



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE - UFAC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA –
CITA**

**FUNGOS DE SOLOS DA AMAZÔNIA COM POTENCIAL PARA O
CONTROLE DO CARRAPATO BOVINO *Rhipicephalus microplus*
(CANESTRINI, 1887)**

ATILON VASCONCELOS DE ARAÚJO

**RIO BRANCO - AC
2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE - UFAC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA –
CITA**

**FUNGOS DE SOLOS DA AMAZÔNIA COM POTENCIAL PARA O
CONTROLE DO CARRAPATO BOVINO *Rhipicephalus microplus*
(CANESTRINI, 1887)**

ATILON VASCONCELOS DE ARAÚJO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Inovação Tecnológica**.

Área de concentração: Ciência e Inovação Tecnológica.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Clarice Maia Carvalho

**RIO BRANCO - AC
2017**

© ARAÚJO, A. V., 2017.

ARAÚJO, Atilon Vasconcelos de. **Fungos de solos da Amazônia com potencial para o controle do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887)**. -- Rio Branco: Universidade Federal do Acre, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia - CITA, 2017. 72f.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

A663f Araújo, Atilon Vasconcelos de, 1990-

Fungos de solos da Amazônia com potencial para o controle do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* (Canestrini,1887) / Atilon Vasconcelos de Araújo. -- Rio Branco: Universidade Federal do Acre, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, 2017.

72f.: il.; 30 cm.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito para a obtenção do grau de *Mestre em Ciência e Inovação Tecnológica*.

Agostinho Sousa Crb11- 547

Rio Branco - Acre

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE - UFAC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA –
CITA

ATILON VASCONCELOS DE ARAÚJO

FUNGOS DE SOLOS DA AMAZÔNIA COM POTENCIAL PARA O CONTROLE DO
CARRAPATO BOVINO *Rhipicephalus microplus* (CANESTRINI, 1887)

Dissertação aprovada em: 27/01/2017

Prof.ª Dr.ª Clarice Maia Carvalho
Universidade Federal do Acre
Orientadora

Prof. Dr. Josimar Batista Ferreira
Universidade Federal do Acre
Membro da Banca Examinadora

Prof. Dr. Adalberto Hipólito de Souza
Universidade Federal do Acre
Membro da Banca Examinadora

AGRADECIMENTOS

À Deus por permitir a conclusão de mais uma fase da minha vida.

À minha família, especialmente a minha mãe Artemizia Secundes de Vasconcelos pelo apoio e incentivo fundamental para concretização dessa dissertação.

À professora Dra. Clarice Maia Carvalho pela orientação e sugestões fundamentais para a realização desse estudo e pela conclusão de mais uma etapa na minha formação acadêmica.

À professora Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt pelos ensinamentos e pela oportunidade de desenvolvimento dos bioensaios na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

À Ma. Sandra Albuquerque Lima Ribeiro pelo auxílio na identificação dos isolados.

À equipe do laboratório de microbiologia da Universidade Federal do Acre pela colaboração e incentivo, em especial à Susan Christina Braga Domingos e Geysel Souza Santos pela ajuda nos trabalhos de laboratório e pela amizade.

À equipe do Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela colaboração e experiência compartilhadas, em especial ao Caio Junior Balduino Coutinho Rodrigues, Mariana Guedes Camargo, Maria Clemente de Freitas, Jéssica Fiorotti de Paulo e Allan Felipe Marciano pela amizade e o auxílio durante a realização dos bioensaios.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia pela oportunidade e aos amigos de turma, especialmente Iriana Maria da Silva, Priscila Ferreira Wolter e Bruna da Costa Viana pelos incentivos.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Muito obrigado!

RESUMO

Os carrapatos da espécie *Rhipicephalus microplus* (CANESTRINI, 1887) afetam a saúde dos bovinos, ocasionando sérios prejuízos econômicos ao setor pecuário. A utilização contínua e indiscriminada de acaricidas para o controle destes parasitas tem favorecido a persistência de populações resistentes, gerando a necessidade de novas estratégias de controle. O controle com fungos entomopatógenos apresenta-se como alternativa potencial. Estes microrganismos expressam enzimas quitinolíticas, proteolíticas e lipolíticas fundamentais para o processo patogênico em artrópodes, sendo uma característica fundamental para a seleção de isolados da biodiversidade. A Região Amazônica abriga uma grande diversidade de microrganismos, constituindo uma fonte para o isolamento de fungos entomopatógenos. Esse estudo teve como objetivos isolar fungos de solos da Região Amazônica produtores de quitinases, avaliar a expressão de enzimas proteolíticas e lipolíticas e o potencial patogênico de isolados fúngicos contra larvas de *R. microplus*. Foi utilizada a técnica de diluição seriada em meio de cultura constituído de quitosana e casca de camarão como única fonte de carbono, tendo sido isolado 216 fungos, classificados em 134 táxons, e identificados isolados de *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Paecilomyces* sp., *Phoma* sp. e *Rhizopus* sp. Foi analisado o potencial proteolítico e lipolítico de 107 isolados, sendo observada expressão de proteases por 68 isolados e lipases por 35 isolados. Foi avaliada a patogenicidade *in vitro* de três isolados contra larvas de *R. microplus*, sendo registrada heterogeneidade de resposta entre os grupos tratados com os isolados 4.145 de *Paecilomyces* sp., 4.329 e 4.338 de *Aspergillus* sp. com índices de mortalidade referentes a 26,5%, 2,6% e 2%, respectivamente. Esses resultados indicam que os solos da Região Amazônica apresentam diversidade de fungos produtores de quitinases, protease e lipases com potencial para o controle de *R. microplus*.

Palavras-chave: enzimas hidrolíticas; entomopatógenos; *Aspergillus*; *Paecilomyces*.

ABSTRACT

Ticks of the species *Rhipicephalus microplus* (CANESTRINI, 1887) affect the health of the cattle, causing serious economic damages to the cattle sector. The continuous and indiscriminate use of acaricides to control these parasites has favored the persistence of resistant populations, generating the need for new control strategies. Control with entomopathogenic fungi presents as a potential alternative. These microorganisms express chitinolytic, proteolytic and lipolytic enzymes that are fundamental for the pathogenic process in arthropods, being a fundamental characteristic for the selection of biodiversity isolates. The Amazon Region harbors a great diversity of microorganisms, constituting a source for the isolation of entomopathogenic fungi. The objective of this study was to isolate fungi from Amazonian soils producing chitinases, to evaluate the expression of proteolytic and lipolytic enzymes and the pathogenic potential of fungal isolates against *R. microplus* larvae. Serial dilution technique was used in culture medium constituted of chitosan and shrimp shell as sole carbon source, and 216 fungi, classified in 134 taxa, were isolated and identified as isolated from *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Paecilomyces* sp., *Phoma* sp. and *Rhizopus* sp. The proteolytic and lipolytic potential of 107 isolates were analyzed, with expression of proteases by 68 isolates and lipases by 35 isolates. The in vitro pathogenicity of three isolates against *R. microplus* larvae was evaluated with response heterogeneity among the groups treated with isolates 4,145 of *Paecilomyces* sp., 4,329 and 4,338 of *Aspergillus* sp. with mortality rates of 26.5%, 2.6% and 2%, respectively. These results indicate that the soils of the Amazon Region show diversity of fungi producing chitinases, protease and lipases with potential for the control of *R. microplus*.

Keywords: hydrolytic enzymes; entomopathogens; *Aspergillus*; *Paecilomyces*.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1. Estrutura química da quitina..... 17

Capítulo I

Figura 1. Análise das características macro e micromorfológicas (Aumento de 40x) de fungos produtores de enzimas quitinolíticas isolados de solos da Amazônia..... 30

Figura 2. Percentual de isolados identificados em amostras de solo de cinco pontos distintos do Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre e em cinco Propriedades Rurais do Estado do Acre..... 31

Capítulo III

Figura 1. Variação da porcentagem de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* infectadas durante o período de dias pós-tratamento..... 53

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Revisão de Literatura

Quadro 1. Populações de <i>Rhipicephalus microplus</i> resistentes a acaricidas.....	13
Quadro 2. Fungos entomopatógenos avaliados como agentes para o controle biológico do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> ...	16
Quadro 3. Fungos produtores de enzimas com atividade quitinolíticas.....	18
Quadro 4. Fungos produtores de enzimas com atividade proteolítica.....	19
Quadro 5. Fungos produtores de enzimas com atividade lipolítica.....	20

Capítulo I

Tabela 1. Localização geográfica dos pontos de coleta de solo para isolamento de fungos.....	27
---	-----------

Capítulo II

Tabela 1. Número de referência do isolado fúngico, identificação taxonômica, valores médios e desvio padrão (mm) do halo de degradação enzimática produzido em meio ágar leite.....	40
Tabela 2. Número de referência do isolado fúngico, identificação taxonômica, valores médios e desvio padrão do halo de degradação enzimática produzido em meio ágar lipase	43

Capítulo III

Tabela 1. Porcentagem média de mortalidade de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> no 21º dia de tratamento expostas a diferentes concentrações de conídios dos isolados 4.329, 4.338 de <i>Aspergillus</i> sp. e 4.145 de <i>Paecilomyces</i> sp.....	52
---	-----------

SUMÁRIO

1. Introdução	10
2. Revisão de literatura	12
2.1 Carrapato bovino.....	12
2.2 Resistência aos acaricidas químicos.....	13
2.3 Fungos como agentes para o controle biológico de pragas.....	14
2.4 Principais enzimas envolvidas no processo de infecção por fungos entomopatógenos.....	16
2.4.1 Quitinases.....	17
2.4.2 Proteases.....	18
2.4.3 Lipases.....	19
2.5 Biopesticidas comerciais formulados com fungos.....	21
CAPÍTULO I	23
Resumo.....	24
Abstract.....	24
Introdução.....	25
Material e Métodos	27
Resultados e Discussão.....	28
Conclusão	33
CAPÍTULO II	34
Resumo.....	35
Abstract.....	35
Introdução.....	36
Material e Métodos	38
Resultados e Discussão.....	39
Conclusão	45
CAPÍTULO III	46
Resumo.....	47
Abstract.....	47
Introdução.....	48
Material e Métodos	50
Resultados e Discussão.....	52
Conclusão	54
3. Conclusões Gerais	55
4. Referências Bibliográficas	56

1. INTRODUÇÃO

Os carrapatos da espécie *Rhipicephalus microplus* (CANESTRINI, 1887), conhecidos popularmente como carrapatos bovinos, são ectoparasitas classificados na família Ixodidae, que afetam a saúde, o bem-estar e a produção dos animais parasitados (SONENSHINE et al., 2002), sendo responsáveis por sérios prejuízos econômicos ao setor pecuário em diversos países.

As infestações pelo carrapato *R. microplus* geram sérios danos à saúde, o bem-estar e o rendimento produtivo dos bovinos. Esses parasitas causam danos ao couro dos animais, redução do ganho de peso, queda na produção de leite e provocam gastos com medidas de controle, que geram perdas econômicas estimadas em 3,24 bilhões de dólares para o setor pecuário no Brasil (GRISI et al., 2014), sendo fundamental o desenvolvimento de estratégias de controle.

Com a finalidade de reduzir esses prejuízos econômicos, os acaricidas sintéticos são extensivamente utilizados como medida primária para o controle do carrapato bovino (ABBAS et al., 2014). No entanto, a utilização contínua e indiscriminada dessas substâncias tem favorecido a deposição de resíduos químicos no ambiente e nos produtos de origem animal (WILLADSEN, 2006; RECK et al., 2014; WEBSTER et al., 2015) e, principalmente, a seleção de populações de *R. microplus* resistentes (FERNÁNDEZ-SALAS et al., 2012; MILLER et al., 2013; CUTULLÉ et al., 2013; JANER et al., 2015), reduzindo ou inviabilizando o controle com a utilização de acaricidas.

Essa redução da eficiência do controle do carrapato bovino, desperta a necessidade por estudos científicos que estabeleçam métodos alternativos de controle. O controle biológico de pragas consiste, basicamente, na utilização de inimigos naturais, incluindo distintos grupos de microrganismos como os fungos entomopatógenos que podem infectar diferentes estágios de vida dos carrapatos (WASSERMANN et al., 2016), destacando-se como uma alternativa potencial para o controle de pragas.

Os fungos entomopatógenos apresentam grande potencial para utilização no controle biológico do carrapato bovino. Esses microrganismos desenvolveram diversos mecanismos para penetrar e invadir a cutícula do carrapato, como a adesão dos conídios aéreos na cutícula do hospedeiro, germinação dos conídios na cutícula, produção de enzimas hidrolíticas e estruturas físicas que podem causar a infecção e morte do hospedeiro (CAMPOS et al., 2005), reduzindo a população de pragas no ambiente.

A produção de metabólitos com atividade enzimática é uma característica fundamental para o processo de infecção pelos fungos entomopatógenos. Estes microrganismos sintetizam enzimas lipolíticas durante os primeiros estágios de infecção, permitindo a adesão e a germinação dos conídios na superfície da cutícula do carrapato (CHARNLEY, 2003), sendo uma característica relacionada com a patogenicidade.

Durante esse processo patogênico também são expressas enzimas quitinolíticas e proteolíticas. As quitinases permitem a degradação da quitina, enquanto a síntese de proteases possibilita a degradação da matriz proteica, considerados os principais componentes estruturais rígidos da cutícula do *R. microplus* (GORTARI; HOURS, 2008), permitindo a penetração na cutícula do carrapato *R. microplus* e a obtenção de nutrientes para o desenvolvimento do fungo.

Apesar desse potencial biotecnológico, são praticamente inexistentes estudos científicos que selecionem isolados da biodiversidade Amazônica produtores de quitinase, proteases e lipases com potencial uso para o controle do carrapato bovino. Assim, esse estudo teve como objetivo avaliar a patogenicidade de fungos produtores de quitinases, proteases e lipases isolados de amostras de solos da Amazônia frente larvas do carrapato *R. microplus* a.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Carrapato bovino

Os carrapatos da espécie *Rhipicephalus microplus* (CANESTRINI, 1887), conhecidos popularmente como carrapatos bovinos, são artrópodes, ectoparasitas, classificados na família Ixodidae (SONENSHINE et al., 2002). Os carrapatos *R. microplus* são transmissores de agentes infecciosos, como *Anaplasma marginale* e *Babesia bovis* (FERNANDES et al., 2012), sendo importantes para a saúde pública e para a medicina veterinária por causarem sérios danos à saúde e produção animal.

R. microplus apresentam-se distribuídos, principalmente, nas regiões tropicais e subtropicais, sendo inicialmente encontrado parasitando bovinos na Ásia, em regiões como a Índia e Indonésia, e posteriormente disseminados para regiões tropicais e subtropicais, como América Central e América do Sul, tornando-se a praga mais predominante em muitos agrossistemas (LÉGER et al., 2013).

O ciclo biológico do carrapato *R. microplus* compreende fases distintas. A fase parasitária tem início com as larvas de *R. microplus* parasitando o hospedeiro susceptível, tendo duração média de 21 dias (SONENSHINE et al., 2002). As larvas desenvolvem-se e evoluem para o estágio de ninfa, adultos, ocorrendo a diferenciação sexual e a cópula (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008).

Durante a fase de vida livre os carrapatos *R. microplus* estão susceptíveis as condições do ambiente. Nesta fase as fêmeas adultas fecundadas desprendem-se do hospedeiro parasitado e realizam a ovoposição no ambiente, ocorrendo a eclosão dos ovos em condições específicas de temperatura (≥ 25 °C) e umidade ($\geq 80\%$) (D'ALESSANDRO et al., 2014).

Estes parasitas na fase adulta apresentam morfologia externa que permite a diferenciação sexual. As fêmeas apresentam o escudo dorsal, uma estrutura rígida, limitado a cobertura da metade anterior da superfície dorsal, permitindo a enorme expansão do corpo da

fêmea observada durante a ingestão de sangue na fase parasitária, enquanto os machos apresentam escudo dorsal amplo que limita a expansão (SONENSHINE et al., 2002).

Os carrapatos *R. microplus* são responsáveis por impactos econômicos negativos na pecuária, causam danos no couro dos animais parasitados, transmitem patógenos, provocam gastos com carrapaticidas e reduzem a produção de leite e o ganho de peso dos animais, gerando perdas anuais estimadas em 3,24 bilhões de dólares para o setor produtivo no Brasil (GRISI et al., 2014), sendo fundamental o desenvolvimento de medidas de controle.

Como método primário de controle do carrapato bovino são utilizados carrapaticidas químicos, que garantem rápida supressão da população desses parasitas, sendo frequentemente empregados de forma indiscriminada (ABBAS et al., 2014), reduzindo a eficiência dessas substâncias para o controle do carrapato bovino.

2.2. Resistência aos acaricidas químicos

A redução da eficiência dos carrapaticidas químicos disponíveis no mercado constitui um sério problema para o controle do carrapato bovino. O uso indiscriminado dessas substâncias exerce uma pressão de seleção no ambiente que favorece a persistência de populações resistentes (Quadro 1), sendo um grande desafio para o controle do carrapato bovino em diversos países.

Quadro 1. Populações de *Rhipicephalus microplus* resistentes a acaricidas.

Princípio ativo	País	Autor
Fipronil	Brasil	CASTRO-JANER et al., 2010
Organofosforados, Piretróides, Amitraz e Ivermectina	México	FERNÁNDEZ-SALA et al., 2012
Fipronil, Permetrina, Coumafós e Amitraz	México	MILLER et al., 2013
Amitraz e Piretróides	Argentina	CUTULLÉ et al., 2013
Cipermetrina, Clorpirifós, Fipronil, Amitraz e Ivermectina	Brasil	RECK et al., 2014
Fipronil e Lindane	Uruguai e Brasil	JANER et al., 2015

A utilização indiscriminada dessas substâncias provoca sérios prejuízos para o setor de alimentos. A deposição de resíduos no ambiente e nos produtos de origem animal, como a carne

e o leite, prejudicam o setor produtivo de alimentos, que busca atender à crescente demanda de consumidores que exigem alimentos livres de substâncias químicas potencialmente prejudiciais à saúde humana (WEBSTER et al., 2015).

Os carrapatos bovinos também desenvolvem resistência adaptativa. Essa característica permite que algumas populações desse parasita sobrevivam aos efeitos dos acaricidas por meio de mutações nos locais de ações dessas substâncias ou por resistência metabólica provocada por alterações genéticas permitindo a síntese de enzimas de detoxicação (ROBBERTSE et al., 2016), limitando ou inviabilizando o controle do carrapato *R. microplus*.

A persistência de *R. microplus* resistentes no ambiente e a inviabilidade do controle com carrapaticidas químicos geram a necessidade de métodos alternativos para controle desse parasita. O controle biológico de pragas baseado na utilização de microrganismos destaca-se como uma alternativa potencial (RECK et al., 2014).

2.3. Fungos como agentes para o controle biológico de pragas

O controle biológico de pragas é uma estratégia que consiste basicamente na utilização de inimigos naturais, incluindo distintos grupos de microrganismos como os fungos entomopatógenos, capazes de infectar hospedeiros susceptíveis e reduzir a população de pragas (GOLDSON et al., 2014), diminuindo as perdas econômicas que afetam o setor produtivo.

Algumas espécies de microrganismos apresentam potencial para o controle biológico de pragas. Agostino Bassi's em 1835 descreveu pela primeira vez a infecção em insetos causada por isolado de *Beauveria bassiana* (CHARNLEY, 2003), indicando a potencial aplicação desses fungos para o controle biológico de pragas.

Posteriormente, os fungos que apresentavam essa característica foram classificados como entomopatógenos, sendo agrupadas diversas espécies, como *Metarhizium anisopliae*, capazes de infectar hospedeiros susceptíveis por meio da penetração direta da cutícula (ORTIZ-URQUIZA; KEYHANI, 2013).

Os fungos entomopatogênicos evoluíram e desenvolveram estratégias distintas para infectar os hospedeiros susceptíveis. A capacidade de germinar na superfície da cutícula do hospedeiro e produzir estruturas especializadas de penetração denominadas de apressórios (CAMPOS et al., 2005), são algumas das características essenciais para o processo de infecção.

Diversos fatores são fundamentais para que ocorra a infecção. Condições bióticas como alta umidade são necessárias para germinação e esporulação dos conídios aéreos do fungo no ambiente, sendo capazes de causar infecção sem a necessidade de serem ingeridos (CHARNLEY, 2003), podendo infectar diferentes estágios de vida do hospedeiro como ovos e larvas.

O ciclo de vida do fungo entomopatógeno é completo quando os conídios aéreos são liberados no ambiente. A produção desses conídios no cadáver do hospedeiro e a liberação no ambiente permite a transmissão da infecção na população praga (CHARNLEY, 2003), permitindo que o fungo sobreviva durante longos períodos em condições ambientais adversas e reduza as populações pragas.

Diante desse potencial, a utilização de microrganismos foi avaliada para o controle de pragas. Estudos prévios avaliaram isolados de *Beauveria bassiana* como agente para o controle de insetos das espécies *Triatoma infestans*, vetor da doença de Chagas (FORLANI et al., 2015), *Spodoptera litura* (GUPTA; KUMAR, 2014) e como alternativa para o controle de insetos do gênero *Cosmopolites sordidus* (FANCELLI et al., 2013).

Estudos anteriores avaliaram o potencial de fungos do gênero *Metarhizium anisopliae* com uma alternativa viável para o controle biológico de populações de *Loxosceles* sp., conhecida popularmente como aranha-marrom (BEYS-DA-SILVA et al., 2013), do inseto *Dysdercus peruvianus*, responsável por perdas nas plantações de algodão (SANTI et al., 2011) e, também, do mosquito da espécie *Aedes aegypti* transmissor do vírus da dengue (GARZA-HERNÁNDEZ et al., 2015).

Algumas espécies de fungos também apresentam potencial uso para o controle biológico do carrapato bovino (Quadro 2). Foi registrada a ocorrência desses entomopatógenos em condições naturais parasitando fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (COSTA et al., 2002) indicando que a infecção por esses parasitas pode ocorrer por meio do contato direto com conídios aéreos liberados no ambiente.

Quadro 2. Fungos entomopatógenos avaliados como agentes para o controle biológico do carrapato *Rhipicephalus microplus*.

Fungo avaliado	Autor
<i>Beauveria amorfa</i> e <i>Beauveria bassiana</i>	CAMPOS et al., 2005
<i>Beauveria</i> sp.	FERNANDES et al., 2011
<i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i>	REN et al., 2012
<i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i>	PERINOTTO et al., 2012
<i>Metarhizium anisopliae</i>	WEBSTER et al., 2015

Os fungos pertencentes às espécies *B. bassiana* e *B. amorpha* apresentam a habilidade de ataque a cutícula, aderência a superfície do hospedeiro susceptível e diferenciação dos tubos germinativos em apressórios (CAMPOS et al., 2005), expressando enzimas durante esse processo de infecção que permitem a penetração do fungo na cutícula de carrapatos da espécie *R. microplus*.

2.4. Principais enzimas envolvidas no processo de infecção por fungos entomopatógenos

Os fungos entomopatógenos são microrganismos heterotróficos. Esses microrganismos podem absorver componentes orgânicos disponíveis no hospedeiro por meio da degradação da cutícula, constituída basicamente por quitina e proteínas (VEGA et al., 2012), obtendo os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento.

Algumas espécies de fungos desenvolveram mecanismos distintos de infecção. A formação de estruturas especializadas de infecção e a produção de enzimas hidrolíticas, como quitinases, proteases e lipases, permitem a germinação e o desenvolvimento dos fungos através da superfície do hospedeiro e subsequentemente penetração nas camadas da cutícula (ORTIZ-URQUIZA; KEYHANI, 2013), sendo as enzimas essenciais para esse processo.

As enzimas são formadas por proteínas e apresentam atividades catalíticas. Essas moléculas possibilitam a ocorrência de reações metabólicas de forma eficiente em condições compatíveis com a atividade celular, sem requerer condições extremas de pH, pressão e temperatura (NAJAFPOUR, 2015), sendo capazes de aumentar reações biológicas fundamentais para os organismos vivos. Portanto, o conhecimento sobre esses grupos de enzimas sintetizadas por fungos durante o processo de infecção é fundamental para decifrar o potencial desses microrganismos para o controle biológico de pragas.

2.4.1. Quitinases

As quitinases são enzimas que catalisam a degradação de quitina (Figura 1) um homopolímero linear insolúvel. Essas enzimas são formadas por ligações do tipo β -1,4 de monômeros de 2-acetoamino-2-desoxi-D-glicopiranosose N-acetilglicosamina – NacGlc ou NAG, em componente monomérico (RINAUDO, 2006).

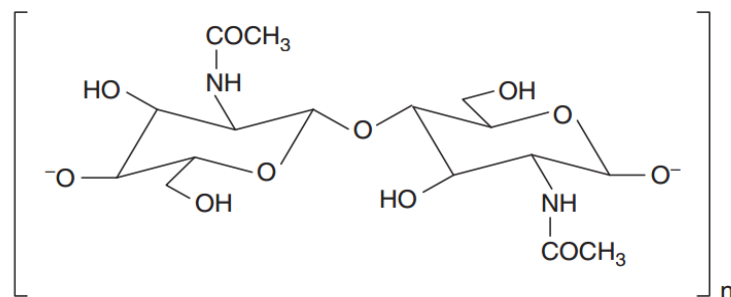


Figura 1. Estrutura química da quitina.

Fonte: Cohen, 2010.

A quitina é um biopolímero abundante na natureza. Esse biopolímero é o principal componente estrutural do exoesqueleto de invertebrados e da parede celular de fungos (RINAUDO, 2006). Algumas espécies fúngicas possuem a habilidade de degradar a quitina presente na cutícula de artrópodes, por meio da produção de enzimas quitinolíticas (CAMPOS et al., 2005), obtendo componentes essenciais para sua nutrição.

Diferentes grupos de organismos sintetizam enzimas quitinolíticas (Quadro 3). Estudos prévios descrevem a expressão dessas enzimas por isolados de bactérias (GABER et al., 2016;

YANG et al., 2016), fungos (PATIL; JADHAV, 2015; FARAG et al., 2016), insetos (KRAMER; MUTHUKRISHNAN, 1997) e plantas (SPANÒ et al., 2015; SYTWALA et al., 2015), constituindo um vasto campo de possibilidades para a bioprospecção.

Quadro 3. Fungos produtores de enzimas com atividade quitinolítica.

Fungo produtor de quitinases	Autor
<i>Metarhizium anisopliae</i>	KANG et al., 1999
<i>Trichoderma harzianum</i>	NAMPOOTHIRI et al., 2004
<i>Beauveria bassiana</i>	CAMPOS et al., 2005
<i>Penicillium</i> sp.	LEE et al., 2009
<i>Verticillium lecanii</i>	RAMIREZ-COUTIÑO et al., 2010

A produção de quitinases pode ser induzida pela disponibilidade do substrato no meio onde o microrganismo desenvolve-se. A síntese dessas enzimas pode ser suprimida quando o crescimento do microrganismo ocorre em meio enriquecidos com diferentes fontes de carbono e nitrogênio, sendo induzida em meio mínimo suplementado com quitina como única fonte de carbono (FOLDER et al., 2001).

As enzimas quitinolíticas apresentam potencial para uso no controle biológico de pragas. Estudo prévios com a enzima quitinase purificada, sintetizada por isolado de *Penicillium ochrochloron* inibiu o crescimento de larvas de *Helicoverpa armigera* em diferentes concentrações (PATIL; JADHAV, 2015), sugerindo o potencial biotecnológico dessa enzima.

Fungos do gênero *B. bassiana* e *B. amorpha* podem expressar enzimas quitinolíticas em meio de cultivo específico. Esses isolados podem produzir quitinases em meios de cultivo constituídos por quitina e cutícula do carrapato *R. microplus* como fonte de carbono (CAMPOS et al., 2005), indicando a relação direta da expressão dessas enzimas com a patogenicidade e virulência desses microrganismos.

2.4.2. Proteases

As proteases são uma das mais importantes enzimas de interesse para a indústria biotecnológica. Essas enzimas contribuem para diversas reações químicas e bioquímicas

hidrolisando ligações peptídicas presentes em proteínas degradando-as em pequenos peptídeos e aminoácidos e podem ser obtidas de diversas fontes naturais, como os microrganismos (NOVELLI et al., 2016).

As proteases microbianas têm sido frequentemente estudadas (Quadro 4). Existe o interesse biotecnológico em descobrir novas enzimas proteolíticas com diferentes características para atender o crescimento rápido das indústrias baseadas no uso de enzimas, bem como a otimização dos métodos empregados para a sua purificação (FIROUZBAKHT et al., 2015).

Quadro 4. Fungos produtores de enzimas com atividade proteolítica.

Fungo produtor de proteases	Autor
<i>Metarhizium anisopliae</i>	LEGER et al., 1987
<i>Acremonium</i> sp.	NASCIMENTO et al., 2015
<i>Beauveria</i> sp.	FIROUZBAKHT et al., 2015
<i>Arthrobotrys musiformis</i>	TZEAN et al., 2016

A expressão de enzimas proteolíticas desempenha um papel importante na patogênese de algumas espécies fúngicas. Isolados de *Metarhizium anisopliae* expressam essas enzimas, garantindo a degradação enzimática da cutícula do hospedeiro susceptível, constituída, basicamente, por uma matriz proteica (LEGER et al., 1986).

A produção de enzimas com atividade proteolítica pode ser induzida de acordo com o meio de cultivo. Isolados de *B. bassiana* e *B. amorpha* expressam quitinases quando cultivados em meio constituído com a cutícula do carrapato (CAMPOS et al., 2005), indicando que essas enzimas desempenham papel fundamental na adaptação, patogenicidade e virulência desses fungos.

A atividade catalítica das enzimas proteolíticas é essencial para a degradação dos componentes proteicos que constituem a cutícula. A expressão dessas enzimas é considerada como fator de virulência para algumas espécies de fungos patogênicos (YIKE, 2011), sendo uma característica fundamental para a seleção de fungos presentes na natureza com potencial uso para o controle biológico.

Enzimas proteolíticas são fundamentais para a indústria biotecnológica. Proteases são utilizadas especialmente para produção de detergentes, alimentos e medicamentos, sendo responsáveis por 60% do mercado global de enzimas, estimado em 3 bilhões de dólares, que inclui a comercialização de proteases obtidas de isolados fúngicos, como o produto Protease P produzido pela Amano de isolado de *Aspergillus* sp. (VELOORVALAPPIL et al., 2013).

2.4.3. Lipases

As lipases são hidrolases capazes de catalisar a quebra de triglicerídeos em diglicerídeos, monoglicerídeos, glicerol e ácidos graxos (SOMMER et al., 1997). São importantes fatores envolvidos na virulência e nos mecanismos de infecção de alguns fungos patogênicos (BEYS-DA-SILVA et al., 2010), sendo sintetizadas por diversas espécies de fungos (Quadro 5).

Quadro 5. Fungos produtores de enzimas com atividade lipolítica.

Fungo produtor de lipases	Autor
<i>Metarhizium anisopliae</i>	SILVA et al., 2005
<i>Penicillium simplicissimum</i>	GUTARRA et al., 2009
<i>Nomuraea rileyi</i>	SUPAKDAMRONGKUL et al., 2010
<i>Aspergillus</i> sp.	COLLA et al., 2016
<i>Candida rugosa</i> e <i>Geotrichum candidum</i>	MORAIS et al., 2016

As lipases desempenham importante papel na patogênese dos fungos. Os lipídios presentes na cutícula do hospedeiro são os primeiros componentes envolvidos na adesão dos conídios na superfície do hospedeiro susceptível (JARROLD et al., 2007). Essas enzimas são expressas pelos fungos durante as etapas iniciais de infecção.

Estudo anterior indicou a importância da atividade lipolítica de fungo da espécie *M. anisopliae* durante os primeiros estágios do processo de infecção. Os conídios aéreos desse isolado foram tratados previamente com um inibidor de lipases, denominado ebelacton B, que preveniu a infecção no carrapato *R. microplus* (BEYS-DA-SILVA et al., 2010).

Os lipídios podem ser utilizados pelos fungos como substrato para o seu desenvolvimento. Os lipídios extraídos da cutícula de carrapatos *R. microplus* em testes *in vitro* estimularam significativamente a germinação de conídios e o desenvolvimento de apressórios

em isolados de *M. anisopliae* (MENT et al., 2010), sugerindo que esses isolados podem utilizar os lipídios como fonte de energia por meio da produção de enzimas lipolíticas.

2.5. Biopesticidas comerciais formulados com fungos

A produção de biopesticidas formulados com fungos é um grande desafio. São necessários estudos científicos que esclareçam os mecanismos de patogênese dos fungos, os fatores que influencia a persistência dos isolados no ambiente e a produção de enzimas sintetizadas durante o processo de invasão da cutícula do hospedeiro (CHARNLEY, 2003), contribuindo para o desenvolvimento de bioprodutos comerciais eficientes.

Os biopesticidas apresentam grande potencial comercial. O mercado global de biopesticidas apresentou vendas estimadas em 1 bilhão de dólares em 2010, com crescimento aproximado de 10% anual, embora exista grande variação entre países devido a leis de regulamentação, ações públicas e políticas, e limitações para a expansão desse mercado (BAILEY et al., 2010).

O primeiro agente utilizado para o controle de pragas produzido em massa foi isolado de *M. anisopliae* em 1888, sendo utilizado para o controle de *Cleonus punctiventris* e posteriormente, em 1965, foi desenvolvido o Boverin, um micoinseticida produzido com isolado de *B. bassiana* (FARIA; WRAIGHT, 2007).

O mercado mundial de micoacaricidas ainda é restrito. Foram desenvolvidos mundialmente cerca de 171 micoinseticidas e micoacaricidas no decorrer dos últimos anos, sendo indicados apenas três produtos para o controle do carrapato, correspondendo aos produtos Tick-EX EC (Novozymes Biologicals Inc., USA), Metazam (Escuela Agricola Panamericana, Honduras) e Metarril SC 1037 (Itaforte Industrial de Bio-Produtos Agro-Florestais Ltda., Brasil) (FARIA; WRAIGHT, 2007).

O controle biológico do carrapato com fungos é uma ferramenta promissora. No entanto, são necessárias pesquisas que investiguem isolados com características ideais para essa

finalidade, os mecanismos envolvidos na infecção, a diversidade de enzimas produzidas, função desempenhada no processo de patogenicidade, desenvolvimento de novos meios de produção, aplicação e estabilidade (FERNANDES et al., 2011), sendo um grande desafio a exploração biotecnológica de fungos para o controle biológico do carrapato *R. microplus*.

CAPÍTULO I

Diversidade de fungos de solos da Amazônia produtores de quitinases

Capítulo I - Diversidade de fungos de solos da Amazônia produtores de quitinases

RESUMO

O solo é um ambiente comumente habitado por uma grande riqueza de microrganismos. Amostras de solo provenientes de ambientes com diferentes características apresentam potencial para abrigarem espécies de fungos com adaptações distintas. Dessa forma, fungos de diferentes regiões apresentam potencial para produção de compostos distintos para garantir a sua persistência, como enzimas adequadas para degradação do substrato disponível, sendo esses compostos de interesse biotecnológico. Esse estudo teve como objetivo avaliar a diversidade de fungos isolados de amostras de solos da Amazônia produtores de quitinases. Foram isolados 216 fungos, sendo 81 de solo de cinco pontos distintos do Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre e 135 de cinco propriedades rurais localizadas no estado do Acre. Para o isolamento foi utilizada a técnica de diluição seriada e as amostras inoculadas em meio de cultura constituído de quitosana e casca de camarão como única fonte de carbono. Os isolados foram classificados em 134 táxons distintos, e por meio da observação das características macro e micromorfológicas foram identificados fungos pertencentes aos gêneros *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Phoma* e *Rhizopus*. Esses resultados indicam que o solo da Amazônia abriga grande diversidade de espécies com potencial biotecnológico ainda pouco explorado.

Palavras chave: enzimas quitinolíticas, *Paecilomyces*, *Acremonium*, *Phoma*.

ABSTRACT

Soil is an environment commonly inhabited by a wealth of microorganisms. Soil samples from environments with different characteristics have the potential to house fungal species with different adaptations. Thus, fungi from different regions present potential for the production of different compounds to guarantee their persistence, as suitable enzymes for the degradation of the available substrate, being these compounds of biotechnological interest. This study aimed

to evaluate the diversity of fungi isolated from samples of Amazonian soils producing chitinases. Sixty-four fungi were isolated, of which 81 were from five different sites of the Zoobotanical Park of the Federal University of Acre and 135 from five rural properties located in the state of Acre. For the isolation, the serial dilution technique and the inoculated samples were used in culture medium constituted of chitosan and shrimp shell as the only source of carbon. The isolates were classified into 134 distinct taxa, and through the observation of macro and micromorphological characteristics, fungi belonging to the genus *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Phoma* and *Rhizopus* were identified. These results indicate that the Amazonian soil shelters a great diversity of species with biotechnological potential that has not yet been explored.

Key words: chitinolytic enzymes, *Paecilomyces*, *Acremonium*, *Phoma*.

INTRODUÇÃO

O solo constitui uma importante reserva biológica de diversidade de microrganismos. Os fungos formam um grupo complexo de microrganismos que são fundamentais para o funcionamento desses ecossistemas, sendo decompositores, mutualistas e patógenos de plantas e animais, com aproximadamente 100 mil espécies descritas (TEDERSOO et al., 2014), constituindo um dos mais diversos grupos de microrganismos.

As comunidades de fungos presentes no solo e as suas interações com o ambiente podem ser afetadas por diversos fatores. O clima, as espécies vegetais que habitam a região e os substratos primários disponíveis para nutrição microbiana interferem diretamente na composição taxonômica de fungos associados ao solo (BARBI et al., 2016).

Além disso, a influência antropogênica também pode interferir na composição das comunidades de microrganismos do solo. A influência antropogênica pode modificar as características químicas e biológicas do solo, ocasionando uma pressão de seleção, que pode favorecer alguns componentes da comunidade microbiana e eliminar outros, interferindo no

equilíbrio entre as populações (MAZZETTO et al., 2016). Portanto, para sobreviverem, as espécies devem adaptar-se as condições do ambiente.

Os microrganismos adaptados podem produzir enzimas para catalisar a quebra de biopolímeros disponíveis e utiliza-los como fonte nutricional. Algumas espécies de fungos que colonizam o solo podem produzir enzimas quitinolíticas para a catálise da hidrólise da quitina, um amino polissacarídeo abundante no solo (KELLNER; VANDENBOL, 2010), sendo degradada e utilizada para diversos processos biológicos.

As enzimas quitinolíticas apresentam várias funções biológicas para os microrganismos. Essas enzimas sintetizadas por distintos grupos de microrganismos estão relacionadas com a morfogênese, autólise, absorção de quitina para finalidades nutricionais e micoparasitismo de diversas espécies fúngicas (LANGNER; GÖHRE, 2016).

Quitinases de origem microbiana apresentam potencial utilização em diversos processos biotecnológicos, sendo utilizadas pela indústria para a conservação de alimentos e pela agricultura como agente para o controle biológico de pragas (HAMID et al., 2013), constituindo um grupo de enzimas com potencial comercial.

A Região Amazônica localizada no Norte do Brasil apresenta grande diversidade biológica. Estimativas sugerem que o Brasil abriga 20% de toda a biodiversidade mundial, sendo frequentemente associada a grande variedade climática e geomorfológica (PYLRO et al., 2014). Essa diversidade biológica é uma fonte importante de bioprospecção.

Apesar da importância, pouco é conhecido sobre a ocorrência e a diversidade de fungos nas comunidades dos solos da Região Amazônica potencialmente produtores de enzimas quitinolíticas. Esse estudo teve como objetivo avaliar a diversidade de espécies de fungos produtores de enzimas quitinolíticas isolados de solos da Região Amazônica.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 10 amostras de solo em cinco pontos distintos da Região do Parque Zoobotânico (PZ), um fragmento florestal urbano situado na Universidade Federal do Acre (UFAC) e em cinco propriedades rurais utilizadas para criação de gado nos municípios de Rio Branco e Senador Guiomard no Estado do Acre em fevereiro de 2015 (Tabela. 1).

Tabela 1. Localização geográfica dos pontos de coleta de solo para isolamento de fungos.

Parque Zoobotânico		Propriedades Rurais	
Amostra	Coordenadas	Amostra	Coordenadas
1	9° 57'14.14''S 67°52'24.24''O	6	9°55'44.44''S 67°47'22.40''O
2	9° 57'2.50''S 67°52'29.46''O	7	10°4'26.70''S 67°47'00''O
3	9° 56'51.09''S 67°52'30.41''O	8	10°6'35.25''S 67°38'29.64''O
4	9° 57'19.39''S 67°52'21.52''O	9	10°9'46.25''S 67°44'32.93''O
5	9° 57'20.15''S 67°52'22.02''O	10	9°56'43.30''S 67°29'49.99''O

Foram coletadas, aproximadamente, 30 g de solo de cada área e depositadas em sacos plásticos devidamente identificados. Essas amostras foram armazenadas em isopor com gelo para o transporte do campo até o laboratório, onde foram processadas em 24 horas.

O isolamento dos fungos foi realizado por meio do método de diluição seriada, na qual 2 g de solo de cada amostra foram depositadas em 18 mL de solução NaCl 0,9% esterilizada e agitada durante uma hora a 120 rpm a 28 °C. Posteriormente, foram preparadas diluições seriadas de 10^{-1} e 10^{-2} (BILLS et al., 2004).

Foram semeados 200 μ L das diluições 10^{-1} e 10^{-2} em placas de Petri contendo meio mínimo para o crescimento de fungos (NaNO₃ 6g, K₂CO₃ 5g, KH₂PO₄ 1,5g, MgSO₄.7H₂O 0,5g, ZnSO₄ traços, FeSO₄ traços e ágar 15g para 1000 mL de água destilada) com adição de 10g de quitosana com casca de camarão a 2% (7,6g) como únicas fontes de carbono para a seleção de fungos potencialmente produtores de enzimas quitinolíticas (AZEVEDO et al., 2010). Em seguida, essas placas foram incubadas a temperatura de 28 °C e observadas diariamente pelo período de 15 dias (BILLS et al., 2004).

Observado o crescimento micelial, os fungos foram transferidos para tubos contendo meio batata dextrose ágar-BDA (infusão 200g batata, dextrose 20g e ágar 15g para 1000 mL de

água destilada). Decorrido o período de sete dias, os isolados foram avaliados quanto as suas características macroscópicas e os semelhantes foram agrupados em táxons que foram armazenados na Coleção do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Acre por meio das técnicas de preservação em água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1939) e óleo mineral (BUELL; WESTON, 1947).

Foram consideradas as características macromorfológicas, como tamanho da colônia, textura e produção de pigmento, e as características micromorfológicas por meio da técnica de cultivo em lâmina utilizando o meio ágar aveia, que permite a observação de estruturas vegetativas e reprodutivas (LACAZ et al., 1991), sendo comparadas com literatura específica para identificação (BARNETT; HUNTER, 1972).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isolados 216 fungos de solos da Região Amazônica em meio específico para a seleção de fungos potencialmente produtores de enzimas quitinolíticas, sugerindo que essa região constitui um ambiente favorável para o isolamento de microrganismos com potencial biotecnológico.

Quantidades similares de isolados foram registrados em estudo realizado com amostras de solos da Região do Serrado Brasileiro, que permitiu a obtenção de 200 isolados fúngicos (TAKAHASHI et al., 2008). Estudo anterior com solos da Região de Caatinga descreveu o isolamento de 85 fungos (OLIVEIRA et al., 2013), indicando que a região de coleta e a metodologia utilizada são fatores que influenciam diretamente na quantidade de isolados.

Foi registrada variação da quantidade de isolados potencialmente produtores de enzimas quitinolíticas de acordo com a amostra utilizada. A maior quantidade de fungos foi isolada de solos coletados em propriedades rurais 135 (62,5%), em contraste com as amostras do Parque Zoobotânico, das quais foram obtidos 81 isolados (37,5%).

Os fungos que colonizam o solo sintetizam enzimas para catalisar a hidrólise de nutrientes indispensáveis a sobrevivência num ambiente onde existe constante competição (TAYLOR; SINSABAUGH, 2015), influenciando diretamente na comunidade de fungos de acordo com os substratos disponíveis no ambiente de origem. A abundância de isolados pode ser influenciada diretamente pelas condições do solo, fatores climáticos e espécies vegetais presentes em cada área de coleta (STÜRMER; SIQUEIRA, 2011).

A produção de quitinases pode ser induzida pela presença do substrato no meio onde o microrganismo desenvolve-se. A síntese dessas enzimas é suprimida quando o crescimento ocorre em meio enriquecido com diferentes fontes de carbono e nitrogênio, sendo induzida em meio mínimo suplementado com quitina como única fonte de carbono (FOLDER et al., 2001).

Além disso, a expressão de enzimas quitinolíticas é influenciada pelo estresse térmico. Estudo prévio com isolado de *Metarhizium anisopliae* descreve a produção de enzimas quitinolíticas como mecanismo de adaptação em resposta ao estresse térmico (STAATS et al., 2013). Dessa forma, o ambiente de pastagem apresenta maior potencial para o isolamento de produtores de quitinases em comparação com área de floresta secundária, como sugerem os resultados do presente estudo, pois a remoção da vegetação expõe o solo a radiação intensiva (STÜRMER; SIQUEIRA, 2011), influenciando a abundância e a riqueza de isolados adaptados a essa condição de estresse.

Os isolados foram classificados morfológicamente de acordo com suas características macroscópicas em 134 táxons distintos, sendo 86 (64,20%) referentes às amostras de solo de propriedades rurais e 48 (35,80%) do Parque Zoobotânico, indicando que a área de coleta influenciou na riqueza de espécies isoladas (Figura 1).

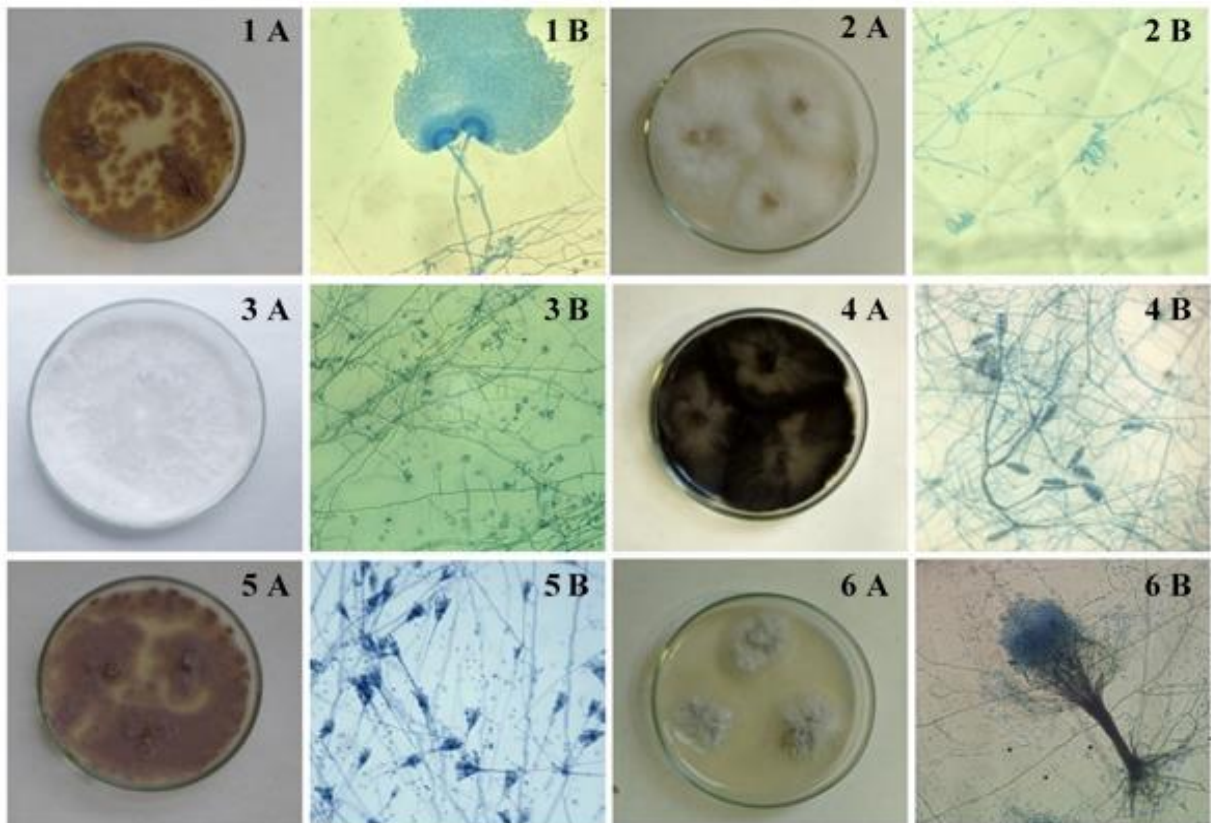


Figura 1. Análise das características macro e micromorfológicas (Aumento de 40x) de fungos produtores de enzimas quitinolíticas isolados de solos da Amazônia. **1A.** Colônia de *Aspergillus* sp.; **1B.** Estruturas reprodutivas de *Aspergillus* sp.; **2A.** Colônia de *Fusarium* sp.; **2B.** Estruturas reprodutivas de *Fusarium* sp.; **3A.** Colônia de *Acremonium* sp.; **3B.** Estruturas reprodutivas de *Acremonium* sp.; **4A.** Colônia de *Curvularia* sp.; **4B.** Estruturas reprodutivas de *Curvularia* sp.; **5A.** Colônia de *Paecilomyces* sp.; **5B.** Estruturas reprodutivas de *Paecilomyces* sp.; **6A.** Colônia de *Graphium* sp.; **6B.** Estruturas reprodutivas de *Graphium* sp.

Nas amostras de solo do Parque Zoobotânico foi observada predominância de fungos pertencentes ao gênero *Paecilomyces* (31%), seguido pelo gênero *Acremonium* (4%), *Graphium* (2%) e *Rhizopus* (2%). Entre os isolados, 16% não apresentaram estruturas reprodutivas e 45% permaneceram sem identificação taxonômica pela literatura utilizada para identificação (Figura 2).

Com relação à identificação dos isolados de amostras de propriedades rurais foi registrada predominância de fungos pertencentes ao gênero *Paecilomyces* (34%), seguidos pelos fungos do gênero *Aspergillus* (12%) e *Fusarium* (7%). Dos fungos isolados, 21% não apresentaram estruturas reprodutivas e não foi possível a identificação de 17% (Figura 2).

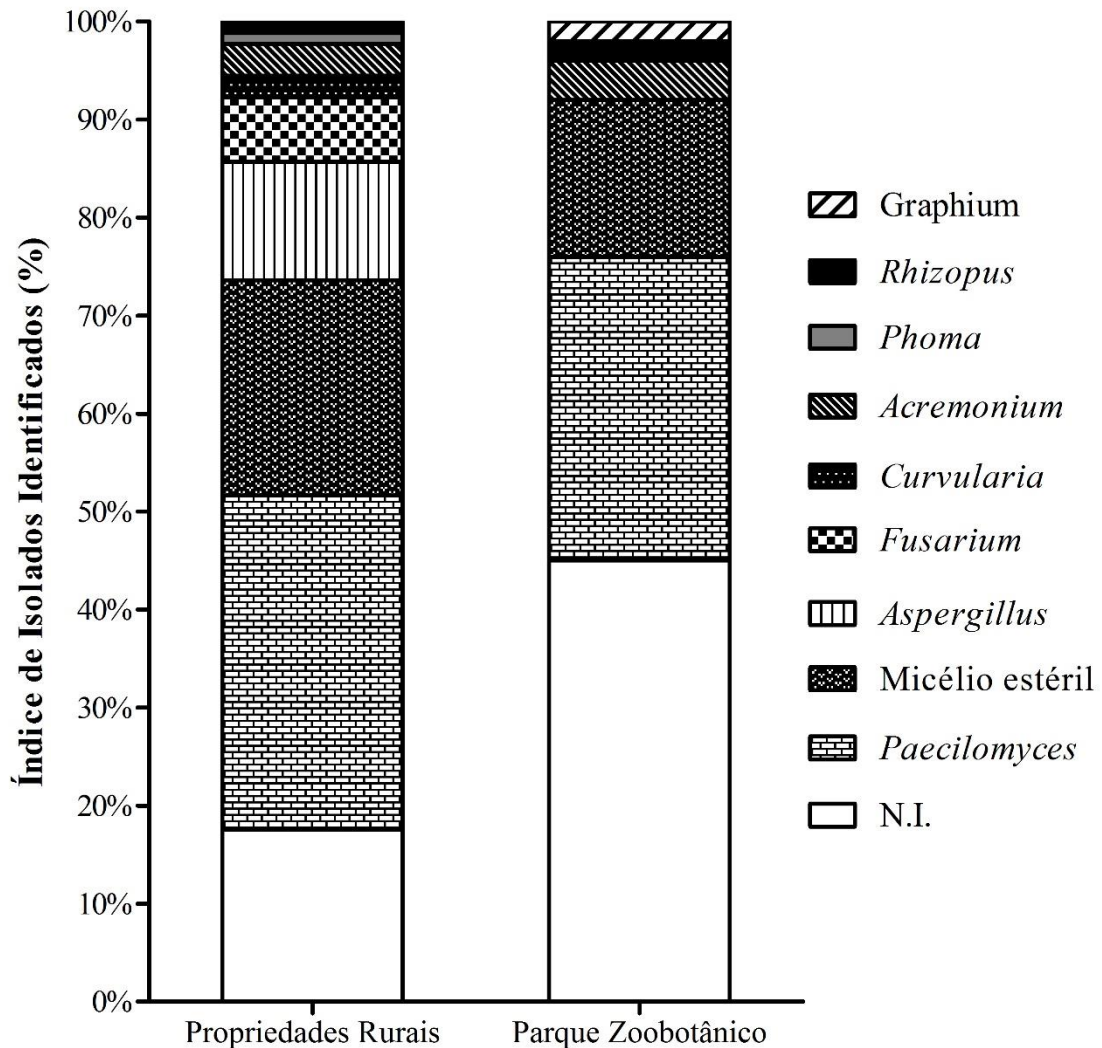


Figura 2. Percentual de isolados identificados em amostras de solo de cinco pontos distintos do Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre e em cinco Propriedades Rurais do Estado do Acre. N.I. = não identificado.

Entre os isolados identificados nesse estudo, *Paecilomyces* foi o gênero mais predominante (Figura 2). Em contraste com esse resultado, estudo realizado com amostras de solos da Amazônia isolados em meio padrão (BDA) descreve a predominância de fungos do gênero *Penicillium*, seguido pelo gênero *Trichoderma* nessas amostras (CELESTINO et al., 2014).

Os resultados de diversidade obtidos indicam que a fonte de carbono utilizada no meio de cultivo interferiu diretamente na seleção de espécimes fúngicas diferentes das que são normalmente isoladas com meio padrão como BDA, uma vez que a indução do crescimento de

fungos produtores de enzimas hidrolíticas pode ser antagonizada pela presença de fontes de carbono preferencias como glicose e frutose (JUN et al., 2013).

Além disso, foram identificados fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus*, *Fusarium*, *Curvularia* e *Acremonium*. De forma semelhante, o isolamento de amostras de solo brasileiro na região de caatinga permitiu o isolamento de espécimes pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Curvularia* e *Paecilomyces* (OLIVEIRA et al., 2013). Assim como, amostras do serrado brasileiro permitiu a obtenção dos fungos *Curvularia senegalensis* e *Fusarium oxysporium* (TAKAHASHI et al., 2008).

A identificação taxonômica dos isolados por métodos tradicionais baseados na caracterização morfológica é um grande desafio, sendo insuficiente para a identificação de 136 (63%) isolados. Esses métodos tradicionais de identificação ainda são utilizados para o estudo de fungos (PASSARINI et al., 2013; DING et al., 2013; HIGGINS et al., 2014).

Diversos fatores influenciam diretamente a identificação taxonômica. Devem ser consideradas as condições de cultivo e habilidade de esporular no meio (KO et al., 2011). Embora existam mais de 100.000 espécies de fungos descritas, estimativas indicam que aproximadamente 1,5 milhões ainda são desconhecidas (HIBBETT et al., 2011), com a possibilidade de novas espécies serem descritas.

Esse fato pode ser exemplificado pela descrição de duas novas espécies, *Neosartoryaa indohii* e *Neosartorya tsurutae*, isoladas de amostras da Floresta Tropical na Amazônia Brasileira (HORIE et al., 2003) e três novas espécies de *Aspergillus* sp., *A. caatingaensis*, *A. pernambucoensis* (MATSUZAWA et al., 2013) e *A. arcoverdensis* (MATSUZAWA et al., 2014) isoladas de solo da região de caatinga. Esses resultados indicam a necessidade do desenvolvimento de novas alternativas para a caracterização e estudo de fungos para a bioprospecção.

CONCLUSÃO

Os solos da Amazônia apresentam grande diversidade de fungos produtores de quitinases. Foram isolados 216 fungos pertencentes a 134 táxons sendo identificadas espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Acremonium*, *Phoma*, *Rhizopus*, *Graphium* e *Paecilomyces* como o gênero mais predominante.

CAPÍTULO II

Seleção de fungos de solos da Região Amazônica produtores de protease e lipase

Capítulo II - Seleção de fungos de solos da Região Amazônica produtores de protease e lipase

RESUMO

A região Amazônica abriga uma vasta diversidade microbiana. Os microrganismos são produtores naturais de enzimas hidrolíticas, como proteases e lipases. Além de desempenharem funções relacionadas com a nutrição e patogenicidade de algumas espécies de microrganismos, essas enzimas apresentam potencial para uso em processos biotecnológicos. Esse estudo teve como objetivo avaliar fungos isolados de solos da Amazônia como potenciais produtores de enzimas proteolíticas e lipolíticas. Foi analisado o potencial proteolítico e lipolítico de 107 isolados. Esses isolados foram cultivados em meio para indução de enzimas proteolíticas e lipolíticas, sendo incubados a temperatura de 28 °C a 120 rpm durante cinco dias. Foi utilizada a técnica de *cup plate* para avaliação da atividade enzimática. Foram depositados 100 µL dos metabólitos em poços em placas com meio Ágar-leite para a avaliação da atividade proteolítica e em Ágar lipase para avaliação da atividade lipolítica. Foi registrada a produção de halos indicativos de degradação enzimática para proteases por 68 isolados em meio ágar leite e para lipases por 35 isolados em meio ágar lipase. O isolado n^o. 4.145 de *Paecilomyces* sp. produziu maior média de halo proteolítico (26mm), enquanto o isolado n^o. 4.166, sem identificação taxonômica, produziu maior média de halo lipolítico (16,6mm). Esses resultados indicam que fungos isolados de solos da Amazônia são produtores de enzimas hidrolíticas com potencial biotecnológico.

Palavras chave: enzimas fúngicas; proteolítica; lipolítica; *Paecilomyces*.

ABSTRACT

The Amazon region is home to a vast microbial diversity. Microorganisms are natural producers of hydrolytic enzymes, such as proteases and lipases. In addition to performing functions related to the nutrition and pathogenicity of some species of microorganisms, these enzymes present

potential for use in biotechnological processes. This study aimed to evaluate isolated fungi of Amazon soils as potential producers of proteolytic and lipolytic enzymes. The proteolytic and lipolytic potential of 107 isolates were analyzed. These isolates were cultured in medium for the induction of proteolytic and lipolytic enzymes and incubated at 28 °C to 120 rpm for five days. The cup plate technique was used to evaluate the enzymatic activity. 100 µL of the metabolites were deposited in wells in plates with agar-milk medium for the evaluation of the proteolytic activity and in Ágar lipase to evaluate the lipolytic activity. The production of halos indicative of enzymatic degradation for proteases was registered by 68 isolates in milk agar medium and for lipases by 35 isolates in lipase agar medium. The isolate no. 4.145 *Paecilomyces* sp. produced a higher average of proteolytic halo (26mm), while the isolate 4,166, without taxonomic identification, produced a higher average of lipolytic halo (16.6mm). These results indicate that isolated fungi from Amazon soils are producers of hydrolytic enzymes with biotechnological potential.

Keywords: fungal enzymes; proteolytic; lipolytic; *Paecilomyces*.

INTRODUÇÃO

A biodiversidade é uma fonte importante de oportunidades para bioprospecção. Estimativas sugerem que o Brasil abriga aproximadamente 20% da biodiversidade mundial, sendo uma região com potencial para a descoberta de novos microrganismos como fonte de produtos de interesse comercial (PYLRO et al., 2013), sendo um grande desafio explorar o potencial biotecnológico dessa riqueza natural.

Estudos realizados nessa região descrevem a identificação de microrganismos potencialmente produtores de compostos bioativos com atividade antimicrobiana (RHODEN et al., 2012), enzimas para conversão de biomassa vegetal (PIROTA et al., 2015; PEREIRA et al., 2016) e enzimas hidrolíticas (NASCIMENTO et al., 2014; MENDES et al., 2015), indicando

que a diversidade de microrganismos associados a essa região fornece oportunidades para a obtenção de enzimas.

Enzimas são moléculas com atividade catalítica. As enzimas podem ser produzidas naturalmente por fungos como estratégia para utilizar os substratos presentes no solo como fonte de carbono para o seu metabolismo e nutrição, sendo produtores de quitinases (LANGNER; GÖHRE, 2016), proteases (NASCIMENTO et al., 2015; TZEAN et al., 2016) e lipases (MORAIS et al., 2016; COLLA et al., 2016).

As quitinases formam um diverso grupo de enzimas que catalisam a degradação de quitina. Essas enzimas podem ser utilizadas para a conservação de alimentos e como agente para o controle de biológico de pragas (HAMID et al., 2013), constituindo um grupo de enzimas com potencial comercial.

As proteases constituem um complexo grupo de enzimas catalizadoras da hidrólise de ligações peptídicas (NOVELLI et al., 2016). As proteases são utilizadas especialmente para produção de detergentes, alimentos e medicamentos, sendo responsáveis por 60% do mercado global de enzimas, estimado em 3 bilhões de dólares, que inclui a comercialização de proteases obtidas de isolados fúngicos, como o produto de isolado de *Aspergillus* sp. Protease P produzido pela Amano® (VELOORVALAPPIL et al., 2013).

As lipases são enzimas catalizadoras da hidrólise de acilgliceróis de cadeia longa. Os substratos naturais para essas enzimas são os óleo e gorduras constituídos por moléculas de triacilgliceróis que são degradados em diglicerídeos, monoglicerídeos, glicerol e ácidos graxos (GUPTA et al., 2015), sendo utilizadas pela indústria de detergentes, têxtil, alimentícia, produção de biosensores, biodiesel, medicamentos e cosméticos (KAPOOR; GUPTA 2012).

O mercado mundial de enzimas é promissor. Esse mercado atingiu 3 bilhões de dólares em 2010, sendo estimado valor de 4,4 bilhões de dólares em 2015 (ADRIO; DEMAIN 2014). Atualmente, mais de 4000 enzimas são conhecidas, das quais 200 são amplamente utilizadas

com finalidades comerciais principalmente, pela indústria de alimentos, farmacêutica, têxtil, papel e couro, sendo a maioria provenientes de fontes microbianas (GUPTA et al., 2015).

Em razão disso, a identificação de novas fontes microbianas, principalmente não tóxicas ao organismo humano, é de grande interesse científico e industrial, pois garante o suprimento de enzimas a diversos processos industriais e o desenvolvimento de novos sistemas biotecnológicos (SOBREVILLA et al., 2015).

Devido à crescente utilização de enzimas na área industrial e o potencial microbiológico da Amazônia, existe o interesse científico em selecionar e identificar fungos produtores de enzimas com aplicações biotecnológicas. O objetivo deste estudo foi avaliar fungos isolados de solos da Amazônia como potenciais produtores de enzimas proteolíticas e lipolíticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi avaliada a atividade enzimática de 107 fungos isolados de amostras de solos da Amazônia coletados no Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre (UFAC) e de propriedades rurais utilizadas para criação de gado. Foi utilizado meio específico para o isolamento, contendo quitosana como única fonte de carbono. Esses isolados foram inoculados em placa de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA) e incubados durante sete dias a temperatura de 28 °C (AZEVEDO et al., 2010).

A identificação dos isolados foi realizada pelos métodos clássicos. Foram consideradas as características macro morfológicas como tamanho da colônia, textura e produção de pigmento, e as características microscópicas por meio da técnica de cultivo em lâmina utilizando o meio ágar aveia, que permite a observação de suas estruturas vegetativas e reprodutivas (LACAZ et al., 1991). Essas estruturas foram comparadas com literatura específica para identificação (BARNETT; HUNTER, 1972).

Três fragmentos do micélio de cada fungo, medindo aproximadamente 5 mm, foram depositados em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio específico para indução da produção de enzimas proteolíticas (NaNO_3 6g, K_2CO_3 5g, KH_2PO_4 1,5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g, ZnSO_4 traços, FeSO_4 traços, caseína 5 g, leite desnatado 2 g, extrato de levedura 2,5 g e glicose 1 g para 1000 mL de água destilada) e no meio específico para indução da produção de enzimas lipolíticas (NaNO_3 6g, K_2CO_3 5g, KH_2PO_4 1,5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g, ZnSO_4 traços, FeSO_4 traço e azeite de oliva 10 % para 1000 mL de água destilada) e incubados a temperatura de 28 °C a 120 rpm durante cinco dias (AZEVEDO et al., 2010).

A atividade enzimática foi determinada pelo método de *cup-plate*. Para a avaliação da atividade proteolítica, 100 µL dos metabólitos fúngicos foram depositados em poços em placas contendo o meio Ágar-leite (Ágar 15g, leite em pó desnatado 2g, caseína 5g, extrato de levedura 2,5g, glicose 1g para 1000 mL de água destilada), sendo incubadas a temperatura de 28 °C durante 24 horas. Decorrido esse período foi realizada a leitura dos halos enzimáticos produzidos em milímetros (TEIXEIRA et al., 2011).

Para a avaliação da atividade lipolítica foi utilizado o meio de cultura ágar lipase (ágar nutriente 2 g, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, Tween 80 1 mL e água destilada - 99 mL) incubado a 28 °C durante 18 horas e, posteriormente, a 4 °C para revelação dos cristais indicando a produção de halos enzimáticos (TEIXEIRA et al., 2011).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados obtidos foram submetidos à estatística descritiva, utilizou-se o programa Bioestat 5.3 e os resultados foram expressos em média e desvio padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os 107 isolados avaliados 68 (63,55%) produziram halos indicativos de degradação enzimática no meio ágar leite, que sugere a produção de enzimas proteolíticas,

sendo 28 (41,17%) isolados provenientes de solos do Parque Zoobotânico e 40 (58,82%) de solos de propriedades rurais (Tabela 1).

Tabela 1. Número de referência do isolado, identificação taxonômica, valores médios e desvio padrão (mm) do halo de degradação enzimática produzido pelo isolado em meio ágar leite.

Parque Zoobotânico			Propriedades Rurais		
Isolado	Identificação	Diâmetro do halo	Isolado	Identificação	Diâmetro do halo
4.145	<i>Paecilomyces</i> sp.	26±3,46	4.285	<i>Paecilomyces</i> sp.	23±1
4.101	<i>Paecilomyces</i> sp.	20,6±3,06	4.184	<i>Paecilomyces</i> sp.	23±1,41
4.148	<i>Paecilomyces</i> sp.	13,3±1,15	4.280	<i>Paecilomyces</i> sp.	22±0
4.97	<i>Acremonium</i> sp.	22±0	4.208	<i>Paecilomyces</i> sp.	22±0
4.113	<i>Acremonium</i> sp.	20,3±0,58	4.279	<i>Paecilomyces</i> sp.	21,3±1,15
4.170	<i>Paecilomyces</i> sp.	19,5±2,12	4.277	<i>Paecilomyces</i> sp.	20,6±1,15
4.157	<i>Rhizopus</i> sp.	20±2	4.198	<i>Paecilomyces</i> sp.	19±1,41
4.144	<i>Graphium</i> sp.	10±0	4.298	<i>Paecilomyces</i> sp.	16,6±1,15
4.140	N.I.	25,3±1,15	4.225	<i>Paecilomyces</i> sp.	14,6±2,31
4.179	N.I.	24±0	4.322	<i>Acremonium</i> sp.	14,6±1,15
4.112	N.I.	24,6±2,31	4.330	<i>Acremonium</i> sp.	14±0
4.92	N.I.	24,3±0,58	4.269	<i>Acremonium</i> sp.	12±1,41
4.127	N.I.	23,6±3,21	4.340	<i>Fusarium</i> sp.	23,3±1,15
4.167	N.I.	22±2,83	4.181	<i>Fusarium</i> sp.	21±1,41
4.142	N.I.	21±1	4.238	<i>Fusarium</i> sp.	14,3±1,53
4.150	N.I.	21,6±2,89	4.338	<i>Aspergillus</i> sp.	24±0
4.154	N.I.	21,6±1,53	4.254	<i>Aspergillus</i> sp.	24±0
4.152	N.I.	21,3±1,15	4.329	<i>Aspergillus</i> sp.	22±4
4.149	N.I.	21±1,73	4.245	<i>Aspergillus</i> sp.	10,6±1,15
4.166	N.I.	20±0	4.253	<i>Curvularia</i> sp.	24,5±0,71
4.119	N.I.	13±4,36	4.237	<i>Curvularia</i> sp.	14±2
4.109	N.I.	19±1	4.333	<i>Rhizopus</i> sp.	15±1
4.102	N.I.	19,3±3,06	4.216	N.I.	23,5±0,71
4.124	N.I.	18,3±2,08	4.185	N.I.	23,5±0,71
4.176	N.I.	16±5,29	4.336	N.I.	22,6±0,58
4.104	N.I.	15,3±4,16	4.287	N.I.	22,5±0,71
4.164	N.I.	15,3±4,62	4.187	N.I.	21±1,41
4.172	N.I.	12±1,53	4.240	N.I.	21±1
			4.188	N.I.	19±1
			4.212	N.I.	19±1
			4.306	N.I.	17±1,73
			4.197	N.I.	16±0
			4.189	N.I.	12±0
			4.291	N.I.	11±1,41
			4.206	N.I.	11±1,41
			4.243	N.I.	11±1,41
			4.249	N.I.	10,5±0,71
			4.223	N.I.	10,5±2,12
			4.230	N.I.	10±0
			4.211	N.I.	10±0

Total 68

N.I. = não identificado.

De forma semelhante, estudos prévios com microrganismos da Amazônia identificaram isolados produtores de proteases, sendo observado leveduras (NEVES et al., 2006), fungos filamentosos (MENDES et al., 2015) e basidiomicetos (FONSECA et al., 2014). Esses resultados indicam o potencial da Região Amazônica como fonte de microrganismos produtores de enzimas.

Entre os isolados avaliados como produtores de enzimas proteolíticas foram observados diferentes níveis de expressão enzimática, sendo registradas médias de halo enzimático com mínimo de 10 mm e máximo de 26 mm. Foi registrada maior média de halo enzimático produzido pelo fungo do gênero *Paecilomyces* sp., correspondente a 26 mm, seguido por dois isolados sem identificação taxonômica, nº 4.140 e nº 4.112, com médias de 25,3mm e 24,6mm, respectivamente (Tabela 1).

Diversos fatores podem influenciar diretamente na expressão de enzimas proteolíticas, como a metodologia utilizada. Foram registrados efeitos direto na expressão de enzimas proteolíticas em culturas, isoladas de solo, crescidas com diferentes fontes nutricionais, condições de temperatura, pH e período de incubação (SHARMA et al., 2015), sendo fatores críticos para produção de enzimas que devem ser investigados.

Foram identificados diferentes gêneros de fungos potencialmente produtores de enzimas proteolíticas. Entre os 68 isolados produtores de halos indicativos de degradação proteolítica, predominaram os gêneros *Paecilomyces* sp. (17,64%), *Acremonium* sp. (8,82%) e *Aspergillus* sp. (4,41%).

De forma semelhante, em pesquisas anteriores fungos pertencem ao gênero *Paecilomyces* sp. também são descritos como produtores de proteases (KHAN et al., 2003; WANG et al., 2010; YANG et al., 2011). Fungos da espécie *Acremonium* sp. também são descritos como potenciais produtores de enzimas com atividade proteolítica (STEPANOV et al., 1986; NASCIMENTO et al., 2015).

Com relação aos isolados pertencentes ao gênero *Aspergillus* sp., o potencial biotecnológico desses fungos foi exemplificado por diversas espécies produtoras de proteases, como *Aspergillus niger* (TAKAHASHI, 1994), *Aspergillus clavatus* (HAJJI et al., 2007), *Aspergillus fumigatus* (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2011) e *Aspergillus flavus* (YADAV et al., 2015).

Foram identificados três isolados de *Fusarium* sp. produtores de proteases. Fungos do gênero *Fusarium* sp. são conhecidos como importantes patógenos de plantas, sendo a produção de proteases um importante fator durante o processo de infecção que possibilita a penetração e colonização dos tecidos das plantas pelo fungo (CHANDRASEKARAN et al., 2016).

Foi registrada a produção de protease por 2 isolados de *Curvularia* sp. Estudo prévio com endofíticos da planta *Azadirachta indica* descreve a atividade proteolítica de isolado de *Curvularia* sp. (PATIL et al., 2015), indicando o potencial biotecnológico desse gênero para produção de enzimas.

A produção de proteases por isolados de *Rhizopus* sp. também tem sido descrita (HSIAO et al., 2014; MUSHTAQ et al., 2015), semelhante ao resultado do presente estudo onde foram identificados dois isolados produtores. Um isolado de *Graphium* sp. foi identificado como produtor de proteases, corroborando com estudo anterior que descreve o potencial enzimático de isolado desse gênero (SOUZA et al., 2015).

Foi avaliada a atividade lipolítica de 107 metabólitos fúngicos, dos quais 35 (32,71%) produziram halos de degradação no meio ágar lipases. Foram obtidos 28 (41,17%) isolados de solos do Parque Zoobotânico e 40 (58,82%) de solos de propriedades rurais (Tabela 2). Esse resultado indica que os microrganismos isolados dos solos da Região Amazônica apresentam potencial para produção de enzimas com atividade lipolítica.

Tabela 2. Número de referência dos isolados, identificação taxonômica, valores médios e desvio padrão dos halos de degradação enzimática produzidos pelos isolados em meio ágar lipase.

Parque Zoobotânico			Propriedades Rurais		
Isolado	Identificação	Diâmetro do halo	Isolado	Identificação	Diâmetro do halo
4.145	<i>Paecilomyces</i> sp.	10,5±0,71	4.335	<i>Fusarium</i> sp.	11 ±1,41
4.174	N.I.	16,6±0,58	4.340	<i>Fusarium</i> sp.	10 ±0
4.166	N.I.	14,6±1,15	4.181	<i>Fusarium</i> sp.	9 ±0
4.119	N.I.	13,3±2,31	4.329	<i>Aspergillus</i> sp.	16,5 ±0,71
4.112	N.I.	13,3±0,58	4.338	<i>Aspergillus</i> sp.	10,5 ±0,71
4.114	N.I.	12,6±1,15	4.269	<i>Acremonium</i> sp.	15 ±1
4.172	N.I.	12±2	4.330	<i>Acremonium</i> sp.	13 ±1
4.164	N.I.	12±2,83	4.333	<i>Rhizopus</i> sp.	10,6 ±1,15
4.125	N.I.	11,6±0,58	4.180	N.I.	14,6±1,53
4.102	N.I.	11,6±1,53	4.294	N.I.	14±1,73
4.150	N.I.	10,5±0,71	4.242	N.I.	13,3±1,15
4.127	N.I.	10±0	4.304	N.I.	13±1,41
4.142	N.I.	10±0	4.189	N.I.	12,3±0,58
4.152	N.I.	10±0	4.307	N.I.	12±0
4.104	N.I.	9±0	4.334	N.I.	12±0
			4.268	N.I.	12±0
			4.188	N.I.	10,3±0,58
			4.240	N.I.	10±0
			4.212	N.I.	9,3±0,58
			4.243	N.I.	9±0
			Total 35		

N.I.= não identificado.

Lipases de origem microbiana apresentam diversas aplicações como biocatalizadores para a indústria biotecnológica. Lipases produzidas por microrganismos não apresentam toxicidade quando utilizadas para produção de alimentos, sendo utilizadas também para a produção de medicamentos, biosensores, pesticidas, cosméticos, detergentes e couro (GUPTA et al., 2015).

Pesquisas prévias também identificaram microrganismos potencialmente produtores de lipases. Estudo anterior investigou a obtenção de lipase de origem microbiana em amostras de solo da Região de Savana no Brasil, no qual 59 fungos foram isolados em meio seletivo para avaliação da produção de lipases, destes 11 isolados foram selecionados com base na razão entre o raio do halo lipolítico e o raio das colônias (COLEN et al., 2006).

Entre os metabólitos testados que apresentaram atividade lipolítica, o que produziu maior média de halo de degradação foi expresso pelo fungo nº 4.174, sem identificação

taxonômica, com média referente a 16,6 mm, seguido pelos fungos pertencentes ao gênero *Acremonium* sp., nº 4.329 e nº 4.269, com médias de 16,5 mm e 15mm, respectivamente (Tabela 2).

Entre os isolados que produziram halos de degradação lipolítica, foi observada predominância de fungos do gênero *Fusarium* sp., sendo identificados 3 (8,57%) (Tabela 2). De forma semelhante, fungos pertencentes a diversas espécies de *Fusarium* também foram capazes de produzir enzimas com atividade lipolítica, como *Fusarium oxysporum* (RAPP 1995; PRAZERES et al., 2006), *Fusarium heterosporum* (SHIMADA et al., 1993) e *Fusarium globulosum* (GULATI et al., 2005).

Foi registrado a identificação de dois isolados de *Aspergillus* sp. e dois de *Acremonium* sp., ambos com frequência de 5,71%, produtores de lipases (Tabela 2). Diversos isolados de *Aspergillus* sp. são produtores de enzimas lipolíticas, incluindo as espécies *Aspergillus oryzae* (OHNISHI et al., 1994), *Aspergillus carneus* (SAXENA et al., 2003) e *Aspergillus niger* (MAHADIK et al., 2002, ELLAIAH et al., 2004; MHETRAS et al., 2009). Semelhantemente, estudo anterior descreveu a produção de lipases por isolado de *Acremonium strictum*, por meio do crescimento em meios de cultivo indutores com diferentes fontes de carbono (OKEKE; OKOLO, 1990), sendo um fator importante para a expressão da atividade lipolítica.

Foram identificados um (2,85%) isolado de *Rhizopus* sp. e um (2,85%) isolado de *Paecilomyces* sp. (Tabela 2). Fungos pertencentes ao gênero *Rhizopus* sp. são importantes produtores de enzimas lipolíticas, sendo comercializadas por empresas, como Sigma[®] e Amano[®], para aplicações na indústria de bioenergia, medicamentos e alimentos (YU et al., 2016). Fungo pertencente ao gênero *Paecilomyces* isolado como endofítico da planta medicinal *Osbeckia chinensis* também apresentou atividade lipolítica (BHAGOBATY; JOSHI 2012), indicando o potencial biotecnológico desse gênero.

A secreção de enzimas por fungos é influenciada diretamente por diversos fatores como tamanho e idade do inóculo, composição do meio, temperatura e período de incubação (NEVES et al., 2006), sendo fatores que devem ser controlados e avaliados para fornecer condições favoráveis para seleção de isolados potencialmente produtores de enzimas de interesse biotecnológico.

CONCLUSÃO

Foram selecionados de solos da Amazônia 68 fungos produtores de enzimas proteolíticas e 35 fungos produtores de enzimas lipolíticas, indicando esta região como importante fonte de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas com possível aplicação biotecnológica.

CAPÍTULO III

Patogenicidade *in vitro* de fungos isolados da Região Amazônica sobre larvas de
Rhipicephalus microplus

Capítulo III - Patogenicidade *in vitro* de fungos isolados da Região Amazônica sobre larvas de *Rhipicephalus microplus*

RESUMO

Rhipicephalus microplus (CANESTRINI, 1887), conhecido popularmente como carrapato bovino, são ectoparasitas que causam sérios prejuízos econômicos para a pecuária em diversos países. O uso indiscriminado dos carrapaticidas tem favorecido a persistência de populações resistentes no ambiente. Assim, o controle biológico destaca-se como uma alternativa em potencial para o controle do carrapato *R. microplus*. Esse estudo teve como objetivo verificar a patogenicidade *in vitro* de fungos isolados de solos da Amazônia contra larvas de *R. microplus*. Os isolados foram avaliados com relação a expressão de enzimas quitinolíticas, proteolíticas e lipolíticas em estudo prévio, sendo selecionados três com maior indicativo de produção de proteases e lipases. Foi avaliado o percentual de mortalidade das larvas tratadas com as suspensões com conídios dos isolados. Foram utilizados quatro grupos de tratamento com as suspensões 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/mL, sendo cada grupo formado por 10 tubos de ensaio contendo larvas de *R. microplus*. A mortalidade das larvas tratadas com essas suspensões foi avaliada a cada cinco dias durante 21 dias. Foi registrada heterogeneidade de resposta, sendo registrados índices de mortalidade nos grupos tratados com os isolados 4.145 de *Paecilomyces* e 4.329 e 4.338 de *Aspergillus* sp. na concentração de 10^8 conídios/mL, no 21º dia de tratamento, referentes a 26,5%, 2,6% e 2%, respectivamente. Dos três isolados fúngicos analisados, *Paecilomyces* apresentou melhor potencial patogênico frente larvas de *R. microplus*.

Palavras-chave: Carrapato bovino, controle biológico, *Aspergillus* sp., *Paecilomyces* sp.

ABSTRACT

Rhipicephalus microplus (CANESTRINI, 1887), popularly known as bovine tick, are ectoparasites that cause serious economic damage to livestock in several countries. The indiscriminate use of carrapaticides has favored the persistence of resistant populations in the

environment. Thus, biological control stands out as a potential alternative for *R. microplus* tick control. This study aimed to verify the in vitro pathogenicity of fungi isolated from Amazonian soils against *R. microplus* larvae. The isolates were evaluated with respect to the expression of chitinolytic, proteolytic and lipolytic enzymes in a previous study, being selected three with the highest indicative protease and lipase production. The mortality rate of the larvae treated with the conidial suspensions of the isolates was evaluated. Four treatment groups were used with suspensions 10^5 , 10^6 , 10^7 and 10^8 conidia/mL, each group consisting of 10 test tubes containing *R. microplus* larvae. Mortality of the larvae treated with these suspensions was evaluated every five days for 21 days. Response heterogeneity was registered and mortality rates were recorded in the groups treated with isolates 4,145 of *Paecilomyces*, 4,329 and 4,338 of *Aspergillus* sp. at the concentration of 10^8 conidia/mL, on the 21st day of treatment, corresponding to 26.5%, 2.6% and 2%, respectively. Of the three fungal isolates analyzed, *Paecilomyces* presented better pathogenic potential against *R. microplus* larvae.

Keywords: bovine tick, biological control, *Aspergillus*, *Paecilomyces*.

INTRODUÇÃO

Os carrapatos da espécie *Rhipicephalus microplus* (CANESTRINI, 1887), conhecidos popularmente como carrapatos bovinos, são ectoparasitas classificados na família Ixodidae, que se destacam como um dos mais importantes transmissores de doenças aos bovinos (SONENSHINE et al., 2002), sendo responsáveis por sérios danos à saúde dos animais e a economia de diversos países.

Esses parasitas são responsáveis por impactos econômicos negativos na pecuária. Os carrapatos bovinos são transmissores de patógenos, causam danos no couro dos animais parasitados, redução da produção de leite, diminuem o ganho de peso dos animais e provocam gastos com carrapaticidas, gerando perdas anuais estimadas em 3,24 bilhões de dólares para o

setor produtivo no Brasil (GRISI et al., 2014), sendo fundamental o desenvolvimento de medidas de controle.

Com a finalidade de reduzir esses prejuízos econômicos, os acaricidas químicos têm sido extensivamente utilizados como medida primária para o controle do carrapato bovino (ABBAS et al., 2014). No entanto, a utilização indiscriminada dessas substâncias tem favorecido a ocorrência de resíduos químicos nos produtos de origem animal e a seleção de populações de carrapatos resistentes (WILLADSEN, 2006; RECK et al., 2014), reduzindo à eficiência do controle químico.

Assim, surge a necessidade de estudos científicos que estabeleçam métodos alternativos para o controle desse parasita. O controle biológico de pragas consiste, basicamente, na utilização de inimigos naturais, incluindo distintos grupos de microrganismos como os fungos entomopatógenos (WASSERMANN et al., 2016), destacando-se como uma alternativa potencial para o controle de pragas.

Diante desse potencial, estudos prévios avaliaram a utilização de microrganismos para o controle biológico. Diversos estudos avaliaram o potencial de fungos entomopatógenos para o controle do carrapato *R. microplus* (FERNANDES et al., 2012; ANGELO et al., 2015; COUTINHO-RODRIGUES et al., 2015; MARCIANO et al., 2015; WEBSTER et al., 2015; CAMARGO et al., 2016;), indicando o potencial biotecnológico desses fungos como uma alternativa estratégica para o controle do carrapato.

Os bioprodutos para o controle de pragas apresentam potencial comercial. Nas últimas décadas, aproximadamente 171 produtos formulados com isolados fúngicos foram registrados mundialmente para o controle de pragas (FARIA; WRAIGHT 2007). No entanto, apenas um produto indicado para o controle de Hemiptera (Cercopidae) e Acari (Ixodidae) e formulado com conídios aéreos de *M. anisopliae* é produzido no Brasil com nome comercial Metarril SC 1037 (Itaforte Industria de Bioprodutos Agro-Florestais Ltda., Brasil) (FARIA; WRAIGHT

2007), sendo um grande desafio o desenvolvimento de bioprodutos para o controle do carrapato bovino com fungos entomopatógenos.

Existem diversos fatores que podem afetar a eficácia de fungos entomopatógenos. Fatores como pH, a utilização de óleo como adjuvante em formulações (MARCIANO et al., 2015), temperatura, meio de cultura utilizado para a manutenção dos fungos e as características genéticas dos fungos (FERNANDES et al., 2012) influenciam diretamente a patogenicidade e virulência dos isolados, sendo fundamental a seleção e avaliação de fungos com diferentes características.

A Região Amazônica constitui uma reserva importante de diferentes espécies com potencial biotecnológico. O Brasil abriga aproximadamente 20% da biodiversidade mundial (PYLRO et al., 2014), sendo uma região com potencial para a descoberta de novos microrganismos como agentes para o controle biológico. Assim, esse estudo teve como objetivo verificar a patogenicidade de isolados de *Paecilomyces* sp. e *Aspergillus* sp. da Região Amazônica contra larvas de *R. microplus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados em bioensaios três fungos contra o carrapato bovino segundo metodologia descrita por Fernandes et al. (2011). Os isolados 4.329 e 4.338 de *Aspergillus* sp. e 3.145 de *Paecilomyces* sp. utilizados nesse estudo foram obtidos por meio do processamento de amostras de solos da Amazônia em meio específico para a seleção de fungos potencialmente produtores de enzimas quitinolíticas. Além disso, esses isolados também foram selecionados em razão da expressão de enzimas proteolíticas e lipolíticas consideradas essenciais para o processo de infecção.

Esses fungos isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), durante 7 dias. Foram coletados os conídios com uma alça microbiológica e suspensos em Tween 80 a 0,01% e levados para contagem em câmara de

Neubauer. Foram preparadas quatro suspensões por meio de diluições seriadas de 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/mL. A solução aquosa de Tween 80 (0,01%) foi utilizada como tratamento do grupo controle.

Uma alíquota da suspensão 10^8 conídios/mL de cada isolado foi depositada em placa de Petri contendo meio BDA e incubada sob temperatura de 25 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$ durante 24 horas.

Para obtenção das larvas de *Rhipicephalus microplus*, fêmeas ingurgitadas foram manualmente coletadas de bovinos infestados artificialmente. Foi realizada a desinfecção superficial das fêmeas ingurgitadas por meio da imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1% durante 3 minutos, lavagem em água destilada esterilizada e secagem em papel toalha.

Essas fêmeas ingurgitadas foram incubadas no escuro a temperatura de 27 °C com 80% de umidade relativa em câmara úmida para a ovoposição. Dez dias após o início dessa ovoposição, os ovos foram divididos em alíquotas de 50 mg e depositados em tubos de ensaio, selados com tampão de algodão e incubado a temperatura de 27 °C e 80% de umidade relativa.

Os bioensaios foram realizados em quatro grupos de tratamento (10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/mL), cada grupo constituído por 10 tubos de ensaio contendo larvas de *R. microplus*. Posteriormente, 1 mL da suspensão de conídios foi injetada dentro dos tubos usando uma seringa hipodérmica inserida entre a parede do tubo de ensaio e o tampão de algodão. A larva foi imersa no inócuo durante 3 minutos.

Os tubos contendo as larvas foram invertidos até a suspensão de conídios ser absorvida pelo tampão de algodão. Posteriormente foram armazenados, em câmara úmida, a temperatura de 27 °C com umidade de 80% até o final do experimento. As larvas foram inspecionadas com aumento de 10x a cada cinco dias durante 21 dias para análise da mortalidade.

Os dados dos bioensaios foram analisados estatisticamente conforme a normalidade. Para os dados com distribuição não-normal ou livre foi aplicado para a análise o teste Kruskal-

Wallis seguido pelo teste SNK. A análise estatística foi feita com o auxílio do programa estatístico Bioestat[®] 5.3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise do percentual de germinação dos isolados 24 horas após a elaboração da suspensão 10^8 conídios/mL, demonstrou que 100% dos conídios haviam germinado sob temperatura de 25 ± 1 °C e umidade relativa ≥ 80 %, evidenciando que os isolados estavam aptos para serem utilizados no experimento.

Os três isolados expressaram efeito patogênico nos grupos tratados. No bioensaio os isolados de *Aspergillus* sp. e *Paecilomyces* sp. demonstraram patogenicidade contra larvas de *R. microplus* nas concentrações de 10^7 e 10^8 conídios/mL com 21 dias de tratamento, diferindo significativamente em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Foi observada heterogeneidade de resposta entre os grupos tratados com isolados de *Aspergillus* sp. e *Paecilomyces* sp. Foram registrados percentuais de mortalidade referentes a 2,6% e 2% nos grupos tratados com os isolados 4.338 e 4.329 de *Aspergillus* sp. na concentração 10^8 conídios/mL, no 21º dia de tratamento, respectivamente (Tabela 1). Estudo prévio descreveu a infecção natural de carrapatos *R. microplus* por fungos do gênero de *Aspergillus flavus* (MIRANDA-MIRANDA et al., 2011), indicando o potencial patogênico desses isolados. Os grupos tratados com o isolado 4.145 de *Paecilomyces* sp. nas concentrações 10^7 e 10^8 conídios/mL apresentaram percentual de mortalidade, 21 dias após o tratamento, correspondentes a 35,5% e 26,5%, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem média de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* no 21º dia de tratamento expostas a diferentes concentrações de conídios dos isolados 4.329, 4.338 de *Aspergillus* sp. e 4.145 de *Paecilomyces* sp.

Isolado	Controle	10^5	10^6	10^7	10^8
4.338	$1 \pm 0,66$ a	$1,4 \pm 0,51$ a	$1,7 \pm 0,94$ ab	$1,5 \pm 0,52$ ab	$2,6 \pm 1,42$ b
4.329	$1 \pm 0,66$ a	$1,9 \pm 1,28$ ab	$2,5 \pm 1,17$ b	$2,5 \pm 1,08$ b	$2 \pm 0,81$ b
4.145	$1 \pm 0,66$ a	$1,8 \pm 0,91$ a	$2,4 \pm 1,17$ a	$35,5 \pm 13,21$ b	$26,5 \pm 5,79$ b

Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem entre si em nível de 5% de significância ($p \geq 0,05$).

Os grupos tratados apresentaram heterogeneidade de resposta (Figura 1). O grupo tratado com isolado de *Paecilomyces* apresentou percentual de mortalidade acima de 12% com a concentração 10^8 conídios/mL no 16º e acima de 20% no 21º dia após o tratamento (Figura 1). Estudo anterior com isolado de *Paecilomyces lilacinus* apresentou resultado semelhante, referente a 13% de mortalidade com 15 dias de tratamento (ANGELO et al., 2012), confirmando o potencial patogênico desses isolados contra carrapatos *R. microplus*.

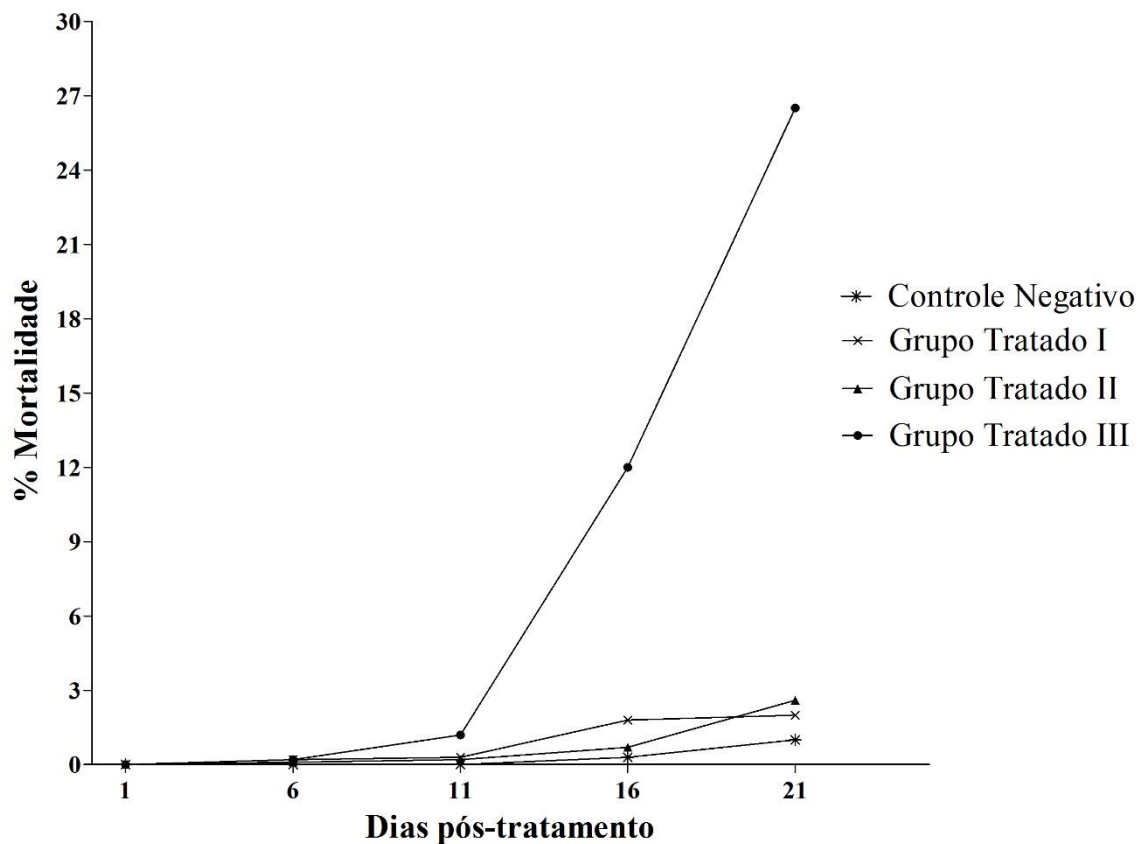


Figura 1. Variação da porcentagem de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* infectadas durante o período de dias pós-tratamento. Grupo Tratado I= 4.338 de *Aspergillus* sp. 10^8 conídios/mL, Grupo Tratado II= 4.329 de *Aspergillus* sp. 10^8 conídios/mL e Grupo Tratado III= 4.145 de *Paecilomyces* sp 10^8 conídios/mL.

Foi registrado o potencial patogênico de fungos como agentes para o controle biológico do carrapato *R. microplus* em diversos estudos (FERNANDES et al., 2011; PERINOTTO et al., 2012; ANGELO et al., 2012; MARCIANO, et al., 2015; COUTINHO-RODRIGUES et al., 2015), sendo que a virulência dos fungos pode variar consideravelmente dependendo do isolado testado e de acordo com a metodologia utilizada.

Diversos fatores podem influenciar diretamente a virulência de isolados fúngicos contra hospedeiros específicos. As características genéticas de cada isolado, repiques sucessíveis em meio de cultivo artificial podem reduzir a virulência do isolados (FERNANDES et al., 2011), influenciando diretamente a patogenicidade e virulência dos isolados, sendo fundamental a seleção e avaliação de fungos com diferentes características. Além disso, a análise de proteases e lipases específicas para o processo de infecção são necessárias para seleção de isolados eficazes para o controle biológico do carrapato *R. microplus*.

CONCLUSÃO

Foi registrada heterogeneidade de resposta da patogenicidade dos isolados de *Paecilomyces* sp. e *Aspergillus* sp. contra larvas de *R. microplus*. O isolado de *Paecilomyces* sp. possui maior potencial de uso no controle do carrapato *R. microplus*.

3. CONCLUSÕES GERAIS

Foram isolados 216 fungos de solos da Amazônia produtores de quitinases com influência das áreas de coleta na quantidade de isolados, indicando que Região Amazônica abriga grande diversidade de espécies com potencial biotecnológico.

Foram selecionados 68 isolados fúngicos de solos da Amazônia produtores de proteases e 35 de lipases, sugerindo esta região como fonte de fungos produtores de enzimas hidrolíticas com aplicação biotecnológica.

Isolado de *Paecilomyces* sp. da Região Amazônica apresentou patogenicidade frente larvas de *Rhipicephalus microplus*, indicando este com potencial para reduzir o uso de acaricidas sintéticos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, R. Z.; ZAMAN, M. A.; COLWELL, D. D.; GILLEARD, J.; IQBAL, Z. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play. **Veterinary parasitology**, v. 203, n. 1, p. 6-20, 2014.

ADRIO J. L.; DEMAIN A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**. v. 4, p.117-139, 2014

ANDERSON, J. F.; MAGNARELLI, L. A. Biology of ticks. **Infectious disease clinics of North America**, v. 22, n. 2, p. 195-215, 2008.

ANGELO, I. C.; DINIZ-NETO, H. C.; SANTOS, S. V.; PERINOTTO, W. M. S.; QUINELATO, S.; SANTOS, H. A.; SANTOS, H. A.; GÔLO, P. S.; CAMARGO, M. G.; MARCIANO, A. F.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Formulações oleosas contendo fungos artropodopatogênicos para o controle de *Rhipicephalus microplus*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 36, n. 2, p. 18-24, 2015.

ANGELO, I. C.; FERNANDES, É. K.; BAHIENSE, T. C.; PERINOTTO, W. M.; GÔLO, P. S.; MORAES, A. P. R.; BITTENCOURT, V. R. Virulence of *Isaria* sp. and *Purpureocillium lilacinum* to *Rhipicephalus microplus* tick under laboratory conditions. **Parasitology research**, v. 111, n. 4, p. 1473-1480, 2012.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L.; LACAVA, P. T.; MARCON J.; LIMA; A. O. S.; SOBRAL, J. K.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Meios de cultura utilizados para o estudo de microrganismos. In: PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; FERREIRA, A.; LIMA, A. O. S.; ANDREOTE, F. D.; ANDREOTE, F. D.; PIMENTEL, I. C.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; SOBRAL, J. K.; QUECINE, M. C.; MARTINS, M. K.; LACAVA, P. T.; ROSSETTO, P. B.; STUART, R. M.; ARAÚJO, W. L. **Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALO, 2010. 167 p.

BAILEY, K. L.; BOYETCHKO, S. M.; LÄNGLE, T. Social and economic drivers shaping the future of biological control: a Canadian perspective on the factors affecting the development and use of microbial biopesticides. **Biological Control**, v. 52, n. 3, p. 221-229, 2010.

BARBI, F.; PRUDENT, E.; VALLON, L.; BUÉE, M.; DUBOST, A.; LEGOUT, A.; MARMEISSE, R.; FRAISSINET-TACHET, L.; LUÍS, P. Tree species select diverse soil fungal communities expressing different sets of lignocellulolytic enzyme-encoding genes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 100, p. 149-159, 2016.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi.**, 3. ed., 1972.

BEYS-DA-SILVA, W. O.; SANTI, L.; BERGER, M.; GUIMARÃES, J. A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Susceptibility of *Loxosceles* sp. to the arthropod pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: potential biocontrol of the brown spider. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 1, p. 59-61, 2013.

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, n. 1, p. 10-15, 2010.

BHAGOBATY, R. K.; JOSHI, S. R. Enzymatic activity of fungi endophytic on five medicinal plant species of the pristine sacred forests of Meghalaya, India. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, n. 1, p. 33-40, 2012.

BILLS, G. F.; CHRISTENSEN, M.; POWELL, M.; THORN, G. Saprobiic soil fungi. In: _____ **Biodiversity of Fungi**. Burlington: Academic Press, 2004. 271-302 p.

BUELL, C. B.; WESTON, W. H. Application of the mineral oil conservation method to maintaining collection of fungous cultures. **American Journal of Botany**. v.34, p.555-561, 1947.

CAMPOS, R. A.; ARRUDA, W.; BOLDO, J. T.; DA 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, n. 5, p. 257-261, 2005.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 225-226, 1939.

CASTRO-JANER, E.; MARTINS, J. R.; MENDES, M. C.; NAMINDOME, A.; KLAFKE, G. M.; SCHUMAKER, T. T. S. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using *in vitro* larval bioassays. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 3, p. 300-306, 2010.

CELESTINO, J. R.; CARVALHO, L. E.; LIMA, M. P.; LIMA, A. M.; OGUSKU, M. M.; SOUZA, J. V. B. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 569-575, 2014.

CHANDRASEKARAN, M.; THANGAVELU, B.; CHUN, S. C.; SATHIYABAMA, M. Proteases from phytopathogenic fungi and their importance in phytopathogenicity. **Journal of General Plant Pathology**, v. 82, n. 5, p. 233-239, 2016.

CHARNLEY, A. K. Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins. **Advances in Botanical Research**, v. 40, p. 241-321, 2003.

COHEN, E. Chitin biochemistry: synthesis, hydrolysis and inhibition. In: CASAS, J.; SIMPSON, S. J. **Advances in Insect Physiology: Insect Integument and Colour**. Amsterdam: Academic Press Elsevier Science, 2010. p. 5-74.

COLEN, G.; JUNQUEIRA, R. G.; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 8, p. 881-885, 2006.

COLLA, L. M.; PRIMAZ, A. L.; BENEDETTI, S.; LOSS, R. A.; LIMA, M.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 461-467, 2016.

COSTA, G. L.; SARQUIS, M. I. M.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathologia**, v. 154, n. 4, p. 207-209, 2002.

COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B.; PERINOTTO, W. M. D. S.; BEYS DA SILVA, W. O.; SANTI, L.; BERGER, M.; MARCIANO, A. F.; SÁ, F. A.; NOGUEIRA, M. R. S.;

QUINELATO, S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Virulence, proteolytic and lipolytic activities of Brazilian *Beauveria bassiana* sl isolates (Hypocreales: Clavicipitaceae) to *Rhipicephalus microplus* ticks (Acari: Ixodidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 239-249, 2016.

CUTULLÉ, C.; LOVIS, L.; D'AGOSTINO, B. I.; BALBIANI, G. G.; MORICI, G.; CITRONI, D.; REGGI, J.; CARACOSTANTOGOLO, J. L. In vitro diagnosis of the first case of amitraz resistance in *Rhipicephalus microplus* in Santo Tomé (Corrientes), Argentina. **Veterinary parasitology**, v. 192, n. 1, p. 296-300, 2013.

D'ALESSANDRO, W. B.; RODRIGUES, J.; FERNANDES, É. K.; LUZ, C. Impact of humidity on clustered tick eggs. **Parasitology research**, v. 113, n. 10, p. 3899-3902, 2014.

DING, X.; LIU, K.; DENG, B.; CHEN, W.; LI, W.; LIU, F. Isolation and characterization of endophytic fungi from *Camptotheca acuminata*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 10, p. 1831-1838, 2013.

ELLAIHAH, P.; PRABHAKAR, T.; RAMAKRISHNA, B.; TALEB, A. T.; ADINARAYANA, K. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 5, p. 525-528, 2004.

FANCELLI, M.; DIAS, A. B.; DELALIBERA JÚNIOR, I.; JESUS, S. C. D.; NASCIMENTO, A. S. D.; CALDAS, R. C.; LEDO, C. A. D. S. *Beauveria bassiana* strains for biological control of *Cosmopolites sordidus* (Germ.) (Coleoptera: Curculionidae) in plantain. **Biomed Research International**, v. 2013, p. 184756-184763, 2013.

FARAG, A. M.; ABD-ELNABEY, H. M.; IBRAHIM, H. A. H.; EL-SHENAWY, M. Purification, characterization and antimicrobial activity of chitinase from marine-derived *Aspergillus terreus*. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, doi: 10.1016/j.ejar.2016.04.004. 2016.

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, n. 3, p. 237-256, 2007.

FERNANDES, É. K.; ANGELO, I. C.; RANGEL, D. E.; BAHIENSE, T. C.; MORAES, Á. M.; ROBERTS, D. W.; BITTENCOURT, V. R. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 2, p. 307-318, 2011.

FERNANDES, É. K.; BITTENCOURT, V. R.; ROBERTS, D. W. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. **Experimental parasitology**, v. 130, n. 3, p. 300-305, 2012.

FERNÁNDEZ-SALAS, A.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I.; ALONSO-DÍAZ, M. A. First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. **Veterinary parasitology**, v. 183, n. 3, p. 338-342, 2012.

FIROUZBAKHT, H.; ZIBAEI, A.; HODA, H.; SOHANI, M. M. Virulence determination of *Beauveria bassiana* isolates on a predatory hemipteran, *Andrallus spinidens Fabricius* (Hemiptera: Pentatomidae). **Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica**, v. 50, n. 1, p. 115-125, 2015.

FONSECA, T. R. B.; BARRONCAS, J. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Produção em matriz sólida e caracterização parcial das proteases de cogumelo comestível da Floresta Amazônica. **Revista Brasileira de Tecnologia**, v. 8, n. 1, p. 1227-1236, 2014.

FORLANI, L.; PEDRINI, N.; GIROTTI, J. R.; MIJAILOVSKY, S. J.; CARDOZO, R. M.; GENTILE, A. G.; HERNÁNDEZ-SUÁREZ, C. M.; RABINOVICH, J. E.; JUÁREZ, M. P. Biological control of the chagas disease vector *Triatoma infestans* with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* combined with an aggregation cue: field, laboratory and mathematical modeling assessment. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 5, p. e0003778, 2015.

GABER, Y.; MEKASHA, S.; VAAJE-KOLSTAD, G.; EIJSINK, V. G.; FRAAIJE, M. W. Characterization of a chitinase from the cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, 2016.

GARZA-HERNÁNDEZ, J. A.; REYES-VILLANUEVA, F.; RUSSELL, T. L.; BRAKS, M. A.; GARCIA-MUNGUÍA, A. M.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, M. A. Copulation activity, sperm production and conidia transfer in *Aedes aegypti* males contaminated by *Metarhizium*

anisopliae: a biological control prospect. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. e0004144, 2015.

GOLDSON, S. L.; WRATTEN, S. D.; FERGUSON, C. M.; GERARD, P. J.; BARRATT, B. I. P.; HARDWICK, S.; MCNEILL, M. R.; PHILLIPS, C.B.; POPAY, A.J.; TYLIANAKIS, J.M.; TOMASETTO, F. If and when successful classical biological control fails. **Biological Control**, v. 72, p. 76-79, 2014.

GÔLO, P. S.; SANTOS, H. A.; PERINOTTO, W. M.; QUINELATO, S.; ANGELO, I. C.; CAMARGO, M. G.; SÁ, F. A.; MASSARD, C. L.; FERNANDES, E. K. K.; ROBERTS, D. W.; BITTENCOURT, V. R. E. P. The influence of conidial Pr1 protease on pathogenicity potential of *Metarhizium anisopliae* sensu lato to ticks. **Parasitology research**, v. 114, n. 6, p. 2309-2315, 2015.

GORTARI, M. C.; HOURS, R. A. Fungal chitinases and their biological role in the antagonism onto nematode eggs. A review. **Mycological Progress**, v. 7, n. 4, p. 221-238, 2008.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. D. S.; BARROS, A. T. M. D.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEÓN, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian journal of veterinary parasitology**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

GULATI, R.; ISAR, J.; KUMAR, V.; PRASAD, A. K.; PARMAR, V. S.; SAXENA, R. K. Production of a novel alkaline lipase by *Fusarium globulosum* using neem oil, and its applications. **Pure and applied chemistry**, v. 77, n. 1, p. 251-262, 2005.

GUPTA, R.; KUMARI, A.; SYAL, P.; SINGH, Y. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: their role in biotechnology and cellular physiology. **Progress in Lipid Research**, v. 57, p. 40-54, 2015.

GUPTA, S. D.; KUMAR, B. Bioefficacy of *Beauveria bassiana* (Balsamo) against third instar larvae of *Spodoptera litura* (Far.). **International Journal of Plant Sciences (Muzaffarnagar)**, v. 9, n. 1, p. 97-100, 2014.

GUTARRA, M. L.; GODOY, M. G.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I.; FREIRE, D. M.; CASTILHO, L. R. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus

Penicillium simplicissimum by solid-state fermentation. **Bioresource technology**, v. 100, n. 21, p. 5249-5254, 2009.

HAJJI, M.; KANOUN, S.; NASRI, M.; GHARSALLAH, N. Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 791-797, 2007.

HAMID, R.; KHAN, M. A.; AHMAD, M.; AHMAD, M. M.; ABDIN, M. Z.; MUSARRAT, J.; JAVED, S. Chitinases: An update. **Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences January-March**, v. 5, n. 1, p. 21, 2013.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G.; BERGMANN, C. W.; LOERA-CORRAL, O.; ROJO-DOMÍNGUEZ, A.; HUERTA-OCHOA, S.; REGALADO-GONZÁLEZ, C.; PRADO-BARRAGÁN, L. A. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 2001-2006, 2011.

HIBBETT, D. S.; OHMAN, A.; GLOTZER, D.; NUHN, M.; KIRK, P.; NILSSON, R. H. Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. **Fungal Biology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 38-47, 2011.

HIGGINS, K. L.; ARNOLD, A. E.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Communities of fungal endophytes in tropical forest grasses: highly diverse host-and habitat generalists characterized by strong spatial structure. **Fungal Ecology**, v. 8, p. 1-11, 2014.

HORIE, Y.; ABLIZ, P.; FUKUSHIMA, K.; OKADA, K.; TAKAKI, G. C. Two new species of *Neosartorya* from Amazonian soil, Brazil. **Mycoscience**, v. 44, n. 5, p. 397-402, 2003.

JANER, E. C.; KLAFKE, G. M.; CAPURRO, M. L.; SCHUMAKER, T. T. S. Cross-resistance between fipronil and lindane in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 210, n. 1, p. 77-83, 2015.

JARROLD, S. L.; MOORE, D.; POTTER, U.; CHARNLEY, A. K. The contribution of surface waxes to pre-penetration growth of an entomopathogenic fungus on host cuticle. **Mycological research**, v. 111, n. 2, p. 240-249, 2007.

JUN, H.; GUANGYE, H.; DAIWEN, C. Insights into enzyme secretion by filamentous fungi: comparative proteome analysis of *Trichoderma reesei* grown on different carbon sources. **Journal of proteomics**, v. 89, p. 191-201, 2013.

KANG, S. C.; PARK, S.; LEE, D. G. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 73, n. 3, p. 276-281, 1999.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its Biochemical Applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555-569, 2012.

KELLNER, H.; VANDENBOL, M. Fungi unearthed: transcripts encoding lignocellulolytic and chitinolytic enzymes in forest soil. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. e10971, 2010.

KHAN, A.; WILLIAMS, K.; MOLLOY, M. P.; NEVALAINEN, H. Purification and characterization of a serine protease and chitinases from *Paecilomyces lilacinus* and detection of chitinase activity on 2D gels. **Protein expression and purification**, v. 32, n. 2, p. 210-220, 2003.

KHAN, A.; WILLIAMS, K.; MOLLOY, M. P.; NEVALAINEN, H. Purification and characterization of a serine protease and chitinases from *Paecilomyces lilacinus* and detection of chitinase activity on 2D gels. **Protein expression and purification**, v. 32, n. 2, p. 210-220, 2003.

KO, T. W. K.; STEPHENSON, S. L.; BAHKALI, A. H.; HYDE, K. D. From morphology to molecular biology: can we use sequence data to identify fungal endophytes? **Fungal Diversity**, v. 50, n. 1, p. 113-120, 2011.

KRAMER, K. J.; MUTHUKRISHNAN, S. Insect chitinases: molecular biology and potencial use as biopesticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, n. 11, p. 887-900. 1997.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 8. ed. São Paulo, Sarvier, 1991. 695 p.

- LANGNER, T.; GÖHRE, V. Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles in plant/pathogen interactions. **Current genetics**, v. 62, n. 2, p. 243-254, 2016.
- LEE, Y. G.; CHUNG, K. C.; WI, S. G.; LEE, J. C.; BAE, H. J. Purification and properties of a chitinase from *Penicillium* sp. LYG 0704. **Protein expression and purification**, v. 65, n. 2, p. 244-250, 2009.
- LEGER, R. S.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 253, n. 1, p. 221-232, 1987.
- LÉGER, E.; VOUREC'H, G.; VIAL, L.; CHEVILLON, C.; MCCOY, K. D. Changing distributions of ticks: causes and consequences. **Experimental and Applied Acarology**, v. 59, n. 1-2, p. 219-244, 2013.
- MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 715-721, 2002.
- MARCIANO, A. F.; COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B.; MARCELO, W.; SOUZA PERINOTTO, M. G. C.; GÔLO, P. S.; ARAUJO, F.; QUINELATO, S.; FREITAS, M. C.; ANGELO, I. C.; NOGUEIRA, M. R. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. *Metarhizium anisopliae*: influência do pH na atividade enzimática e no controle de *Rhipicephalus microplus* **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 37, n. 1, p. 85-90, 2015.
- MATSUZAWA, T.; TAKAKI, G. M. C.; YAGUCHI, T.; OKADA, K.; ABLIZ, P.; GONOI, T.; HORIE, Y. *Aspergillus arcoverdensis*, a new species of *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from caatinga soil in State of Pernambuco, Brazil. **Mycoscience**, v. 56, n. 2, p. 123-131, 2015.
- MATSUZAWA, T.; TAKAKI, G. M. C.; YAGUCHI, T.; OKADA, K.; GONOI, T.; HORIE, Y. Two new species of *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from caatinga soil in the State of Pernambuco, Brazil. **Mycoscience**, v. 55, n. 2, p. 79-88, 2014.
- MAZZETTO, A. M.; FEIGL, B. J.; CERRI, C. E. P.; CERRI, C. C. Comparing how land use change impacts soil microbial catabolic respiration in Southwestern Amazon. **Brazilian journal of microbiology**, v. 47, n. 1, p. 63-72, 2016.

- MENDES, M. M. G. S.; PEREIRA, S. A.; OLIVEIRA, R. L.; SILVA, L. A. D. O.; DUVOISIN JUNIOR, S.; ALBUQUERQUE, P. M. Screening of Amazon fungi for the production of hydrolytic enzymes. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 10, p. 741-748, 2015.
- MHETRAS, N. C.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 3, p. 1486-1490, 2009.
- MILLER, R. J.; ALMAZÁN, C.; ORTÍZ-ESTRADA, M.; DAVEY, R. B.; GEORGE, J. E.; DE LEÓN, A. P. First report of fipronil resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* of Mexico. **Veterinary parasitology**, v. 191, n. 1, p. 97-101, 2013.
- MORAIS, W. G.; KAMIMURA, E. S.; RIBEIRO, E. J.; PESSELA, B. C.; CARDOSO, V. L.; RESENDE, M. M. Optimization of the production and characterization of lipase from *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum* in soybean molasses by submerged fermentation. **Protein expression and purification**, v. 123, p. 26-34, 2016.
- MUSHTAQ, Z.; IRFAN, M.; NADEEM, M.; NAZ, M.; SYED, Q. Kinetics study of extracellular detergent stable alkaline protease from *Rhizopus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 2, p. 175-184, 2015.
- NAJAFPOUR, G. Enzyme Technology. In: ____ **Biochemical engineering and biotechnology**. 2 ed. Amsterdam: Elsevier Science Ltd., 2015. p. 19-49.
- NAMPOOTHIRI, K. M.; BAIJU, T. V.; SANDHYA, C.; SABU, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. **Process biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1583-1590, 2004.
- NASCIMENTO, T. C. E. S.; SENA, A. R.; GOMES, J. E. G.; SANTOS, W. L.; MONTALVO, G. S. A.; TAMBOURGI, E. B.; MEDEIROS, E. V.; SETTE, L. D.; PESSOA JUNIOR, A.; MOREIRA, K. A. Extracellular serine proteases by *Acremonium* sp. L1-4B isolated from Antarctica: Overproduction using cactus pear extract with response surface methodology. **Bio catalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 737-744. 2015.
- NEVES, K. C. S.; PORTO, A. L. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. **Acta Amazonica**, v. 36, p. 299-306, 2006.

NOVELLI, P. K.; BARROS, M. M.; FLEURI, L. F. Novel inexpensive fungi proteases: production by solid state fermentation and characterization. **Food Chemistry**, v. 198, p. 119-124, 2016.

OHNISHI, K.; YOSHIDA, Y.; SEKIGUCHI, J. Lipase production of *Aspergillus oryzae*. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 77, n. 5, p. 490-495, 1994.

OKEKE, C. N.; OKOLO, B. N. The effect of cultural conditions on the production of lipase by *Acremonium strictum*. **Biotechnology letters**, v. 12, n. 10, p. 747-750, 1990.

OLIVEIRA, L. G.; CAVALCANTI, M. A. Q.; FERNANDES, M. J. S.; LIMA, D. M. M. Diversity of filamentous fungi isolated from the soil in the semiarid area, Pernambuco, Brazil. **Journal of arid environments**, v. 95, p. 49-54, 2013.

ORTIZ-URQUIZA, A.; KEYHANI, N. O. Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects*, v. 4, n. 3, p. 357-374, 2013.

PASSARINI, M. R.; SANTOS, C.; LIMA, N.; BERLINCK, R. G.; SETTE, L. D. Filamentous fungi from the Atlantic marine sponge *Drasmodon reticulatum*. **Archives of microbiology**, v. 195, n. 2, p. 99-111, 2013.

PATIL, M. G.; PAGARE, J.; PATIL, S. N.; SIDHU, A. K. Extracellular enzymatic activities of endophytic fungi isolated from various medicinal plants. **International Journal Current Microbiology Applied Sciences**, v. 4, n. 3, p. 1035-1042, 2015.

PEREIRA, S. A.; OLIVEIRA, R. L.; DUVOISIN JUNIOR, S.; SILVA, L. A. D. O.; ALBUQUERQUE, P. I. M. The use of Amazon fungus (*Trametes* sp.) in the production of cellulase and xylanase. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 20, p. 843-853, 2016.

PERINOTTO, W. M. S.; ANGELO, I. C.; GOLO, P. S.; QUINELATO, S.; CAMARGO, M. G.; SÁ, F. A.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 3, p. 257-260, 2012.

PRAZERES, J. N. D.; CRUZ, J. A. B.; PASTORE, G. M. Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 505-509, 2006.

PYLRO, V. S.; ROESCH, L. F. W.; ORTEGA, J. M.; AMARAL, A. M.; TÓTOLA, M. R.; HIRSCH, P. R.; ROSADO, A. S.; GÓES NETO, A.; SILVA, A. L. C.; ROSA, C. A.; MORAIS, D. K.; ANDREOTE, F. D.; DUARTE, G. F.; MELO, I. S.; SELDIN, L.; LAMBAIS, M. R.; HUNGRIA, M.; PEIXOTO, R. S.; KRUGER, R. H.; TSAI, S. M.; AZEVEDO, V. Brazilian microbiome project: revealing the unexplored microbial diversity—challenges and prospects. **Microbial Ecology**, v. 67, n. 2, p. 237-241, 2014.

RAMIREZ-COUTIÑO, L.; ESPINOSA-MARQUEZ, J.; PETER, M. G.; SHIRAI, K. The effect of pH on the production of chitinolytic enzymes of *Verticillium fungicola* in submerged cultures. **Bioresource technology**, v. 101, n. 23, p. 9236-9240, 2010.

RAPP, P. Production, regulation, and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 9, p. 832-838, 1995.

RECK, J.; KLAFKE, G. M.; WEBSTER, A.; DALL'AGNOL, B.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U. A.; CORASSINI, V. B.; VARGAS, R.; SANTOS, J. S.; SOUZA MARTINS, J. R. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**, v. 201, n. 1, p. 128-136, 2014.

REN, Q.; LIU, Z.; GUAN, G.; SUN, M.; MA, M.; NIU, Q.; LI, Y.; LIU, A.; LIU, J.; YANG, J.; YIN, H.; LUO, J. Laboratory evaluation of virulence of Chinese *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to engorged female *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks. **Biological Control**, v. 63, n. 2, p. 98-101, 2012.

RHODEN, S. A.; GARCIA, A.; BONGIORNO, V. A.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Antimicrobial activity of crude extracts of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Trichilia elegans* A. Juss. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 8, p. 57-59, 2012.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in polymer science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.

ROBBERTSE, L.; BARON, S.; VAN DER MERWE, N. A.; MADDER, M.; STOLTSZ, W. H.; MARITZ-OLIVIER, C. Genetic diversity, acaricide resistance status and evolutionary potential

of a *Rhipicephalus microplus* population from a disease-controlled cattle farming area in South Africa. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 7, n. 4, p. 595-603. 2016.

SANTI, L.; SILVA, L. A. D.; DA SILVA, W. O. B.; CORRÊA, A. P. F.; RANGEL, D. E. N.; CARLINI, C. R.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Virulence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* using soybean oil formulation for control of the cotton stainer bug, *Dysdercus peruvianus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 10, p. 2297-2303, 2011.

SAXENA, R. K.; DAVIDSON, W. S.; SHEORAN, A.; GIRI, B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 239-247, 2003.

SHARMA, A. K.; SHARMA, V.; SAXENA, J.; YADAV, B.; ALAM, A.; PRAKASH, A. Effect of culture conditions on protease production and activity of protease from soil borne fungi. **International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences**, v 3, n 11, p. 0411-0419, 2015.

SHIMADA, Y.; KOGA, C.; SUGIHARA, A.; NAGAO, T.; TAKADA, N.; TSUNASAWA, S.; TOMINAGA, Y. Purification and characterization of a novel solvent-tolerant lipase from *Fusarium heterosporum*. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 75, n. 5, p. 349-352, 1993.

SILVA, W. O. B.; MITIDIÉRI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 321-326, 2005.

SOBREVILLA, J. V.; VILLA, D. B.; RODRIGUEZ, R.; HERNANDEZ, J. L. M.; AGUILAR, C.N. Microbial biosynthesis of enzymes for food applications. In: YADA, Y. **Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition**. Woodhead Publishing, 2015, p. 85-99.

SOMMER, P.; BORMANN, C.; GÖTZ, F. Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3553-3560, 1997.

SONENSHINE, D. E.; LANE, R. S.; NICHOLSON, W. L. Ticks (Ixodida). In: MULLEN G, DURDEN L. **Medical and veterinary entomology**. Amsterdam: Academic Press Elsevier Science; 2002. p. 517–58.

SOUZA, P. M. D.; BITTENCOURT, M. L. D. A.; CAPRARA, C. C.; FREITAS, M. D.; ALMEIDA, R. P. C. D.; SILVEIRA, D.; FONSECA, Y. M.; FERREIRA FILHO, E. X.; PESSOA JUNIOR, A.; MAGALHÃES, P. O. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 337-346, 2015.

SPANÒ, D.; POSPISKOVA, K.; SAFARIK, I.; PISANO, M. B.; PINTUS, F.; FLORIS, H.; MEDDA, R. Chitinase III in *Euphorbia characias* latex: Purification and characterization. **Protein Expression and Purification**, v. 116, n. 1, p. 152-158. 2015.

STAATS, C. C.; KMETZSCH, L.; LUBECK, I.; JUNGES, A.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. *Metarhizium anisopliae* chitinase CHIT30 is involved in heat-shock stress and contributes to virulence against *Dysdercus peruvianus*. **Fungal biology**, v. 117, n. 2, p. 137-144, 2013.

STEPANOV, V. M.; RUDENSKAYA, G. N.; VASIL'eva, L. I.; KREST'ANOVA, I. N.; KHODOVA, O. M.; BARTOSHEVITCH, Y. E. Serine proteinases from *Acremonium chrysogenum*. **International Journal of Biochemistry**, v. 18, n. 4, p. 369-375, 1986.

STÜRMER S. L.; SIQUEIRA, J. O. Species richness and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi across distinct land uses in Western Brazilian Amazon. **Mycorrhiza**, v. 21, n. 4, p. 255-267, 2011.

SUPAKDAMRONGKUL, P.; BHUMIRATANA, A.; WIWAT, C. Characterization of an extracellular lipase from the biocontrol fungus, *Nomuraea rileyi* MJ, and its toxicity toward *Spodoptera litura*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 105, n. 3, p. 228-235, 2010.

SYTWALA, S.; GÜNTHER, F.; MELZIG, M. F. Lysozyme- and chitinase activity in latex bearing plants of genus *Euphorbia* – A contribution to plant defense mechanism. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 95, n. 1, p. 35-40. 2015.

TAKAHASHI, J. A.; CASTRO, M. C. M.; SOUZA, G. G.; LUCAS, E. M. F.; BRACARENSE, A. A. P.; ABREU, L. M.; MARRIEL, I. E.; OLIVEIRA, M. S.; FLOREANO, M. B.;

OLIVEIRA, T. S. Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Medical Mycology**, v. 18, n. 4, p. 198-204, 2008.

TAKAHASHI, K. Proteinase A from *Aspergillus niger*. **Methods in enzymology**, v. 248, p. 146-155, 1994.

TAYLOR, D. L.; SINSABAUGH, R. L. Soil microbiology, ecology, and biochemistry. In: PAUL, E. A. **The soil fungi: occurrence, phylogeny, and ecology**. 4 ed. USA: Elsevier Science Ltd., 2014. P. 77-100.

TEDERSOO, L.; BAHRAM, M.; PÖLME, S.; KÕLJALG, U.; YOROU, N. S.; WIJESUNDERA, R.; RUIZ, L. V.; VASCO-PALACIOS, A. M.; THUN, P. Q.; SUIJA, A.; SMITH, E. M.; SHARP, C.; SALUVEER, E.; SAITTA, A.; ROSAS, M.; RIIT, T.; RATKOWSKY, D.; PRITSCH, K.; PÕLDMAA, K.; PIEPENBRING, M.; PHOSRI, C.; PETERSON, M.; PARTS, K.; PÄRTEL, K.; OSSING, E.; NOUHRA, E.; NJOUONKOU, A. L.; NILSSON, R. H.; MORGADO, L. N.; MAYOR, J.; MAY, T. W.; MAJUAKIM, L.; LODGE, D. G.; LEE, S. S.; LARSSON, K.; KOHOUT, P.; HOSAKA, K.; HIIESALU, I.; HENKEL, T. W.; HAREND, H.; GUO, L.; GRESLEBIN, A.; GRELET, G.; GEML, J.; GATES, G.; DUNSTAN, W.; DUNK, C.; DRENKHAN, R.; DEARNALEY, J.; KESES, A. D.; DANG, T.; CHEN, X.; BUEGGER, F.; BREARLEY, F. Q.; BONITO, G.; ANSLAN, S.; ABELL, S.; ABARENKOV, K. Global diversity and geography of soil fungi. **Science**, v. 346, n. 6213, p. 1256688, 2014.

TEIXEIRA, M. F. S.; SILVA, T. A.; PALHETA, R. A.; CARNEIRO, A. L. B.; ATAYDE, H. M. **Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada (Aplicações Biotecnológicas)**. Manaus: Edua, 2011. p 255.

TZEAN, Y.; CHOU, T. H.; HSIAO, C. C.; SHU, P. Y.; WALTON, J. D.; TZEAN, S. S. Cloning and characterization of cuticle-degrading serine protease from nematode-trapping fungus *Arthrobotrys musiformis*. **Mycoscience**, v. 57, n. 2, p. 136-143, 2016.

VEGA, F. E.; MEYLING, N. V.; LUANGSA-ARD, J. J.; BLACKWELL, M. Fungal entomopathogens. **Insect pathology**, v. 2, p. 171-220, 2012.

VELOORVALAPPIL, N. J.; ROBINSON, B. S.; SELVANESAN, P.; SASIDHARAN, S.; KIZHAKKEPAWOTHAIL, N. U.; SREEDHARAN, S.; PRAKASAN, P.; JOSH, M. S.; BENJAMIN, S. Versatility of microbial proteases. **Advances in Enzyme Research**, v. 1, n. 3, p. 39-51, 2013.

WANG, J.; WANG, J.; LIU, F.; PAN, C. Enhancing the virulence of *Paecilomyces lilacinus* against *Meloidogyne incognita* eggs by overexpression of a serine protease. **Biotechnology letters**, v. 32, n. 8, p. 1159-1166, 2010.

WASSERMANN, M.; SELZER, P.; STEIDLE, J. L.; MACKENSTEDT, U. Biological control of *Ixodes ricinus* larvae and nymphs with *Metarhizium anisopliae* blastospores. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 2016.

WEBSTER, A.; RECK, J.; SANTI, L.; SOUZA, U. A.; DALL'AGNOL, B.; KLAFKE, G. M.; BEYS-DA-SILVA, W. O.; MARTINS, J. R.; SCHRANK, A. Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions. **Veterinary parasitology**, v. 207, n. 3, p. 302-308, 2015.

WILLADSEN, P. Tick control: thoughts on a research agenda. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1, p. 161-168, 2006.

YADAV, S. K.; BISHT, D.; TIWARI, S.; DARMWAL, N. S. Purification, biochemical characterization and performance evaluation of an alkaline serine protease from *Aspergillus flavus* MTCC 9952 mutant. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 667-677, 2015.

YANG, J.; ZHAO, X.; LIANG, L.; XIA, Z.; LEI, L.; NIU, X.; ZOU, C.; ZHANG, K. Q. Overexpression of a cuticle-degrading protease Ver112 increases the nematicidal activity of *Paecilomyces lilacinus*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 89, n. 6, p. 1895-1903, 2011.

YANG, S.; FU, X.; YAN, Q.; GUO, Y.; LIU, Z.; JIANG, Z. Cloning, expression, purification and application of a novel chitinase from a thermophilic marine bacterium *Paenibacillus barengoltzii*. **Food Chemistry**, v. 192, n. 1, p. 1041-1048. 2016.

YIKE, I. Fungal proteases and their pathophysiological effects. **Mycopathologia**, v. 171, n. 5, p. 299-323, 2011.

YU, X. W.; XU, Y.; XIAO, R. Lipases from the genus *Rhizopus*: Characteristics, expression, protein engineering and application. **Progress in Lipid Research**, v. 64, p. 57-68, 2016.