



RUTH CELESTINA CONDORI MAMANI

**ESTUDO DAS ENZIMAS DE *Metarhizium anisopliae* E DA
PAPAÍNA COMO BIOPESTICIDAS**

**LAVRAS -MG
2024**

RUTH CELESTINA CONDORI MAMANI

**ESTUDO DAS ENZIMAS DE *Metarhizium anisopliae* E DA PAPAÍNA COMO
BIOPESTICIDAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Filippe Elias de Freitas Soares
Orientador

Prof. Dr. Willian Cesar Terra
Coorientador

**LAVRAS -MG
2024**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Mamani, Ruth Celestina Condori.

Estudo das Enzimas de *Metarhizium anisopliae* e da Papaína
como Biopesticidas / Ruth Celestina Condori Mamani. - 2024.
116 p.

Orientador(a): Filippe Elias De Freitas Soares.

Coorientador(a): Willian Cesar Terra.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Controle biológico. 2. controle bioquímico. 3. papaína. I. De
Freitas Soares, Filippe Elias. II. Terra, Willian Cesar. III. Título.

RUTH CELESTINA CONDORI MAMANI

**ESTUDO DAS ENZIMAS DE *Metarhizium anisopliae* E DA PAPAÍNA COMO
BIOPESTICIDAS**

**STUDY OF THE ENZYMES OF *Metarhizium anisopliae* AND PAPAIN AS
BIOPESTICIDES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 17 de julho de 2024.

Prof^a. Dr^a. Joziana Muniz de Paiva Barçante. UFLA

Prof. Dr. Rafael Neodini Remédio. UFLA

Prof. Dr. André Luís Elias Moreira. IFG

Prof. Dr. Filippe Elias de Freitas Soares
Orientador

Prof. Dr. Willian Cesar Terra
Coorientador

**LAVRAS -MG
2024**

À minha mãe e meu pai, que todos os dias lutam para me dar o melhor e me motivam a alcançar meus objetivos. O amor infinito que eles me mostram todos os dias é um impulso para melhorar como pessoa.

Anastacia Mamani Chani, Manuel Natividad Condori Huarsa

Ao meu tio, que me apoia todos os dias e está ao meu lado.

Jose Usca Huarsa

Aos meus irmãos, que são meus pilares de apoio.

Daniel, Miquias, Merica, Delia e Edgar

Aos meus sobrinhos, que são a minha força e motivação.

Gaia, Tiago, Josue, Isaías

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por cuidar de mim e guiar meu caminho. Aos meus pais, meu tio e irmãos, pelo apoio e amor incondicional, sendo o meu melhor exemplo a seguir.

À Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras. Pôr a oportunidade de poder estudar meu mestrado, estou eternamente agradecida. Y a Dr^a. Kalyinka Gabriella do Livramento, coordenadora da sua disposição e paciência ao longo de todo este período.

Ao meu orientador, Dr. Filippe Elias de Freitas Soares, expresso minha mais profunda gratidão pelo apoio, confiança e conhecimentos compartilhados. Sua orientação constante, dedicação e sábios conselhos foram fundamentais para a realização bem-sucedida deste projeto e para o meu desenvolvimento acadêmico.

Ao meu coorientador, Dr. Willian Cesar Terra, pelo apoio durante a realização do projeto.

Aos membros da banca, Joziana Muniz de Paiva Barçante, Rafael Neodini Remédio e André Luís Elias Moreira, expresso minha mais profunda gratidão pelo tempo dedicado e pelas valiosas observações que contribuíram para o aprimoramento deste projeto. Seu conhecimento foram fundamentais para meu crescimento acadêmico e pessoal.

Expresso minha gratidão à professora Joziana, bem como a Ingri e Pedro do Departamento de Medicina, Laboratório de Biologia Parasitária, por me proporcionarem seu valioso conhecimento e confiança, permitindo-me trabalhar em seu laboratório e contribuindo significativamente para o meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

A Cecilia e Aline, agradeço de todo o coração, pelos conselhos e por estarem sempre ao meu lado. Os momentos únicos que compartilhamos tornaram meus dias em Lavras muito mais felizes.

À Bióloga Carmen Teresa Reátegui Bardales, minha sincera gratidão por me acompanhar com seus sábios conselhos ao longo de todo o período deste mestrado no Brasil.

Aos meus amigos Amanda, Hugo, Ana, Jhennifer, Sthefania, Micaela, Marcus, Dolores, Francis, Keyla, Javir, Sara, Ivon, Estefani, Xiome, Hector, Tatiana, Gabriela, Lucero, Miguel e Carlos: obrigada por estarem presentes e me apoiarem incondicionalmente.

Aos meus colegas Debora, Lisseth, Adriane e Elias, do Laboratório de Bioquímica e Biotecnologia Aplicada, com quem compartilhei momentos de aprendizagem.

Ao Programa de Bolsas Brasil, ao Grupo de Cooperação Internacional de Universidades Brasileiras (GCUB), pela oportunidade concedida para realizar o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro imprescindível.

RESUMO GERAL

O controle de insetos-vetores, nematoides, parasitas de plantas e animais, frequentemente depende do uso massivo de pesticidas químicos. Diante desses problemas, surge uma alternativa sustentável, o controle biológico e bioquímico, que utiliza organismos vivos e os produtos químicos naturais para suprimir a densidade populacional ou o impacto de uma determinada praga ou parasito. Dentre os fungos entomopatogênicos, podemos citar o *Metarhizium anisopliae*. Este fungo produz enzimas hidrolíticas, como proteases e quitinases, que são fundamentais no processo de infecção do hospedeiro. Além disso, o látex de mamão (*Carica papaya*), é conhecido como uma rica fonte de papaína. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo o estudo das enzimas de *M. anisopliae* e da papaína como biopesticidas. O trabalho foi estruturado em um capítulo de livro sobre a bioquímica de entomopatógenos e micoparasitas, com foco em *Metarhizium*, e dois artigos. O primeiro artigo descreveu a produção de enzimas por *M. anisopliae* em diferentes meios de cultura e sua eficácia no controle *in vitro* de nematoides parasitas de animais e planta (*Haemonchus* spp. e *Meloidogyne incognita*). O segundo artigo investigou a compatibilidade entre o uso da papaína e de conídios de *M. anisopliae* IP119 para o controle de larvas (L₃) de *Aedes aegypti*. Os resultados demonstraram que o meio de arroz com soro de leite foi mais eficaz para a produção de protease e quitinase em *M. anisopliae* IBCB 424, apresentando uma atividade de 52 U/mg e 0,60 U/mg, respectivamente. O extrato bruto testado mostrou uma redução de 100% em parasitas animais e 71% em parasita de planta. Em relação a *Aedes. aegypti* (L₃), foi observada uma mortalidade de 100% com 10% (p/v) de papaína e uma mortalidade de 97% com 4% (p/v) de papaína suplementada com *M. anisopliae* IP119 (10⁷ conídios/mL). Os resultados são promissores, indicando a eficácia da enzima produzida por *M. anisopliae* contra os nematoides testados e demonstrando o potencial da combinação de papaína e conídios para o controle de *A. aegypti*. Este estudo pioneiro abre novas perspectivas de pesquisa no campo das enzimas, com potenciais aplicações futuras.

Palavras-chave: Controle biológico; controle bioquímico, papaína; protease.

ABSTRACT

The control of insect vectors, nematodes, and plant and animal parasites often relies on the massive use of chemical pesticides. In light of these issues, a sustainable alternative emerges: biological and biochemical control, which uses living organisms and natural chemical products to suppress the population density or impact of a particular pest or parasite. Among entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* stands out. This fungus produces hydrolytic enzymes, such as proteases and chitinases, which are essential in the host infection process. Additionally, papaya latex (*Carica papaya*) is known as a rich source of papain. Therefore, the present study aimed to investigate the enzymes of *M. anisopliae* and papain as biopesticides. The work was structured into a book chapter on the biochemistry of entomopathogens and mycoparasites, focusing on *Metarhizium*, and two research articles. The first article described the production of enzymes by *M. anisopliae* in different culture media and their efficacy in the *in vitro* control of parasitic nematodes of animals and plants (*Haemonchus* spp. and *Meloidogyne incognita*). The second article investigated the compatibility between the use of papain and conidia of *M. anisopliae* IP119 for the control of third-instar larvae (L₃) of *Aedes aegypti*. The results showed that the rice medium with whey was the most effective for the production of protease and chitinase by *M. anisopliae* IBCB 424, with activities of 52 U/mg and 0.60 U/mg, respectively. The crude extract tested showed a 100% reduction in animal parasites and a 71% reduction in plant parasites. Regarding *Aedes aegypti* (L₃), 100% mortality was observed with 10% (w/v) papain, and 97% mortality was observed with 4% (w/v) papain supplemented with *M. anisopliae* IP119 (10⁷ conidia/mL). The results are promising, indicating the efficacy of the enzyme produced by *M. anisopliae* against the tested nematodes and demonstrating the potential of the papain and conidia combination for the control of *A. aegypti*. This pioneering study opens new research perspectives in the field of enzymes, with potential future applications.

Keywords: Biological control; biochemical control; papain; protease.

INDICADORES DE IMPACTO

Foram utilizadas enzimas que demonstraram grande atividade antiparasitária tanto em plantas quanto em animais. Além disso, evidenciou-se o poder da enzima papaína no controle do mosquito *Aedes aegypti*. Por meio dos bioensaios realizados *in vitro*, espera-se contribuir para futuras pesquisas e oferecer soluções tanto para o setor agrônomo quanto para o setor da saúde. O projeto contou com o apoio de diversas pessoas que contribuíram significativamente para a sua conclusão e a Universidade Federal de Minas Gerais. De acordo com a Política Nacional de Extensão, este projeto está alinhado com vários princípios, como os Direitos Humanos, que incluem o direito a uma alimentação saudável e livre de compostos químicos. No âmbito da Educação, fomenta o aprendizado contínuo e a busca por alternativas que melhorem o entorno. Quanto ao Meio Ambiente, promoveu-se o uso de produtos não tóxicos. Na área de Saúde, o trabalho busca novas alternativas para o controle de insetos vetores de doenças, visando à redução de casos e mortes associadas. Em relação à Tecnologia e Produção, o projeto promove o uso de tecnologias ambientalmente sustentáveis, com potencial para implementação em larga escala. Por fim, no âmbito do Trabalho, futuras pesquisas e produções podem gerar novos empregos na área da biotecnologia. O presente trabalho está alinhado com vários dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU. Em particular, contribui para o ODS 3: Saúde e Bem-Estar, ao buscar alternativas para o controle de insetos vetores de doenças como o *Aedes aegypti*, reduzindo assim o risco de propagação de enfermidades. Também impacta o ODS 12: Produção e Consumo Sustentáveis, ao propor o uso de biopesticidas naturais, como as enzimas de *Metarhizium anisopliae* e a papaína, para mitigar o uso indiscriminado de aos pesticidas químicos, promovendo práticas agrícolas mais sustentáveis. Finalmente, está alinhado com o ODS 15: Vida Terrestre, ao incentivar métodos de controle biológico que reduzem o uso de substâncias nocivas ao meio ambiente.

IMPACT INDICATORS

Enzymes have been used that have shown great anti-parasitic activity in both plants and animals. In addition, the power of the papain enzyme in controlling the *Aedes aegypti* mosquito was demonstrated. The bioassays carried out *in vitro* are expected to contribute to future research and offer solutions for both the agronomic and health sectors. The project had the support of several people who contributed significantly to its completion and the Federal University of Minas Gerais. In accordance with the National Extension Policy, this project is aligned with various principles, such as Human Rights, which include the right to healthy food free from chemical compounds. In terms of Education, it encourages continuous learning and the search for alternatives to improve the environment. As for the Environment, the use of non-toxic products has been promoted. In the area of Health, the work seeks new alternatives for controlling insect vectors of disease, with a view to reducing cases and associated deaths. With regard to Technology and Production, the project promotes the use of environmentally sustainable technologies with the potential for large-scale implementation. Finally, with regard to Labor, future research and production could generate new jobs in the biotechnology field. This work is aligned with several of the UN's Sustainable Development Goals (SDGs). In particular, it contributes to SDG 3: Health and Well-being, by seeking alternatives for controlling insect disease vectors such as *Aedes aegypti*, thus reducing the risk of spreading diseases. It also impacts SDG 12: Sustainable Production and Consumption, by proposing the use of natural biopesticides, such as *Metarhizium anisopliae* enzymes and papain, to mitigate the indiscriminate use of chemical pesticides, promoting more sustainable agricultural practices. Finally, it is aligned with SDG 15: Life on Land, by encouraging biological control methods that reduce the use of substances harmful to the environment.

LISTA DA FIGURAS

Figura 1:	Detalhes morfológicos de <i>Metarhizium anisopliae</i> . A) Aspecto da colônia do isolado com conídio de coloração verde. B) Conidióforo. C) Morfologia do conídio.....	20
Figura 2:	Mecanismo de infecção de <i>Metarhizium</i> spp. em insetos terrestres.....	21
Figura 3:	Quitinase, estrutura do modelo de fita; B:Protease estrutura do modelo de fita.	23
Figura 4:	<i>Meloidogyne incógnita</i> , estrutura morfológica.....	25
Figura 5:	<i>Meloidogyne incognita</i> durante o processo de infecção da raiz da planta.	26
Figura 6:	<i>Haemonchus contortus</i> . A: Larva (L ₂) e B: Larva (L ₃).....	27
Figura 7:	Processo de infecção de <i>Haemonchus</i> spp.....	28
Figura 8:	Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	30

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Notificações, hospitalizações e mortes por dengue no período de 2014 a 2024. 29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1	Uso de produtos químicos.....	16
2.2	Controle biológico e bioquímico.....	16
2.2.1	Bioinseticida.....	17
2.2.1.1.	Fungos entomopatogênico.....	18
2.2.1.1.1	<i>Metarhizium anisopliae</i>	19
2.2.2	Compatibilidade de compostos naturais com o controle biológico	21
2.2.3	Enzimas.....	22
2.2.4	Papaína.....	23
2.3	Nematoides parasitas.....	24
2.3.1	<i>Meloidogyne incognita</i>	24
2.3.2	<i>Haemonchus</i> spp.....	26
2.4	Inseto vetor.....	28
2.4.1	<i>Aedes aegypti</i>	28
2.5	Justificativa.....	30
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	Objetivo geral.....	31
3.2	Objetivos específicos.....	31
	REFERÊNCIAS.....	32
	Capítulo 1- Bioquímica de entomopatógenos e micoparasitas: <i>Metarhizium</i>	42
	Artigo 1- Produção de enzimas por <i>Metarhizium anisopliae</i> e sua aplicação no controle de nematoides (<i>Haemonchus</i> spp. e <i>Meloidogyne incognita</i>) <i>in vitro</i>	67
	Artigo 2 - Compatibilidade do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> s.s. e papaína no controle de <i>Aedes aegypti</i>	86
	Anexo 1- Artigo Publicado.....	104

INTRODUÇÃO

A saúde humana e animal depende diretamente do equilíbrio do ecossistema, um princípio fundamental da abordagem de "Saúde Única". Na sociedade atual, é essencial adotar práticas mais sustentáveis no uso de pesticidas para preservar os solos e a água, o que beneficia tanto os ecossistemas quanto a saúde pública. Infelizmente, a necessidade de controlar certas "pragas" frequentemente resulta no uso indiscriminado ou abusivo de compostos químicos, como anti-helmínticos e inseticidas, comprometendo a integridade ambiental e a saúde humana e animal.

A produção de pequenos ruminantes, como ovelhas e cabras, desempenha um papel crucial na economia global ao fornecer carne, leite e diversos subprodutos (Sargison, 2012). No entanto, essas espécies são vulneráveis a endoparasitoses, sendo os nematoides gastrointestinais uma das principais causas de perdas econômicas significativas devido ao retardo no crescimento e desnutrição (Busin e Sargison, 2014; Chagas et al., 2022). Entre eles, *Haemonchus contortus* se destaca pela resistência aos anti-helmínticos comerciais (Rudolphi, 1803; Kuiseu et al., 2021). Representam um desafio econômico considerável para a indústria pecuária, com perdas anuais estimadas em 107,52 milhões de dólares no Brasil (Chagas et al., 2022). Em particular, na região sul do Brasil, as perdas devido a *H. contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* chegam até 500.000 dólares anuais (Oliveira et al., 2017).

No âmbito agrícola, o controle sustentável de nematoides fitoparasitas é crucial para enfrentar a crescente demanda global por alimentos, esses organismos são responsáveis por mais de 30% das perdas mundiais de rendimento em culturas (Sikora et al., 2023). Entre eles, o nematoide-das-galhas (*Meloidogyne incognita*) é especialmente devastador, causando perdas significativas na produção de tomate, onde os tratamentos atuais dependem em grande parte de nematicidas químicos (Shilpa et al., 2022). Atualmente, o controle desses fitopatógenos é difícil e pode se apoiar no uso extensivo de nematicidas químicos, o que pode levar a resistência (Stucky et al., 2024).

Além disso, a propagação de arboviroses como dengue (DENV), zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV), transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti*, aumentou consideravelmente nas últimas décadas. Em 2010, o número de casos notificados superou pela primeira vez um milhão, uma marca que voltou a ser ultrapassada em 2013, 2015, 2016, 2019, 2022, 2023 e 2024. Apesar das medidas de controle, desde o início de 2024 até 19 de março de 2024, foram notificados quase 2 milhões de casos suspeitos de dengue no Brasil, sendo as maiores taxas de incidência registradas nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (Brasil, 2024). Durante esse período, foram confirmadas 630 mortes por dengue, enquanto 1.009 mortes

permanecem sob investigação. Mais de 80% dessas mortes confirmadas ou em investigação estão concentradas em cinco estados: Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Goiás e o Distrito Federal. Além das ações emergenciais, o Ministério da Saúde trabalhou ao longo de 2023 para normalizar o estoque de inseticidas destinados aos estados e municípios, adquirindo 400.000 quilos de larvicida e 12.600 quilos de adulticida (inseticidas para mosquitos adultos) para uso em 2024 (Who, 2023; Maciel et al., 2024).

O uso intensivo de inseticidas e anti-helmínticos levou ao desenvolvimento de resistência nos organismos-alvo, reduzindo a eficácia dos métodos de controle convencionais (Gubler e Clark, 1995; Szewc, De Waal e Zintl, 2021). Portanto, há um crescente interesse em alternativas menos prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana. Em resposta a esses desafios, o controle biológico emergiu como uma estratégia promissora que utiliza organismos vivos para reduzir as populações de artrópodes e pragas, minimizando assim os efeitos adversos ao meio ambiente e à saúde humana (Eilenberg, Hajek, Lomer., 2001; Sentis et al., 2022). Ainda, compostos derivados de plantas e microorganismos têm mostrado ser alternativas viáveis e ambientalmente sustentáveis para o manejo integrado de pragas (Garcez et al., 2009). Nas plantas, as cisteíno proteases estão amplamente distribuídas em vários tecidos responsáveis pelo metabolismo das proteínas (Liggieri et al., 2009). Por exemplo, o látex obtido do mamão (*Carica papaya*) é rico em enzimas como papaína e quimopapaína, e tem sido tradicionalmente utilizado devido às suas propriedades inseticidas e antimicrobianas (Satrija et al., 1995; Sapaat et al., 2012). Por outro lado, os fungos entomopatogênicos, como *Metarhizium anisopliae*, destacam-se pela capacidade de infectar e controlar uma ampla gama de insetos, além de contribuir para o crescimento das plantas (Santi et al., 2011; Hussain et al., 2016). O mecanismo de ação de *M. anisopliae* envolve a produção de enzimas hidrolíticas como proteases e quitinases, que desempenham papel crucial na decomposição das estruturas celulares do hospedeiro (Alkhaibari et al., 2016).

Diante desse contexto, o presente estudo proposto investigar diferentes meios de cultura para *M. anisopliae*, a fim de avaliar o mais promissor para a produção de enzimas quitinase e protease. Além disso, foi analisado o efeito desses extratos enzimáticos no controle de nematoides parasitas, bem como a avaliação da papaína pura e combinado com os conídios de *M. anisopliae* como agente de controle de insetos vetores. Este estudo aborda a necessidade de desenvolver métodos de controle alternativos e sustentáveis para nematoides parasitas e vetores de doenças, destacando a importância de investigar e aplicar soluções que minimizem o impacto ambiental e promovam a segurança alimentar e a saúde pública global.

2.REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Uso de produtos químicos

Os pesticidas são substâncias ou misturas de substâncias amplamente utilizadas para controlar pragas agrícolas e artrópodes vetores de doenças humanas e animais, além de serem empregados no controle de insetos e ácaros que afetam a produção (FAO, 2022). No entanto, o controle de pragas e vetores ainda depende significativamente do uso desses produtos químicos, cuja utilização deve ser racional devido aos riscos que representam para a saúde humana e o meio ambiente. Além disso, as pragas e vetores estão rapidamente desenvolvendo linhagens resistentes a inseticidas químicos, bem como aos bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* que é utilizado para o controle de *Aedes aegypti* (Hemingway e Ranson, 2000; Tilquin., 2008; Alkhaibari et al., 2016).

A utilização de produtos químicos para o controle de parasitas gastrointestinais em bovinos, como benzimidazóis e imidazotiazóis/tetrahidropirimidinas, e uso de os piretróides para controle de ectoparasitos é outra prática comum (Cáceres, Ayarza, Bernal., 2023; Costa, Simões, Riet-Correa., 2011). No entanto, é importante observar que esses tratamentos frequentemente perdem eficácia devido à exposição excessiva ao longo do tempo, resultando na seleção de linhagens resistentes por parte desses parasitas, um problema sanitário significativo em rebanhos ovinos em todo o mundo (Mederos e Banchemo, 2013).

Diante dessa situação, há uma busca crescente por métodos alternativos de controle de doenças e pragas (Ortiz-Ocampo et al., 2016). Nesse contexto, uma alternativa tem sido o uso de fungos entomopatogênicos (Mendoza De Gives et al., 2018). Esses microrganismos produzem enzimas como proteases (EC 3.4), quitinases (EC 3.2.11.14) e lipases (EC 3.1.1.3), que catalisam a quebra de componentes estruturais essenciais como proteínas, quitina e lipídios nos alvos que se deseja controlar (Lacey et al., 2001; Schrank e Vainstein., 2010). Assim também a utilização de plantas como *Carica papaya* que produz proteases, como a papaína, tem potencial para ser utilizada no controle de insetos vetores (Nunes et al., 2013).

2.2. Controle biológico e bioquímico

O controle biológico é reconhecido pelo uso de organismos vivos com o objetivo de reduzir a incidência de uma determinada praga (Eilenberg, Hajek, Lomer., 2001; Poveda, abril-Urias, Escobar., 2020). Historicamente, tem-se buscado aprimorar o controle biológico para compreender melhor as interações entre inimigos naturais e seus alvos específicos (Heimpel e Mills, 2017). Vale destacar que o mercado de produtos relacionados ao controle biológico tem

crescido significativamente nos últimos anos, e espera-se que seu valor triplique até 2029 em relação ao valor atual de aproximadamente 5 bilhões de dólares (Liu, Smagghe, Liu., 2023). Diversos microrganismos são utilizados para o controle biológico, sendo as bactérias e os fungos os mais proeminentes. No caso dos fungos, o mecanismo bioquímico envolve principalmente a ação de enzimas hidrolíticas, como proteases (que catalisam a hidrólise das ligações peptídicas entre resíduos de aminoácidos em peptídeos e proteínas) e quitinases (que catalisam a quebra das ligações glicosídicas entre resíduos de N-acetil-glucosamina) (Schark e Vanstein, 2010; Ferreira e Soares, 2023). Esse processo facilita a penetração do fungo ao degradar tecidos na zona de infecção, tornando-os uma opção viável para o desenvolvimento de biopesticidas que permitam controle eficaz sem contaminação e degradação ambiental (Motta-Delgado e Ordoñez, 2011; Faíscas et al., 2021; Oliveira, Oliveira, Mani., 2022).

Por muitos séculos, *Carica papaya*, tem sido estudado no tratamento de doenças transmitidas por vetores, como malária, dengue, infecção pelo vírus Zika, chikungunya, entre outras (Malviya et al., 2023). Pesquisas farmacológicas e clínicas extensivas têm sido conduzidas para investigar os fitoquímicos responsáveis por essas atividades, além do desenvolvimento de formulações inovadoras para melhorar a eficácia dos fitofármacos ativos de *C. papaya*, promovendo assim um melhor enfoque no tratamento de doenças transmitidas por vetores (Tyas, Wahyuni, Hariyadi, 2014; Sari e Khaira, 2020; Malviya et al., 2023).

2.2.1. Bioinseticida

Os bioinseticidas são substâncias naturais de diversas fontes que controlam pragas-insetos. Considerados uma opção promissora devido ao seu baixo risco ambiental, alta seletividade de espécies e baixa toxicidade para mamíferos, além disso, são mais seguros que seus equivalentes sintéticos, que são tóxicos para organismos alvo, incluindo humanos (Qu et al., 2022). São utilizados para designar uma variedade de agentes de controle de pragas como microorganismos (vírus, bactérias, fungos), nematoides entomopatogênicos, pesticidas de origem vegetal, feromônios e genes (Tamez., 2001; Ferreira e Soares, 2023). Alguns de estes produtos têm a vantagem de exigir baixo investimento para produção e podem ser obtidos por processos simples que não requerem grande infraestrutura (Blanco, Sirio, Roldán., 2022). Nesse contexto, o mamão (*C. papaya*) é uma espécie de amplo uso no campo da medicina tradicional. Suas sementes têm sido usadas no tratamento de helmintos e protozoários. Outros exemplos som a pimenta, alho, crisântemo, amplamente utilizados em cultivos de hortaliças, frutas e tubérculos para o controle de pragas como mosca branca, pulgões, ácaros, etc. Outros

extratos vegetais que também se mostraram eficazes contra mosca branca incluem mamona, anonáceas e eucalipto. A mamona (*Ricinus communis* L.) produz metabólitos secundários como albuminas (ricina) e alcalóides (ricinina), utilizados como nematocidas e inseticidas para o controle de pragas em diversas culturas. A anonácea (*Annona squamosa* L.) é composta principalmente por acetogeninas como anonacina, anonastatina, anonina, asimicina e bullatanonina, também utilizadas como inseticidas, antimicrobianos e antihelmínticos. O eucalipto (*Eucalyptus globulus*) apresenta compostos como 1,8-cineol ou eucaliptol, α -pineno, bourboneno, limoneno e nerol, hidrocarbonetos e álcoois monoterpênicos e sesquiterpênicos, aldeídos alifáticos, citronelal, carvona, acetato de citronelilo, geranilo e α -terpinilo, todos com efeito anti-alimentar, repelente e inseticida que inibem o desenvolvimento e crescimento de muitos insetos (Choi et al.,2003; Bailey et al.,2010).

Os fungos entomopatogênicos também são usados como bioinseticidas. No passado, foram combinados com outros inseticidas para reduzir a resistência desenvolvida pelos insetos aos inseticidas sintéticos. Os fungos entomopatogênicos têm a capacidade de induzir alta susceptibilidade aos inseticidas nas pragas-alvo, suprimindo atividades enzimáticas e predispondo à infecção fúngica (Ambethgar, 2009). Alguns entomopatógenos importantes pertencem aos gêneros *Verticillium*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces*, *Hirsutella* (Sinha, Choudhary, Kumari.,2016). Projeta-se que o mercado mundial de bioinseticidas cresça de um valor estimado de 2,2 bilhões de dólares em 2020 para 4,6 bilhões de dólares em 2025, tornando o desenvolvimento e a produção de bioinseticidas um campo muito gratificante (Qu et al., 2022).

2.2.1.1. Fungos entomopatogênicos

Os agentes de controle biológico, em particular os patógenos, são um dos pilares do manejo integrado de pragas (MIP), uma ferramenta promissora para reduzir os impactos gerados pelas pragas (Lacey et al.,2001). O uso de fungos como controle biológico remonta a 1835, quando Agostino Bassi observou que um fungo poderia causar uma doença nos bichos-da-seda (Steinhaus, 1956; Lord, 2007). No final da década de 1870, Metschnikoff observou uma alta proporção de curculio (*Cleonus punctiventris*) da beterraba sacarina, mortos por *Metarhizium* e propôs o conceito de controlar este inseto com conídios desse fungo. Posteriormente, nos Estados Unidos, Luggar (1888) sugeriu o uso de outro fungo, agora conhecido como *Beauveria bassiana*, para controlar o percevejo do trigo (*Blissus leucopterus*); no Kansas, Nebraska e estados vizinhos, o fungo foi produzido *in vivo* (Billing e Glenn, 1911).

A comercialização de fungos nos Estados Unidos foi limitada, mas os esforços aumentaram em vários países, principalmente Brasil, Cuba, a antiga Checoslováquia, a antiga URSS e China, por razões econômicas e ambientais (Bartlett e Jaronski, 1988). Atualmente, existem mais de 100 produtos comerciais baseados em fungos entomopatogênicos (De Faria e Wraight, 2007; Jaronski, S. T, 2023).

O ciclo de vida dos fungos Ascomycetes começa quando o conídio entra em contato com a cutícula do artrópode, aderindo-se inicialmente por forças de van der Waals, para depois aderir-se mais firmemente e germinar em poucas horas. Produz-se uma hifa de penetração, assim como um apressório ou estrutura de ancoragem em algumas espécies. A hifa penetra a cutícula do artrópode por meio de várias enzimas e pressão mecânica. Uma vez no hemocèle, o fungo prolifera por meio de corpos semelhantes a leveduras. À medida que o hospedeiro morre, o fungo se transforma rapidamente em micélio e, sob condições ideais (particularmente um período prolongado de alta umidade), emerge para esporular no exterior do inseto (Clarkson e Charnley, 1996; Pedrini, Crespo, Juárez., 2007; Howard et al., 2010; Mnyone et al., 2010; Okumu et al., 2010).

Mais de 750 espécies de fungos em mais de 100 gêneros foram relatadas como patógenos de insetos (St Leger e Wang, 2010). Entre os fungos entomopatogênicos os gêneros que se destacam pela sua importância agrônômica são: *Beauveria*, *Metarhizium*, *Tolypocladium*, *Paecilomyces*, *Nomuraea*, *Lecanicillium* e *Hirsutella*, os quais foram identificados isolados a partir de artrópodes que vivem em plantas, no solo e na água (Maldonado e Reyna., 2022; Zimmermann, 2007; Zhang et al. 2018).

Esses fungos agem por meio da infecção de seus hospedeiros diretamente através da cutícula, de modo que não precisam ser ingeridos por seus hospedeiros. Essa característica torna os fungos entomopatogênicos os principais candidatos para o controle de insetos, especialmente aqueles que se alimentam da seiva das plantas (St Leger e Wang 2020). Atualmente, há muitas preparações comerciais compostas por estes fungos em todo o mundo e elas são usadas para controlar várias pragas agrícolas e florestais (Goettel, Eilenberg, Glare., 2005)

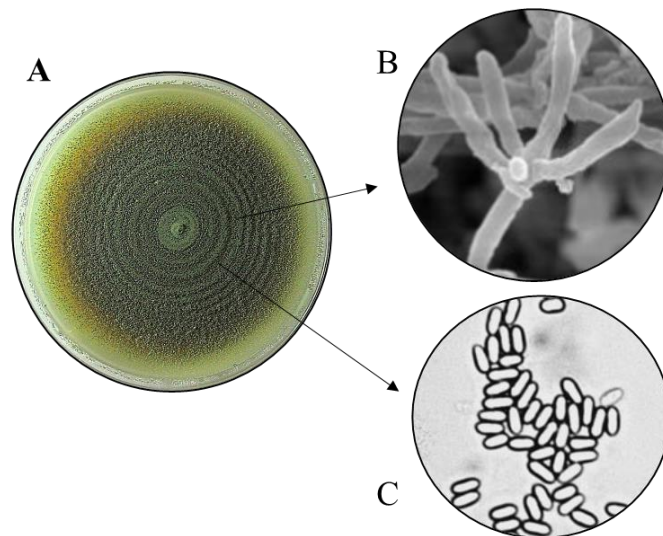
2.2.1.1.1. *Metarhizium anisopliae*

Os fungos *Metarhizium* spp. são fungos filamentosos, entomopatogênicos, cujo estudo data de 1879, quando o patologista russo Metschnikoff o isolou de larvas do besouro *Anisopliae* austríaca Hbst, classificando-o como *Entomophthora anisopliae* (Arruda, 2005). Pertencentes a classe Sordariomycetes e filo Ascomycota. Apresentam micélio hialino e septado, com

conidióforos característicos, sobre os quais surgem conídios que são normalmente uninucleados, cilíndricos e de dimensões variáveis em colunas compactas (Lima,1989).

As colônias de *Metarhizium anisopliae* têm um desenvolvimento efetivo nos meios de cultura de BDA (Batata-dextrose-ágar). A colônia em forma circular apresenta inicialmente um crescimento micelar branco, exibindo variações de cor quando o fungo esporula; no início do processo de multiplicação de conídios, uma coloração verde-oliva é percebida na superfície micelar. Os conidióforos crescem irregularmente do micélio com dois a três ramos em cada septo. Estes conidióforos têm um comprimento de 4 a 14 microns e um diâmetro de 1,5 a 2,5 microns. Os fiálides são estruturas geradas no micélio, sendo o local onde os conídios são liberados. Quanto aos conídios, são estruturas unicelulares, cilíndricas e truncadas, com longas cadeias, hialinas a esverdeadas. Os conídios têm um comprimento de 4 a 10 microns e um diâmetro que varia de 2 a 4 microns ver Figura 1 (Padilla et al.,2000; Altamirano.,2021).

Figura 1: Detalhes morfológicos de *Metarhizium anisopliae*. A) Aspecto da colônia do isolado com conídio de coloração verde. B) Conidióforo. C) Morfologia do conídio.



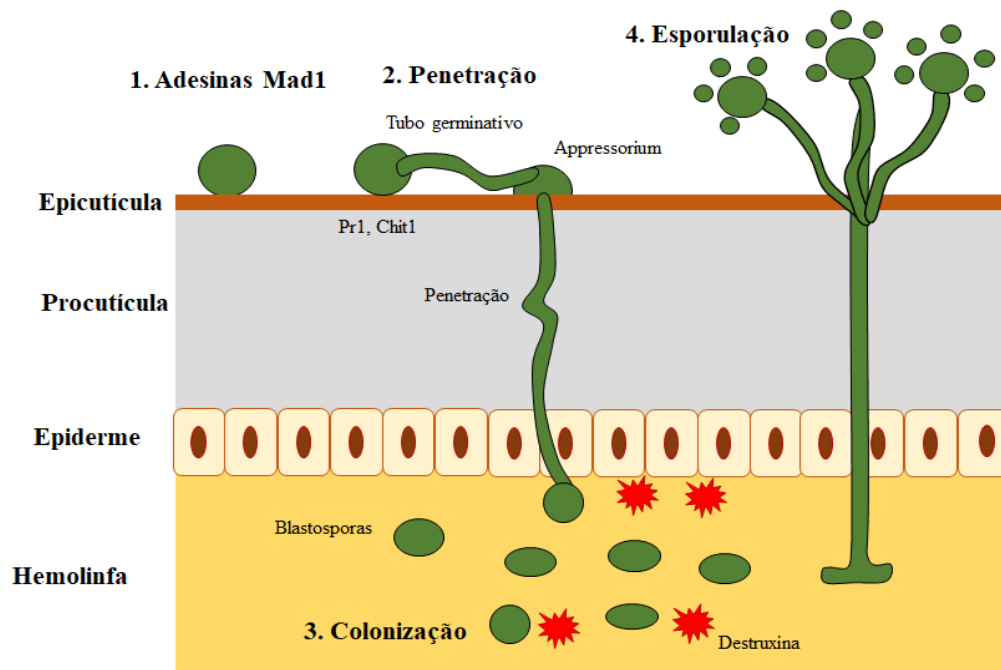
Fonte: Modificado de Arruda (2005).

O processo de infecção varia de acordo com o hospedeiro, pois no caso de insetos que têm parte de seu ciclo de vida na água, como por exemplo larvas de *Culex quinquefasciatus*, os conídios flutuantes de *M. anisopliae* aderem à superfície interna das válvulas, germinaram e invadiram o tecido da ponta do sifão, espalhando-se e bloqueando a traqueia, resultando em asfixia e morte (Lacey et al., 1988). Toxinas, particularmente, destruxinas, têm sido apontadas

como a causa da morte de larvas de mosquitos, produzidas por conídios não germinados na cutícula, dentro do intestino, ou liberadas após a digestão de conídios de *M. anisopliae* (Crisan.,1971; Al-Aidroos, Roberts,1978)

Metarhizium anisopliae infecta hospedeiros suscetíveis por meio da penetração direta na cutícula. Para fins de descrição, o processo de infecção pode ser dividido em: (1) adesão de conídios à cutícula do hospedeiro por meio de interações hidrofóbicas e material mucilaginoso fino; (2) germinação e desenvolvimento de conídios; (3) diferenciação do tubo germinativo em apressórios; (4) penetração na cutícula; (5) diferenciação das hifas em blastosporos/anticorpos de hifas na hemolinfa; (6) colonização do hospedeiro; (7) extrusão para a superfície do corpo do hospedeiro e (8) formação de conidióforos e produção de conídios ver Figura 2 (Schrack e Verinsein,2010). Neste processo estão presentes diferentes enzimas hidrolíticas, principalmente proteases e quitinases, que contribuem para o processo de infecção e colonização do hospedeiro (Ferreira e Soares, 2023).

Figura 2: Mecanismo de infecção de *Metarhizium* spp. em insetos terrestres.



Fonte: Modificado de Schrank e Verinsein (2010).

2.2.2 Compatibilidade de compostos naturais com o controle biológico

O interesse pelo uso de microorganismos entomopatogênicos no controle biológico tem crescido nos últimos anos, especialmente fungos e produtos vegetais. Poucos estudos têm explorado a compatibilidade de compostos naturais como agentes de controle biológico, mas

nos últimos anos tem havido experimentos avaliando o efeito da combinação de dois ou mais desses compostos no controle de pragas (Ansari, Shah, Butt.,2010; Bueno-Pallero et al.,2018; Jaffuel et al.,2019; Paula et al.,2019). Por exemplo, a combinação de dois produtos naturais pode aumentar significativamente a eficácia, como demonstrado pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* em combinação com óleos essenciais extraídos de *Azadirachta*, *Artemisa haussknechtii* e *Citrus vulgaris*. A junção deste fungo com cada um desses óleos essenciais resultou em alta compatibilidade, com uma elevada taxa de mortalidade observada nos insetos estudados, principalmente com *A. haussknechtii* (Shakarami et al.,2015).

Outro exemplo de compatibilidade ocorre entre extratos da planta *Eucalyptus camaldulensis* e o fungo entomopatogênico *B. bassiana* contra pulgão. A combinação desses dois compostos resultou em uma mortalidade de 87%, afetando negativamente também a fecundidade dos insetos tratados. Esses resultados demonstram que a associação desses agentes tem um efeito sinérgico significativo e apresenta-se como uma alternativa promissora como bioinseticida (ALI et al., 2018). Outro exemplo de compatibilidade é a utilização do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* (AC001) e seu extrato bruto rico em protease no controle *in vitro* de *Panagrellus* sp., *Haemonchus* spp. e *Trichostrongylus* spp. (De Souza et al., 2023). Neste estudo, foi observada uma maior redução ($77 \pm 5 \%$) com o uso combinado dos dois compostos (AC001 e extrato rico em protease), indicando um efeito positivo e compatível.

2.2.3. Enzimas

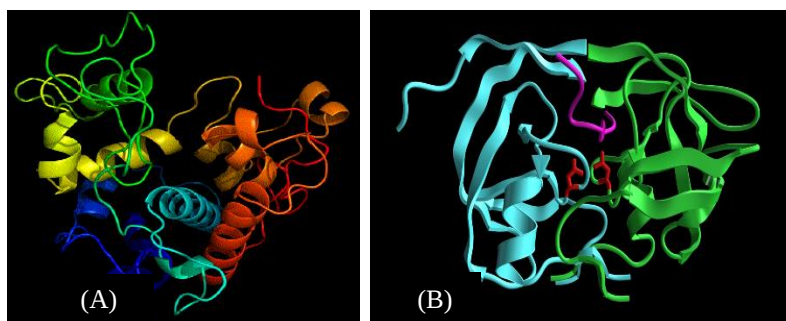
As proteases (EC 3.4) são enzimas hidrolíticas extracelulares que atuam catalisando a hidrólise da ligação peptídica entre resíduos de aminoácidos de peptídeos e proteínas. São classificadas em quatro classes diferentes: serina, cisteína, metalo e aspartil, das quais a mais comum nos fungos entomopatogênicos é a serina-protease do tipo subtilisina (St Leger, 1995). *Metarhizium anisopliae* produz diversas proteases, como subtilisina (Pr1), tripsina (Pr2), cisteíno proteases (Pr4) e metaloproteases, também foram relatado que pelo menos 14 isoformas de protease foram detectadas durante o crescimento em insetos (St Leger et al., 1987). Há 11 genes de subtilisina Pr1 no genoma do *M. anisopliae* (Bagga et al., 2004). Em particular, a protease Pr1A foi implicada na entomopatogenicidade. A superexpressão da Pr1A aumenta a patogenicidade contra insetos (St Leger et al., 1996).

As enzimas que catalisam a degradação da quitina em monômeros N-acetilglucosamina são divididas em N-acetilglucosaminidases [EC 3.2.1.52, família 20 glicosídeos hidrolases (GH)] e quitinases (CE3.2.1.14, família GH18 e 19). As quitinases podem ser classificadas em

duas classes principais: endoquitinases que catalisa a clivagem do polímero de quitina em qualquer ponto dentro da fibra e exoquitinases que atuam na clivagem da extremidade não redutora do polímero e liberam dímeros de N-acetilglucosamina (GlcNAc). Todas as quitinases fúngicas analisadas até o momento (incluindo todos os genomas fúngicos disponíveis) pertencem à família GH 18 (Santi et al., 2011; Hussain et al., 2016; Umaru e Simarari, 2022; Ferreira e Soares, 2023).

A classificação atual divide as 18 quitinases da família GH em três subgrupos. As quitinases do subgrupo A (antiga classe V) contêm domínio catalítico, mas não domínio de ligação a carboidratos (CBM), e têm massa molecular variando de 40 a 50 kDa. As quitinases do subgrupo B (antiga classe III) também possuem peptídeo sinal N-terminal e variam muito em tamanho, variando de 30 a 90 kDa. O subgrupo C é composto por grandes quitinases com massa molecular de 140–170 kDa. Possuem peptídeo sinal N-terminal e várias características que os distinguem de outros subgrupos, como as regiões de ligação aos peptidoglicanos (Schrack e Verinstein 2010; Mora, Castilho, Fraga, 2016). Um exemplo da estrutura tridimensional das enzimas proteases e quitinases se poder ver na figura 3.

Figura 3:Quitinase, estrutura do modelo de fita; B:Protease estrutura do modelo de fita.



Fonte: Hao et al. (2016).

2.2.4. Papaína

A papaína é uma enzima proteolítica vegetal muito versátil encontrada naturalmente no mamão e isolada do látex deste fruto, preferencialmente quando está verde e a enzima está mais ativa. Devido à sua versatilidade, esta enzima tem sido utilizada no campo médico para o tratamento de lesões esportivas e outros traumas, pois pode atuar em tecidos que carecem da enzima α -1-antitripsina, promovendo a cicatrização sem a necessidade de destruir tecidos saudáveis, o que acelera o processo de recuperação. Na indústria farmacêutica, é utilizada na forma de gel devido às suas propriedades antifúngicas, antibacterianas e anti-inflamatórias (Mamboya e Amri, 2012).

A papaína também apresenta vários usos em outros nichos industriais, como no amaciamento da carne, devido à sua capacidade de atuar na hidrólise de quase qualquer proteína presente nos tecidos musculares, tendões e ligamentos. Na indústria láctea, é empregada principalmente na produção de queijos semiduros e cremosos, melhorando sua capacidade de fusão e estiramento, ao hidrolisar os enlaces peptídicos específicos para formar caseína e macropeptídeos. As proteases têm sido usadas como catalisadoras na coagulação do leite (Feijoo-Siota e Villa, 2011; Fernández-Lucas, Castañeda, Hormigo, 2017).

Na indústria cervejeira, a papaína é utilizada há muito tempo para facilitar a degradação de vários agregados de proteínas insolúveis formados durante e após a fermentação da cerveja, que podem causar efeitos indesejáveis como turvação, viscosidade e excesso de espuma, sem comprometer as propriedades organolépticas (Polaina e Maccabe, 2007; Fernández-Lucas, Castañeda, Hormigo, 2017). Em outro contexto, Estudos demonstraram que o extrato de papaína é altamente eficaz contra *Spodoptera litura* em condições de umidade, desde que o tegumento do inseto esteja exposto ao bioinseticida. A papaína degrada o tegumento, deixando o inseto vulnerável a outros microrganismos, o que leva à sua morte (Wijanarko, 2017).

2.3. Nematoides parasitas

2.3.1. *Meloidogyne incognita*

As espécies endoparasitas sedentárias obrigatórias de *Meloidogyne* pertencem a um grupo devastador de nematoides que causam severo agalhamento nas raízes das plantas, daí o nome nematoides de galhas radiculares, que infectam a maioria das espécies de plantas superiores, principalmente hortaliças (Silva et al., 2019) *Meloidogyne incognita* é uma das principais espécies estudadas devido à sua patogenicidade, amplo espectro de hospedeiros e alta prevalência mundial (Sikora e Fernandez, 2005), produzindo alterações na absorção de água e nutrientes pelas raízes das plantas (Mhatre et al., 2015,2020), resultando em perdas anuais estimadas em US\$ 157 bilhões para os cultivos agrícolas (Coyne et al., 2018). Devido aos graves danos ocasionados por esta praga, é fundamental compreender seu ciclo de vida para desenvolver estratégias eficazes de controle.

O ciclo de vida desse nematoide é dividido em cinco estágios: ovo, três estágios juvenis que incluem o estágio infeccioso (J₂) e os estágios de desenvolvimento (J₃ e J₄), além do estágio adulto (Mani, Assefa, Hahn, 2021). O ciclo de vida fitoparasita obrigatório de *M. incognita* começa com os juvenis de segunda fase (J₂) infectando a raiz do hospedeiro ao penetrar as paredes celulares próximas à ponta da raiz com seu estilete. Em seguida, os (J₂) migram entre as células até o cilindro vascular da planta. Lá, estabelecem um local de alimentação

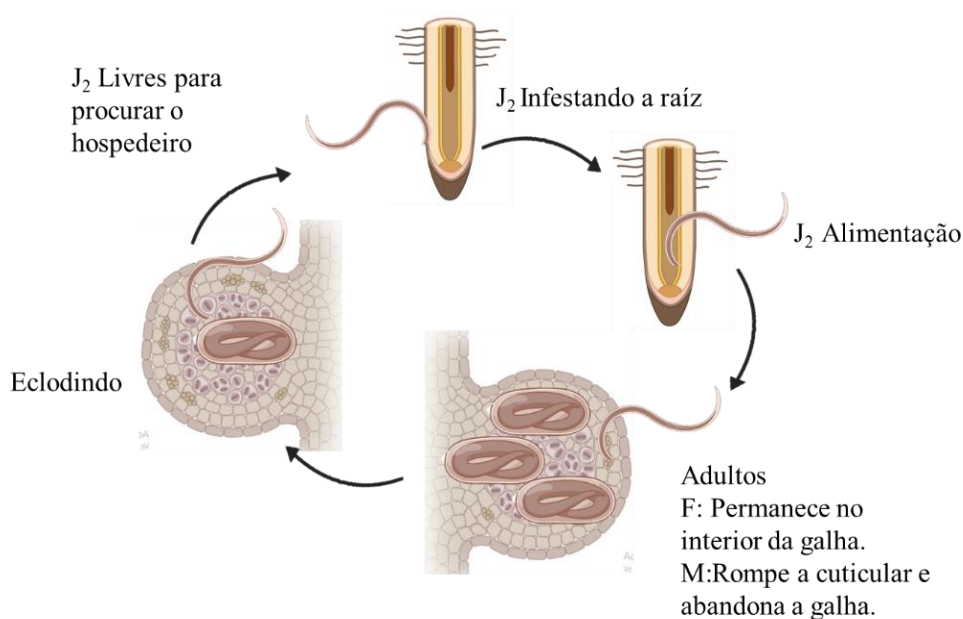
permanente pela secreção de enzimas que degradam a parede celular e induzem as células circundantes da raiz a se diferenciar em uma célula gigante multinucleada da qual os nematoides sedentários se alimentam (Tian, Cao, Zhang, 2015; Stucky et al., 2024). A infecção por nematoides e a irritação das raízes levam a um crescimento deficiente das plantas e a uma redução na resistência das plantas a outros estresses bióticos e abióticos (Jones et al., 2013; Siddique e Grundler, 2018). Após a terceira muda dos nematoides na planta, apenas os machos se tornam móveis e abandonam o hospedeiro. As fêmeas sedentárias produzem ovos, que são depositados principalmente fora da superfície da raiz em uma matriz gelatinosa (Figura 4 e 5) (Papadopolou e Triantaphyllou, 1982; Jones et al., 2013). Acredita-se que os machos desempenham um papel menor na reprodução, já que as fêmeas podem se reproduzir assexuadamente (Ahmad et al., 2021).

Figura 4: *Meloidogyne incognita*.



Fonte: Rui map Zheng, Bugwood.org

Figura 5: *Meloidogyne incognita* durante o processo de infecção da raiz da planta.



Fonte: Modificado de Ahmad et al. (2021).

2.3.2. *Haemonchus* spp.

Durante várias décadas, o controle dos nematoides gastrintestinais (GIN) foi baseado quase exclusivamente no uso de fármacos anti-helmínticos (AH). O uso frequente e indiscriminado desses medicamentos favoreceu o surgimento de populações resistentes (Rashid et al., 2019). A parasitose em ruminantes representa um problema econômico e sanitário de importância global. América Latina representa 25% da superfície mundial de produção pecuária (Roeber, Jex, Gasser.,2013; Selzer e Epe,2021). Diversos estudos têm avaliado o impacto econômico dos principais parasitas (nematoides, trematoides e cestoides) que infectam ruminantes, relatando perdas econômicas devido à baixa produtividade e mortalidade (Arsenopoulos et al., 2021). (Costa, Simões, Riet-Correa., 2011).

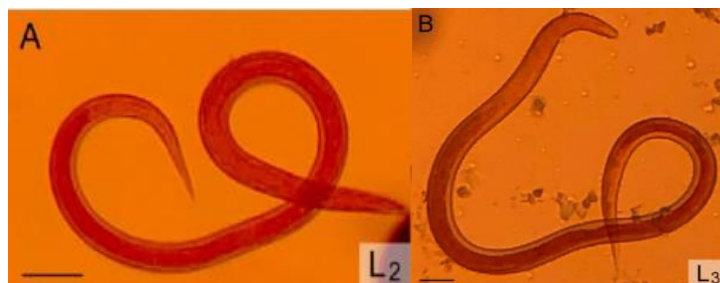
As espécies de nematoides gastrintestinais *Haemonchus* spp. são helmintos hematófagos pertencentes ao filo Nematoda, classe Chromadorea (Endo et al., 2014). Eles causam perda de eritrócitos e ferro no hospedeiro, levando à inflamação da mucosa abomasal e ativação do sistema imune (Sczesny-Moraes et al., 2010; Costa, Simões, Riet-Correa.,2011; Storillo, 2016). *Haemonchus contortus* é o nematoide parasita mais patogênico devido ao seu comportamento hematófago, causando graves problemas de saúde e produtividade nos sistemas de produção ovino e caprino (Arsenopoulos et al., 2021; Besier et al., 2016; Santos et al., 2019). As larvas e parasitas adultos no abomaso causam aumento do pH e gastrite, comprometendo a

capacidade digestiva, resultando em perda energética e proteica, além de anorexia no hospedeiro (Hernández, 2011; Padilla, 2020).

O ciclo biológico de *Haemonchus* spp. é direto e inicia-se com os parasitas adultos presentes no abomaso do hospedeiro. Esses parasitas têm grande capacidade de oviposição, e são eliminados nas fezes dos animais infectados. A fase ambiental começa no bolo fecal, e na presença de oxigênio, alimentam-se de bactérias e desenvolvem-se em larvas de segundo estágio (L₂), e posteriormente em larvas de terceiro estágio (L₃), que são infectantes e não se alimentam, pois mantêm a cutícula do estágio anterior. Essa parte do ciclo ocorre em condições ideais de temperatura entre 18 a 26 °C e umidade entre 80 a 100% (Storillo, 2016). As L₃ migram erraticamente para fora do bolo fecal, auxiliadas pela presença de umidade até o capim, sendo assim ingeridas pelo hospedeiro. No abomaso do hospedeiro, as larvas de terceiro instar (L₃) do *Haemonchus* se transformam em larvas de quarto instar (L₄). Esse período de crescimento e desenvolvimento significa que as L₄ começam a penetrar na mucosa gástrica, causando danos à mucosa e contribuindo para a patogenicidade do parasita. As larvas (L₄) continuam a se desenvolver e se tornam larvas de quinto estágio (L₅).

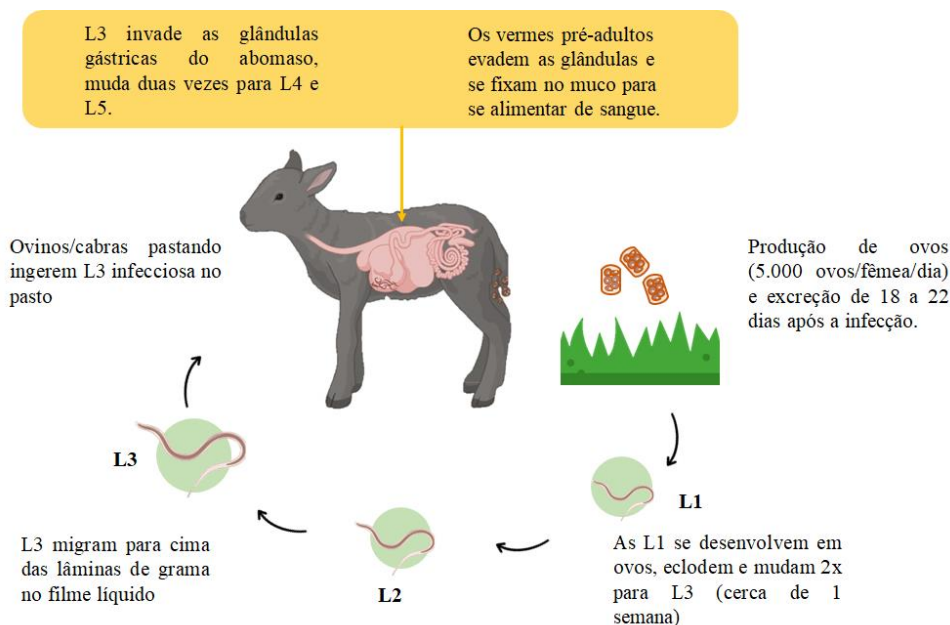
Os adultos jovens (L₅) se alimentam de sangue, assim como as larvas (L₄), o que pode causar anemia e outras complicações no hospedeiro. Além disso, as L₅ se acasalam e as fêmeas começam a produzir ovos que são excretados nas fezes do hospedeiro, completando o ciclo de vida do parasita (Figura 6 e 7) (Amarante, Ragozo, Silva., 2014; Mendes et al., 2020). O ciclo completo dura cerca de 28 dias, sendo 7 dias de vida livre e 21 dias para a fase parasitária. Animais jovens e fêmeas prenhas são mais suscetíveis aos helmintos do que os animais adultos devido ao seu estado nutricional e ao baixo nível de imunidade (Vieira., 2014).

Figura 6: *Haemonchus contortus*. A: Larva (L₂) e B: Larva (L₃).



Fonte: Niciura et al. (2023).

Figura 7: Processo de infecção de *Haemonchus* spp.



Fonte: Modificado de Dos Anjos et al. (2024).

2.4. Inseto vetor

2.4.1. *Aedes aegypti*

O vírus dengue (DENV) é transmitido principalmente pelos mosquitos *Aedes aegypti*, que se reproduzem e se distribuem em ambientes urbanos, fazendo da dengue uma doença predominantemente urbana. A dengue é responsável por cerca de 10.000 mortes e 100 milhões de infecções sintomáticas por ano em mais de 129 países (Bhatt et al., 2013; Schmitz e Harzheim, 2017; Semenza, Rocklöv, Ebi, 2022). Outros dois vírus causadores de arboviroses, chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV), também são transmitidos pelos mesmos vetores e, nas últimas décadas, tiveram um grande impacto em surtos epidêmicos nas Américas, África e Polinésia (Musso e Gubler, 2015). O *Aedes aegypti* está entre os vetores de arbovírus mais proeminentes do mundo. Este inseto originou-se na África Subsaariana como espécie silvestre e foi introduzido nas Américas através de navios pouco depois da chegada dos europeus nos anos 1400 (Powell e Tabachnick, 2013). No período de 1º de janeiro de 2014 a 11 de março de 2024, foram notificados 11.795.637 casos de dengue no Brasil, com uma média anual de 1.072.331 casos. Isso equivale a uma taxa de incidência média anual de 510,71 casos por 100.000 habitantes. Nos últimos três anos (2022 a 2024), observou-se um aumento de 60,80% no número médio anual de casos em relação ao período de 2014 a 2021 (De Sousa e Paradella, 2024) (Tabela 1).

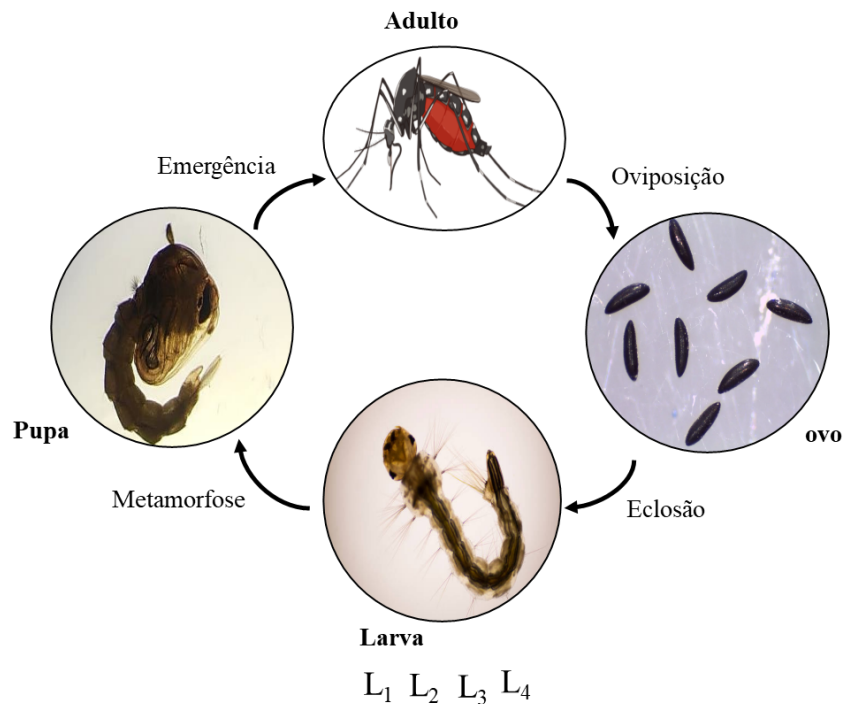
Tabela 1: Notificações, hospitalizações e mortes por dengue no período de 2014 a 2024.

Ano	Notificações	Hospitalizações	Mortes
2014	591.13	19.64	496
2015	1.697.801	38.33	1.005
2016	1.518.858	32.27	726
2017	243.34	11.60	205
2018	266.39	15.10	222
2019	1.556.588	56.20	851
2020	952.51	31.87	580
2021	531.81	16.92	276
2022	1.394.532	49.798	1.052
2023	1.517.840	49.723	1.072
2024	1.524.848	42.036	444
Total	11.795.637	363.477	6.929

Fonte: De Sousa e Paradella, (2024).

O ciclo de vida do *Aedes aegypti* não é muito exigente quanto às condições ambientais. Começa com a oviposição em depósitos de água. Em seguida, a eclosão dá origem a uma larva de primeiro estágio. Esta larva passa por três mudas sucessivas, conhecidas como ecdises, que a transformam em larvas de segundo, terceiro e quarto estágios, respectivamente. Após a quarta ecdise, ocorre a formação da pupa, que dá origem à pupa. Finalmente, uma muda, chamada emergência, dá origem à imago, conhecido comumente como o adulto do mosquito, seja macho ou fêmea. Para completar o ciclo de vida, ocorre o acasalamento e a cópula, o que leva à fertilização da fêmea. Posteriormente, se a fêmea tiver obtido uma refeição de sangue suficiente, ocorre a oviposição, ou seja, a postura dos ovos ver (Figura 8) (Christophers et al., 1960).

Figura 8: Ciclo de vida do *Aedes aegypti*.



Fonte: Modificado de Christophers et al. (1960).

2.5. Justificativa

Este estudo envolve a utilização de enzimas de *Metarhizium anisopliae* e papaína como possíveis soluções de controle para diversos nematoides parasitas de plantas e animais. Além disso, busca o controle do vetor *Aedes aegypti* mediante a combinação de conídios de *Metarhizium anisopliae* e enzimas de papaína. Estas soluções se destacam por serem mais seguras para a saúde humana e estão alinhadas com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), especificamente os objetivos 2 (Fome Zero), 3 (Saúde e Bem-estar) e 15 (Vida Terrestre).

Diversos estudos têm sido realizados para mitigar o uso de produtos sintéticos, mas ainda há muito a ser investigado. Este estudo é um dos pioneiros nessa área, e a utilização de enzimas como método de controle bioquímico ainda é um campo que precisa ser explorado em maior profundidade. A continuação das pesquisas é essencial para desenvolver alternativas seguras e eficazes para o controle de nematoides e insetos de interesse à saúde humana e animal.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a ação das enzimas de *Metarhizium anisopliae*, bem como da combinação entre papaína e conídios de *M. anisopliae* como biopesticidas contra nematoides e larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti*.

3.2. Objetivos específicos

Explorar os mecanismos de infecção de fungos do gênero *Metarhizium* e suas interações bioquímicas como potenciais caminhos para a criação de alternativas sustentáveis no manejo de pragas de insetos.

Avaliar a produção de protease e quitinase extracelular pelo fungo *Metarhizium anisopliae* em diferentes meios de cultura e sua aplicação no controle de nematoides parasitas de animais e plantas (*Haemonchus* spp. e *Meloidogyne incognita*) *in vitro*.

Avaliar a ação de conídios de *Metarhizium anisopliae* s.s. combinados à papaína sobre larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti*.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, G. et al. **Biological control: a novel strategy for the control of the plant parasitic nematodes**. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 114, n. 7, p. 885-912, 2021.
- AL-AIDROOS, K.; ROBERTS, D.W. **Mutants of *Metarhizium anisopliae* with increase virulence toward mosquito larvae**. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, v. 20, n. 2, p. 211-219, 1978.
- ALI, S. et al. **Compatibility of entomopathogenic fungi and botanical extracts against the wheat aphid, *Sitobion avenae* (Fab.) (Hemiptera: Aphididae)**. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, v. 28, p. 1-6, 2018.
- ALKHAIBARI, A.M. et al. ***Metarhizium brunneum* blastospore pathogenesis in *Aedes aegypti* larvae: attack on several fronts accelerates mortality**. *PLoS Pathogens*, v. 12, n. 7, p. e1005715, 2016.
- ALTAMIRANO, E.J. **Microencapsulación de conidios de *Metarhizium anisopliae* mediante secado por aspersión y gelificación iónica**. 2021.
- AMARANTE, A. F. T. D.; RAGOZO, A.; SILVA, B. F. D. **Os parasitas de ovinos São Paulo**; Editora Unesp Digital, pp. 13-97. ISBN 978-85-68334-42-3. Available from SciELO Books, 2014.
- AMBETHGAR, V. **Potential of entomopathogenic fungi in insecticide resistance management (IRM): A review**. *Journal of Biopesticides*, v. 2, n. 2, p. 177-193, 2009.
- ANSARI, M. A.; SHAH, F. A.; BUTT, T. M. **The entomopathogenic nematode *Steinernema kraussei* and *Metarhizium anisopliae* work synergistically in controlling overwintering larvae of the black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*, in strawberry growbags**. *Biocontrol Science and Technology*, v. 20, n. 1, p. 99-105, 2010.
- ARRUDA, W. **Caracterização molecular e morfofisiológica de diferentes isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e análise morfológica do processo de infecção em *Boophilus microplus***. 2005.
- ARSENOPOULOS, K.V. et al. **Haemonchosis: A challenging parasitic infection of sheep and goats**. *Animals*, v. 11, n. 2, p. 363, 2021.
- BAGGA, S. et al. **Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae***. *Gene*, v. 324, p. 159-169, 2004.
- BAILEY, A. et al. **Biopesticides pest management and regulation**, Wallingford, CABI, 232 p, 2010.
- BARTLETT, M.C; JARONSKI, S.T. **Mass production of entomogenous fungi for biological control of insects**. In: Burge, M.N. (Ed.), *Fungi in Biological Control Systems*, Manchester University Press, Manchester, UK, pp. 61–85, 1988.
- BESIER, R. B. et al. **The pathophysiology, ecology and epidemiology of *Haemonchus contortus* infection in small ruminants**. *Advances in parasitology*, 93, 95-143, 2016.

BHATT, S. et al. **The global distribution and burden of dengue.** Nature, 496(7446), 504-507,2013.

BILLINGS, F.H e GLENN, P.A. **Results of the artificial use of the white-fungus disease in Kansas.** USDA Bur. Entomol. Bull. 107, 58,1911.

BLANCO, S., SIRIO, A. A., ROLDÁN, S. **Uso de Bioinsecticidas: *Beauveria bassiana*,** (Universidad Nacional Del Nordeste. Facultad de Ciencias Agrarias. Instituto Agrotécnico “Pedro M. Fuentes Godo”, 2022.

Brasil, Ministério da Saúde. **Centro de Operações de Emergências (COE) Dengue e outras arboviroses.** Informe semanal. Edição Nº 06, SE 01 a 11/2024.12 p. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/arboviroses/informe-semanal/informe-semanal-no-06-centro-de-operacoes-de-emergencias-se-11-19-de-marco-de-2024/@download/file>

BUENO-PALLERO, F. Á. et al. **Simultaneous exposure of nematophagous fungi, entomopathogenic nematodes and entomopathogenic fungi can modulate belowground insect pest control.** Journal of Invertebrate Pathology, 154, 85-94,2018.

BUSIN, V., e SARGISON, N. D. **Preliminary observations on the value of using effective anthelmintic drugs to control nematode parasitism in lambs in the face of a high level of infective larval challenge.** Small Ruminant Research, 119(1-3), 172-175,2014.

CÁCERES, L., AYARZA, C., BERNAL, D. **Evaluación de la eficacia biológica y de la sensibilidad de *Aedes aegypti* a los insecticidas piretroides deltametrina y ciflutrina durante el brote del virus Zika en Kuna Yala, Panamá.** Biomédica, 43(2), 222-243,2023.

CHAGAS, A. C. D. S. et al. **Economic impact of gastrointestinal nematodes in Morada Nova sheep in Brazil.** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 31, e008722,2022.

CHOI, W. I. et al. **Toxicity of plant essential oils to *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae).** Journal of Economic Entomology 96 (5): 1479-1484,2003.

CHRISTOPHERS, S. ***Aedes aegypti* (L.) The yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure. *Aedes aegypti* (L.) the Yellow Fever Mosquito: its Life History, Bionomics and Structure., v., n., p,1960.**

CLARKSON, J. M e Charnley, A. K. **New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects.** Trends in microbiology, 4(5), 197-203,1996.

COSTA, V. M.; SIMÕES, S. V.; RIET-CORREA, F. **Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil.** Pesquisa Veterinária Brasileira, 31, 65-71,2011.

COYNE, D. L. et al. **Plant-parasitic nematodes and food security in Sub-Saharan Africa.** Annual review of phytopathology, 56(1), 381-403,2018.

CRISAN, E. V. **Mechanism responsible for release of toxin by *Metarrhizium* spores in mosquito larvae.** Journal of invertebrate pathology, 17(2), 260-264,1971.

- DE FARIA, M e WRAIGHT, S. **Mycoinsecticides and Mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types**. Biol. Control 43,237–256,2007.
- DE SOUSA, F. A. C. G.; PARADELLA, T. C. **Fatores de risco de morte por dengue no brasil: um estudo ecológico**. Revista Baiana de Saúde Pública, 48(2), 181-190,2024.
- DE SOUZA, D. C.et al.**Compatibility study of *Duddingtonia flagrans* conidia and its crude proteolytic extract**. Veterinary Parasitology, 322, 110030,2023.
- DOS ANJOS, K. A.et al. ***In vitro* evaluation of the potential of mites of the family Macrochelidae (Acari: Mesostigmata) as macrobiological agents against the nematode *Haemonchus contortus* (Strongylida: Trichostrongylidae)**. Veterinary Parasitology, 328, 110191,2024.
- EILENBERG, J.; HAJEK, A.; LOMER, C.**Suggestions for unifying the terminology in biological control**. BioControl, 46, 387-400,2001.
- ENDO, V.T.et al. **Prevalência dos helmintos *Haemonchus contortus* e *Oesophagostomum columbianum* em pequenos ruminantes atendidos no setor de anatomia patológica–UEM**. Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública, 1(2), 112-118,2014.
- FAÍSCAS, T.C.et al.**Manejo e indústria de resistência a inseticidas: As origens e a evolução do Comitê de Ação de Resistência a Inseticidas (IRAC) e o esquema de classificação do modo de ação**. Manejo de Pragas. 77, 2609-2619,2021.
- FEIJOO-SIOTA, L.; VILLA, T. G. (2011). **Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications**. Food and Bioprocess Technology, 4, 1066-1088,2011.
- FERNÁNDEZ-LUCAS, J.; CASTAÑEDA, D.; HORMIGO, D. **New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry**. Trends in Food Science and Technology, 68, 91-101,2017.
- FERREIRA, B, A.et al. **The role of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil,(E)-cinnamaldehyde and (E)-cinnamaldehyde oxime in the control of *Meloidogyne incognita***. Journal of Phytopathology, v. 169, n. 4, p. 229-238, 2021.
- FERREIRA, J.M; SOARES F.E de F.**Entomopathogenic fungi hydrolytic enzymes: A new approach to biocontrol?**. Jornal Nat Pestic Res. 3:100020,2023.
- GARCEZ, W.S. et al. **Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of some plants native to the West-Central of Brazil**. Biores. Technol. 100, 6647–6650,2009.
- GOETTEL. M.S.; EILENBERG. J.; GLARE. T.**Hongos entomopatógenos y su papel en la regulación de las poblaciones de insectos**. En: Iatrou K, Gill SS (eds) Gilbert LI. Elsevier, Amsterdam, pp 361–405,2005.
- GUBLER, D.J.; CLARK, G.G. **Dengue hemorrhagic fever: the emergence of a lobar health problem**. Emerging infectious diseases, 1, 55,1995.

HAO, Z. et al. **Cloning, Expression and 3D Structure Prediction of Chitinase from *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBC-H1**. Int. Jornal Mol. Sci. 17, 825,2016.

HEIMPEL, G. E.; MILLS, N. J. **Biological control. Ecology and applications**. Cambridge University Press,2017.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. **Insecticide resistance in insect vectors of human disease**. Annual review of entomology, 45(1), 371-391,2000.

HERNÁNDEZ, A. **Estudio de la respuesta inmune frente *Haemonchus contortus* en dos razas ovinas canarias**. (Tesis doctoral de la universidad de las palmas de gran canaria, Arucas) Pag. 28,2011.

HOWARD, A. F. et al. **Pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* leads to increased susceptibility to the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana***. Malaria Journal, 9, 1-9,2010.

HUSSAIN, A. et al. **Susceptibility and immune defence mechanisms of *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) against entomopathogenic fungal infections**. Int. J. Mol. Sci. 17, 1518,2016.

JAFFUEL, G. et al. **Protecting maize from rootworm damage with the combined application of arbuscular mycorrhizal fungi, *Pseudomonas* bacteria and entomopathogenic nematodes**. Scientific reports, 9(1), 3127,2019.

JARONSKI, S. T. **Mass production of entomopathogenic fungi—state of the art**. Mass production of beneficial organisms, 317-357,2023.

JONES, J. T. et al. **Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology**. Molecular plant pathology, 14(9), 946-961,2013.

KUISEU, J. et al. **Prevalence, effects and alternative control methods of *Haemonchus contortus* in small ruminants: a review**. Journal of Veterinary Medicine and Animal Health, 13(2), 84-97,2021.

LACEY, C.M.; LACEY, L.A.; ROBERTS, D.R. **Route of invasion and histopathology of *Metarhizium anisopliae* in *Culex quinquefasciatus***. Jornal Invertebr. Pathol., 52:108-118,1988.

LACEY, L. A. et al. **Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future?**. Biological Control, 21(3), 230–248,2001.

LIGGIERI, C. et al. **Biochemical analysis of papainlike protease isolated from the latex of *Asclepias curassavica* L**. Acta. Biochim. Biophys. Sin. 41, 154–162,2009.

LIMA, E.A.L.A. **Aspectos taxonômicos e citológicos de Hyphomycetes (Deuteromycotina) entomopatogênicos**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 84:17-20,1989,1989.

LIU, D.; SMAGGHE G; LIU T-X. **Interações entre Fungos Entomopatogênicos e Insetos e Perspectivas com Glicanos**. Jornal dos Fungos. 9(5):575,2023.

- LORD, J.C. **From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control.** *J. Invertebr. Pathol.* 89 (1), 19–29, 2007.
- LUGGER, O. **Fungi which kill insects.** *Univ. Minn. Coll. Ag. Bull.* 4, 26–41, 1888.
- MACIEL, E. L. N. et al. **Esforços Governamentais Alavancam Combate Efetivo à Dengue no Brasil,** 2024.
- MALDONADO, G J. A.; REYNA BELLO, A. **Caracterização de fungos entomopatogénicos com potencial para o controlo biológico de stresses bióticos em plantas** <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/28904/1/T>, 2022.
- MALVIYA, N. et al. **Scientific and ethnopharmacological evidence of *Carica papaya* for the effective management of vector-borne disease.** In *Natural Products in Vector-Borne Disease Management* (pp. 467-497). Academic Press, 2023.
- MAMBOYA, F e AMRI, E. (2012). **Papain, a Plant Enzyme of Biological Importance: A Review.** *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8(2), 99-104, 2012.
- MANI, V.; ASSEFA, A. D.; HAHN, B. S. **Transcriptome analysis and miRNA target profiling at various stages of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* development for identification of potential regulatory networks.** *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7442, 2021.
- MEDEROS, A., BANCHERO, G. **Parasitoses gastrointestinais em ovinos e bovinos: situação atual e progresso da investigação.** *Revista INIA.* 34: 10-15, 2013.
- MENDES, J. P. et al. ***Haemonchus contortus* e medidas estratégicas de controle para ovinos.** *Ensaio e Ciência Biológicas Agrárias e da Saúde*, 24(2), 105-110, 2020.
- MENDOZA-De GIVES, P. et al. **The nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* reduces the gastrointestinal parasitic nematode larvae population in faeces of orally treated calves maintained under tropical conditions— Dose/response assessment.** *Veterinary parasitology*, 263, 66-72, 2018.
- MHATRE, P. H. **Histopathological changes and evaluation of resistance in Asian rice (*Oryza sativa* L.) against rice root-knot nematode, *Meloidogyne graminicola* Golden and Birch.** *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 75(01), 41-48, 2015.
- MHATRE, P. H. et al. **Isolation and characterization of *Pasteuria* parasitizing root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, from black pepper fields in India.** *Egyptian journal of biological pest control*, 30, 1-7, 2020.
- Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico 1** <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2023/boletim-epidemiologico-volume-54-no-01/view>>, 2023.
- MNYONE, L.L. et al. **Tools for delivering entomopathogenic fungi to malaria mosquitoes: effects of delivery surfaces on fungal efficacy and persistence.** *Malaria Journal*, 9, 1-7, 2010.

- MORA, E, CASTILHO, M; FRAGA.A.M. **Fungos entomopatogenicos: enzimas, toxinas e fatores que afetam a diversidade**,2016.
- MOTTA-DELGADO, P. A.; MURCIA-ORDOÑEZ, B. **Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. Ambiente and Água-An Interdisciplinary**. Journal of Applied Science, 6(2), 77-90,2011.
- MUSSO, D.; GUBLER, D. J. **Zika virus: following the path of dengue and chikungunya?**. The Lancet, 386(9990), 243-244,2015.
- NICIURA, S. C. M. et al. **In vitro culture of parasitic stages of *Haemonchus contortus***. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 32(1), e010122,2023.
- NUNES, N. N. D. S.et al. **The component of *Carica papaya* seed toxic to *A. aegypti* and the identification of tegupain, the enzyme that generates it**. Chemosphere, 92(4), 413-420,2013.
- OKUMU, F. O.et al. **Attracting, trapping and killing disease-transmitting mosquitoes using odor-baited stations-The Ifakara Odor-Baited Stations**. Parasites and Vectors, 3, 1-10,2010.
- OLIVEIRA, A.; OLIVEIRA, R.B.; MANI, M. **Resistência a inseticidas e seu manejo em insetospraga de culturas hortícolas**. In Tendências em Entomologia Hortícola; Oliveira, M., Ed.; Springer: pp. 455-490,2022.
- OLIVEIRA, P. A. D. et al.**Doenças parasitárias em bovinos e ovinos no sul do Brasil: frequência e estimativa de perdas econômicas**. Pesquisa Veterinária Brasileira, 37(08), 797-801,2017.
- ORTIZ-OCAMPO, G. I. et al. **In vitro ANTHELMINTIC EFFECT OF *Coffea arabica* RESIDUES AGAINST AN *Haemonchus contortus* ISOLATE WITH LOW SUSCEPTIBILITY TO TANNINS**. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 19(1),2016.
- PADILLA, G. N.et al. **Caracterización patogénica y morfológica de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* obtenidos de diferentes órdenes insectiles**,2000.
- PADILLA., AMOR, M. J. **Estudio transversal de la infección por *Haemonchus contortus* en ovinos destetos de la granja el Socorro del municipio de Turbaco, departamento de Bolívar**,2020.
- PAHO/WHO. **Epidemiological Alert: Chikungunya increase in the Region of the Americas**. 13 Feb. <<https://www.paho.org/en/documents/epidemiological-alert-chikungunya-increase-region-americas>> ,2023.
- PAPADOPOULOU J, TRIANTAPHYLLOU AC. **Sex differentiation in *Meloidogyne incognita* and anatomical evidence of sex reversal**. Jornal Nematol. 14:549–66,1982.
- PAULA, A. R. et al.**Neem oil increases the persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae**. Parasites vectors, 12, 1-9,2019

PEDRINI, N.; CRESPO, R.; JUÁREZ, M. P. **Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi.** Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 146(1-2), 124-137,2007.

POLAINA, J.; MACCABE, A. P. **Industrial enzymes** (pp. 531-547). Netherlands: Springer,2007.

POVEDA, J.; ABRIL-URIAS, P.; ESCOBAR, C. **Biological control of plant-parasitic nematodes by filamentous fungi inducers of resistance: Trichoderma, mycorrhizal and endophytic fungi.** Frontiers in Microbiology, 11, 530260,2020.

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. **History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-a review.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 108(suppl 1), 11-17,2013.

QU, M., et al. **Bioinsecticides as future mainstream pest control agents: Opportunities and challenges.** Frontiers of Agricultural Science and Engineering, 9(1), 82-97,2022.

RASHID, M. et al. **A systematic review on modelling approaches for economic losses studies caused by parasites and their associated diseases in cattle.** Parasitology, 146(2), 129-141,2019.

RÍOS-DE ÁLVAREZ, L. **Alternativas naturais para o controle de parasitas gastrointestinais em ovinos e caprinos.**

Engormix.<https://www.engormix.com/ovinos/articulos/alternativas-naturales-controlparasitost29261.html>,2011.

ROEBER, F.; JEX, A. R.; e GASSER, R. B. **Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance-an Australian perspective.** Parasites and vectors, 6, 1-13,2013.

RUDOLPHI, K. A. **Neue Beobachtungen über die Eingeweidewürmer.** Archiv für Zoologie und Zootomie, 3, 1-32,1803.

SANTI, L. et al. **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, 27, 2297-2303,2011.

SANTOS, F. O. et al. **Anthelmintic activity of plants against gastrointestinal nematodes of goats: A review.** Parasitology, 146(10), 1233-1246,2019.

SAPAAT, A. et al. **Anthelmintic activity of papaya seeds on *Hymenolepis diminuta* infections in rats.** Trop. Biomed. 29, 508–512,2012.

SARGISON, N. D. **Pharmaceutical treatments of gastrointestinal nematode infections of sheep—Future of anthelmintic drugs.** Veterinary Parasitology, 189(1), 79-84,2012.

SARI, M.; KHAIRA, I. L. **Ekstrak daun pepaya (*Carica papaya* L.) terhadap mortalitas larva nyamuk *Aedes aegypti*.** Epidemica (Journal of Public Health), 1(1), 17-23,2020.

SATRIJA, F. et al. **Anthelmintic activity of papaya latex against patent *Heligmosomoides polygyrus* infections in mice.** Journal of ethnopharmacology, 48(3), 161-164,1995.

Schmitz, C.A.A.; Harzheim, E. **Oferta e utilização de teleconsultorias para Atenção Primária à Saúde no Programa Telessaúde Brasil Redes**. Rev Bras Med Fam Comunidade.12(39):1-11,2017.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. ***Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins**. Toxicon, 56(7), 1267-1274,2010.

SCZESNY-MORAES, E. A. et al. **Resistência anti-helmíntica de nematóides gastrintestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul**. Pesquisa Veterinária Brasileira, 30, 229-236,2010.

SELZER, P.M.; EPE, Christian. **Antiparasitics in animal health: quo vadis? Trends in parasitology**. v. 37, n. 1, p. 77-89, 2021.

SEMENZA, Jan C.; ROCKLÖV, J; EBI, K.L. **Climate change and cascading risks from infectious disease**. Infectious diseases and therapy, v. 11, n. 4, p. 1371-1390, 2022.

SENTIS, A. et al. **Biological control needs evolutionary perspectives of ecological interactions**. Evol Appl 15: 1537–1554,2022.

SHAKARAMI, J. et al. **Insecticidal activity and synergistic effect of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and three botanical compounds against third instar larvae of *Ephestia kuehniella* Zeller**. Research on Crops, 16(2), 296-303,2015.

SHILPA, N.et al. **A status-quo review on management of root knot nematode in tomato**. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 97(4), 403-416,2022.

SIDDIQUE S, GRUNDLER FM. **Parasitic nematodes manipulate plant development to establish feeding sites**. Curr Opin Microbiol. 46:102–8,2018.

SIKORA, R. A. et al. **Integrated nematode management in a world in transition: constraints, policy, processes, and technologies for the future**. Annual Review of Phytopathology, 61(1), 209-230,2023.

SIKORA, R., FERNÁNDEZ. **Enematode parasites of vegetables**. In: Luc M, Sikora RA, Bridge J, eds. Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. Wallingford, UK: CAB,2005.

SILVA, J. D. O. et al. **Efficacy of new nematicides for managing *Meloidogyne incognita* in tomato crop**. Journal of Phytopathology, 167(5), 295-298,2019.

SINHA, K. K.; CHOUDHARY, A. K.; KUMARI, P. **Entomopathogenic fungi. In Ecofriendly pest management for food security** (pp. 475-505). Academic Press,2016.

ST LEGER, R.J. et al. **Characterization and Ultrastructural Localization of Chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during Fungal Invasion of Host (*Manduca sexta*) Cuticle**. Appl Environ Microbiol., 62: 907–912,1996.

ST LEGER, R.J. **The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects**. Canad J Bot., 73(S1):1119-1125,1995.

ST LEGER, R.J.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A.K. **Production of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*.** Jornal Gen Microbiol., 133: 1371–1382,1987.

ST. LEGER, R. J.; WANG, C. **Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests.** Applied Microbiology and Biotechnology, 85, 901-907,2010.

ST. LEGER, R. J.; WANG, J. B. ***Metarhizium*: jack of all trades, master of many.** Open Biology, 10(12), 200307,2020.

STEINHAUS, E.A. **Microbial control—the emergence of an idea. A brief history of insect pathology through the nineteenth century.** Hilgardia 26, 107–160,1956.

STORILLO, V.M. **Resistência, resiliência e sensibilidade de ovinos ao *Haemonchus contortus*: comparações hematológicas e bioquímicas.** São Paulo: Universidade de São Paulo,2016.

STUCKY,et al. **Control of the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* in soil and on tomato roots by *Clonostachys rosea*.** Journal of Applied Microbiology, 135(5), 1111-1119,2024.

SZEWC, M.; De WAAL, T.; ZINTL, A. **Biological methods for the control of gastrointestinal nematodes.** The Veterinary Journal, 268, 105602,2021.

TAMEZ GUERRA, P. **Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México.** Ciencia UANL, 4(2), 143-152,2001.

TIAN, B. Y.; CAO, Y.; ZHANG, K. Q. **Metagenomic insights into communities, functions of endophytes and their associates with infection by root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, in tomato roots.** Scientific reports, 5(1), 17087,2015.

TILQUIN, M. **Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis (Bti) in mosquito natural habitats.** PLoS One, 3(10), e3432,2008.

TYAS, D. W.; WAHYUNI, D.; HARIYADI, S. **Perbedaan Toksisitas Ekstrak, Rebusan Dan Rendaman Daun Pepaya (*Carica Papaya* L.) Terhadap Mortalitas Larva Nyamuk *Aedes aegypti* L.** Pancaran Pendidikan, 3(1), 59-68,2014.

UMARU, F.E.;SIMARARI,K. **Efficacy of Entomopathogenic Fungal Formulations against *Elasmolomus pallens* (Dallas)(Hemiptera:Rhyparochromidae) and Their Extracellular Enzymatic Activities.** Toxins 2022,14,584,2022.

VIDHATE, R. P. et al. **Genomic determinants of entomopathogenic fungi and their involvement in pathogenesis.** Microbial ecology, p.1-12,2023.

VIEIRA, V. D. **Sheep gastrointestinal helminthiasis in the Sertão region of Paraíba State, Northeastern Brazil: prevalence and risk factors.** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 23(4), 488-494,2014.

WIJANARKO, A. **Production of a Biopesticide Based on a Cysteine Protease Enzyme from Latex and Papaya (*Carica Papaya*) for *Spodoptera Litura* in Red Chili Peppers (*Capsicum Annuum*)**. International Journal of Technology. Volume 8(8), pp.1455-1461,2017.

ZHANG W. et al. **Introgression and gene family contraction drive the evolution of lifestyle and host shifts of Hypocrealean fungi**. Mycology 9:176–188,2018.

ZIMMERMANN, G. **Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae***. Biocontrol Science and technology, 17(9), 879-920,2007.

Capítulo 1: Bioquímica de entomopatógenos e micoparasitas: *Metarhizium*

Ruth Celestina Condori Mamani, Juliana Marques Ferreira, Lisseth Bibiana Puentes Figueroa,
and Filippe Elias de Freitas Soares

R. C. C. Mamani, L. B. P. Figueroa, F. E. F. Soares (*)
Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras
e-mail: filippe.soares@ufla.br

J. M. Ferreira
Instituto de Patologia Tropical e Saúde, Universidade Federal de Goiás

Em revisão: Springer book: Entomopathogenic Fungi: Prospects and Challenges.
_Deshmukh_89278082

Resumo: O controle de pragas é um grande desafio devido à baixa efetividade dos produtos químicos sintéticos. Portanto, alternativas ecologicamente corretas são urgentemente necessárias. Uma opção promissora é a utilização de fungos entomopatogênicos, especialmente os do gênero *Metarhizium*. Esses fungos usam dois mecanismos principais para atingir seus hospedeiros: pressão mecânica para romper áreas membranosas ou levemente escleróticas e degradação bioquímica da cutícula, como proteínas, quitina e lipídios, por meio do uso de enzimas hidrolíticas extracelulares, como proteases, quitinases e lipases. O *Metarhizium* secreta várias enzimas, incluindo metaloproteases, subtilisina (Pr1), tripsina (Pr2) e cisteína proteases (Pr4) durante o processo de infecção. Além disso, os genes codificadores de quitinase *chit1*, *chi2* e *chi3* são ativados. Este capítulo se concentra nos fungos entomopatogênicos pertencentes ao gênero *Metarhizium*, sua utilização como biocontroladores, suas enzimas e o possível uso futuro dessas enzimas como biopesticidas.

Palavras-chave: *Metarhizium*, Pragas, Protease, Quitinase, Lipases, Toxinas

1.Introdução

A agricultura moderna enfrenta desafios significativos no gerenciamento de fitopatógenos e artrópodes-pragas, que podem causar perdas de rendimento nas principais culturas alimentares (arroz, trigo, soja) entre 10% e 30% (He et al., 2021; Savary et al., 2019). Nesse contexto, a agricultura convencional em larga escala depende muito de produtos sintéticos para manter a produtividade (Singh e Kaur, 2020). Esses produtos são prejudiciais ao ecossistema e à saúde humana, pois têm resíduos tóxicos para vários animais, inclusive humanos. Além disso, seu uso exacerbado levou à seleção de pragas resistentes (Sing e Kaur, 2020).

Em resposta a esses desafios, um método de controle sustentável está crescendo em todo o mundo: o controle biológico. Esse método implica o uso de organismos e/ou seus produtos para reduzir os danos e as perdas causados por uma determinada praga ou patógeno na área-alvo (Eilenberg et al., 2001; Sentis et al., 2022). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) (2022) classifica os biopesticidas como pesticidas microbianos, que são baseados em bactérias e em fungos entomopatogênicos, etc, ou bioquímicos, que são baseados em compostos naturais (Ferreira e De Freitas Soares, 2023).

O controle biológico foi introduzido pela primeira vez no Brasil com o uso de *Neodusmetia sangwani* (Hymenoptera: Encyrtidae) como parasitoide para o manejo de *Antonina graminis* (Hemiptera: Pseudococcidae), que causava danos significativos às

gramíneas forrageiras (Postali Parra e Coelho, 2019). Atualmente, os fungos entomopatogênicos são usados para tratar mais de 3,5 milhões de hectares somente no Brasil (Mascarin et al., 2019). Baculovírus, bactérias e fungos entomopatogênicos são agentes de biocontrole usados para controlar artrópodes (Ferreira e de Freitas Soares, 2023; Schrank e Vainstein, 2010). Os fungos entomopatogênicos (FEP) são importantes agentes de biocontrole porque podem infectar várias espécies de artrópodes e não poluem o ambiente com compostos tóxicos e bioacumulativos (Tamayo-Mejía et al., 2020; Wang et al., 2019). Além disso, várias espécies de fungos entomopatogênicos também podem contribuir positivamente para o crescimento das plantas (De Freitas Soares et al., 2020).

Ao contrário dos baculovírus e das bactérias, que precisam ser ingeridos, os fungos podem penetrar ativamente nos artrópodes por meio de aberturas naturais ou invadindo a cutícula. O esporo do fungo é capaz de reconhecer e aderir à cutícula do artrópode. A germinação e a penetração da cutícula ocorrem por dois mecanismos. O primeiro é a pressão mecânica, devido à ação das hifas que rompem áreas membranosas ou levemente escleróticas. O segundo mecanismo é de natureza bioquímica e envolve a ação de enzimas hidrolíticas extracelulares. As lipases (EC 3.1.1.3) catalisam a clivagem de ligações éster dentro do triacilglicerol para produzir glicerol e ácidos graxos de cadeia longa. As proteases (EC 3.4) funcionam catalisando a clivagem da ligação peptídica que une os resíduos de aminoácidos nos peptídeos e nas proteínas. As quitinases (EC 3.2.1.14) funcionam catalisando a clivagem de ligações glicosídicas entre resíduos de N-acetilglucosamina conectados por ligações β -[1-4] (Ferreira e de Freitas Soares, 2023; Hussein et al., 2010; Umaru e Simarani, 2022).

Durante a infecção, os fungos entomopatogênicos produzem várias subclasses de proteases, incluindo metaloproteases, subtilisina (Pr1), tripsina (Pr2) e cisteína (Pr4) (Charnley, 2003; Schrank e Vainstein, 2010). Os isolados virulentos têm altos níveis de Pr1 ligados aos esporos e, em associação com outras enzimas, atuam para digerir os componentes da superfície do hospedeiro e liberar nutrientes que promovem o crescimento fugal (Charnley, 2003; Schrank e Vainstein, 2010; St. Leger, 1993). Por exemplo, o *M. anisopliae* também produz toxinas, principalmente destruxinas, que foram identificadas como fatores de virulência que aceleram a morte de insetos infectados (Schrank e Vainstein, 2010). Nesse contexto, o objetivo desta revisão é explorar os mecanismos de infecção do *Metarhizium* e suas interações bioquímicas como possíveis caminhos para a criação de alternativas sustentáveis no manejo de insetos-pragas.

1.1 Desafios agrícolas

O desafio de alcançar uma agricultura mais sustentável exige o desenvolvimento de abordagens inovadoras. No entanto, ainda há muitos desafios. Por muitos anos, as pragas têm sido um problema persistente no campo, resultando em graves perdas econômicas (He et al., 2021; Oerke e Dehne, 2004). As pragas-insetos causam danos significativos às culturas, com perdas anuais estimadas em cerca de US\$ 100 bilhões, no total, as pragas-insetos reduzem a produtividade agrícola em todo o mundo em 20 a 32% antes e depois da colheita. (Carlini e Grossi-De-Sá, 2002; Oberemok et al., 2023). A FAO relata que as pragas de insetos causam perdas de pelo menos US\$ 70 bilhões em todo o mundo (Ferreira e de Freitas Soares, 2023).

Em geral, os métodos convencionais de controle de pragas envolvem a aplicação de produtos químicos sintéticos, que se mostraram eficazes na mitigação dos danos causados pelas pragas. No entanto, esse método tem um impacto significativo sobre o meio ambiente, pois os produtos químicos contaminam a água, o ar e o solo, apresentando riscos ao meio ambiente e à saúde humana (Smagghe et al., 2023). Os pesticidas sintéticos, incluindo piretroides, organofosforados e neonicotinoides, melhoraram significativamente o controle de pragas. Conforme declarado pelo banco de dados FAOSTAT (2019), a aplicação global de pesticidas quase dobrou nas últimas três décadas. Por exemplo, em 2018, foram 4 milhões de toneladas de pesticidas sintéticos (FAO e OMS 2019).

Embora os pesticidas sintéticos atuem rapidamente e sejam convenientes de usar, sua aplicação extensiva gerou uma preocupação generalizada sobre seus efeitos negativos. Além disso, o uso constante e/ou incorreto da mesma classe de pesticidas selecionou populações resistentes em várias espécies-alvo. Por exemplo, mais de 600 casos de resistência foram documentados na mosca branca (*Bemisia tabaci*), tornando 68 ingredientes ativos ineficazes (Smagghe et al., 2023). Portanto, a atenção está se voltando para uma alternativa sustentável e eficiente: o controle biológico (Eilenberg et al., 2001; Sentis et al., 2022).

O uso de biopesticidas promove a segurança dos alimentos, apoia o bem-estar da saúde, evita a contaminação da água e do solo com toxinas sintéticas e promove práticas responsáveis de consumo e produção de alimentos. Atualmente, uma das principais questões é aumentar a competitividade dos bioprodutos baseados em fungos entomopatogênicos. Nesse contexto, as enzimas produzidas pelo (fungos entomopatogênicos) EPF oferecem oportunidades para melhorar os biopesticidas atuais e criar novos bioprodutos.

1.2 Controle Biológico

Os agentes de controle biológico utilizados no manejo de pragas de artrópodes abrangem uma variedade de organismos, incluindo baculovírus, fungos entomopatogênicos, bactérias e nematoides (Lacey et al., 2015), juntamente com artrópodes úteis, como predadores e parasitoides (Messelink, 2014). Esses agentes têm sido extensivamente estudados e amplamente utilizados como biopesticidas (Ferreira e De Freitas Soares, 2023; Schrank e Vainstein, 2010). A grande biodiversidade de fungos permite a identificação de isolados adequados para o desenvolvimento de agentes de controle biológico competitivos e ambientalmente seguros (Thomas e Read, 2007).

A eficácia e a segurança dos agentes de controle biológico criam um mercado multimilionário (Muñiz-Paredes et al., 2017). Os produtos microbianos são um segmento importante dos biopesticidas, representando aproximadamente 60% do mercado. Embora esse mercado seja avaliado em cerca de US\$ 1,9 bilhão, ele representa apenas 3% do mercado mundial de pesticidas (Tabela 1) (Smagghe et al., 2023). Os biopesticidas comerciais que contêm EPF constituem 19% do mercado de biopesticidas. As principais espécies utilizadas são: *M. anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*, *Lecanicillium lecanii* e *B. brongniarti*. O foco desta análise são os fungos do gênero *Metarhizium*, que representam aproximadamente 70% dos produtos existentes até o momento (Smagghe et al., 2023). Os EPF são usados devido à sua capacidade de regular um amplo espectro de espécies de artrópodes (Pucheta Díaz, 2006). Os conídios são produzidos em processos de cultura sólida de pequena, média ou grande escala (Cherry et al., 1999) e são fundamentais para a preparação de vários produtos ativos em todo o mundo (Méndez-González et al., 2018; 2022).

Tabela 1. Mercados globais de pesticidas (BBC Report 2018), biopesticidas (Microbial Pesticide Market, 2020-2025) e pesticidas microbianos (Fonte: Adaptado de Lacey et al. (2015) e Smagghe et al. (2023)).

Pesticida	Percentual de Mercado
Pesticidas sintéticos	95%
Biopesticidas	5%
Pesticidas microbianos	58%
Outros biopesticidas	42%
Bactérias	66%
Fungos	19%
Vírus	10%
Nematoides	5%

2. Principais microrganismos

2.1 Bactérias Entomopatogênicas

As bactérias entomopatogênicas (EPBs) constituem 66% dos biopesticidas microbianos disponíveis, mas respondem por apenas 1,9% dos bioprodutos comercializados (Lacey et al. 2015). Eles oferecem uma alternativa sustentável aos inseticidas químicos devido à sua menor toxicidade e maior eficácia no controle de pragas. Os EPBs são eficazes contra uma variedade de pragas, sendo que as espécies de *Bacillus thuringiensis* (Bt) dominam o mercado e capturam quase 90% da participação de mercado. Embora outras espécies de EPBs estejam disponíveis para controlar besouros e lepidópteros, elas constituem uma parcela menor do mercado de EPBs (Lacey et al., 2015; Smagghe et al., 2023).

2.2 Fungos entomopatogênicos

O uso de EPFs não contamina o meio ambiente, pois são organismos que ocorrem naturalmente (Vega e Kaya, 2012). Durante seu ciclo de vida, os EPFs de ordem Hypocrealean exibem fases biotróficas e saprofíticas alternadas. Isso corresponde à infestação de artrópodes e à colonização de cadáveres de hospedeiros, respectivamente (Ferreira e de Freitas Soares, 2023). Atualmente, estima-se que o número de espécies de EPF seja de cerca de 750 (Kaczmarek e Boguś, 2021). As espécies do filo Ascomycota, especialmente as pertencentes aos gêneros *Beauveria* (família Cordycipitaceae) e *Metarhizium* (família Clavicipitaceae), são de considerável importância econômica, juntamente com os gêneros *Cordyceps* (família Cordycipitaceae), *Paecilomyces* (família Trichocomaceae) e *Akanthomyces* (família Cordycipitaceae) (Taylor et al., 2020).

Os ascomicetos *B. bassiana* e *M. anisopliae* se destacam como os mais extensivamente estudados e amplamente utilizados no campo. Essas espécies, juntamente com várias outras, estão entre as mais bem caracterizadas nessa categoria. Notavelmente, mais de 12 espécies ou subespécies de fungos foram oficialmente registradas como bioinseticidas ou bioacaricidas (De Faria e Wraight, 2007; Grabka et al., 2022). Estudos moleculares sobre o modo de ação desses microrganismos estão em andamento usando mutantes e análises de transcriptoma (Islam et al., 2021).

2.2.1 *Metarhizium*

Os *Metarhizium* spp. são fungos entomopatogênicos conhecidos como fungos verdes da muscardina. O *Metarhizium anisopliae* foi relatado pela primeira vez em 1879 por Metschnikoff como *Entomophthora anisopliae*. Em 1883, o gênero foi revisado para

Metarhizium por Sorokin. A taxonomia foi revisada novamente em 1976 por Tulloch, distinguindo as espécies por micromorfologia. Em 1971, 204 espécies de insetos de 7 ordens diferentes haviam sido descritas como hospedeiras desse fungo (Hussein et al., 2010).

Metarhizium anisopliae é predominante em vários ambientes, incluindo a rizosfera de plantas, carcaças de artrópodes e solo, que é predominante em campos cultivados (Hussein et al., 2021). Entre todos os biopesticidas EPF pesquisados, o *M. anisopliae* se destaca como o mais extensivamente estudado, com suas propriedades inseticidas minuciosamente investigadas (Wang et al., 2016). Sua eficácia comprovada no controle de pragas elevou seu status como um biopesticida popular, compartilhando o reconhecimento com o biopesticida *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillales: Bacillaceae) (Liu et al., 2023).

As colônias de *M. anisopliae* crescem bem em meio Ágar Batata Dextrose (ABD). A colônia circular mostra inicialmente um crescimento micelial branco; no início do processo de multiplicação conidial, uma coloração verde-oliva pode ser observada na superfície micelial (Fig. 1) (Islam et al., 2021). Os conidióforos crescem irregularmente a partir do micélio com dois a três ramos em cada septo. Esses conidióforos têm de 4 a 14 microns de comprimento e de 1,5 a 2,5 microns de diâmetro. As fiálides são estruturas produzidas no micélio e são o local onde os conídios são liberados. No *M. anisopliae*, elas são finas no ápice, com 6 a 15 microns de comprimento e 2 a 5 microns de diâmetro. Os conídios são estruturas unicelulares, cilíndricas e truncadas, hialinas a esverdeadas. Os conídios têm de 4 a 10 microns de comprimento e de 2 a 4 microns de diâmetro (Islam et al., 2021).

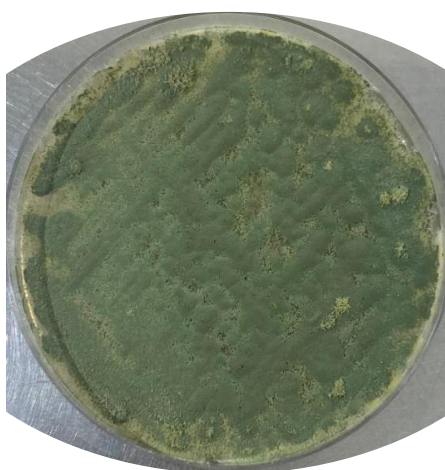


Fig. 1 Morfologia do *Metarhizium anisopliae* s.s. em Ágar Batata Dextrose.

Fonte: Autores

2.2.2 Mecanismo de infecção, *Metarhizium* spp.

Em comparação com as bactérias e os vírus, as infecções fúngicas não precisam ser consumidas, mas ocorrem ativamente por meio da fixação dos conídios na cutícula do hospedeiro (Fig. 2) (Smagghe et al., 2023). Para penetrar na cutícula do hospedeiro, o fungo libera lipases, proteases e quitinases que clivam seus componentes (lipídios, proteínas e quitina) para facilitar a penetração das hifas (Sierotzki et al., 2000).

Devido à alta especificidade das enzimas, a capacidade do fungo de produzir diferentes isoformas dessas hidrolases está ligada à especificidade do fungo e à sua capacidade de infectar artrópodes de diferentes ordens. Como diferentes ordens e até mesmo espécies de artrópodes têm diferentes composições de tegumento, a quantidade de diferentes isoformas produzidas está diretamente relacionada ao número de possíveis hospedeiros (Mondal et al. 2016). Para maior clareza, o curso da infecção é: (1) adesão, (2) germinação conidial, (3) desenvolvimento do apressório, (4) invasão da cutícula, (5) desenvolvimento de hifas em corpos hifais na hemolinfa, (6) colonização, (7) extrusão na superfície e (8) conidióforese e conidiogênese (Schrack e Vainstein, 2010).

O processo de infecção começa com a fixação de propágulos de fungos na superfície do artrópode. A adesão é crucial para o início da infecção, envolvendo interações hidrofóbicas entre proteínas de superfície no propágulo, como as hidrofobinas (Fang et al., 2007), e a camada lipídica que reveste a cutícula do artrópode. Pesquisas recentes associaram a degradação de lipídios ao crescimento da pré-penetração na cutícula do hospedeiro (Jarrold et al., 2007). A presença de lipídios na epicutícula, que atua como um obstáculo inicial para os entomopatógenos, destaca a importância das enzimas lipolíticas nas fases iniciais da infecção. Sugere-se que as lipases produzidas por *M. anisopliae* estejam envolvidas nesse processo, com lipases também relatadas na superfície dos conídios (Silva et al., 2005).

Depois de se prenderem à epicutícula, os conídios germinam e desenvolvem um tubo germinativo e, em seguida, forma-se um apressório (Figura 2) (Wang e St. Leger, 2007). É importante observar que o *M. anisopliae* pode iniciar o processo de penetração diretamente, ignorando a formação de um apressório (Valero-Jiménez et al., 2016). Tanto a formação do apressório quanto a penetração da cutícula são reguladas pela proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), que é codificada pelos genes *hog1* e *mpk1* (Jin et al., 2014; Zhang et al., 2009). Posteriormente, forma-se o pino de penetração, que é uma estrutura especializada para penetrar no tecido do hospedeiro (Fig. 2). Após o processo de adesão e penetração, o fungo se desenvolve dentro do hemocele em estruturas unicelulares chamadas corpos hifais. Após o esgotamento nutricional, ocorre o alongamento das hifas, seguido da extrusão do fungo e da

geração de conídios infecciosos que são dispersos no ambiente (Fig. 2). As hidrolases, em combinação com fatores já identificados na ruptura inicial do tegumento, permitem a extrusão hifal (Valero-Jiménez et al., 2016; Wang et al., 2019).

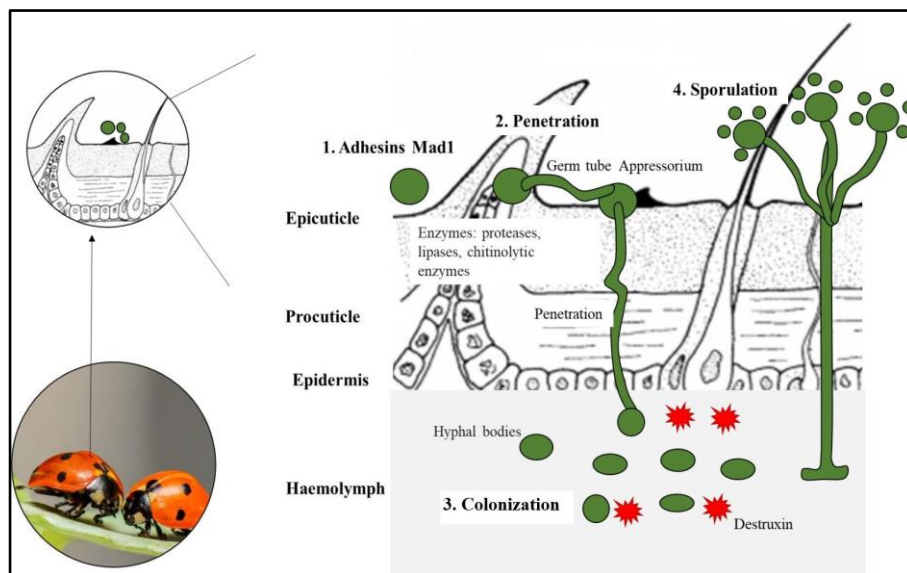


Fig. 2 Ciclo de vida de fungos entomopatogênicos em insetos. Fonte: Autores

2.2.3 Enzimas envolvidas no mecanismo de infecção de *Metarhizium* spp.

Os fungos entomopatogênicos produzem enzimas essenciais conhecidas como hidrolases (EC 3) que catalisam a hidrólise de ligações covalentes dentro das moléculas. Entre esse grupo de enzimas, que contribuem para o processo de infecção e a mortalidade do hospedeiro, destacam-se as lipases (triacilglicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1. 3), proteases (peptídeo-hidrolases, E.C. 3.4) e enzimas quitinolíticas (glicosil-hidrolase, E.C. 3.2.1.52; quitinase, E.C. 3.2.1.14) (Schränk e Vainstein, 2010; Mondal et al, 2016). A camada mais externa da cutícula de artrópodes, conhecida como epicutícula, consiste principalmente de lipídios, ácidos graxos, ésteres, hidrocarbonetos de cadeia longa e lipoproteínas. Portanto, as primeiras enzimas secretadas durante a degradação da cutícula são as lipases, seguidas pelas proteases. Em contrapartida, a camada mais interna, a procutícula, é composta por uma matriz de proteínas e quitina. A atividade das proteases expõe as fibras de quitina, levando à produção de enzimas quitinolíticas (St Leger et al., 1996; Schränk e Vainstein, 2010; Shimizu et al., 1993). As proteases são essenciais para o processo de penetração, pois a cutícula dos artrópodes pode ser composta por até 70% de proteínas (Charnley, 2003). As principais famílias de proteases incluem subtilisinas (Pr1), tripsinas (Pr2), cisteínas (Pr4), metaloproteases e exopeptidases. Entre elas, a Pr1 é a principal protease responsável pela patogenicidade do isolado (Hajek e St Leger, 1994; St Leger et al., 1987; Wang e St Leger, 2007).

Lipases

As lipases são enzimas que pertencem à categoria das serina hidrolases. Elas hidrolisam ligações de éster em lipoproteínas, ceras e gorduras presentes no tegumento (Ali et al., 2009). Essas enzimas apresentam atividade hidrolítica em mono, di e triglicerídeos, liberando ácidos graxos livres e glicerol. Além da hidrólise, certas lipases podem catalisar várias reações, como esterificação, acidólise, alcoólise e aminólise (Keyhani, 2018). As lipases desempenham um papel fundamental no metabolismo de lipídios, influenciando o armazenamento, a digestão, o processamento e o transporte de substratos lipídicos. Embora haja uma grande quantidade de literatura sobre as aplicações das lipases, as informações sobre sua função na EPF permanecem limitadas (Keyhani, 2018). Devido à importância dessas enzimas nos estágios iniciais do desenvolvimento fúngico, as lipases, como a lipase de superfície de esporos de *M. anisopliae* (MASSL), são encontradas na superfície dos conídios de *Metarhizium* (Santi et al., 2010; Silva et al., 2009). As lipases presentes nos conídios são cruciais para o sucesso da infecção, conforme demonstrado por Beys-da-Silva et al. (2010). Os resultados do estudo sugerem que os conídios tratados com um inibidor de lipase (ebelactona B) não conseguiram infectar os carrapatos *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. Isso destaca a função crítica das lipases no processo de penetração inicial e a virulência geral do fungo.

Fosfolipases

As fosfolipases atuam hidrolisando ligações éster em glicerofosfolipídios. Elas são enzimas importantes no processo inicial de infecção e são classificadas em quatro categorias (A, B, C e D) com base na especificidade da ligação de éster. As fosfolipases A1 (EC. 3.1.1.32) e A2 (E.C.3.1.1.4) (PLA1 e PLA2) estão envolvidas na clivagem de ligações éster de ácidos graxos nas posições sn-1 e sn-2 do glicerol, respectivamente. A fosfolipase C (E.C.3.1.4.3) (PLC) tem como alvo a ligação fosfodiéster na molécula de fosfolipídio. Sua presença na superfície dos conídios de *M. anisopliae* sugere sua importância nos estágios iniciais da infecção (Santi et al., 2010). No entanto, as pesquisas sobre a função das fosfolipases na EPF permanecem limitadas (Keyhani, 2018). As enzimas específicas do citocromo P450 (CYPs) facilitam a assimilação de hidrocarbonetos, como os alcanos encontrados na epicutícula. Embora a maioria dos estudos sobre o papel das CYPs na virulência de fungos entomopatogênicos tenha se concentrado em isolados de *B. bassiana*, as investigações com isolados de *Metarhizium* são relativamente escassas (Pedrini et al., 2013; Keyhani, 2018). Embora a importância das lipases no processo de infecção do EPF esteja bem estabelecida, são

necessárias mais pesquisas para compreender totalmente sua ação e produção (Beys-da-Silva et al., 2010; Keyhani, 2018).

Proteases

Pr1 consiste em um grupo de subtilisinas, compreendendo 11 isoformas (Pr1A-K), cada uma desempenhando funções diferentes e significativas no processo de infecção. A Pr1A é a principal isoforma e está diretamente associada à virulência do isolado (Rosas-García et al., 2018; Butt et al., 2016). A Pr1 apresenta uma ampla especificidade para aminoácidos que possuem uma cadeia lateral hidrofóbica no segundo átomo de carbono. Ele também tem especificidade secundária para cadeias peptídicas hidrofóbicas alongadas. Seu sítio ativo pode reconhecer pelo menos cinco resíduos secundários (Rosas-García et al., 2018; Vega e Kaya, 2012).

Bidochka e Melzer (2000) demonstraram que os genes Pr1 do *M. anisopliae* formam uma família de vários genes e propuseram que esses genes podem ser originários de um ancestral comum. Eles sugeriram que esses genes podem ter sido herdados de um ancestral comum da subtilisina. O padrão RFLP para Pr1A é mais complexo do que o de Pr1B ou Pr1C (Bidochka e Melzer, 2000). Portanto, o Pr1A pode ser o gene ancestral que foi duplicado. Outros estudos filogenéticos confirmaram a validade dessas subdivisões e sugerem que a duplicação de genes precedeu a especiação das principais linhagens de fungos ao comparar as subtilisinas de *Metarhizium* com diferentes organismos (Bagga et al., 2004; Freimoser et al., 2003).

A Pr2 é uma protease do tipo tripsina que existe como quatro isoenzimas (ca. pI 4-4,9), mostrando baixa especificidade para cutícula de inseto, mas alta especificidade para caseína e proteínas cuticulares solubilizadas. A Pr2 apresenta alta especificidade para arginina e lisina, semelhante à tripsina bovina, e é sensível a inibidores de tripsina, inclusive clorocetona tosil-metionina, leupeptina e inibidor de tripsina de soja. As principais isoformas (pI 4,4 e 4,9) compartilham semelhanças com outros terminais N de tripsina (Cole et al., 1993).

A ação da Pr1 na cutícula resulta na liberação de peptídeos com uma média de cinco resíduos de aminoácidos. A maioria desses peptídeos sofre degradação por peptidases para o metabolismo fúngico. Duas classes de aminopeptidases foram identificadas no *M. anisopliae*. A aminopeptidase M (pH ideal 7-8, 33 kDa) apresenta ampla especificidade, principalmente ativa contra resíduos de alanina. A dipeptidil aminopeptidase IV pós-prolina (pH ideal 8, 74 kDa) remove os grupos X-prolil dos polipeptídeos. Ela apresenta maior atividade contra

resíduos apolares (Cole et al., 1993; Hajek e St Leger, 1994; St Leger, 2011; Wang e St Leger, 2007).

Hajek e St. Leger (1994) purificaram uma serina carboxipeptidase que é secretada durante o crescimento na cutícula de insetos. A enzima tem uma ampla especificidade para aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas e é principalmente ativa contra resíduos aromáticos. A serina carboxipeptidase complementa a Pr1 hidrolisando os peptídeos da cutícula nos resíduos C-terminais, enquanto a Pr1 hidrolisa os resíduos N-terminais (Charnley, 2003; Freimoser et al., 2003; Guo et al., 2017; St Leger et al., 1996).

Quitinases

As enzimas quitinolíticas são classificadas como quitinases ou N-acetilglucosaminidases, dependendo do tipo de ligação ou substrato que têm como alvo (Schränk e Vainstein, 2010). Essas enzimas funcionam de forma sinérgica e sequencial.

As quitinases são divididas em duas classes principais: endoquitinases, que clivam o polímero de quitina em vários pontos ao longo da fibra, e exoquitinases, que clivam a extremidade não redutora do polímero, liberando dímeros de N-acetilglucosamina (GlcNAc) (Mondal et al. 2016; Schränk e Vainstein, 2010).

Essas enzimas também podem promover a hidrólise da extremidade não redutora do polímero, atuando em uma variedade de produtos e na própria quitina. (Fig. 3). As N-acetilglucosaminidases [EC3.2.1.52, família 20 de glicosil hidrolases (GH)] podem degradar completamente a quitina em monômeros de N-acetilglucosamina (Kaczmarek et al., 2019; Mondal et al., 2016). Elas catalisam a liberação de monômeros de GlcNAc dos dímeros de GlcNAc ou da extremidade terminal não redutora dos multímeros de GlcNAc (Kaczmarek et al., 2019; Mondal et al., 2016).

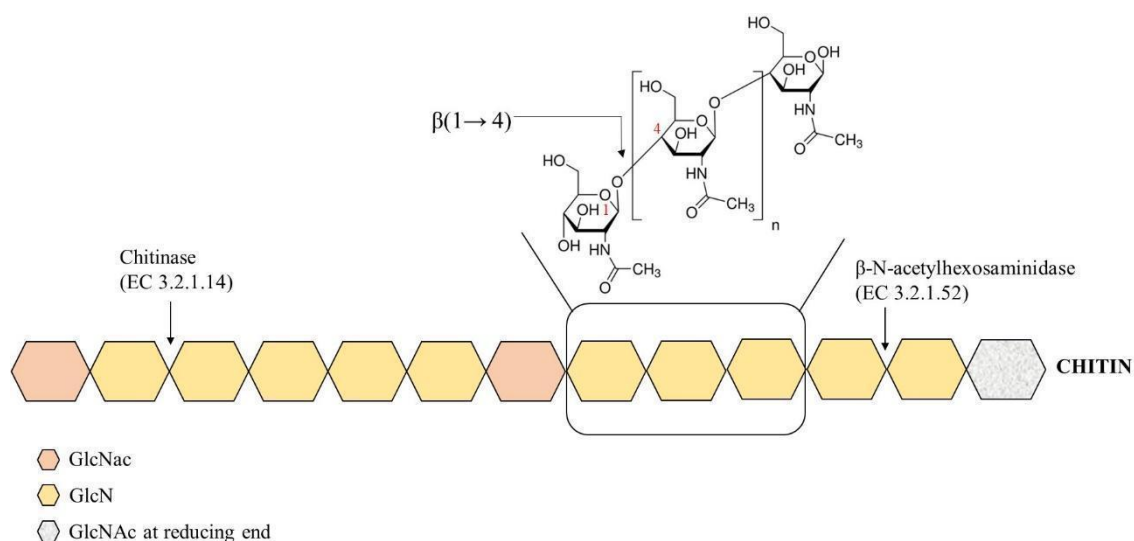


Fig. 3. Mecanismos de ação das enzimas quitinolíticas. GlcNAc (N-acetilglicosamina), GlcN (Glucosamina). Fonte: Autores

As enzimas quitinolíticas são divididas nas famílias GH18 e GH19. Dentro da GH18, as quitinases são classificadas em subgrupos distintos: Subgrupo A (anteriormente conhecido como classe V): Compreende as quitinases que possuem um domínio catalítico, mas não possuem um domínio de ligação a carboidratos (CBM). Essas quitinases normalmente têm de 40 kDa a 50 kDa. A maioria tem um peptídeo sinalizador N-terminal e é direcionada para a via secretora, embora haja exceções em que algumas são intracelulares.

Subgrupo B (anteriormente conhecido como classe III): Englobando quitinases com um peptídeo sinal N-terminal, essas enzimas têm de 30 a 90 kDa (Ferreira e de Freitas Soares 2023; Schrank e Vainstein 2010). As quitinases menores desse subgrupo são caracterizadas por um domínio de ligação à celulose que amplia seu espectro de ligação a polissacarídeos para incluir a quitina (Ferreira e de Freitas Soares 2023; Schrank e Vainstein, 2010). Por outro lado, as quitinases maiores desse subgrupo geralmente possuem domínios ricos em serina/treonina e/ou um sinal de ancoragem GPI, permitindo que as proteínas maduras se liguem à membrana plasmática. Subgrupo C: Composto por enzimas que variam de 140 kDa a 70 kDa, essas enzimas possuem um peptídeo sinalizador N-terminal juntamente com características distintas, como regiões de ligação ao peptidoglicano (Ferreira e de Freitas Soares, 2023; Schrank e Vainstein, 2010).

Foram identificados três genes que codificam diferentes quitinases: chit1 (42 kDa endoquitinase) (Baratto et al., 2011), chi2 (42 kDa endoquitinase) (Baratto et al., 2011; Boldo et al., 2009) e chi3 (30 kDa exo/endoquitinase ativa) (Da Silva et al., 2005).

O gene chit1 foi amplamente caracterizado e tem uma ORF (Quadro de leitura aberto-uma região do DNA que pode ser transcrita e traduzida em uma proteína funcional) de 1521 pb que codifica uma pré-proteína de 423 aminoácidos, com uma sequência semelhante a um peptídeo de sinal que abrange 35 resíduos de aminoácidos. A expressão do gene chi2 é regulada positivamente pela presença de quitina ou do monômero de quitina GlcNAc na cutícula do artrópode (Baratto et al., 2011). Boldo et al., (2009) avaliaram a superexpressão da quitinase chi2 e observaram uma redução no tempo necessário para causar a morte do hospedeiro, enquanto a eliminação do gene diminuiu a virulência, sugerindo um papel significativo para a quitinase chi2 no processo de infecção e virulência do fungo isolado (Boldo et al., 2009). A caracterização de todo o sistema quitinolítico em nível genético é fundamental para compreender a função de cada enzima no metabolismo e na patogenicidade dos fungos (Schrank e Vainstein, 2010).

Trealase

Uma enzima aldolase que cliva a trealose, um dissacarídeo composto por duas moléculas de glicose. Essa enzima é expressa em humanos, animais, fungos e plantas. Os fungos entomopatogênicos, como o *Metarhizium*, liberam quantidades significativas de trealase ácida na hemolinfa do hospedeiro (Zhao et al. 2006).

Como a trealose é o principal açúcar da hemolinfa, a produção dessa enzima sugere uma vantagem adaptativa para a fase parasitária. Ao usar a trealose como fonte de nutrientes, o fungo reduz simultaneamente sua disponibilidade para a nutrição do hospedeiro. Zhao et al. (2006) demonstraram que o gene ntl-1 da trealase do *Metarhizium* é regulado positivamente durante o processo de infecção.

3. Produção de enzimas e toxinas pelo *Metarhizium*

Os fungos microscópicos pertencentes à categoria do Filo: Ascomycota produzem um repertório diversificado de toxinas, conhecidas como micotoxinas, que ameaçam o bem-estar dos insetos. Essas micotoxinas exibem diferentes mecanismos em diferentes tecidos. As citotoxinas, por exemplo, rompem as células internas do inseto, facilitando a infiltração de hifas de fungos (Silva et al., 2005).

Por outro lado, as toxinas neuromusculares perturbam o sistema nervoso do inseto, causando paralisia, redução da irritabilidade e letargia. Enquanto isso, o *M. anisopliae* produz destruxinas e citocalasinas quando infecta um inseto. As destruxinas interrompem o fluxo de cálcio nas células musculares da borboleta, levando à paralisia, e também afetam as células sanguíneas do inseto (Silva et al., 2005).

3.1 Enzimas

Os produtos à base de *Metarhizium* são atualmente empregados em todo o mundo, com um sucesso notável sendo o tratamento de dois milhões de hectares de cana-de-açúcar no Brasil anualmente usando *M. anisopliae* para gerenciar cigarrinhas. (Iwanick et al., 2019; St. Leger et al., 2020).

Entre os estudos, Grewal et al. (2021); Gebremariam et al. (2022); Velavan et al. (2022) e Golzan et al. (2023) fizeram uma correlação entre a produção de enzimas e a virulência de diferentes isolados de *Metarhizium*. Seus resultados mostraram que alguns isolados eram virulentos contra os hospedeiros testados e tinham atividade significativa de proteases totais, quitinases e lipases. Entretanto, outros isolados também apresentaram alta atividade enzimática, mas não foram tão virulentos contra o mesmo inseto. Isso enfatiza a importância de estudar a especificidade de cada isolado fúngico no desenvolvimento de um biopesticida, pois as isoformas da enzima devem ser específicas para o artrópode-alvo.

Estudos que avaliaram o efeito direto da aplicação de enzimas de *Metarhizium* em artrópodes demonstraram que sua aplicação isolada é capaz de afetar insetos em vários estágios, afetando o desenvolvimento, a metamorfose e até mesmo causando a morte do artrópode (Wu et al., 2010; Keppanam et al., 2017). Essa informação é apoiada por Wu et al. (2010), que examinaram a ação das quitinases de *M. anisopliae* em larvas de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). Os resultados mostraram que o tratamento com quitinase reduziu a porcentagem de pupação e aumentou a mortalidade de larvas e pupas.

As enzimas podem ser usadas em formas purificadas, parcialmente purificadas ou não purificadas, reduzindo assim os custos de produção. Além disso, elas podem ser usadas sozinhas ou em combinação com outras enzimas, conforme explorado por Wu et al. (2010) usando quitinase purificada, Keppanam et al. (2017) usando proteases parcialmente purificadas e Alves et al. (2020) usando exocelulase, endoglucanase, quitinase e β -1,3-glucanase de *B. bassiana* (Ferreira e De Freitas Soares, 2023). A eficácia das enzimas como inseticidas é notável. Por exemplo, Keppanam et al. (2017) demonstraram que as larvas de *Galleria mellonella* apresentaram taxas de mortalidade acima de 80% em cinco dias após o consumo de uma dieta

tratada com enzimas de *M. anisopliae*. Essa observação é corroborada por Ortiz-Urquiza et al. (2009), que usaram enzimas parcialmente purificadas de *M. anisopliae* para tratar adultos de *Drosophila melanogaster* (Diptera: Brachycera). Após três dias de exposição contínua a uma dieta suplementada com enzimas, a taxa de mortalidade ultrapassou 70%.

Ortiz-Urquiza et al. (2009) sugerem que as larvas continuamente expostas a proteínas produzidas pela EPF sofrem danos no epitélio intestinal. Esse dano é provavelmente induzido por enzimas hidrolíticas capazes de degradar a proteína. Essa descoberta indica que as enzimas geradas por fungos entomopatogênicos podem servir como biopesticidas alternativos às toxinas Bt. As enzimas também oferecem a possibilidade de aumentar a eficácia dos biopesticidas. Supakdamrongkul et al. (2010) observaram que a aplicação de lipases purificadas em conjunto com esporos de *M. rileyi* não apenas facilitou a germinação de conídios, mas também aumentou a mortalidade de *S. litura* em 2,7 vezes em comparação com o tratamento apenas com conídios (Supakdamrongkul et al., 2010; Vidhate et al., 2023). Em uma pesquisa separada realizada por Beys-da-Silva et al. (2010), foi avaliada a eficácia do *M. anisopliae* contra o *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus. Os carrapatos foram totalmente imersos na solução e, durante um período de 30 minutos, a atividade enzimática (lipase) foi monitorada. Os resultados verificaram uma taxa de mortalidade de 50% e uma atividade lipídica de aproximadamente 0,3 U, demonstrando a eficácia da enzima lipase como agente de controle bioquímico.

Grewal et al. (2021) realizaram uma pesquisa para avaliar a correlação entre a atividade enzimática (protease, quitinase e lipase) e o uso de conídios produzidos por *M. rileyi* em *S. litura* (Lepidoptera: Noctuidae). Os resultados mostraram uma eficácia de 63,33%, indicando uma relação entre a atividade enzimática e a mortalidade de insetos. As informações obtidas enfatizam ainda mais a importância das enzimas no processo de infectar e matar os hospedeiros. No entanto, as espécies de *Metarhizium* têm uma vantagem em sua capacidade de formar associações com as raízes das plantas no solo. Isso permite que elas se adaptem aos habitats ecológicos em vez de depender apenas dos hospedeiros de insetos disponíveis. Sua ampla adaptação ecológica sugere que elas podem induzir a virulência em uma gama diversificada de insetos, maximizando a proteção das plantas e fornecendo nutrientes essenciais, como o nitrogênio, para seu crescimento. Essas alternativas estão intimamente relacionadas aos processos bioquímicos do fungo e aos seus mecanismos de infecção contra os hospedeiros. Isso amplia o potencial de avanços tecnológicos, como seu uso no controle de pragas (Islam et al., 2021; Sharma et al., 2020).

3.2 Toxinas

Isoladas pela primeira vez do *M. anisopliae* em 1961, as destruxinas (DTX) são toxinas cíclicas compostas por um ácido D- α -hidroxílico ligado a cinco aminoácidos. (Kodaira, 1961). Mais de 28 destruxinas foram identificadas, principalmente de espécies de *Metarhizium*, exibindo níveis variados de atividade (Peng et al., 2005). A quantidade de DTX presente está correlacionada com a virulência e a especificidade do hospedeiro. Estudos que investigam os efeitos da atividade da DTX sugerem que ela afeta o sistema imunológico celular do inseto, incluindo a prevenção da formação de nódulos (Peng et al., 2005) e a interferência na fagocitose. A produção de DTX ocorre na hemolinfa após o desenvolvimento do fungo, onde suas propriedades imunossupressoras foram observadas (Odier et al. 1992). Além disso, Dumas et al. (1996) observaram que a DTX desencadeia a ativação do músculo do inseto. No entanto, o mecanismo completo ainda não está claro. Pesquisas recentes sugerem que a principal função da DTX é ajudar o patógeno a se estabelecer nos tecidos do hospedeiro por meio da modulação dos canais iônicos (Chen et al., 2014; Islam et al., 2021).

4. Conclusões

Em um esforço para diminuir o impacto sobre o meio ambiente, a bioacumulação de produtos químicos sintéticos e o surgimento de resistência dos indivíduos, novas abordagens para o controle de pragas têm sido investigadas. Nesse contexto, uma das estratégias mais promissoras é o uso de enzimas extracelulares de fungos entomopatogênicos - produzidas por processos de fermentação e purificação. As enzimas produzidas por fungos entomopatogênicos têm uma ampla gama de efeitos sobre os artrópodes. Elas podem degradar a cutícula do inseto, inibir seus processos metabólicos e fisiológicos e até mesmo causar sua morte. Isso os torna ferramentas importantes para o controle de pragas, pois podem ser usados como inseticidas. Os fungos entomopatogênicos do gênero *Metarhizium*, em particular, já são produzidos em larga escala para o controle de pragas no campo. Seu poderoso arsenal enzimático é uma arma fundamental no ataque e na penetração do hospedeiro.

A enorme diversidade dessas enzimas oferece um meio de produzir extratos enzimáticos que são benéficos para uma série de setores, incluindo os campos alimentício, farmacêutico e médico. O uso de enzimas fúngicas entomopatogênicas é uma tecnologia verde que visa à produção de bioprodutos livres de componentes nocivos ao meio ambiente e a organismos não visados. Este capítulo oferece uma visão geral da bioquímica dos fungos entomopatogênicos do gênero *Metarhizium*. Esse conhecimento fornece uma base fundamental para a geração de novas abordagens para uso no manejo integrado de pragas. O compromisso de investir em

alternativas inovadoras de controle biológico não apenas avança o conhecimento científico, mas também contribui para um mundo mais sustentável.

5. Referências

- Ali, S., Huang, Z. and Ren, S.X. (2009). Production and extraction of extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Isaria fumosoroseus* (Cordycipitaceae; Hypocreales). *Biocontrol. Sci. Technol.*, 19:81-89. 10.1080/09583150802588524.
- Alves, E.A., Schmaltz, S., Tres, M.V., Zabet, G.L., Kuhn, R.C. et al. (2020). Process development to obtain a cocktail containing cell-wall degrading enzymes with insecticidal activity from *Beauveria bassiana*. *Biochem. Eng. J.*, 156: 107484. 10.1016/j.bej.2019.107484.
- Bagga, S., Hu, G., Screen, S.E. and St Lege, R.J. (2004). Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene*, 324:159–169. 10.1016/j.gene.2003.09.031.
- Baratto, C.M., Da Silva, M.V., Santi, L., Passaglia, L., Schrank, I.S. et al. (2011). Expression and characterization of the 42 kDa chitinase of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* in *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* 49: 723–726. 10.1139/W03-085.
- Beys-da-Silva, W.O., Rosa, R.L., Berger, M., Coutinho-Rodrigues, C.J.B., Vainstein, M.H. et al. (2020). Updating the application of *Metarhizium anisopliae* to control cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Exp. Parasitol.* 208:107812. 10.1016/j.exppara.2019.107812.
- Beys-da-Silva, W.O., Santi, L., Schrank, A. and Vainstein, M.H. (2010). *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infection. *Fungal. Biol.*, 114:10-15. 10.1016/j.mycres.2009.08.003.
- Bidochka, M.J. and Melzer, M.J. (2000). Genetic polymorphisms in three subtilisin-like protease isoforms (Pr1A, Pr1B, and Pr1C) from *Metarhizium* strains. *Can. J. Microbiol.*, 46:1138–1144. 10.1139/w00-112.
- Boldo, J.T., Junges, A., Do, Amaral, K.B., Staats, C.C., Vainstein, M.H. et al. (2009). Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. *Curr. Genet.* 55:551–560. 10.1007/s00294-009-0267-5.
- Butt, T.M., Coates, C.J., Dubovskiy, I.M. and Ratcliffe, N.A. (2016). Entomopathogenic Fungi: New Insights into Host–Pathogen Interactions. In: Lovett B, St. Leger RJ (eds) *Advances in Genetics*. Academic Press, p. 307–364.

- Carlini, C.R. and Grossi-De-Sá, M.F. (2002). Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 40:1515–1539. 10.1016/S0041-0101(02)00240-4.
- Charnley, A.K. (2003). Fungal pathogens of insects: Cuticle degrading enzymes and toxins. In: *Advances in Botanical Research*, Academic Press, p. 241–321. 10.1016/S0065-2296(05)40006-3.
- Chen, X.R., Hu, Q.B., Yu, X.Q. and Ren, S.X. (2014). Effects of destruxins on free calcium and hydrogen ions in insect hemocytes. *Insect. Sci.* 21:31–38. 10.1111/1744-7917.12028.
- Cherry, A.J., Jenkins, N.E., Hevief, G., Bateman, R. and Lomer, C.J. (1999). Operational and Economic Analysis of a West African Pilotscale Production Plant for Aerial Conidia of *Metarhizium* spp. for Use as a Mycoinsecticide Against Locusts and Grasshoppers. *Biocontrol. Sci. Technol.*, 9:35–51. 10.1080/09583159929893.
- Cole, S.C., Charnley, A.K. and Cooper, R.M. (1993). Purification and partial characterisation of a novel trypsin-like cysteine protease from *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol Lett.*, 113:189–195. 10.1111/j.1574-6968.1993.tb06512.x.
- Da Silva, M.V., Santi, L., Staats, C.C., Da Costa, A.M., Colodel, E.M. et al. (2005). Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. *Res Microbiol.*, 156: 382–392. 10.1016/j.resmic.2004.10.013
- De Faria, M.R. and Wraight, S.P. (2007). Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol Control.*, 43:237–256. 10.1016/j.biocontrol.2007.08.001.
- De Freitas Soares, F.E., Fernandes, E.K.K. and Gôlo, P.S. (2020). Nematophagous and entomopathogenic fungi: new insights into the beneficial fungus-plant interaction. In *Molecular aspects of plant beneficial microbes in agriculture*, pp 295–304. 10.1016/B978-0-12-818469-1.00024-9
- Dumas, C., Matha, V., Quiot, J.M. and Vey, A. (1996). Effects of destruxins, cyclic depsipeptide mycotoxins, on calcium balance and phosphorylation of intracellular proteins in lepidopteran cell lines. *Comp Biochem Physiol Part C Pharmacol Toxicol Endocrinol.*, 114:213–219. 10.1016/0742-8413(96)00041-2.
- Eilenberg, J., Hajek, A. and Lomer, C. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl.*, 46:387–400. 10.1023/A:1014193329979.
- Fang, J., Hogan, G.J., Liang, G., Lieb, J.D. and Zhang, Y. (2007). The *Saccharomyces cerevisiae* Histone Demethylase Jhd1 Fine-Tunes the Distribution of H3K36me2. *Mol Cell Biol.*, 27:5055–5065. <https://doi.org/10.1128/mcb.00127-07>.

- FAO and WHO.(2019). Pesticide residues in food - Extra Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues.
- Ferreira, J.M., De Freitas Soares, F.E. (2023). Entomopathogenic fungi hydrolytic enzymes: A new approach to biocontrol?. J Natu Pesticide Res., 3:100020. 10.1016/j.napere.2023.100020.
- Freimoser ,F.M., Screen, S., Bagga, S., Hu, G and St Leger, R.J. (2003). Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. Microbiology., 149: 239–247. 10.1099/MIC.0.25761-0.
- Gebremariam, A., Chekol, Y.and Assefa, F. (2022). Extracellular enzyme activity of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and their pathogenicity potential as a bio-control agent against whitefly pests, *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). BMC Res Notes 15:117. 10.1186/s13104-022-06004-4.
- Golzan, S.R., Talaei-Hassanloui, R., Homayoonzadeh, M. and Safavi, S.A. (2023). Role of cuticle-degrading enzymes of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in virulence on *Plodia interpunctella* (Lepidoptera, Pyralidae) larvae. J Asia Pac Entomol., 26:102038. 10.1016/j.aspen.2023.102038.
- Grewal, G.K., Joshi, N.and Suneja, Y. (2021). Pathogenicity of *Metarhizium rileyi* (Farlow) Kepler, S.A. Rehner and Humber isolates against *Spodoptera litura* (Fabricius) and their extracellular enzymatic activities. Egypt J Biol Pest Control., 31:1–7. 1186/s41938-021-00407-4
- Guo, N., Qian, Y., Zhang, Q., Chen, X., Zeng, G. et al. (2017). Alternative transcription start site selection in Mr-OPY2 controls lifestyle transitions in the fungus *Metarhizium robertsii*. Nat Commun., 8:1565. 10.1038/s41467-017-01756-1.
- Hajek, A.E. and St. Leger, R.J. (1994). Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Annu Rev Entomol., 39:293–322.10.1146/s39.010194.001453.
- He, D.C., He, M.H., Amalin, D.M., Liu, W., Alvindia, D.G. et al. (2021). Biological control of plant diseases: An evolutionary and eco-economic consideration. Pathogens., 10: 1311. 10.3390/pathogens10101311.
- Hussein, K.A., Abdel-Rahman, M.A., Abdel-Mallek, A.Y., El-Maraghy, S.S., Joo, J.H. (2010). Climatic factors interference with the occurrence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in cultivated soil. Afr J Biotechnol., 9:7674–7682.10.5897/ajb10.1112

- Islam, W., Adnan, M., Shabbir, A., Naveed, H., Abubakar, Y.S. et al. (2021). Insect-fungal interactions: A detailed review on entomopathogenic fungi pathogenicity to combat insect pests. *Microb Pathog.*, 159:105122. 10.1016/j.micpath.2021.105122.
- Iwanicki, N.S., Pereira, A.A., Botelho, A.B.R.Z., Rezende, J.M., Moral, R.D.A. et al. (2019). Monitoring of the field application of *Metarhizium anisopliae* in Brazil revealed high molecular diversity of *Metarhizium* spp in insects, soil and sugarcane roots. *Sci Rep.*, 9:4443. 10.1038/s41598-019-38594-8.
- Jarrold, S.L., Moore, D., Potter, U. and Charnley, A.K. (2007). The contribution of surface waxes to pre-penetration growth of an entomopathogenic fungus on host cuticle. *Mycol Res.*, 111:240–249. 10.1016/J.mycres.2006.10.007.
- Jin, K., Han, L. and Xia, Y. (2014). MaMk1, a FUS3/KSS1-type mitogen-activated protein kinase gene, is required for appressorium formation, and insect cuticle penetration of the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum*. *J Invertebr Pathol.*, 115:68–75. 10.1016/j.jip.2013.10.014.
- Kaczmarek, A. and Boguś, M. (2021). The metabolism and role of free fatty acids in key physiological processes in insects of medical, veterinary and forensic importance. *PeerJ* 9, 10.7717/peerj.12563.
- Kaczmarek, M.B., Struszczyk-Swita, K., Li, X., Szczęśna-Antczak, M. and Daroch, M. (2019). Enzymatic Modifications of Chitin, Chitosan, and Chitooligosaccharides. *Front Bioeng Biotechnol* 7:243. 10.3389/fbioe.2019.00243.
- Keppanan, R., Sivaperumal, S., Chadra Kanta, D., Akutse, K.S. and Wang, L. (2017). Molecular docking of protease from *Metarhizium anisopliae* and their toxic effect against model insect *Galleria mellonella*. *Pestic Biochem Physiol* 138:8–14. 10.1016/J.pestbp.2017.01.013.
- Keyhani, N.O. (2018). Lipid biology in fungal stress and virulence: Entomopathogenic fungi. *Fungal Biol.*, 122:420–429. 10.1016/j.funbio.2017.07.003.
- Kodaira, Y. (1961). Toxic Substances to Insects, Produced by *Aspergillus ochraceus* and *Oospra destructor*. *Agric Biol Chem.*, 25:261–262. 10.1080/00021369.1961.10857803.
- Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.I., Frutos, R., Brownbridge, M. et al. (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *J Invertebr Pathol.*, 132:1–41. 10.1016/j.jip.2015.07.009.
- Liu, D., Smagghe, G. and Liu, T.X. (2023). Interactions between Entomopathogenic Fungi and Insects and Prospects with Glycans. *J Fungi.*, 9:575. 10.3390/jof9050575.

- Mascarin, G.M., Jackson, M.A., Kabori, N.N., Behle, R.W. and Júnior, Í.D. (2015). Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. *J Invertebr Pathol.*,127:11–20. 10.1016/j.jip.2014.12.001.
- Mascarin, G.M., Lopes, R.B., Delalibera, J.R.Í., Fernandes, É.K.K., Luz, C. et al. (2019). Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *J Invertebr Pathol.*, 165:46–53. 10.1016/j.jip.2018.01.00
- Méndez-González, F., Castillo-Minjarez, J.M., Loera, O. and Favela-Torres, E. (2022). Current developments in the resistance, quality, and production of entomopathogenic fungi. *World J Microbiol Biotechnol.*, 38:115. 10.1007/s11274-022-03301-9.
- Méndez-González, F., Loera-Corral, O., Saucedo-Castañeda, G. and Favela-Torres, E. (2018). Bioreactors for the Production of Biological Control Agents Produced by Solid-State Fermentation. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Current Advances in Solid-State Fermentation.*, 109–121. 10.1016/B978-0-444-63990-5.00007-4.
- Messelink, G.J. (2014). Persistent and emerging pests in greenhouse crops: Is there a need for new natural enemies? *IOBC/WPRS Bull.*, 102:143-150. <https://www.researchgate.net/publication/268807593>.
- Mondal, S., Baksi, S., Koris, A. and Vatai, G. (2016). Journey of enzymes in entomopathogenic fungi. *Pac. Sci. Rev: A Natural Sci and Eng.*, 18: 85-10.1016/j.psra.2016.10.001.
- Muñiz-Paredes, F., Miranda-Hernández, F. and Loera, O. (2017). Production of conidia by entomopathogenic fungi: from inoculants to final quality tests. *World J Microbiol Biotechnol.*, 33: 1-9.10.1007/s11274-017-2229-2.
- Odier, F., Vey, A. and Bureau, J.P. (1992). In vitro effect of fungal cyclodepsipeptides on leukemic cells: study of destruxins A, B and E. *Biol Cell.*, 74:267-271.1016/0248-4900(92)90037-2.
- Oerke, E.C. and Dehne, H.W. (2004). Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. *J Crop Prot.*, 23:275-285. 10.1016/j.cropro.2003.10.001.
- Ortiz-Urquiza, A., Garrido-Jurado, I., Santiago-Álvarez, C. and Quesada-Moraga, E. (2009). Purification and characterisation of proteins secreted by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with insecticidal activity against adults of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Pest Manag., Sci* 65: 1130-1139. 10.1002/ps.1803.
- Pedrini, N., Ortiz-Urquiza, A., Zhang, S. and Keyhani, N.O. (2013). Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: Hydrocarbon

- oxidation within the context of a host-pathogen interaction. *Front Microbiol.*, 4:42518. 10.3389/fmicb.2013.00024.
- Peng, K.C., Huang, H.S., Tzeng, Y.M. and Liu, S.Y. (2005). Circular dichroism analysis of destruxins from *Metarhizium anisopliae*. *J Biochem Biophys Methods.*, 62:41–50. 10.1016/j.jbbm.2004.08.001
- Postali, Parra. J. R .and Coelho, A. (2019). Applied biological control in Brazil: from laboratory assays to field application. *J Insect Science.*, 19:5. 10.1093/jisesa/iey112
- Rosas-García, N.M., López-Barrera, G.L., Mireles-Martínez, M. and Villegas-Mendoza, J.M. (2018). Activación de las Isoformas del Gen pr1 de *Metarhizium anisopliae*1 Durante la Patogénesis en *Diaphorina citri*2. *SW Entomol.*, 43:199-207. 10.3958/059.043.0112.
- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S.J., Esker, P., McRoberts, N. et al. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nat Ecol Evol.*, 3: 430–439. 10.1038/s41559-018-0793-y.
- Schrank, A. and Vainstein, M.H. (2010). *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon* 56: 1267–1274. 10.1016/j.toxicon.2010.03.008.
- Sentis, A., Hemptinne, J.L., Magro, A. and Outreman, Y. (2022). Biological control needs evolutionary perspectives of ecological interactions. *Evol Appl.*, 15:1537–1554. 10.1111/eva.13457.
- Shimizu, K., Santocanale, C., Ropp, P.A., Longhese, M.P., Plevani, P. et al. (1993). Purification and characterization of a new DNA polymerase from budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*: A probable homolog of mammalian DNA polymerase β . *J Biol Chem.*, 268: 27148–27153. 10.1016/s0021-9258(19)74229-x.
- Sierotzki, H., Camastral, F., Shah, P.A., Aebi, M. and Tuor, U. (2000). Biological characteristics of selected *erynia neoaphidis* isolates. *Mycol Res.*, 104: 213–219. 10.1017/S0953756299001392.
- Silva, W.O.B., Mitidieri, S., Schrank, A. and Vainstein, M.H. (2005). Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochem.*, 40:321–326. 10.1016/j.procbio.2004.01.005.
- Singh, H. and Kaur, T. (2020). Pathogenicity of entomopathogenic fungi against the aphid and the whitefly species on crops grown under greenhouse conditions in India. *Egypt J Biol Pest Control.*, 30: 1–9. 10.1186/S41938-020-00287-0.
- Smagghe, F., Spooner-Hart, R., Chen, Z-H. and Donovan-Mak, M. (2023). Biological control of arthropod pests in protected cropping by employing entomopathogens: Efficiency, production and safety. *Biol Control.*, 186: 1049–9644. 10.1016/j.biocontrol.2023.105337.

- St Leger, R.J. and Jonathan, B. (2020). *Metarhizium*: Jack of all trades, master of many. *Open biology.*, 10: 200307. 10.1098/rsob.200307.
- St Leger, R.J. (1993). Biology and mechanisms of insect cuticle invasion by deuteromycete fungal pathogens. In Beckage NE, Thompson SN, Federici BA (Eds) *Parasites and Pathogens of Insects.*, pp 211–229. 10.0/font/bootstrap-icons.css
- St Leger, R.J. (1995). The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Canad J Bot.*, 73(S1):1119-1125. 10.1139/b95-367
- St Leger, R.J., Cooper, R. M. and Charnley, A.K. (1987). Production of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. *J Gen Microbiol.*, 133: 1371–1382. 10.1099/00221287-133-5-1371.
- St Leger, R.J., Joshi, L., Bidochka, M.J., Rizzo, N.W. and Roberts, D.W. (1996). Characterization and Ultrastructural Localization of Chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during Fungal Invasion of Host (*Manduca sexta*) Cuticle. *Appl Environ Microbiol.*, 62: 907–912. 10.1128/aem.62.3.907-912.1996.
- Supakdamrongkul, P., Bhumiratana, A. and Wiwat, C. (2010). Characterization of an extracellular lipase from the biocontrol fungus, *Nomuraea rileyi* MJ, and its toxicity toward *Spodoptera litura*. *J Invertebr Pathol.*, 105: 228-235. 10.1016/j.jip.2010.06.011.
- Tamayo-Mejía, F., Tamez-Guerra, P., Guzmán-Franco, A.W and Gomez-Flores, R. (2016). Developmental stage affects survival of the ectoparasitoid *Tamarixia triozae* exposed to the fungus *Beauveria bassiana*. *Biol Control.*, 93: 30–36. 10.1016/j.biocontrol.2015.11.006.
- Taylor, B.C., Lejzerowicz, F., Poirel, M., Shaffer, J.P., Jiang L. et al. (2020). Consumption of fermented foods is associated with systematic differences in the gut microbiome and metabolome. *MSystems.*, 5: e00901-19. 10.1128/msystems.00901-19.
- Thomas, M.B. and Read, A.F. (2007). Fungal bioinsecticide with a sting. *Nat. Biotechnol.*, 25:1367–1368. 10.1038/nbt1207-1367.
- Umaru, F.F. and Simarani, K. (2022). Efficacy of Entomopathogenic Fungal Formulations against *Elasmolomus pallens* (Dallas) (Hemiptera: Rhyparochromidae) and Their Extracellular Enzymatic Activities. *Toxins.*, 14: 584. 10.3390/toxins14090584.
- Valero-Jiménez, C.A., Wieggers, H., Zwaan, B.J., Koenraadt, C.J. and van Kan, J.A. (2016). Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.*, 133: 41–49. 10.1016/J.JIP.2015.11.011.

- Vega, F.E. and Kaya, H.K. (2012). *Insect Pathology*, (2nd Edition). Elsevier, 1016/B978-0-12-384984-7.01001-0.
- Velavan, V., Dhanapal, R., Ramkumar, G., Karthi, S., Senthil-Nathan, S. et al. (2022). Characterization and evaluation of *Metarhizium* spp. (Metsch.) Sorokin isolates for their temperature tolerance. *J. Fungi.*, 8:68. 10.3390/jof8010068.
- Vidhate, R.P., Dawkar, V.V., Punekar, S.A. and Giri, A.P. (2023). Genomic determinants of entomopathogenic fungi and their involvement in pathogenesis. *Microb. Ecol.*, 85: 49–60. 10.1007/s00248-021-01936-z.
- Wang, C. and St Leger, R.J. (2007). The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryot. Cell.*, 6: 808–816. 10.1128/ec.00409-06.
- Wang, J., Ying, S.H., Hu, Y. and Feng, M.G. (2016). Mas5, a homologue of bacterial DnaJ, is indispensable for the host infection and environmental adaptation of a filamentous fungal insect pathogen. *Environ. Microbiol.*, 18: 1037–1047. 10.1111/1462-2920.13197.
- Wang, Z.Z., Liu, Y.Q., Shi, M., Huang, J.H. and Chen, X.X. (2019). Parasitoid wasps as effective biological control agents. *J. Integr. Agric.*, 18: 705–715. 10.1016/S2095-3119(18)62078-7.
- Wu, J.H., Ali, S. and Ren, S.X. (2010). Evaluation of Chitinase from *Metarhizium anisopliae* as Biopesticide Against *Plutella xylostella*. *Pak. J. Zool.*, 42: 521–528.
- Zhang, Y., Zhao, J., Fang, W., Zhang, J., Luo, Z. et al. (2009). Mitogen-activated protein kinase hog1 in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* regulates environmental stress responses and virulence to insects. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 3787–3795. 10.1128/aem.01913-08.
- Zhao, Y., McIntosh, K.B., Rudra, D., Schawalder, S., Shore, D. et al. (2006). Fine-structure analysis of ribosomal protein gene transcription. *Mol. Cell. Biol.*, 26: 4853–4862. 10.1128/mcb.02367-05.

Artigo 1: Produção de enzimas por *Metarhizium anisopliae* e sua aplicação no controle de nematoides (*Haemonchus* spp. e *Meloidogyne incognita*) *in vitro*.

Lisseth Bibiana Puentes Figueroa^{1*}, Ruth Celestina Condori Mamani^{1*}, Debora Castro de Souza¹, Jhennifer Cristina de Souza Alves¹, Stefany Amorim de Souza¹, Cecilia Balduino Ferreira¹, Tiago Facury Moreira³, Willian César Terra², Filippe Elias de Freitas Soares^{1^a}

¹ Department of Chemistry, Laboratory of Biochemistry and Applied Biotechnology, Federal University of Lavras

² Department of Phytopathology, Laboratory of Nematology, Federal University of Lavras

³ School of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Clinical and Surgery, Federal University of Minas Gerais.

* These authors contributed equally.

^aCorresponding author – filippe.soares@ufla.br

Publicado: *Journal of Natural Pesticide Research*

Anexo 1

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.napere.2024.100077>

Resumo

O Brasil é afetado pela infecção de nematoides gastrintestinais (*Haemonchus* spp.), pois causam doenças subclínicas em pequenos ruminantes que afetam diretamente o peso e a produção de leite e, por sua vez, geram um risco à saúde dos animais. Da mesma forma, o nematoide das galhas (*Meloidogyne incognita*) é uma doença grave que parasita as raízes das plantas de tomate, causando danos como a má absorção de nutrientes, o que leva a perdas significativas de produtividade. Para minimizar o impacto econômico desses nematoides, é importante estabelecer novas estratégias de controle. *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* são dois dos principais micoinseticidas usados para controlar muitas ordens de insetos, como Lepidoptera e Hemiptera. Esses fungos têm a capacidade de produzir enzimas extracelulares, que desempenham um papel importante no controle do processo de infecção de pragas. O objetivo deste estudo foi avaliar a produção de proteases e quitinases de *M. anisopliae* em diferentes meios de cultura sólidos e líquidos e sua aplicação *in vitro* no controle de *Haemonchus* spp e *Meloidogyne incognita*. Para atingir esse objetivo, as enzimas foram produzidas em condições de fermentação sólida e líquida para determinar a maior atividade quitinolítica e proteolítica de duas cepas *M. anisopliae* (IBCB 425 e ESALQ E9) em meios líquidos: Caldo SDY, meio de cultura YPG, sintético e amido solúvel com extrato de levedura. Os meios sólidos testados foram: arroz suplementado com soro de leite e farinha de crisálida misturada com arroz. Além disso, foi medida a ação nematicida de seus extratos (contendo enzimas concentradas e sem células fúngicas). Os resultados mostraram que o melhor meio de cultura ($p < 0,01$) para protease foi o meio de soro sólido de arroz, com um valor para *M. anisopliae* IBCB 425 de 52 U/mg, em comparação com todos os meios testados. Por outro lado, para a quitinase da cepa IBCB 425 de *M. anisopliae*, o valor da atividade foi próximo a 0,60 U/mg. Com relação à atividade nematicida dos extratos brutos, as porcentagens de redução foram de 100% para o IBCB 425 no caso de parasitas animais. Para os parasitas de plantas, as porcentagens de redução foram de 71% para o IBCB 425. Assim, o uso de extratos brutos ricos em enzimas apresenta opções de controle promissoras para o controle de pragas.

Palavras-chave: *Metarhizium anisopliae*, protease, quitinase, atividade nematicida.

1.Introdução

Ao longo da história, muitas espécies de nematoides parasitas de plantas e animais causaram uma série de problemas, incluindo a interrupção do fluxo de nutrientes para a planta, o que pode levar à redução do crescimento e da produtividade da cultura, e causar anemia, perda de peso e morte em animais infectados. Esses danos afetaram gravemente a sociedade humana por meio de seus impactos negativos na produção de alimentos e no desenvolvimento econômico (He et al. 2021). Nesse contexto, a produção agrícola e pecuária depende de pesticidas e anti-helmínticos para manter a produtividade. No entanto, o uso inadequado desses produtos pode causar danos ao ecossistema e à saúde humana, pois eles produzem resíduos tóxicos que podem contaminar o solo, a água e os alimentos, além de selecionar pragas resistentes (Fletcher et al. 2020). Portanto, é necessário desenvolver novas estratégias de controle de nematoides que sejam mais sustentáveis e menos prejudiciais ao meio ambiente (Viera e Jackson 2020; He et al. 2021; Omar et al. 2021).

Entre as vantagens do uso de fungos entomopatogênicos, é importante destacar a eficiência no controle de insetos-praga. Isso permite o uso dessa tecnologia para aumentar as defesas das plantas por meio da indução de resistência sistêmica. Essas características tornam os fungos entomopatogênicos excelentes agentes de controle biológico (Julius et al. 2020; Gebremariam et al. 2022).

O fungo *M. anisopliae* tem sido amplamente utilizado em formulações comerciais de produtos biológicos para o controle de insetos-praga. Esse fungo tem a capacidade de produzir enzimas e metabólitos secundários que têm desempenhado um papel importante no processo de infecção de insetos, ácaros (Ebani e Mancianti 2021; Soares et al. 2023). O mecanismo de infecção de *M. anisopliae* em seus hospedeiros depende da ação combinada de dois processos: o mecânico, devido à pressão do apressório que rompe as áreas membranosas ou levemente escleróticas da cutícula, e o bioquímico, resultante da secreção de enzimas hidrolíticas extracelulares, como proteases (EC 3. 4) e quitinases (EC 3.2.11.14) que atuam na degradação da cutícula, facilitando a penetração do fungo na hemolinfa do inseto (Srivani e Jalaja 2022).

Grande parte desses danos é atribuída aos nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.), que são patógenos transmitidos pelo solo com uma ampla gama de hospedeiros, distribuição mundial e alta capacidade reprodutiva. Os nematicidas químicos eram uma solução prática para o controle de NGs (Nematoides-das-Galhas). Entretanto, os compostos químicos tradicionais, por exemplo, brometo de metila e organofosforados, foram retirados do mercado (U.S. Environmental Protection Agency 2008; Zasada et al. 2010).

Os nematoides intestinais são outro problema que afeta o setor pecuário e, quando não controlados, podem levar a perdas de 30 a 40% no desempenho animal (Lino et al., 2016). Além disso, os principais nematoides que afetam os pequenos ruminantes e têm grande importância econômica são o *Haemonchus contortus* e o *Trichostrongylus axei* (Silva et al., 2017). Além disso, *Haemonchus* é o gênero com maior prevalência, correspondendo a níveis acima de 80% nas cargas parasitárias de pequenos ruminantes (Amarante & Oliveira, 2007, Da Silva et al., 2018).

Há um consenso de que a aplicação de fungos entomopatogênicos é uma alternativa sustentável ao uso de inseticidas sintéticos (Baruah e Deka 2017; Ferreira e Soares 2023). Além disso, esses microrganismos têm demonstrado grande potencial biotecnológico, principalmente devido à produção de enzimas com capacidade de degradação da cutícula. Nesse ponto, vale a pena mencionar que os nematoides, assim como os insetos, fazem parte do superfilo Ecdysozoa, um clado animal importante que reúne todos os animais que mudam (Dunn et al. 2008). Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a produção de protease e quitinase extracelular pelo fungo *M. anisopliae* em diferentes meios de cultura e sua aplicação no controle de nematoides parasitas de animais e plantas.

2. Material e métodos

2.1. Cepas e coleta de inóculo

A cepa de *M. anisopliae* usada nos experimentos foram obtidas de produtos comerciais. *M. anisopliae* IBCB 425 foram fornecidas pela Nitro Agro como Metarriz®. *M. anisopliae* ESALQ E9 foi adquirido pela empresa Koppert como Metarril®.

Essas cepas foram inoculadas em placas de Petri contendo 2,0% de Potato Dextrose Agar (PDA) a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ no escuro por 10 dias. Uma solução aquosa estéril de Tween 80 a 0,040% (v/v) foi adicionada a cada placa inoculada e uma alíquota de cada placa foi usada para contar o número de conídios na câmara de Neubauer para obter uma concentração de 10^7 conídios/mL. Após esse procedimento, a suspensão de conídios foi inoculada em meios líquidos e sólidos para iniciar a produção de enzimas extracelulares, como proteases e quitinases.

2.2. Produção de enzimas

Todos os ensaios foram realizados com pelo menos três réplicas. Todos os meios de cultura foram autoclavados antes da inoculação dos conídios.

2.2.1. Preparação de meios de cultura líquidos

2.2.1.1. Amido solúvel com extrato de levedura

A produção do meio de cultura líquido foi realizada com base na metodologia de Kim et al. (2011), uma alíquota de 0,50 mL de conídios foi inoculada em frascos contendo 50 mL de meio composto de amido solúvel e extrato de levedura, ambos em concentrações de 10 g/L, com pH inicial igual a 6,00. Todos os frascos foram incubados a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ por 4 dias com rotação constante de 150 rpm.

2.2.1.2. Meio de cultura sintético

O meio de cultura sintético foi usado para o crescimento dos isolados de acordo com Bhadani et al. (2021). Uma alíquota de 0,50 mL de conídios, preparada conforme descrito na seção de cepas, foi inoculada em frascos contendo 50 mL de meio composto por: KH_2PO_4 1,0 (g/L), K_2HPO_4 0,50 (g/L), MgSO_4 0,50 (g/L), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,20 (g/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3,34 (g/L), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,020 (g/L), NaCl 0,48 (g/L), dextrose (2% p/v), extrato de levedura (1% p/v), caseína (1% p/v), em um pH inicial de 6,00. Os frascos foram submetidos a agitação rotativa a 150 rpm e incubados a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ por 4 dias.

2.2.1.3. Caldo SDY (amido, dextrose e extrato de levedura)

O caldo SDY foi preparado de acordo com a metodologia de Dhar e Kau (2010). Uma alíquota de 0,50 mL de conídios, preparada conforme descrito na seção de cepas, foi inoculada em frascos contendo 50 mL de meio composto de (p/v): dextrose (4,0%), peptona (1,0%) e extrato de levedura (1,0%), por três dias. Posteriormente, após o crescimento dos micélios, uma alíquota de 0,50 mL dessas estruturas fúngicas foi coletada e inoculada em frascos contendo 50 mL de meio de indução composto de caseína (1,0%) (p/v). O pH inicial do meio de cultura foi ajustado para 8,00 e as culturas foram incubadas a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e 150 rpm por três dias.

2.2.1.4. YPG (extrato de levedura, peptona e glicose)

O caldo YPG foi preparado de acordo com a metodologia de Nahar et al. (2004). Uma alíquota de 0,50 mL de conídios, preparada conforme descrito na seção de cepas, foi inoculada em frascos contendo 50 mL de meio composto de (p/v): extrato de levedura (0,30%), peptona (0,50%) e glicose (1,0%), a 150 rpm, $27 \pm 1^\circ\text{C}$, por 3 dias como pré-enriquecimento. Da mesma forma, um meio contendo quitina foi usado para a produção induzida de quitinases, tendo como composição: KH_2PO_4 3,0 (g/L); K_2HPO_4 1,0 (g/L); MgSO_4 0,7 (g/L); NaCl 0,50 (g/L); CaCl_2 0,50 (g/L); extrato de levedura 0,50 (g/L); peptona 0,50 (g/L); e quitina 5,0 (g/L). O pH inicial

do meio foi de 5,50, e as culturas foram incubadas a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e 150 rpm por um período de 3 dias.

2.2.1.5. Extração de enzimas do meio de cultura líquido

Os meios de cultura líquidos foram filtrados a vácuo com papel Whatman nº 4. O filtrado foi então centrifugado a $10.000 \times g$ por 15 minutos (Kim et al. 2011). O sobrenadante coletado de cada meio de cultura foi denominado como extrato bruto para cada cepa e usado nos ensaios subsequentes. Esse extrato continha enzimas concentradas e não continha células fúngicas.

2.2.2. Preparação de meios de cultura sólidos

2.2.2.1. Arroz com farinha de crisálida de bicho-da-seda (*Bombyx mori*)

Para a preparação do meio sólido, foi utilizada a metodologia descrita por Santoro et al. (2005). Uma alíquota de 0,50 mL de conídios, preparada conforme descrito na seção de cepas, foi inoculada em frascos contendo 50 g de arroz pré-cozido e 50 g de farinha de crisálida do bicho-da-seda (*Bombyx mori*). As amostras foram mantidas em uma incubadora BOD sob condições de luz a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ por 25 dias.

2.2.2.2. Arroz com soro de leite

Outro meio de cultura foi usado para a produção de enzimas, suplementado com soro de leite. A preparação do meio foi adaptada de Santoro et al. (2005). Uma alíquota de 0,50 mL de conídios, preparada conforme descrito na seção de cepas, foi inoculada em frascos contendo 40 g de arroz pré-cozido e 20 mL de soro de leite. As amostras foram mantidas em uma incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) sob condições de luz a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ por 10 dias. Foi necessário homogeneizar as amostras a cada três dias para dispersar os conídios, a fim de melhorar o contato e a germinação.

2.2.2.3. Extração de enzimas do meio de cultura sólido

As amostras foram homogeneizadas com água destilada estéril, agitadas por um período de 2 horas e filtradas a vácuo com papel Whatman nº 4. O filtrado foi então centrifugado a $10.000 \times g$ por 15 minutos (Kim et al. 2011). O sobrenadante coletado foi denominado extrato bruto para cada cepa e usado nos ensaios subsequentes. Esses extratos continham enzimas concentradas e não continham células fúngicas.

2.3. Atividade enzimática

2.3.1. Atividade de protease total

A atividade proteolítica dos extratos brutos foi medida de acordo com Soares et al. (2013). As condições foram 37°C e pH 8,00. Um zero de reação foi preparado sob as mesmas condições do ensaio enzimático; no entanto, a reação foi interrompida por TCA, ácido tricloroacético, 10% (p/v) antes da inserção do extrato contendo a enzima. Uma unidade de protease foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µg de tirosina por minuto sob as condições do ensaio.

2.3.2. Atividade total de quitinase

A atividade de quitinase dos extratos brutos foi medida pela quantificação de açúcares redutores (Miller, 1959). As condições foram 37°C e pH 5,35. Uma unidade de atividade de quitinase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µM de N-acetilglucosamina por minuto sob as condições do ensaio.

2.3.3. Determinação da proteína total

A concentração de proteína total foi estimada de acordo com o método de Bradford (1976), no qual a albumina de soro bovino (BSA) foi usada como padrão.

2.3.4. Atividade específica

A atividade específica das enzimas foi calculada dividindo-se o valor obtido da atividade enzimática pelo valor medido das proteínas totais e foi expressa em U/mg de proteína.

2.4. Coleta de nematoides

2.4.1. Coleta de nematoides parasitas de animais

Larvas infectantes (L₃) de nematoides pertencentes a *Haemonchus* spp. (~70%) e tricostrongilídeos (~30%) foram coletadas na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), na cidade de Belo Horizonte, obtidas de fezes de caprinos (*Capra aegagrus hircus*) naturalmente infectados (Soares et al., 2019).

2.4.2. Coleta de nematoides parasitas de plantas

Meloidogyne incognita foi multiplicado em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), cultivar Santa Clara, na estufa. Os ovos foram extraídos das raízes do tomateiro usando a técnica descrita por Hussey e Barke (Boneti e Ferraz, 1981). Os (J₂) foram obtidos usando a técnica do

funil de Baermann (Baermann 1917). Para os ensaios *in vitro*, foram usados (J₂) coletados 48 horas após o estabelecimento da câmara de eclosão. Os (J₂) eclodidos 24 horas após o início da câmara de eclosão foram descartados.

2.4.3. Ensaios nematocidas *in vitro*

A análise da atividade nematocida foi realizada com enzimas produzidas *M. anisopliae*, formando três grupos experimentais: um grupo de controle e dois grupos tratados (Soares et al. 2013). O grupo de controle foi tratado com: 60 µL de água destilada e 60 µL de uma suspensão contendo aproximadamente 30 nematoides. Cerca de 30 nematoides foram tratados com extrato bruto desnaturado de enzima (fervido a 100 °C por 2 horas): 60 µL de extrato desnaturado e 60 µL de suspensão de nematoides. O grupo tratado com o extrato enzimático ativo foi formado por: 60 µL de extrato de enzima ativa e 60 µL de uma suspensão contendo cerca de 30 nematoides. Todos os grupos foram incubados por um período de 24 horas a 27 °C no escuro. Finalmente, o número de nematoides viáveis foi contado por microscopia óptica de acordo com a metodologia de Soares et al. (2013). O procedimento foi realizado com os extratos enzimáticos, utilizando os meios de cultura que produziram a maior atividade proteolítica, para cada um dos isolados avaliados de *M. anisopliae*. O ensaio foi realizado com *Haemonchus* spp. (~70%), tricostrongilídeos (~30%) e *M. incognita*.

2.5. Análise estatística

Os dados obtidos foram interpretados estatisticamente por ANOVA em níveis de significância de 1 e 5%. A eficiência da destruição de nematoides, em comparação com o controle, foi realizada pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade, usando o software Bioestat 5.0 (Ayres et al. 2003). Posteriormente, a porcentagem média de redução de nematoides foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Redução (\%)} = \frac{(\bar{x} \text{ controle de nematoides vivos} - \bar{x} \text{ nematoides vivos do tratamento})}{\bar{x} \text{ controle nematoides vivos}} \times 100$$

3. Resultados

3.1. Produção e atividade enzimática

Os resultados obtidos do teste de atividade de protease total para as diferentes cepas comerciais de *M. anisopliae* IBCB 425 e *M. anisopliae* ESALQ E9 usando arroz com soro de

leite (52 U/mg) demonstraram uma diferença significativa ($p<0,01$) em comparação com todos os meios dos experimentos (Fig. 1).

Em relação aos resultados obtidos no teste de atividade de quitinase total, a cepa de *M. anisopliae* ESALQ E9 no meio de cultura de arroz com soro de leite produziu a maior quantidade de quitinase, apresentando uma diferença significativa ($p<0,01$) em relação aos outros meios de cultura testados, incluindo aqueles avaliados para *M. anisopliae* IBCB 425, com um valor de atividade próximo a 0,60 U/mg (Fig. 2).

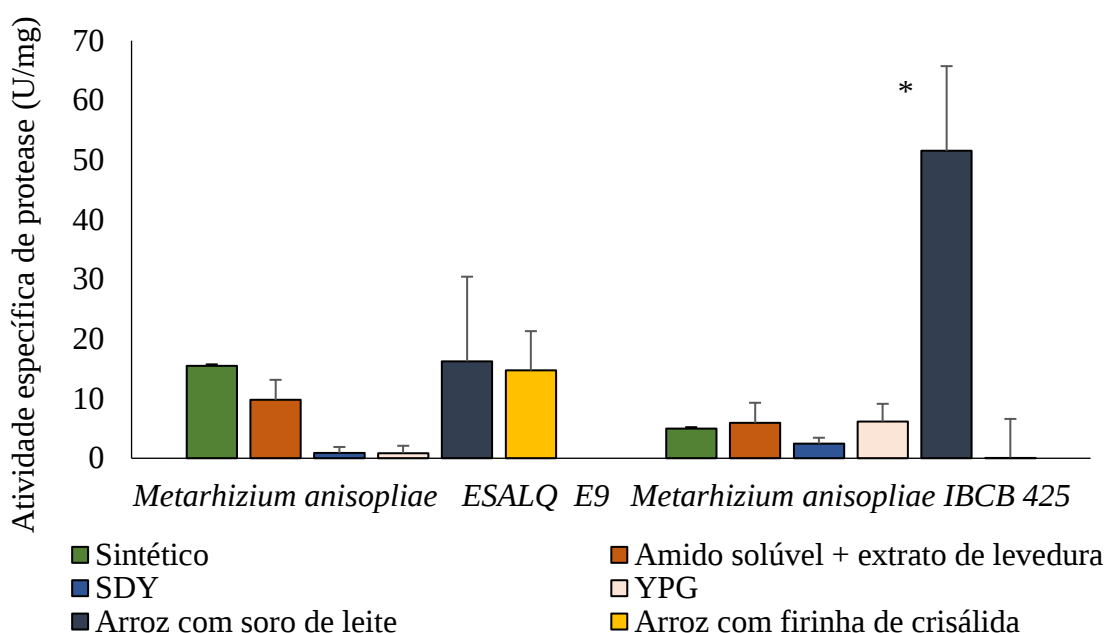


Figura 1: Atividade específica de protease (U/mg) do isolado de *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 e ESALQ E9, que ocorreu nos diferentes meios de cultura líquido e sólido.

**M. anisopliae* IBCB425 em meio de cultura arroz com soro apresentou diferença significativa pelo teste estatístico de Tukey de ($p<0,01$) em relação a *M. anisopliae* ESALQ E9 e entre os demais meios de cultura avaliados.

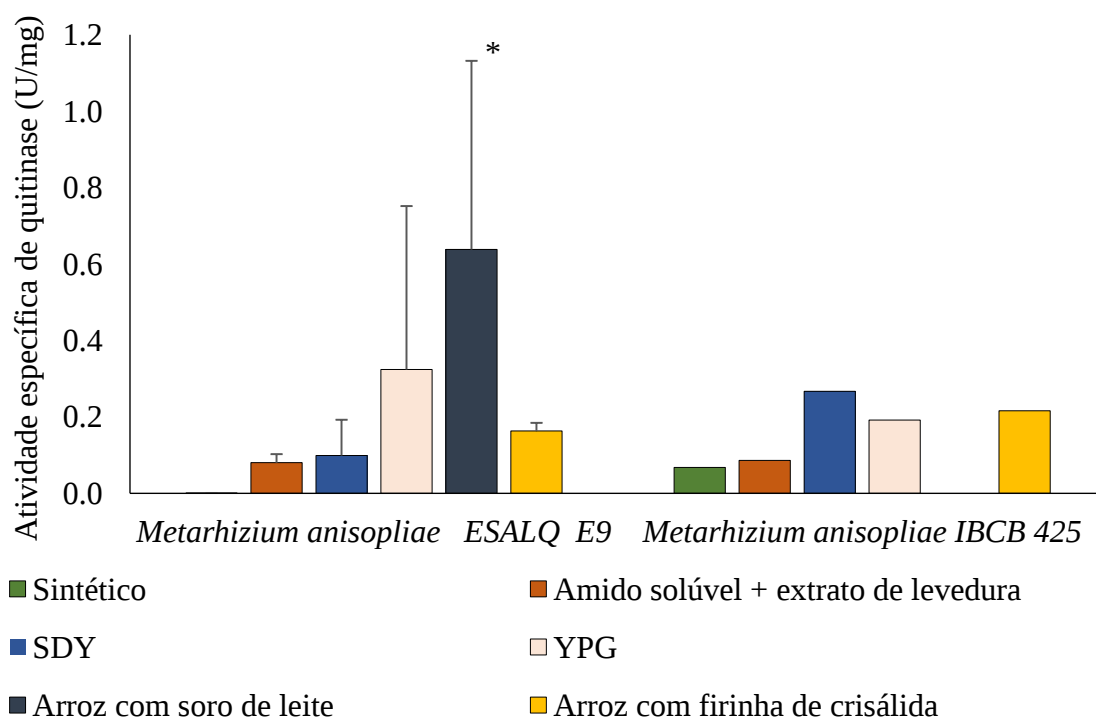


Figura 2: Atividade específica da quitinase (U/mg) de *Metarhizium anisopliae* isolado IBCB 425 e ESALQ E9, que foi produzido na combinação de diferentes meios de cultura líquidos e sólidos.

* *M. anisopliae* ESALQ E9 em meio de cultura arroz com soro apresentou diferença significativa pelo teste estatístico de Tukey de ($p < 0,01$) em relação a *M. anisopliae* IBCB425 e entre os demais meios de cultura avaliados.

3.2. Atividade nematocida

Os extratos brutos com a maior atividade específica de protease produzida pela cepa de *M. anisopliae* IBCB 425 foram selecionados para os ensaios nematocidas.

No ensaio com nematoides parasitas caprinos (L_3), para *M. anisopliae* IBCB 425, foram obtidas diferenças estatísticas ($p < 0,01$) do extrato ativo em comparação com o controle e o grupo desnaturado. Foram obtidas as seguintes porcentagens de redução: 33% desnaturado e 100% de extrato bruto (Figura 3).

Usando os mesmos extratos, foi avaliada a atividade nematocida sobre (J_2) de *M. incognita*. O extrato bruto com maior atividade proteolítica produzido por *M. anisopliae* IBCB 425 foi significativamente ($p < 0,01$) superior em causar mortalidade a (J_2) de *M. incognita* em

comparação com o controle e o extrato desnaturado. *M. anisopliae* IBCB 425 causou mortalidade de 34% e 71%, respectivamente, na população de (J₂) de *M. incognita* (Fig. 4).

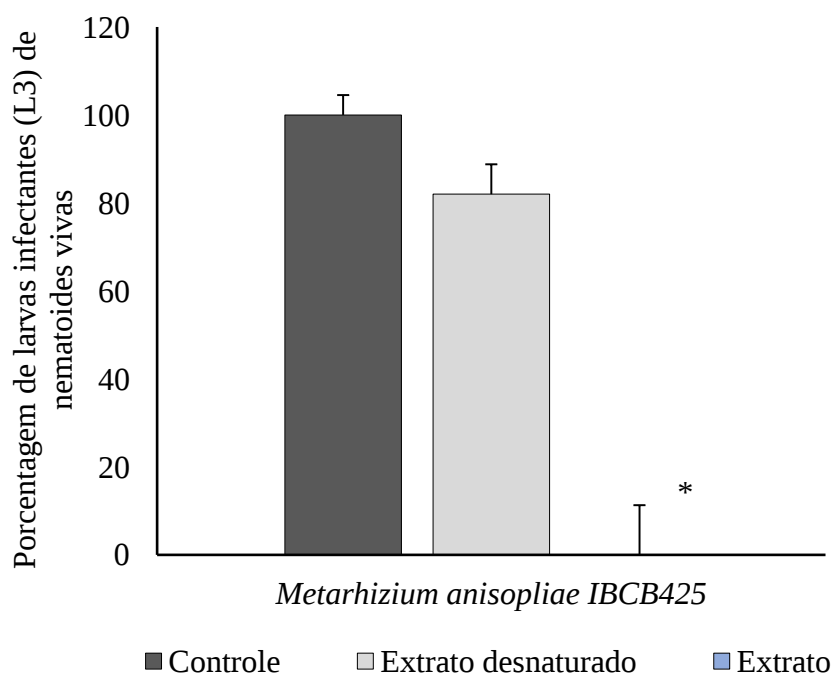


Figura 3: Porcentagem média de larvas de nematoides (L₃) recuperadas dos dois grupos tratados (extrato de *Metarhizium anisopliae* IBCB 425; extrato desnaturado) e um grupo controle, após incubação por 24 horas a 27°C. O tratamento representado com um asterisco (*) apresentou diferença significativa ($p < 0,01$) em relação ao grupo extrato e ao grupo controle pelo teste t e teste de Tukey.

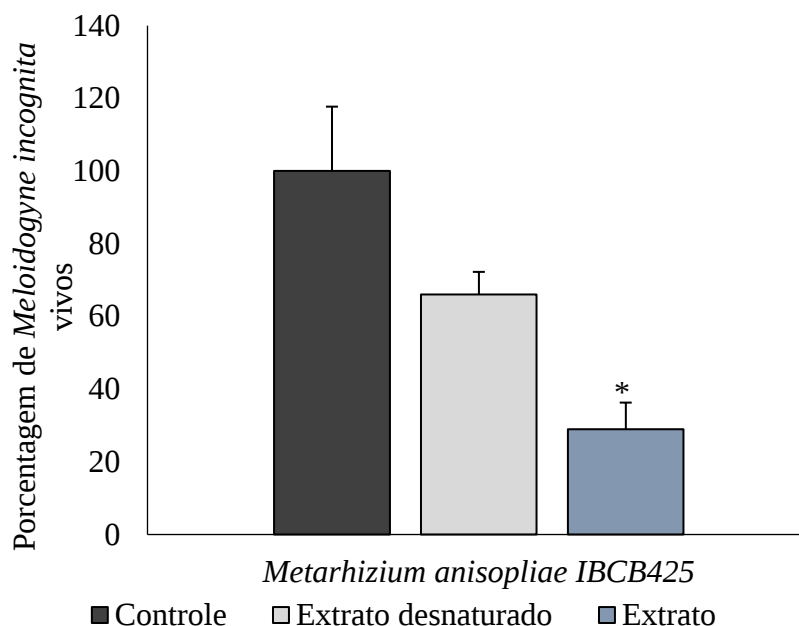


Figura 4: Porcentagens médias de *Meloidogyne incognita* (J₂) recuperadas nos dois grupos tratados (extrato isolado de *Metarhizium anisopliae* IBCB 425; extrato desnaturado) e grupo controle após incubação por 24 horas a 27°C. O tratamento representado com um asterisco (*) apresentou diferença significativa ($p < 0,01$) em relação ao grupo extrato e ao grupo controle pelo teste t e teste de Tukey.

4. Discussão

A cepa do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* IBCB 425 e ESALQ E9 usadas no presente estudo produziram protease e quitinase, atingindo alto nível de atividade enzimática. Além disso, nossos resultados mostraram que, após a avaliação de diferentes meios de cultura, para os dois isolados testados, o meio de soro de arroz foi o que induziu a maior produção de protease.

O arroz é o substrato mais amplamente utilizado no processo industrial de multiplicação de fungos. Esse meio é barato e tem efeitos positivos na germinação de fungos, fornecendo uma área de superfície que permite a rápida colonização de fungos e tem a capacidade de absorver umidade, contribuindo para uma germinação mais rápida e alta viabilidade conidial (Taylor et al. 2013). No entanto, o presente estudo destaca pela primeira vez que o meio de arroz suplementado com soro de leite é um excelente meio de cultura para a produção de proteases e quitinases pela cepa comercial de *M. anisopliae*.

O soro de leite é um subproduto da indústria de laticínios que geralmente é considerado um produto residual. No entanto, quando processado, o soro de leite pode ser usado como

substrato de alto valor em fermentações microbianas que utilizam lactose (Mehri et al. 2021). Por meio desses resultados, é possível afirmar que a fonte nutricional de soro de leite utilizada na preparação do meio sólido para a cepa de *M. anisopliae* ESALQ E9 proporciona maior produtividade de enzimas com atividade quitinolítica quando inoculadas em arroz, que é a fonte de carbono majoritária.

A cepa de *M. anisopliae*, foi possível identificar que o segundo melhor meio de cultura com alta produção de enzimas extracelulares foi o meio de cultura YPG. Nahar et al. (2004) avaliaram a produção extracelular constitutiva de enzimas metabolizadoras de quitina, como quitinase, quitosanase e quitina desacetilase em meio YPG pelo isolado de *M. anisopliae*. Dentro dos resultados, a atividade de quitinase de *M. anisopliae* no meio contendo quitina foi de 0,010 U/mL às 120 h. St. Leger et al. (1986) relataram atividade de quitinase (0,027 U/mL) em *M. anisopliae* após 120 h. Comparando com os resultados relatados neste estudo, pode-se inferir que a suplementação com quitina no meio, além do pré-enriquecimento inicial, permite que o fungo absorva essas fontes de nitrogênio e carboidratos e gere uma maior atividade quitinolítica.

Na preparação do meio sólido, a farinha de crisálida do bicho-da-seda (*Bombyx mori*), que é um subproduto da indústria da seda, foi usada como fonte de nitrogênio. O uso de meios enriquecidos com farinha de insetos é amplamente utilizado para a produção de enzimas. Zhang et al. (2004) demonstraram que a produção de quitinase foi aprimorada na fermentação em estado sólido em escala laboratorial usando farelo de trigo misturado com cutícula de inseto para o isolado de *B. bassiana* Bb174. No presente estudo, o arroz com farinha de crisálida do bicho-da-seda (*B. mori*) foi avaliado quanto à produção de protease e quitinase, o que nos permite sugerir que, ao suplementar meios de cultura sólidos com cutícula de insetos, é possível induzir a produção de enzimas extracelulares, como proteases e quitinases, levando em conta os resultados obtidos neste estudo.

Em um estudo recente conduzido por Golzan et al. (2023), diferentes sais e a cutícula de *P. interpunctell* foram usados como indutores. Esses autores sugeriram que os isolados de *M. anisopliae* tinham os níveis mais altos de atividade proteolítica. Portanto, é importante mencionar que esses processos de fermentação em estado sólido usando cereais (por exemplo, trigo, arroz, farelo de trigo), bem como resíduos agrícolas e de alimentos, têm a vantagem da produção de enzimas. No estudo de Ghoreishi et al. (2023), por exemplo, aparas de grama e resíduos de poda foram usados como substrato em SSF para cultivar *Trichoderma harzianum* e produzir biopesticidas (ou seja, esporos conidiais) eficazes contra fungos fitopatogênicos.

Mochi et al. (2010) descobriram que os isolados de *M. anisopliae*, especialmente IBCB 425 e E9, podem matar pupas de *H. irritans* em diferentes concentrações de conídios. Ghayedi e Abdollahi (2013) relataram que o *M. anisopliae* também é eficaz contra parasitas de plantas, como *Heterodera avenae* e nematoides da cana-de-açúcar. No entanto, foi demonstrado que o extrato enzimático de *B. bassiana* mata vários nematoides parasitas de plantas importantes para a agricultura, incluindo *M. incognita*, *M. hapla*, *Aphelenchoides besseyi* e *Heterodera glycines* (Liu et al. 2008; Zhao et al. 2013). Isso ocorre porque a cutícula dos nematoides é composta de colágenos e cuticulinas, que são os alvos das enzimas presentes no extrato de os fungos entomopatogenos (Page et al. 2014).

Outros autores também demonstraram o efeito antagônico significativo dos fungos *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Paecilomyces lilacinus* contra o nematoide de galha *M. incognita*, reduzindo significativamente sua população e, posteriormente, melhorando o crescimento e o rendimento das plantas de feijão-caupi (Youssef et al. 2020).

No presente estudo, foi demonstrado que o extrato livre de células, particularmente rico em enzimas como proteases e quitinases, produzido pela cepa comercial de *M. anisopliae* apresentou atividade nematicida contra juvenis de segundo estágio de *M. incognita*. Esse resultado pode ser comparado com o relatado por Soares et al. (2014), onde foi avaliada a ação nematicida de quitinases extracelulares produzidas por fungos nematófagos sobre *Panagrellus redivivus*. Soares et al. (2014) forneceram evidências de que a enzima quitinase está envolvida no mecanismo molecular de penetração da cutícula e digestão celular de nematoides. Além disso, os extratos enzimáticos apresentaram ação significativa sobre as proteínas da cutícula dos juvenis, conforme observado pela comparação entre os grupos desnaturados e ativos.

Em relação aos nematoides parasitas de animais, outros autores propõem o uso dos seguintes fungos, frequentemente isolados do ambiente externo, para o controle de infecções por helmintos gastrointestinais em pequenos ruminantes: *Arthrobotrys oligospora*, *Candelabrella musiformis*, *Arundo conoides*, *Andropogon dactyloides*, *Trichoderma*, *Beauveria*, *Clonostachys* e *Lecanicillium* (Soto-Barrientos et al. 2011). No entanto, vale a pena observar que este trabalho é o primeiro relato da ação enzimática de extratos brutos *M. anisopliae* em nematoides parasitas de ruminantes. De fato, isso demonstra que as proteases produzidas por esses fungos entomopatogênicos também reconhecem e catalisam a hidrólise de proteínas em juvenis de nematoides, não apenas em insetos. Portanto, os resultados do presente estudo abrem uma nova perspectiva para o uso de enzimas de *M. anisopliae*.

5. Conclusão

A cepa comercial de *Metarhizium anisopliae* produziu com sucesso enzimas extracelulares, usando o meio de cultura de arroz suplementado com soro de leite como o meio de cultura mais eficaz. A enzima protease extraída nesta pesquisa apresentou a maior atividade nematicida contra ambos (*Haemonchus* spp e *Meloidogyne incognita*), mostrando seu potencial biopesticida com a maior eficácia dos extratos enzimáticos produzidos por *M. anisopliae* IBCB 425.

6. Referências

- Amarante, A. F. T., Oliveira, S. R. 2007. Controle de endoparasitoses dos ovinos: uma revisão. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal, 1, 14-36.
- Ayres, M., Ayres, J.R.M., Ayres, D.L., Santos, A.S. 2003. Aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas. Sociedade civil mamirauá: Brasília CNPq, Belém, p 290.
- Baruah, N., Deka, A.C., 2017. Myco-biocontrol of red spider Mite (*Oligonychus coffeae*, Nietner) using *Metarhizium anisopliae*. Int J Res Appl Sci Eng Tech 5:1800–1804. <https://doi.org/10.22214/IJRASET.2017.10264>
- Baermann, G., 1917. A simple method for detecting *Ankylostomum* (nematode) larvae in soil samples. Medical Journal for the Dutch East Indies 57:131–137.
- Bhadani, R.V., Gajera, H.P., Hirpara, D.G., Kachhadiya, H.J., Dave, R.A., 2021. Metabolomics of extracellular compounds and parasitic enzymes of *Beauveria bassiana* associated with biological control of whiteflies (*Bemisia tabaci*). Pestic biochem phys 176:104877. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104877>
- Boneti, J.S., Ferraz, S., 1981. Modification of the Hussey and Barker method for generating *Meloidogyne exigua* eggs from coffee roots. Fitopatol Bras 6:553.
- Chen, Q., Peng, D., 2019. Nematode chitin and application. Targeting chitin-containing organisms. Adv. Exp. Med. Biol 1142: 209-219. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7318-3_10
- Da Silva Roberto, F. F., dos Santos Difante, G., Zaros, L. G., & Gurgel, A. L. C. (2018). Nematoides gastrintestinais na ovinocultura de corte sob regime de pastejo. Pubvet, 12, 147
- Dhar, P., Kaur, G., 2010. Cuticle-degrading proteases produced by *Metarhizium anisopliae* and their induction in different media. Indian J Microbiol 50:449-455. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0098-1>

- Dunn, C., Hejnol, A., Matus, D. et al., 2008. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 452: 745–749. <https://doi.org/10.1038/nature06614>
- Ebani, V.V., Mancianti, F., 2021. Entomopathogenic fungi and bacteria in a veterinary perspective. *Biology* 10:479. <https://doi.org/10.3390/biology10060479>
- Environmental Protection Agency., 2008. Fenamiphos; amendment to use deletion and product cancellation order. Federal Register. <https://www.federalregister.gov/documents/2008/12/10/E8-29223/fenamiphos-amendment-to-use-deletion-and-product-cancellation-order>.
- Ferreira, J.M., Soares, F.E., 2023. Entomopathogenic fungi hydrolytic enzymes: a new approach to biocontrol?. *Journal of Natural Pesticide Research* 3:100020. <https://doi.org/10.1016/j.napere.2023.100020>
- Fletcher, S.J., Reeve, P.T., Hoang, B.T., Mitter, N.A., 2020. Perspective on RNAi-Based Biopesticides. *Front. Plant Sci.* 11:51. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00051>
- Gebremariam, A., Chekol, Y., Assefa, F., 2022. Extracellular enzyme activity of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and their pathogenicity potential as a bio-control agent against whitefly pests, *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). *BMC Res Notes* 15:117. <https://doi.org/10.1186/s13104-022-06004-4>
- Ghayedi, S., Abdollahi, M., 2013. Biocontrol potential of *Metarhizium anisopliae* (*Hypocreales: Clavicipitaceae*), isolated from suppressive soils of the Boyer-Ahmad region, Iran, against J2S of *Heterodera avenae*. *J Plant Prot Res* 53: 165–171. <https://doi.org/10.2478/jppr-2013-0025>
- Ghoreishi, G., Barrena, R., Font, X., 2023. Using green waste as substrate to produce biostimulant and biopesticide products through solid-state fermentation. *Waste Manage* 159: 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2023.01.026>
- Golzan, S.R., Talaie-Hassanloui, R., Homayoonzadeh, M., Safavi, S.A., 2023. Role of cuticle-degrading enzymes of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in virulence on *Plodia interpunctella* (Lepidoptera, Pyralidae) larvae. *J Asia Pac Entomol* 26:102038. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2023.102038>
- He, D.C., He, M.H., Amalin, D.M., Liu, W., Alvindia, D.G., Zhan, J., 2021. Biological Control of Plant Diseases: An Evolutionary and Eco-Economic Consideration. *Pathog Basel Switz* 10: 1311. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101311>

- Hussain,A., Tian, M.Y., He, Y.R., Ruan, L., Ahmed, S., 2010. In vitro and in vivo culturing impacts on the virulence characteristics of serially passed entomopathogenic fungi. *J Food Agric Environ* 8: 481-487
- Julius,R., Afroja, R., Patcharin, K., 2020. Entomopathogenic fungi in Southeast Asia and Africa and their possible adoption in biological control. *Biol Control* 151: 104399. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104399>
- Kim, J.S., Je, Y.H., Yu, Y.M., 2011. Mass production of aphicidal *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant with the parameter of chitinase. *J Microbiol Biotechnol* 21: 604–612. PMID: 21715967
- Liu, T., Wang, L., Duan, Y.X., Wang, X., 2008. Nematicidal activity of culture filtrate of *Beauveria bassiana* against *Meloidogyne hapla*. *World J Microbiol Biotechnol* 24:113-118. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9446-z>
- Lino, D. M., Pinheiro, R. S. B. & Ortunho, V. V. 2016. Benefícios do bem-estar animal na produtividade e na sanidade de ovinos. *Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista*, 12, 124-132
- Marion, M., Bradford., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Mehri,D., Perendeci, N.A, Goksungur, Y., 2021. Utilization of whey for red pigment production by *Monascus purpureus* in submerged fermentation. *Fermentation* 7:75. <https://doi.org/10.3390/fermentation7020075>
- Miller, G.L.,1959.Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *J Anal Chem* 31: 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mochi, D.A., Monteiro, A.C., Machado, A.R., Yoshida, L., 2010. Efficiency of entomopathogenic fungi in the control of eggs and larvae of the horn fly *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *Vet. Parasitol* 167: 62-66. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.046>
- Nahar, P., Ghormade, V., Deshpande, M., 2004. The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. *J Invertebr Pathol* 85:80-88. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2003.11.006>
- Omar, G., Ibrahim, A., Hamadah, K., 2021. Virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on different stages of the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders)

- (Lepidoptera: Gelechiidae). Egypt J Biol Pest Control 31:102.
<https://doi.org/10.1186/s41938-021-00447-w>
- Page, A., Stepek, G., Winter, A., Pertab, D., 2014. Enzymology of the nematode cuticle: A potential drug target. Int J Parasitol Drugs Drug Resist 4:133–141.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2014.05.003>
- St Leger, R., Cooper, R., Charnley, A., 1986. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. J Gen Microbiol 132:1509-1517
<https://doi.org/10.1099/00221287-132-6-1509>
- Santoro, P. H., Neves, P. M. de O. J., Silva, R. Z. da, Akimi, S., Zorzetti, J., 2005. Produção de esporos de *Beauveria bassiana* (Bals). Vuill. num processo bifásico utilizando diferentes meios líquidos. *Semina: Ciências Agrárias*, 26(3), 313–320. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2005v26n3p313>
- Silva, D. G., Menezes, B. M., Bettencourt, A. F., Frantz, A. C., Corrêa, M. R., Ruzskowski, G., Martins, A. A., Brum, L. P. & Hirschmann, L.C. 2017. Método FAMACHA® como ferramenta para verificar a infestação parasitária ocasionada por *Haemonchus* spp. em ovinos. PUBVET, 11, 1015-1021
- Sikora, R., Molendijk, L., Desaeger, J., 2022. Integrated nematode management and crop health: Future challenges and opportunities. Integrated Nematode Management: State-of-the-art and visions for the future 3-10. <https://doi.org/10.1079/9781789247541.000>.
- Soares, F.E., Ferreira, J.M., Genier, H.L., Al-Ani, L.K., Aguilar-Marcelino, L., 2023. Biological control 2.0: Use of nematophagous fungi enzymes for nematode control. Journal of Natural Pesticide Research 4: 100025. <https://doi.org/10.1016/j.napere.2023.100025>
- Soares, F.E., de Queiroz, J.H., de Araújo, J.V., Queiroz, P.V., Gouveia, A.D., Hiura, E., Braga, F.R., 2015. Nematicidal action of chitinases produced by the fungus *Monacrosporium thaumasium* under laboratorial conditions. Biocontrol Sci. Technol 25: 337-344.
<https://doi.org/10.1080/09583157.2014.979133>
- Soares, F.E., Braga, F.R., Araújo, J.V., Genier, H.L., Gouveia, A.S., Queiroz, J.H., 2013. Nematicidal activity of three novel extracellular proteases of the nematophagous fungus *Monacrosporium sinense*. Parasitol Res 112: 1557–1565. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3304-8>
- Soares, F.E., Nakajima, V.M., Sufiate, B.L., Satiro, L.A., Gomes, E.H., Froes, F.V., Sena, F.P., Braga, F.R., Queiroz, J.H., 2019. Proteolytic and nematicidal potential of the compost colonized by *Hypsizygus marmoreus*. Exp. Parasitol 197:16–19.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.12.006>

- Srivani,M., Jalaja, N., 2022. Efficacy of Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* in Pest Management. Curr trends biotechnol pharm 16: 553-561. <https://doi.org/10.5530/ctbp.2022.4.88>
- Soto-Barrientos, N., de Oliveira, J., Vega-Obando, R., Montero-Caballero, D., Vargas, B., Hernández-Gamboa, J., Orozco-Solano, C., 2011. In-vitro predatory activity of nematophagous fungi from Costa Rica with potential use for controlling sheep and goat parasitic nematodes. Rev boil trop 59:37-52. <https://doi.org/10.15517/rbt.v59i1.3177>
- Taylor,B., Edgington, S., Luke, B., Moore, D., 2013. Yield and germination of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* when grown on different rice preparations. J Stored Prod Res 53: 23-26. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2013.02.004>
- Viera, W., Jackson, T., 2020. Ecuador demonstrates a sustainable way forward for small farmer producers. Chron Horticult 60:19-22.
- Wram, L., Zasada, A., 2019. Short-term effects of sublethal doses of nematicides on *Meloidogyne incognita*. Phytopathology 109:1605–1613. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-18-0420-R>
- Youssef ,M., El-Nagdi, W., Lotfy, D., 2020. Evaluation of the fungal activity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces lilacinus* as biocontrol agents against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on Cowpea. Bull Natl Res Cen 44: 112. <https://doi.org/10.1186/s42269-020-00367-z>
- Zasada, I., Halbrendt, J., Kokalis-Burelle, N., LaMondia, J., McKenry, M., Noling, J., 2010. Managing nematodes without methyl bromide. Annu. Rev. Phytopathol 48: 311-328. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114425>
- Zhang,J., Cai, J., Wu, K., Jin,S., Pan, R., Fan, M., 2004. Production and properties of chitinase from *Beauveria bassiana* Bb174 in solid state fermentation. Chin J Appl Ecol 15: 863-866 PMID: 15320411
- Zhao, D., Liu, B., Wang, Y., Zhu, X., Duan, Y., Chen, L., 2013. Screening for nematicidal activities of *Beauveria bassiana* and associated fungus using culture filtrate. Afr J Microbiol Res 7: 974-978.

Artigo 2: Compatibilidade do fungo *Metarhizium anisopliae* s.s. e papaína no controle de *Aedes aegypti*

Ruth Celestina Condori Mamani¹, Ana Carolina Silva¹, Jhennifer Cristina de Souza Alves¹, Juliana Marques Ferreira⁴, Sthefania Ferreira dos Santos, Amanda do Carmo Alves, Ingrid Marciano Alvarenga², Pedro Henryque de Castro², Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa³, Joziana Muniz de Paiva Barçante², Filippe Elias de Freitas Soares^{1*}

¹-Departamento de Química, Laboratório de Biotecnologia e Bioquímica Aplicada, Universidade Federal de Lavras.

²-Departamento de Medicina, Laboratório de Biologia Parasitária, Universidade Federal de Lavras.

³-Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

⁴-Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás.

*Correspondente: filippe.soares@ufla.br

Formato apropriado de acordo com a revista: Chemosphere

Resumo

Aedes aegypti é vetor de arbovírus que causa doenças como dengue, zika, Chikungunya, febre amarela dentre outros. Os esforços para seu controle se concentram principalmente no controle mecânico, eliminação de criaderos de mosquito e uso de produtos químicos, que geram impactos negativos no meio ambiente e na saúde humana. Por isso, buscam-se alternativas mais sustentáveis. Os fungos entomopatogênicos, especialmente *Metarhizium*, são amplamente estudados por seu mecanismo de ação em insetos, devido às suas enzimas hidrolíticas. Outra alternativa é o uso de compostos vegetais, como a papaína, extraída do látex dos frutos verdes de *Carica papaya*. Este estudo tem como objetivo avaliar a eficácia da enzima papaína suplementada com conídios de *Metarhizium anisopliae* IP119 em larvas (L₃) de *A. aegypti*. A pesquisa determinou os valores de CL50 para concentrações de papaína que foi de (0.39) e combinada com conídios foi de (0.05). A mortalidade das larvas foi analisada por meio de ANOVA. Os resultados mostraram que uma concentração de papaína de 10% obteve uma mortalidade de 100%, enquanto a combinação de papaína 4% com conídios atingiu 97% de mortalidade, mostrando diferenças significativas em relação ao controle e nas primeiras 24 horas. Esses achados são promissores para futuras pesquisas com outros vetores, e esta combinação de compostos representa um dos primeiros estudos neste campo.

Palavras-chave: Papaína; conídio; controle bioquímico

1. Introdução

Aedes aegypti Linn. (Diptera: Culicidae) é um vetor reconhecido de doenças amplamente difundidas, como dengue, chikungunya e zika (Jones et al., 2020; Lorenz and Chiaravalloti-Neto, 2022; Powell et al., 2018; Caragata et al., 2019; Gomes et al., 2023). Neste contexto, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o Brasil é o país, no mundo, com o maior número de notificações de dengue em 2024. São 6 milhões e 300 mil casos prováveis, sendo mais de 3 milhões confirmados em laboratório. Entre os fatores que contribuem para a alta incidência dessas arboviroses estão as medidas inadequadas de controle do vetor (Mendonça et al., 2023).

O controle do vetor, é realizado principalmente com produtos sintéticos (Vontas et al., 2010; Ranson e Lissenden 2016; Smith et al., 2016). No entanto, o uso destes produtos químicos está associado ao risco de contaminação do solo, da água, da flora e da fauna (Ahamad et al., 2023; Procopio et al., 2024). Portanto, há uma necessidade mundial urgente de se desenvolver agentes de controle sustentáveis que não contaminem o meio ambiente. Uma

possível estratégia utiliza microrganismos entomopatogênicos. Entre estes microrganismos, o grupo dos fungos entomopatogênicos (FEP) é um dos mais promissores no controle de *A. aegypti* são (Thomas eRead.,2007; Wang et al., 2018). Esses fungos são capazes de reconhecer e se aderir à cutícula de artrópodes. Em seguida, o fungo germina e inicia o processo de penetração da cutícula do seu hospedeiro. Esse processo ocorre pela associação de dois mecanismos: o mecânico, que rompe áreas membranosas ou levemente escleróticas devido à ação das hifas; e o bioquímico, que envolve a ação de enzimas hidrolíticas extracelulares, especialmente proteases (EC 3.4) e quitinases (EC 3.2.1.14) (Umaru and Simarari, 2022; Ferreira and Soares, 2023). *Metarhizium anisopliae* é um dos fungos entomopatogênicos mais utilizados para o controle de insetos pragas e já é vendido para o controle de pragas agrícolas. Contudo, ele também é promissor para o controle de artrópodes-patógenos, incluindo flebotomíneos, triatomíneos, carrapatos e mosquitos (Gomes et al.,2023).

Outra fonte rica em enzimas proteolíticas é o mamoeiro, *Carica papaya*, que produz a papaína (EC 3.4.22.2). Essa enzima pertence ao grupo das cisteíno-proteases, possui um notável potencial comercial e é a protease vegetal mais estudada e utilizada na indústria alimentícia e farmacêutica em todo o mundo (Fernández et al.,2017). Embora haja numerosos estudos abordando a ação dos conídios de *M. anisopliae* sobre larvas de *A. aegypti*, não há relatos na literatura avaliando a compatibilidade do uso de fungos entomopatogênicos com a papaína como uma ferramenta em potencial para melhorar o controle desse vetor (Bitencourt et al.,2022).

Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar a ação de conídios de *M. anisopliae* s.s. combinados à papaína sobre larvas de *Aedes aegypti*.

2. Materiais e Metodologia

2.1. Manutenção de *Aedes aegypti*

Ovos de *Aedes aegypti* (linhagem Rockefeller) obtidos do laboratório de Biologia Parasitária II (Departamento de Medicina-UFLA), foram incubados em água da torneira (1.5 L) em recipientes plásticos quadrados (40 × 40 cm na parte superior). As larvas foram alimentadas com grânulos de ração triturada para peixe e mantidas a 25 ± 2 °C em uma sala com temperatura controlada por um fotoperíodo de 12:12 (L:D). Depois de cinco dias obteve-se as larvas de terceiro estágio (L₃).

2.2. Produção de conídios e suspensões

O isolado IP119 de *Metarhizium anisopliae* sensu stricto foi gentilmente cedido da coleção de fungos entomopatogênicos do Laboratório de Patologia de Invertebrados, no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), da Universidade Federal de Goiás (UFG). Para a obtenção de conídios, foi necessário realizar o cultivo do fungo em meio contendo batata-dextrose ágar (BDA), em estufa por dez dias, a 27 °C. Após a incubação, os conídios foram suspensos em solução estéril de Tween 80 (0,01% v/v). As suspensões de conídios resultantes foram filtradas separadamente utilizando papel-filtro estéril de (11 µm) (Whatman No.1) para obter a suspensão de conídios livres de hifas. A concentração de conídios na suspensão foi determinada usando câmara de Neubauer e a concentração desejada de 1×10^7 conídio/mL foi ajustada com água destilada estéril (Hicks et al., 2001; Alves et al., 1998; Bitencourt et al., 2021). Os conídios foram utilizados para os ensaios preliminares e CL50.

2.3. Atividade larvícida com papaína e conídio de *Metarhizium anisopliae*

2.3.1. Ensaio preliminar com papaína e combinado com os conídios de *Metarhizium anisopliae*

O bioensaio foi realizado segundo as diretrizes da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2005), com modificações, onde foram estabelecidos quatro grupos experimentais: dois grupos controles, um grupo composto apenas por água de torneira e outro grupo composto por solução Tween 80 (0,01% v/v), e cinco grupos tratamento, a saber: papaína pura (10% p/v), papaína (1% p/v), papaína 10% (p/v) mais conídios de *M. anisopliae* s.s. (10^7 conídios/mL), papaína 1% (p/v) mais conídios de *M. anisopliae* s.s. (10^7 conídios/mL) e apenas conídios de *M. anisopliae* s.s. (10^7 conídios/mL). Para cada grupo experimental utilizou 25 mL de solução e 20 larvas de terceiro estágio (L₃). Os grupos foram acomodados em copos plásticos (4,5 cm de diâmetro x 8,5 cm de altura), com seis repetições para cada grupo. A avaliação da mortalidade foi realizada ao longo de três dias. Todos os grupos foram incubados a 27 ± 1 °C, e as larvas receberam alimentação diária (Falvo et al., 2018).

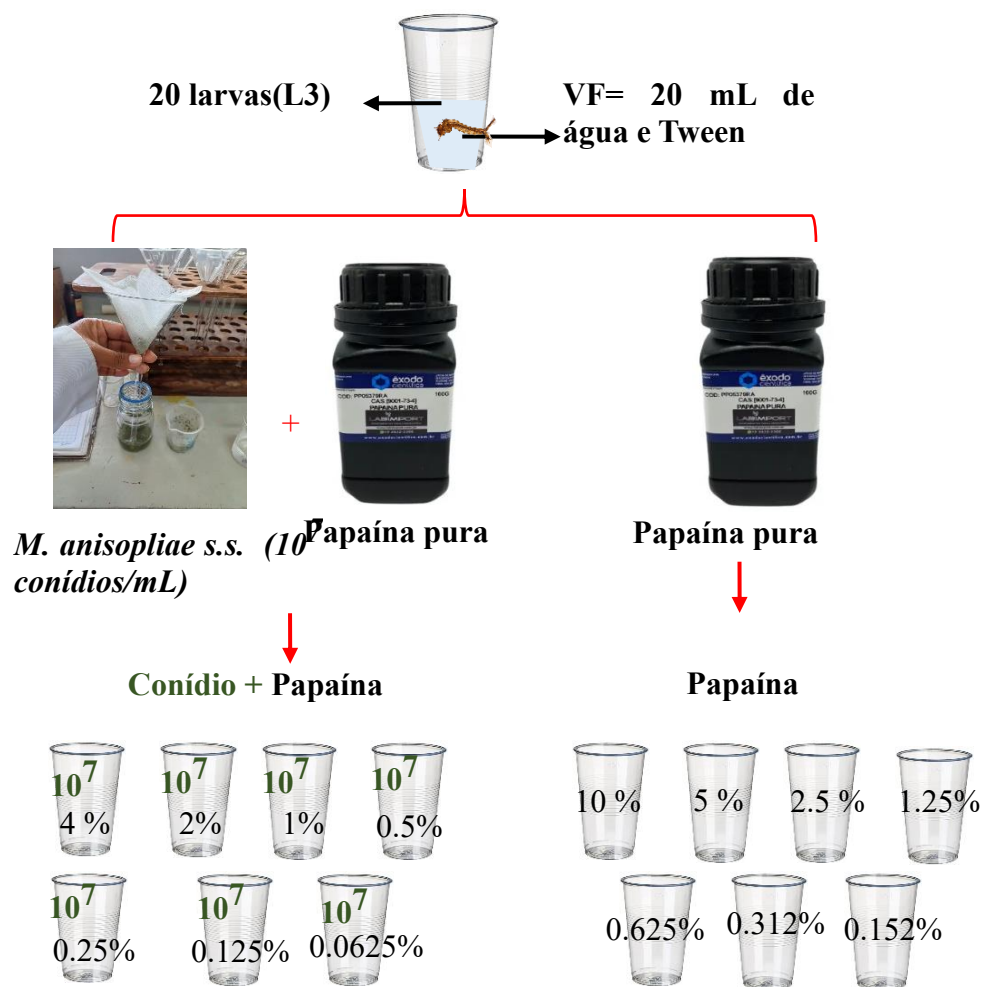
2.3.2. Ensaio CL50

A análise da atividade larvícida foi conduzida por meio de um bioensaio quantitativo seguindo as diretrizes da OMS. Com base nos resultados do 2.3.1, foram estabelecidos um grupo controle, composto por água e Tween 80 (0,01% v/v) e dois grupos tratados. O primeiro grupo tratado recebeu papaína pura em concentrações (p/v) de 10%, 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625%, 0,312% e 0,152%, e o segundo grupo tratado foi composto pela papaína combinada com

conídios de *M. anisopliae* s.s. (10^7 conídios/mL) nas concentrações (p/v) de 4%, 2%, 1%, 0,5%, 0,25%, 0,125% e 0,0625%. Para cada concentração, incluindo a do grupo controle, foi preparada com 25 mL de água da torneira e 20 larvas de terceiro estágio (L₃). Os ensaios foram realizados em triplicata. Os demais parâmetros foram iguais ao tópico 2.3.1.

As larvas foram consideradas mortas quando não puderam alcançar a superfície da solução ao agitar os copos, e também quando não mostraram sinais de movimento, mesmo após serem tocadas suavemente com um bastão de vidro. As larvas mortas foram registradas após 24, 48 e 72 horas de incubação. Caso se formassem pupas, estas foram consideradas como larvas vivas. Determinou-se a concentração necessária para alcançar a mortalidade de 50% (LC₅₀) ver (Figura 1) (Abbott 1925; Finney 1971).

Figura 1: Infográfico da metodologia do CL₅₀.



Fonte: Do autor

2.4. Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA) com níveis de significância de 1% e 5%. A diferença estatística foi avaliada pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade, utilizando o software Bioestat 5.0 (Ayres et al. 2007). Posteriormente, a média percentual de mortalidade das larvas (L₃) foi calculada conforme a seguinte equação:

$$\text{Redução (\%)} = \frac{(\bar{x} \text{ controle de larvas vivos} - \bar{x} \text{ larvas vivas do tratamento})}{\bar{x} \text{ controle larvas vivos}} \times 100$$

3. Resultados

3.1. Atividade larvicida

3.1.1. Atividade larvicida preliminar com papaína e combinado com os conídios de *Metarhizium anisopliae*

Foram realizados bioensaios com três tratamentos: conídios de *Metarhizium anisopliae* s.s., papaína e papaína mais conídios de *M. anisopliae* s.s. Os resultados mostraram que o tratamento com apenas conídios resultou em uma mortalidade de 9 % depois de 72 horas. Os tratamentos com 10% de papaína e papaína associada aos conídios não apresentaram diferenças significativas em 48 e 72 horas entre si, ambos alcançando uma mortalidade de 92% e 100% respectivamente. Na concentração de 1% de papaína associada a conídios, obteve-se uma mortalidade de 98%, enquanto com apenas papaína a mortalidade de L₃ foi de 65% em 72 horas, apresentando uma diferença estatisticamente significativa (p<0,01) (Figura 2).

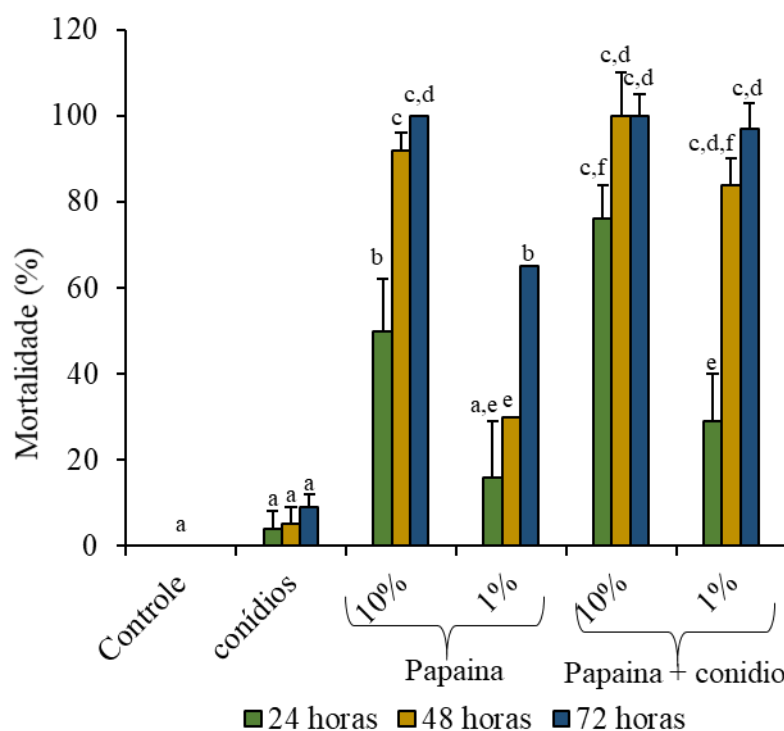


Figura 2. Determinação da concentração de papaína suplementada com conídio de *Metarhizium anisopliae*, no ensaio preliminar. Os resultados mostraram que uma concentração de 10% de papaína resulta em uma mortalidade de 100%, apresentando o mesmo efeito que uma concentração de 1% de papaína mais conídios de *M. anisopliae* s.s., após 72 horas. Não houve diferença estatística entre os tratamentos com papaína a 10% e papaína suplementada com conídios de *M. anisopliae* s.s., após 48 e 72 horas. No entanto, houve diferença estatística ($p < 0,01$) entre papaína a 1% e papaína suplementada com conídios de *M. anisopliae* s.s., após 48 e 72 horas.

3.2. Ensaio CL50

3.2.1. Papaína associada a conídios de *Metarhizium anisopliae* s.s.

Nas primeiras 24 horas, não foram registradas larvas (L_3) mortas nas concentrações de papaína + conídios de *M. anisopliae* s.s. de 0,0625 %; 0,125% e 0,25%. Ainda após 24 horas, as concentrações de papaína + conídios de *M. anisopliae* s.s. de 0,5%; 1%; 2% e 4% mostraram baixa mortalidade: 8%, 8%, 13% e 18% respectivamente.

Depois de 48 horas, pode-se observar uma porcentagem de redução significativa ($p < 0.01$) em todas as concentrações de papaína + conídios de *M. anisopliae* s.s. em relação ao controle, obtendo-se as seguintes porcentagens de mortalidade: 28% (0,0625%); 23% (0,125%); 25% (0,25%); 30% (0,5%); 28% (1 %); 62% (2%). A concentração de 4% de papaína

+ conídios de *M. anisopliae* s.s. foi a que apresentou maior porcentagem de mortalidade, de 72%.

Em relação às 72 horas, foram observadas mortalidades de: 55% (0,065%); 62% (0,125%); 63% (0,25%); 65% (0,5%); 70% (1%); 80% (2%) e 97% (4%). A combinação de papaína mais conídios de *M. anisopliae* s.s. mostrou que a compatibilidade contribuiu para a mortalidade das larvas. Houve diferenças significativas ($p < 0.01$) entre os tratamentos e as concentrações dos tratamentos (Figura 3). Além disso, em baixas concentrações de papaína ocorreu maior germinação de conídios de *M. anisopliae* (Figura 4).

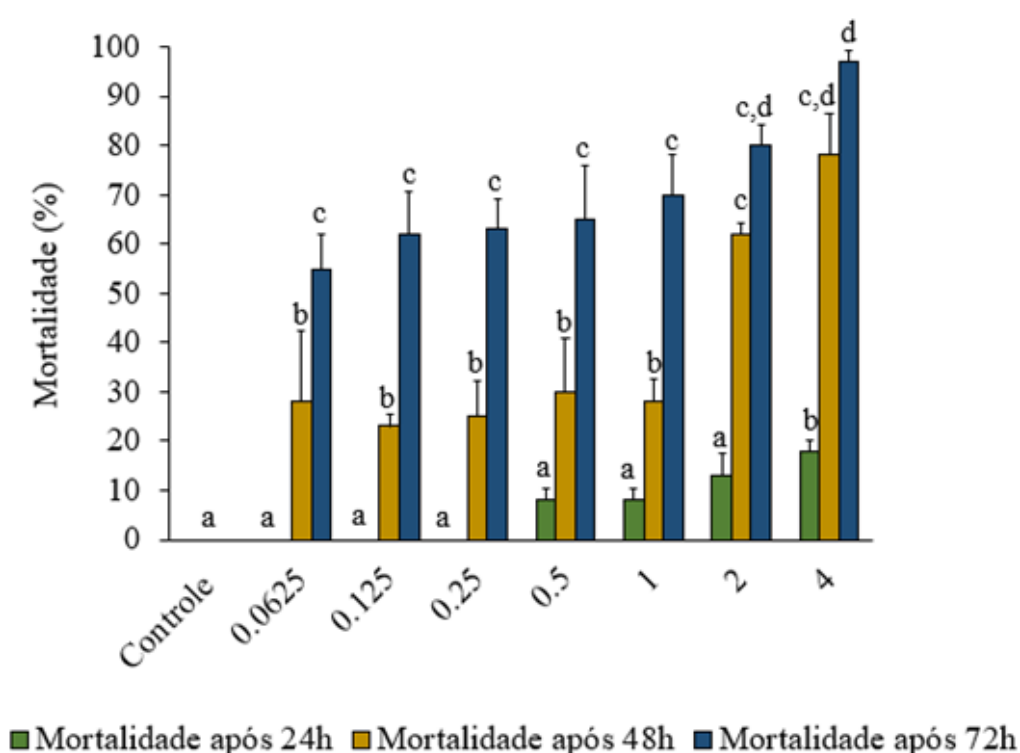


Figura 3. Mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* tratadas com papaína mais conídios de *Metarhizium anisopliae* s.s. No controle, não se observou mortalidade durante os três dias de avaliação. Nas 48 horas, nas concentrações de 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; e 1%, não foi observada diferença estatística. No entanto, após 72 horas, houve diferenças significativas em relação às primeiras 24 e 48 horas ($p < 0,01$ segundo o teste de Tukey). Não há realmente diferenças entre 2% em 72h e 4% 48h e 72h. Entretanto, 2% 72h e 4% 48h são iguais a todos os outros tratamentos após 72h ($p < 0,01$ segundo o teste de Tukey).

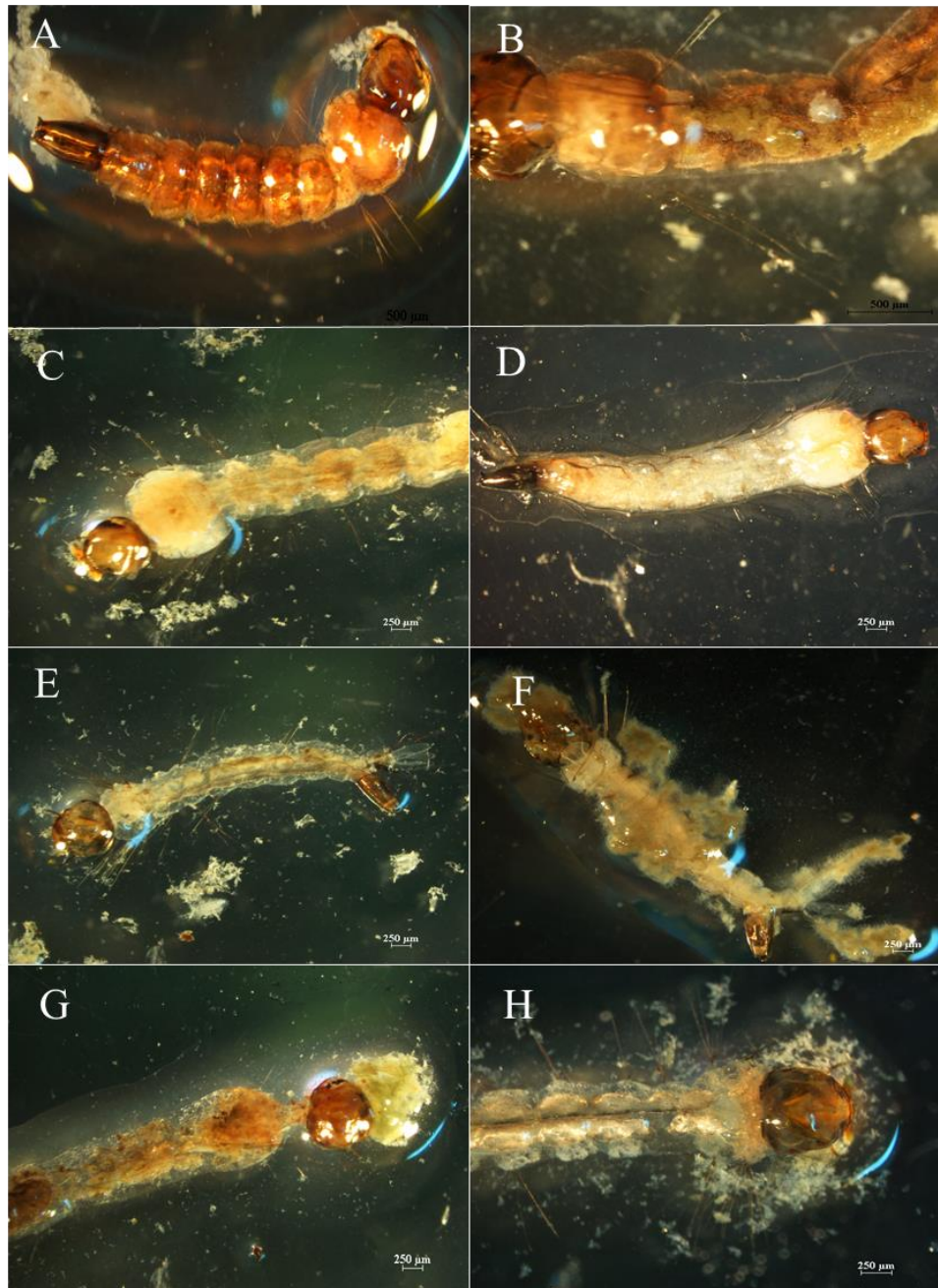


Figura 4. Larvas de *Aedes aegypti* três dias após o tratamento com papaína mais conídios de *Metarhizium anisopliae* s.s. (A: controle), (B: 0,0625%), (C: 0,125%), (D: 0,25%), (E: 0,5%), (F: 1%), (G: 2%) e (H: 4%).

Observou-se que os conídios estavam presentes na cavidade corporal das larvas e que a cavidade interna estava completamente digerida. Cabe mencionar que nas demais imagens, as larvas foram observadas ingerindo os conídios, o que pode ter contribuído para a mortalidade.

3.3. Ensaio com papaína

Foi possível observar os seguintes percentuais de mortalidade nas primeiras 24 horas de avaliação para as respectivas concentrações de papaína mostrou uma mortalidade de 3% (0,152%) e 85% (10%). Após 48 horas, os percentuais de mortalidade aumentaram significativamente, alcançando 20% (0,152%) e 100% (10%), com diferenças significativas entre as concentrações ($p < 0,01$). Este aumento é atribuído à ação da enzima, que já nas primeiras 24 horas debilitou o corpo das larvas.

Após 72 horas, os percentuais de mortalidade foram de 33% (0,152) e 100% (10%) respectivamente. Entre os tempos de 48 e 72 horas, a concentração de 5% de papaína não mostrou diferença significativa, mas houve diferença significativa entre os demais tempos e concentrações ($p < 0,01$) (Figura 5). Além disso, foram observadas diferenças na estrutura das larvas expostas às diferentes concentrações (Figura 6), onde a enzima destruiu completamente a cavidade interna das larvas.

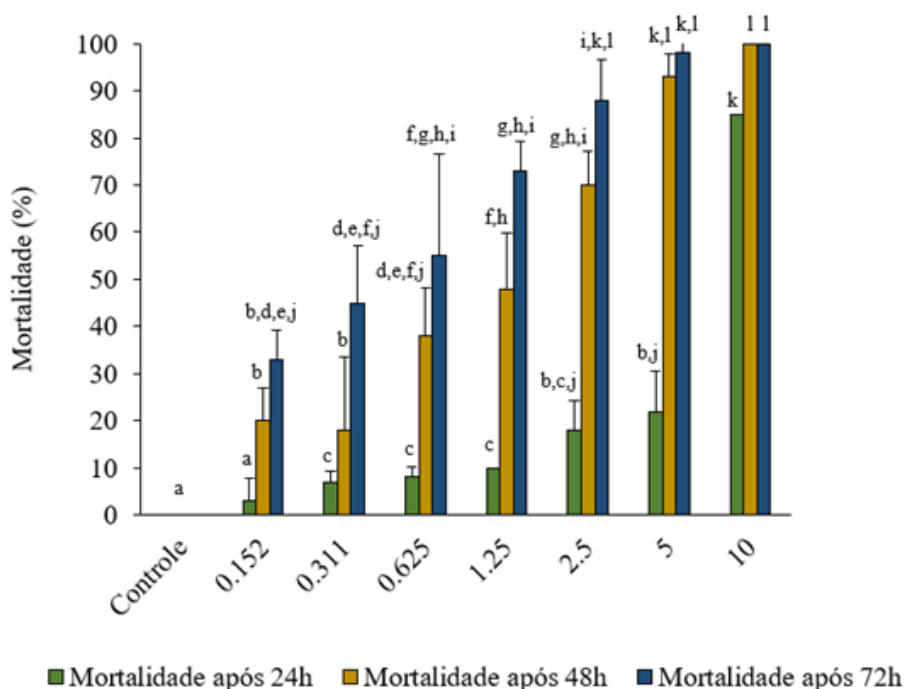


Figura 5. Mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* tratados com papaína pura. Nas primeiras 24 horas, já se observou mortalidade. Nas concentrações de 0,625% e 1,25% em 72 horas, não foram observadas diferenças significativas. Por outro lado, nas concentrações de 2,5% em 72 horas, assim como 5% e 10% em 48 e 72 horas, foram observadas diferenças significativas em relação aos outros tratamentos ($p < 0,01$ segundo o teste de Tukey).

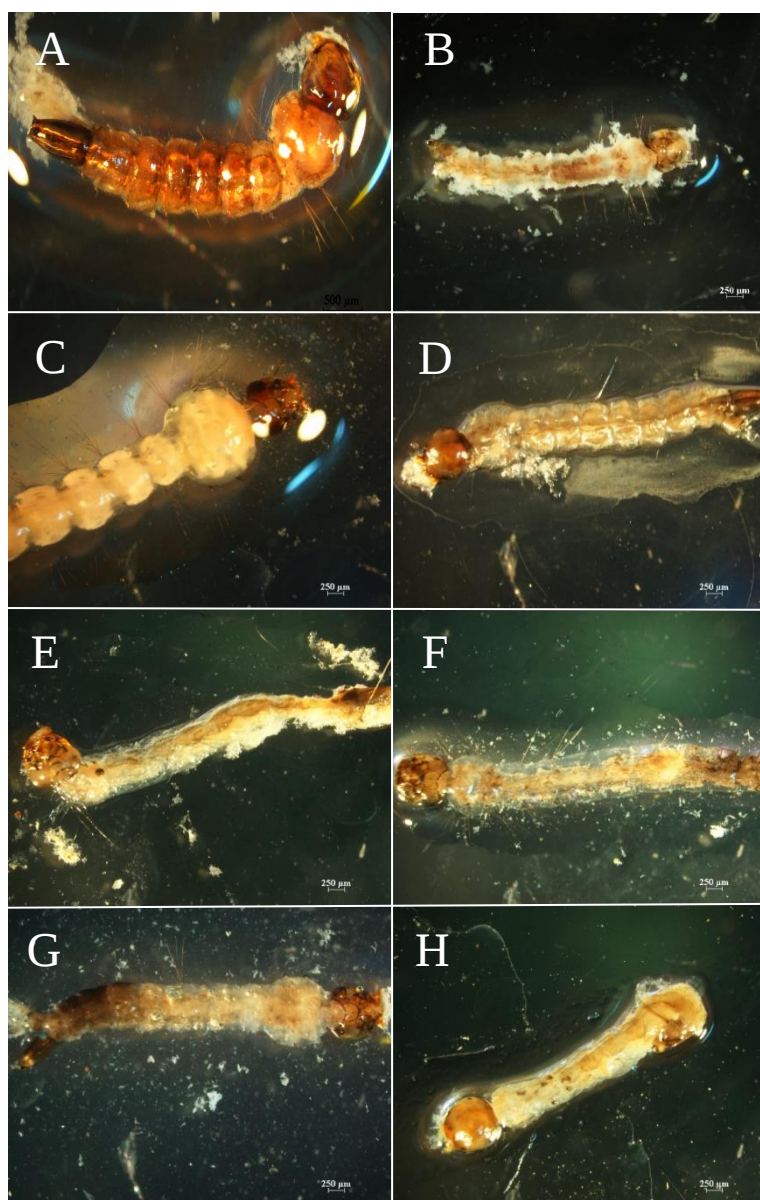


Figura 6. Larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti* três dias após o tratamento com papaína pura. (A: Controle), (B: 0.152 %), (C:0.311%), (D:0.625 %), (E:1.25 %), (F: 2.5 %), (G:5 %) e (H:10 %). Após 72 horas, foi possível observar uma coloração esbranquiçada por toda sua parte interna em relação ao controle.

Os resultados dos tratamentos que associaram enzimas e conídios foram notáveis. Observou-se que mesmo com uma baixa concentração desses compostos ao longo de um período de 72 horas, houve uma redução significativa de 97%. Além disso, foi interessante notar que as larvas consumiram ativamente os conídios como parte de sua dieta, evidenciando assim a contribuição vital desses elementos para o processo. Por outro lado, no tratamento com

papaína pura, alcançou-se uma redução ainda mais expressiva, atingindo 98% com uma concentração de 5% ao longo de 72 horas.

3.4. Determinação da CL 50

Em seguida, foi realizada a análise estatística, onde foi determinada a curva logarítmica. Tendo os valores do “y” sendo a porcentagem de mortalidade e “x” as concentrações. Tendo a equação gerada pelos valores de “y” e “x” foi calculado a concentração letal, sendo este caso (LC50) (Figura 7).

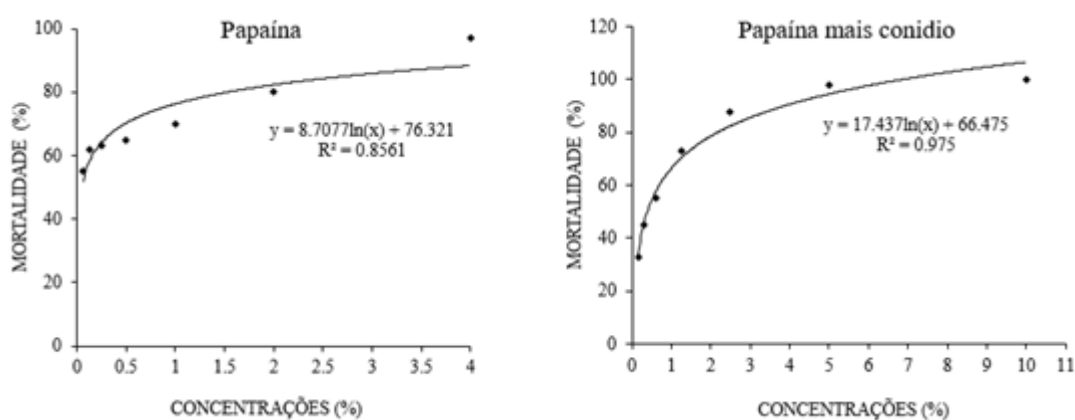


Figura 7. Concentração letal de papaína pura e suplementada com conídios de *Metarhizium anisopliae* s.s. Foram realizados bioensaios para avaliar a concentração letal de papaína pura e suplementada com conídios de *M. anisopliae* s.s contra as larvas de *Aedes aegypti*.

Para o tratamento combinando enzima e conídios, a dose letal calculada foi de 0,05% (p/v). Já para o tratamento apenas com enzima, a dose letal CL50 foi 0,39% (p/v). Isso indica que, para alcançar uma mortalidade de 50% de larvas, será necessária uma quantidade menor de papaína, onde os conídios de *M. anisopliae* atuam como um suplemento, acelerando o processo de morte das larvas (Tabela 1).

Tabela 1. Mortalidade das larvas do *Aedes aegypti* (L₃) após 72 horas de exposição a diferentes concentrações de papaína pura ou associada a conídios.

Tratamento	Concentração (p/v)	% Taxa de mortalidade (%) $\pm$ DP	LC50 (p/v)
Enzima + conídios	Controle	0	0.05
	4	97 $\pm$ 2	
	2	80 $\pm$ 4	
	1	70 $\pm$ 8	
	0.50	65 $\pm$ 11	
	0.250	63 $\pm$ 8	
	0.125	62 $\pm$ 6	
	0.0625	55 $\pm$ 7	
Enzima	Controle	0	0.39
	10	100 $\pm$ 0	
	5	98 $\pm$ 2	
	2.50	88 $\pm$ 8	
	1.25	73 $\pm$ 6	
	0.625	55 $\pm$ 22	
	0.312	45 $\pm$ 12	
	0.152	33 $\pm$ 6	

CL50: Concentração Letal 50, DP: Desvio padrão

4. Discussão

Um dos principais desafios no controle das epidemias de dengue, zika e chikungunya é relacionada se ao controle do vetor, *Aedes aegypti*. Diversas medidas de controle têm sido propostas, sendo os produtos químicos um dos métodos mais amplamente utilizados. Em um estudo recente conduzido por Cáceres et al. (2023), foram realizados bioensaios de sensibilidade com a linhagem de *A. aegypti* Ustupo, os quais revelaram uma possível resistência à deltametrina, com uma média de mortalidade de 95,3%, e à ciflutrina, com 94%. A resistência de *A. aegypti* aos inseticidas piretróides e organofosforados representa uma ameaça crescente para a sustentabilidade das estratégias dos programas de controle vetorial (Rawlins SC, 1998; Rodríguez et al., 2007), além de causar impactos adversos à saúde humana e ao meio ambiente. Diante disso, surgem propostas de medidas mais sustentáveis, como o uso de produtos biológicos, incluindo fungos entomopatogênicos e enzimas derivadas de plantas, como a papaína obtida de *Carica papaya* (Alkhaibari et al., 2016; Sousa et al., 2023; Mendonça et al., 2023).

O presente trabalho buscou combinar esses dois compostos (fungo entomopatogênico + protease) para alcançar uma maior mortalidade das larvas de *A. aegypti*. O látex do mamão é reconhecido como uma rica fonte de quatro cisteína proteinases: papaína, quimopapaína, glicilo endopeptidase e caricaína, podendo ser desenvolvido como um inseticida botânico (Anuar et al., 2008; Tyas et al., 2014).

Na pesquisa de Verisman (2006), evidenciou-se que a papaína presente na seiva do mamão é uma enzima capaz de degradar proteínas e, em concentrações específicas, pode provocar a mortalidade das larvas de *A. aegypti*. Farias et al. (2007) isolaram uma proteína das sementes de mamão que inibe *in vitro* a enzima digestiva amilase de “Gorgulho do Feijão” *Callosobruchus maculatus* (ordem:Coleoptera). *In vivo*, este inibidor reduz a longevidade e a fecundidade dos adultos e causa mortalidade larval. Em estudos realizados por Nunes et al. (2013) utilizando extratos do tegumento e cotilédones de sementes de *C. papaya*, em concentrações de 668 µg/mL e 1100 µg/mL, respectivamente, mostrando que a combinação dos dois teve uma mortalidade de 100% em 24 horas em *A. aegypti*. A eficácia do mamão foi demonstrada nos estudos mencionados, porém até o momento não foi desenvolvida uma combinação com outros produtos naturais ou micro-organismos para aumentar sua eficácia e mitigar a utilização de produtos químicos (Cáceres et al.,2023).

Atualmente, existem diferentes microrganismos que são usados como larvicidas. Dentre estes micro-organismos, podemos citar as proteínas de *Bacillus thuringiensis* que são utilizadas para controlar *A. aegypti* (Pérez et al., 2005). As microalgas, também são exploradas como alternativas para o controle de vetores. O estudo de Gil et al. (2024) utilizou *Nannochloropsis aquatica* como suplemento alimentar para larvas de *Aedes albopictus* (L₄), mostrando que as larvas ingerem microalgas, resultando em sua morte.

Um dos microrganismos mais explorados para o controle de artrópodes é o *M. anisopliae*. Os conídios são usados como larvicidas, mas sua eficácia está ligada à concentração utilizada (células/mL) e a toxicidade que a cepa apresenta. Sousa et al. (2023) utilizaram conídios de *Metarhizium humberi* IP 46 sobre ovos de *A. aegypti* e não mostraram efeito significativo nas primeiras 72 horas, utilizando uma concentração de 10⁶ células/mL. O estudo sugere que uma alta concentração de conídios poderia melhorar a efetividade. As pesquisas realizadas reforçam a busca de novas alternativas para o controle do *A. aegypti*, utilizando compostos naturais como bioinseticidas, com o objetivo de aumentar a mortalidade das larvas e mitigar a disseminação do vírus.

Rocha et al. (2024) estudaram a combinação de anis estrelado (*Illicium verum* (ordem:Austrobaileyales)) e *M. anisopliae* LCS01, e calcularam a sobrevivência das larvas de

A. aegypti em 7 dias. No primeiro ensaio, a aplicação de apenas conídios (10^8 conídios/mL) de *M. anisopliae* resultou em uma sobrevivência de 50% ao longo dos 7 dias. No entanto, ao combinar ambos os compostos, observou-se uma sobrevivência de 50% em apenas dois dias, demonstrando a efetividade da combinação.

No presente estudo, foi registrado uma mortalidade superior a 50% em três dias. Em outros estudos, Bitencourt et al. (2022) avaliaram o óleo essencial de falso pimentero (*Schinus molle* (Ordem: Sapindales)) em conjunto com conídios de *M. anisopliae* CG153 em larvas de *A. aegypti*. Foi descoberto que uma baixa concentração de *S. molle* (0,0025%) não mostrou uma interação negativa com os conídios, mas o percentual de mortalidade nas larvas não foi significativo. O risco de combinar dois compostos, é que um pode inibir o outro. No entanto, nosso trabalho demonstrou que a combinação de papaína pura e conídios de *M. anisopliae* s.s. obteve melhores resultados em comparação aos mesmo quando de forma isolada. Esta efetividade provavelmente deve-se à ação dos fungos entomopatogênicos que atuam penetrando o tegumento, chegando ao hemocele e esgotando os nutrientes do hospedeiro (Wang et al., 2017). Além disso, têm a capacidade de infectar os hospedeiros entrando através do trato digestivo, destruindo o epitélio intestinal (Bitencourt et al., 2023). Este tipo de mecanismo foi observado nos bioensaios, onde as larvas ingeriram os conídios. No entanto, poucos estudos foram realizados sobre o uso de enzimas de plantas como controle bioquímico, e a combinação de dois compostos para aumentar a atividade larvicida ainda não foi amplamente explorada.

5. Conclusão

Os resultados obtidos foram promissores, observando-se uma mortalidade de 100% com a enzima papaína e de 97% com a combinação de enzimas e conídios de *Metarhizium* em 72 horas, confirmando o grande potencial da enzima. As concentrações letais foram de 0,05% para a combinação de enzimas e conídios, e de 0,39% para a enzima isolada. A combinação de compostos naturais é um aspecto que merece ser continuamente estudado.

Os resultados são promissores para futuras investigações nos campos da biotecnologia e da saúde. Um dos pontos fundamentais é a utilização de compostos naturais que possam mitigar o uso de compostos químicos. O uso de enzimas é um campo novo, com muitas aplicações e grande potencial a ser explorado. Este trabalho é um dos primeiros a combinar esses compostos e a utilizar enzimas de papaína para o controle de *A. aegypti*.

6. Referências

- Abbot, W.S., 1925. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18, 265-267.
- Ahamad, A., Kumar, J., 2023. Pyrethroid pesticides: an overview on classification, toxicological assessment and monitoring. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 100284.
- Alkhaibari, A.M., Carolino, A.T., Yavasoglu, S.I., Maffei, T., Mattoso, T.C., Bull, J.C., Samuels, R.I., Butt, T.M., 2016. *Metarhizium brunneum* Blastospore Pathogenesis in *Aedes aegypti* Larvae: Attack on Several Fronts Accelerates Mortality. *PLoS Pathogens* 12 (7), 1-19.
- Alves, S.B.; Moino Jr, A.; Almeida, J.E.M., 1998. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ. 2, 217-238.
- Anuar, N. S., Zahari, S. S., Taib, I. A., & Rahman, M. T., 2008. Effect of green and ripe Carica papaya epicarp extracts on wound healing and during pregnancy. *Food and Chemical Toxicology*, 46(7), 2384-2389
- Ayres, M., Ayres JR, M., Ayres, D.L., Santos, A.A.S., 2007. BIOESTAT – aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Bio-Médicas. 4.
- Bitencourt, R.O.B., Faria, F.S., Marchesini, P., Santos-Mallet, J.R., Camargo, M.G., Bittencourt, V.R.E.P., Pontes, E.G., Pereira, D.B., Chaves, D.S.A., Angelo, I.c., 2022. Entomopathogenic fungi and Schinus molle essential oil: The combination of two eco-friendly agents against *Aedes aegypti* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 194, 1-12.
- Bitencourt, R.O.B., Mallet, J.R.S., Mesquita, E., Gôlo, P.S., Fiorotti, J., Bittencourt, V.R.E.P., Pontes, E.G., Angelo, I.C., 2021. Larvicidal activity, route of interaction and ultrastructural changes in *Aedes aegypti* exposed to entomopathogenic fungi. *Acta. Trop.* 213, 1-11.
- Bitencourt, R.O.B.; Santos-Mallet, J.R.; Lowenberger, C.; Ventura, A.; Gôlo, P.S.; Bittencourt, V.R.E.P.; Angelo, I.C., 2023. A Novel Model of Pathogenesis of *Metarhizium anisopliae* Propagules through the Midguts of *Aedes aegypti* Larvae. *Insects* 14 (4), 1-12.
- Caceres, L., Ayarza, C., Bernal, D., 2023. Evaluation of the biological efficacy and susceptibility in *Aedes aegypti* to the pyrethroid insecticides deltamethrin and cyfluthrin during the Zika virus outbreak in Kuna Yala, Panama. *Biomédica* 43(2), 222-243.
- Caragata, E.P., Rocha, M.N., Pereira, T.N., Mansur, S.B., Dutra, H.L.C., Moreir, L.A., 2019. Pathogen blocking in Wolbachia-infected *Aedes aegypti* is not affected by Zika and denguevirus co-infection. *PNTD* 13 (5), 1-26.
- Christophers, S.S.R., 1960. *Aedes Aegypti* (L.) The Yellow fever mosquito. The syndic of the Cambridge university press. 739.
- Falvo, M. L., Albornoz Medina, P., Rodrigues, J., López Lastra, C. C., García, J. J., Fernandes, É. K., & Luz, C., 2018. Effect of UV-B irradiation on water-suspended *Metarhizium anisopliae* sl

- (Hypocreales: Clavicipitaceae) conidia and their larvicidal activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 55(5), 1330-1333
- Farias, L.R., Souza, L.A., Pelegrini, P.B., Grossi-de-Sá, M.F., Neto, S.M., Bloch Jr, C., Laumann, R.A., Noronha, E.F., Franco, O.L., 2007. Isolation of a novel *Carica papaya* α -amylase inhibitor with deleterious activity toward *Callosobruchus maculatus*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 87 (3), 255-260.
- Fernández-Lucas, J., Castañeda, D., Hormigo, D., 2017. “New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry”. *Trends. Food. Sci. Tech.* 68, 91-101
- Ferreira, J.M., Soares, F.E.F., 2023. Entomopathogenic fungi hydrolytic enzymes: A new approach to biocontrol?. *J. Nat. Pestic. Res.* 3, 1-6.
- Gil, M. F., de la Hoz, M. F. T., Fassolari, M., Battaglia, M. E., Berón, C. M., 2024. *Neochloris aquatica* induces larval mortality, molting defects, and unstable flightless adults in the Asian tiger mosquito. *Journal of Invertebrate Pathology*, 202, 108041.
- Gomes, S.A., Carolino, A.C., Teodoro, T.B.P., Silva, G.A., Bitencourt, R.O.B., Silva, C.P., Alkhaibari, A.M., Butt, T.M., Samuels, R.I., 2023. The Potential of *Metarhizium anisopliae* Blastospores to Control *Aedes aegypti* Larvae in the Field. *J. Fungi.* 9, 1-11.
- Hicks, B.J., Watt, A.D., Cosens, D., 2001. The potential of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) as a biological control agent against the pine beauty moth, *Panolis flammea* (Lepidoptera: Noctuidae). *For. Ecol. Manag.* 149 (1-3), 275–281.
- Jones, R., Kulkarni, M. A., Davidson, T. M., Radam-Lac Research Team, & Talbot, B., 2020. Arbovirus vectors of epidemiological concern in the Americas: a scoping review of entomological studies on Zika, dengue and chikungunya virus vectors. *PloS one*, 15(2), e0220753.
- Lorenz, C., and Chiaravalloti-Neto, F., 2022. Why are there no human West Nile virus outbreaks in South America?. *The Lancet Regional Health–Americas*, 12.
- Mendonça, G. R. Q., Peters, L. P., Lopes, L. M., Sousa, A. H., & Carvalho, C. M. ,2023. Native fungi from Amazon with potential for control of *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae). *Brazilian Journal of Biology*, 83, e274954. 10.1590/1519-6984.274954
- Nunes, N.N.S., Santana, L.A., Sampaio, M.U., Lemos, F.J.A., Oliva, M.L., 2013. The component of *Carica papaya* seed toxic to *A. Aegypti* and the identification of tegupain, the enzyme that generates it. *Chemosphere* 92 (4), 413-420.
- Parra, M.C.P., Lorenz, C., Milhim, B.H.G.A., Dibo, M.R., Guirado, M.M., Chiaravalloti-Neto, F., Nogueira, L.M., 2022. Detection of Zika RNA virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes, Sao Paulo, Brazil. *Infect. Genet. Evol.* 98, 1-7.
- Pérez, C., Fernandez, L.E., Sun, J., Folch, J.L., Gill, S.S., Soberon, M., Bravo, A., 2005. *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *PNAS* 102 (51), 18303–18308.
- Powell, J.R., Gloria-Soria, A., Kotsakiozi, P., 2018. Recent History of *Aedes aegypti*: Vector Genomics and Epidemiology Records. *BioScience* 68 (11), 854-860.

- Procopio, A. C., Colletta, S., Laratta, E., Mellace, M., Tilocca, B., Ceniti, C., Urbani A., Roncada, P. (2024). Integrated one health strategies in Dengue. *One Health*, 100684.
- Proscopio, A.C., Colletta, S., Laratta, E., Mellace, M., Tilocca, B., Ceniti, C., Urbani, A., Roncada, P., 2024. Integrated One Health strategies in Dengue. *One Healt* 18, 1-7.
- Ranson, H., Lissenden, N., 2016. Insecticide Resistance in African Anopheles Mosquitoes: A Worsening Situation that Needs Urgent Action to Maintain Malaria Control. *Trends. parasitol.* 32 (3), 187-196.
- Rawlins, S.C., 1998. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. *Rev. Panam. Salud Publica.* 4 (4), 243-251.
- Rocha, I.U., Bitencourt, R.O.B., Freitas, A.M., Moreira, H.V.S., Magalhaes, K.L.A., Souza, B.A., Gôlo, P.S., Chaves, D.S.A., Bittencourt, V.R.E.P., Amgelo, I.C., 2024. Exploiting the combination of entomopathogenic fungi and Illicium verum essential oil against *Aedes aegypti* larvae. *Biol. Control.* 193 (3), 1-10.
- Rodriguez, M.M., Bisset, J.A., Fernández, D., 2007. Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from some Latin American Countries. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* 23 (4), 420-429.
- Smith, L.B., kasai S., Scott, J.G., 2016. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. *Pestic. Biochem. Physiol.* 133, 1-12.
- Sousa, N.A., Rodrigues, J., Luz, C., Humber, R.A., 2023. Exposure of newly deposited *Aedes aegypti* eggs to *Metarhizium humberi* and fungal development on the eggs. *J. Invertebr. Pathol.* 197. 1-7.
- Thomas, M., Read, A., 2007. Fungal bioinsecticide with a sting. *Nat Biotechnol* 25, 1367–1368
- Tyas, D.W., Wahyuni, D., Hariyadi, S., 2014. Perbedaan toksisitas ekstrak, rebusan dan rendaman daun pepaya (*Carica papaya* L.) terhadap mortalitas larva nyamuk *Aedes aegypti* L. *Pancaran Pendidikan* 3(1), 59-68.
- Umaru, F.F., Simarani, K., 2022. Efficacy of Entomopathogenic Fungal Formulations against *Elasmolomus pallens* (Dallas) (Hemiptera: Rhyparochromidae) and Their Extracellular Enzymatic Activities. *Toxins* 14 (9), 1-14.
- Verisman, I., 2006. Perbandingan efektivitas abate dengan papain dalam menghambat pertumbuhan larva *Aedes aegypti*. 1-13
- Vontas, J., Ranson, H., Alphey, L., 2010. Transcriptomics and disease vector control. *BMC Biology* 8, 1-3.
- Wang, Y., Jiang, H., Cheng, Y., An, C., Chu, Y., Raikhel, A.S., Zou, Z., 2017. Activation of *Aedes aegypti* prophenoloxidase-3 and its role in the immune response against entomopathogenic fungi. *Insect. Mol. Biol.* 26 (5), 552-563.
- Wang, Y.H., Chang, M.M., Wang, X.L., Zheng, A.H., Zou, Z., 2018. The immune strategies of mosquito *Aedes aegypti* against microbial infection. *Dev. Comp. Immunol.* 83, 12-21.

Anexo 1: Artigo Publicado

Journal of Natural Pesticide Research 8 (2024) 100077



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Natural Pesticide Research

journal homepage: www.journals.elsevier.com/journal-of-natural-pesticide-research

Enzyme production by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and their application in the control of nematodes (*Haemonchus* spp. and *Meloidogyne incognita*) *in vitro*

Liseth Bibiana Puentes Figueroa^{a,1}, Ruth Celestina Condori Mamani^{a,1},
 Debora Castro de Souza^a, Jhennifer Cristina de Souza Alves^a, Stefany Amorim de Souza^a,
 Cecilia Baldoino Ferreira^a, Tiago Facury Moreira^c, Willian César Terra^b, Filipe Elias de
 Freitas Soares^{a,*}

^a Department of Chemistry, Laboratory of Biochemistry and Applied Biotechnology, Federal University of Lavras, Brazil

^b Department of Phytopathology, Laboratory of Nematology, Federal University of Lavras, Brazil

^c School of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Clinical and Surgery, Federal University of Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Beauveria bassiana
Metarhizium anisopliae
 Protease
 Chitinase
 Nematicidal activity

ABSTRACT

Brazil is affected by the infection of gastrointestinal nematodes (*Haemonchus* spp.) because it causes subclinical diseases in small ruminants that directly affect weight and milk production and, in turn, generate a health risk for the animals. In the same way root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*) is a serious disease, which parasitize the roots of tomato plants causing damage such as poor nutrient absorption leading to significant yield losses. In order to minimize the economic impact of these nematodes, it is important to establish new control strategies. *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* are two main mycoinsecticides used to control many orders of insects, such as Lepidoptera and Hemiptera. These fungi have the ability to produce extracellular enzymes, which play an important role to control in the pest infection process. The aim of this study was to evaluate the production of proteases and chitinases by the entomopathogenic fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae* on different solid and liquid culture media and their application *in vitro* to the control of *Haemonchus* spp and *Meloidogyne incognita*. To achieve this goal, enzymes were produced under solid and liquid fermentation conditions to determine the highest chitinolytic and proteolytic activity of commercial two strain of *B. bassiana* (IBCB 66 and ESALQ PL63) and *M. anisopliae* (IBCB 425 and ESALQ E9) in liquid media: SDY broth, YPG culture medium, synthetic, and soluble starch with yeast extract. The solid media tested were: rice supplemented with whey and chrysalis flour mixed with rice. In addition, the nematicidal action of their extracts (containing concentrated enzymes and without fungal cells) was measured. The results showed that the best culture medium ($p < 0.01$) for protease was solid serum rice medium, with a value for *M. anisopliae* IBCB 425 of 52 U/mg, and for *B. bassiana* ESALQ PL63 the value was 36 U/mg, compared to all the tested media. On the other hand, for chitinase of *M. anisopliae* strain IBCB 425, the activity value was close to 0.60 U/mg. In contrast, for *B. bassiana* isolate ESALQ PL63, SDY medium was the best inducer for chitinase production, with a value of 0.90 U/mg. Regarding the nematicidal activity of the crude extracts, the reduction percentages were 58% for ESALQ PL63 and 100% for IBCB 425 in the case of animal parasites. For plant parasites, the reduction percentages were 19% for ESALQ PL63 and 71% for IBCB 425. Thus, the use of enzyme-rich crude extracts presents promising control options for pest control.

1. Introduction

Throughout history, many species of plant- and animal-parasitic

nematodes have caused a range of problems, including disrupting the flow of nutrients to the plant, which can lead to reduced crop growth and yield, and causing anemia, weight loss, and death in infected

* Corresponding author.

E-mail address: filipe.soares@ufla.br (F.E.F. Soares).

¹ These authors contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.napere.2024.100077>

Received 30 October 2023; Received in revised form 14 March 2024; Accepted 23 March 2024

Available online 27 March 2024

2773-0786/© 2024 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

animals. These damages have severely impacted human society through their negative impacts on food production and economic development (He et al., 2021). In this context, agriculture and livestock production relies on pesticides and anthelmintics to maintain productivity. However, the improper use of these products can lead to damage to the ecosystem and human health, as they produce toxic residues that can contaminate soil, water, and food, and can select resistant pests (Fletcher et al., 2020). Therefore, it is necessary to develop new nematode control strategies that are more sustainable and less harmful to the environment (Viera and Jackson, 2020; He et al., 2021; Omar et al., 2021).

Among the advantages of the use of entomopathogenic fungi, it is important to highlight the efficiency in the control of insect pests. This allows the use of this technology to increase plant defenses through the induction of systemic resistance. These characteristics make entomopathogenic fungi excellent biological control agents (Julius et al., 2020; Gebremariam et al., 2022).

The fungal species *B. bassiana* and *M. anisopliae* have been widely used in commercial formulations of biological products for the control of insect pests. These fungi have the ability to produce enzymes and secondary metabolites that have played an important role in the infection process of insects, arachnids, and mites (Ebani and Mancianti, 2021; Soares et al., 2023). The infection mechanism of *B. bassiana* and *M. anisopliae* on their hosts has depended on the combined action of two processes: the mechanical one, due to the pressure of the appressorium that breaks the membranous or slightly sclerotic areas of the cuticle, and the biochemical one, resulting from the secretion of extracellular hydrolytic enzymes such as proteases (EC 3.4) and chitinases (EC 3.2.11.14) that act in the degradation of the cuticle, facilitating the penetration of the fungus into the insect's hemolymph (Srivani and Jalaja, 2022).

A large part of these damages is attributed to root-knot nematodes (RKNs) (*Meloidogyne* spp.), which are soil-borne pathogens with a wide range of hosts, worldwide distribution, and high reproductive capacity. Chemical nematicides were a practical solution for RKNs control. However, traditional chemical compounds, e.g., methyl bromide and organophosphates, have been withdrawn from the market (U.S. Environmental Protection Agency, 2008; Zasada et al., 2010).

Intestinal nematodes are another problem affecting the livestock sector, when uncontrolled, they can lead to losses of 30–40% in animal performance (Lino et al., 2016). In addition, the main nematodes affecting small ruminants and of major economic importance are *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus axei* (Silva et al., 2017). Moreover, *Haemonchus* sp. is the genus with the highest prevalence, corresponding to levels above 80% in the parasitic loads of small ruminants (Amarante and Oliveira, 2007; Da Silva et al., 2018).

There has been consensus that the application of entomopathogenic fungi is a sustainable alternative to the use of synthetic insecticides (Baruah and Deka, 2017; Ferreira and Soares, 2023). In addition, these microorganisms have shown great biotechnological potential, particularly due to the production of enzymes with cuticle degradation capacity. At this point, it is worth mentioning that nematodes as well as insects have been part of the superphylum Ecdysozoa, a major animal clade that unites all molting animals (Dunn et al., 2008). Therefore, the aim of this study was to evaluate the production of protease and chitinase extracellular by the entomopathogenic fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae* from different culture media and their application in the control of animal and plant parasitic nematodes.

2. Material and methods

2.1. Strain and collection of inoculum

The strain of *M. anisopliae* and *B. bassiana* used in the experiments were obtained from commercial products. *M. anisopliae* IBCB 425 and *B. bassiana* IBCB 66 were supplied by Nitro Agro as Metarril® and

Bouveriz®, respectively. *M. anisopliae* ESALQ E9 and *B. bassiana* ESALQ PL63 were purchased by the company Koppert as Metarril® and Boveril®, respectively.

These strains were inoculated on Petri dishes containing 2.0% Potato Dextrose Agar (PDA) at 25±1°C in the dark for 10 days. A sterile aqueous solution of Tween 80 at 0.040% (v/v) was added to each inoculated plate and an aliquot from each plate was used to count the number of conidia in the Neubauer chamber to obtain a concentration of 10⁷ conidia/mL. After this procedure, the conidia suspension was inoculated into liquid and solid media to initiate enzyme production of extracellular enzymes such as proteases and chitinases.

3. Enzyme production

All assays were performed with at least three replicates. All culture media have been autoclaved prior to inoculation of conidia.

3.1. Preparation of liquid culture media

3.1.1. Soluble starch with Yeast extract

The production of the liquid culture medium was performed based on the methodology of Kim et al. (2011) was used, an aliquot of 0.50 mL of conidia, was inoculated into flasks containing 50 mL of medium composed of soluble starch and yeast extract, both at concentrations of 10 g/L, with an initial pH equal to 6.00. All flasks were incubated at 27 ± 1°C for 4 days with constant rotation at 150 rpm.

3.1.2. Synthetic culture medium

Synthetic culture medium was used for growth of the isolates according to Bhadani et al. (2021). A 0.50 mL aliquot of conidia, prepared as described in the strain section, was inoculated into flasks containing 50 mL of medium composed of: KH₂PO₄ 1.0 (g/L), K₂HPO₄ 0.50 (g/L), MgSO₄ 0.50 (g/L), FeSO₄·7H₂O 0.20 (g/L), ZnSO₄·7H₂O 3.34 (g/L), CuSO₄·5H₂O 0.020 (g/L), NaCl 0.48 (g/L), dextrose (2% w/v), yeast extract (1% w/v), casein (1% w/v), at an initial pH of 6.00. The flasks were subjected to rotary shaking at 150 rpm and incubated at 27±1°C for 4 days.

3.1.3. SDY broth (starch, dextrose, and yeast extract)

SDY broth was prepared according to the methodology of Dhar and Kaur (2010). A 0.50 mL aliquot of conidia, prepared as described in the strain section, was inoculated into flasks containing 50 mL of medium composed of (w/v): dextrose (4.0%), peptone (1.0%) and yeast extract (1.0%), for three days. Subsequently, after the growth of the mycelia, an aliquot of 0.50 mL of these fungal structures was collected and inoculated into flasks containing 50 mL of induction medium composed of casein (1.0%) (w/v). The initial pH of the culture media was adjusted to 8.00 and the cultures were incubated at 27±1°C and 150 rpm for three days.

3.1.4. YPG (Yeast extract, peptone and glucose)

YPG broth was prepared according to the methodology of Nahar et al. (2004). A 0.50 mL aliquot of conidia, prepared as described in the strain section, was inoculated into flasks containing 50 mL of medium composed of (w/v): yeast extract (0.30%), peptone (0.50%) and glucose (1.0%), at 150 rpm, 27±1°C, for 3 days as pre-enrichment. Similarly, a chitin-containing medium was used for the induced production of chitinases, having as composition: KH₂PO₄ 3.0 (g/L); K₂HPO₄ 1.0 (g/L); MgSO₄ 0.7 (g/L); NaCl 0.50 (g/L); CaCl₂ 0.50 (g/L); yeast extract 0.50 (g/L); peptone 0.50 (g/L); and chitin 5.0 (g/L). The initial pH of the medium was 5.50, and the cultures were incubated at 27±1°C and 150 rpm for a period of 3 days.

3.1.5. Extraction of enzymes from liquid culture media

The liquid culture media were vacuum filtered using Whatman paper No. 4. The filtrate was then centrifuged at 10,000 x g for 15 min (Kim

et al., 2011). The supernatant collected from each culture medium was termed as crude extract for each of the strain and used in the subsequent assays. These extracts contained concentrated enzymes and without fungal cells.

3.2. Preparation of solid culture media

3.2.1. Rice with silkworm chrysalis flour (*Bombyx mori*)

For the preparation of the solid medium, the methodology described by Santoro et al. (2005) was used. An aliquot of 0.50 mL of conidia, prepared as described in the strain section, was inoculated into flasks containing 50 g of precooked rice and 50 g of silkworm (*Bombyx mori*) meal. The samples were kept in a BOD incubator under light conditions at $27 \pm 1^\circ\text{C}$ for 25 days.

3.2.2. Rice with whey

Another culture medium was used for enzyme production, supplemented with whey. The preparation of the medium was adapted from Santoro et al. (2005). A 0.50 mL aliquot of conidia, prepared as described in the strain section, was inoculated into flasks containing 40 g of precooked rice and 20 mL of whey. The samples were kept in a Biochemical Oxygen Demand (BOD) incubator under light conditions at $27 \pm 1^\circ\text{C}$ for 10 days. It was necessary to homogenize the samples every three days to disperse the conidia in order to improve contact and germination.

3.2.3. Extraction of enzymes from the solid culture media

The samples were homogenized with sterile distilled water, stirred for a period of 2 hours, and vacuum-filtered using Whatman paper No. 4. The filtrate was then centrifuged at $10,000 \times g$ for 15 min (Kim et al., 2011). The collected supernatant was termed crude extract for each of the strain and used in the subsequent assays. These extracts contained concentrated enzymes and without fungal cells.

4. Enzyme activity

4.1. Total protease activity

The proteolytic activity of the crude extracts was measured according to Soares et al. (2013). For *B. bassiana*, the conditions were 37°C and pH 7.15. For *M. anisopliae*, the conditions were 37°C and pH 8.00. A reaction zero was prepared under the same conditions as the enzyme assay; however, the reaction was stopped by TCA, trichloroacetic acid, 10% (w/v) before insertion of the enzyme-containing extract. One protease unit was defined as the amount of enzyme required to release 1.0 μg of tyrosine per minute under the assay conditions.

4.2. Total chitinase activity

The chitinase activity of crude extracts was measured by the quantification of reducing sugars (Miller, 1959). For *B. bassiana*, the conditions were 37°C and pH 7.15. For *M. anisopliae*, the conditions were 37°C and pH 5.35. One unit of chitinase activity was defined as the amount of enzyme required to release 1.0 μM of N-acetylglucosamine per minute under the assay conditions.

4.3. Determination of total protein

Total protein concentration was estimated according to the method of Bradford (1976), in which bovine serum albumin (BSA) was used as a standard.

4.4. Specific activity

The specific activity of enzymes was calculated by dividing the obtained value of enzyme activity with the measured value of total proteins

and was expressed as U/mg protein.

4.5. Collection of nematodes

4.5.1. Collection of animal parasitic nematodes

Infective larvae (J_2) of nematodes belonging to *Haemonchus* spp. (~70%) and trychostrongylid (~30%) were collected at the Veterinary School of the Federal University of Minas Gerais (UFMG) in the city of Belo Horizonte, obtained from naturally infected goat (*Capra aegagrus hircus*) feces (Soares et al., 2019).

4.5.2. Collection of plant-parasitic nematodes

Meloidogyne incognita was identified and characterized according to the vertical electrophoresis modified methodology by Ornstein (1964) and Davis (1964). *M. incognita* was multiplied in tomato plants (*Solanum lycopersicum*), cultivar Santa Clara, in the greenhouse. The eggs were extracted from tomato roots using the technique described by Hussey and Barker (Boneti and Ferraz, 1981). The (J_2) were obtained using the Baermann funnel technique (Baermann, 1917). For the *in vitro* assays, (J_2) collected 48 hours after the establishment of the hatching chamber were used. The (J_2) hatched 24 hours after the start of the hatching chamber were discarded.

4.5.3. *In vitro* nematocidal assays

The analysis of nematocidal activity was carried out using enzymes produced by *B. bassiana* and *M. anisopliae*, forming three experimental groups: one control group and two treated groups (Soares et al., 2013). The control group was treated with: 60 μL of distilled water and 60 μL of a suspension containing approximately 30 nematodes. About 30 nematodes were treated with denatured crude extract of enzyme (boiled at 100°C for 2 hours) 60 μL of denatured extract and 60 μL of suspension of nematodes. The group treated with active enzyme extract was formed by: 60 μL of active enzyme extract and 60 μL of a suspension containing about 30 nematodes. All groups were incubated for a period of 24 hours, at 27°C in the dark.

Finally, the number of viable nematodes was counted by optical microscopy according to the methodology of Soares et al. (2013). The procedure was carried out with the enzymatic extracts, using the culture media that produced the highest proteolytic activity, for each of the evaluated isolates of *B. bassiana* and *M. anisopliae*. The assay was performed with *Haemonchus* spp. (~70%), trychostrongylid (~30%) and *Meloidogyne incognita*.

4.6. Statistical analysis

The data obtained were statistically interpreted by ANOVA at significance levels of 1 and 5%. The efficiency of nematode destruction, in comparison with the control, was performed by Tukey's test at 1% probability, using the Bioestat 5.0 software (Ayres et al., 2003). Subsequently, the average percentage of nematode reduction was calculated according to the following equation:

$$\text{Reduction (\%)} = \frac{(\bar{x} \text{ control live nematodes} - \bar{x} \text{ live nematodes from treatment})}{\bar{x} \text{ control live nematodes}} \times 100$$

5. Results

5.1. Enzyme production and activity

The results obtained from the total protease activity test for the different commercial strain of *M. anisopliae* IBCB 425 and *M. anisopliae* ESALQ E9 using rice with whey (52 U/mg) medium demonstrated a significant difference ($p < 0.01$) compared to all the media of the experiments (Fig. 1).

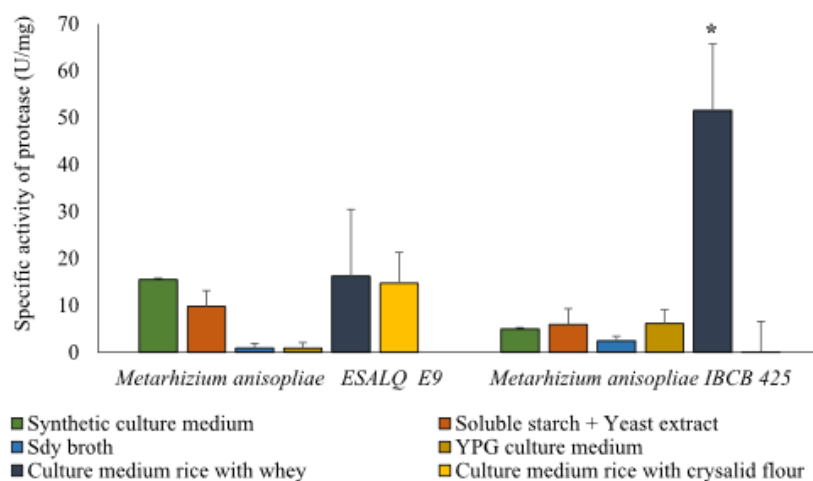


Fig. 1. Specific activity of protease (U/mg) from *Metarhizium anisopliae* strain IBCB 425 and *M. anisopliae* strain ESALQ E9. **Metarhizium anisopliae* protease production in culture medium rice with whey showed a significant difference according to Tukey's statistical test of ($p < 0.01$) in relation to *Metarhizium anisopliae* ESALQ E9 and among the other culture media evaluated.

In the case of the results obtained from the total protease activity test for the commercial strain of *B. bassiana*, they recorded a significant difference ($p < 0.01$) for the production of protease by *B. bassiana* ESALQ PL63 using the rice medium with whey (36 U/mg) compared to all the media tested, including those evaluated for *B. bassiana* IBCB 66 (Fig. 2).

Regarding the results obtained from the total chitinase activity test, the strain of *M. anisopliae* ESALQ E9 in the culture medium of rice with whey produced the highest amount of chitinase, presenting a significant difference ($p < 0.01$) to the other culture media tested, including those evaluated for *M. anisopliae* IBCB 425, with an activity value close to 0.60 U/mg (Fig. 3).

However, the specific activity for the *B. bassiana* strain ESALQ PL63, in the SDY broth medium produced a crude extract with 0.90 U/mg, a value higher than the other media (Fig. 4). The difference was significant ($p < 0.01$) in relation to the activity values of the other culture media tested, including those evaluated for *B. bassiana* IBCB 66.

5.2. Nematicidal activity

The crude extracts with the highest specific protease activity produced by the strain of *B. bassiana* ESALQ PL63 and *M. anisopliae* IBCB 425 were selected for the nematicidal assays.

For the assay with goat parasitic nematodes (J_2), for *B. bassiana* ESALQ PL63, a statistical difference ($p < 0.01$) was observed (Fig. 5) for the active extract in comparison to the control and the denatured group. The percentages of reduction were obtained: 30% denatured and 58% crude extract. Regarding the strain of *M. anisopliae* IBCB 425, statistical differences ($p < 0.01$) of the active extract were obtained compared to the control and the denatured group. The following percentages of reduction were obtained: 33% denatured and 100% crude extract.

Using the same extracts, the nematicidal activity on (J_2) of *M. incognita* was evaluated. The crude extract with higher proteolytic activity produced by *M. anisopliae* IBCB 425 was significantly ($p < 0.01$) superior in causing mortality to (J_2) of *M. incognita* compared to the

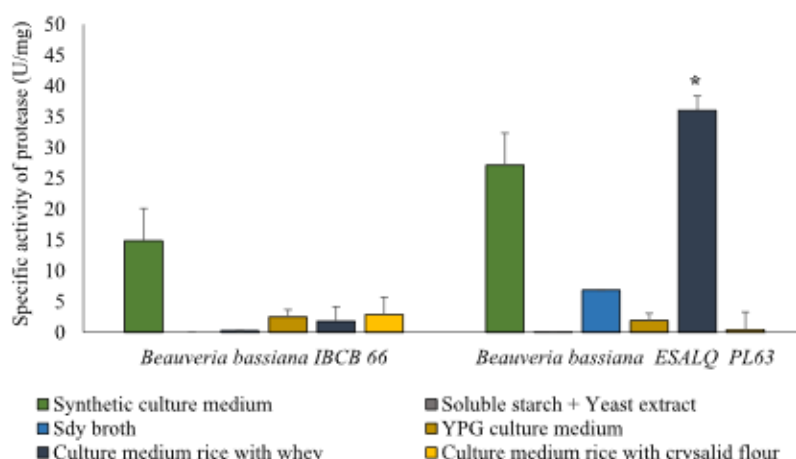


Fig. 2. Specific activity of protease (U/mg) from *Beauveria bassiana* strain IBCB 66 and *B. bassiana* strain ESALQ PL63. **Beauveria bassiana* IBCB 66 protease production in culture medium rice with whey showed a significant difference according to Tukey's statistical test of ($p < 0.01$) in relation to *Beauveria bassiana* ESALQ PL63 and among the other culture media evaluated.

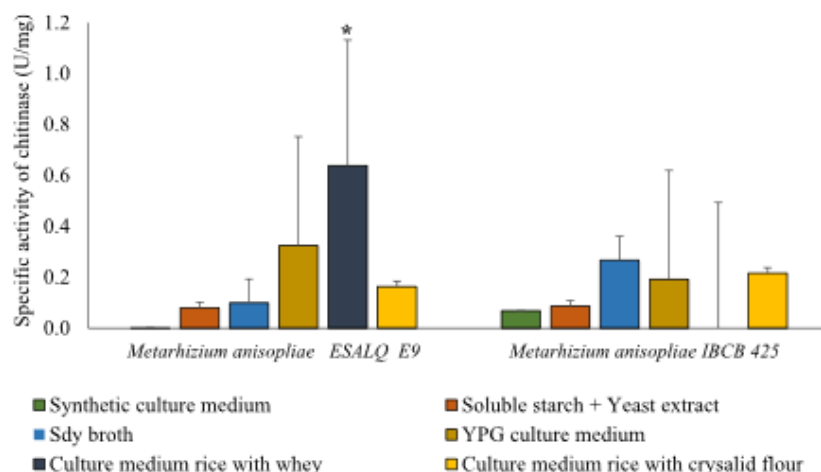


Fig. 3. Specific activity of chitinase (U/mg) from *Metarhizium anisopliae* strain IBCB 425 and *M. anisopliae* strain ESALQ E9 using liquid and solid culture media. **Metarhizium anisopliae* ESALQ E9 chitinase production in culture medium rice with whey showed a significant difference according to Tukey's statistical test of ($p < 0.01$) in relation to *Metarhizium anisopliae* IBCB425 and among the other culture media evaluated.

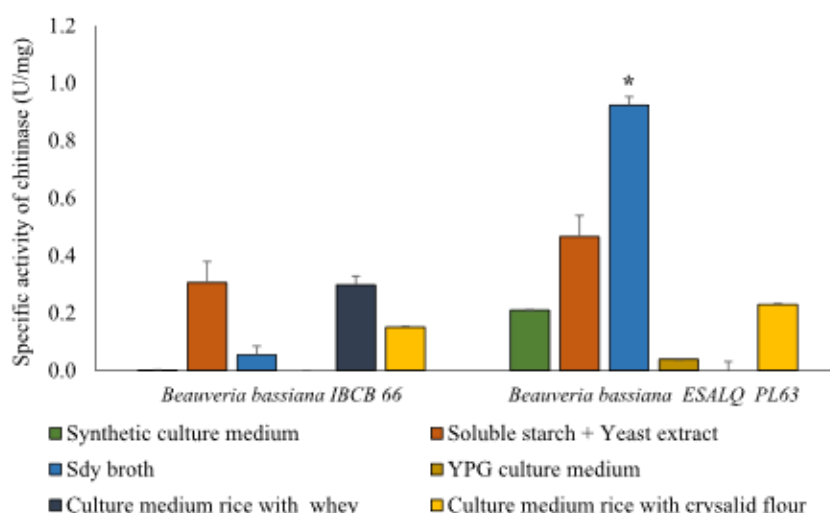


Fig. 4. Specific activity of chitinase (U/mg) from *Beauveria bassiana* strain IBCB 66 and *B. bassiana* strain ESALQ PL63 using liquid and solid culture media. **Beauveria bassiana* ESALQ PL63 chitinase production in SDY broth showed a significant difference according to Tukey's statistical test of ($p < 0.01$) in relation to *Beauveria bassiana* IBCB 66 and among the other culture media evaluated.

control and denatured extract. *M. anisopliae* IBCB 425 caused mortality of 34% and 71%, respectively, in the population of (J_2) of *M. incognita* (Fig. 6).

On the other hand, the crude and denatured extracts produced by *B. bassiana* ESALQ PL63 showed the same effect ($p > 0.01$) on the (J_2) of *M. incognita* as control. The percentages of reduction for this isolate were: denatured extract (17%) and active (19%) in contrast to the control.

The digestive action of proteases on juvenile cuticles and contents is shown in Fig. 7.

6. Discussion

The strains of the entomopathogenic fungi *M. anisopliae* IBCB 425 and ESALQ E9 and of *B. bassiana* IBCB 66 and ESALQ PL63 used in the

present study produced protease and chitinase, reaching high level of enzymatic activity. Furthermore, our result showed that after the evaluation of different culture media, for all isolates tested the medium rice whey medium was the one that induced the highest protease production.

Rice is the most widely used substrate in the industrial process of fungal multiplication. This medium is inexpensive and has positive effects on fungal germination, providing a surface area that allows rapid fungal colonization and has the capacity to absorb moisture, contributing to faster germination and high conidial viability (Taylor et al., 2013).

In addition, this medium allows *B. bassiana* strain to produce protease and chitinase, as demonstrated in the study of Kim et al. (2013). However, the present study highlights for the first time that rice medium supplemented with whey is an excellent culture medium for the production of proteases and chitinases by commercial strain of *M. anisopliae*.

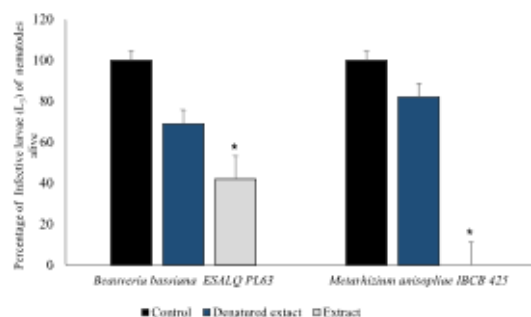


Fig. 5. Average percentages of infective larvae (L_4) of nematodes *Haemonchus* spp. (~70%) and trychostrongylid (~30%) recovered in the two treated groups (extract from *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 and *Beauveria bassiana* ESALQ PL63; denatured extract) and one control group (containing only distilled water and infective larvae of nematodes L_4) after incubation for 24 hours at 27°C. The treatments represented with an asterisk (*) showed a significant difference ($p < 0.01$) in relation to the extracts group and the control group by the Tukey test.

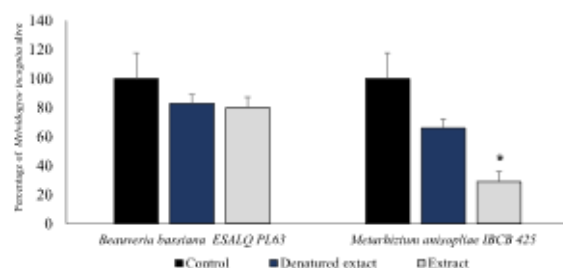


Fig. 6. Percentages of second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita* alive after exposure for 24 h at 27°C (to the extract produced by *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 and *Beauveria bassiana* ESALQ PL63; denatured extract) and one control group (containing only distilled water and *M. incognita*). The treatments represented with an asterisk (*) showed a significant difference ($p < 0.01$) in relation to the extracts group and the control group by the Tukey test.

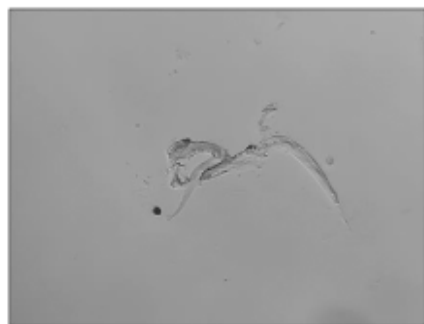


Fig. 7. Digestive action of proteases present in the crude extract produced by *Metarhizium anisopliae* (IBCB 425) on the cuticles and contents of second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita*.

and *B. bassiana*.

Whey is a by-product of the dairy industry that is often considered a waste product. However, when processed, whey can be used as a high-value substrate in microbial fermentations that utilize lactose (Mehri et al., 2021). Through these results, it is possible to affirm that the nutritional source of whey used in the preparation of the solid medium

for the strain of *M. anisopliae* ESALQ E9 provides greater productivity of enzymes with chitinolytic activity when they are inoculated on rice, which is the majority carbon source.

On the other hand, the strain of *B. bassiana* ESALQ PL63 used in the present study produced high levels of chitinolytic activity in the culture medium containing SDY broth. One of the main nitrogen sources of this medium besides peptone is yeast extract, as well as for those evaluated in the different isolates in starch medium and YPG (Montesinos-Matías et al., 2021). It is worth to mention that the insect cuticle and the yeast extract in the culture medium are able to provide the necessary nutrients, which are not present in commercial media, improving most of the characteristics involved in the pathogenicity of *B. bassiana*, *M. robertsii* and *C. javanica* (Montesinos-Matías et al., 2021).

Sun et al. (2023) selected *B. bassiana* mutants that were grown in broth (SDY) and evaluated for chitinase activities. Enzyme activity was highest in the mutant (6 M) on days 5, 9 and 10. In the case of the mutant (8 M), chitinase activity increased on days 5 and 6 compared to the control. This finding corroborates that the use of this type of culture medium can promote the germination of conidia and induces the production of enzymes, such as chitinases, in *B. bassiana*. Especially, conidial germination and the enzyme production are profoundly influenced by the conditions of the culture medium (Kim et al., 2010). Similarly, Kim et al. (2011) evaluated different carbohydrate and nitrogen sources for optimization of a medium producing supernatant of *B. bassiana* SFB-205 effective with chitinase activity parameter. In addition, chitinase production was further increased by individual addition of nitrogen sources to soluble starch (carbohydrate + nitrogen combination) and maximized by combining with yeast extract.

In the case of *M. anisopliae* strain, it was possible to identify that the second best culture medium with a high production of extracellular enzymes was the YPG culture medium. Nahar et al. (2004) evaluated the constitutive extracellular production of chitin metabolizing enzymes such as chitinase, chitosanase and chitin deacetylase in YPG medium by *M. anisopliae* isolate.

Within the results the chitinase activity of *M. anisopliae* in the medium containing chitin was 0.010 U/mL at 120 h. St Leger et al. (1986) reported chitinase activity (0.027 U/mL) in *M. anisopliae* after 120 h. Comparing with the results reported in this study, it can be inferred that supplementation with chitin in the medium in addition to the initial pre-enrichment allows the fungus to take up these nitrogen and carbohydrate sources and generate a higher chitinolytic activity.

In the preparation of the solid media, silkworm (*Bombyx mori*) chrysalis meal, which is a by-product of the silk industry, was used as a nitrogen source. The use of insect meal enriched media is widely used for enzyme production. Zhang et al. (2004) demonstrated that chitinase production was improved in solid-state fermentation at the laboratory scale using wheat bran mixed with insect cuticle for the isolate of *B. bassiana* Bb174. In the present study, rice with silkworm (*B. mori*) chrysalis flour was evaluated for the production of protease and chitinase, which allows us to suggest that by supplementing solid culture media with insect cuticle, it is possible to induce the production of extracellular enzymes such as proteases and chitinases, taking into account the results obtained in this study.

In a recent study conducted by Golzan et al. (2023), different salts and *P. interuptell* cuticle were used as inductors. Those authors suggested that the isolates of *M. anisopliae* had the highest levels of proteolytic activity. Therefore, it is important to mention that these solid-state fermentation processes using cereals (e.g., wheat, rice, wheat bran), as well as food and agricultural residues, have the advantage in enzyme production. In the study of Ghoreishi et al. (2023), for example, grass clippings and pruning residues were used as substrate in SSF to cultivate *Trichoderma harzianum* and produce biopesticides (i.e., conidial spores) effective against phytopathogenic fungi.

Mochi et al. (2010) found that isolates of *M. anisopliae*, particularly IBCB 425 and E9, can kill *H. irritans* pupae at different conidial concentrations. Ghayedi and Abdollahi (2013) reported that *M. anisopliae* is

also effective against plant parasites such as *Heterodera avenae* and sugarcane nematodes. *B. bassiana* has potential as a biocontrol agent for plant pests and nematodes, but research on its use for nematode control is limited (Waill et al., 2021). However, the enzymatic extract of *B. bassiana* has been shown to kill several agriculturally important plant-parasitic nematodes, including *M. incognita*, *M. hapla*, *Aphelenchoides besseyi*, and *Heterodera glycines* (Liu et al., 2008; Zhao et al., 2013). This is because the cuticle of nematodes is composed of collagens and cuticulins, which are the targets of the enzymes present in the *B. bassiana* extract (Page et al., 2014).

Other authors have also demonstrated the significant antagonistic effect of fungi *B. bassiana*, *M. anisopliae*, and *Paeclomyces lilacinus* against the root-knot nematode *M. incognita*, significantly reducing its population and subsequently improving the growth and yield of cowpea plants (Youssef et al., 2020).

Chen and Peng (2019), mentioned that chitin is the essential component of eggshell and pharynx of some nematodes, which may indicate the effect on the chitinases obtained from crude extracts on the percentage reduction obtained in the results. In the present study, it was demonstrated that the cell-free extract, particularly rich in enzymes as proteases and chitinases, produced by commercial strain of *B. bassiana* and *M. anisopliae* showed nematocidal activity against second-stage juveniles of *M. incognita*. This result can be compared with that reported by Soares et al. (2015), where it was evaluated the nematocidal action of extracellular chitinases produced by nematophagous fungi on *Panagrellus redivivus*. Soares et al. (2015) provided evidence that the chitinase enzyme is involved in the molecular mechanism of cuticle penetration and cell digestion of nematodes. In addition to this, the enzyme extracts showed significant action on the proteins of the juveniles' cuticle, as observed by comparing the denatured and active groups, as well as through microscopic observation (Fig. 7).

Regarding parasitic nematodes of animals, other authors propose the use of the following fungi, often isolated from the external environment, for the control of gastrointestinal helminth infections in small ruminants: *Arthrospora oligospora*, *Candelabrella musiformis*, *Arundo conoides*, *Andropogon dactyloides*, *Trichoderma*, *Beauveria*, *Clonostachys*, and *Lecanicillium* (Soto-Barrientos et al., 2011). However, it is worth noting that this paper is the first report of the enzymatic action of crude extracts of *B. bassiana* and *M. anisopliae* on parasitic nematodes of ruminants. Indeed, this demonstrates that the proteases produced by these entomopathogenic fungi also recognize and catalyze the hydrolysis of proteins in nematode juveniles, not just insects.

Nowadays, the pest biocontrol market is the fastest growing market, with a compound annual growth rate (CAGR) of 13.6%. For this, the biocontrol market is expected to grow from approximately US\$5 billion today to US\$15 billion by 2029 (Marrone, 2024). Currently, microbial pesticides can play an important role in improving environmental and human health by reducing toxic chemical pesticides, allowing biopesticides to gain more widespread acceptance in sustainable agricultural production practices (Kumar et al., 2019; Mishra et al., 2015).

Therefore, the results of the present study open up a new perspective for the use of enzymes from *B. bassiana* and *M. anisopliae*.

7. Conclusion

The commercial strain of *M. anisopliae* and *B. bassiana* successfully produced extracellular enzymes, using the rice culture medium supplemented with whey, as the most effective culture medium. The protease enzyme extracted in this research exhibited the highest nematocidal activity against both (*Haemonchus* spp and *Meloidogyne incognita*) showing their biopesticides potential with the highest efficacy of enzyme extracts produced by *M. anisopliae* IBCB 425.

Author contributions

Lisseth Bibiana Puentes Figueroa, Ruth Celestina Condori Mamani,

Debora Castro de Souza, Jhennifer Cristina de Souza Alves, Stefany Amorim de Souza, Cecilia Balduino Ferreira, Tiago Facury Moreira, conducted the experiments. Filipe Elias de Freitas Soares designed this study. Filipe Elias de Freitas Soares and Willian César Terra analyzed data. Lisseth Bibiana Puentes Figueroa, Ruth Celestina Condori Mamani and FEFS wrote the manuscript. Filipe Elias de Freitas Soares and Tiago Facury Moreira critically revised the manuscript for important intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Ethical statement

The present study did not involve human participants and/or animals and hence no consent is required for the same.

Funding

This research was financed by the Minas Gerais Research Funding Foundation (FAPEMIG) (APQ-02466-21) and (RED-00161-23).

CRediT authorship contribution statement

Stefany Amorim de Souza: Investigation. Jhennifer Cristina de Souza Alves: Investigation. Debora Castro de Souza: Investigation. Ruth Celestina Condori Mamani: Writing – original draft, Investigation. Lisseth Bibiana Puentes Figueroa: Writing – original draft, Investigation. Filipe Elias de Freitas Soares: Writing – review & editing, Supervision, Conceptualization. Willian César Terra: Writing – review & editing, Supervision, Investigation. Cecilia Balduino Ferreira: Investigation.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

The authors are thanks to Coordination for the Improvement of Higher Education (CAPES), Minas Gerais Research Funding Foundation (FAPEMIG), for all the financial support. The authors also thank the companies Koppert and Nitro for provide the products.

References

- Amarante, A.F.T., Oliveira, S.R., 2007. Controle de endoparasitoses dos ovinos: uma revisão. Rev. Bras. Hig. Sanid. Anim. 1, 14–36.
- Ayres, M., Ayres, J.R.M., Ayres, D.L., Santos, A.S., 2003. Aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas. Sociedade civil mamirauá: Brasília CNPq, Belém, p. 290.
- Baermann, G., 1917. A simple method for detecting *Ankylostomum* (nematode) larvae in soil samples. Med. J. Dutch East Indies 57, 131–137.
- Baruah, N., Deka, A.C., 2017. Myco-biocontrol of red spider Mite (*Oligonychus coffeae*, Nether) using *Metarhizium anisopliae*. Int. J. Res. Appl. Sci. Eng. Tech. 5, 1800–1804. <https://doi.org/10.22214/IJRASET.2017.10264>.
- Bhadani, R.V., Gajera, H.P., Hirpara, D.G., Kachhadiya, H.J., Dave, R.A., 2021. Metabolomics of extracellular compounds and parasitic enzymes of *Beauveria bassiana* associated with biological control of whiteflies (*Bemisia tabaci*). Pest. Biochem. Phys. 176, 104877 <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104877>.
- Bonetti, J.S., Ferraz, S., 1981. Modification of the Hussey and Barker method for generating *Meloidogyne exigens* eggs from coffee roots. Fitopatol. Bras. 6, 553.
- Bradford, Marion M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Chen, Q., Peng, D., 2019. Nematode chitin and application. Targeting chitin-containing organisms. Adv. Exp. Med. Biol. 1142, 209–219. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7318-3_10.

- Da Silva Roberto, F.F., dos Santos Difante, G., Zaros, L.G., Gurgel, A.L.C., 2018. Nematoides gastrintestinais na ovinocultura de corte sob regime de pastejo. *Pubvet* 12, 147.
- Davis, B.J.B., 1964. Disk electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 404–427.
- Dhar, P., Kaur, G., 2010. Cuticle-degrading proteases produced by *Metarhizium anisopliae* and their induction in different media. *Indian J. Microbiol.* 50, 449–455. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0098-1>.
- Dunn, C., Hejnol, A., Matus, D., et al., 2008. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 452, 745–749. <https://doi.org/10.1038/nature06614>.
- Ebani, V.V., Mancianti, F., 2021. Entomopathogenic fungi and bacteria in a veterinary perspective. *Biology* 10, 479. <https://doi.org/10.3390/biology10060479>.
- Environmental Protection Agency, 2008. Fenamiphos; amendment to use deletion and product cancellation order. Federal Register. <https://www.federalregister.gov/documents/2008/12/10/ES-29223/fenamiphos-amendment-to-use-deletion-and-product-cancellation-order>.
- Ferreira, J.M., Soares, F.E., 2023. Entomopathogenic fungi hydrolytic enzymes: a new approach to biocontrol? *J. Nat. Pestic. Res.* 3, 100020. <https://doi.org/10.1016/j.napere.2023.100020>.
- Fletcher, S.J., Raeva, P.T., Hoang, B.T., Mitter, N.A., 2020. Perspective on RNAi-based biopesticides. *Front. Plant Sci.* 11, 51. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00051>.
- Gebremariam, A., Chelol, Y., Assafa, F., 2022. Extracellular enzyme activity of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and their pathogenicity potential as a bio-control agent against whitefly pests, *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *BMC Res. Notes* 15, 117. <https://doi.org/10.1186/s13104-022-06004-4>.
- Ghayedi, S., Abdollahi, M., 2013. Biocontrol potential of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae), isolated from suppressive soils of the Boyer-Ahmad region, Iran, against J2s of *Heterodera avenae*. *J. Plant Prot. Res.* 53, 165–171. <https://doi.org/10.2478/jppr-2013-0025>.
- Ghorvishi, G., Barrena, R., Font, X., 2023. Using green waste as substrate to produce biostimulant and biopesticide products through solid-state fermentation. *Waste Manag.* 159, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2023.01.026>.
- Goltan, S.R., Taleai-Hassanlou, R., Homayoonzadeh, M., Safavi, S.A., 2023. Role of cuticle-degrading enzymes of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in virulence on *Plodia interpunctella* (Lepidoptera, Pyralidae) larvae. *J. Asia Pac. Entomol.* 26, 102038. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2023.102038>.
- He, D.C., He, M.H., Amalin, D.M., Liu, W., Alviridia, D.G., Zhan, J., 2021. Biological control of plant diseases: an evolutionary and eco-economic consideration. *Pathogens* 10, 1311. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101311>.
- Julius, R., Afreja, R., Patcharin, K., 2020. Entomopathogenic fungi in Southeast Asia and Africa and their possible adoption in biological control. *Biol. Control* 151, 104399. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104399>.
- Kim, K.S., Lee, J.B., Kim, B.S., Lee, M.H., Kang, K.M., Joo, W.H., Kwon, G.S., 2013. The optimal condition and enzyme activity of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* using extracted rice bran. *J. Life Sci.* 23, 1010–1018. <https://doi.org/10.5352/JLS.2013.23.8.1010>.
- Kim, J.S., Roh, J.Y., Choi, J.Y., Wang, Y., Shim, H.J., Je, Y.H., 2010. Correlation of the aphidicidal activity of *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant with enzymes. *Fungal Biol.* 114, 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.10.011>.
- Kim, J.S., Je, Y.H., Yu, Y.M., 2011. Mass production of aphidicidal *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant with the parameter of chitinase. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 604–612. PMID: 21715967.
- Kumar, K.K., Sridhar, J., Murali-Baskaran, R.K., Senthil-Nathan, S., Kaushal, P., Dara, S. K., Arthurs, S., 2019. Microbial biopesticides for insect pest management in India: current status and future prospects. *J. Invertebr. Pathol.* 165, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.10.008>.
- Lino, D.M., Pinheiro, R.S.B., Ortuno, V.V., 2016. Benefícios do bem-estar animal na produtividade e na sanidade de ovinos. *Periód. Eletrôn. Fórum Ambient. Alta Paul.* 12, 124–132.
- Liu, T., Wang, L., Duan, Y.X., Wang, X., 2008. Nematicidal activity of culture filtrate of *Beauveria bassiana* against *Meloidogyne hapla*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 113–118. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9446-z>.
- Marrone, P., 2024. Status of the biopesticide market and prospects for new bioherbicides. *Pest Manag. Sci.* 80, 81–88. <https://doi.org/10.1002/ps.7403>.
- Mehri, D., Ferendik, N.A., Gokungur, Y., 2021. Utilization of whey for red pigment production by *Monascus purpureus* in submerged fermentation. *Fermentation* 7, 75. <https://doi.org/10.3390/fermentation7020075>.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *J. Anal. Chem.* 31, 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.
- Mishra, J., Tewari, S., Singh, S., Arora, N.K., 2013. Biopesticides: where we stand? *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*. Springer India, New Delhi, pp. 37–73. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2068-8_2.
- Mochi, D.A., Monteiro, A.C., Machado, A.R., Yoshida, L., 2010. Efficiency of entomopathogenic fungi in the control of eggs and larvae of the horn fly *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *Vet. Parasitol.* 167, 62–66. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.046>.
- Montesinos-Matias, R., Ordaz-Hernández, A., Angel-Cuapio, A., Colin-Bonifacio, Y., García-García, R.E., Ángel-Sahagún, C., Arredondo-Bernal, H., 2021. Principal component analysis of the biological characteristics of entomopathogenic fungi in nutrient-limited and cuticle-based media. *J. Basic Microbiol.* 61, 147–156. <https://doi.org/10.1002/jbm.20200627>.
- Nahar, P., Ghormade, V., Deshpande, M., 2004. The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. *J. Invertebr. Pathol.* 85, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2003.11.006>.
- Omar, G., Ibrahim, A., Hamadah, K., 2021. Virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on different stages of the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Egypt. J. Biol. Pest Control* 31, 102. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00447-w>.
- Orstein, L., 1964. Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 321–349.
- Page, A., Stepek, G., Winter, A., Pertab, D., 2014. Enzymology of the nematode cuticle: a potential drug target. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 4, 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.ijddr.2014.05.003>.
- Santoro, P.H., Neves, P.M. de O.J., Silva, R.Z. da, Akimi, S., Zorzi, J., 2005. Produção de esporos de *Beauveria bassiana* (Sals). Vuil. num processo bífase utilizando diferentes meios líquidos. *Semin. Ciênc. Agr.* 26 (3), 313–320. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2005v26n3p313>.
- Silva, D.G., Menezes, B.M., Bettencourt, A.F., Prant, A.C., Corrêa, M.R., Ruzkowsky, G., Martins, A.A., Brum, L.P., Hirschmann, L.C., 2017. Método FAMACHA® como ferramenta para verificar a infestação parasitária ocasionada por *Haemonchus* spp. em ovinos. *PUBVET* 11, 1015–1021.
- Soares, F.E., Braga, F.R., Araújo, J.V., Genier, H.L., Gouveia, A.S., Queiroz, J.H., 2013. Nematicidal activity of three novel extracellular proteases of the entomopathogenic fungus *Monacrosporium thausium*. *Parasitol. Res.* 112, 1557–1565. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3304-8>.
- Soares, F.E., de Queiroz, J.H., de Araújo, J.V., Queiroz, P.V., Gouveia, A.D., Hiuza, E., Braga, F.R., 2015. Nematicidal action of chitinases produced by the fungus *Monacrosporium thausium* under laboratory conditions. *Biocontrol Sci. Technol.* 25, 337–344. <https://doi.org/10.1080/09583157.2014.979133>.
- Soares, F.E., Nakajima, V.M., Sufiate, B.L., Satiro, L.A., Gomes, E.H., Froes, F.V., Sena, F. P., Braga, F.R., Queiroz, J.H., 2019. Proteolytic and nematicidal potential of the compost colonized by *Hypocrepis marmorata*. *Exp. Parasitol.* 197, 16–19. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.12.006>.
- Soares, F.E., Ferreira, J.M., Genier, H.L., Al-Ani, L.K., Aguiar-Marcolino, I., 2023. Biological control 2.0: use of entomopathogenic fungi enzymes for nematode control. *J. Nat. Pestic. Res.* 4, 100025. <https://doi.org/10.1016/j.napere.2023.100025>.
- Soto-Barrientos, N., de Oliveira, J., Vega-Obando, R., Montero-Caballero, D., Vargas, B., Hernández-Gamboa, J., Orozco-Solano, C., 2011. In-vitro predatory activity of entomopathogenic fungi from Costa Rica with potential use for controlling sheep and goat parasitic nematodes. *Rev. Bol. Trop.* 59, 37–52. <https://doi.org/10.15517/rbt.v59i1.3177>.
- Srivani, M., Jalaja, N., 2022. Efficacy of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* in pest management. *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.* 16, 553–561. <https://doi.org/10.5530/ctbp.2022.4.88>.
- St Lager, R., Cooper, R., Chamley, A., 1986. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. *J. Gen. Microbiol.* 132, 1509–1517. <https://doi.org/10.1099/00222728-132-6-1509>.
- Sun, Y., Zhang, B., Zhang, W., Wang, Q., Toufeeq, S., Rao, X., 2023. UV-induced mutagenesis of *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) yields two hypervirulent isolates with different transcriptomic profiles. *Pest Manag. Sci.* 79, 2762–2779. <https://doi.org/10.1002/ps.7452>.
- Taylor, B., Edgington, S., Luke, B., Moore, D., 2013. Yield and germination of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* when grown on different rice preparations. *J. Stored Prod. Res.* 53, 23–26. <https://doi.org/10.1016/j.jstpr.2013.02.004>.
- Viera, W., Jackson, T., 2020. Ecuador demonstrates a sustainable way forward for small farmer producers. *Chron. Hort.* 60, 19–22.
- Wall, E., Ghoson, D., Gazlea, S., 2021. The Anti-nematic potential of mushroom against plant-parasitic nematodes. *J. Microbiol. Biotechnol.* 6, 1–6. <https://doi.org/10.23880/oajmb-16000186>.
- Youssef, M., El-Nagdi, W., Lotfy, D., 2020. Evaluation of the fungal activity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paeclomyces laticinctus* as biocontrol agents against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on Cowpea. *Bull. Natl. Res. Cent.* 44, 112. <https://doi.org/10.1186/s42269-020-00367-z>.
- Zasada, I., Halbrecht, J., Kokalis-Burelle, N., LaMondia, J., McKenry, M., Noling, J., 2010. Managing nematodes without methyl bromide. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 311–328. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114425>.
- Zhang, J., Cai, J., Wu, K., Jin, S., Fan, R., Fan, M., 2004. Production and properties of chitinase from *Beauveria bassiana* Bb174 in solid state fermentation. *Chin. J. Appl. Ecol.* 15, 863–866. PMID: 15320411.
- Zhao, D., Liu, B., Wang, Y., Zhu, X., Duan, Y., Chen, L., 2013. Screening for nematicidal activities of *Beauveria bassiana* and associated fungus using culture filtrate. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7, 974–978.

Further reading

- Hussain, A., Tian, M.Y., He, Y.R., Ruan, L., Ahmed, S., 2010. In vitro and in vivo culturing impacts on the virulence characteristics of serially passed entomopathogenic fungi. *J. Food Agric. Environ.* 8, 481–487.
- Olson, S., 2015. An analysis of the biopesticide market now and where it is going. *Outlooks Pest Manag.* 26, 203–206. <https://doi.org/10.1564/v26oct04>.
- Sikora, R., Molendijk, L., Desaegeer, J., 2022. Integrated nematode management and crop health: future challenges and opportunities. *Integr. Nematode Manag. State Art. Vis. Future* 3–10. <https://doi.org/10.1079/9781789247541.000>.
- Wram, L., Zasada, A., 2019. Short-term effects of sublethal doses of nematicides on *Meloidogyne incognita*. *Phytopathology* 109, 1605–1613. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-18-0420-R>.