

Metarhizium anisopliae: influência do pH na atividade enzimática e no controle de *Rhipicephalus microplus**

Allan Felipe Marciano¹, Caio Junior Balduino Coutinho-Rodrigues², Wendell Marcelo de Souza Perinotto³, Mariana Guedes Camargo⁴, Patrícia Silva Gôlo⁵, Fillipe Araujo de Sá⁶, Simone Quinelato⁷, Maria Clemente de Freitas⁸, Isabele da Costa Angelo⁹, Michel Ruan dos Santos Nogueira¹⁰ e Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt¹¹⁺

ABSTRACT. Marciano A.F., Coutinho-Rodrigues C.J.B., Perinotto W.M.S., Camargo M.G., Gôlo P.S., Sá F.A., Quinelato S., Freitas M.C., Angelo I.C., Nogueira M.R.S. & Bittencourt V.R.E.P. [*Metarhizium anisopliae*: influence of pH on enzyme activity and control of *Rhipicephalus microplus* ticks.] *Metarhizium anisopliae*: influência do pH na atividade enzimática e no controle de *Rhipicephalus microplus*. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 37(Supl.1):85-90, 2015. Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal do Rio de Janeiro, BR 465, Km 47, Seropédica, RJ 23897-970, Brasil. E-mail: vaniabit@ufrj.br

Rhipicephalus microplus ticks are one of the major agents causing substantial losses to livestock worldwide. In the search for alternative control strategies, both *in vitro* and *in vivo* use of the arthropodpathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* has shown promising results against this ectoparasite. During host colonization, protease production by *M. anisopliae* is considered one important virulence factor once it is directly related to the active penetration process carried by the fungus on the full host cuticle. Nevertheless, limitations as environmental pH may modulate the proteases production and/or activity, as well as, the fungal virulence. The current study aimed evaluate the virulence and total protease activity of *M. anisopliae* CG 148 sensu lato (s.l.). Fungal aqueous suspensions or 5% mineral oil formulations were used in different pH ranges (5, 7, or 9). Suspensions and formulations were prepared using a pH meter and adjusted to 10⁸ spores mL⁻¹. In the bioassay, four groups were formed for each pH range: the aqueous fungal suspension, the oil-based fungal formulation and their respective controls (aqueous and oil-based), totaling 12 groups. Engorged females were immersed for 3 minutes and maintained under optimal conditions for evaluation of biological parameters. Total protease activity of

*Recebido em 4 de novembro de 2015.

Aceito para publicação em 7 de dezembro de 2015.

¹ Médico-veterinário, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (CPGCV), Instituto de Veterinária (IV), UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: allanfmarc@gmail.com.br - bolsista CAPES

² Médico-veterinário, MSc., CPGCV, IV, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail:caio-jr@hotmail.com - bolsista CNPq.

³ Médico-veterinário, DSc. Departamento de Parasitologia Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Cuiabá, Avenida Beira Rio, 3100, Jardim Europa, Cuiabá, MT 78065-900. E-mail: wendellufrj@hotmail.com

⁴ Médica-veterinária, DSc. Programa de Apoio ao Pós-Doutorado (PAPD), Departamento de Parasitologia Animal (DPA), IV, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: marigcamargo@gmail.com - bolsista FAPERJ.

⁵ Médica-veterinária, DSc. DPA, IV, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, 23897-970 RJ. E-mail: patriciagolo@gmail.com

⁶ Médico-veterinário, MSc. Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis (IBqM), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ 21941-902. E-mail: llipea@hotmail.com

⁷ Médica-veterinária, DSc. Coleção de fungos filamentosos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Brasil, 4365, Pavilhão Rocha Lima, Sala 525, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ 21040-360. E-mail: squinelato@gmail.com

⁸ Curso de Medicina Veterinária, UFRRJ, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: mariamedvet@hotmail.com - bolsista FAPERJ.

⁹ Médica-veterinária, DSc. Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, IV, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. Email: isabeleangelo@yahoo.com.br

¹⁰ Médico-veterinário, MSc., CPGCV, IV, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: michelnogueira2012@hotmail.com - bolsista CAPES.

¹¹ Médica-veterinária, PhD. DPA, IV, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. *Autora para correspondência. E-mail: vaniabit@ufrj.br - bolsista CNPq.

the artificial medium (after filtration of mycelia) was assessed by azocasein hydrolysis at 72 hours of incubation in minimal medium supplemented with 1% *R. microplus* cuticle. Oil-based formulations did not yield significant alterations in the fungal virulence or enzyme activity. Nevertheless, the alkaline pH at aqueous suspensions reduced total protease activity and negatively influenced fungal virulence, reducing 1.5 times tick control percent. Based on these results, it is suggested that excessive alkalinity in strictly aqueous media may potentially interfere in the *in vitro* arthropodpathogenic fungal virulence.

KEY WORDS. Cattle ticks, biological control, proteases, arthropodopathogenic fungi.

RESUMO. O carrapato *Rhipicephalus microplus* é considerado um dos principais agentes causadores de grandes prejuízos à pecuária mundial. Na busca por estratégias alternativas de controle, o uso de fungos artropodopatogênicos como *Metarhizium anisopliae* tem apresentado resultados promissores *in vitro* e *in vivo* para este artrópode. Durante a colonização do hospedeiro, a produção de proteases por *M. anisopliae* é considerada um importante fator de virulência, pois encontra-se diretamente relacionada ao processo de penetração ativa do fungo pela cutícula íntegra. Entretanto, limitações como o pH do meio de atuação fúngica são capazes de modular a produção/atividade das proteases, bem como influenciar a capacidade patogênica de isolados fúngicos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a virulência e a atividade proteolítica total do isolado CG 148 de *M. anisopliae* sensu lato (s.l.) suspenso em água destilada estéril acrescida de Tween 80 0,01% ou formulado em óleo mineral (5%) em diferentes faixas de pH (5, 7 e 9). As suspensões e formulações foram elaboradas com auxílio de medidor de pH e microscópio óptico na concentração de 10^8 conídios/mL. No ensaio biológico, para cada faixa de pH foram formados quatro grupos, compostos de uma suspensão aquosa, uma formulação oleosa e seus respectivos controles (oleoso e aquoso), totalizando 12 grupos. As fêmeas ingurgitadas foram imersas por três minutos e mantidas sob condições controladas para observação dos parâmetros biológicos. A atividade proteolítica foi determinada pela hidrólise da azocaseína após 72 horas de crescimento em meio mínimo acrescido de 1% de cutícula de *R. microplus*. Para todas as formulações oleosas avaliadas, não foram observadas alterações significativas de patogenicidade e atividade enzimática. Porém, em suspensões aquosas, o pH alcalino reduziu a atividade proteolítica total e influenciou negativamente a virulência, reduzindo em 1,5 vezes o percentual de controle. Com base nestes resultados, acredita-se que a alcalinidade excessiva em meios estritamente aquosos interfira no potencial *in vitro* de fungos artropodopatogênicos.

PALAVRAS-CHAVE. Carrapato dos bovinos, controle biológico, enzimas, fungos artropodopatogênicos.

INTRODUÇÃO

O carrapato dos bovinos *Rhipicephalus microplus* é atualmente considerado um dos principais agentes de parasitismo no mundo, sendo causador de diversos prejuízos à pecuária brasileira. Este artrópode é responsável por significativas perdas econômicas em rebanhos de áreas tropicais e subtropicais, sendo um importante transmissor de patógenos, que muitas vezes reduzem a produção de carne e leite nacional (Castro & Newson 1993, Monteiro et al. 2003).

De maneira geral, as técnicas utilizadas para controle desta parasitose baseiam-se no manejo rotacionado das pastagens e na aplicação de carrapaticidas químicos através de banhos periódicos (Bittencourt et al. 1999). Entretanto, o uso inadequado destes produtos tem impulsionado o surgimento de populações resistentes às principais bases farmacológicas existentes no mercado e suas associações. Por este motivo, pesquisas que envolvam formas alternativas à utilização de produtos químicos são crescentes tanto no Brasil quanto em outros países. Neste cenário, o controle biológico utilizando fungos artropodopatogênicos tem consolidado cada vez mais sua importância no combate dos principais ectoparasitos de importância médica veterinária. Embora a patogenicidade e virulência de fungos como *Metarhizium anisopliae* já tenha sido comprovada em condições laboratoriais, sua eficácia diminui consideravelmente quando são testados a campo (Inglis et al. 2001).

A secreção de enzimas proteolíticas e quitinolíticas é uma característica marcante dos processos de infecção por *M. anisopliae* em seus hospedeiros. Esse micro-organismo produz diferentes famílias de proteases extracelulares como as do tipo subtilisinas (Pr1), tripsinas (Pr2), além de metaloproteases e várias peptidases de ação exógena, todas consideradas importantes na degradação da cutícula (St. Leger 1995).

O desempenho de fungos artropodopatogênicos é afetado por uma variedade de fatores ambientais, tais como temperatura, umidade, radiação solar, chuvas e ventos, além do microclima no hábitat em que o artropodopatógeno vive (Inglis et al. 2001). Arelado a isso, sabe-se que o pH do meio exerce grande influência na expressão de exoenzimas importantes para o processo de colonização e crescimento fúngicos (St. Leger et al. 1999, Franceschini et al. 2001, Small et al. 2005, Perinotto et al. 2014). Um trabalho que avaliou diferentes faixas de pH e a ação proteolítica de *M. anisopliae*, determinou que as maiores atividades enzimáticas eram observadas em pH alcalino, tendo as enzimas Pr1 e Pr2 apresentado maior potencial de ação em pH 8 (St. Leger 1998). Perinotto et al. (2014) ao avaliarem a virulência *in vitro* para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e a atividade proteolítica específica (Pr1) de cinco isolados de *M. anisopliae*, observaram que o isolado CG 148 apresentou alto potencial patogênico após quatro dias de tratamento, além de demonstrar as maiores atividades enzimáticas após 48 e 72h de crescimento em meio mínimo acrescido de cutícula de carrapatos.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo testar formulações aquosas e oleosas do isolado CG 148 *Metarhizium anisopliae* s.l. elaboradas em diferentes variações de pH, assim como avaliar a atividade proteolítica total das suspensões e formulações do isolado cultivadas em meio mínimo contendo cutícula de *R. microplus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Elaboração das suspensões e formulações

O isolado CG 148 de *M. anisopliae* s.l. foi repicado em meio batata-dextrose-ágar (BDA) e crescido em condições controladas por 15 dias ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura e umidade relativa (U. R.) $\geq 80\%$). O pH do veículo utilizado no preparo das suspensões (água destilada estéril) foi ajustado com o auxílio de potenciômetro em três faixas: 5,0 (faixa ácida); 7,0 (faixa neutra) e 9,0 (faixa básica). Após crescimento, os conídios foram raspados da superfície das placas para a elaboração das suspensões e formulações. As suspensões aquosas em cada faixa foram elaboradas a partir da adição de Tween 80 a 0,01% (Sigma) (Luz et al., 1998) e quantificadas na concentração de 10^8 conídios/mL. Para as formulações oleosas, a concentração de óleo mineral nas suspensões foi ajustada para 5%. Vinte e quatro horas após preparo, a determinação da viabilidade e o cálculo da germinação dos conídios foi realizado segundo Alves (1998).

Ensaio biológico com fêmeas ingurgitadas

As fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram obtidas a partir da infestação artificial de bezerros estabulados

(submetido à Comissão de Ética da UFRRJ, protocolo 2083.011620/2011-68) sem contato recente com carrapaticidas químicos no município de Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. Para garantir a assepsia da cutícula, as fêmeas foram imersas em uma solução de hipoclorito de sódio a 1% durante três minutos. Posteriormente, parte foi pesada e separada homogeneamente por peso, enquanto outra parte foi acondicionada em placas de Petri e incubadas a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e U.R. $\geq 80\%$ para realização de postura para os ensaios com ovos e larvas.

Foram utilizadas oito fêmeas por grupo, sendo determinado um total de 6 grupos tratados: *Metarhizium* (Ma) aquoso (Aq) pH 5,0; Ma Aq pH 7,0; Ma Aq pH 9,0; Ma Oleoso (OL) pH 5,0; Ma OL pH 7,0; Ma OL pH 9,0. Para a cada tratamento, foi elaborado um grupo controle: CTR Aq pH 5,0; CTR Aq pH 7,0; CTR Aq pH 9,0; CTR OL pH 5,0; CTR OL pH 7,0; CTR OL pH 9,0.

As fêmeas foram imersas por três minutos em um mL das suspensões ou água destilada estéril acrescida de Tween 80 0,01% (controle), sendo posteriormente mantidas sob temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e U. R. $\geq 80\%$. Diariamente, foram realizadas a avaliação da presença de fêmeas mortas bem como a pesagem da postura obtida. Os ovos foram mantidos em câmara climatizada e o percentual de eclosão das larvas foi acompanhado diariamente.

Os parâmetros biológicos utilizados para avaliar o efeito do fungo sobre fêmeas ingurgitadas foram: Peso Total da Massa de Ovos (P.T.M.O.), Percentual de Eclosão das Larvas (P.E.L.), Índice de Produção de Ovos (I.P.O.) e Índice Nutricional (I.N.) (Bennett, 1974). Além disto, ao final do experimento, foi determinado o Percentual de Controle a partir da Eficiência Reprodutiva (R.E.) obtida em cada tratamento (Drummond et al. 1971).

Reisolamento fúngico

Três dias após o término da postura, amostras de fêmeas de todos os grupos foram colocadas em câmara úmida e incubadas a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e U.R. $\geq 80\%$ para facilitar o crescimento dos fungos e posterior confirmação de suas características (Samson & Evans 1982).

Ensaio enzimáticos

Em frascos Erlenmeyer, contendo 20 mL de meio mínimo líquido (adaptado de Beys da Silva et al., 2010) enriquecido com 1% de cutícula de teleóginas de *R. microplus*, foram adicionados um mL de suspensão e a formulação fúngica na concentração de 10^6 conídios/mL elaboradas a partir de veículo apresentando pH 5, 7 ou 9. As culturas foram incubadas em agitador orbital a 150 rpm e 25°C durante 72 horas. Para extração das enzimas foram adicionados 250 μL de Triton X-100 a 10% (Silva et al. 2005), sendo manualmente agitados durante um minuto; posteriormente o micélio foi filtrado em papel Whatman n°1 com auxílio de bomba de vácuo. O sobrenadante foi recuperado e armazenado à -80°C até a realização do ensaio.

A atividade proteolítica foi determinada pela hidrólise da azocaseína (Sigma) segundo Sangorrín et al. (2001). O cálculo da atividade enzimática foi determinado a a par-

tir das densidades ópticas obtidas do segundo Sangorrín et al. (2001). Os experimentos foram feitos em triplicata e o branco da reação realizado com a adição do tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,9 em substituição à amostra.

Análise estatística

Para a análise dos dados paramétricos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) para a comparação entre as médias, e para a análise dos dados não-paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal Wallis, seguido do teste de SNK para comparação entre as ordenações médias (Sampaio 2002).

RESULTADOS

Viabilidade das suspensões e reisolamento fúngico

Todas as suspensões e formulações foram consideradas viáveis 24 horas após preparo, com percentual de germinação superior a 98%, não sendo observado efeito deletério nas suspensões aquosas ácida, neutra e alcalina. Além disto, o corpo residual das fêmeas submetidas ao tratamento com as formulações fúngicas apresentou exteriorização fúngica após 30 dias, que foi confirmada através da avaliação morfológica por microscopia óptica.

Ensaio biológico com fêmeas ingurgitadas

As suspensões aquosas com pH 5,0 e 7,0 apresentaram maior percentual de controle quando comparado ao pH 9,0. A suspensão aquosa mostrou influenciar negativamente a formulação fúngica, no qual o percentual de controle foi de 36,89%, sendo considerado 1,58 vezes menor do que a formulação com pH neutro (58,92%). As suspensões oleosas provocaram a morte de todas as fêmeas ainda no período de pré-postura atingindo 100 % de controle das fêmeas tratadas (Tabela 1).

Na avaliação dos Índices de Produção de Ovos (IPO), Índice Nutricional (IN) e Eficiência Reprodutiva (ER) não houve diferença entre os tratamentos controles. Sendo que o IPO e ER foram estatisticamente menores nos tratamentos com suspensão aquosa quando comparados aos tratamentos controles (Tabela 2).

As suspensões oleosas foram capazes de ocasionar a morte de todas as fêmeas submetidas ao tra-

Tabela 1. Percentual de controle de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão em suspensão aquosa ou formulações oleosas no pH 5, 7 ou 9 do isolado CG148 de *Metarhizium anisopliae* (s.l.), e mantidas sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$.

Isolado CG148	Ácido (pH 5,0)	Neutro (pH 7,0)	Básico (pH 9,0)
Suspensão aquosa	49,62 %	58,92%	36,89%
Formulação oleosa	100 %	100%	100%

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão do Índice de Produção de Ovos (I.P.O.), Índice Nutricional (I.N.) e Eficiência Reprodutiva (E.R.) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão em suspensão aquosa ou formulações oleosas com pH 5, 7 ou 9 do isolado CG 148 de *Metarhizium anisopliae* s.l., e mantidas sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$.

Grupos	I.P.O.	I.N.	E.R.
Controle Aquoso pH 5,0	58,67 ^a ±4,11	69,11 ^a ±4,47	58,08 ^a ±4,07
Controle Aquoso pH 7,0	59,47 ^a ±3,4	69,85 ^a ±5,51	58,30 ^a ±4,04
Controle Aquoso pH 9,0	59,19 ^a ±7,94	69,92 ^a ±9,02	58,45 ^a ±7,90
Controle Oleoso pH 5,0	56,56 ^a ±3,06	62,76 ^a ±6,87	53,16 ^a ±7,76
Controle Oleoso pH 7,0	56,55 ^a ±6,96	65,46 ^a ±5,91	54,97 ^a ±7,34
Controle Oleoso pH 9,0	56,35 ^a ±4,68	62,71 ^a ±7,41	53,29 ^a ±8,00
CG148 Aquoso pH 5,0	32,83 ^b ±11,86	55,0 ^{ab} ±22,41	29,26 ^b ±13,00
CG148 Aquoso pH 7,0	32,67 ^b ±14,99	49,20 ^b ±18,77	20,95 ^b ±15,99
CG148 Aquoso pH 9,0	40,71 ^b ±6,47	73,09 ^a ±10,11	36,89 ^b ±9,23
CG148 Oleoso pH 5,0	-	-	-
CG148 Oleoso pH 7,0	-	-	-
CG148 Oleoso pH 9,0	-	-	-

^{ab}Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$).

Tabela 3. Atividade proteolítica do isolado CG 148 de *Metarhizium anisopliae* s.l. a partir de suspensões fúngicas aquosas e oleosas em diferentes faixas de pH após 72 horas cultivado em meio mínimo contendo 1% de cutícula do carrapato *Rhipicephalus microplus*.

Isolado CG148	Ácido (pH 5,0)	Neutro (pH 7,0)	Básico (pH 9,0)
Suspensão aquosa	10,28 ^{Aa} ± 0,72	10,08 ^{Aa} ± 1,73	8,16 ^{Ba} ± 0,16
Formulação oleosa	9,84 ^{Aa} ± 0,40	9,32 ^{Aa} ± 1,06	8,76 ^{Aa} ± 0,54

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

tamento, impossibilitando a avaliação do IPO, IN e ER (Tabela 2).

O IN das fêmeas do grupo tratado com suspensão aquosa no pH 7,0 foi estatisticamente reduzido quando comparado aos demais grupos (Tabela 2).

Ensaio enzimáticos

Nos ensaios enzimáticos, o pH alcalino do meio foi capaz de reduzir significativamente a atividade enzimática (8,16 U) quando comparado ao meio neutro (10,08 U) e ácido (10,28 U) (Tabela 3).

Já as formulações oleosas não apresentaram diferença significativa da atividade enzimática quando comparadas entre si e quando comparadas com as formulações aquosas no mesmo valor de pH não foi observada significância entre os resultados (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Diversas pesquisas demonstram o uso de fungos artropodopatogênicos para o combate do carrapato *R. microplus* (Bittencourt et al. 1995, Barci et al.

2009a, Campos et al. 2010). No entanto fatores bióticos e abióticos podem influenciar diretamente o potencial de um agente biológico. Trabalhos de Inglis et al. (2001), Cagan & Svercel (2001), Alves et al. (2002) e Peng & Xia (2011), mostram fatores como umidade relativa, temperatura ambiente, velocidade do ar, precipitação pluviométrica, tipo de suspensão e raios UV, sendo implicações no desenvolvimento fúngico.

O pH faz parte dos fatores que podem influenciar no mecanismo de ação destes microrganismos, St. Leger et al. (1999), demonstra que *M. robertsii* é capaz de mudar o pH ambiente para favorecer a atividade de suas enzimas e possuem faixas ótimas de pH para seu melhor desenvolvimento, podendo este ser um fator estressante e de relevância para a formulação de bioacaricidas.

No presente trabalho acrescentar ao artropodopatógeno o óleo mineral seguiu o preceito indicado por Alves (1998) no qual formular um agente biológico é adicionar substâncias que melhoram seu desempenho, facilitando a manipulação, aumentando o tempo de prateleira, diminuindo custos e impedindo a perda de qualidade.

Foi constatado que a atividade proteolítica foi mantida nas diferentes variações de pH das suspensões oleosas, revelando um possível efeito protetor do óleo à alcalinidade excessiva do meio, corroborando com Camargo et al. (2012) que sugere um efeito protetor do óleo para outras intempéries ambientais, assim como diversos trabalhos que mostram a adição de óleo mineral em formulações fúngicas potencializado o desempenho de *M. anisopliae* s. l. e *Beauveria bassiana* s. l. (Camargo et al. 2012, Perinotto et al. 2012, Marciano et al. 2013).

Segundo St. Leger et al. (1998), o pH alcalino é essencial para o ótimo funcionamento das enzimas proteolíticas secretadas no processo inicial de infecção de *M. anisopliae*, e ao analisar as formulações aquosas, foi evidenciado o efeito prejudicial ao mecanismo fungico na suspensão com pH 9,0 (alcalino), visto que nos ensaios biológico a excessiva alcalinidade da água utilizada diminuiu a atividade proteolítica do fungo quando não formulado com óleo, o que justifica o menor percentual de controle das fêmeas do carrapato, uma vez que a atividade exercida pelo complexo proteolítico está intimamente relacionada com a hidrólise de proteínas que compõe a procutícula (St. Leger et al. 1986). Estudos prévios analisando a secreção de enzimas extracelulares presentes na superfície de conídios, demonstraram que existem várias isoformas de proteases (Santi et al. 2010). Esta protease é sabidamente envolvida no

processo de penetração fúngica nos hospedeiros artrópodes, sendo responsável pela hidrólise de aproximadamente 30% de toda proteína da procutícula, e por isso, são consideradas importantes na virulência de *M. anisopliae* s.l. (St. Leger et al. 1996).

O maior percentual de controle encontrado nos tratamentos com suspensão aquosa nos valores de pH 5,0 e 7,0 podem ser explicados pela capacidade do fungo em alcalinizar o meio onde é encontrado e acelerar seu processo de penetração e consequentemente a colonização e morte do hospedeiro. O fungo *M. anisopliae* alcaliniza o ambiente levando em consideração que o pH 8,0 é ótimo para o funcionamento de suas enzimas proteolíticas (St. Leger et al. 1998, 1999).

Há diversos trabalhos que sugerem de forma variada a tolerância do fungo *M. anisopliae* ao pH, Milner (1989) indica faixas de 5 a 8,5, Rath et al. (1992) demonstra amplitudes variando de 4 a 7,8, já Hallsworth & Magan (1996) tiveram resultados ainda mais amplos entre 2.2 e 10.5. Em contraste, Goettel & Inglis (1997) observaram que o crescimento dos fungos é geralmente favorecido quando o pH do meio é inferior a 5. Sendo assim este fator justifica os resultados melhores nas formulações com valores de pH mais baixos.

Os resultados aqui demonstram a plasticidade do fungo *M. anisopliae* em se adaptar em diferentes meios com grande amplitude de pH, favorecendo a busca de novos veículos e associações de agentes biológicos com carrapaticidas químicos e fitoterápicos, uma vez que estes tem sido fonte de estudo de muitos pesquisadores (Bahense et al. 2004, Barci et al. 2009b, Soares et al. 2011) e que podem apresentar diferentes variações de pH e alterar os resultados aditivos dessas combinações.

CONCLUSÃO

Os resultados evidenciaram que o óleo manteve a atividade proteolítica nas diferentes variações de pH, reafirmando a ação protetora do óleo contra as adversidades do ambiente. O pH influencia na eficiência de formulações fúngicas aquosas, sendo melhor as formulações com pH entre cinco e sete, visto que a atividade proteolítica geral é comprometida em meios de alcalinidade superior a nove. Tais resultados são promissores para outras pesquisas no âmbito da utilização do óleo em formulações usadas no controle do carrapato dos bovinos e mais pesquisas devem ser feitas a fim de esclarecer sobre a influência do óleo na atividade de proteases.

Agradecimentos. Esta pesquisa foi executada com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Cien-

tífico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). Agradecemos ao Instituto Universitário de Pesquisas Melhorar (CAPES) por fornecer aos pós-graduandos as bolsas de estudo. Vânia R.E.P. Bittencourt é bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq.

REFERÊNCIAS

- Alves R.T., Bateman R.P., Gunn J., Prior C. & Leather S.R. Effects of Different Formulations on Viability and Medium-Term Storage of *Metarhizium anisopliae* Conidia. *Neotropical Entomology*, 31:91-99, 2002.
- Alves S.B. *Controle microbiano de insetos*. 2ª ed FEALQ, Piracicaba, 1998. 1163p.
- Bahiense T.C. & Bittencourt V.R.E.P. Laboratory evaluation of the compatibility and the synergism between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and deltamethrin to resistant strains of *Boophilus microplus*. *Annals of the New York Academy of Science*, 1026:319-322, 2004.
- Barci L.A.G., Almeida J.E.M., Nogueira A.H.C., Zappellini L.O. & Prado A.P. Selection of isolates of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) for control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18:7-13, 2009a.
- Barci L.A.G., Wenzel I.M., Almeida J.E.M., Nogueira A.H.C. & Prado A.P. Compatibilidade de isolados de *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) com carrapaticidas químicos utilizados no controle do carrapato dos bovinos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18:63-68, 2009b.
- Bennett G.F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida: Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. *Acarologia*, 16:52-61, 1974.
- 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*, 114:10-15, 2010.
- Bittencourt V.R.E.P., Massard C.L. & Lima A.F. Dinâmica da infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Revista Universidade Rural: Ciências da Vida*, 17:83-88, 1995.
- Bittencourt V.R.E.P. Controle Biológico de Carrapatos, p.49-55 In: Melo I.S. & Azevedo J.L. (Eds), *Controle Biológico*, EMBRAPA, Jaguariuna, SP, 1999.
- Cagan L. & Svercel M. The influence of ultraviolet light on pathogenicity of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin to the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* HBN. (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Central European Agriculture*, 2:119-125, 2001.
- Campos R.A., Boldo J.T., Pimentel I.C., Dalfovo V., Araújo W.L., Azevedo J.L., Vainstein M.H. & Barros N.M. Endophytic and entomopathogenic strains of *Beauveria* sp to control the bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Genetics and Molecular Research*, 9:1421-1430, 2010.
- Camargo M.G., Gôlo P.S., Angelo I.C., Perinotto W.M.S., Sá F.A., Quinelato S. & Bittencourt V.R.E.P. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. *Veterinary Parasitology*, 188:140-147, 2012.
- Castro J.J. & Newson R.M. Host resistance in cattle tick control. *Parasitology Today*, 9:13-17, 1993.
- Drummond R.O., Gladney W. J., Whetstone T. M. & Ernst S. E. Laboratory testing of insecticides for control of the winter tick. *Journal of Economic Entomology*, 64:686-688, 1971.
- Franceschini M., Guimarães A.P., Camassola M., Frazzon A.P., Barato C.M. Kogler V., Silva M.V., Dutra V., Nakazoto L., Castro L., Santini L., Vainstein M.H. & Schrank A. Biotecnologia aplicada ao controle biológico - O entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 23:32-37, 2001.
- Goettel M.S. & Inglis G.D. Fungi: Hyphomycetes, p.213-250. In: Lacey L.A. (Ed.), *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press, London, 1997.
- Hallsworth J.E. & Magan N. Culture age, temperature, and pH after the polyol and trehalose contents of fungal propagules. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:2435-2442, 1996.
- Inglis G.D., Goettel M.S., Tariq M.B. & Strasser H. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pest, p.23-69. In: Butt T.M., Jackson C.W. & Magan N. (Eds), *Fungi as Biological Control Agents*. CABI, Wallingford, 2001. 390p.
- Luz C., Tigano M.S., Silva I.G., Cordeiro C.M.T. & Aljanabi S.M. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates to control *Triatoma infestans*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 93:839-846, 1988.
- Marciano A.F., Fiorotti J.P., Souza L.A., Camargo M.G., Perinotto W.M.S., Angelo I.C., Patrícia Silva Gôlo P.S., Sá F.A., Coutinho-Rodrigues C.J.B., Quinelato S. & Bittencourt V.R.E.P. Eficiência in vitro de uma formulação oleosa de *Metarhizium anisopliae* no controle de *Rhipicephalus microplus*. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35:28-34, 2013.
- Milner R.J. Ecological considerations on the use of *Metarhizium* for control of soil-dwelling pests, p.10-13. In: Robertson L.N. & Allsopp P.G. (Eds), *Proceedings of a Soil-Invertebrate Workshop*. Indoorpilly, Queensland, 1989.
- Monteiro S.G., Matimoto L.R., Silveira F.S. & Leal A.M. Isolamento de fungos em carrapatos ixodídeos naturalmente infectados. *Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia*, 10:65-71, 2003.
- Peng G. & Xia Y. The mechanism of the diluent on the efficacy of oil formulation of insecticidal fungus. *Biocontrol*, 56:893-902, 2011.
- Perinotto W.M.S., Angelo I. C., Gôlo P.S., Camargo M.G., Sá F.A., Monteiro C.M.O., Coutinho-Rodrigues C.J.B., Quinelato S., Marciano A.F. & Bittencourt V.R.E.P. Eficiência da formulação comercial de *Beauveria bassiana* no controle de *Rhipicephalus microplus* em condições laboratoriais. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 34(Supl. 1):95-101, 2012.
- Perinotto W.M.S., Angelo I.C., Gôlo P.S., Camargo M.G., Quinelato S., Santi L., Vainstein M.H., Beys da Silva W.O., Salles C.M.C. & Bittencourt V.R.E.P. *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Moniliales) Pr1 activity: Biochemical marker of fungal virulence in (Acari: Ixodidae). *Biocontrol Science and Technology*, 24:123-132, 2014.
- Rath A.C. *Metarhizium anisopliae* for control of the Tasmanian pasture scarab *Adoryphorus couloni*, p.217-227. In: Jackson A.T. & Glare R.T. (Eds), *The Use of Pathogens in Scarab Pest Management*, 1992
- Sampaio I.B.M. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. FE-PMVZ - Editora, Belo Horizonte, 2002. 265p.
- Samson R.A. & Evans H.C. Two new *Beauveria* spp. from South America. *Journal of Invertebrate Pathology*, 39:93-97, 1982.
- Sangorin M.P., Folco E.J., Martone C.M. & Sánchez J.J. Purification and characterization of a protease inhibitor from white croaker skeletal muscle (*Micropogon opercularis*). *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 33:691-699, 2001
- Santi L., Beys da Silva W.O., Berger M. Guimarães J.A., Schrank A. & Vainstein M.H. Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. *Toxicon*, 55:874-880, 2010.
- Silva M.V., Santi L., Staats C.C., Costa A.M., Colodel E.M., Driemeier D., Vainstein M.H. & Schrank A. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the ch3 gene. *Research in Microbiology*, 156:382-392, 2005.
- Small C.L.N. & Bidochka M.J. Up-regulation of Pr1, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. *Mycology Research*, 109:307-313, 2005.
- Soares F.B. & Monteiro A.C. Compatibilidade de *Metarhizium anisopliae* com carrapaticidas químicos. *Arquivos do Instituto Biológico*, 78:385-391, 2011.
- St Leger R.J., Joshi L., Bidochka R.J., Rizzo N.W. & Roberts D.W. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:1257-1264, 1996.
- St Leger R.J., Joshi L. & Roberts D.W. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:709-713, 1998.
- St. Leger R. J. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogens of insects. *Canadian Journal of Botany*, 73:1119-1125, 1995.
- St. Leger R.J., Cooper R.M. & Charnley A.K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. *Journal of Genetic Microbiology*, 132:1509-1517, 1986.
- St. Leger R.J., Nelson J.O. & Screen S.E. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. *Microbiology*, 145:2691-2699, 1999.