro* e *in vivo* para artrópodes.

São obtidos através do solo e de cadáveres naturalmente colonizados presentes no ambiente, sendo que após reisolamento, através de meios seletivos, podem ser mantidos viáveis em laboratório. A manutenção rotineira dos fungos envolve o crescimento em meios de cultura sob condições controladas de temperatura e umidade. Todavia, relatos registram que a realização de repiques sucessivos podem alterar o potencial patogênico de uma cultura fúngica. Em contrapartida, passagens consecutivas em hospedeiros artrópodes podem recuperar ou mesmo elevar a virulência de agentes patogênicos.

Fungos artropodopatogênicos apresentam a capacidade de penetrar ativamente pela cutícula íntegra. O processo inicia-se com a interação dos conídios com a superfície cuticular, seguida da adesão conidial. Após aderência, tem-se o desenvolvimento de tubos germinativos, sendo realizada a penetração através de interações físicas e químicas realizadas pelo apressório. A excreção de enzimas hidrolíticas como proteases, lipases e quitinases permite a digestão dos constituintes cuticulares e propicia a internalização das hifas. A completa colonização culmina com a morte do artrópode e a exteriorização fúngica.

Dentro deste contexto, o estudo que associe a análise do desenvolvimento e do metabolismo fúngico possibilita selecionar isolados de melhor potencial artropodopatogênico. A avaliação morfológica compreende uma etapa inicial importante para o reconhecimento e identificação do gênero fúngico, além de auxiliar no entendimento das modificações estruturais adaptativas que deverão ocorrer durante o processo de colonização. Sequencialmente, testes de virulência *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados para determinar o potencial patogênico no controle dos diferentes estágios do artrópode-alvo. Esta é considerada a fase crucial da seleção, no qual o potencial do fungo consegue evidenciado através da alteração dos parâmetros biológicos ou da determinação do percentual de mortalidade da espécie acometida. Assim como a virulência, a análise da atividade enzimática permite conhecer o metabolismo fúngico envolvido durante o processo de infecção e também orienta a escolha de isolados fúngicos.

Algumas das enzimas produzidas durante o desenvolvimento fúngico estão diretamente relacionadas com o processo de internalização. Lipases são hidrolases que têm sua atuação relatada nas fases iniciais da infecção, interagindo principalmente com epicutícula do hospedeiro; já serino proteases do tipo subtilisina (Pr1) são as enzimas mais estudadas

envolvidas na fase de penetração. Atrelado a isto, acredita-se que serino proteases do tipo tripsina (Pr2) podem ser precursoras ou até mesmo necessárias para a atividade de Pr1.

Para insetos, a literatura reporta que há relação direta da virulência com as enzimas envolvidas no processo de colonização. Entretanto, para carrapatos, estas observações ainda são preliminares e tendem a demonstrar uma não relação entre ambos.

Assim, o presente estudo objetivou avaliar a influência de uma passagem (ciclo de crescimento) do fungo artropodopatogênico *B. bassiana* s.l. sobre *R. microplus* na morfologia, virulência e atividades enzimáticas. Para isto, foram realizadas análises macro e micromorfológicas dos isolados, bem como a quantificação da produção total de conídios; avaliação dos parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* tratadas com suspensões aquosas *B. bassiana* e quantificação das atividades proteolíticas (semi-quantitativa, total, Pr1 e Pr2) e lipolítica antes e após reisolamento.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 *Rhipicephalus microplus*

*Rhipicephalus microplus* Canestrini, 1888 (Acari: Ixodidae) (MURREL; BARKER, 2003) é um ectoparasita de grande importância mundial para os sistemas pecuários de produção. Popularmente conhecido como “carrapato dos bovinos”, apresenta alta capacidade de dispersão no ambiente e fácil adaptação às regiões tropicais, acarretando danos diretos e indiretos aos animais. Parasita principalmente bovinos, podendo em grandes infestações parasitar cavalos, cães, ovelhas, veados, cabras, búfalos, gatos, cangurus, inclusive o homem (GONZALES, 1974; PEREIRA, 1980).

Tem origem descrita na Índia e Ilha de Java e disseminação relacionada à movimentação de animais e mercadorias por embarcações marítimas oriundas do continente asiático para os países de clima tropical e subtropical (WHARTON, 1974). No Brasil, acredita-se que a introdução tenha ocorrido a partir de animais vindos do Chile no início do século XVIII (GONZÁLES, 1995).

Classificado no Filo Arthropoda, Subfilo Chelicerata, Classe Aracnida, Subclasse Acari, Ordem Ixodida e Família Ixodidae (BARROS-BATTESTI et al., 2006), a denominação anterior de *Boophilus microplus* passou por importantes modificações na última década. A partir de um estudo morfológico e molecular, foi proposto a junção de dois diferentes gêneros da Família Ixodidae, sendo definido que *Boophilus* passaria a ser um subgênero de *Rhipicephalus* e a espécie renomeada para *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (MURREL; BACKER, 2003).

Apresenta um ciclo de vida direto composto de duas fases distintas: parasitária e não parasitária. A partir do desprendimento da fêmea completamente ingurgitada, inicia-se a fase não parasitária. No solo, após um período de pré-postura de aproximadamente três dias, a fêmea dá início à oviposição que tem duração média de 15 dias. Cada fêmea chega a produzir cerca de 2000 a 3000 ovos, que no ambiente, passam por período de incubação de até 30 dias até a completa eclosão das larvas. Posteriormente, as larvas seguem por um processo de fortalecimento da cutícula, tornando-se assim larvas infestantes. Devido à liberação de CO<sub>2</sub> pela respiração e pela temperatura do hospedeiro, as larvas sobem até porção apical das pastagens e migram para superfície corporal dos animais, onde se fixam dando início a fase parasitária do desenvolvimento. Nessa fase, as larvas tendem a migrar para as regiões mais quentes do corpo como virilha, traseira e úbere para fixação. Durante 18 a 26 dias, os espécimes passam por diferentes fases que envolvem a alimentação, evolução para ninfa, fase adulta e cópula, culminando com o ingurgitamento e queda das fêmeas e a permanência dos machos sobre o corpo do hospedeiro, bem como o acasalamento dos mesmos com outras fêmeas (FURLONG, 1993; SONENSHINE, 1993).

Na pecuária mundial, o ectoparasitismo realizado por *R. microplus* acarreta problemas como redução da produção de carne e leite, desconforto animal, perdas em carcaça e couro, além de atuar na transmissão e vetoração de patógenos (HORN; ARTECHE, 1985). Pesquisas relataram que no Brasil, devido ao hábito hematófago e à ação espoliativa, os prejuízos contabilizados tenham aumentado de 2 para 3,24 bilhões de dólares anuais na última década (GRISI et al., 2002; 2014).

De maneira geral, o controle de *R. microplus* é baseado na utilização de acaricidas químicos. Entretanto, o uso indiscriminado e a forma errônea de administração destes produtos têm ocasionado diversos problemas ambientais como o surgimento de populações resistentes e a contaminação de efluentes (GONZÁLES, 1995). Por isso, a diminuição dos efeitos deletérios causados por essas moléculas tem sido alvo de numerosos estudos nos últimos anos.

Neste contexto, o controle microbiano utilizando fungos artropodopatogênicos, principalmente para pragas agrícolas, figura como alternativa promissora, visto que tem

demonstrado potencial para controle de vários artrópodes (CHANDLER et al., 2000), além de causar menor dano ao meio ambiente, permitindo a produção de alimentos de natureza orgânica e conseqüentemente mais saudáveis (SAMISH et al., 2004).

### 3.2 Controle Microbiano Utilizando Fungos Artropodopatogênicos

O controle microbiano de artrópodes é um fenômeno que, em condições apropriadas, pode ser observado naturalmente no ambiente. Historicamente, chineses e egípcios, cerca de mais de 2000 a.C., faziam relatos sobre doenças ocorridas em bicho-da-seda e abelhas em seus manuscritos. Aristóteles, Virgílio e Schirack também já descreviam doenças de insetos úteis como a podridão-da-cria de abelhas. Entretanto, a primeira observação de um entomopatôgeno foi realizada por Réaumur (1726) a partir da observação de um fungo do gênero *Cordyceps* colonizando um lepidóptero (ALVES, 1998).

No Brasil, o estudo de fungos artropodopatogênicos iniciou-se em 1923, com a identificação feita por Pestana de *Penicillium anisopliae* (= *Metarhizium anisopliae* s.l.) como um agente promissor no controle da cigarrinha *Tomaspis liturata* (ALVES, 1998).

O uso de fungos artropodopatogênicos para o controle de artrópodes apresenta diversas vantagens. Dentre estas, possibilita a utilização de micro-organismos que tenham maior especificidade e seletividade pelo hospedeiro; possui capacidade de multiplicação e dispersão direta no meio ambiente; apresenta efeitos secundários para as gerações subsequentes de artrópodes e permite assim a associação com outros métodos rotineiros de controle, como os acaricidas químicos (ALVES, 1998).

Contudo, algumas limitações podem comprometer a eficácia da utilização em massa desta biotecnologia. Espectro de ação limitado para o número de espécies atuantes; ação mais lenta, visto que o processo de desenvolvimento da doença está relacionado à susceptibilidade do hospedeiro; dependência de condições ambientais favoráveis e necessidade de maiores cuidados no armazenamento, dificultando a manutenção da patogenicidade e virulência dos organismos são atualmente os principais obstáculos enfrentados (ALVES, 1998; FARIA; WRAIGHT, 2007).

Desde a década de 60, um número substancial de micopesticidas e formulações fúngicas têm sido desenvolvidos (ZIMMERMANN, 2007 a, b). Neste contexto, *Beauveria bassiana* s.l. e *Metarhizium anisopliae* s.l. são os principais fungos estudados e utilizados no controle de artrópodes. Em 2007, foram contabilizados cerca de 171 produtos com ação micoacaricida e/ou micoinseticida distribuídos pelo mundo (FARIA; WRAIGHT, 2007), sendo destes, 33,9% produzidos a partir de *B. bassiana* s.l.

### 3.3 *Beauveria bassiana* s.l.

*Beauveria bassiana* s.l. Balsamo-Crivelli (Vuillemin, 1912) é um micro-organismo cosmopolita de vasta utilização na agricultura moderna. Na atualidade é classificado como pesticida biológico que apresenta grande importância no setor agrícola. Considerado um fungo artropodopatogênico, frequentemente é isolado do solo, rizosfera de plantas e artrópodes (ZIMMERMANN, 2007 a), tendo ampla distribuição em todo território nacional.

Agostino Bassi, cientista italiano, no ano de 1835, foi o primeiro a relatar um agente fúngico atuando como causador de uma epizootia na produção de bicho-da-seda (*Bombix mori*). Sua ocorrência foi registrada no sudoeste da Europa e popularmente era conhecida como muscardine branca ou calcino (REHNER, 2005). A descrição oficial foi realizada no mesmo ano por Giuseppe Gabriel Balsamo-Crivelli, sendo a espécie nomeada de *Botrytis bassiana* como uma homenagem aos estudos de Bassi sobre o agente. Em 1912, Vuillemin reclassificou o fungo a partir da inclusão de *Botrytis bassiana* como espécie-tipo num novo gênero descrito,

*Beauveria*. Desde então, a nomenclatura estabelecida foi de *Beauveria bassiana*, fruto do reconhecimento aos estudos realizados por Jean Beauverie sobre o muscardino (REHNER; BUCKLEY, 2005).

Por ser considerado um fungo filamentosos, apresenta células eucarióticas quitinizadas e crescimento satisfatório em meios de cultura como batata-dextrose-ágar (BDA) e Sabourand-dextrose-ágar (SDA). As colônias apresentam coloração inicial esbranquiçada, podendo variar até branco-amarelada, no geral de aparência lanosa e superfície levemente almofadada. O diâmetro geral de crescimento a 23°C por 10 dias varia de 15-32 mm, espessura média de 5 mm e reverso variando de incolor a branco amarelado (REHNER et al., 2011). Microscopicamente, apresenta hifas septadas, hialinas e de parede lisa, com tamanho variando de 1-2 µm. Os conídios encontram-se aglomerados (cinco ou mais por grupo), com formato ovóide e base variando de subesférica a ampuliforme, com tamanho médio de 3 a 6 µm (REHNER et al., 2011).

Na taxonomia contemporânea, a espécie *B. bassiana* é classificada no Império Eucaryota, Domínio Opisthokonta, Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem Hypocreales, Família Cordycipitaceae (NATURDATA, 2014). Entretanto, com a inserção da biologia molecular como ferramenta na identificação das diferentes espécies de fungos, mudanças importantes têm sido propostas por distintos grupos de pesquisa (REHNER, 2005). Rehner et al. (2011) reclassificaram o gênero *Beauveria* a partir da constatação de que *B. bassiana* e *B. brongniartii* eram consideradas espécies complexas e que apresentavam diversas espécies-tipo reconhecidas. Além disto, no trabalho em questão, também foi discutido o reconhecimento de uma correlação filogenética do gênero *Beauveria* com o gênero *Cordyceps*. Todas as conclusões obtidas foram baseadas em uma análise multilocus dos genes RPB 1, RPB 2, TEF e Bloc (região intergênica nuclear), sendo proposto a descrição de seis novas espécies: *B. varroae* e *B. kipukae* (ancestralidade bifilética com *B. bassiana* e *B. brongniartii*), *B. pseudobassiana* (similar morfológicamente a *B. bassiana*, mas distante filogeneticamente), *B. asiatica* e *B. australis* (semelhante a *B. brongniartii*) e *B. sungii* (com similaridade genética com o gênero *Cordyceps*), bem como a manutenção de *B. bassiana* e *B. brongniartii* com referências do gênero. Por este motivo, em função do referido trabalho, alguns grupos de pesquisa têm adotado a denominação de *Beauveria bassiana* s.l. para isolados que ainda não tenham sido caracterizados morfológica e geneticamente segundo as descrições de Rehner et al. (2011).

Em função dos diferentes tipos de reprodução, diversas famílias dos ascomicetos comumente apresentavam dupla nomenclatura para um mesmo gênero fúngico. Neste contexto, o gênero *Beauveria* era denominado para reprodução anamórfica (assexuada) através da produção de conídios, tendo o gênero *Cordyceps* como correlato para a reprodução teleomórfica (sexuada) (ALVES, 1998). Todavia, taxonomistas contemporâneos têm rejeitado essa denominação e proposto uma nova regra que preconiza a utilização de um único nome para um mesmo fungo (1 Fungus = 1 Name). Para as ocorrências em questão, deve-se preconizar a nomenclatura do gênero que foi descrita primeiro, sendo no caso da espécie *Beauveria bassiana*, sugerido que o nome do gênero seja aquele responsável pela reprodução de forma sexuada, passando assim a ser nomeada de *Cordyceps bassiana*. A determinação dessa nova regra foi proposta e aceita pelo Internacional Code of Nomenclature (ICN) for Fungi, Algae and Plants realizado em Melbourne – Austrália (2011), e por se tratar de uma modificação taxonômica importante, tais mudanças ainda tendem a encontrar resistência à aceitação pelos micologistas clássicos e seus respectivos grupos de pesquisa (HUMBER, 2012).

### 3.4 Patogenicidade de *Beauveria* spp. para Diferentes Ixodídeos

A capacidade que um isolado fúngico apresenta de causar doença em artrópodes está diretamente relacionado ao seu potencial patogênico. Porém, fatores abióticos como temperatura, luminosidade, radiação solar (UV-A e UV-B, principalmente) e umidade relativa do ar, podem influenciar a susceptibilidade do agente ao hospedeiro-alvo (ALVES, 1998).

O primeiro relato da utilização de *B. bassiana* s.l. como agente controlador de carrapatos foi feito por Samsinakova (1957), no qual foi observado que uma fêmea de *Ixodes ricinus*, coletada do campo, estava naturalmente colonizada pelo fungo. Além disto, foi documentado toda a oviposição e a exteriorização das hifas, principalmente pela abertura oral. Em sequência, Boyce e Rizvanov (1960), ao colocarem fêmeas ingurgitadas sobre uma cultura fúngica de *B. bassiana* s.l., observaram a completa colonização da fêmea, além da capacidade de inviabilizar os ovos e reduzir o percentual de eclosão.

Diversos estudos avaliaram a virulência e realizaram a seleção de isolados de *B. bassiana* s.l. com possível potencial patogênico para os diferentes estágios de *Rhipicephalus microplus* (BITTENCOURT et al., 1996; BITTENCOURT et al., 1997; BARCI et al., 2009; POSADAS; LEUCONA, 2009; FERNANDES et al., 2011; SUN et al., 2013). Dentro desta ótica, trabalhos também têm demonstrado a eficiência *in vitro* de *B. bassiana* para diferentes gêneros de carrapatos como *Hyalomma* sp. (TIAN, 1984), *Rhipicephalus appendiculatus* (MWANGI et al., 1995; KAAYA et al., 1996), *Amblyomma cajennense* (REIS et al., 2001), *Dermacentor nitens* (CARNEIRO et al., 1999; MONTEIRO et al., 2003), *R. sanguineus*, *D. variabilis* e *I. scapularis* (KIRKLAND et al., 2004).

### 3.5 Obtenção e Manutenção de Fungos Artropodopatogênicos em Laboratório

Fungos são organismos pluricelulares que podem ser naturalmente encontrados no meio ambiente. Porém, de maneira geral, para a ocorrência de forma natural, fungos artropodopatogênicos necessitam de condições ideais de umidade relativa do ar e temperatura. Isolados fúngicos são linhagens obtidas de um determinado gênero fúngico no qual têm-se registrado informações como hospedeiro e/ou local de obtenção, região geográfica da aquisição e ano do reisolamento (ALVES, 1998).

Dentro de um mesmo gênero fúngico, isolados podem apresentar diferenças de virulência e tolerância aos diversos fatores abióticos (ALVES, 1998). Fungos artropodopatogênicos como *B. bassiana* e *M. anisopliae* podem ser naturalmente reisolados do solo, rizosfera de plantas e de artrópodes moribundos que estejam colonizados (ZIMMERMANN, 2007 a, b). Para a formação de uma coleção fúngica (denominada de Micoteca), deve-se primariamente coletar amostras (solo ou artrópodes colonizados) em recipientes adequados e que estejam devidamente identificados. Para isolamento, comumente meios de cultura como o CTC (Ciclohexamida-Tiabendazole-Cloranfenicol) para *M. anisopliae* (FERNANDES et al., 2010) e Aveia-Dodine-Tetraciclina-Cristal Violeta para *B. bassiana* (CHASE et al., 1986) são reportados como possíveis fontes de desenvolvimento seletivo para fungos artropodopatogênicos. Na sequência, após identificação morfológica e molecular da espécie, o fungo deve ser submetido a testes de patogenicidade para determinar seu potencial patogênico para artrópodes. Como fase final, deve ser depositado em bancos de coleções, devidamente acondicionados, para manutenção das características estruturais e virulência (ALVES, 1998).

As culturas obtidas podem ser armazenadas por distintos períodos de tempo. A escolha do método e a manutenção do mesmo deve respeitar o prazo médio garantido pela técnica, não ocorrendo assim problemas como contaminação, redução da viabilidade e mutação (perda das características fisiológicas). Dentre os diferentes métodos, destacam-se o repique contínuo

(curto prazo); preservação em óleo mineral, preservação em água destilada estéril (método de Castellani) e secagem em sílica (médio prazo); liofilização e criopreservação (longo prazo). Métodos de médio e longo prazos são os mais indicados para manutenção de isolados de grande importância biotecnológica e científica. Através de baixas temperaturas (água destilada estéril) e da privação de oxigênio (óleo mineral), o metabolismo fúngico pode ser reduzido, mantendo assim as características morfológicas e patogênicas das colônias. Além disto, métodos como a liofilização e a criopreservação permitem uma vida útil mais longa em função da paralização total da atividade metabólica destes micro-organismos (COSTA; FERREIRA, 1991).

Todavia, para uso rotineiro nos laboratórios, o repique contínuo é a técnica de propagação mais utilizada, visto que é considerada de fácil manipulação e permite uma rápida obtenção do isolado quando necessário. Meios como SDA e BDA são frequentemente utilizados, pois são de fácil elaboração e permitem o desenvolvimento de diversos agentes fúngicos (ALVES, 1998). Para produções em larga escala, a utilização destes meios torna-se inviável devido aos altos custos. Por isto, utiliza-se o arroz como principal substrato para crescimento, visto que fornece todos os nutrientes necessários ao crescimento e reprodução dos fungos artropodopatogênicos. Hadapad e Zebitz (2006) demonstraram que o arroz é o meio que mais adequado para a conidiogênese de *B. brongniartii*, atingindo uma produção máxima de até  $1 \times 10^9$  conídios por grama de substrato.

No entanto, sabe-se que a constante manutenção de fungos em meios de cultura pode afetar diretamente a virulência de um isolado. Shah et al. (2007) demonstraram que repiques sucessivos de dois isolados de *M. anisopliae* em meio sintético SDA foram capazes de alterar a adesão, hidrofobicidade e atividade/expressão proteolítica do esporo fúngico a partir da primeira passagem por meio de cultura. No trabalho em questão, foi observado que, aparentemente, o fungo adaptou-se às condições sintéticas, com substratos simples e disponíveis, diminuindo a virulência em consequência à ausência de desafio infectivo.

Em contrapartida, têm-se conhecimento de que passagens sucessivas dos fungos em ciclos de infecção sobre hospedeiros artrópodes possuem a capacidade de reinstaurar características como o aumento da virulência e elevação da atividade/expressão enzimática. Um trabalho demonstrou que de 21 isolados de *B. bassiana* inicialmente estudados, três apresentaram aumento significativo da virulência e da atividade enzimática após três ciclos sucessivos sobre *Nilaparvata lugens* (SONG; FENG, 2011).

### 3.6 Estudo e Seleção de Isolados Artropodopatogênicos

O estudo de um gênero fúngico inicia-se a partir da análise morfológica. A avaliação da macromorfologia de fungos filamentosos deve partir do exame visual das colônias, com a observação da coloração de verso e do reverso, presença de pigmentação, detecção de bordas irregulares, avaliação do tipo e da velocidade de crescimento, superfície, textura, topografia, aspecto e diâmetro da colônia. Para identificação do gênero fúngico, devem ser observadas características microscópicas como formato e tamanho de conídios, disposição e presença de septações nas hifas, desenvolvimento de células conidiogênicas e quaisquer outras estruturas características envolvidas no crescimento de fungos filamentosos (SIDRIM; ROCHA, 2004). Arelado a isso, a biologia molecular auxilia e complementa na diferenciação das espécies presentes dentro de um mesmo gênero, como para os complexos *Metarhizium anisopliae* (BISCHOFF et al., 2009) e *Beauveria bassiana* (REHNER et al., 2011). Assim, a identificação das diferentes espécies é feita de forma mais precisa, desde que ambas trabalhem em associação (análise morfológica e engenharia molecular).

O passo seguinte para avaliação de um isolado compreende a realização de testes *in vitro* e *in vivo* com artrópodes em potencial. O objetivo desta fase é observar a capacidade que o fungo possui de alterar os parâmetros biológicos ou mesmo causar a morte das espécies

acometidas. No caso dos carrapatos, para isto, os isolados precisam ser veiculados em meio líquido. Todavia, devido às características hidrofóbicas da superfície conidial, para permitir que a água seja utilizada como principal meio de veiculação, faz-se necessário a adição de espalhantes adesivos como o Tween 80 (LUZ et al., 1998). Além disto, a formulação de isolados fúngicos é capaz de garantir melhores resultados na aplicabilidade do controle microbiano para controle de artrópodes. O uso de adjuvantes como o óleo mineral e/ou vegetal facilitam a interação entre as superfícies conidial e cuticular durante a fase de adesão (MARANGA et al., 2005).

A avaliação do metabolismo fúngico ocorrido durante o processo de colonização do artrópode também pode orientar a seleção de isolados. Para transpor a cutícula do hospedeiro, o artropatógeno secreta enzimas hidrolíticas como proteases, quitinases e lipases capazes de digerir os constituintes cuticulares, permitindo assim a penetração hifal (WANG et al., 2002; ARRUDA, 2005, SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). Em insetos, tende-se a observar uma relação direta da virulência com a atividade enzimática. Estudos sugerem que a ocorrência de mutação espontânea de proteases específicas produzidas em grande escala durante a penetração podem resultar em redução significativa da virulência (WANG et al., 2002; BAGGA et al., 2004). Porém, estudos demonstram que, para outros artrópodes como *R. microplus* (GÔLO, 2014), *Protopia* sp. e *Spodoptera exigua* (ROSAS-GARCÍA et al., 2014), até o presente momento, os mecanismos não encontram-se bem elucidados, visto que tendem a demonstrar uma não relação entre ambos.

### 3.7 Constituição da Cutícula dos Artrópodes

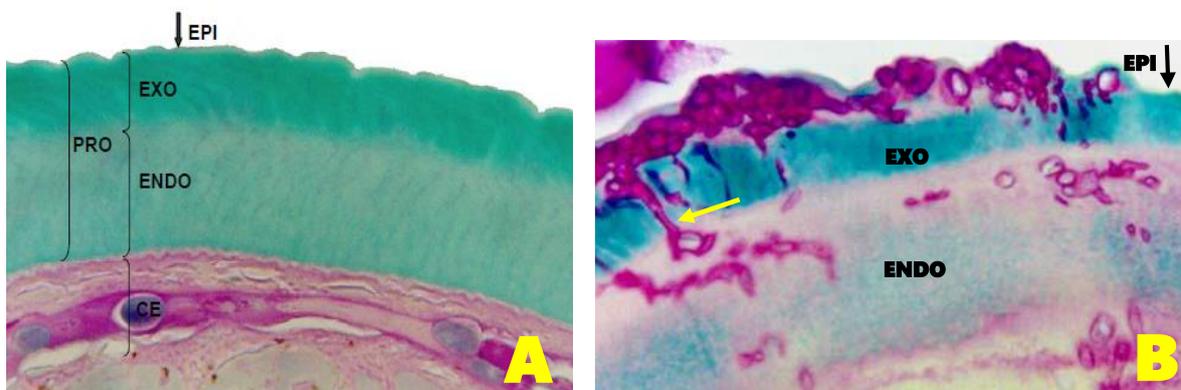
Originária a partir das células da epiderme, a cutícula possui importante função no corpo dos artrópodes. É um constituinte natural do tegumento que atua como a primeira e a mais importante barreira física contra a ação de agentes externos, sendo considerada a principal limitação para a ocorrência de parasitismo e doenças (VINCENT; WEGST, 2004). Além disto, exerce funções de sustentação e proteção contra a dessecação.

É composta por nanofibras cristalinas de quitina dispostas em várias camadas que encontram-se incorporadas em uma matriz rica em proteínas, polifenóis e água e pouco abundante em lipídios (VINCENT; WEGST, 2004). Apresenta-se dividida em duas camadas denominadas de epicutícula e procutícula (Figura 1 a).

A epicutícula é considerada a camada mais externa, de origem não-quitinosa, localizada sobre a procutícula. Geralmente de espessura muito fina, é mesclada de pelo menos duas subcamadas: uma de origem mais interna, a cuticulina, composta por lipídeos polimerizados e lipoproteínas e outra mais externa, rica em ácidos graxos esterificados de cadeia longa e álcoois (BLOMQUIST et al., 1987; BEYS-DA-SILVA, 2005). Woods e Grula (1984) ao realizarem um estudo com *Helicoverpa zea* e *B. bassiana*, relataram que a epicutícula é composta quase que exclusivamente por lipídios (95%), sendo a camada responsável pela proteção inicial externa.

A procutícula, observada em maior proporção, é composta majoritariamente por quitina conjugada às proteínas estruturais. Encontra-se dividida em duas subcamadas, a exocutícula e endocutícula (Figura 1 a) (CLARKSON; CHARNLEY, 1996). Nesta camada, encontram-se os sítios específicos de atuação de proteases e lipases (SANTI, 2009). As proteínas são os componentes predominantes na procutícula (61%), seguido de quitina (30%) e lipídios (7%) (BIDOCHKA; KHACHATOURIANS, 1994). Atrelado a isso, a literatura reporta que a proporção de quitina/proteína presente na cutícula de carrapatos *Rhipicephalus* é bem inferior à dos demais artrópodes, com percentuais de apenas 3,8% de quitina estrutural (ANDERSEN, 1979).

Diversos trabalhos demonstram que a virulência de um isolado é induzida pela presença da cutícula de um artrópode, no qual em condições estressantes, pode-se observar o aumento concomitante da atividade enzimática (BUTT et al., 1998; WANG et al., 2002).



**Figura 1** - **A** - Fotomicrografia do tegumento do carrapato *Rhipicephalus microplus* evidenciando as diferentes camadas da cutícula. **B** - Fotomicrografia da cutícula do carrapato *R. microplus* infectado com *Metarhizium anisopliae*. Aumento de 640x. **EPI**: epicutícula. **EXO**: exocutícula. **ENDO**: endocutícula. **PRO**: procutícula. **CE**: células epidérmicas. Seta amarela (**B**) indicando a penetração hifal pelas diferentes camadas cuticulares. Coloração (PAS-verde luz) – (ARRUDA, 2005).

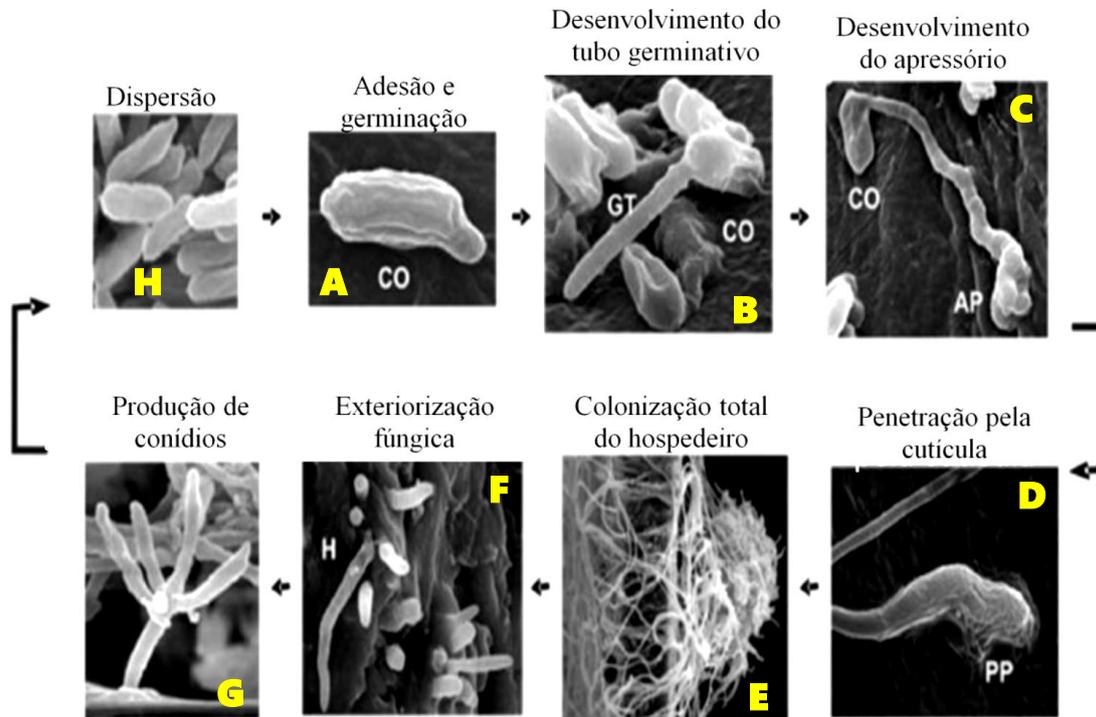
### 3.8 Colonização de Artrópodes

O processo de colonização dos fungos artropodopatogênicos é marcado por distintas fases. Para garantir a eficiência do processo infectivo, é necessária a associação de interações físicas e químicas entre o tegumento do artrópode e as enzimas presentes na superfície dos conídios, bem como aquelas produzidas em função do processo de colonização (ALVES, 1998).

O primeiro contato do agente com o hospedeiro é marcado pela adesão do conídio à cutícula (Figura 2A). Durante esta fase, interações proteicas e enzimáticas são responsáveis pela fixação da estrutura fúngica aos componentes cuticulares. Ecto-enzimas como catalases (CAKMAK; MARSCHNER, 1992), peroxidases (VIEIRA et al., 2003) e superóxido desmutase (BEYER; FRIDOVICH, 1987) já foram reportadas como responsáveis por manter a integridade de conídios de *M. anisopliae* no ambiente. Broetto et al. (2010) demonstraram a presença da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) na superfície de conídios de *M. anisopliae*, bem como sua importância para a interação da superfície conidial com o artrópode alvo. Cosentino-Gomes et al. (2013) relataram que a inibição de uma ecto-fosfatase responsável pela liberação de energia influencia negativamente no processo de adesão da cutícula. Beys-da-Silva et al. (2009) identificaram pela primeira vez uma lipase presente na superfície do esporo de *M. anisopliae* capaz de hidrolisar diferentes substratos lipídicos. Tal capacidade favorece a interação do fungo com a epicutícula, visto que a mesma é formada exclusivamente por lipídios. Já Latgé et al. (1988) sugerem que a presença de lectinas, um tipo de glicoproteína ligada a um carboidrato, que é encontrada na superfície dos conídios de *B. bassiana*, esteja envolvida no processo de interação entre o fungo e a cutícula do artrópode. Wang e St. Leger (2007) avaliaram a presença de MAD 1 (proteína do tipo adesina 1) em conídios de *M. anisopliae*. A supressão de MAD 1 foi capaz de atrasar a germinação, suprimir a formação do blastoporo e reduzir a virulência do fungo para lagartas de *Manduca sexta*.

Após a adesão, o conídio dá início ao processo de diferenciação celular com o desenvolvimento do tubo germinativo (Figura 2B). Fatores como a presença de substrato,

temperatura, umidade relativa do ar, radiação UV e o pH do meio influenciam neste processo (ALVES, 1998). É importante ressaltar que, nesta fase em específico, o fungo utiliza exclusivamente de suas reservas metabólicas para o seu desenvolvimento sobre o hospedeiro-alvo.



**Figura 2** - Ciclo esquemático de microscopia eletrônica de varredura representando o processo de infecção de *Metarhizium anisopliae* no hospedeiro *Rhipicephalus microplus*. **CO**: conídio; **GT**: tubo germinativo; **AP**: apressório; **PP**: grampo de penetração; **H**: hifa. (Esquema elaborado por BEYS-DA-SILVA et al., 2013 – fotografias de ARRUDA, 2005).

Durante a germinação, na extremidade distal do tubo germinativo, é possível observar a ocorrência de diferenciação celular, seguida pela formação de uma estrutura circunscrita dilatada denominada de apressório (PEDRINI et al., 2007) (Figura 2C). Devido à alta taxa metabólica, o fungo acumula nesta região, carboidratos responsáveis por sua manutenção energética e enzimas responsáveis por digerir os componentes cuticulares nas fases subsequentes (WANG; ST. LEGER, 2007).

Na sequência, o processo de penetração se inicia com a formação do grampo de penetração (Figura 2D). Esta estrutura de aparência afilada, que surge na porção inferior do apressório, é responsável por dar início à associação da pressão mecânica exercida pelo tubo germinativo com a atividade enzimática a partir da liberação de lipases, proteases e quitinases (ARRUDA, 2005). A hidrólise dos componentes permite que sejam abertos orifícios na cutícula íntegra do artrópode, obtendo-se pontos de penetração para as hifas. A digestão cuticular inicia-se pela epicutícula, sendo as lipases supostamente as primeiras enzimas a serem empregadas no processo de digestão cuticular (BEYS-DA-SILVA et al., 2010 a). Poucos são os estudos sobre estas enzimas durante o processo de penetração, todavia, para *M. anisopliae*, Beys-da-Silva et al., (2009) identificaram e purificaram uma lipase de extrema importância para a ocorrência de infecção do fungo artropodopatogênico em *R. microplus*. Posteriormente, proteases e quitinases dão início ao processo de degradação da endo e exocutícula. Acredita-se que haja um sinergismo de ambas para que o processo infectivo seja considerado eficiente. Diversos

trabalhos relatam a presença de proteases atuando no processo de penetração de *M. anisopliae* (ST. LEGER et al., 1996a; BAGGA et al., 2004; PERINOTTO et al., 2014) e *B. bassiana* (ITO et al., 2007; FANG et al., 2009; SUN et al., 2013) para as mais diferentes espécies de artrópodes. Já quitinases encontram-se relacionadas com a aquisição de nutrientes durante infecção e participam da morfogênese fúngica durante o crescimento das hifas e nos processos de diferenciação celular (STAATS, 2007). Trabalhos reportam a presença de quitinases em *M. anisopliae* (PINTO et al., 1997) e *B. bassiana* (ST. LEGER et al., 1996 b; FANG et al., 2005) e sua importância para a infecção do hospedeiro.

A partir do contato com a hemocele do hospedeiro, o fungo desenvolve uma estrutura denominada de blastosporo, derivada das hifas (CHO et al., 2006). Seu tamanho reduzido provavelmente facilita a circulação do fungo na hemolinfa e conseqüentemente a disseminação no corpo do hospedeiro. Wang e St. Leger et al. (2007) observaram que o gene responsável pela expressão da adesina MAD 1 é capaz também de modular a produção de blastosporos na hemocele de insetos.

Após estabelecimento, inicia-se o processo de proliferação celular (Figura 2E), utilizando como nutrientes as fontes de carbono disponíveis para a produção em massa de hifas. Alguns fungos artropodopatogênicos são capazes de produzir endotoxinas, como a destruxina para *M. anisopliae* (ROBERTS; ST. LEGER, 2004) e a beauvericina para *B. bassiana* (HAMILL et al., 1969).

O processo de infecção finaliza com o esgotamento das reservas nutricionais do hospedeiro, no qual o agente fúngico mata o artrópode por causar um desequilíbrio hídrico em associação à ação toxêmica e à compressão interna de órgãos (ARRUDA, 2005).

Em condições ambientais favoráveis, o fungo é capaz de se exteriorizar sobre a cutícula. A fase conidiogênica no cadáver do hospedeiro (Figura 2F) culmina com uma produção em massa de conídios (Figura 2G) que serão dispersados na natureza através do vento ou mesmo por outro artrópode (Figura 2H). Neste momento, poderá haver um novo ciclo de infecção, caso o fungo novamente interaja com outros hospedeiros em potencial.

### 3.9 Fatores Relacionados a Virulência de Fungos Artropodopatogênicos

Fungos artropodopatogênicos apresentam particularidade em função do mecanismo de colonização dos hospedeiros. Para a garantia de penetração ativa pela cutícula, inicialmente os conídios precisam aderir à superfície cuticular do artrópode (ALVES, 1998).

A hidrofobicidade conidial comum aos conídios de *B. bassiana* s.l. e *M. anisopliae* s.l. dificultam a interação, visto que faz-se necessário então a formulação de suspensões com a adição de adjuvantes como óleo mineral e espalhantes adesivos. Atrelado a isto, trabalhos demonstram que a presença destes constituintes é capaz de elevar o potencial patogênico de isolados de *Lecanicillium lecanii*, *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana* s.l. para *R. microplus* (ANGELO et al., 2010; CAMARGO et al., 2012). Um estudo realizado com passagens sucessivas *in vitro* de isolados de *B. bassiana* sobre *Nilaparvata lugens* observou correlação positiva entre o número de passagens sobre o hospedeiro e a hidrofobicidade dos conídios (SONG; FENG, 2011).

Além disto, durante o desenvolvimento fúngico, toxinas podem ser produzidas por artropodopatógenos e dependendo da espécie em estudo, apresentam importante papel na morte do inseto. Tem ação citotóxica e age na hemocele do hospedeiro (CLARKSON & CHARNLEY, 1996). As toxinas mais conhecidas e estudadas são as destruxinas para *M. anisopliae* (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010) e as beauvericinas (QUESADA-MORAGA; VEY, 2004) para *B. bassiana*. Para *R. microplus*, Gôlo et al. (2011), ao inocularem destruxina A em fêmeas ingurgitadas, não observaram alterações significativas dos parâmetros biológicos. Assim, demonstrou-se que a toxina não é capaz de causar efeitos deletérios em todas as classes

de artrópodes; já para beauvericinas, até o presente momento, não há relatos de sua ação para carrapatos.

Durante a penetração, a secreção de enzimas extracelulares como quitinases, proteases e lipases permitem a internalização das hifas. Quitinases são enzimas hidrolíticas que clivam especificamente ligações glicosídicas. Participam ativamente do metabolismo fúngico, seja na modificação da quitina constituinte da parede celular, na liberação dos conídios, na diferenciação e na morfogênese de hifas (GOODAY et al. 1992). Poucos são os conhecimentos atuais sobre a real importância desta classe enzimática para carrapatos. Um trabalho realizado por Silva et al. (2005) demonstrou a presença de uma endo e exoquitinase (CHIT 30) e sua expressiva efetividade durante o processo de penetração sobre *R. microplus*. Para insetos, cogita-se que atuem de forma sinérgica com as proteases durante a internalização (ST. LEGER et al., 1986).

### 3.9.1 Proteases

A primeira barreira física do inseto a ser vencida pelo fungo é a cutícula. Neste contexto, as proteases desempenham importante papel durante o processo de colonização em hospedeiros artrópodes, atuando como um importante fator de virulência e auxiliando principalmente no processo de digestão dos componentes cuticulares (ST. LEGER et al., 1987a).

Proteases são enzimas hidrolíticas que possuem a capacidade de clivar cadeias proteicas em pequenos peptídeos. Representam o tipo enzimático mais estudado na enzimologia, devido à vasta distribuição e por apresentarem diversas funções nos mais distintos tipos de organismos. Inicialmente são classificadas pelo local de clivagem na cadeia polipeptídica em: endopeptidases (clivagem nas porções internas da estrutura quaternária da proteína) e exopeptidases (clivagem na porção terminal das proteínas) (TREMACOLDI, 2009).

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), subdivide as proteases em quatro grandes classes em relação ao sítio ativo de cada enzima: serino proteases, cisteino proteases, aspártico proteases e metaloproteases. Serino proteases são hidrolases caracterizadas por apresentar uma tríade catalítica no sítio ativo enzimático composto de serina, aspartato e histidina. Apresenta como principais exemplos as proteases pertencentes às famílias das quimiotripsinas, tripsinas, elastases, subtilisinas e calicreínas. Cisteino proteases são enzimas hidrolíticas que se ligam covalentemente ao substrato através da interação de um resíduo de cisteína presente no sítio ativo da enzima. Em concomitância, apresentam também um resíduo adjacente de histidina e aspartato. Dentro deste grupo, têm-se como principais exemplos às famílias das papaínas, catepsinas e calpaínas. Aspártico (=aspartato ou aspartil) proteases são hidrolases que possuem dois resíduos de aspartato no centro do sítio ativo. São consideradas proteases ácidas, uma vez que seu pH ideal de atuação encontra-se em torno de 2 a 3. Tem como principais exemplos a pepsina e a renina. Metaloproteases são enzimas hidrolíticas que apresentam como característica principal a presença de um átomo de metal, comumente o elemento químico zinco, localizado no centro ativo enzimático. O metal apresenta grande importância para o processo catalítico, visto que fornece uma forte atração eletrofílica que auxilia no processo da ligação enzimática através da ativação do sítio ativo. A carboxipeptidase e a termolisina são os principais exemplos da classe. (NEURATH, 1994; DUNN, 1994).

Estudos como os de Wang et al. (2002) e Shah et al. (2005) demonstram a importância de enzimas proteolíticas para o sucesso da infecção fúngica. Em artrópodes, uma classe importante de serino proteases do tipo subtilisina denominada de Pr1 está relacionada com processo de penetração ativa pelo tegumento. St. Leger et al. (1986), a partir de um estudo que avaliou a hidrólise da cutícula em condições controladas, observaram que a presença de Pr1 foi capaz de remover até 30% das proteínas cuticulares presentes. Para *M. anisopliae*, Bagga et al. (2004) observaram a partir de

zimogramas, a presença de 14 isoformas de proteases após infecção de *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). Destas, a maior parte representada por 11 isoformas, foram caracterizadas como serino proteases do tipo subtilisina, sendo denominadas de Pr1 A a Pr1 K. St. Leger et al. (1996a) reforçaram a presença de Pr1 durante o processo de penetração da cutícula de insetos, bem como apontaram a Pr1 A como a mais importante protease para o processo de degradação cuticular. Em *B. bassiana*, Bidochka e Khachatourians (1990) identificaram e descreveram a importância de Pr1 para infecção de artrópodes. Em insetos, a partir de um estudo com *M. anisopliae*, a identificação de Pr1 foi associada como fator de virulência para o gafanhoto *Melonoplus sanguinipes* (Orthoptera: Acrididae), visto que um mutante natural do fungo apresentou redução da mortalidade deste gafanhoto em condições experimentais (BIDOCHKA; KHACHATOURIANS, 1994).

Em concomitância, os mesmos gêneros fúngicos são capazes também de secretar outras serino proteases do tipo tripsina denominadas de Pr2 (ST. LEGER et al. 1996a; GILLESPIE et al. 1998). St. Leger et al. (1996a) reportam que duas isoformas de Pr2 encontradas a partir do crescimento fúngico em meio mínimo podem estar associadas à formação do apressório e que por isto, sempre encontram-se disponíveis nos primeiros estágios da colonização dos artrópodes. Gillespie et al. (1998) demonstraram para *M. anisopliae* que esta hidrolase seria uma das primeiras enzimas a surgir durante o crescimento *in vitro*, e que supostamente teria função de produzir peptídeos indutores para Pr1.

Para *B. bassiana*, as atividades de Pr1 e Pr2 são reforçadas na presença da cutícula de artrópodes no meio de crescimento (GUPTA et al., 1992). Deste modo, observa-se a importância destas enzimas no processo de penetração ativa. Numa abordagem mais específica, Campos et al. (2005) demonstraram que a presença da cutícula de *R. microplus* junto ao meio mínimo foi capaz de induzir a produção de Pr1, enquanto que a presença do aminoácido alanina foi capaz de inibir tal processo.

Um trabalho que avaliou mutantes espontâneos de *M. anisopliae*, deficientes para os genes *pr1a* e *pr1b*, demonstrou que mesmo sob estas condições, o fungo possuía potencial de infectar *Galleria mellonella*, embora tenha reduzido a patogenicidade para *Tenebrio molitor* (WANG et al., 2002). Em contrapartida, para carrapatos, a relação entre as proteases e a virulência não estão completamente elucidadas. Neste contexto, Gôlo (2014) observou, após reisolamento do isolado CG 148 de *M. anisopliae* s.l. em *R. microplus*, aumento da atividade enzimática e da expressão gênica de Pr1, embora não tenha sido observado aumento significativo da virulência do fungo em questão para larvas.

Atrelados a isto, estudos como o de Gupta et al. (1994) reportam existir uma correlação entre a produção de quitinases e proteases com a virulência de *B. bassiana* para *G. mellonella*. Fang et al. (2009) ao avaliarem a expressão de uma proteína fusionada (gene de protease e quitinase) em isolados mutantes naturais de *B. bassiana* observaram que a penetração ativa pela cutícula ocorreu de forma mais rápida em isolados selvagens que tinham os genes superexpressados para a proteína em questão. Com isto e outros tantos estudos, observa-se que as proteases, apesar da grande importância, não são as únicas responsáveis pelo sucesso da infecção fúngica.

### 3.9.2 Lipases

Lipases são enzimas classificadas como serino hidrolases capazes de fragmentar ácidos graxos polimerizados, gerando como produto álcoois e ácidos graxos de cadeia curta (BEYSDA-SILVA, 2009). Joseph et al. (2008) relataram que o sítio ativo destas enzimas é mantido protegido por um oligopeptídeo helicóide, sendo este composto por uma tríade de aminoácidos (ácido aspártico ou ácido glutâmico, histidina e serina). O fenômeno de exposição do sítio ativo

denominado de ativação interfacial é observado após a interação das enzimas com superfícies hidrofóbicas, permitindo assim contato direto com o substrato.

O primeiro relato de um lipase extracelular de *B. bassiana* foi realizado por Hegedus e Khachatourians (1988) em óleo de oliva, demonstrando a importância das hidrolases na degradação de substratos lipídicos. Um estudo que avaliou a atividade proteolítica, lipolítica e virulência de 17 isolados de *B. bassiana* para o gafanhoto *Melanoplus sanguinipes*, observou pequena correlação da atividade lipásica com a redução do Tempo Letal 50 (TL50) (FENG, 1988).

Todavia, através de estudos recentes, sabe-se que as lipases secretadas por *M. anisopliae* exercem um papel importante para a manutenção do controle biológico. Beys-da-Silva et al. (2009) purificaram pela primeira vez uma lipase presente na superfície do esporo de *M. anisopliae* capaz de hidrolisar diferentes substratos lipídicos como a trioleína, colesterol esterato,  $\rho$ -nitrofenil palmitato e  $\rho$ -nitrofenil laurato. Identificada com peso molecular de aproximadamente 56 kDa e pI de 5,6, o estudo demarcou a capacidade de lipases oriundas de fungos artropodopatogênicos em digerir múltiplos substratos. No mesmo contexto, para a consolidação da importância das lipases durante o processo de penetração, Beys-da-Silva et al. (2010 a) realizaram um tratamento prévio dos esporos de *M. anisopliae* com um inibidor de atividade lipásica (Ebelactona B). Neste estudo, foi observado pelos autores a completa inibição da atividade lipolítica e, conseqüentemente, inibição total da virulência do fungo para *R. microplus*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Localização de Realização do Experimento

Os experimentos foram realizados de Março/2013 a Outubro/2014 nas instalações dos:

- *Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes* (LCM) localizado na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas Wilhemn Otto Neitz (EPPWON) do Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Instituto de Veterinária (IV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica - RJ, Brasil;
- *Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos* do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) localizado na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro – RJ, Brasil;
- *Laboratório de Proteínas Tóxicas* (Laprotox) do Centro de Biotecnologia (CBiot) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre – RS, Brasil.

### 4.2 Obtenção e Seleção dos Isolados de *Beauveria bassiana* s.l.

Na realização do experimento foram utilizados dez isolados brasileiros (Bb 02, Esalq 986, CG 154, CG 206, CG 234, CG 471, CG 478, CG 479, CG 481, CG 500) de *B. bassiana* s.l. (Tabela 2) obtidos de diferentes regiões geográficas do Brasil. O isolado Bb 02 era procedente da Micoteca do LCM – UFRRJ, sendo obtido de carrapatos naturalmente infectados. Os demais foram gentilmente cedidos à UFRRJ (Esalq 986 advindo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) e isolados CG (Coleção de Fungos de Invertebrados - Cenargen) oriundos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília - DF, Brasil).

**Tabela 1** - Isolados de *Beauveria bassiana* s.l., hospedeiros de isolamento, regiões geográficas de origem e ano de isolamento.

Isolado	Hospedeiro do isolamento	Origem Geográfica	Ano
<b>Bb 02</b>	Acari: Ixodidae	Paracambi, RJ	1999
<b>Esalq 986</b>	Acari: Ixodidae	Piracicaba, SP	1990
<b>CG 154</b>	Homoptera: Cercopidae	Jataí, GO	1983
<b>CG 206</b>	Hymenoptera: Vespidae	Costa do Arapapa, AM	1981
<b>CG 234</b>	Homoptera: Cicadellidae	Ponta Porã, MS	1983
<b>CG 471</b>	Coleoptera: Curculionidae	Ijuí, RS	1984
<b>CG 478</b>	Coleoptera: Curculionidae	Campinas, SP	1983
<b>CG 479</b>	Hymenoptera: Vespidae	Santana do Ipanema, AL	1985
<b>CG 481</b>	Coleoptera: Chrysomelidae	Ribeira do Pombal, BA	1985
<b>CG 500</b>	Coleoptera: Chrysomelidae	Goiânia, GO	1985

A escolha dos isolados foi baseada em um estudo prévio realizado por Fernandes et al. (2011) que demonstrou variação na virulência entre 60 isolados de *Beauveria* spp. para larvas de *R. microplus*. Em função disto, foram selecionados cinco isolados mais virulentos (CG 206, CG 471, CG 478, CG 481 e CG 500) e cinco menos virulentos (Esalq 986, Bb 02, CG 154, CG 234 e CG 479) para a realização das atividades.

### 4.3 Manutenção, Reisolamento e Formação dos Grupos Experimentais

Os isolados do experimento encontravam-se preservados sob óleo mineral na Micoteca do LCM desde ano de 2007 (seis anos conservados). Após seleção, os mesmos foram repicados em placas de Petri (90 x 15 mm – Prolab<sup>®</sup>) contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) (Merck<sup>®</sup>) e mantidos em câmara climatizada do tipo B.O.D. a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  de temperatura e umidade relativa (U.R.)  $\geq 80\%$  por 15 dias. Após crescimento, as placas foram armazenadas sob refrigeração a  $4^\circ\text{C}$  por um período de três meses até a realização dos experimentos (Grupo Micoteca).

Para o reisolamento fúngico, fêmeas totalmente ingurgitadas de *R. microplus* foram tratadas por imersão em formulação oleosa (5% de óleo mineral estéril - Vetec<sup>®</sup> acrescido em água destilada estéril e Tween 80 a 0,01%) dos respectivos isolados provenientes do Grupo Micoteca. Após tratamento, as fêmeas foram mantidas em B.O.D. sob as mesmas condições anteriores para exteriorização do fungo. Quinze dias após a imersão, as fêmeas colonizadas foram depositadas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA acrescido de 0,1 % de extrato de levedura (Vetec<sup>®</sup>) e 0,05% de Cloranfenicol (Sigma<sup>®</sup>) para crescimento fúngico (Grupo Reisolado). A confirmação do reisolamento foi realizada a partir da observação visual das características macroscópicas e microscópicas da colônia. Após confirmação, os isolados foram repicados em BDA e mantidos sob refrigeração sobre o mesmo período de tempo do grupo anterior.

### 4.4 Morfologia dos Isolados de *B. bassiana* s.l. Antes e Após Reisolamento

#### 4.4.1 Avaliação macromorfológica

Na avaliação das características macromorfológicas, foram utilizadas placas de Petri contendo meio BDA. O crescimento das colônias foi observado a partir da realização de ponto único de inóculo no centro da placa com o auxílio de alça de platina reta. Para comparações com as descrições feitas por Rehner et al. (2011) para *B. bassiana*, os isolados foram mantidos sob condições controladas de temperatura ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e umidade relativa ( $\geq 80\%$ ) em câmaras climatizadas do tipo B.O.D. durante dez dias. Após cultivo, foram avaliadas características como o diâmetro total, aparência, aspecto e coloração da massa conidial, presença de exsudato, além de aspecto e coloração do reverso da colônia tanto para Micoteca quanto para Reisolado. O diâmetro de cada colônia foi mensurado com auxílio de calíper digital (StarFer<sup>®</sup>) de resolução de 0,01 mm.

#### 4.4.2 Avaliação micromorfológica

A avaliação das características micromorfológicas foi realizada a partir da técnica de microcultivo entre lâmina e lamínula em meio BDA, com posterior acondicionamento em câmara úmida a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e U. R.  $\geq 80\%$  (RIDDELL, 1950). Dentro do princípio comparativo anterior, as lâminas foram mantidas por cinco e dez dias sob as mesmas condições controladas acima descritas. Após cultivo, as lâminas e lamínulas foram coradas com lactofenol acrescido de azul de algodão (NewProv<sup>®</sup>) e observadas em microscópio óptico no aumento de 400x. Foram observadas características como formato e medida dos conídios e células conidiogênicas como descritos por De Hoog (1972) e Rehner et al.(2011).

#### 4.4.3 Avaliação da produção de conídios

Os isolados foram crescidos em meio BDA acrescido de 0,1 % de extrato de levedura em placas de Petri a 25°C e U.R.  $\geq$  80% durante 20 dias. Para a contagem dos conídios, com o auxílio de uma alça de platina, foram realizados três cortes de 0,582 cm<sup>2</sup>, aleatoriamente, do meio de cultura contendo o fungo crescido sob a superfície. Na sequência, os cortes foram ressuspensos em tubos contendo um mL de água destilada estéril e Tween 80 a 0,01%, sendo agitados vigorosamente em aparelho do tipo vortex por 30 segundos. A quantificação foi realizada a partir de 10  $\mu$ L de suspensão através da observação direta em microscópio óptico com auxílio de câmara de Neubauer.

Para uma classificação qualitativa do número de conídios produzidos neste experimento, os valores obtidos foram divididos em três classes distintas baseado em estudo prévio realizado por Fernandes (2007): baixo potencial (inferior a 5000 x 10<sup>4</sup> conídios), médio potencial (5000 – 10000 x 10<sup>4</sup> conídios) e alto potencial (acima de 10000 x 10<sup>4</sup> conídios). Os experimentos foram repetidos três vezes para a obtenção de média e erro padrão das contagens. Os dados obtidos foram projetados em gráfico com auxílio do programa GraphPad Prism<sup>®</sup> 5.0.

#### **4.5 Infecção *In Vitro* de Fêmeas Ingurgitadas de *R. microplus***

##### **4.5.1 Preparo das suspensões fúngicas e viabilidade dos conídios**

A elaboração das suspensões foi realizada a partir das placas com os respectivos isolados (Micoteca e Reisolado) que estavam preservadas sob refrigeração. Os conídios de cada isolado fúngico foram raspados da superfície do meio de cultura e suspensos em água destilada estéril acrescido de Tween 80 0,01% (Sigma<sup>®</sup>).

As suspensões iniciais foram elaboradas na concentração de 10<sup>8</sup> conídios/mL e foram quantificadas com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico segundo Alves (1998). Na sequência, foi realizada uma diluição decimal seriada para a obtenção das suspensões na concentração de 10<sup>7</sup> conídios/mL.

Uma alíquota da suspensão contendo 10<sup>7</sup> conídios/mL de cada isolado de *B. bassiana* s.l. foi depositada em placa de Petri contendo meio BDA, sendo incubadas sob temperatura de 25  $\pm$  1°C e umidade relativa  $\geq$  80% durante 24 horas. A determinação do percentual de germinação dos conídios foi realizado segundo Alves (1998).

##### **4.5.2 Delineamento experimental**

Para o ensaio biológico, foram formados 41 grupos: um grupo controle, que recebeu tratamento com água destilada estéril e Tween 80 0,01% e outros 40 grupos tratados com suspensões aquosas nas concentrações de 10<sup>8</sup> e 10<sup>7</sup> conídios/mL de cada isolado (20 para os 10 isolados do Grupo Micoteca e 20 para o Grupo Reisolado). Os ensaios foram repetidos duas vezes.

##### **4.5.3 Ensaio biológico com fêmeas ingurgitadas**

Para a obtenção das fêmeas ingurgitadas, três bezerros foram artificialmente infestados por três dias consecutivos com larvas provenientes de 300 mg de ovos previamente separados (Comitê de Ética - UFRRJ – n° 23083.009241/2011-16 - aprovação 154/2011). Após 21 dias da infestação, as fêmeas totalmente ingurgitadas que se desprendiam dos animais foram coletadas do chão das baias. No laboratório, as mesmas foram lavadas em água corrente e higienizadas com solução de hipoclorito de sódio a 1% por três minutos para a assepsia externa da cutícula. Na sequência, foram pesadas e distribuídas de forma homogênea em 41 grupos

contendo oito fêmeas cada. Cada fêmea foi individualmente identificada, pesada e numerada para a realização do tratamento.

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

#### **4.5.4 Parâmetros biológicos**

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

Baseado nos resultados obtidos neste experimento e orientada por escala semelhante à elaborada por Fernandes (2007) para o percentual de mortalidade de larvas de *R. microplus*, a eficácia do tratamento *in vitro* foi classificada como baixa (0 - 25%), intermediária (26-50%) e alta (51 - 100%) em função dos percentuais de controle observados para os respectivos tratamentos

#### **4.5.5 Reisolamento fúngico**

As fêmeas ingurgitadas dos grupos tratados e controle foram incubadas em câmara úmida em B.O.D. a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $\text{U. R.} \geq 80\%$  para facilitar o desenvolvimento do fungo e posterior confirmação de suas características segundo Rehner et al. (2011).

#### **4.5.6 Análise estatística**

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

### **4.6 Avaliação da Atividade Enzimática**

#### **4.6.1 Análise semi-quantitativa em meio mínimo sólido**

O ensaio para a atividade semi-quantitativa das proteases de *B. bassiana* s.l. foi realizado segundo a metodologia adaptada de Tiago e Silva (2007). O meio mínimo sólido utilizado no experimento seguiu a descrição de Pontecorvo et al. (1953), sem adição de glicose e acrescido de gelatina 1%. A solução de gelatina a 1% (pH 6,0) foi preparada a partir de solução de NaOH (0,05 M) e esterilizada por calor úmido a  $121^\circ\text{C}$  por 20 minutos. O substrato não cuticular foi

adicionado ao meio mínimo sólido previamente esterilizado e depositado em placas de Petri (150 x 15 mm) para solidificação.

Com o auxílio de uma câmara de Neubauer, foram elaboradas suspensões de conídios na concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/mL de cada isolado de ambos os grupos (Micoteca e Reisolado). Dez microlitros de cada suspensão foram inoculados em discos de papel filtro estéril de seis mm. Na sequência, os discos foram depositados sob o meio de cultura sólido, permanecendo posteriormente sob incubação em câmara climatizada do tipo B.O.D. por 10 dias a  $25 \pm 1$  °C e  $\geq 80\%$  de umidade relativa. Após incubação, uma solução de ácido tricloroacético 10% (TCA) foi depositada sob a superfície das placas, até a cobertura total do meio de cultura, para a revelação dos halos de degradação formados pela ação enzimática. A atividade proteolítica semi-quantitativa foi mensurada pela determinação do Índice de Relação Enzimática (IRE), segundo a fórmula abaixo:

$$IRE = \frac{D}{d}$$

Sendo: D = diâmetro total (colônia + halo) e d = diâmetro da colônia.

O experimento foi delineado inteiramente ao acaso, contando com 20 tratamentos (dez isolados do Grupo Micoteca e dez isolados do Grupo Reisolado). No total, foram realizadas 3 repetições com pelo menos 12 réplicas cada. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey com nível de significância de 5% no software BioEstat 5.3.

#### **4.6.2 Cultivo em meio mínimo líquido**

Para os ensaios enzimáticos quantitativos, os isolados fúngicos foram crescidos em meio mínimo líquido (0,6% de NaNO<sub>3</sub>; 0,05% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,05% de MgSO<sub>4</sub>). Um mL de cada suspensão fúngica (Micoteca e Reisolado) na concentração de 10<sup>6</sup> conídios/mL foi introduzido em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL de meio mínimo enriquecido com 1% de cutícula de fêmeas de *R. microplus* e sem a adição de estereato de colesterol (adaptado de BEYS-DA-SILVA et al., 2010). Todos os isolados (Micoteca e Reisolado) foram crescidos em triplicata e incubados em agitador orbital a 25°C e 150 rpm por 72 horas para a avaliação da atividade enzimática micelial.

Após crescimento, a extração das enzimas foi realizada a partir da adição de 250 µL de Triton X-100 a 20% (SILVA et al., 2005) e agitação manual durante um minuto. Na sequência, o micélio foi separado da fração líquida pelo papel de filtro Whatman n° 1 com auxílio de bomba de vácuo. O líquido obtido foi filtrado em colunas do tipo Millex 0,22 µm (Millipore®), dividido em alíquotas que foram acondicionadas em microtubos do tipo eppendorf e posteriormente armazenados a -80°C até a realização dos ensaios enzimáticos.

#### **4.6.3 Determinação da concentração de proteínas totais**

A determinação da quantidade de proteína total foi realizada segundo o método de Bradford (1976), sendo a curva padrão elaborada a partir de diluições seriadas (de 0,5 a 5 µg/mL) de albumina sérica bovina (Sigma®) (concentração inicial = 25 µg/mL) como padrão. A absorbância das amostras e da curva padrão foram mensuradas em triplicata com auxílio de espectrofotômetro (S30 – Boeco Germany®) a 595 nm.

#### **4.6.4 Determinação da atividade proteolítica total**

A atividade proteolítica total foi determinada pela hidrólise da azocaseína (Sigma<sup>®</sup>) segundo Sangorrín et al. (2001). Em microtubos de 1,5 mL de volume, 100 µL de amostra, 100 µL de solução de azocaseína a 2% e 200 µL de tampão fosfato de sódio (Merck<sup>®</sup>) 0,05 M pH 7,9 foram incubados em banho-maria a 50°C por 15 minutos. Para a realização do branco, foram utilizados somente o tampão fosfato de sódio e o substrato de azo-caseína. Após incubação, a reação foi paralisada com a adição de 800 µL de ácido tricloroacético (Merck<sup>®</sup>) a 20%. As amostras foram centrifugadas a 4000 g por 5 minutos e a absorbância determinada por leitura em espectrofotômetro a 400 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos três vezes para ambos os grupos, sendo o cálculo da atividade enzimática determinado segundo a metodologia descrita por Sangorrín et al. (2001).

#### **4.6.5 Determinação da atividade proteolítica de Pr1**

A atividade enzimática da serino protease tipo subtilisina (Pr1) foi determinada pela hidrólise de 5 µL do substrato cromogênico N-suc-ala-ala-pro-phe-ρNA (Sigma<sup>®</sup>) 1 mM, segundo Santi et al. (2010). Cinco microlitros de cada amostra foram adicionados junto ao substrato em 90 µL de tampão Tris/HCl 0,1 M pH 8,0 (Sigma<sup>®</sup>). Os ensaios foram incubados a 37 °C por 30 minutos e a absorbância mensurada em espectrofotômetro SpectraMax (Molecular Devices<sup>®</sup>) equipado com termostato e agitador a 405 nm.

Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos três vezes para ambos os grupos. A atividade enzimática foi calculada a partir da curva padrão de ρ-nitroanilina e expressa em por minuto de reação por micrograma de proteína (U específica) (SANTI et al., 2010).

#### **4.6.6 Determinação da atividade proteolítica de Pr2**

A atividade enzimática da serino protease do tipo tripsina (Pr2) foi determinada pela hidrólise de 5 µL de Bz-phe-val-arg-ρNA (Sigma<sup>®</sup>) 1 mM, segundo Santi et al. (2010). Tanto a realização do ensaio enzimático quanto o cálculo da atividade enzimática seguiram a metodologia descrita acima para Pr1.

#### **4.6.7 Determinação da atividade lipolítica**

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

As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro Spectramax<sup>®</sup> a 410 nm no tempo zero (T0), que marca o tempo imediato após a aplicação da emulsão sobre a amostra, e 20 minutos após incubação das mesmas a 37°C (T20). A atividade enzimática da lipase foi determinada pela subtração dos valores de absorbância de T20 – T0 e os valores foram calculados em função de uma curva de ρ-nitrofenol previamente elaborada.

A definição de uma unidade específica de lipase (U específica) foi determinada como a quantidade necessária de enzima para liberar 1 (um) pmol de ρ-nitrofenol por minuto por micrograma de proteína nas condições supracitadas. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos três vezes para ambos os grupos, tendo o branco sido descontado do valor das absorbâncias de cada amostra.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação Morfológica

#### 5.1.1 Macromorfologia

Todos os isolados avaliados sob as diferentes condições do estudo apresentaram características condizentes às reportadas por De Hoog (1972), Fernandes (2007) e Rehner et al. (2011) em relação à macromorfologia de *Beauveria bassiana* s.l. (Figura 3). O diâmetro das colônias do grupo Micoteca variou de 15,47 mm (CG 154) a 32,96 mm (CG 234), apresentando valor médio de  $24,35 \pm 4,92$  mm. Já para o grupo Reisolado, a variação observada esteve entre 17,40 mm (CG 478) e 26,47 mm (CG 500), com valor médio de  $22,03 \pm 3,50$  mm. Dois dos dez isolados estudados apresentaram aumento do diâmetro das colônias (CG 154 e CG 471) após a passagem e reisolamento em *R. microplus* (Tabela 2).

O aspecto geral apresentado das colônias dos grupos Micoteca e Reisolado esteve entre flocoso, lanoso e aveludado, sendo observado variações após o reisolamento de lanoso para aveludado (Bb 02 e CG 206) e aveludado para lanoso/flocoso (CG 234, CG 481 e CG 500).

A forma do crescimento variou entre liso e rugoso, sendo observado variações de rugoso a liso (Bb 02 e CG 478) e liso a rugoso (Esalq 986 e CG 500). Todas as colônias apresentaram coloração esbranquiçada, com pequenas regiões variando em tonalidade para branco-amareladas. A presença de exsudato hialino observada somente no isolado CG 471 foi mantida em ambas as situações (Figura 3 - 1F e 2F). No mesmo contexto, a coloração do reverso variou de branco a amarelo escuro, sendo CG 234 o único que apresentou reverso incolor antes e após reisolamento (Tabela 2).

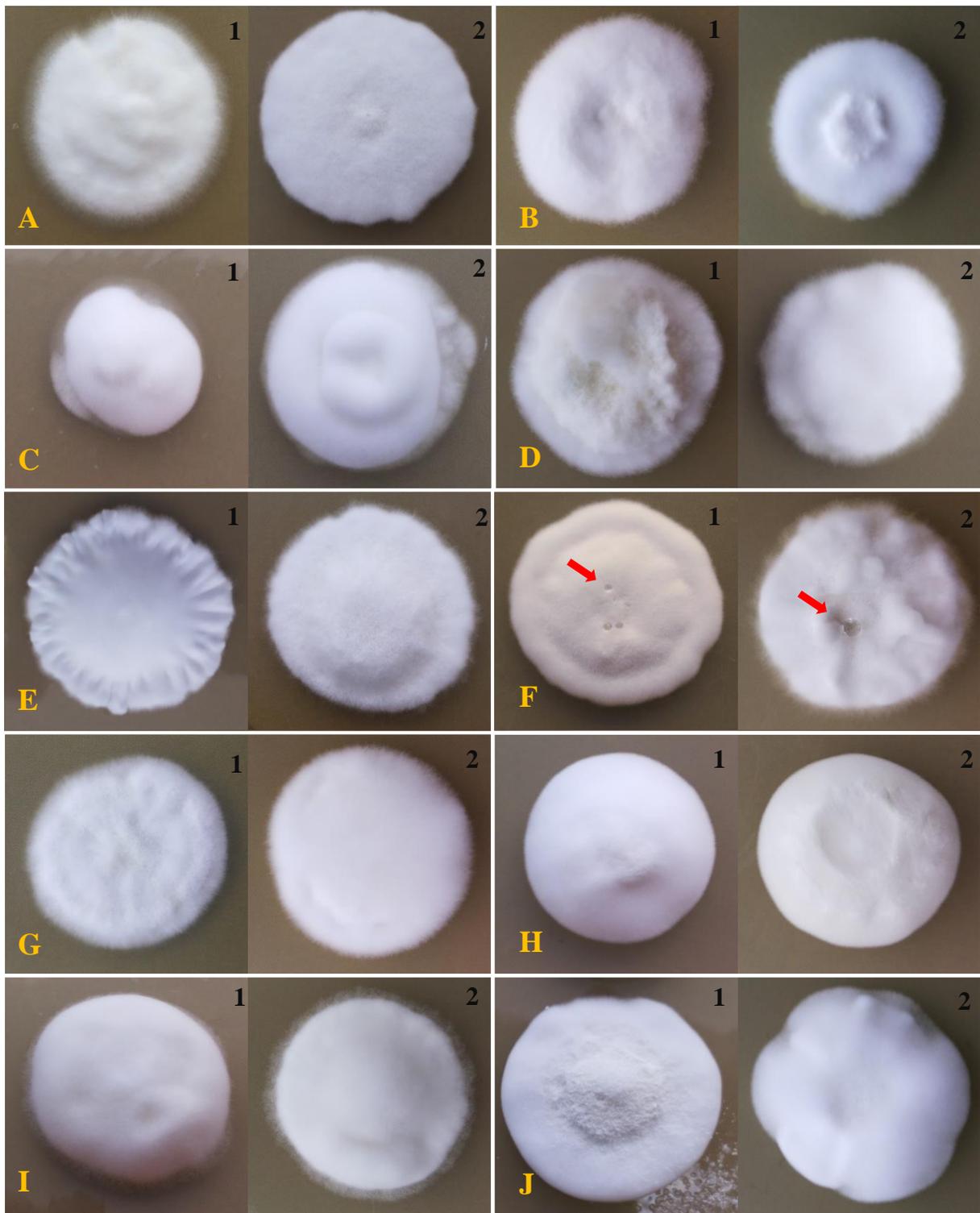
#### 5.1.2 Micromorfologia

Assim como na macromorfologia, todos os isolados avaliados no estudo apresentaram características condizentes às reportadas por De Hoog (1972), Fernandes (2007) e Rehner et al. (2011) (Figura 4), apresentando crescimento satisfatório no microcultivo em lâmina.

Ambos os grupos (Micoteca e Reisolado) apresentaram características semelhantes, no qual foi observado, em dez dias de crescimento, a presença de hifas septadas e com coloração cristalina (Figura 4 C).

As células conidiogênicas encontravam-se aglomeradas, formando densos cachos na superfície apical das fiálides (Figura 4 A). Os conídios apresentaram-se de formato variando do globoso ao subgloboso (Figura 4 B), com tamanho médio de aproximadamente 2,5  $\mu$ m de diâmetro, embora para os dois grupos o comprimento e a largura tenham variado entre 1 – 3,5  $\mu$ m (Tabela 3).

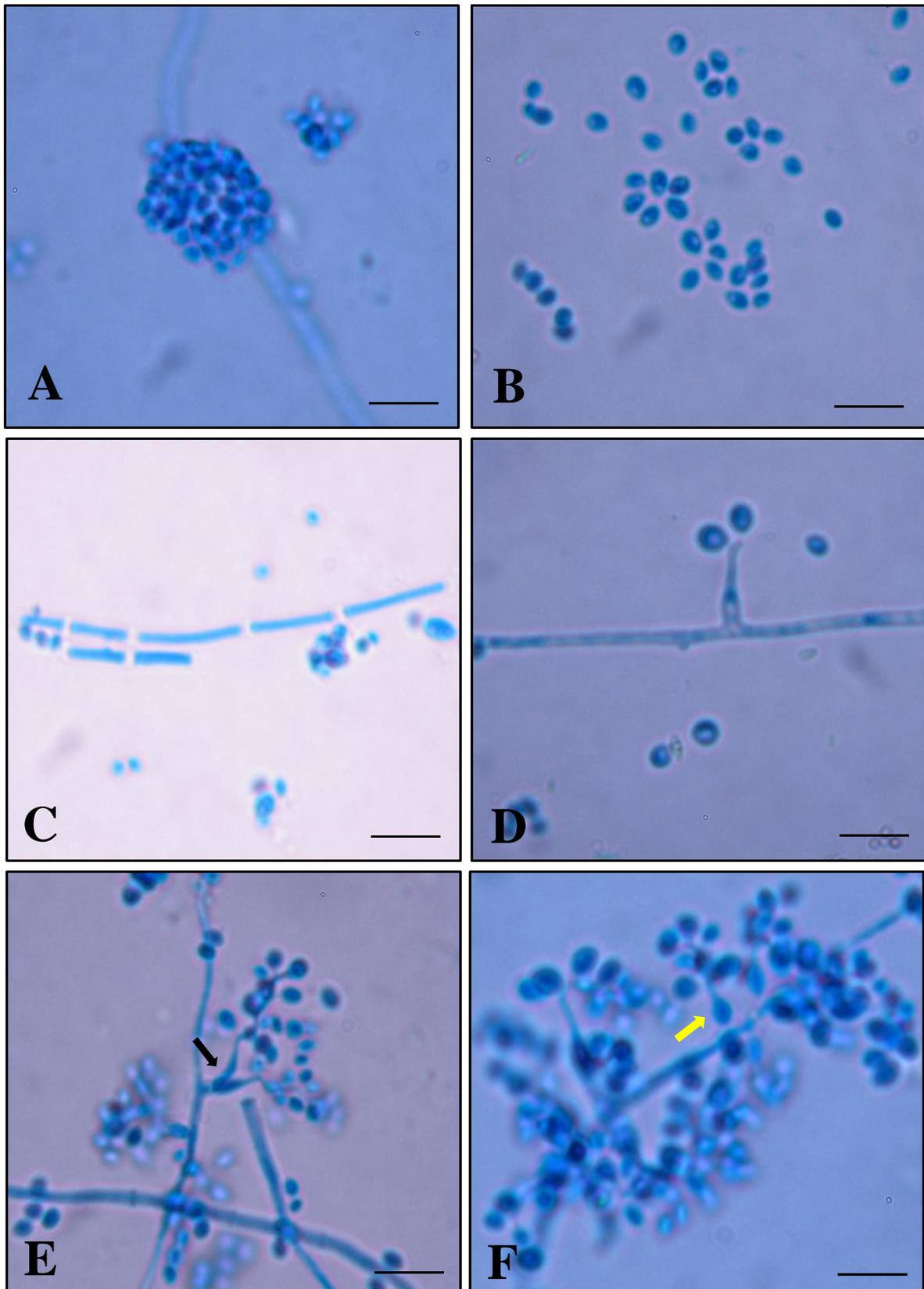
O conidióforo apresentava a parte basal levemente dilatada (Figura 4 D) que servia de sustentação para o desenvolvimento das fiálides e crescimento dos conídios (Figura 4 F). Em alguns isolados, como Bb 02 e CG 206, foi possível a observação de células laterais a partir dos conidióforos (Figura 4 E).



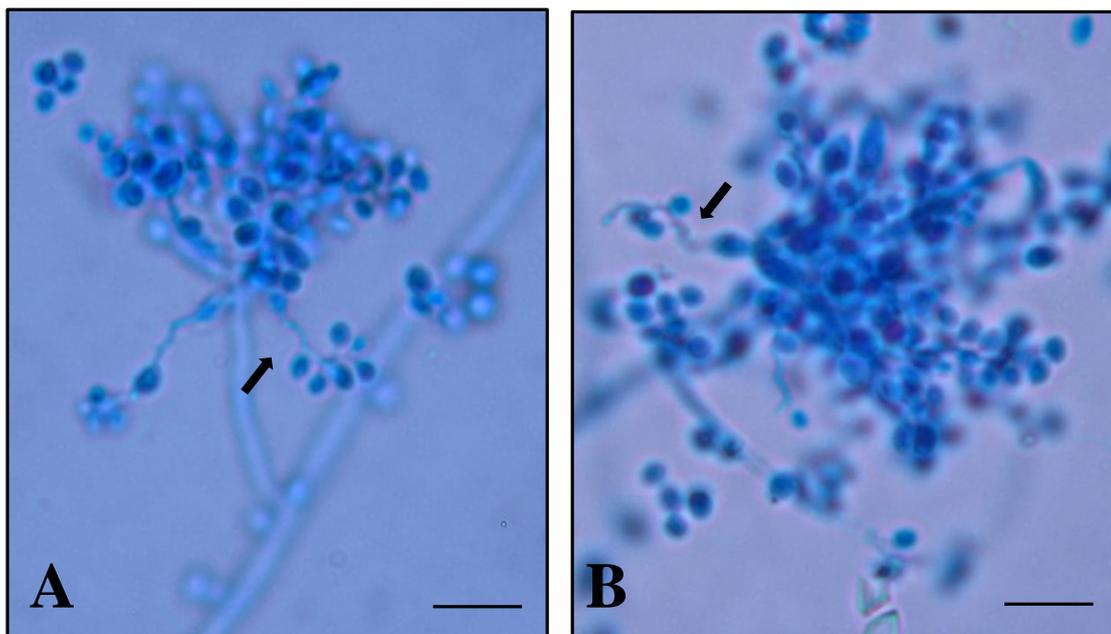
**Figura 3** - Colônias dos diferentes isolados de *Beauveria bassiana* s.l. dos grupos Micoteca (1) e Reisolado em *Rhipicephalus microplus* (2) (10 dias). **Bb 02** (A); **Esalq 986** (B); **CG 154** (C); **CG 206** (D); **CG 234** (E); **CG 471** (F); **CG 478** (G); **CG 479** (H); **CG 481** (I) e **CG 500** (J). Notar exsudação hialina do isolado CG 471 em ambas as condições de estudo (seta vermelha).

**Tabela 2** - Características macromorfológicas dos diferentes isolados de *Beauveria bassiana* s.l. dos grupos Micoteca (M) e Reisolado em *Rhizoglyphus microplus* (R) crescidos a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e U. R.  $\geq 80\%$  em BDA (10 dias).

Isolado	Condição	Diâmetro (mm)	Aparência	Aspecto	Coloração	Presença de Exsudato	Reverso
<b>Bb 02</b>	M	26,92	lanosa	rugosa	branca	-	amarelo claro
	R	23,50	aveludada e centro pulverulento	lisa	branca	-	amarelo claro
<b>Esalq 986</b>	M	20,46	lanosa	lisa	branca	-	amarelo claro
	R	17,46	lanosa	rugosa	branca	-	amarelo claro
<b>CG 154</b>	M	15,47	aveludada	rugosa	branca	-	amarelo escuro
	R	21,67	aveludada	rugosa	branca	-	amarelo claro
<b>CG 206</b>	M	21,53	lanosa	rugosa	branca	-	amarelo médio
	R	17,52	aveludada e centro lanoso	rugosa	branca	-	amarelo claro
<b>CG 234</b>	M	32,96	aveludada e centro flocoso	centro liso e borda rugosa	branca	-	incolor
	R	22,97	lanosa	lisa	branca	-	incolor
<b>CG 471</b>	M	22,94	aveludada	rugosa	branca	presente	amarelo claro
	R	24,58	flocosa	rugosa	branca	presente	amarelo claro
<b>CG 478</b>	M	23,25	lanosa	rugosa	branca	-	amarelo claro
	R	17,40	lanosa	lisa	branca	-	amarelo médio
<b>CG 479</b>	M	23,87	aveludada	lisa	branca	-	amarelo claro
	R	22,43	aveludada	lisa	branca	-	branco
<b>CG 481</b>	M	29,54	aveludada	lisa	branca	-	amarelo claro
	R	26,32	lanosa	lisa	branca	-	amarelo claro
<b>CG 500</b>	M	26,58	aveludada e centro pulverulento	lisa	branca	-	amarelo claro
	R	26,47	lanosa	rugosa	branca	-	amarelo claro



**Figura 4** - Isolados de *Beauveria bassiana* s.l. corados com azul de algodão sob microscopia óptica (aumento de 1000X). Barras = 10 µm. **A** – Presença de densos cachos de células conidiogênicas ao longo do seguimento hifal (CG 471); **B** – Conídios desprendidos de formato variado (globoso, subgloboso e elipsoide) (CG 234); **C** – Presença de hifas septadas e de coloração hialina (CG 500); **D** – Formação do conidióforo a partir da hifa principal (Bb 02); **E** – Presença de células laterais surgindo do conidióforo (CG 206 - seta preta); **F** – Conidióforo em formação com presença de conídios dispostos aos pares (CG 206 -seta amarela).



**Figura 5** – Isolado de *Beauveria bassiana* s.l. (Bb 02) Micoteca (A) e Reisolado em *Rhipicephalus microplus* (B). Barras = 10  $\mu$ m. Notar a manutenção das características micromorfológicas através da presença de conidióforo, fíalides e conídios de formato arredondado dispostos aos pares (seta).

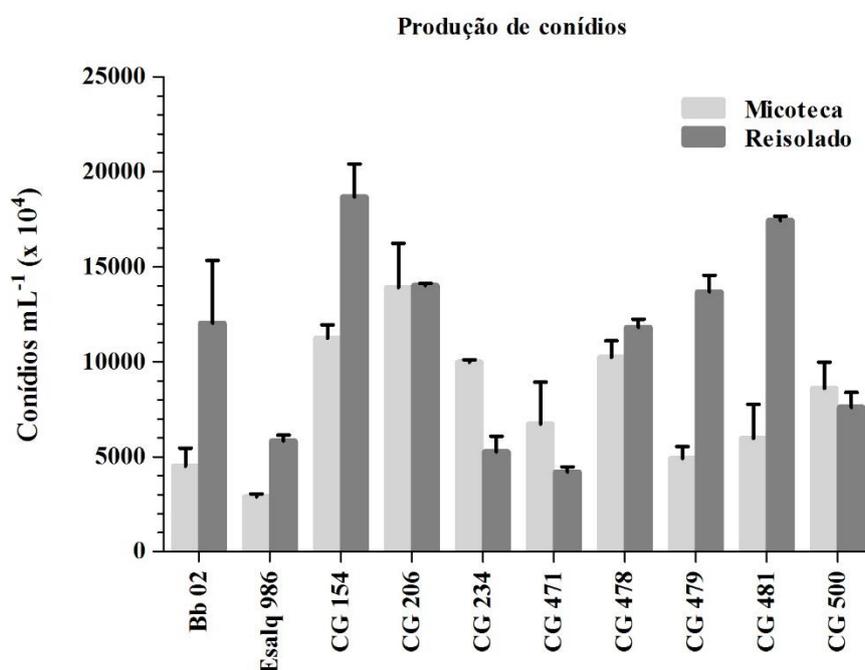
**Tabela 3** - Média e desvio padrão das medidas ( $\mu$ m) de comprimento (C) e largura (L) de conídios dos isolados de *Beauveria bassiana* s.l. dos grupos Micoteca e Reisolado em *Rhipicephalus microplus* crescido a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e U. R.  $\geq 80\%$  em BDA (10 dias).

Isolado	Medida de conídio			
	Micoteca		Reisolado	
	C	L	C	L
<b>Bb 02</b>	2,1 $\pm$ 0,5 $\mu$ m	2,1 $\pm$ 0,4 $\mu$ m	2,2 $\pm$ 0,6 $\mu$ m	2,3 $\pm$ 0,5 $\mu$ m
<b>Esalq 986</b>	1,7 $\pm$ 0,4 $\mu$ m	1,8 $\pm$ 0,5 $\mu$ m	2,2 $\pm$ 0,7 $\mu$ m	2,1 $\pm$ 0,4 $\mu$ m
<b>CG 154</b>	1,8 $\pm$ 0,4 $\mu$ m	1,5 $\pm$ 0,4 $\mu$ m	2,0 $\pm$ 0,5 $\mu$ m	2,1 $\pm$ 0,6 $\mu$ m
<b>CG 206</b>	1,8 $\pm$ 0,3 $\mu$ m	1,9 $\pm$ 0,6 $\mu$ m	1,9 $\pm$ 0,6 $\mu$ m	2,0 $\pm$ 0,5 $\mu$ m
<b>CG 234</b>	2,0 $\pm$ 0,4 $\mu$ m	2,3 $\pm$ 0,5 $\mu$ m	2,0 $\pm$ 0,6 $\mu$ m	2,1 $\pm$ 0,6 $\mu$ m
<b>CG 471</b>	1,9 $\pm$ 0,5 $\mu$ m	2,2 $\pm$ 0,4 $\mu$ m	2,2 $\pm$ 0,9 $\mu$ m	2,3 $\pm$ 0,6 $\mu$ m
<b>CG 478</b>	2,1 $\pm$ 0,5 $\mu$ m	2,2 $\pm$ 0,6 $\mu$ m	2,2 $\pm$ 0,6 $\mu$ m	2,3 $\pm$ 0,7 $\mu$ m
<b>CG 479</b>	2,3 $\pm$ 0,8 $\mu$ m	2,3 $\pm$ 0,5 $\mu$ m	2,4 $\pm$ 0,7 $\mu$ m	2,1 $\pm$ 0,4 $\mu$ m
<b>CG 481</b>	2,5 $\pm$ 0,3 $\mu$ m	2,4 $\pm$ 0,2 $\mu$ m	2,7 $\pm$ 0,5 $\mu$ m	2,8 $\pm$ 0,3 $\mu$ m
<b>CG 500</b>	2,3 $\pm$ 0,4 $\mu$ m	2,6 $\pm$ 0,5 $\mu$ m	2,1 $\pm$ 0,7 $\mu$ m	2,9 $\pm$ 0,6 $\mu$ m

### 5.1.3 Avaliação da produção de conídios

Os isolados apresentaram variabilidade na quantidade de conídios produzidos (Figura 6). No grupo Micoteca, os valores encontrados variaram entre  $2890 \times 10^4$  conídios (Esalq 986) e  $13910 \times 10^4$  conídios (CG 206): três isolados (Bb 02, Esalq 986 e CG 479) apresentaram baixo potencial, quatro isolados (CG 234, CG 471, CG 481 e CG 500) moderado e três isolados (CG 154, CG 206 e CG 478) alto potencial de produção de conídios em  $0,582 \text{ cm}^2$ . Para o grupo Reisolado, os valores variaram entre  $4210 \times 10^4$  conídios (CG 471) e  $18680 \times 10^4$  conídios (CG 154) (Figura 6 B), sendo que um isolado (CG 471) apresentou baixo, três isolados (Esalq 986, CG 234 e CG 500) moderado e seis isolados (Bb 02, CG 154, CG 206, CG 478, CG 479 e CG 481) apresentaram alto potencial de produção.

O processo de reisolamento foi capaz de aumentar a capacidade produtiva de seis isolados (Bb 02, Esalq 986, CG 154, CG 478, CG 479 e CG 481). Um isolado (CG 206) manteve as mesmas proporções tanto para Micoteca quanto para Reisolado e três (CG 234, CG 471 e CG 500) apresentaram redução da média quantificada sob as mesmas condições (Figura 6 C).



**Figura 6** - Média e erro padrão da produção de conídios pelos diferentes isolados de *Beauveria bassiana* s.l. dos grupos Micoteca e Reisolado em *Rhipicephalus microplus* cultivados em meio BDA acrescido de 0,1% de extrato de levedura a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e U. R.  $\geq 80\%$  durante 20 dias.

## 5.2 Avaliação da Virulência

### 5.2.1 Antes do reisolamento (grupo Micoteca)

Todos as suspensões utilizadas nos tratamento do grupos em ambas as condições (Micoteca e Reisolado) encontravam-se viáveis, com percentuais de germinação superiores a 98% depois de 24 horas de crescimento em BDA sob condições controladas. Na Tabela 4, os isolados do grupo Micoteca encontram-se organizados em função do percentual de controle obtido para fêmeas de *R. microplus*. Dos dez isolados avaliados, cinco isolados promoveram redução significativa de todos os parâmetros observados (CG 206, CG 234, CG 479, CG 481 e CG 500).

Em relação à massa total de ovos produzida pela oviposição de uma fêmea, isolados como CG 206 e CG 481 apresentaram os maiores percentuais de redução do peso total de ovos obtidos em comparação ao grupo controle (42% e 58%, respectivamente).

Já para o percentual de eclosão das larvas, isolados como CG 234 e CG 500 apresentaram os maiores índices de redução, diminuindo a eclodibilidade em até 20% e 23%.

Na análise do Índice de Produção de Ovos, os isolados CG 206 e CG 481 diminuíram esta capacidade em 42% e 57%. Resultados similares foram encontrados para os mesmos isolados no Índice Nutricional, com reduções significativas de 40% para CG 206 e 51% para CG 481 (Tabela 4).

Dos dez isolados avaliados no estudo, cinco isolados apresentaram eficiência baixa com percentuais variando de 15,80% (CG 154) a 24,65% (CG 471), dois isolados apresentaram eficiência intermediária (46,30% para CG 479 e 46,40% para CG 500) e três isolados apresentaram alta eficiência (CG 234, CG 206 e CG 481 com percentuais sequencialmente de 51,30%; 61,15% e 65,75%).

### **5.2.2 Após o reisolamento (grupo Reisolado)**

O tratamento com os fungos reisolados de *R. microplus*, quando comparados com os isolados do grupo Micoteca nas duas concentrações testadas ( $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL), não apresentou diferença significativa em oito dos dez isolados analisados (Esalq 986, CG 154, CG 206, CG 234, CG 471, CG 478, CG 479 e CG 481).

Porém, dois isolados apresentaram alterações significativas de todos parâmetros analisados. Um isolado (Bb 02) foi capaz de aumentar em 1,8 vezes, após reisolamento, os percentuais de controle observados na concentração de  $10^8$  conídios/mL. Neste caso, a eficiência *in vitro* de *B. bassiana* s.l. no controle de carrapatos passou de baixa para intermediária. Em contrapartida, um único isolado (CG 500) foi capaz de reduzir os mesmos em até 4,8 vezes, consequentemente diminuindo a eficiência de média para baixa.

Ao final do experimento, as fêmeas ingurgitadas tratadas com os respectivos isolados que apresentaram eficiência intermediária e alta demonstraram o crescimento de colônias fúngicas em sua superfície. Tais colônias foram identificadas como sendo os mesmos isolados utilizados nos ensaios biológicos, comprovando que os fungos foram capazes de penetrar, colonizar e causar alterações nos parâmetros biológicos das fêmeas. Os exemplares do grupo controle não apresentaram crescimento fúngico.

**Tabela 4** - Valor médio e desvio padrão do Peso Inicial da Fêmea (P. I. F.), Peso Total da Massa de Ovos (P. T. M. O.), Percentual de Eclosão (%), Índice de Produção de Ovos (I. P. O.), Índice Nutricional (I. N.) e Percentual de Controle (% Controle) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão em suspensão aquosa de  $10^8$  conídios/mL (Micoteca) dos diferentes isolados de *Beauveria bassiana* s.l.

<b>Grupo</b>	<b>P. I. F. (g)</b>	<b>P. T. M. O. (g)</b>	<b>P. E. (%)</b>	<b>I. P. O.</b>	<b>I. N.</b>	<b>% Controle</b>
<b>CTR</b>	0,2483 ± 0,0181 a	0,1448 ± 0,0164 a	98,50 ± 1,58 a	58,30 ± 4,76 a	71,88 ± 6,76 ac	-
<b>CG 154</b>	0,2481 ± 0,0199 a	0,1381 ± 0,0180 a	98,29 ± 1,48 ad	55,60 ± 4,61 ab	74,80 ± 4,13 c	15,80
<b>Bb 02</b>	0,2479 ± 0,0179 a	0,1230 ± 0,0268 ac	97,75 ± 3,34 ac	49,47 ± 7,86 ab	68,14 ± 9,07 ac	15,90
<b>CG 478</b>	0,2469 ± 0,0182 a	0,1227 ± 0,0124 ae	90,38 ± 6,96 bde	49,67 ± 3,62 ad	59,58 ± 3,38 acf	21,70
<b>Esalq 986</b>	0,2465 ± 0,0199 a	0,1127 ± 0,0296 ad	94,25 ± 6,07 ad	45,85 ± 11,54 bde	57,94 ± 11,65 ad	24,60
<b>CG 471</b>	0,2465 ± 0,0185 a	0,1157 ± 0,0217 ad	92,20 ± 8,90 ae	46,95 ± 8,04 bde	58,32 ± 8,52 ae	24,65
<b>CG 479</b>	0,2481 ± 0,0175 a	0,0958 ± 0,0164 bce	79,38 ± 13,33 bf	38,55 ± 5,81 ce	48,94 ± 5,03 bdef	46,30
<b>CG 500</b>	0,2454 ± 0,0205 a	0,0943 ± 0,0149 bce	75,02 ± 8,16 f	38,81 ± 6,97 cd	48,41 ± 7,20 bdf	46,40
<b>CG 234</b>	0,2464 ± 0,0177 a	0,0880 ± 0,0193 bcde	78,33 ± 11,70 bf	35,75 ± 7,61 ce	45,59 ± 7,52 be	51,30
<b>CG 206</b>	0,2462 ± 0,0188 a	0,0829 ± 0,0234 bd	82,11 ± 11,08 bef	33,47 ± 8,34 c	42,51 ± 9,70 b	61,15
<b>CG 481</b>	0,2455 ± 0,0191 a	0,0607 ± 0,0188 b	90,43 ± 7,44 bcde	24,81 ± 7,64 c	35,02 ± 10,17 b	65,75

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 5** - Valor médio e desvio padrão do Peso Inicial da Fêmea (P. I. F.), Peso Total da Massa de Ovos (P. T. M. O.), Índice de Produção de Ovos (I. P. O.), Índice Nutricional (I. N.), Eficiência Reprodutiva (E. R.) e Percentual de Controle (% Controle) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão em suspensões aquosas acrescida de Tween 80 0,01% ( $10^8$  e  $10^7$  conídios/mL) dos isolados de *Beauveria bassiana* s.l. (Micoteca e Reisolado), mantidas sob temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e Umidade Relativa  $\geq 80\%$ .

Grupo	P. I. F. (g)	P. T. M. O.	I. P. O.	I. N.	E. R.	% Controle
<b>CTR</b>	0,2483 $\pm$ 0,0181 a	0,1448 $\pm$ 0,0164 a	58,30 $\pm$ 4,76 a	71,88 $\pm$ 6,76 a	57,41 $\pm$ 4,65 a	-
<b>Bb 02 Micoteca <math>10^8</math></b>	0,2479 $\pm$ 0,0179 a	0,1230 $\pm$ 0,0268 ab	49,47 $\pm$ 7,86 a	68,14 $\pm$ 9,07 a	48,28 $\pm$ 7,48 a	15,90
<b>Bb 02 Micoteca <math>10^7</math></b>	0,2475 $\pm$ 0,0175 a	0,1353 $\pm$ 0,0110 a	54,77 $\pm$ 3,73 a	72,90 $\pm$ 4,14 a	43,23 $\pm$ 14,50 a	11,70
<b>Bb 02 Reisolado <math>10^8</math></b>	0,2465 $\pm$ 0,0178 a	0,1150 $\pm$ 0,0115 b	46,98 $\pm$ 6,45 a	56,92 $\pm$ 5,10 b	39,82 $\pm$ 7,61 b	30,60
<b>Bb 02 Reisolado <math>10^7</math></b>	0,2499 $\pm$ 0,0187 a	0,1234 $\pm$ 0,0182 ab	49,79 $\pm$ 6,27 a	67,11 $\pm$ 7,88 a	46,40 $\pm$ 6,49 a	19,20
<b>CTR</b>	0,2483 $\pm$ 0,0181 a	0,1448 $\pm$ 0,0164 a	58,30 $\pm$ 4,76 a	71,88 $\pm$ 6,76 a	57,41 $\pm$ 4,65 a	-
<b>Esalq 986 Micoteca <math>10^8</math></b>	0,2465 $\pm$ 0,0199 a	0,1127 $\pm$ 0,0296 a	45,85 $\pm$ 11,54 a	57,94 $\pm$ 11,65 a	43,30 $\pm$ 11,79 a	24,60
<b>Esalq 986 Micoteca <math>10^7</math></b>	0,2486 $\pm$ 0,0193 a	0,1209 $\pm$ 0,0199 a	48,78 $\pm$ 8,51 a	60,70 $\pm$ 7,49 a	45,93 $\pm$ 8,38 a	20,00
<b>Esalq 986 Reisolado <math>10^8</math></b>	0,2491 $\pm$ 0,0191 a	0,1167 $\pm$ 0,0263 a	47,13 $\pm$ 11,10 a	57,41 $\pm$ 11,84 a	44,69 $\pm$ 11,08 a	22,15
<b>Esalq 986 Reisolado <math>10^7</math></b>	0,2474 $\pm$ 0,0178 a	0,1223 $\pm$ 0,0295 a	48,87 $\pm$ 8,96 a	64,70 $\pm$ 8,33 a	43,48 $\pm$ 8,50 a	20,25
<b>CTR</b>	0,2483 $\pm$ 0,0181 a	0,1448 $\pm$ 0,0164 a	58,30 $\pm$ 4,76 a	71,88 $\pm$ 6,76 a	57,41 $\pm$ 4,65 a	-
<b>CG 154 Micoteca <math>10^8</math></b>	0,2481 $\pm$ 0,0199 a	0,1381 $\pm$ 0,0180 a	55,60 $\pm$ 4,61 a	74,80 $\pm$ 4,13 a	48,34 $\pm$ 17,86 a	15,80
<b>CG 154 Micoteca <math>10^7</math></b>	0,2475 $\pm$ 0,0192 a	0,1443 $\pm$ 0,0153 a	58,23 $\pm$ 2,93 a	73,73 $\pm$ 4,40 a	55,59 $\pm$ 4,57 a	3,15
<b>CG 154 Reisolado <math>10^8</math></b>	0,2460 $\pm$ 0,0187 a	0,1357 $\pm$ 0,0171 a	55,10 $\pm$ 4,76 a	64,21 $\pm$ 4,96 a	46,38 $\pm$ 17,57 a	19,60
<b>CG 154 Reisolado <math>10^7</math></b>	0,2478 $\pm$ 0,0175 a	0,1432 $\pm$ 0,0112 a	57,82 $\pm$ 2,17 a	73,24 $\pm$ 4,22 a	54,34 $\pm$ 3,36 a	5,30
<b>CTR</b>	0,2483 $\pm$ 0,0181 a	0,1448 $\pm$ 0,0164 a	58,30 $\pm$ 4,76 a	71,88 $\pm$ 6,76 a	57,41 $\pm$ 4,65 a	-
<b>CG 206 Micoteca <math>10^8</math></b>	0,2462 $\pm$ 0,0188 a	0,0829 $\pm$ 0,0234 b	33,47 $\pm$ 8,34 b	42,69 $\pm$ 9,21 b	22,30 $\pm$ 14,66 b	61,15
<b>CG 206 Micoteca <math>10^7</math></b>	0,2475 $\pm$ 0,0183 a	0,1297 $\pm$ 0,0186 a	52,20 $\pm$ 4,72 a	64,08 $\pm$ 5,35 a	49,19 $\pm$ 7,12 a	14,30
<b>CG 206 Reisolado <math>10^8</math></b>	0,2450 $\pm$ 0,0181 a	0,1073 $\pm$ 0,0143 b	43,80 $\pm$ 4,64 b	53,94 $\pm$ 3,37 b	37,61 $\pm$ 4,31 b	34,50
<b>CG 206 Reisolado <math>10^7</math></b>	0,2472 $\pm$ 0,0196 a	0,1344 $\pm$ 0,0098 a	54,53 $\pm$ 3,62 a	69,26 $\pm$ 6,56 a	47,74 $\pm$ 7,48 a	16,80

Médias seguidas da mesma letra, para o mesmo isolado, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ).

Tabela 5 - Continuação.

<b>Grupo</b>	<b>P. I. F.</b>	<b>P. T. M. O.</b>	<b>I. P. O.</b>	<b>I. N.</b>	<b>E. R.</b>	<b>% Controle</b>
<b>CTR</b>	0,2483 ± 0,0181 a	0,1448 ± 0,0164 a	58,30 ± 4,76 a	71,88 ± 6,76 a	57,41 ± 4,65 a	-
<b>CG 234 Micoteca 10<sup>8</sup></b>	0,2464 ± 0,0177 a	0,0880 ± 0,0193 b	35,75 ± 7,61 b	45,59 ± 7,52 b	27,93 ± 7,61 b	51,30
<b>CG 234 Micoteca 10<sup>7</sup></b>	0,2480 ± 0,0197 a	0,1279 ± 0,0192 a	51,49 ± 6,08 a	65,34 ± 6,93 a	49,38 ± 5,83 a	14,00
<b>CG 234 Reisolado 10<sup>8</sup></b>	0,2494 ± 0,0182 a	0,0793 ± 0,0278 b	31,62 ± 10,30 b	42,09 ± 10,69 b	21,89 ± 14,24 b	49,15
<b>CG 234 Reisolado 10<sup>7</sup></b>	0,2469 ± 0,0179 a	0,1357 ± 0,0123 a	55,03 ± 3,86 a	72,31 ± 2,16 a	44,73 ± 17,37 a	22,00
<b>CTR</b>	0,2483 ± 0,0181 a	0,1448 ± 0,0164 a	58,30 ± 4,76 a	71,88 ± 6,76 a	57,41 ± 4,65 a	-
<b>CG 471 Micoteca 10<sup>8</sup></b>	0,2465 ± 0,0185 a	0,1157 ± 0,0217 a	46,95 ± 8,04 a	58,32 ± 8,52 b	43,24 ± 7,87 b	24,65
<b>CG 471 Micoteca 10<sup>7</sup></b>	0,2468 ± 0,0191 a	0,1202 ± 0,0214 a	48,55 ± 6,90 a	63,61 ± 9,76 a	43,26 ± 10,86 ab	22,35
<b>CG 471 Reisolado 10<sup>8</sup></b>	0,2464 ± 0,0193 a	0,1170 ± 0,0231 a	58,69 ± 7,43 a	58,69 ± 7,43 b	42,23 ± 8,56 b	26,40
<b>CG 471 Reisolado 10<sup>7</sup></b>	0,2472 ± 0,0180 a	0,1360 ± 0,0201 a	54,88 ± 6,15 a	71,26 ± 7,55 a	48,83 ± 11,64 a	14,95
<b>CTR</b>	0,2483 ± 0,0181 a	0,1448 ± 0,0164 a	58,30 ± 4,76 a	71,88 ± 6,76 a	57,41 ± 4,65 a	-
<b>CG 478 Micoteca 10<sup>8</sup></b>	0,2469 ± 0,0182 a	0,1227 ± 0,0124 b	49,67 ± 3,62 b	59,58 ± 3,38 a	44,94 ± 5,20 a	21,70
<b>CG 478 Micoteca 10<sup>7</sup></b>	0,2485 ± 0,0189 a	0,1398 ± 0,0084 a	56,34 ± 1,95 a	72,42 ± 3,67 a	51,32 ± 6,50 a	10,60
<b>CG 478 Reisolado 10<sup>8</sup></b>	0,2467 ± 0,0188 a	0,1286 ± 0,0182 a	52,11 ± 5,92 a	66,75 ± 4,94 a	45,17 ± 16,11 a	21,30
<b>CG 478 Reisolado 10<sup>7</sup></b>	0,2463 ± 0,0190 a	0,1421 ± 0,0083 a	57,80 ± 2,71 a	74,39 ± 4,87 a	54,02 ± 4,86 a	5,90
<b>CTR</b>	0,2483 ± 0,0181 a	0,1448 ± 0,0164 a	58,30 ± 4,76 a	71,88 ± 6,76 a	57,41 ± 4,65 a	-
<b>CG 479 Micoteca 10<sup>8</sup></b>	0,2481 ± 0,0175 a	0,0958 ± 0,0164 b	38,55 ± 5,81 b	48,94 ± 5,03 b	30,83 ± 7,54 b	46,30
<b>CG 479 Micoteca 10<sup>7</sup></b>	0,2479 ± 0,0191 a	0,1104 ± 0,0382 a	43,82 ± 13,70 ab	57,09 ± 18,33 ab	42,45 ± 14,27 ab	26,00
<b>CG 479 Reisolado 10<sup>8</sup></b>	0,2460 ± 0,0174 a	0,1201 ± 0,0160 a	48,68 ± 4,43 b	58,54 ± 4,34 b	39,82 ± 6,49 b	30,65
<b>CG 479 Reisolado 10<sup>7</sup></b>	0,2466 ± 0,0180 a	0,1351 ± 0,0153 a	54,66 ± 2,82 a	67,62 ± 4,58 a	51,06 ± 4,63 a	11,00

Médias seguidas da mesma letra, para o mesmo isolado, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si (p>0,05).

**Tabela 5 - Continuação.**

<b>Grupo</b>	<b>P. I. F.</b>	<b>P. T. M. O.</b>	<b>I. P. O.</b>	<b>I. N.</b>	<b>E. R.</b>	<b>% Controle</b>
<b>CTR</b>	0,2483 ± 0,0181 a	0,1448 ± 0,0164 a	58,30 ± 4,76 a	71,88 ± 6,76 a	57,41 ± 4,65 a	-
<b>CG 481 Micoteca 10<sup>8</sup></b>	0,2455 ± 0,0191 a	0,0607 ± 0,0188 b	24,81 ± 7,64 b	35,02 ± 10,17 b	19,65 ± 8,38 b	65,75
<b>CG 481 Micoteca 10<sup>7</sup></b>	0,2470 ± 0,0188 a	0,1266 ± 0,0084 a	51,47 ± 4,33 a	66,73 ± 6,89 a	50,36 ± 4,38 a	12,25
<b>CG 481 Reisolado 10<sup>8</sup></b>	0,2466 ± 0,0169 a	0,1025 ± 0,0259 a	41,16 ± 8,49 ab	52,37 ± 7,47 ab	33,98 ± 10,02 b	40,80
<b>CG 481 Reisolado 10<sup>7</sup></b>	0,2443 ± 0,0137 a	0,1295 ± 0,0102 a	53,15 ± 4,59 a	65,96 ± 5,72 a	51,96 ± 4,90 a	9,50
<b>CTR</b>	0,2483 ± 0,0181 a	0,1448 ± 0,0164 a	58,30 ± 4,76 a	71,88 ± 6,76 a	57,41 ± 4,65 a	-
<b>CG 500 Micoteca 10<sup>8</sup></b>	0,2454 ± 0,0205 a	0,0943 ± 0,0149 b	38,81 ± 6,97 b	48,41 ± 7,20 b	26,38 ± 11,02 b	46,40
<b>CG 500 Micoteca 10<sup>7</sup></b>	0,2459 ± 0,0198 a	0,1247 ± 0,0386 a	50,07 ± 14,69 a	62,09 ± 18,29 a	48,74 ± 14,29 a	7,80
<b>CG 500 Reisolado 10<sup>8</sup></b>	0,2460 ± 0,0179 a	0,1314 ± 0,0213 a	53,16 ± 5,79 a	64,21 ± 6,63 a	51,92 ± 6,45 a	9,55
<b>CG 500 Reisolado 10<sup>7</sup></b>	0,2469 ± 0,0200 a	0,1394 ± 0,0152 a	56,40 ± 3,15 a	73,41 ± 2,88 a	55,07 ± 3,33 a	4,00

Médias seguidas da mesma letra, para o mesmo isolado, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si (p>0,05).

### 5.3 Atividade Enzimática

#### 5.3.1 Atividade proteolítica semi-quantitativa em meio mínimo sólido

Os isolados de *B. bassiana* apresentaram variação nos Índices de Relação Enzimática (IRE) para o crescimento em meio mínimo acrescido de 1% de gelatina. As relações do diâmetro geral (colônia + halo) com o diâmetro da colônia encontram-se dispostos na Tabela 6.

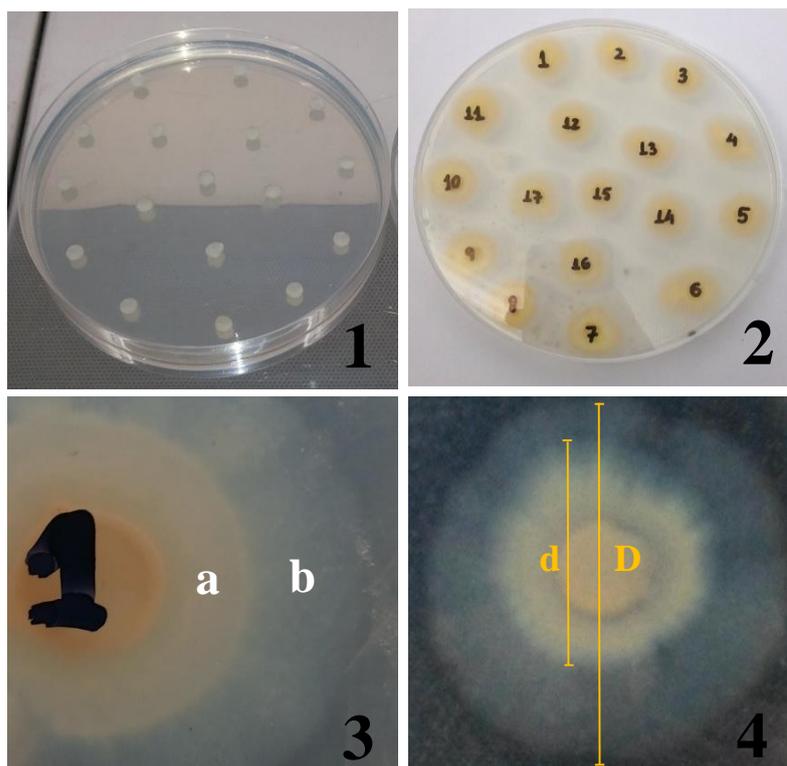
Para o grupo Micoteca, o IRE variou de  $1,21 \pm 0,09$  (Esalq 986) a  $1,69 \pm 0,21$  (CG 206). Os maiores índices foram observados para CG 500 ( $1,48 \pm 0,15$ ), CG 479 ( $1,59 \pm 0,10$ ) e CG 206 ( $1,69 \pm 0,21$ ) e os menores índices para Esalq 986 ( $1,21 \pm 0,09$ ), CG 471 ( $1,26 \pm 0,16$ ) e CG 478 ( $1,28 \pm 0,15$ ). Entretanto, somente Esalq 986, CG 206 e CG 479 apresentaram diferenças estatísticas quando os dez isolados foram comparados entre si. Dentro do grupo Reisolado, o IRE variou entre  $1,25 \pm 0,11$  (Esalq 986) e  $2,32 \pm 0,38$  (Bb 02). Os maiores valores foram observados para CG 206 ( $1,74 \pm 0,15$ ), CG 234 ( $1,88 \pm 0,21$ ) e Bb 02 ( $2,32 \pm 0,38$ ) e os menores valores para Esalq 986 ( $1,25 \pm 0,11$ ), CG 154 ( $1,26 \pm 0,10$ ) e CG 471 ( $1,53 \pm 0,22$ ).

Em relação ao processo de reisolamento, somente um dos dez isolados avaliados apresentou variação significativa do IRE (Bb 02) (Figura 7). O processo de uma passagem por *R. microplus* para o isolado Bb 02 foi capaz de aumentar em 1,6 vezes a relação entre o diâmetro geral e o diâmetro da colônia.

**Tabela 6** – Índice de Relação Enzimática (IRE) relacionado à atividade proteolítica semi-quantitativa de isolados de *Beauveria bassiana* s.l. do grupos Micoteca e Reisolado em *Rhipicephalus microplus* - incubação em Meio Mínimo Sólido (MMS) acrescido de gelatina a 1%.

Isolado	Índice de Relação Enzimática	
	Micoteca	Reisolado
<b>Bb 02</b>	$1,45 \pm 0,15$ a A	$2,32 \pm 0,38$ a B
<b>Esalq 986</b>	$1,21 \pm 0,09$ bc A	$1,25 \pm 0,11$ b A
<b>CG 154</b>	$1,34 \pm 0,17$ ac A	$1,26 \pm 0,10$ b A
<b>CG 206</b>	$1,69 \pm 0,21$ d A	$1,74 \pm 0,15$ cde A
<b>CG 234</b>	$1,37 \pm 0,40$ ace A	$1,88 \pm 0,21$ c A
<b>CG 471</b>	$1,26 \pm 0,16$ ac A	$1,53 \pm 0,22$ ef A
<b>CG 478</b>	$1,28 \pm 0,15$ ac A	$1,33 \pm 0,28$ bf A
<b>CG 479</b>	$1,59 \pm 0,10$ de A	$1,40 \pm 0,14$ bf A
<b>CG 481</b>	$1,34 \pm 0,10$ ac A	$1,50 \pm 0,16$ bdf A
<b>CG 500</b>	$1,48 \pm 0,15$ ac A	$1,51 \pm 0,10$ bdf A

\*Índice de Relação Enzimática seguida da mesma letra minúscula na mesma coluna e maiúscula na mesma linha, não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ).



**Figura 7** - Avaliação semi-quantitativa da atividade proteolítica do isolado Bb 02 de *B. bassiana* s.l. (Grupo Reisolado). **1** – Disposição dos discos de papel (6mm) com suspensão fúngica sobre o Meio Mínimo acrescido de 1% de gelatina; **2** – Marcação das colônias no reverso da placa após 10 dias de crescimento e antes da aplicação de TCA 10%; **3** – Diferenciação entre colônia e halo após aplicação de TCA 10% (**a** = colônia e **b** = halo); **4** – Áreas mensuráveis para o cálculo da IRE (**D** = diâmetro geral (colônia + halo) e **d** = diâmetro da colônia).

### 5.3.2 Atividade proteolítica geral (azocaseína)

A atividade proteolítica total a partir da hidrólise da azocaseína dos isolados dos grupos Micoteca e Reisolado encontram-se dispostos na Tabela 7. Quanto ao grupo Micoteca, somente os isolados CG 471 ( $6,32 \pm 0,05$  U) e CG 500 ( $5,24 \pm 0,02$  U) apresentaram diferença significativa no número de unidades enzimáticas responsáveis pela atividade proteolítica geral. Por outro lado, no grupo Reisolado, somente CG 471 apresentou alteração significativa do número de unidades enzimáticas ( $9,56 \pm 0,08$  U) após 72 horas de cultivo em meio mínimo acrescido de cutícula 1%.

O processo de reisolamento foi capaz de alterar significativamente a atividade geral das proteases. Dos dez isolados avaliados, CG 234 e CG 471 aumentaram significativamente em 2 e 1,5 vezes, respectivamente, o número de unidades enzimáticas. Entretanto, o processo foi capaz de reduzir em 1,91 e 1,54 vezes a atividade proteolítica geral dos isolados CG 481 e CG 500.

**Tabela 7** - Atividade proteolítica geral com azocaseína (U) dos diferentes isolados de *Beauveria bassiana* s.l. dos grupos Micoteca e Reisolado após 72 horas de crescimento em meio mínimo líquido contendo 1% de cutícula do carrapato *Rhipicephalus microplus*.

Isolado	Unidade enzimática	
	Micoteca	Reisolado
<b>Bb 02</b>	2,72 ± 0,07 a A	3,04 ± 0,05 aA
<b>Esalq 986</b>	3,08 ± 0,01 a A	4,04 ± 0,04 a A
<b>CG 154</b>	2,76 ± 0,02 a A	2,36 ± 0,04 a A
<b>CG 206</b>	2,84 ± 0,02 a A	2,32 ± 0,09 a A
<b>CG 234</b>	2,64 ± 0,12 a A	5,44 ± 0,06 a B
<b>CG 471</b>	6,32 ± 0,05 b A	9,56 ± 0,08 b B
<b>CG 478</b>	4,08 ± 0,02 a A	2,76 ± 0,05 a A
<b>CG 479</b>	4,64 ± 0,03 ab A	5,08 ± 0,08 ab A
<b>CG 481</b>	4,68 ± 0,08 ab A	2,44 ± 0,01 a B
<b>CG 500</b>	5,24 ± 0,02 b A	3,40 ± 0,05 a B

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

### 5.3.3 Atividade proteolítica específica de Pr1

No ensaio enzimático de Pr1, para o grupo Micoteca, os isolados apresentaram variação no número de unidades enzimáticas específicas (Tabela 8). Os valores encontrados variaram entre  $0,68 \pm 0,029$  U (Bb 02) e  $4,46 \pm 0,023$  U (CG 478), sendo que CG 471, CG 500 e CG 478 foram aqueles que exibiram as maiores atividades enzimáticas ( $3,95 \pm 0,070$  U;  $4,36 \pm 0,409$  U e  $4,46 \pm 0,023$  U). Para o grupo Reisolado, os valores observados estavam entre  $0,43 \pm 0,026$  U (CG 481) e  $7,68 \pm 0,262$  U (CG 479), sendo os maiores valores observados para CG 479, CG 481 e Esalq 986 ( $7,68 \pm 0,262$  U;  $5,18 \pm 0,067$  U e  $4,37 \pm 0,039$  U).

Assim como na atividade proteolítica geral, o processo de reisolamento também foi capaz de alterar significativamente a atividade proteolítica específica de Pr1. Dos dez isolados avaliados, Bb 02, Esalq 986 e CG 478 foram capazes de aumentar em 6,36; 1,26 e 1,16 vezes, respectivamente, o número de unidades enzimáticas após 72 horas de crescimento. Todavia, os isolados CG 500, CG 481 e CG 471 tiveram o número de unidades reduzidas em 3,6; 2,13 e 1,77 vezes, respectivamente.

### 5.3.4 Atividade proteolítica específica de Pr2

Para o ensaio proteolítico específico de Pr2, os resultados encontram-se expostos na Tabela 9. Dentro do grupo Micoteca, os valores observados variaram entre  $1,75 \pm 0,033$  U (CG 206) e  $4,52 \pm 0,490$  U (CG 500), sendo os maiores valores de unidades específicas enzimáticas observados para os isolados CG 500 ( $4,52 \pm 0,490$  U), CG 481 ( $3,56 \pm 0,014$  U) e CG 478 ( $3,53 \pm 0,060$  U). Já para o grupo Reisolado, os valores observados variaram entre  $2,50 \pm 0,027$  U (CG 471) e  $6,22 \pm 0,162$  U (CG 479). Os maiores valores das unidades enzimáticas foram observados para CG 479 ( $6,22 \pm 0,162$  U), CG 478 ( $4,67 \pm 0,074$  U) e CG 481 ( $4,55 \pm 0,123$  U).

O processo de reisolamento foi capaz de alterar significativamente oito dos dez isolados estudados. O número de unidades enzimáticas foi reduzido em 0,78 vezes para o isolado CG

479 e 1,26 vezes para o isolado CG 500. Em contra partida, seis isolados aumentaram significativamente a atividade enzimática específica: Bb 02 (2,4 vezes), CG 479 (2,4 vezes), CG 154 (1,9 vezes), CG 206 (1,8 vezes), Esalq 986 (1,3 vezes) e CG 481 (1,2 vezes).

**Tabela 8** - Atividade de Pr1 (U específica) ( $\mu\text{mol/mL/min}$ ) dos diferentes isolados de *Beauveria bassiana* s.l. dos grupos Micoteca e Reisolado após 72 horas de crescimento em meio mínimo líquido contendo 1% de cutícula do carrapato *Rhipicephalus microplus*.

Isolado	Unidade enzimática	
	Micoteca	Reisolado
<b>Bb 02</b>	0,68 $\pm$ 0,029 a A	4,33 $\pm$ 0,025 a B
<b>Esalq 986</b>	3,45 $\pm$ 0,347 bf A	4,37 $\pm$ 0,039 a B
<b>CG 154</b>	3,42 $\pm$ 0,121 bf A	3,95 $\pm$ 0,189 b A
<b>CG 206</b>	1,40 $\pm$ 0,057 c A	1,05 $\pm$ 0,035 c A
<b>CG 234</b>	3,19 $\pm$ 0,056 b A	2,89 $\pm$ 0,104 d A
<b>CG 471</b>	3,95 $\pm$ 0,070 d A	2,23 $\pm$ 0,107 e B
<b>CG 478</b>	4,46 $\pm$ 0,023 e A	5,18 $\pm$ 0,067 f B
<b>CG 479</b>	3,57 $\pm$ 0,072 f A	7,68 $\pm$ 0,262 g A
<b>CG 481</b>	0,92 $\pm$ 0,014 a A	0,43 $\pm$ 0,026 h B
<b>CG 500</b>	4,36 $\pm$ 0,409 df A	1,20 $\pm$ 0,022 c B

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

**Tabela 9** - Atividade de Pr2 (U específica) ( $\mu\text{mol/mL/min}$ ) dos diferentes isolados de *Beauveria bassiana* s.l. dos grupos Micoteca e Reisolado após 72 horas de crescimento em meio mínimo líquido contendo 1% de cutícula do carrapato *Rhipicephalus microplus*.

Isolado	Unidade enzimática	
	Micoteca	Reisolado
<b>Bb 02</b>	1,75 $\pm$ 0,049 a A	4,20 $\pm$ 0,376 a B
<b>Esalq 986</b>	2,92 $\pm$ 0,330 b A	3,81 $\pm$ 0,106 ad B
<b>CG 154</b>	1,99 $\pm$ 0,177 a A	3,93 $\pm$ 0,034 b B
<b>CG 206</b>	1,75 $\pm$ 0,033 a A	3,29 $\pm$ 0,035 c B
<b>CG 234</b>	2,48 $\pm$ 0,093 c A	2,90 $\pm$ 0,109 e A
<b>CG 471</b>	3,18 $\pm$ 0,103 b A	2,50 $\pm$ 0,027 f B
<b>CG 478</b>	3,53 $\pm$ 0,060 d A	4,67 $\pm$ 0,074 g A
<b>CG 479</b>	2,56 $\pm$ 0,052 c A	6,22 $\pm$ 0,162 e B
<b>CG 481</b>	3,56 $\pm$ 0,014 d A	4,55 $\pm$ 0,123 g B
<b>CG 500</b>	4,52 $\pm$ 0,490 e A	3,58 $\pm$ 0,139 d B

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

### 5.3.5 Atividade lipolítica

Os resultados da atividade lipolítica encontram-se dispostos na Tabela 10. Para o grupo Micoteca, os valores encontrados variaram entre 0,01  $\pm$  0,008 U (CG 206) e 0,58  $\pm$  0,044 U (CG 154). Já os maiores valores foram observados para os isolados CG 154 (0,58  $\pm$  0,044 U),

CG 500 ( $0,31 \pm 0,055$  U) e CG 471 ( $0,29 \pm 0,078$  U). Com relação ao grupo Reisolado, os valores das unidades enzimáticas variaram entre  $0,07 \pm 0,009$  U (CG 154) e  $1,29 \pm 0,0035$  U (CG 234). Os maiores valores encontrados de atividade foram para os isolados CG 234 ( $1,29 \pm 0,035$  U), CG 479 ( $0,54 \pm 0,093$  U) e CG 471 ( $0,46 \pm 0,036$  U).

O processo de reisolamento neste caso foi capaz de reduzir a atividade lipolítica em 8,28 e 1,63 vezes para os isolados CG 154 e CG 500, respectivamente. Todavia, sete isolados tiveram a atividade lipásica aumentada após o cultivo em *R. microplus*: CG 206 (20 vezes), Bb 02 (9 vezes), CG 478 (8,3 vezes), CG 234 (7,16 vezes), CG 479 (6 vezes), CG 481 (2,44 vezes) e CG 471 (1,58 vezes).

**Tabela 10** - Atividade de lipase (U específica) (pmol/mL/min) dos diferentes isolados de *Beauveria bassiana* s.l. dos grupos Micoteca e Reisolado após 72 horas de crescimento em meio mínimo líquido contendo 1% de cutícula do carrapato *Rhipicephalus microplus*.

Isolado	Unidade enzimática	
	Micoteca	Reisolado
<b>Bb 02</b>	$0,03 \pm 0,008$ a A	$0,27 \pm 0,091$ a B
<b>Esalq 986</b>	$0,16 \pm 0,053$ ac A	$0,20 \pm 0,038$ ac A
<b>CG 154</b>	$0,58 \pm 0,044$ bd A	$0,07 \pm 0,009$ bc B
<b>CG 206</b>	$0,01 \pm 0,008$ a A	$0,20 \pm 0,054$ ac B
<b>CG 234</b>	$0,18 \pm 0,024$ ae A	$1,29 \pm 0,035$ d B
<b>CG 471</b>	$0,29 \pm 0,078$ cde A	$0,46 \pm 0,036$ e B
<b>CG 478</b>	$0,03 \pm 0,005$ a A	$0,25 \pm 0,018$ a B
<b>CG 479</b>	$0,09 \pm 0,081$ a A	$0,54 \pm 0,093$ e B
<b>CG 481</b>	$0,09 \pm 0,148$ a A	$0,22 \pm 0,035$ a B
<b>CG 500</b>	$0,31 \pm 0,055$ cde A	$0,19 \pm 0,028$ a B

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

#### 5.4 Avaliação individual dos isolados antes e após o reisolamento

Após as análises morfológica, de virulência e enzimática dos isolados de *B. bassiana* s.l. antes e após reisolamento em *R. microplus*, os resultados obtidos foram comparados na Tabela 13.

Bb 02 apresentou alteração das características macroscópicas, tornando a colônia mais aveludada e com centro pulverulento. Embora o diâmetro da colônia tenha apresentado discreta redução, a micromorfologia manteve-se a mesma, registrando no entanto, o aumento no número de conídios produzidos. Em relação à virulência, inicialmente (grupo Micoteca) o isolado apresentou baixo potencial patogênico, registrando menos do que 16% de eficácia *in vitro* na concentração de  $10^8$  conídios/mL. Todavia, após o processo de reisolamento, pôde ser observado o aumento de 1,9 vezes do percentual de controle, registrando até 30,60% de eficiência nas mesmas condições. Quanto à atividade enzimática, foi observado aumento significativo em quase todas as atividades analisadas (I.R.E., Pr1, Pr2 e atividade lipásica).

Esalq 986 não apresentou modificação das características macro e microscópicas, no entanto teve a produção de conídios reduzida após reisolamento. A virulência inicial classificada com potencial intermediário de patogenicidade foi mantida em torno de 22% a 24%. Quanto às atividades enzimáticas, foi observado o aumento da atividades proteolítica específica de Pr1 e Pr2.

CG 154 não apresentou alterações morfológicas, sendo observado somente discreto aumento do diâmetro da colônia, bem como a elevação do número de conídios produzidos. A classificação da virulência foi determinada como baixo potencial patogênico, sendo mantida os percentuais de controle entre 15% e 19%. Na avaliação enzimática, foram observados aumento na atividade de Pr2 e redução da atividade lipolítica.

CG 206 não demonstrou nenhuma alteração macro e microscópica, bem como manteve o número de conídios produzidos em ambas as condições. Não apresentou diferença estatística de virulência antes e após reisolamento, embora tenha ocorrido redução do percentual de 61,15% para 34,50% a eficácia *in vitro*. Quanto à atividade enzimática, foi observado aumento da atividade de Pr2 e atividade lipolítica.

CG 234 não modificou as características microscópicas da colônia, sendo observado pequena redução do número de conídios produzidos. Na análise da virulência, apresentou bom potencial patogênico, tendo sido mantido após reisolamento. Em relação à atividade enzimática, foi observado somente aumento da atividade proteolítica geral e atividade lipolítica.

CG 471 não apresentou variações na macro e micromorfologia, embora tenha reduzido o número de conídios produzidos. Quanto à virulência, o isolado foi classificado com uma eficiência intermediária, que foi mantida após o reisolamento, registrando percentuais dentro de 24% e 26%. Em relação às atividade enzimática, observou-se aumento da atividade proteolítica geral e lipásica, com seguinte redução das atividades de Pr1 e Pr2.

CG 478 manteve as características morfológicas da colônia com aumento da produção de conídios após reisolamento. Nos ensaios biológicos, apresentou baixo potencial patogênico que foi mantido após o reisolamento, com percentuais de 21,70% e 21,30%. Foi observado aumento significativo das atividades de Pr1 e lipolítica.

CG 479 não demonstrou alterações das características macro e micromorfológicas, apresentando também aumento dos conídios produzidos. Quanto à virulência, o isolado apresentou potencial intermediário que foi mantido após o reisolamento, com percentuais variando entre 46,30% e 30,65%. Em relação à atividade enzimática, foi observado aumento das atividades proteolítica geral e Pr2, além da atividade lipásica.

CG 481 não modificou a morfologia após reisolamento da colônias, sendo observado porém aumento dos conídios produzidos. Após o teste de virulência, que foi classificada com bom potencial patogênico, não apresentou diferença estatística após reisolamento, embora tenha reduzido o percentual de controle de 65,75% para 40,80%. Em relação à atividade enzimática, foi observado redução das atividades proteolíticas geral e Pr1 e aumentar da atividade Pr2 e atividade lipásica.

CG 500 foi um dos isolados que mais sofreu a influência do processo de reisolamento. As colônias modificaram a macromorfologia e reduziram o número de conídios produzidos. Além disto, a virulência foi reduzida cerca de 4,84 vezes, diminuindo o percentual de controle de 46,40% para 9,55%. Em concomitância, todas as atividades enzimáticas avaliadas a partir do crescimento em meio mínimo também foram reduzidas (atividade proteolítica geral, Pr1, Pr2 e atividade lipolítica).

**Tabela 11** - Análise morfológica, de virulência e enzimática dos isolados brasileiros de *Beauveria bassiana* antes (M) e após (R) reisolamento em *Rhipicephalus microplus*.

ISOLADOS	Morfologia			Virulência		Atividade Enzimática				
	Macromorfologia (M para R)	Micromorfologia (M para R)	Contagem de conídios	Virulência Micoteca	Virulência (M para R)	Atividade Proteolítica Semi- Quantitativa	Protease geral (Azo- caseína)	Pr1	Pr2	Lipase
<b>Bb 02</b>	+ pulverulento	=	↑	Baixo	↑	↑	=	↑	↑	↑
<b>Esalq 986</b>	=	=	↑	Baixo	=	=	=	↑	↑	=
<b>CG 154</b>	=	=	↑	Baixo	=	=	=	=	↑	↓
<b>CG 206</b>	=	=	=	Bom	=	=	=	=	↑	↑
<b>CG 234</b>	=	=	↓	Bom	=	=	=	=	=	↑
<b>CG 471</b>	=	=	↓	Intermediário	=	=	↑	↓	↓	↑
<b>CG 478</b>	=	=	↑	Baixo	=	=	=	↑	=	↑
<b>CG 479</b>	=	=	↑	Intermediário	=	=	=	=	↑	↑
<b>CG 481</b>	=	=	↑	Bom	=	=	=	↓	↑	↑
<b>CG 500</b>	- pulverulento	=	↓	Intermediário	↓	=	=	↓	↓	↓

**Legenda:**

- + **pulverulento** – isolado que aumentou o número de conídios desprendidos do micélio (análise qualitativa – percepção visual)
- **pulverulento** – isolado que diminuiu o número de conídios desprendidos do micélio (análise qualitativa – percepção visual)
- = (**manutenção**) - isolado que manteve as características observadas antes e após o reisolamento
- ↑ (**aumento**) - isolado que aumentou significativamente o número observado de antes para depois do reisolamento
- ↓ (**diminuição**) - isolado que diminuiu significativamente o número observado de antes para depois do reisolamento

## 6 DISCUSSÃO

Crescentes são as pesquisas relacionadas à ação e à produção comercial de fungos artropodopatogênicos atuando como micoacaricidas e micoInseticidas (FARIA; WRAIGHT, 2007). Avaliações que associem a análise da morfologia fúngica, virulência e atividade enzimática são capazes de orientar uma melhor seleção de isolados com alto potencial patogênico (ALVES, 1998; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010; FERNANDES et al., 2011).

O estudo de um gênero fúngico inicia-se a partir da análise morfológica. Todos os isolados avaliados no presente trabalho apresentaram características macro e micromorfológicas semelhantes às descritas por De Hoog (1972), Fernandes (2007) e Rehner et al. (2011) para *B. bassiana*. Fernandes et al. (2011), após oito dias de crescimento utilizando meio de cultura aveia ágar, avaliaram as variações morfológicas de 60 isolados de *Beauveria* spp obtidos de coleções fúngicas. A determinação dos dez espécimes utilizados neste estudo foi orientada pelo trabalho supracitado, sendo as variações observadas na aparência, aspecto, coloração da colônia, presença de exsudato e coloração do reverso condizentes às descritas por Fernandes (2007). A padronização do tempo de crescimento das colônias em dez dias para as análises macromorfológicas seguiu as condições de estudo determinadas por Rehner et al. (2011) que realizaram uma análise morfológica e multigênica (RPB 1, RPB 2, TEF e Bloc) de isolados inicialmente classificados como *B. bassiana* e *B. brongniartii*. Os autores observaram que entre as linhagens estudadas, poucas eram as diferenças morfológicas encontradas, reportando assim a necessidade da implementação de análise molecular como técnica complementar de diagnóstico. Após as avaliações, seis novas espécies de *Beauveria* foram descritas, sendo que alguns grupos de pesquisa têm adotado a denominação de *Beauveria bassiana* s.l. para isolados que ainda não tenham sido caracterizados morfológica e geneticamente segundo as descrições de Rehner et al. (2011).

Varela e Morales (1996) relataram que a seleção de isolados somente em função das características morfológicas não deve ser utilizada para *B. bassiana*, considerando a ampla variação observada entre linhagens. Contudo, a observação das características macroscópicas pode inicialmente indicar isolados que possuam possível potencial de utilização em larga escala e que apresentem facilidade de adaptação à biotecnologia (KRULL et al., 2013). Os isolados de *B. bassiana* s.l. utilizados nos experimentos do presente trabalho encontravam-se preservados por imersão em óleo mineral por sete anos na Micoteca do Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes (UFRRJ). Ao serem recuperados em meios de cultura sintético, modificações morfológicas, patogênicas e enzimáticas pertinentes puderam ser observadas em função do tempo de preservação. Todavia, a literatura relata que *B. bassiana* possui alta capacidade de preservar suas características macroscópicas em função de sucessivas passagens em meio de cultura. Safavi (2011) em um experimento que avaliou o efeito de sucessivas passagens de *B. bassiana* sob meio SDA, observou que o desenvolvimento das hifas e a cor da colônia mantinham-se inalterados até a décima quinta passagem por meio de cultura. Dentro deste contexto, o processo de reisolamento em *R. microplus* alterou em pequena escala a morfologia das colônias de *B. bassiana*. Bb 02, que tem o carrapato (Acari: Ixodidae) como hospedeiro original de isolamento, apresentou alterações importantes como aumento da pulverulência e presença de colônia menos lanosa e mais aveludada. Em contrapartida, CG 500, obtido de coleóptero naturalmente colonizado, foi aquele que mais sofreu modificações em função do processo de reisolamento, com redução da pulverulência e a apresentação de colônias de aspecto mais rugoso. Com base nestes resultados, acredita-se que possa existir relação do hospedeiro original de isolamento com as alterações morfológicas das colônias. Além disto, evidências indicam que passagens sucessivas de fungos artropodopatogênicos sobre hospedeiros artrópodes possam interferir positivamente na macromorfologia (colônias mais

pulverulentas), aumentando a produção de conídios (FERNANDES, 2007). Porém, como o presente trabalho avaliou o efeito de somente uma única passagem (um ciclo) sobre *R. microplus*, acredita-se que alterações de maior escala não tenham sido observadas em função do tempo de permanência do fungo em desafio sobre o hospedeiro.

Na micromorfologia, as características e as mensurações do comprimento e da largura dos conídios para todos os isolados dos grupos Micoteca e Reisolado corroboraram com relatos de Fernandes et al. (2011) que descreveram os conídios de *B. bassiana* como estruturas de superfície lisa e formato globoso ou subgloboso com tamanho médio de 2,5 µm. Do mesmo modo, Rehner et al. (2011) reportaram *B. bassiana* com hifas septadas, hialinas e de parede lisa e conídios aglomerados dispostos ao pares. O processo de reisolamento em *R. microplus* não alterou as características micromorfológicas de nenhum dos isolados avaliados, mantendo a conformação de estruturas como conidióforo, fiálides e conídios de formato arredondado.

Variações na produção de conídios para diferentes isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* já foram observadas por Liu et al. (2003). Em relação ao número de conídios contados por área (0,582 cm<sup>2</sup>), dois isolados (CG 206 e CG 154) foram os que apresentaram maiores números de contagem ao final do experimento tanto para Micoteca quanto para Reisolado. Resultados similares a estes foram observados por Fernandes et al. (2011) e consolidam os mesmos como potentes produtores de estruturas reprodutivas utilizadas para a dispersão no meio ambiente. Um estudo realizado por Safavi (2011) demonstrou que passagens sucessivas em meios sintéticos têm a capacidade de influenciar negativamente a produção de conídios por isolados fúngicos, observando redução significativa do número de conídios contados após a décima quinta passagem em SDA. Os resultados observados indicam que a produção de conídios parece estar fortemente relacionada à macro e micromorfologia do isolado, no qual isolados de baixa produção podem demonstrar o início de um processo de degeneração do fungo (DE HOOG, 1972). Por este motivo, a constante manipulação de isolados em meios de cultura sem a manutenção do contato com artrópode pode acarretar atenuações da produtividade conidial e perda da patogenicidade de fungos artropodopatogênicos.

A virulência *in vitro* de artropodopatógenos como *M. anisopliae* s.l. (BITTENCOURT et al., 1992), *L. lecanii* (ANGELO et al., 2010) e *B. bassiana* (BITTENCOURT et al., 1996; BITTENCOURT et al., 1997; FERNANDES et al., 2011) já foram amplamente estudadas para *R. microplus*. Os dez isolados de *B. bassiana* s.l. avaliados no presente estudo foram considerados patogênicos para *R. microplus* com percentuais de controle variando de 15,80% a 65,75% (grupo Micoteca). Cinco (CG 481, CG 206, CG 234, CG 500 e CG 479) dos dez isolados foram capazes de alterar todos os parâmetros biológicos avaliados, sendo CG 206 e CG 481 aqueles que apresentaram os maiores percentuais de controle (61,15% e 65,75%, respectivamente). Fernandes et al. (2011) observaram efeitos semelhantes para os mesmos isolados quando testados para larvas do carrapato dos bovinos. Ao correlacionarem produção conidial, tolerância aos raios UV-B, termotolerância e atividade ao frio com a virulência, os autores observaram que os isolados CG 481 e CG 206 apresentaram alto percentual de mortalidade para larvas. Devido à alta capacidade patogênica para diferentes estágios evolutivos do carrapato evidenciados aqui e por Fernandes (2007), estes isolados apresentam grande potencial para estudos que envolvam programas de controle integrados de *R. microplus* a partir de *B. bassiana* s.l.

Ainda neste contexto, alguns dos isolados testados neste trabalho já tiveram sua capacidade patogênica comprovada para estágios adultos do carrapato dos bovinos. Bittencourt et al. (1997) avaliaram a eficácia de dois isolados de *B. bassiana* (Esalq 747 e Esalq 986) para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. No experimento, foi observado que os percentuais de controle encontrados foram de 86,78% para o isolado Esalq 986. e 83,39% para Esalq 747. No presente estudo, os maiores percentuais encontrados foram de 65,75% (CG 481) e 61,15% (CG

206). Além disso, o isolado Esalq 986 que também foi utilizado nos experimentos, apresentou percentual máximo de 24,6%. Camargo et al. (2012) ao testarem formulações oleosas com o mesmo isolado de *B. bassiana* s.l. também observaram percentuais de controle próximos de 21% quando utilizado 20% de óleo mineral nas formulações. A diferença encontrada de 62,18% entre os achados de Bittencourt et al. (1997) e o presente trabalho podem estar relacionadas a diferentes fatores. O tempo de preservação do isolado (sete anos) em Micoteca pode ter exercido influência negativa na patogenicidade do fungo. Alves (1998) relata que fungos preservados que não passem por constante manutenção podem ter suas características morfológicas e de virulência atenuadas em função do longo período de latência da colônia fúngica. Já Brownbridge et al. (2001) relatam que *B. bassiana* parece ser menos susceptível à reduzir a virulência através de passagens em meios de cultura do que os demais fungos artropodopatogênicos. Atrelado a este fato, trabalhos reportam também que populações de carrapatos que tenham origens diferentes, podem apresentar respostas distintas quanto à susceptibilidade aos fungos artropodopatogênicos. Perinotto et al. (2012) observaram existir diferenças significativas *in vitro* entre populações distintas de *R. microplus* para indivíduos tratados com suspensões aquosas de *M. anisopliae* s.l. e *B. bassiana*. Fernandes et al. (2011) observaram efeito semelhante com os isolados Bb 44 e Esalq 986 para larvas de *R. microplus*, sendo observado diferenças de até 20 dias para a mortalidade das larvas entre populações A e B (de origens diferentes). Por este motivo, para estudos que envolvam teste *in vitro* com diferentes isolados fúngicos, deve-se ter informações como a procedência da população e sua susceptibilidade aos diferentes produtos previamente utilizados para o controle a campo em condições naturais, como os acaricidas químicos.

Em relação ao processo de reisolamento, o presente trabalho alterou significativamente somente dois dos dez isolados avaliados (Bb 02 e CG 500). CG 500, obtido de um coleóptero, reduziu em até 4,8 vezes sua eficácia, conseqüentemente diminuindo potencial patogênico de médio para baixo. Já Bb 02, originalmente obtido de carrapatos, foi capaz de aumentar em 1,8 vezes o percentual de controle. Schaerffenberg (1964), Wasti e Hartmann (1975), Song e Feng (2011) e Mohammadbeigi (2013) demonstram que sucessivas passagens em artrópodes são capazes de elevar a virulência de *B. bassiana* para diferentes espécies de artrópodes. Porém, Fernandes et al. (2011) reportaram não haver diferença significativa de maior virulência de isolados obtidos de carrapatos naturalmente infectados para isolados obtidos de outras ordens de artrópodes, como CG 206, obtido de um himenóptero que também foi utilizado neste experimento, apresentando resultados satisfatórios para o controle de carrapatos. Neste âmbito, como o presente estudo avaliou o efeito de uma passagem (um ciclo) para o carrapato dos bovinos, acredita-se que outros estudos que envolvam mais passagens de *B. bassiana* sobre *R. microplus* podem elucidar melhor a real influência do hospedeiro de isolamento na virulência para os diferentes artrópodes-alvo.

Fungos filamentosos são organismos heterotróficos que necessitam de elementos presentes no meio ambiente (substratos) para garantir seu desenvolvimento. Lipases, quitinases e proteases são algumas das mais importantes enzimas que possibilitam este processo (ARRUDA, 2005). O presente estudo avaliou a atividade proteolítica semi-quantitativa extracelular em meio mínimo sólido através dos Índices de Relação Enzimática (IRE's). Tiago e Silva (2007) avaliaram os IRE's de diferentes isolados de *M. anisopliae* em substratos não cuticulares. No presente estudo, foi observado que todos os IRE's de *B. bassiana* foram inferiores aos encontrados para *M. anisopliae* por Tiago e Silva (2007). Novamente, processo de reisolamento foi capaz de aumentar significativamente em até 1,6 vezes somente o IRE do isolado Bb 02. Estudos relatam variações de atividade enzimática entre isolados fúngicos. Paccola-Meirelles e Azevedo (1990) observaram variabilidade genética natural quanto à atividade enzimática para isolados de *B. bassiana* quando cultivados em meio mínimo acrescido

de gelatina. Tiago e Silva (2007) concluíram que há variabilidade genética entre os isolados de *M. anisopliae* para a produção de proteases extracelulares frente aos substratos não-cuticulares, além de relatar que substratos cuticulares não permitiram a detecção de atividade enzimática. Os mesmos autores relataram que a obtenção da IRE pode atuar como triagem inicial para a orientação na seleção de isolados com alta atividade proteolítica. Atrelado ao fato, sugerem que posteriormente, os mesmos devam ser analisados quanto à produção de proteases específicas, como Pr1 e Pr2, possibilitando uma melhor compreensão dos possíveis fatores que afetam a eficácia de isolados fúngicos no controle de artrópodes-alvo. Com os resultados do presente trabalho e os achados de Tiago e Silva (2007), acredita-se que o conhecimento da IRE e sua associação com a virulência para os diferentes artrópodes podem servir de base para a seleção de isolados de fungos artropodopatogênicos para programas de controle de parasitos como o carrapato *R. microplus*.

Proteases são enzimas que apresentam a capacidade de clivar cadeias peptídicas. Neste contexto, serino proteases do tipo subtilisina (Pr1) e tripsina (Pr2) são enzimas específicas que têm sua importância relatada experimentalmente durante o processo de infecção de artrópodes. O crescimento fúngico neste estudo foi realizado a partir de meio mínimo líquido acrescido de 1% de cutícula de carrapatos. Gupta et al. (1992) demonstraram que para *B. bassiana*, a atividade de Pr1 e Pr2 são reforçadas na presença da cutícula de artrópodes no meio de crescimento. O uso de 1% de cutícula de *R. microplus* possibilita a simulação de condições semelhantes ao processo infectivo, como presença de substrato, pH ideal e exposição do fungo ao meio de cultura para a obtenção de resultados mais expressivos e de caráter mais fidedigno. Campos et al. (2005) ao observarem a atividade proteolítica de Pr1 de isolados de *B. bassiana* e *B. amorfa*, demonstraram que a presença da cutícula de *R. microplus* junto ao meio mínimo foi responsável por apresentar os maiores valores de unidades enzimáticas. Para os grupos Micoteca e Reisolado, os isolados apresentaram variação no número de unidades específicas de Pr1 e Pr2 em meio líquido. Quanto à Pr1, isolados considerados com bom potencial patogênico como CG 481 e CG 206 não apresentaram as maiores atividades em meio mínimo. Trabalhos relatam que a presença de Pr1 é importante durante o processo infectivo, mas que não é estritamente necessária para a virulência de fungos artropodopatogênicos. Wang et al. (2002) reportaram que mutantes espontâneos de *M. anisopliae* deficientes para genes relacionados à expressão de Pr1 possuíam o potencial de infectar *Galleria mellonella*, embora tenham reduzido a patogenicidade para *Tenebrio molitor*. Rosas-García et al. (2014) avaliaram o crescimento de quatro isolados de *M. anisopliae* em meio mínimo acrescido de cutícula de camarão, bem como a virulência, expressão e atividade enzimática de Pr1 e Pr2. A partir dos resultados obtidos, os autores que não observaram correlação entre a virulência e a atividade/expressão enzimática, sugerem que, provavelmente, as enzimas estudadas sejam de relevante importância, mas que não são de necessidade vital para fungos artropodopatogênicos.

A atividade proteolítica dos isolados neste estudo foi observada 72 horas após crescimento. Dhar e Kuar (2010) relataram que as maiores atividades proteolíticas de Pr1 e Pr2 do extrato micelial de isolados de *B. bassiana* s.l. crescidos em meio mínimo estavam entre 96 e 192 horas. No presente estudo, foi observado que o processo de passagem pelo hospedeiro influenciou positivamente a atividade proteolítica. Após reisolamento, três isolados aumentaram significativamente, em apenas 72 horas, a atividade de Pr1 (Bb 02, Esalq 986 e CG 478) e seis isolados a atividade de Pr2 (Bb 02, Esalq 986, CG 154, CG 206, CG 479 e CG 481). Destes, dois (Bb 02 e Esalq 986) têm como origem os carrapatos. Tais resultados relacionam-se ao aumento da virulência observado para o isolado Bb 02, obtido de regiões geográficas próximas ao local do estudo (Paracambi-RJ). Isto salienta a ideia de que isolados obtidos de determinados hospedeiros ao serem submetidos ao crescimento sob o mesmo gênero

de artrópode, podem acelerar o aumento da expressão/atividade enzimática e, conseqüentemente, a elevar a virulência.

Lipases são hidrolases que tem a capacidade de fragmentar ácidos graxos polimerizados (JOSEPH et al., 2008). Por muito tempo, sua atividade não esteve correlacionada com a virulência dos fungos artropodopatogênicos. A atividade lipásica foi avaliada a partir da hidrólise do substrato *p*-nitrofenil palmitato também após 72 horas de crescimento em meios sem suplementação de ácidos graxos, como o estereato de colesteril. Por este motivo, as atividades enzimática observadas foram expressadas em pmol/mL/min, visto que o processo de autoclavagem das cutículas é capaz de alterar a constituição lipídica das mesma. Nestes casos, é aconselhável que a suplementação seja realizada pra produzir resultados mais expressivos. Trabalhos como os de Cruz (2009), que observou que o isolado CG 432 de *B. bassiana* apresentava melhores condições de crescimento e atividade enzimática em meio de Vogel suplementado com 0,75% de óleo de oliva, reforçam a necessidade de suplementação de fonte lipídica para análise da atividade lipásica. O processo de reisolamento foi capaz de elevar a atividade lipolítica de sete isolados dos dez isolados avaliados neste estudo (CG 206, Bb 02, CG 478, CG 234, CG 479, CG 481, CG 471 e Esalq 986). Perinotto et al. (2014) ao avaliarem a atividade lipásica de cinco isolados de *M. anisopliae* não observaram um padrão de aumento ou diminuição progressiva após crescimento em condições semelhantes às do presente estudo. Porém os autores notaram que os isolados que possuam maior percentual de virulência eram àqueles que com 24 horas pós-cultivo já apresentavam as maiores atividades enzimáticas. Desde modo, salienta-se a importância das lipases nos momentos iniciais da colonização do artrópode. Sugahara e Varéa (2014) observaram a atividade lipásica através do método titrimétrico para oito isolados de *B. bassiana*. Foi observado que o isolado CG 481 foi aquele que apresentou maior atividade enzimática (30,5 U/mL), diferentemente deste experimento, em que o mesmo não denotou atividades tão expressivas. Zibae et al. (2011) observaram e purificaram uma nova lipase de *B. bassiana* de aproximadamente 25 KDa que apresentava alta atividade seis dias após inoculação em meio com o pH de 7,1. Como neste trabalho, foi avaliado a atividade enzimática somente 72 horas após crescimento, acredita-se que talvez mais tempo de crescimento sob condições controladas, bem a suplementação com estereato de colesteril ou quaisquer outras fontes lipídicas, pudessem ser mais expressivos para a detecção de maiores atividades enzimáticas.

Enfim, as avaliações de morfologia, virulência e atividade enzimática são ferramentas importantes para a seleção de isolados fúngicos. O presente trabalho avaliou separadamente cada uma destas etapas para os diferentes isolados de *B. bassiana* antes e após reisolamento em *R. microplus*. Numa triagem inicial, isolados como CG 206 e CG 481 foram aqueles que apresentaram a maior eficácia para um possível uso em estudos posteriores. St. Leger et al. (1986) relatam para *M. anisopliae* que, variações encontradas entre os isolados fúngicos, são observadas em decorrência da diferença no grau de crescimento entre os isolados e a conseqüente liberação de enzimas para hidrólise de substratos e obtenção de nutrientes para o desenvolvimento fúngico. Em posse das análises totais e baseando-se pelos achados deste experimento, isolados como CG 206 e CG 481, mesmo após reisolamento, apresentaram os melhores percentuais de virulência e atividade enzimática, sendo possivelmente sugeridos para utilizações futuras em formulações fúngicas ou mesmo teste *in vivo*. Em relação ao processo de reisolamento, de maneira geral, uma passagem por *R. microplus* foi capaz de alterar minimamente as características avaliadas. Todavia, isolados como Bb 02 e CG 500 merecem destaque, uma vez que Bb 02 foi capaz de duplicar o percentual de controle, bem como elevar significativamente todos os níveis de atividades enzimáticas estudados. Em contrapartida, CG 500 apresentou intensa redução de todos os parâmetros em função do reisolamento de *R. microplus*.

Dentro deste âmbito, estudos com números maiores de passagens pelo hospedeiro-alvo talvez possam propiciar resultados mais relevantes em função da alteração de morfologia, virulência e atividade enzimática. Além disto, com o advindo da biologia molecular, observa-se que a engenharia genética pode auxiliar na seleção e na produção de micro-organismos que encontrem-se cada vez mais capacitados para o desafio fúngico que é a colonização de artrópodes.

## 7 CONCLUSÕES

Após todas as avaliações, foi possível concluir do presente trabalho que:

- Os isolados brasileiros avaliados de *Beauveria bassiana* apresentaram diferenças morfológicas, de virulência e enzimáticas quando comparados entre si;
- O processo de reisolamento em *Rhizoglyphus microplus* (uma passagem) alterou em pequena escala a morfologia e virulência dos diferentes isolados de *B. bassiana* após reisolamento;
- A atividade enzimática sofreu influência através do processo de uma passagem por *R. microplus*, principalmente as atividades de Pr2 e lipásica;
- De maneira geral, não foi observado relação entre a virulência e atividade enzimática para os isolados fúngicos avaliados neste experimento.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998, 1163p.
- ANDERSEN, S. O. Biochemistry of the insect cuticle. **Annual Reviews**, v. 24, p. 29-61, 1979.
- ANGELO, I.C.; FERNANDES, E.K.K.; BAHIENSE, T.C.; PERINOTTO, W.M.S.; MORAES, A.P.R.; TERRA, A.L.M.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 317–322, 2010.
- ARRUDA, W. **Caracterização molecular e morfofisiológica de diferentes isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e análise morfológica do processo de infecção em *Boophilus microplus***. 2005. 144p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- BARCI, L. A. G.; ALMEIDA, J. E. M.; NOGUEIRA, A. H. C. ZAPPELINI, L. O.; PRADO, A. P. Seleção de isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) para o controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 7-13, 2009.
- 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.
- BARROS-BATESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, H. G. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação das espécies**. 1 ed., São Paulo, SP: Butantã, 2006, 223p.
- BENNETT, G. F. Ovoposition of *Boophilus microplus* (CANESTRINI) (ACARIDA: IXODIDAE) I. Influence of tick size on egg production. **Acarologia**, v. 16, 1974.
- BEYER, W. F.; FRIDOVICH, I. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. **Analytical Biochemistry**, v. 161, p. 559-566, 1987.
- BEYS-DA-SILVA, W. O. **Lipases de *Metarhizium anisopliae*: purificação parcial, regulação e secreção durante o processo de infecção do carrapato bovino *Boophilus microplus***. 2005. 96p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2005.
- 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. Regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Experimental Mycology**, v.13, p. 161-168, 1988.

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.

BIDOCHKA, M.J.; KHACHATOURIANS, G.G. Protein hydrolysis in grasshopper cuticles by entomopathogenic fungal extracellular proteases. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 63, p. 7-13, 1994.

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.; PERALVA, S. L. F. S.; VIEGAS, E. C.; ALVES, S. B. Avaliação dos efeitos do contato de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. com ovos e larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 5, p. 81-84, 1996.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; PERALVA, S. L. F. S.; SOUZA, E. J.; MASCARENHAS, A. G.; ALVES, S. B. Ação de dois isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* sobre algumas características biológicas de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* em laboratório. **Revista Universidade Rural, Série Ciência da Vida**, v. 19, p. 65-71, 1997.

BLOMQUIST G. J.; NELSON D. R.; RENOBALLES M. Chemistry, biochemistry and physiology of insect cuticular lipids. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 6, p. 227-265, 1987

BOYCEV, D.; RIZVANOV, K. Relation of *Botrytis cinerea* to ixodid ticks. **Zoologie Zeitschrift Ukranien**, v. 39, p. 460, 1960.

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

BROWNBRIDGE, M.; COSTA, S.; JARONSKI, S.T. Effects of *in vitro* passage of *Beauveria bassiana* on virulence to *Bemisia argentifolii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 77, p. 280–283, 2001.

BUTT T. M.; ST. LEGER R. J.; LEAL S. C. M.; KERRY B. R. Variation in the subtilisins of fungal pathogens of insects and nematodes. In: Couteaudier BP, Clarkson J. **Molecular variability of fungal pathogens**, CAB International: Wallingford 1998. p. 149-169.

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

CAMARGO, M.G.; 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.

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

CARNEIRO, M. E.; MONTEIRO, S. G.; DAEMON, E.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Effects of isolate 986 of the fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., on eggs of the tick *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 8, p. 59-62, 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.

CHASE, A. R.; OSBORNE, I. S.; FERGUSON, V. M. Selective isolation of the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, from an artificial pouring medium. **Florida Entomologist**, v. 69, p. 285-292, 1986.

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

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

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.

COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de Micro-organismos: Revisão. **Revista de Microbiologia**, v.22, p. 263-268, 1991.

CRUZ, M. C. B. **Produção de lipases por fermentação submersa suplementada com óleos vegetais e resíduo agroindustrial pelo fungo *Beauveria bassiana***. 2009. 101p., Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Londrina. Londrina.2009.

DE HOOG, G.S. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. **Studies in Mycology**, n.1, p.1-41, 1972.

DHAR, P.; KAUR, G. Production of cuticle - degrading proteases by *Beauveria bassiana* and their induction in different media. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 4, p. 65-72, 2010.

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

DUNN, B. M. Determination of protease mechanism. In: Beynon, R. J. and Bond, J. S. **Proteolytic enzymes: a practical approach**. IRL Press: Oxford University. 1994. p. 57 - 82.

FANG W.; FENG J.; FAN Y.; ZHANG Y.; BIDOCHKA M. J.; ST. LEGER R. J.; PEI Y. Expressing a fusion protein with protease and chitinase activities increases the virulence of the insect pathogen *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 102, p. 155-159, 2009.

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 Environ Microbiology**, v. 71, p. 363-370, 2005.

FARIA, M. R.; WRIGHT, 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.

FENG, M. G. Reliability of extracellular protease and lipase activities of *Beauveria bassiana* isolates used as their virulence indices. **Acta Microbiologica Sinica**, v. 38 p. 461-467, 1998.

FERNANDES, E. K. K. **Caracterização e seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle microbiano do carrapato *Boophilus microplus***. 2007. 130p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária. Seropédica. 2007.

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

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

FERNANDES, E. K. K.; ANGELO, I. C.; RANGEL, D. E. N.; BAHIANSE, 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.

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.

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

GÔLO, P. S. *Metarhizium* spp.: caracterização de isolados com potencial para biocontrole de pragas. 2014. 116p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2014.

GOLO, P.S.; ANGELO, I.C.; CAMARGO, M.G.; PERINOTTO, W.M.S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Effects of destruxin A on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, in press, 2011.

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

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

GOODAY, G. H.; ZHU, W. Y.; DONNELL, R. W. What are the roles of chitinases in the growing fungus? **FEMS Microbiology Letters**, v. 100, p. 387-392, 1992.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. D.; LEON, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potencial economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, p. 150-156, 2014.

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

GUPTA, S.C.; LEATHERS, T.D.; EL-SAYED, G.N.; IGNOFFO, C.M. Insect cuticle-degrading enzymes from the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*. **Experimental Mycology**, v. 16, p. 132-137, 1992.

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

GUPTA, S. C.; MONTLOR, C.; HWANG, Y-S. Isolation of novel Beauvericin analogues from the fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 733-738, 1995.

HADAPAD, A. B; ZEBITZ, C.P. Mass production, survival and evaluation of solid substrate inocula of *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch against *Holotrichia serrata* (Coleoptera: Scarabaeidae). **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, v.71, p. 433-441, 2006.

- HAMILL, R.L.; HIGGENS, G.E.; BOAZ, H.E.; GORMAN, M. The structure of beauvericin, a new desipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. **Tetrahedron Letter**, v. 49, p. 4255–4258, 1969.
- HEGEDUS, D. D.; KHACHATOURIANS, G. G. Production of an extracellular lipase by *Beauveria bassiana*. **Biotechnology Letters, Dordrecht**, v.10, p.637-642, 1988.
- HORN, S. C.; ARTECHE, C. C. P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 4, p. 12-32, 1985.
- HUMBER, R. A. Hurricane warning! How changed nomenclatural rules affect fungal entomopathogens. In: **Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology**, 45 th, 2012, Buenos Aires: SIP, 2012. p. 106-106.
- ITO E. T.; VAREA-PEREIRA G.; MIYAGUI D. T.; PINOTTI M. H. P.; NEVES P. M. O. J. Production of Extracellular Protease by a Brazilian Strain of *Beauveria bassiana* Reactivated on Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 217-223, 2007.
- 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.
- 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.
- KIRKLAND, B. H.; WESTWOOD, G. S.; KEYHANI, N. O. Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to ixodidae species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, p. 705-711, 2004.
- KRULL, R.; WUCHERPFENNING, T.; ESFANDABADI, M. E.; WALISKO, R.; MELZER, G.; HEMPEL, D. C.; KAMPEN, I.; KWADE, A.; WITTMANN, C. Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 112–123, 2013.
- LATGÉ, J. P. MONSIGNY M., PREVOST M. C. Visualization of exocellular lectins in the entomopathogenic fungus *Conidiobolus obscurus*. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 36, p. 1419-1424, 1988.
- LIU, H.; SKINNER, M.; BROWNBRIGDE, M.; PARKER, B.L. Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.82, p.139- 147, 2003.
- LUZ, C.; TIGANO, M. S.; SILVA, I. G.; CORDEIRO, C. M. T.; ALJANABI, S. M. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolate to control *Triatoma infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p.839-846, 1998.

MOHAMMADBEIGI, A. Virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) pasaged through artificial media and an insect host *Uvarovistia zebra* (Orthoptera: Tetigoniodae). **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**, v. 6, p. 147-152, 2013.

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

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

MWANGI, E. N.; KAAAYA, G. P.; ESSUMAN, S. Experimental infections of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* with entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, and natural infections of some ticks with bacteria and fungi. **Journal of African Zoology**, v. 109, p. 151-160, 1995.

NATURDATA. *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin. Disponível em: <<http://www.naturdata.com/Beauveria-bassiana-11867.htm>>. Acesso em: 18 de set. de 2014.

NEURATH, H. The Diversity of proteolytic enzymes. In: Beynon, R. J. and Bond, J. S. **Proteolytic enzymes: a practical approach**. IRL Press: Oxford University. 1994. p. 1 - 14.

PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; AZEVEDO, J.L. Variabilidade natural no fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. **Archives Biology Technology**, v.33, p.657-672, 1990.

PEDRINI, N.; CRESPO, R.; JUAREZ, M. P. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology and Pharmacology**. v. 146, p. 124-137, 2007.

PEREIRA, M. C. *Boophilus microplus: Revisão taxionômica e morfo-biológica*. 1980. 126f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro pelo Instituto de Ciências Biomédicas), 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.

PERINOTTO, W. M. S.; ANGELO, I. C.; CAMARGO, M. G.; QUINELATO, S.; SANTI, L.; VAINSTEIN, M. H.; BEYS-DA-SILVA, W. O.; SALLES, C. M. C.; BITTENCOURT, V. R. E. P. *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Moniliaceae) Pr1 activity: molecular marker of fungal virulence in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 24, p. 123-132, 2013.

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

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

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

PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MACDONALD, K. D.; BUFTON, A.W. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v.5, p.141-238, 1953.

POSADAS, J. B.; LEUCONA, R. E. Selection of Native Isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) for the Microbial Control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v.46, p. 284-291, 2009.

QUESADA-MORAGA, E.; VEY, A. Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**, v. 108, p. 441-452, 2004.

ROSAS-GARCÍA, N. M.; ÁVALOS-DE-LEÓN, O.; VILLEGAS-MENDOZA, J. M.; MIRELES-MARTÍNEZ, M.; BARBOZA-CORONA, J. E.; CASTAÑEDA-RAMÍREZ, J. C. Correlation between pr1 and pr2 Gene Content and Virulence in *Metarhizium anisopliae* Strains. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1495–1502, 2014.

REHNER, S. A. Phylogenetics of the insect pathogenic genus *Beauveria*. In: VEGA, F. E.; BLACKWELL, M. **Insect-fungal Association Ecology and Evolution**. New York: Oxford University Press, 2005.

REHNER, S. A.; BUCKLEY, E. A. *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. **Mycologia**, v. 97, p. 84-98, 2005.

REHNER, S. A.; MINNIS, A. M.; SUNG, G.; LUANGSA-ARD, J. J.; DEVOTTO, L.; HUMBER, R. A. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. **Mycologia**, v. 103, p. 1055-1073, 2011.

REIS, R. C. S.; MELO, D. R.; SOUZA, E. J. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Ação *in vitro* dos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok sobre ninfas e adultos de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 544-547, 2001.

RIDDELL, R.W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, v. 42, p. 265-270, 1950.

ROBERTS, D.W.; ST. LEGER, R.J. *Metarhizium spp.*, cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. **Advances in applied microbiology**, v. 54, p. 1-70, 2004.

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

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

SAMSINAKOVA, A. *Beauveria globulifera* (Speg.) Pic. Lako Parasit. Klistete *Ixodes ricinus*. **Zoologie List.**, v. 6, p. 329-30, 1957.

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. **Relação patógeno-hospedeiro: Análise bioquímica e proteômica da interação do fungo *Metarhizium anisopliae* e seus hospedeiros artrópodes**. 2009. 161p, Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2009.

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.

SCHAERFFENBERG, B. Biological and environmental conditions for the development of mycoses caused by *Beauveria* and *Metarhizium*. **Journal of Insect Pathology**, v. 6, p. 8–20, 1964.

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

SHAH, F. A.; ALLEN, N.; WRIGHT, C. L.; BUTT, T. M. Repetead in vitro subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 276, p.60-66, 2007.

SHAH, F.A.; WANG, C.S.; BUTT, T.M. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, p. 259–266, 2005.

SHIMIZU, S.; TSUCHITANI, Y.; MATSUMOTO, T. Serology and substrate specificity of extracellular proteases from four species of entomopathogenic hyphomycetes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.61, p.192-195, 1993.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2004, 408p.

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.

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

SONG, T. T.; FENG, M. G. *In vivo* passages of heterologous *Beauveria bassiana* isolates improve conidial surface properties and pathogenicity to *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 106, p. 211–216, 2011.

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

ST. LEGER R. J.; COOPER R. M.; CHARNLEY A. K. Production of cuticle degrading enzymes by the Entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Colliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. **Journal of general microbiology**, v. 133, p. 1371-1382. 1987a.

ST. LEGER, R.J.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K. Distribution of chymoelastases and trypsin-like enzymes in five species of entomopathogenic deuteromycetes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.258, p.123-131, 1987b.

ST. LEGER, R. J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. 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.; BIDOCHKA, M. J.; RIZZO, N. W.; ROBERTS, D. W. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca Sexta*) cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 907-912, 1996 b.

STAATS, C. C. **Estudo funcional de genes do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae***. 2007. 254p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2007.

SUGAHARA, V. H.; VARÉA, G.S. Immobilization of *Beauveria bassiana* lipase on silica gel by physical adsorption. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, p. 842-850, 2014.

SUN, M.; REN, Q.; GUAN, G.; LI, Y.; HAN, X.; MA, C.; YIN, H.; LUO, J. Effectiveness of *Beauveria bassiana* sensu lato strains for biological control against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in China. **Parasitology International**, v. 62, p. 412–415, 2013.

TIAGO, P. V.; SILVA, R. J. Atividade proteolítica de isolados de *Metarhizium anisopliae* sobre substratos cuticulares e não-cuticulares. **Ciência Rural**, v.37, p.26-30, 2007.

TIAN, G. F. Infecting and killing *Hyalomma detritum* with fungi. **Journal of Veterinary Science and Technology**, v. 7, p. 11-13, 1984.

TREMACOLDI, C. R. **Proteases e Inibidores de Proteases na Defesa de Plantas Contra Pragas**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2009. 44p.

- VARELA, A.; MORALES, E. Characterization of some *Beauveria bassiana* isolates and their virulence toward the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.67, p.147-152, 1996.
- VICENTINI, S.; FARIA, M.; 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.
- VIEIRA, I. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O. Determination of paracetamol in pharmaceutical products using a carbon paste biosensor modified with crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*). **Química Nova**, v. 26, p. 39-43, 2003.
- VINCENT, J. F. V.; WEGST, U. G. K. Design and mechanical properties of insect cuticle. **Arthropod Structure and Development**, v. 33, p. 187-199, 2004.
- 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.
- WANG, C.; TYPAS, M. A.; BUTT, T. M. Detection and characterization of pr1 virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 213, p. 251-225, 2002.
- WASTI, S. S.; HARTMANN, G. C. Experimental parasitization of larvae of the gypsy moth, *Porthetria dispar* (L.), with the entomogenous fungus, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. **Parasitology**, v. 70, p. 341-346, 1975.
- 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.
- WOODS, S. P.; GRULA, E. A. Utilizable surface nutrients on *Heliothis zea* available for growth of *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 43, p. 259-269, 1984.
- ZIBAE, A.; SADEGHI-SEFIDMAZGI, A.; FAZELI-DINAN, M. Properties of a lipase produced by *Beauveria bassiana*: purification and biochemical studies. **Biocontrol Science and Technology**, v. 21, p. 317-331, 2011.
- ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, 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.