



**LISSETH BIBIANA PUENTES FIGUEROA**

**POTENCIAL BIOPESTICIDA DE ENZIMAS  
EXTRACELULARES DE *Beauveria bassiana***

**LAVRAS – MG**

**2024**

**LISSETH BIBIANA PUENTES FIGUEROA**

**POTENCIAL BIOPESTICIDA DE ENZIMAS EXTRACELULARES DE**  
***Beauveria bassiana***

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 obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Filipe 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).

Puentes Figueroa, Lisseth Bibiana.

Potencial biopesticida de enzimas extracelulares de *Beuaveria bassiana* / Lisseth Bibiana Puentes Figueroa. - 2024.

139 p. : il.

Orientador(a): Filippe Elias de Freitas Soares.

Coorientador(a): Willian Cesar Terra.

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

Bibliografia.

1. Fungo entomopatogênico. 2. Quitinase. 3. Protease. I. de Freitas Soares, Filippe Elias. II. Terra, Willian Cesar.

**LISSETH BIBIANA PUENTES FIGUEROA**

**POTENCIAL BIOPESTICIDA DE ENZIMAS EXTRACELULARES DE**  
***Beauveria bassiana***

**BIOPESTICIDE POTENTIAL OF EXTRACELLULAR ENZYMES FROM**  
***Beauveria bassiana***

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 obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 16 de julho de 2024  
Prof. Dr. Geraldo Andrade de Carvalho, UFLA  
Prof. Dr. Tiago Facury Moreira, UFMG

Prof. Dr. Filippe Elias de Freitas Soares  
Orientador

Prof. Dr. Willian Cesar Terra  
Coorientador

**LAVRAS – MG**

**2024**

*Dedico a minha dissertação principalmente a Deus, por me ter dado a força necessária para concluir este objetivo e a todas as pessoas que me acompanharam neste processo por me terem motivado a seguir em frente.*

## AGRADECIMENTOS

Principalmente agradeço a Deus, que foi meu guia, por nos dar constância, fortaleza e sabedoria para alcançar cada uma das metas e por todos os ensinamentos durante a realização deste projeto.

Agradeço os meus pais e ao meu irmão, meu namorado e amigas, especialmente Daniela Coca, Lida Rodriguez, Andrea Gonzalez, Debora Castro, Adriane Toledo, Amanda Alves, Elias Honorato, Carolina Bojacá, Cecilia Baldoino, vossa dedicação e carinho, não estaria cursando esta etapa tão importante da minha vida. Vocês são os artífices deste momento, pois, mesmo diante das dificuldades que enfrentaram, sempre priorizaram o meu bem-estar.

À equipe de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia e Bioquímica aplicada da UFLA, pelo auxílio nos experimentos.

Ao meu orientador Dr. Filippe Elias, por toda sua ajuda, paciência, colaboração e confiança, que nos inspirou a realizar este projeto e nos deu a oportunidade de adquirir novos conhecimentos.

Ao Professor Dr. Geraldo Andrade de Carvalho e à Técnica Eliana Donizete Andrade, do Departamento de Entomologia, meus sinceros agradecimentos pela inestimável colaboração e orientação em todas as etapas de obtenção e disponibilização do material e da infraestrutura necessários para a pesquisa com o inseto *Spodoptera frugipeda*.

Ao Professor Dr. Tiago Facury Moreira por disponibilizar os ovos de *Eurytrema pancreaticum* para os ensaios *in vitro* com as enzimas.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal pelos conhecimentos aprendidos e a oportunidade para o meu crescimento profissional.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior – Brasil (CAPES) e à Organização dos Estados Americanos (OEA), meu mais profundo agradecimento pela inestimável oportunidade de realizar meu mestrado no Brasil, com o auxílio da bolsa de estudos concedida.

## RESUMO

Fungos entomopatogênicos têm mostrado grande potencial no controle de insetos e outros parasitos. A *Beauveria bassiana* produz diversas enzimas extracelulares hidrolíticas, incluindo proteases e quitinases. Nesse contexto, o objetivo deste projeto foi avaliar o potencial biopesticida *in vitro* das enzimas extracelulares (proteases e quitinases) produzidas por *B. bassiana* contra parasitas de animais, parasita de plantas e insetos-praga, além da caracterização *in silico* as proteases produzidas pelo fungo a partir de análises filogenéticas e da predição da estrutura tridimensional (3D). A primeira etapa foi a avaliação de diferentes meios de cultura para indução de proteases e quitinases utilizando como inóculo os isolados comerciais de *B. bassiana*: IBCB 66 e ESALQ PL63, além do isolado IP 361. A ação do extrato bruto e do precipitado no controle *in vitro* de nematoides e trematódeos parasitas de animais e vegetais foi determinado, assim como o efeito do precipitado sobre pupas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). A segunda etapa foi realizada a partir do ensaio *in silico* das proteases de *B. bassiana* em relação a análise filogenética com outros gêneros de fungos entomopatogênicos. Para atingir esse objetivo, as enzimas foram produzidas em condições de fermentação sólida e líquida, para determinar a maior atividade quitinolítica e proteolítica de isolados comerciais de *B. bassiana*. Os resultados demonstraram que o melhor meio de cultura ( $p < 0,01$ ) para protease e quitinase foi o meio sólido de arroz com soro de leite. Com relação à atividade nematicida do extrato bruto enzimático, o percentual de redução foi de 58% no caso dos nematoides parasitas de animais e 19% para os parasitas de plantas, apresentando diferença significativa em comparação com o tratamento controle. No entanto, o ensaio *in vitro* com o extrato precipitado de *B. bassiana* IP 361 aplicado nos ovos de *Eurytrema pancreaticum*, causou redução de 47% em relação ao extrato desnaturado ( $p < 0,01$ ). No ensaio com *S. frugiperda*, o precipitado ativo de *B. bassiana* IP 361 reduziu 100% o número das pupas em comparação ao tratamento controle. Por outro lado, não houve diferença significativa ( $p > 0,01$ ) entre o ativo com o grupo com inseticida sintético. O precipitado ativo revelou no zimograma cinco bandas com pesos moleculares de 25,6 a 66,9 kDa. A análise *in silico* identificou a linhagem das proteases Pr1 e Pr2 e sua estrutura tridimensional. Estes resultados indicam que as proteases e quitinases de *B. bassiana* podem ser úteis no controle de doenças parasitárias e de pragas, apresentando potencial como uma alternativa sustentável.

Palavras-chave: Quitinase; Protease; Fungo entomopatogênico; Insetos-praga; Doenças negligenciadas.

## ABSTRACT

Entomopathogenic fungi have shown great potential for the control of insects and other parasites. *Beauveria bassiana* produces diverse extracellular hydrolytic enzymes, including proteases and chitinases. In this context, the objective of this project was to evaluate the *in vitro* biopestic potential of extracellular enzymes (proteases and chitinases) produced by *B. bassiana* against animal parasites, plant parasites, and insect pests, as well as the *in silico* characterization of the proteases produced by the fungus from phylogenetic analyzes and three-dimensional (3D) structure prediction. The first step was to evaluate different culture media for the induction of proteases and chitinases using the commercial isolates of *B. bassiana*: IBCB 66 and ESALQ PL63, as well as the isolate IP 361. The action of the crude extract and the precipitate in the *in vitro* control of nematodes and trematodes parasitic to animals and plants was determined, as well as the effect of the precipitate on pupae of *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). The second step was carried out from the *in silico* assay of *B. bassiana* proteases in relation to phylogenetic analysis with other genera of entomopathogenic fungi. To achieve this objective, the enzymes were produced under solid and liquid fermentation conditions, in order to determine the highest chitinolytic and proteolytic activity of commercial isolates of *B. bassiana*. The results demonstrated that the best culture medium ( $p < 0.01$ ) for protease and chitinase was the solid rice medium with milk serum. Regarding the nematicidal activity of the enzymatic crude extract, the percentage of reduction was 58% in the case of nematodes parasitic to animals and 19% for plant parasites, presenting a significant difference compared to the control treatment. However, the *in vitro* assay with the precipitated extract of *B. bassiana* IP 361 applied to the eggs of *Eurytrema pancreaticum* caused a 47% reduction compared to the denatured extract ( $p < 0.01$ ). In the test with *S. frugiperda*, the active precipitate of *B. bassiana* IP 361 reduced the number of pupae by 100% compared to the control treatment. On the other hand, there was no significant difference ( $p > 0.01$ ) between the active group and the group with synthetic insecticide. The active precipitate revealed five bands with molecular weights of 25.6 to 66.9 kDa in the zymogram. *In silico* analysis identified the lineage of proteases Pr1 and Pr2 and their three-dimensional structure. These results indicate that *B. bassiana* proteases and chitinases can be useful in the control of parasitic diseases and pests, presenting potential as a sustainable alternative.

Keywords: Chitinase; Protease; Entomopathogenic fungus; insect pests; neglected diseases.

## INDICADORES DE IMPACTO

A busca por soluções sustentáveis para a agricultura tem se intensificado diante dos desafios impostos pelas mudanças climáticas e pela necessidade de garantir a segurança alimentar. Neste contexto, este estudo intitulado “Potencial biopesticida de enzimas extracelulares produzidas pelo fungo *Beauveria bassiana*”, destaca-se como uma promissora alternativa aos agrotóxicos sintéticos e antihelmínticos.

A utilização de enzimas como proteases e quitinases, capazes de catalisar a hidrólise de componentes presentes na cutícula dos insetos e parasitas de animais, oferece um controle mais específico e menos impactante ao meio ambiente. Ao substituir os pesticidas convencionais, essa abordagem contribui diretamente para a redução da contaminação do solo e dos recursos hídricos, alinhando-se aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) relacionados à vida na terra e na água.

Além disso, o desenvolvimento de biopesticidas a partir de *B. bassiana* fortalece diretamente a agricultura familiar e a produção de alimentos saudáveis, contribuindo para a erradicação da fome zero e agricultura sustentável, assim como a promoção da saúde e bem-estar. A adoção dessas tecnologias inovadoras também estimula a pesquisa e o desenvolvimento, impulsionando a indústria e a inovação.

Do ponto de vista social, os impactos se concentram na melhoria da segurança alimentar e na sustentabilidade de uso de biopesticidas para o controle das práticas agrícolas locais, ao fim de poder mitigar os efeitos na microbiota do solo e no produto final destinado diretamente as comunidades.

Ao reduzir a dependência de produtos químicos sintéticos, essa abordagem contribui economicamente para a mitigação das mudanças climáticas e a proteção da biodiversidade. A produção tecnológica de alimentos mais seguros e de alta qualidade, por sua vez, impacta positivamente a saúde humana e o desenvolvimento social, contribuindo para a construção de sociedades mais justas e equitativas.

## IMPACT INDICATORS

The search for sustainable solutions for agriculture has intensified in the face of the challenges posed by climate change and the need to ensure food security. In this context, this study entitled "Biopesticide potential of extracellular enzymes produced by the fungus *Beauveria bassiana*" stands out as a promising alternative to synthetic pesticides and anthelmintics.

The use of enzymes such as proteases and chitinases, capable of catalyzing the hydrolysis of components present in the cuticle of insects and animal parasites, offers a more specific and less environmentally impactful control. By replacing conventional pesticides, this approach contributes directly to reducing soil and water contamination, aligning with the Sustainable Development Goals (SDGs) related to life on land and in water.

Furthermore, the development of biopesticides from *B. bassiana* directly strengthens family farming and the production of healthy foods, contributing to the eradication of zero hunger and sustainable agriculture, as well as promoting health and well-being. The adoption of these innovative technologies also stimulates research and development, driving industry and innovation.

From a social perspective, the impacts are concentrated on improving food security and the sustainability of using biopesticides for the control of local agricultural practices, in order to mitigate the effects on soil microbiota and the final product destined directly to communities.

By reducing the dependence on synthetic chemical products, this approach contributes economically to mitigating climate change and protecting biodiversity. The technological production of safer and higher quality foods, in turn, positively affects human health and social development, contributing to the construction of more just and equitable societies.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo de vida parasitária do nematoide das galhas das raízes <i>Meloidogyne incognita</i> .....	1818
Figura 2- Ciclo de vida representando nematoides gastrointestinais ( <i>Haemonchus</i> spp) de pequenos ruminantes .....	200
Figura 3- Ciclo de vida do gênero <i>Eurytrema</i> .....	222
Figura 4- Ciclo biológico de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	244
Figura 5- Diagrama geral do ciclo de infecção de <i>Beauveria bassiana</i> em artrópodes .....	289

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE.....</b>	<b>13</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral .....</b>	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>15</b>
<b>3.</b>	<b>REFERENCIAL TEORICO .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1</b>	<b>Controle de pragas e parasitas .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2</b>	<b>Nematoides fitoparasitas de plantas: <i>Meloidogyne incognita</i> .....</b>	<b>17</b>
<b>3.3</b>	<b>Nematoides parasitas gastrintestinais de animais: <i>Haemonchus sp. e</i> <i>Trichostrongylus sp.</i> .....</b>	<b>19</b>
<b>3.4</b>	<b><i>Eurytrema pancreaticum</i>.....</b>	<b>20</b>
<b>3.5</b>	<b>Insetos praga na agricultura .....</b>	<b>23</b>
<b>3.5.1</b>	<b><i>Spodoptera frugiperda</i>.....</b>	<b>23</b>
<b>3.6</b>	<b>Controle químico .....</b>	<b>25</b>
<b>3.7</b>	<b>Controle biológico e biopesticida .....</b>	<b>26</b>
<b>3.8</b>	<b><i>Beauveria bassiana</i> .....</b>	<b>26</b>
<b>3.8.1</b>	<b>Mecanismo de infecção de <i>B. bassiana</i> em artrópodes.....</b>	<b>27</b>
<b>3.8.2</b>	<b>Enzimas secretadas por <i>Beauveria bassiana</i>.....</b>	<b>29</b>
<b>3.8.3</b>	<b>Caracterização genômica e proteica de <i>B. bassiana</i> .....</b>	<b>32</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>34</b>
	<b>SEGUNDA PARTE .....</b>	<b>44</b>
	<b>ARTIGO 1 - Produção de enzimas pelo fungo entomopatogênico</b> <b><i>Beauveria bassiana</i> e sua aplicação no controle de nematoides</b> <b>(<i>Haemonchus spp.</i> e <i>Meloidogyne incognita</i>) <i>in vitro</i> .....</b>	<b>45</b>
	<b>ARTIGO 2 – Estudo <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> do potencial ovicida de proteases</b> <b>de <i>Beauveria bassiana</i> sobre o trematódeo <i>Eurytrema pancreaticum</i>.....</b>	<b>71</b>
	<b>ARTIGO 3 – Efeito <i>in vitro</i> das enzimas extracelulares e conídios de</b> <b><i>Beauveria bassiana</i> sobre pupas de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....</b>	<b>102</b>
<b>4.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>128</b>
	<b>ANEXO A .....</b>	<b>129</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1. INTRODUÇÃO GERAL

A busca pela garantia da segurança alimentar diante do crescimento populacional, que aumenta a demanda por alimentos, tem levado ao desenvolvimento de novas tecnologias voltadas para o aumento da produtividade agropecuária. As pragas e doenças causam perdas significativas na agropecuária, a proteção das culturas é essencial para a segurança alimentar (Rodrigues *et al.*, 2023; Hawkins *et al.*, 2019).

No contexto da produção agrícola, os insetos representam um obstáculo significativo à produção. Durante o ano de 2020, as perdas globais de produção foram estimadas em US\$ 470 bilhões (Mantzoukas *et al.*, 2022). Essas perdas representam um desafio para a segurança alimentar e a sustentabilidade agrícola, impulsionou a necessidade de soluções inovadoras para minimizar o impacto prejudicial de artrópodes pragas.

No entanto, a produção bovina, apesar de ser uma atividade fundamental para a alimentação humana, enfrenta diversos desafios que afetam sua rentabilidade. Entre esses desafios, as zoonoses parasitárias se posicionam como doenças negligenciadas que geram um impacto considerável (Madsen; Stauffer, 2022). As infecções parasitárias não apenas causam problemas de saúde consideráveis em seres humanos, mas também impõem um peso financeiro substancial às indústrias pecuárias (Madsen; Stauffer, 2022; Torgerson; Macpherson, 2011).

Porém, o uso de agroquímicos e de anti-helmínticos de amplo espectro tem sido uma das principais alternativas adotadas para evitar essas perdas agropecuárias (Ramos *et al.*, 2020). O uso excessivo e incorreto dos agroquímicos e anti-helmínticos tem causado danos significativos ao meio ambiente e à saúde humana. Além disso, o desenvolvimento de resistência a determinados pesticidas sintéticos e a destruição de organismos vivos representam desafios adicionais que comprometem a sustentabilidade do ecossistema (Rodrigues *et al.*, 2023; Bettioli *et al.*, 2017).

Os fungos entomopatogênicos têm demonstrado um considerável potencial no controle de insetos. Seu modo de ação através da cutícula confere uma vantagem pois apresentam largo espectro de ação causando a morte tanto das pragas quanto organismos benéficos. Nesse mecanismo de infecção os conídios se aderem à cutícula, penetram no hospedeiro (sem a necessidade de ingestão), crescem no interior do hemocele e, finalmente, causam a morte do hospedeiro devido à depleção de nutrientes e invasão de tecidos e órgãos internos e/ou secreção

de proteínas e/ou metabólitos secundários com atividade inseticida (Quesada-Moraga *et al.*, 2023; Vega *et al.*, 2012).

Nessa perspectiva, *Beauveria bassiana* desempenha um papel fundamental na eliminação de diferentes tipos de pragas (Ebani; Mancianti, 2021). Esse fungo é capaz de atuar a partir de diversos mecanismos, como a produção de metabólitos (antibióticos, compostos voláteis — amônio, cianeto, álcool, ésteres, cetonas ou enzimas), competição (por espaço, fontes de C, N ou minerais), parasitismo ou indução de resistência sistêmica na planta, ou aumento de sua resposta de crescimento (Thambugala *et al.*, 2020; Baron; Rigobelo; Zied, 2019).

Todavia, antes de definir o uso dos biopesticidas como produtos comerciais, é necessário observar várias características, tais como sua virulência, capacidade de resistir a estressores ambientais (como a exposição à luz ultravioleta e tolerância à temperatura), potencial de produção, habilidade de esporular em substratos alternativos de baixo custo, capacidade de causar infecção em condições de baixa umidade e especificidade em relação aos parasitas de interesse (Sabbahi *et al.*, 2022; Couceiro *et al.*, 2021).

As enzimas, moléculas proteicas presentes em todos os organismos vivos, despontam como ferramentas promissoras na química verde. Sua alta especificidade e eficiência catalítica as tornam aliadas valiosas na busca por processos industriais mais sustentáveis e economicamente viáveis (Naveed *et al.*, 2021; Rekik *et al.*, 2019). Diante dos desafios associados ao uso de compostos químicos, a aplicação de enzimas hidrolíticas extracelulares obtidas de *B. bassiana*, como as proteases (EC 3.4) e as quitinases (EC 3.2.11.14), desempenha um papel fundamental como fatores de virulência em sua patogenicidade frente a artrópodes e nematoides, além de participar no processo de infecção, catalisando a degradação da barreira protetora externa e permitindo que o fungo alcance o interior do corpo do inseto (Figuerola *et al.*, 2024; Srivani; Jalaja, 2022). Esta abordagem oferece novas possibilidades de formulações e aplicações biotecnológicas, contribuindo significativamente para a economia agropecuária e promovendo práticas agrícolas mais sustentáveis em um contexto global.

Nesse contexto, o objetivo deste projeto foi avaliar o potencial biopesticida das enzimas extracelulares (proteases e quitinases) produzidas por *B. bassiana* contra parasitas de animais, parasita de plantas e insetos-praga.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial biopesticida das enzimas extracelulares (proteases e quitinases) produzidas por *B. bassiana* sobre parasitas de animais, parasita de plantas e insetos-praga.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer o meio de cultura que apresenta a maior produção de atividade enzimática específica (proteases e quitinases) nos isolados comerciais de *B. bassiana* (IBCB 66) e (ESALQ PL63) durante o processo fermentativo.
- Analisar a influência do meio de cultura (arroz suplementado com soro de leite) na atividade enzimática (proteases e quitinases) de *B. bassiana* (IP 361).
- Determinar a atividade nematicida das enzimas extracelulares de *B. bassiana* sobre juvenis do fitonematoide *Meloidogyne incognita*, bem como nas larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de parasitas de animais (*Haemonchus* spp. e *Trichostrongylus* spp.).
- Determinar o efeito *in vitro* das proteases de *B. bassiana* sobre ovos de tremátode (*Eurytrema pancreaticum*).
- Determinar o perfil proteolítico do extrato precipitado de *B. bassiana* mediante SDS-PAGE acoplado a um zimograma.
- Comparar as enzimas proteolíticas de *B. bassiana* com as de outros fungos entomopatogênicos por meio de análise filogenética e modelagem molecular.
- Avaliar a porcentagem de mortalidade causada pelas enzimas (proteases e quitinases) em concomitância com os conídios de *B. bassiana* em pupas de *S. frugiperda*.
- Avaliar as alterações morfológicas durante a fase adulta de *S. frugiperda*, dos conídios de *B. bassiana*, suas enzimas e também a ação concomitante entre ambos.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Controle de pragas e parasitas

As pragas são organismos que competem entre si pelo mesmo hospedeiro e podem danificar as culturas, acarretando a diminuição da densidade das plantas, crescimento atrofiado, menor capacidade de produção e redução do rendimento ou da qualidade dos produtos agrícolas (Agarwal; Werma, 2020). Os artrópodes pragas, em particular os insetos, são responsáveis por 10-16% das perdas globais de produção agrícola a cada ano. Esse aumento do número de insetos praga, tem ocorrido significativamente em áreas agrícolas e florestais devido a perturbações antropogênicas, como mudanças climáticas e globalização (Savary *et al.*, 2019).

O manejo integrado de pragas pode ser definido como um conjunto de boas práticas agrícolas que envolve o monitoramento da população de pragas. Inclui métodos como rotação de culturas, controle biológico, controle genético e controle químico (Oliveira *et al.*, 2014).

É amplamente aceito que os pesticidas desempenham um papel importante no controle de pragas e no desenvolvimento agrícola, pois podem reduzir as perdas de produtos agrícolas e melhorar a produtividade (Strassemeyer *et al.*, 2017; Tudi *et al.*, 2021; Fenik *et al.*, 2011). No entanto, o uso crescente de pesticidas também traz diversos efeitos negativos para o ambiente e a saúde humana (Tudi *et al.*, 2021; Miraglia *et al.*, 2009).

Os pesticidas são usados para o controle de pragas e enfermidades em função de seus princípios ativos e, portanto, também podem ser tóxicos para outros organismos (Tudi *et al.*, 2021; Elgueta *et al.*, 2017; Mingo *et al.*, 2017), assim como para diferentes meios ambientais, incluindo ar, solo e culturas (Tudi *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2017). Os pesticidas químicos afetam a saúde humana por meio da contaminação do meio ambiente e dos alimentos. A aplicação de pesticidas apresenta o risco de contaminação além das áreas de aplicação, acarretando o desequilíbrio ecológico. Os pesticidas são transportados de várias maneiras, incluindo para o ar, por meio de correntes de vento, para a água, por meio de escoamento ou lixiviação (Tudi *et al.*, 2021; Fang *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2012).

Outro desafio importante na agropecuária são as infecções parasitárias, o qual é uma das principais restrições à produção de ruminantes em países tropicais e subtropicais. Os parasitas gastrointestinais habitam o trato digestivo do gado, levando a uma considerável perda econômica devido a inapetência, anemia, diarreia, mau crescimento, redução do ganho de peso, comprometimento do desempenho reprodutivo, condenação dos órgãos afetados e mortalidade em animais infectados (Thanasuwan *et al.*, 2021; Marskole *et al.*, 2016).

Entre as alternativas para prevenir e minimizar os danos proveniente do parasitismo por nematoides, destaca-se a utilização de fármacos com ação anti-helmíntica. Contudo, a resistência a esses medicamentos tem aumentado globalmente devido ao uso incorreto, como tratamentos frequentes e repetição da mesma classe de anti-helmínticos sem alternância de grupos (Williams *et al.*, 2021; Patten *et al.*, 2011). Além disso, práticas inadequadas de pastagem, como a utilização de pastos limpos após o tratamento, favorecem a reinfestação por vermes resistentes (Williams *et al.*, 2021).

Desta forma, será apresentada a seguir uma breve revisão sobre parasitas de plantas e animais, suas características, impactos e métodos de controle tradicionais e inovadores, com foco nos organismos alvos do estudo.

### **3.2 Nematoides fitoparasitas de plantas: *Meloidogyne incognita***

Os nematoides são classificados no grande filo Nematoda, que abrange invertebrados não segmentados. São cosmopolitas na natureza, ou seja, são encontrados em quase todos os habitats ao redor do globo, podendo se adaptar a diversas e extremas condições, desde áreas frias até desertos quentes (Subedi; Thapa; Shrestha, 2020).

De acordo com os hábitos alimentares e estilos de vida, os nematoides fitoparasitas são agrupados em ectoparasitas e endoparasitas (Escobar *et al.*, 2015). Os ectoparasitas são aqueles que se alimentam inserindo o estilete na raiz, mas permanecem fora da superfície radicular, enquanto os endoparasitas penetram nas células hospedeiras e permanecem dentro das raízes (Escobar *et al.*, 2015).

Os nematoides das galhas são classificados como endoparasitas sedentários (ou sessídeos), uma vez que formam galhas nas raízes das plantas infectadas (Dong *et al.*, 2012). Estes nematoides pertencem ao gênero *Meloidogyne* (Dong *et al.*, 2012).

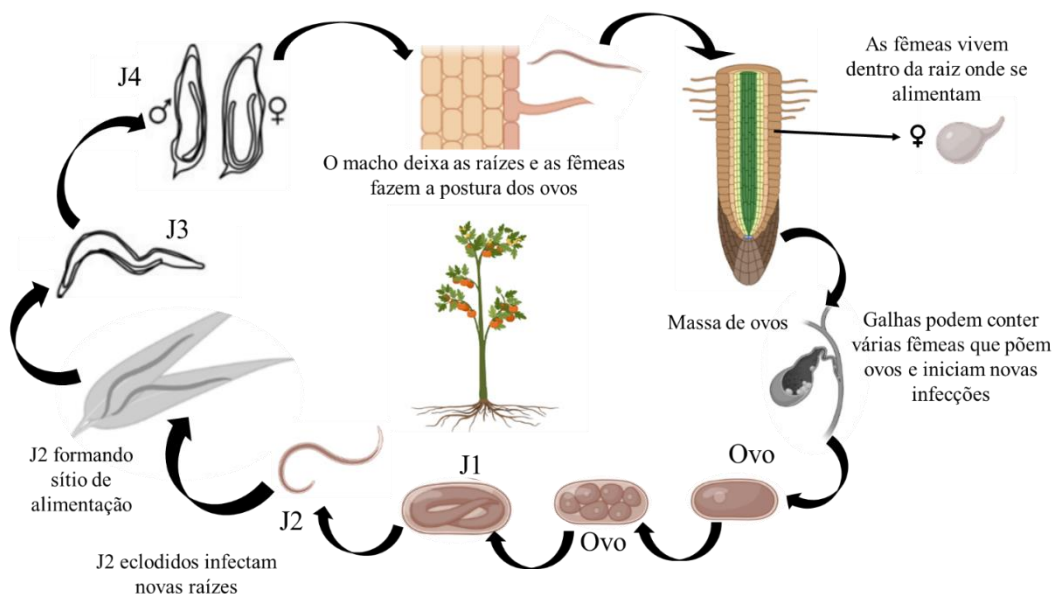
Entre as espécies de *Meloidogyne*, *M. incognita*, *Meloidogyne hapla*, *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne arenaria* são as mais comumente encontradas e compreendem até 95% de todos os endoparasitas de plantas. As fêmeas maduras dessas espécies depositam massas de ovos na superfície das raízes. O desenvolvimento do nematoide inicia-se com o estágio juvenil (J<sub>1</sub>), seguido pela ecdise para o juvenil infectante do segundo estágio (J<sub>2</sub>), que eclode do ovo (Subedi; Thapa; Shrestha, 2020; Dong *et al.*, 2012).

A eclosão de *M. incognita* depende principalmente das condições de umidade e temperatura, devido à sua ampla natureza hospedeira, e não necessita de estímulos da planta

hospedeira para ocorrer. Em algumas condições, a eclosão pode ser influenciada pelo número de gerações (Curtis; Robinson; Perry, 2009).

O nematoide de segundo estágio juvenil (J<sub>2</sub>) penetra a raiz da planta hospedeira perfurando a parede celular com a ajuda do estilete. O nematoide se movimenta entre o tecido cortical e as células, e, em seguida, entra no cilindro vascular da planta, onde se torna sedentário (Abad *et al.*, 2009). O estilete também é utilizado para secretar substâncias do esôfago e extrair nutrientes da planta (Figura 1).

Figura 1- Ciclo de vida parasitária do nematoide das galhas das raízes *Meloidogyne incognita*. O nematoide de segundo estágio juvenil (J<sub>2</sub>) se move através dos tecidos da raiz para se alimentar desenvolver ao estágio juvenil (J<sub>3</sub>).



Fonte: Do Autor (2023).

A infecção em plantas maduras causa diminuição da produtividade, já a infecção nas plantas jovens pode ser letal (Terefe; Tefera; Sakhuja, 2009). Devido à natureza endoparasitária sedentária dos nematoides, o controle total dessas pragas é muito difícil. Diversos métodos de manejo têm sido testados mundialmente, incluindo cultivares resistentes, solarização do solo e uso de produtos químicos. Embora os agroquímicos sejam geralmente eficazes, eles apresentam desvantagens, como custo elevado e potenciais efeitos danosos ao ambiente. Assim, agentes de controle biológico podem oferecer alternativas econômicas e ecologicamente corretas para o

manejo integrado de fitonematoides (Subedi; Thapa; Shrestha, 2020; Terefe; Tefera; Sakhuja, 2009).

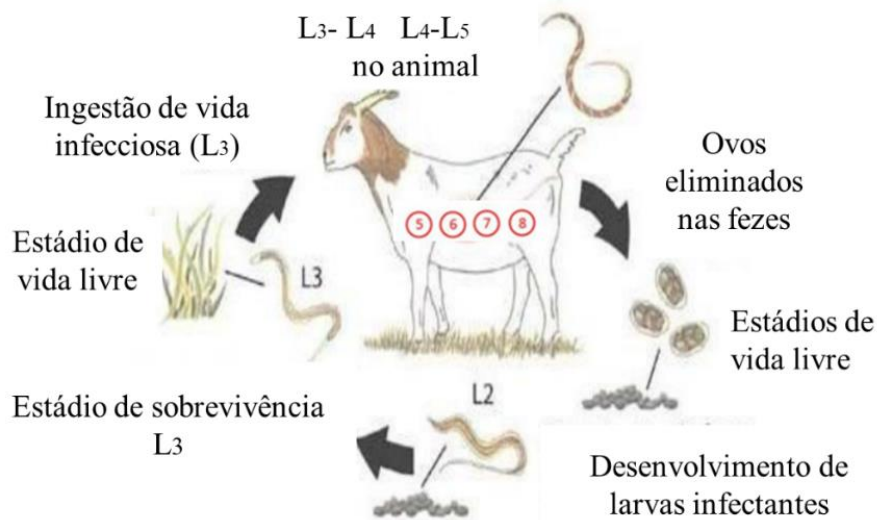
### **3.3 Nematoides parasitas gastrintestinais de animais: *Haemonchus* sp. e *Trichostrongylus* sp.**

Nematoides endoparasitas da família Trichostrongylidae, principalmente dos gêneros *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp. e *Cooperia* spp., representam um sério problema de saúde para bovinos jovens, ovinos, caprinos e animais selvagens, podendo afetar inclusive adultos. Nos bovinos, a infecção parasitária ocorre em condições ideais de temperatura e umidade. A contaminação ocorre durante a ingestão de pasto contaminado com larvas infectantes. Ao ingerir essas larvas, elas vão para o trato gastrointestinal do animal e tornarão adultas, etapa na qual é atingida a maturidade reprodutiva. Assim, elas vão se reproduzir e, quando o animal depositar suas fezes no ambiente, seus ovos serão eliminados juntos (De melo *et al.*, 2021; Neves *et al.*, 2014). Este ciclo é concluído em torno de 28 a 35 dias. No entanto, as larvas infectantes podem permanecer no ambiente por alguns meses. Normalmente, as infecções por nematoides bovinos são mistas, em que mais de uma espécie parasita o mesmo animal (Fávero *et al.*, 2020).

O ciclo é considerado direto, envolvendo apenas um único hospedeiro animal, com duas fases distintas: uma parasitária, onde o parasito se encontra no trato gastrointestinal do hospedeiro, e outra de vida livre ou não parasitária, onde os parasitos estão presentes no ambiente (Knapp-lawitzke *et al.*, 2016).

Na fase parasitária, após a reprodução sexuada dos nematoides adultos, os ovos embrionados são liberados pelas fêmeas fecundadas no intestino, conforme a espécie, sendo eliminados intactos nas fezes do animal (Khattak *et al.*, 2018). No ambiente, os estádios larvais de vida livre se desenvolvem dentro das fezes. Após a eclosão, as larvas do primeiro estágio larval (L<sub>1</sub>) emergem e se alimentam de bactérias e matéria orgânica presentes nas fezes. Quando adquirem capacidade suficiente, as L<sub>1</sub> se desenvolvem para o estágio L<sub>2</sub> através do processo de muda (ecdise) e, posteriormente, para L<sub>3</sub>, também conhecido como larva infectante (Khattak *et al.*, 2018) (Figura 2).

Figura 2- Ciclo de vida representando nematoides gastrointestinais (*Haemonchus spp*) de pequenos ruminantes. As larvas de primeiro, segundo e terceiro estádios (L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub>, respectivamente) são de vida livre no ambiente. O quarto estádio larval (L<sub>4</sub>) e o estádio adulto (L<sub>5</sub>) são parasitas no trato gastrointestinal do hospedeiro.



Fonte: Adaptado de KHATTAK *et al.* (2018).

Embora os anti-helmínticos sejam a principal ferramenta no combate à infecção por nematoides gastrointestinais, nenhum deles é eficaz contra 100% dos parasitas em um rebanho. Mesmo com a dose terapêutica, alguns nematoides conseguem resistir ao fármaco. Assim, o controle químico elimina os parasitas sensíveis, enquanto os resistentes sobrevivem e se reproduzem, transmitindo essa resistência às gerações futuras, um fenômeno conhecido como resistência anti-helmíntica (Torres-Acosta; Hoste, 2008).

### 3.4 *Eurytrema pancreaticum*

As infecções parasitárias esquecidas ou negligenciadas surgiram ou reapareceram nas populações humanas e animais ao longo do tempo. As trematodioses estão entre as doenças parasitárias mais negligenciadas dos seres humanos (de Sousa; de Castro, 2022; Toledo *et al.*,

2019; Tandon *et al.*, 2015) e também têm recebido pouca atenção em pequenos ruminantes durante muito tempo (de Sousa *et al.*, 2021).

A euritrematose pancreática (EP) é uma infecção parasitária crônica relatada principalmente em bovinos, caracterizada por baixo ganho de peso, perda de peso crônica e mortes esporádicas (Okajima *et al.*, 2016; Ilha *et al.*, 2005). O gênero *Eurytrema* pertence à família Dicrocoeliidae, que inclui os principais parasitas dos ductos pancreáticos dos ruminantes (de Sousa; de Castro, 2022).

A elevada carga parasitária nos bovinos tem sido relacionada com a baixa produtividade dos efetivos e com perdas econômicas significativas, com uma distribuição geográfica bem conhecida nas zonas endêmicas (de Sousa; de Castro, 2022). Os tremátodes desenvolveram-se e adaptaram-se com sucesso às adversidades ambientais ao longo do tempo como parasitas importantes e tornaram-se um risco para a saúde dos seres humanos e dos animais como agentes de doenças tropicais negligenciadas e de origem alimentar (Hu *et al.*, 2024; Fürst *et al.*, 2012).

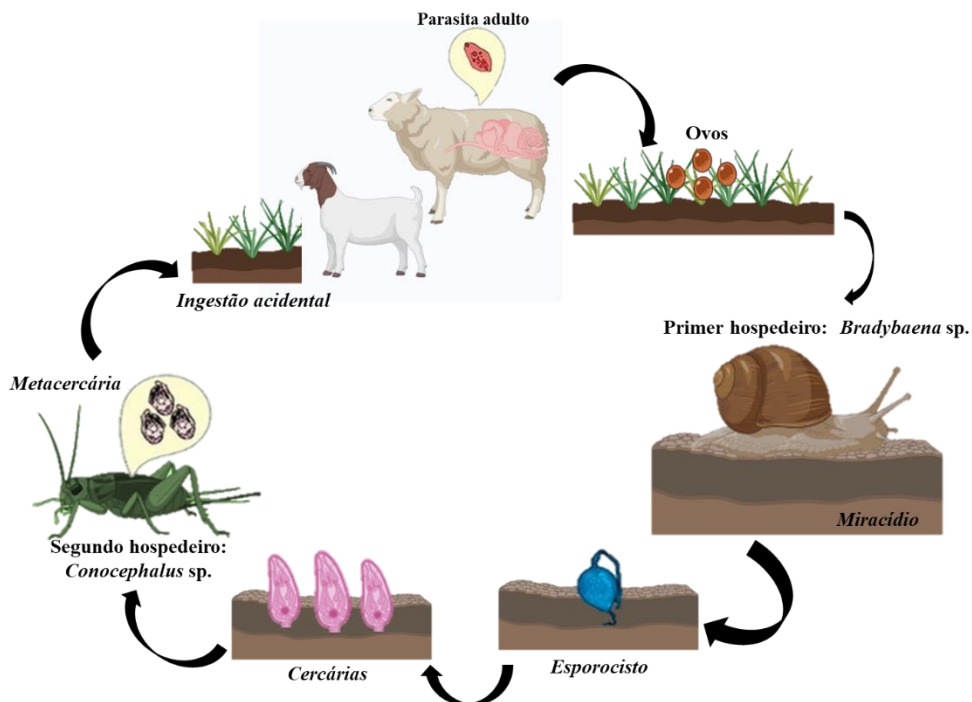
Morfologicamente, *E. pancreaticum* varia entre 12,5 e 18,0 mm de comprimento e 5,5-6,0 mm de largura; a ventosa oral (0,9-1,7 mm) está situada na extremidade anterior do corpo e a ventral (0,8-0,9 mm), no terço médio do corpo; o tamanho dos ovos é de 0,046-0,076 mm de comprimento e 0,028-0,040 mm de largura (Mohanta *et al.*, 2015; Sakamoto; Oikawa, 2007).

O gênero *Eurytrema* possui um ciclo de vida heteroxênico com dois hospedeiros intermediários (Figura 3). Os primeiros hospedeiros são caramujos e os segundos incluem gafanhotos ou formigas (de Sousa; de Castro, 2022; Svadzhyan; Frolova, 1966). Os ovos presentes nas fezes de ruminantes infectados com o parasita são ingeridos por caramujos suscetíveis. Após esta etapa os ovos eclodem liberando os miracídios no lúmen do intestino que penetram e aderem à parede intestinal como esporocistos maternos. Após a maturação, os esporocistos maternos liberam esporocistos filhas através de vesículas excretoras que migram para a câmara respiratória dos caramujos (de Sousa; de Castro, 2022; Tang *et al.*, 1979; Tang; Tang, 1977). O desenvolvimento total nos caramujos leva em média de seis meses a um ano, dependendo da espécie infectante de *Eurytrema* spp. (de Sousa; de Castro, 2022; Sakamoto *et al.*, 1980; Tang *et al.*, 1979).

Os esporocistos filhas se transformam em cercárias aderidas à vegetação, seguidas por sua ingestão acidental por gafanhotos. Os esporocistos penetram no hemocele dos gafanhotos, iniciando o processo de maturação em metacercárias, que pode variar entre 20 e 30 dias, de acordo com a temperatura ambiente (de Sousa; de Castro, 2022; Tang *et al.*, 1979).

A infecção em ruminantes ocorre pela ingestão acidental do segundo hospedeiro intermediário que contém cistos com várias metacercárias. As metacercárias liberadas no duodeno migram para o pâncreas (de Sousa; de Castro, 2022; Tang *et al.*, 1979).

Figura 3- Ciclo de vida do gênero *Eurytrema*. Pequenos ruminantes como hospedeiros definitivos. Para completar seu ciclo biológico necessita de dois hospedeiros intermediários, um caramujo terrestre do gênero *Bradybaena Similaris* e um inseto ortóptero do gênero *Conocephalus sp.*



Fonte: Do Autor (2024).

Para evitar prejuízos relacionados às infecções por helmintos, o principal meio de controle é através do uso de compostos químicos que possuem um amplo espectro de ação, compreendendo principalmente Praziquantel. Na maioria das vezes são administrados sem a aplicação de nenhum critério técnico de seleção de fármacos, de forma empírica e indiscriminada gerando como consequência a presença de medicamentos no animal que pode ser transmitido a toda cadeia alimentícia (Ramos *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2017), por esta razão, é importante estabelecer estratégias para o controle a partir do uso de biopesticidas minimizando o impacto nos alimentos.

### 3.5 Insetos praga na agricultura

As pragas agrícolas, como insetos e ácaros, têm um grande impacto na limitação da produção agrícola, resultando em uma redução de 40% do potencial de produção mundial de culturas. Principalmente ao se alimentarem das plantações, essas pragas diminuem a qualidade do produto (Deka *et al.*, 2021; Mantzoukas; Eliopoulos, 2020).

Embora muitas pragas e doenças nativas sejam agentes integrais de diversas culturas, surtos de alta intensidade podem ter efeitos adversos no crescimento e na sobrevivência das plantações (Canelles *et al.*, 2021; Van Lierop *et al.*, 2015). A extensão e os custos econômicos e ecológicos subsequentes de surtos de pragas aumentaram nas últimas décadas, à medida que o comércio mundial facilitou a propagação de espécies invasoras (Canelles *et al.*, 2021). No entanto, será apresentado de forma concisa um dos insetos que mais impacta a agricultura brasileira, a lagarta-do-cartucho.

#### 3.5.1 *Spodoptera frugiperda*

A lagarta militar, popularmente conhecida como lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), é uma praga altamente polífaga, isto é, capaz de se alimentar de diversos tipos de plantas e apresenta um enorme potencial de dano à agricultura. Segundo Montezano *et al.* (2018), essa espécie afeta mais de 350 espécies comerciais e não comerciais distribuídas por 76 famílias de plantas.

*Spodoptera frugiperda* causa danos a diversas culturas, incluindo milho (*Zea mays* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), soja (*Glycine max* (L.) Merr), algodão (*Gossypium hirsutum* L.), cevada (*Hordeum vulgare* L.) e trigo (*Triticum aestivum* L.) (Overton *et al.*, 2021; Hardke *et al.*, 2015; Bueno *et al.*, 2011). No Brasil, é considerada a praga mais destrutiva do milho (Jaramillo-Barrios *et al.*, 2020; Cruz *et al.*, 2012). Este inseto causa um atraso no desenvolvimento da cultura e uma queda na produtividade porque se alimenta do tecido vegetal nas fases iniciais da cultura (Jaramillo-Barrios *et al.*, 2020; Hernández-Trejo *et al.*, 2018).

O ciclo total de desenvolvimento de *S. frugiperda* dura em torno de 30 dias. Uma fêmea pode ovipositar até 300 ovos, que são colocados em massa, em camadas sobrepostas. Os ovos apresentam uma coloração clara, que se torna mais alaranjada ao longo do desenvolvimento do embrião (Chen *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2015). Seguidamente, a lagarta deixa a planta, penetra no solo e se transforma em pupa, com aproximadamente 15 mm de comprimento. O adulto é uma mariposa que apresenta as asas anteriores parda-escura e as posteriores branca-

acinzentadas, como é possível evidenciar na Figura 4 (Chen *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2015). Este é um período relativamente longo quando comparado com as demais pragas, por isso apresenta alto potencial de causar injúrias. Quando ocorre controle neste momento, os indivíduos que sobrevivem precisam terminar o ciclo para ocorrer as reinfestações. Portanto, em torno de um mês após as aplicações, deve-se intensificar o monitoramento (Chen *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2015).

*Spodoptera frugiperda* causa danos à cultura do milho quando está na fase de lagarta, o que corresponde a mais ou menos 55% do seu ciclo de vida (15 a 20 dias). Geralmente, é nesta fase que se intensifica o controle da praga, porque os danos são mais visíveis. No entanto, vale salientar que nas outras fases do ciclo de vida do inseto também é possível realizar o controle (Chen *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2015).

Figura 4- Ciclo biológico de *Spodoptera frugiperda*



Fonte: Adaptado de Silva *et al.* (2015).

O controle desta praga nas áreas recentemente invadidas tem se tornado um problema crítico devido aos devastadores danos econômicos que causa. Em sua área de distribuição nativa, as Américas, diversos métodos de manejo são empregados contra a praga (Guo *et al.*, 2020; Burtet *et al.*, 2017).

Entretanto, a aplicação intensiva de pesticidas convencionais e a dependência deles como único método de controle podem promover a seleção de populações resistentes, tornando-

se ineficazes e insustentáveis a longo prazo (Guo *et al.*, 2020; Day *et al.*, 2017). Portanto, há uma necessidade urgente de desenvolver e introduzir alternativas biotecnológicas para o controle sustentável deste tipo de pragas nas áreas recém-invasidas.

### 3.6 Controle químico

Os pesticidas são definidos como agentes químicos e naturais aplicados no controle de pragas agressivas (Rani *et al.*, 2021). Em resumo, são substâncias químicas que podem ser usadas em uma ampla área da cultura como proteção contra insetos, ervas daninhas e outras pragas, além de contribuir para o desenvolvimento das culturas (Wang *et al.*, 2017).

Nas últimas décadas, o ambiente agrícola tem estado sob forte pressão de pesticidas químicos, sendo este o método mais popular de proteção de plantas contra pragas (Tyśkiewicz *et al.*, 2022; Ghorbanpour *et al.*, 2018). Apesar da elevada eficácia dos produtos fitofarmacêuticos químicos, existem preocupações quanto à sua utilização segura e ao seu impacto no ambiente, bem como na saúde humana e animal (Tyśkiewicz *et al.*, 2022; Ghorbanpour *et al.*, 2018).

Nesse contexto, a agricultura contemporânea enfrenta o desafio de intensificar a produção agrícola, assegurando simultaneamente a proteção do ambiente e da saúde humana com soluções sustentáveis e biológicas. A utilização segura e racional de pesticidas sintéticos pode ser um fator chave contra futuras carências alimentares (Viera; Jackson, 2020). O uso de pesticidas apresenta uma grande variedade de aplicações, destacando-se no controle de pragas agrícolas e vetores de doenças de plantas, no controle de vetores de doenças humanas e pecuárias, e na prevenção ou controle de pragas que danifiquem outras ações e construções humanas (Viera; Jackson, 2020; Bonner; Alavanja, 2017).

No entanto, os pesticidas geram efeitos secundários nocivos quando usados inadequadamente e em excesso, podendo prejudicar significativamente a qualidade da água e do solo. Esses efeitos podem ter consequências negativas sobre animais, aves, plantas e seres humanos, perturbando a biodiversidade e a exposição contínua, direta ou indireta, através dos alimentos (Suo *et al.*, 2019).

Além disso, a resistência anti-helmíntica nos helmintos patogênicos de animais tem aumentado em termos de prevalência e gravidade. Nesse contexto, são necessárias novas classes químicas ou biológicas com novos mecanismos de ação para combater a ameaça da resistência, mas, apesar da necessidade urgente de inovação, o desenvolvimento de novos anti-helmínticos tem sido lento (Canton *et al.*, 2023; Nixon *et al.*, 2020).

### 3. 7 Controle biológico e biopesticidas

Mundialmente, são desenvolvidos agentes de controle biológico, organismos vivos como fungos, bactérias, vírus e insetos que reduzem a população de pragas que afetam as culturas agrícolas. O uso de biopesticidas não leva ao acúmulo de resistência nas pragas-alvo, e os fungos, em especial, despertam o interesse de empresas e órgãos de pesquisa devido ao seu papel no controle de insetos e doenças, sem agredir o meio ambiente e a saúde (Viera; Jackson, 2020).

O desenvolvimento e a aplicação no mercado de um novo pesticida químico requerem um investimento de aproximadamente US\$ 250 milhões e um mínimo de 10 anos. Por outro lado, um novo pesticida microbiano requer apenas um investimento de US\$ 1-2 milhões e pode ser comercializado no mercado dentro de 3-5 anos (Jiang; Wang, 2023; Seiber *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2012).

Os fungos entomopatogênicos são um grupo especial de microrganismos que habitam o solo, infectam e matam insetos e outros artrópodes através da penetração na cutícula (Mantzoukas *et al.*, 2022). Esses fungos são utilizados como agentes de biocontrole contra insetos-praga e desempenham um papel vital no seu manejo. Além disso, são capazes de controlar gafanhotos, insetos perfurantes e sugadores, ácaros, pragas de grãos armazenados, várias pragas florestais, bem como pragas invasoras, médicas e veterinárias (Quesada-Moraga; Yousef; Garrido-Jurado, 2020).

Entre os fungos entomopatogênicos, há representantes do filo Blastocladiomycota, como *Coelomomyces*, e do subfilo Entomophthoromycotina, como de *Conidiobolus* spp., *Entomophthora* spp., *Erynia* spp. e *Entomophaga* spp. Dentre os fungos superiores, vários gêneros do filo Ascomycota (subreino Dikarya) são comercializadas e aplicadas no campo, como *Purpureocillium* spp., *Metarhizium* spp., *Beauveria* spp., *Cordyceps* spp., *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp. e outros patógenos (Baron; Rigobelo; Zied, 2019).

### 3. 8 *Beauveria bassiana*

Grandes programas de controle biológico já foram aplicados e consolidados no Brasil, como é o caso da utilização de *B. bassiana* contra *Bemisia tabaci* em soja e contra *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) na cultura cafeeira (Mascarin *et al.*, 2019).

*Beauveria bassiana* é um dos melhores fungos entomopatogênicos para controlar insetos-praga (Srivani; Jalaja, 2022). Diversas cepas de *B. bassiana* desempenham um papel fundamental na eliminação de diferentes tipos de pragas. Ele é um micoinseticida ecológico

que produz enzimas e metabólitos secundários que desempenham um papel importante no controle biológico de pragas (Ebani; Mancianti, 2021). *Beauveria bassiana* pertence ao Reino Fungi, filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales e família Cordycipitaceae (Sung *et al.*, 2006). O fungo é saprófito e de origem terrígena. Ele infecta muitas ordens de insetos como Lepidoptera, Hemiptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera e Orthoptera. Os esporos desse fungo são chamados de conídios, os quais são de cor branca a amarelada com filamentos septais (Srivani; Jalaja, 2022).

Diversos tipos de conídios são produzidos por *B. bassiana* sob diferentes condições ambientais. O diâmetro das hifas varia de 2,5 µm a 25 µm. Tanto os seus conidióforos quanto os blastosporos são órgãos infecciosos (Srivani; Jalaja, 2022). Este fungo atua também como microrganismo endófito em cerca de 25 espécies vegetais, contribuindo para o controle de pragas e fungos fitopatogênicos (Ramakuwela *et al.*, 2020). Como fungo endófito e epífita, coloniza folhas e brotos, além de raízes de plantas, tornando as plantas mais resistentes a insetos, e também protege com sucesso as plantas de patógenos microbianos, suprimindo agentes causadores de doenças ou aumentando as respostas de defesa das plantas (Ramakuwela *et al.*, 2020).

Quando *B. bassiana* cresce na cutícula de insetos produz uma variedade de enzimas extracelulares, gerando mortalidade desses mesmos. O fungo pode aderir à superfície externa do corpo de insetos na forma de esporos assexuados ou diaspóricos, resultando na germinação de esporos e na produção de hifas, que posteriormente colonizam a cutícula do inseto, sob condições ideais de temperatura e umidade, rápida exposição microbiana, esporos com suficientes cargas (UFC/mL) e virulência (Fernandes *et al.*, 2012; Green; Beezhold, 2011).

### **3.8.1 Mecanismo de infecção de *B. bassiana* em artrópodes**

Mascarin e Jaronski (2016) estudaram detalhadamente o modo de infecção de *B. bassiana*. Os conídios são geralmente dispersos pelo vento ou chuva ou mesmo por vetores artrópodes que ajudam os esporos assexuados a colonizar os hospedeiros suscetíveis (Mascarin; Jaronski, 2016).

A infecção do fungo no hospedeiro ocorre geralmente por meio das seguintes fases: adesão, germinação, diferenciação, penetração e disseminação. Inicialmente, os conídios primeiro reconhecem as células do tegumento do inseto por forças hidrofóbicas, eletrostáticas e químicas, permitindo a germinação na epicutícula (Srivani; Jalaja, 2022). Em seguida, o tubo

germinativo forma uma estrutura chamada apressório, que depende das condições de temperatura e umidade, assim como da fisiologia do hospedeiro. A função do apressório pode ser enfraquecer a cutícula em seus pontos de contato, fixação ao tegumento durante a penetração, ou simplesmente, o apressório pode ser considerado uma etapa de transição entre o tubo germinativo e o pico de penetração, que é uma célula especializada que atravessa o tegumento do hospedeiro (Seyed-Talebi *et al.*, 2020).

A penetração do fungo através da cutícula do hospedeiro implica em uma ação combinada de dois processos principais: físico, devido à pressão da hifa que rompe as áreas membranosas ou levemente escleróticas, e químico, resultante da secreção de enzimas como proteases, quitinases, lipases, amilases, que então atuam na digestão da cutícula para facilitar a penetração na hemolinfa do inseto (Srivani; Jalaja, 2022; Seyed-Talebi *et al.*, 2020) (Figura 4).

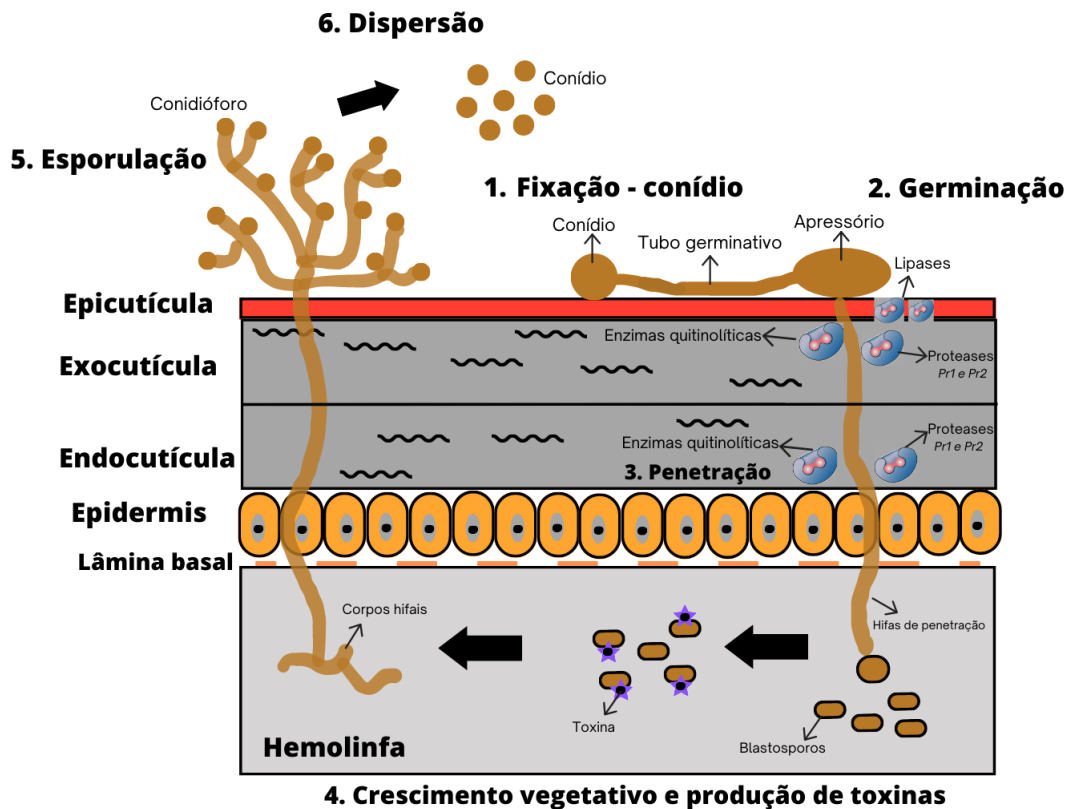
*Beauveria bassiana* cresce como estruturas unicelulares (blastosporos) e começa a destruir os tecidos do hospedeiro. Os conídios produzidos a partir do hospedeiro morto são levados pelo ar e são capazes de infectar outros hospedeiros (Pedrini, 2018). O fungo também produz toxinas como beauvericina, beauverolidas, bassinolidas e isarolidas que podem ajudar na invasão do fungo e sua morte (Srivani; Jalaja, 2022).

Como resultado da infecção progressiva, o corpo do inseto, inicialmente macio, torna-se rígido devido à absorção de líquidos pelo fungo. Cadáveres de insetos atacados por fungos do gênero *Beauveria* podem assumir uma cor vermelha escura. Todo o processo de infecção é relativamente longo e leva aproximadamente 14 dias após a infecção, mas os primeiros sintomas de infecção geralmente ocorrem cerca de 7 dias após a infecção (ou até antes, dependendo da espécie fúngica) (Skinner; Parker; Kim, 2014).

Nesse contexto, as enzimas líticas desempenham o papel mais importante durante o processo de infecção de insetos. Sua ação, estrutura e tipos são relativamente bem descritos. Seu principal papel é auxiliar na hidrólise dos componentes da cutícula do inseto, o que permite que os apressórios penetrem nas coberturas externas dos artrópodes (Litwin; Nowak; Różalska, 2020).

Figura 5- Diagrama geral do ciclo de infecção de *Beauveria bassiana* em artrópodes. Etapas do processo patógeno-hospedeiro: 1-2) adesão e germinação (emissão de tubo germinativo e formação de apressório) do conídio na cutícula do inseto-alvo; 3) penetração da hifa através do tegumento do inseto via atividade enzimática e mecânica; 4) diferenciação da hifa de penetração em blastosporos ou corpos hifais na hemolinfa e rápida multiplicação do fungo para disseminação pelos órgãos do inseto e absorção de nutrientes, acompanhado da síntese de metabólitos imunossupressores; 5) extrusão do fungo e formação de conidióforos para produção

de conídios aéreos como fonte de inóculo para reiniciar, no ambiente, o ciclo em hospedeiros suscetíveis; 6) dispersão dos conídios no ambiente.



Fonte: Do Autor (2023).

### 3.8.2 Enzimas secretadas por *Beauveria bassiana*

Basicamente, quitinases (EC 3.2.11.14), lipases (E.C.3.1.1.3) e proteases (EC 3.4) são as mais importantes de todas as enzimas produzidas por *B. bassiana* (Amobonye *et al.*, 2020) no processo de infecção. Assim, pode-se dizer que inicialmente as lipases atuam na catálise da degradação da cutícula externa do inseto, aumentando a aderência dos esporos fúngicos à cutícula por meio do incremento das interações hidrofóbicas entre o fungo e a superfície. Em seguida, as proteases catalisam a quebra das ligações peptídicas das proteínas escleroproteínicas da exocutícula, expondo as fibras de quitina. Por fim, as exoquitinases e endoquitinases trabalham juntas para catalisar as quebras das fibras de quitina (Arias-Aravena *et al.*, 2022).

As proteases (EC 3.4) constituem um grande grupo de enzimas hidrolíticas que catalisam a clivagem das ligações peptídicas das proteínas, levando a sua quebra em pequenos

peptídeos e aminoácidos (Sharma *et al.*, 2005). Essas enzimas são de vital importância para o processo de penetração, uma vez que as proteínas podem constituir até 70% da cutícula de um artrópode (Charnley, 2003).

Alguns estudos indicam que as proteases desempenham um duplo papel no processo infeccioso. Embora sua principal função seja atuar na hidrólise de proteínas cuticulares, as proteases também podem participar da inativação de proteínas antifúngicas produzidas na epiderme de insetos (Sotelo-Mundo *et al.*, 2007). De acordo com o mecanismo catalítico e à similaridade da sequência de aminoácidos, as proteases são agrupadas em famílias. Dentre as várias proteases liberadas durante a penetração, as principais famílias são: subtilisinas, tripsinas, metaloproteases e exopeptidases (Mondal *et al.*, 2016).

A produção de proteases extracelulares é um fator crucial na determinação da relação parasítica de *B. bassiana* contra o hospedeiro alvo. Acredita-se que, após a quebra da epicutícula por ação das lipases, o fungo invasor produza excelentes quantidades de Pr1 (serino-protease), que degrada o material proteico. As enzimas proteolíticas mais frequentemente estudadas são a serino-protease tipo subtilisina Pr1 e a protease ácida tipo tripsina Pr2. O gene Pr1 está relacionado com onze isoformas que foram identificadas e clonadas, incluindo uma metaloprotease (Dhawan *et al.*, 2020; St. Leger; Bidochka; Roberts, 1994).

Isolados de *B. bassiana* foram avaliados por Dhar (2010) quanto à produção de protease extracelular, e a maior atividade de protease foi observada durante quatro a seis dias de incubação da cultura. A atividade das proteases subtilisina tipo Pr1 e tipo tripsina Pr2 foram medidas utilizando diferentes meios. O meio mínimo suplementado com 1% de caseína apresentou alta produção de protease, enquanto o meio mínimo suplementado com 2% de quitina coloidal também foi capaz de induzir a atividade de Pr1. No processo de degradação enzimática, a serino protease Pr1 foi uma enzima crucial para a degradação da cutícula (Dhar; Kaur, 2010).

A estrutura molecular da protease tipo subtilisina Pr1 consiste em cinco resíduos de cisteínas formando duas pontes dissulfeto. Estudos como o de Jensen *et al.* (2020) avaliaram a expressão gênica em plantas tratadas com *B. bassiana*, onde os resultados indicaram que houve uma expressão dos genes (Pr1 e Pr2) da resposta de defesa em plantas tratadas com *B. bassiana* em comparação com o controle, permitindo o uso de fungos endófitos para o controle de pragas (Jensen *et al.*, 2020).

Estudos demonstram que a presença de múltiplas proteases pertencentes a diferentes famílias provavelmente aumenta a atividade proteolítica geral (Litwin *et al.*, 2023). Gao *et al.*

(2020) mostraram que entre os 11 genes Pr1, apenas cinco participam da degradação da epiderme (Gao *et al.*, 2020).

Quanto à caracterização das proteases de *B. bassiana*, Alghanimi *et al.* (2020) purificaram e caracterizaram proteases totais desse fungo. Os resultados reportaram que o pH ótimo para a atividade da protease total de *B. bassiana* é 9,0, isso enfatiza que a protease de *B. bassiana* no estudo pode ser considerada uma protease alcalina (Alghanimi *et al.*, 2020). Nesse sentido, demonstrou-se que a protease de *B. bassiana* foi estável a 20-40°C e inativada significativamente em temperaturas mais altas (50-55°C). Além disso, íons metálicos incluindo  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  induziram a atividade da protease de *B. bassiana*, e  $\text{Hg}^{+2}$  diminuiu a atividade proteolítica, possivelmente atuando como desnaturante, onde os íons  $\text{Hg}^{+2}$  podem interagir com grupos tiol de cisteína, triptofano e/ou resíduos de histidina além da quebra das pontes dissulfeto (Alghanimi *et al.*, 2020).

As quitinases (EC 3.2.1.14) também são hidrolases que catalisam a quebra de ligações glicosídicas entre os resíduos de N-acetil-glucosamina ligados por ligações do tipo  $\beta$ -[1-4] da quitina. Essas enzimas são de vital importância no processo de infecção e estão diretamente ligadas à patogenicidade do isolado fúngico. Isso se deve à quantidade e isoformas de enzimas extracelulares produzidas e que influenciam na capacidade do fungo de degradar a cutícula de um determinado hospedeiro (Andreis; Schrank; Thompson, 2019; Schrank; Vainstein, 2010).

Por isso, as quitinases de *B. bassiana* e outros fungos entomopatogênicos têm sido identificados como importantes fatores de virulência em sua patogenicidade frente a artrópodes e nematoides (Berini *et al.*, 2018). Essas quitinases atuam sinergicamente com outras enzimas, como proteases e lipases, para degradar a cutícula de insetos e outros animais. Nesse processo de degradação, a ação de proteases expõe as fibras de quitina presentes na epicutícula. Quando o fungo atinge a procutícula, ele começa a secretar quitinases (Mondal *et al.*, 2016).

As enzimas degradadoras de cutícula secretadas são cruciais para o processo de infecção, degradando a barreira protetora externa e permitindo que o fungo alcance o interior do corpo do inseto. Pelo menos 20 quitinases foram relatadas em *B. bassiana*, e várias foram caracterizadas in vivo, incluindo Bbchit1 e Bbchit2 (Ortiz-Urquiza; Keyhani, 2016). Assim, o envolvimento bem elucidado das quitinases de *B. bassiana* em sua patogênese tem levantado a possibilidade de suas aplicações na agricultura (Bhagwat *et al.*, 2021).

Estudos recentes mostraram que *B. bassiana* produz uma extensa quantidade de endo-quitinases e exo-quitinases, e suas atividades estão positivamente correlacionadas com a virulência contra os insetos-praga (Dhawan; Joshi, 2017). Endo-quitinases atuam na hidrólise

da ligação  $\beta$ -1,4-glicosídica dentro da molécula de quitina e exo-quitinases atuam na hidrólise de oligômeros N-acetilglicosamina formados durante a ação das endo-quitinases. A ação combinada de endo e exo-quitinases é necessária para a degradação completa da quitina do inseto durante o processo de infecção (Dhawan *et al.*, 2020).

Vários autores indicam uma correlação positiva entre virulência e atividade da quitinase de *B. bassiana*. Por exemplo, Kim e Je (2010) relataram que os níveis mais elevados de quitinases extracelulares em *B. bassiana* são responsáveis pela virulência do pulgão *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) (Kim; Je, 2010).

Nas últimas décadas, melhorias na biotecnologia e um crescente interesse em *B. bassiana* resultaram na geração de grandes quantidades de dados genômicos para a espécie. Muitos genes foram identificados quanto ao seu papel na virulência em *B. bassiana*, fornecendo clareza sobre como o fungo leva à morte dos seus hospedeiros (Fan *et al.*, 2007).

Em relação à caracterização dessas enzimas, Amobonye *et al.* (2020) mencionaram que há poucos relatos sobre a caracterização de diferentes quitinases produzidas por *B. bassiana*. Entretanto, estudos identificaram que uma quitinase de *B. bassiana* poderia ser de natureza ácida com pH ótimo entre 5,5 e 6,0 com temperatura ótima entre 30°C e 48°C, podendo-se dizer que estão na faixa das quitinases mesófilas a moderadamente termofílicas (Amobonye *et al.*, 2020; Sassá *et al.*, 2008).

Uma abordagem importante está relacionada à produção de enzimas a partir de fungos filamentosos, com um valor de (60%). Espera-se que o mercado de enzimas industriais cresça a uma taxa composta de crescimento anual (CAGR) de 6,6% entre 2023 e 2028 (El-Gendi *et al.*, 2022; Loi *et al.*, 2021). Dentre as principais enzimas com potencial de aplicação na agricultura estão lipases, quitinases, celulasas, proteases, xilanases e pectinases, utilizadas para transformar resíduos agrícolas recalcitrantes (resíduos de lignocelulose) em produtos de valor agregado, aumentando a fertilidade do solo e potencializando o controle biológico (biopesticidas e biofungicidas) (Ferreira; Soares, 2023).

Desta forma, se pretende por meio deste estudo estabelecer estratégias biotecnológicas e sustentáveis para o controle doenças parasitárias e insetos-pragas, por meio da produção de enzimas extracelulares (quitinases e proteases) do fungo *B. bassiana*.

### **3.8.3 Caracterização genômica e proteica de *B. bassiana***

A compreensão detalhada das razões e processos pelos quais diferentes proteínas são secretadas é valiosa, pois a capacidade da célula de exportar numerosas proteínas é importante

para o seu metabolismo de substratos extracelulares e sua existência contínua em seu ambiente (Amobonye *et al.*, 2020). Nesse sentido, as ferramentas "ômicas", que incluem a proteômica, a transcriptômica, entre outras, têm sido amplamente utilizadas na identificação e elucidação do repertório de enzimas em diferentes organismos industrialmente importantes, incluindo o de *B. bassiana*. O sequenciamento completo do genoma de diferentes isolados de *B. bassiana* revelou que estes fungos possuem entre 32 e 45 megabases, com uma densidade gênica maior em comparação a outros patógenos de insetos (Amobonye *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2018; Xiao *et al.*, 2012).

A análise de alguns desses isolados mostrou que o genoma central consiste em 7.341 clusters de genes ortólogos, enquanto o pan-genoma consiste em 13.068 clusters de genes ortólogos. Sugeriu-se, portanto, que *B. bassiana* possui um pan-genoma aberto, o que é esperado para espécies que colonizam naturalmente ambientes diversos. Isso é significativo porque o fungo é conhecido por colonizar diferentes insetos e hospedeiros nematoides, além de sua capacidade de colonizar plantas (Amobonye *et al.*, 2020; Valero-Jimenez *et al.*, 2016).

Além disso, o genoma de *B. bassiana* foi previsto para codificar 10.366 genes de proteínas, incluindo genes para: proteases (23 tripsinas, 43 subtilisinas, 21 proteases aspárticas, 52 carboxipeptidases, 47 cisteína peptidases, 20 treoninas peptidases e 98 metaloproteases) e 145 enzimas ativas em carboidratos, incluindo quitinases, celulases, hemicelulases, cetolases entre outros (Amobonye *et al.*, 2020; Xiao *et al.*, 2012). Esses dados criam uma base para estabelecer estratégias de engenharia genética conveniente para melhorar a virulência fúngica.

## REFERÊNCIAS

- ABAD, P. *et al.* Invasion, feeding and development. Em: Root-knot Nematodes. 1. ed. **Root-knot nematodes**, 2009. v. 163p. 181.
- AGARWAL, M.; VERMA, A. Modern Technologies for Pest Control: A Review. Em: Heavy Metals. 1. ed. **Rijeka: IntechOpen**, 2020. p. 1–280.
- ALGHANIMI, A. A. J.; ALEBADI, S. M. A.; AL-ETHARI, A. Y. H. Partial Purification and Characterization of Protease from Local Isolate of *Beauveria bassiana*. **Scientific Journal of Medical Research**, v. 04, n. 13, p. 17–22, 2020.
- AMOBONYE, A. *et al.* Biotechnological potential of *Beauveria bassiana* as a source of novel biocatalysts and metabolites. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 40, n. 7, p. 1019–1034, 2020.
- ANDREIS, F. C.; SCHRANK, A.; THOMPSON, C. E. Molecular evolution of Pr1 proteases depicts ongoing diversification in *Metarhizium* spp. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 294, n. 4, p. 901–917, 2019.
- ARIAS-ARAVENA, M.; ALTIMIRA, F.; GUTIÉRREZ, D. *et al.* Identification of exoenzymes secreted by entomopathogenic fungus *Beauveria pseudobassiana* RGM 2184 and their effect on the degradation of cocoons and pupae of quarantine pest *Lobesia botrana*. **Journal of Fungi**, v. 8, p. 1083, 2022.
- BARON, N. C.; RIGOBELLO, E. C.; ZIED, D. C. Filamentous fungi in biological control: Current status and future perspectives. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 79, n. 2, p. 307–315, 2019.
- BERINI, F. *et al.* Microbial and viral chitinases: Attractive biopesticides for integrated pest management. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 3, p. 818–838, 2018.
- BETTIOL, W. *et al.* Aquecimento global e problemas fitossanitários. Brasília, DF: **Embrapa**, 2017. 488 p.
- BHAGWAT, P. *et al.* A comparative analysis of GH18 chitinases and their isoforms from *Beauveria bassiana*: An in-silico approach. **Process Biochemistry**, v. 100, p. 207–216, 2021.
- BONNER, M. R.; ALAVANJA, M. C. R. Pesticides, human health, and food security. **Food and Energy Security**, v. 6, n. 3, p. 89–93, 2017.
- BUENO, R. *et al.* Lepidopteran larva consumption of soybean foliage: basis for developing multiple-species economic thresholds for pest management decisions. **Pest Management Science**, v. 67, p. 170–174, 2011.
- BURTET, L. M. *et al.* Managing fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), with Bt maize and insecticides in southern Brazil. **Pest Management Science**, v. 73, n. 12, p. 2569–2577, 2017.

CANELLES, Q. *et al.* Global review on interactions between insect pests and other forest disturbances. **Landscape Ecology**, v. 36, p. 945-972, 2021.

CANTON, C. *et al.* Monepantel-based anthelmintic combinations to optimize parasite control in cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 53, n. 8, p. 441-449, 2023.

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

CHEN, J. *et al.* The dynamics of the microbial community in fall armyworm *Spodoptera frugiperda* during a life cycle. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 171, n. 7, p. 502-513, 2023.

COUCEIRO, J. DA C. *et al.* UV-B Radiation Tolerance and Temperature-Dependent Activity Within the Entomopathogenic Fungal Genus *Metarhizium* in Brazil. **Frontiers in Fungal Biology**, v. 2, p. 1–12, 2021.

CRUZ, I. *et al.* Using sex pheromone traps in the decision-making process for pesticide application against fall worm (*Spodoptera frugiperda*) [Smith] [Lepidoptera: Noctuidae] larvae in maize. **International Journal of Pest Management**, v. 58, n. 1, p. 83-90, 2012.

CURTIS, R. H. C.; ROBINSON, A. F.; PERRY, R. N. Hatch and host location. Em: Root-knot Nematodes. 1. ed. **Root-knot Nematodes**, 2009. v. 6p. 139–162.

DAY, R. *et al.* Fall armyworm: impacts and implications for Africa. **Outlooks on Pest Management**, v. 28, n. 5, p. 196-201, 2017.

DE MELO, L. R. B. *et al.* Resistance of bovine gastrointestinal nematodes to four classes of anthelmintics in the semiarid region of Paraíba state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 30, n. 3, p. 1–33, 2021.

DE SOUSA, D. E. R.; DE CASTRO, M. B. Pancreatic eurytrematosis in small ruminants: A forgotten disease or an untold history?. **Veterinary Parasitology**, v. 311, p. 109794, 2022.

DE SOUSA, D. E. R. *et al.* *Eurytrema coelomaticum* natural infection in small ruminants: a neglected condition. **Parasitology**, v. 148, n. 5, p. 576-583, 2021.

DEKA, B.; BARUAH, C.; BABU, A. Entomopathogenic microorganisms: their role in insect pest management. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, p. 1-8, 2021.

DHAR, P.; KAUR, G. Production of cuticle-degrading proteases by *Beauveria bassiana* and their induction in different media. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 4, n. 3, p. 65–72, 2010.

DHAWAN, M. *et al.* Deciphering the relationships among enzymatic systems and virulence of *Beauveria bassiana*: A review. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, v. 8, n. 6, p. 1–7, 2020.

- DHAWAN, M.; JOSHI, N. Enzymatic comparison and mortality of *Beauveria bassiana* against cabbage caterpillar *Pieris brassicae* LINN. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 522–529, 2017.
- DONG, L. *et al.* Screening plants resistant against *Meloidogyne incognita* and integrated management of plant resources for nematode control. **Crop Protection**, v. 33, p. 34–39, 2012.
- EBANI, V. V.; MANCIANTI, F. Entomopathogenic fungi and bacteria in a veterinary perspective. **Biology**, v. 10, n. 6, p. 479, 2021.
- EL-GENDI, H. *et al.* A comprehensive insight into fungal enzymes: structure, classification, and their role in mankind's challenges. **Journal of Fungi**, v. 8, p. 0023, 2022.
- ELGUETA, S. *et al.* Pesticide residues in leafy vegetables and human health risk assessment in North Central agricultural areas of Chile. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 10, n. 2, p. 105–112, 2017.
- ESCOBAR, C. *et al.* Overview of root-knot nematodes and giant cells. **Advances in Botanical Research**, v. 73, p. 1–32, 2015.
- FAN, Y. *et al.* Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 295–302, 2007.
- FANG, Y. *et al.* Organochlorine pesticides in soil, air, and vegetation at and around a contaminated site in southwestern China: Concentration, transmission, and risk evaluation. **Chemosphere**, v. 178, p. 340–349, 2017.
- FÁVERO, F. C. *et al.* *Haemonchus* sp. in beef cattle in Brazil: species composition and frequency of benzimidazole resistance alleles. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 185, p. 105162, 2020.
- FENIK, J.; TANKIEWICZ, M.; BIZIUK, M. Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 6, p. 814–826, 2011.
- FERNANDES, E. G. *et al.* Variability in the production of extracellular enzymes by entomopathogenic fungi grown on different substrates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 827–833, 2012.
- FERREIRA, J. M.; SOARES, F. E. Entomopathogenic fungi hydrolytic enzymes: a new approach to biocontrol?. **Journal of Natural Pesticide Research**, v. 3, p. 100020, 2023.
- FIGUEROA, L. B. P. *et al.* 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*. **Journal of Natural Pesticide Research**, v. 8, p. 100077, 2024.
- FÜRST, T.; KEISER, J.; UTZINGER, J. Global burden of human food-borne trematodiasis: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet infectious diseases**, v. 12, n. 3, p. 210–221, 2012.

GAO, B.-J. *et al.* Subtilisin-like Pr1 proteases marking the evolution of pathogenicity in a wide-spectrum insect-pathogenic fungus. **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 365–380, 2020.

GHORBANPOUR, M. *et al.* Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. **Biological Control**, v. 117, p. 147–157, 2018.

GREEN, B. J.; BEEZHOLD, D. H. Industrial Fungal Enzymes: An Occupational Allergen Perspective. **Journal of Allergy**, p. 11, 2011.

GUO, J. *et al.* Prospects for microbial control of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: a review. **BioControl**, v. 65, p. 647–662, 2020.

HARDKE, J. T.; LORENZ III, G. M.; LEONARD, B. R. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) ecology in southeastern cotton. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 6, n. 1, p. 10, 2015.

HAWKINS, N. J. *et al.* The evolutionary origins of pesticide resistance. **Biological Reviews**, v. 94, n. 1, p. 135–155, 2019.

HERNÁNDEZ-TREJO, A. *et al.* Insectos benéficos asociados al control del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.). **Agroproductividad**, v. 11, n. 1, p. 9–14, 2018.

HU, Y. *et al.* Global distribution of zoonotic digenetic trematodes: a scoping review. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 13, n. 1, p. 46, 2024.

ILHA, M. R. S.; LORETTI, A. P.; REIS, A. C. F. Wasting and mortality in beef cattle parasitized by *Eurytrema coelomaticum* in the State of Paraná, southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 133, n. 1, p. 49–60, 2005.

JARAMILLO-BARRIOS, C.; VARÓN-DEVIA, E.; MONJE-ANDRADE, B. Economic injury level and action thresholds for *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in maize crops. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, v. 73, p. 9065–9076, 2020.

JENSEN, R. E. *et al.* Influence of the plant interacting entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on parasitoid host choice-behavior, development, and plant defense pathways. **PLOS ONE**, v. 15, n. 9, p. 1–16, jun. 2020.

JIANG, Y.; WANG, J. The registration situation and use of mycopesticides in the world. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 9, p. 940, 2023.

KHATTAK, B. *et al.* Biological control of *Haemonchus contortus* by fungal antagonists in small ruminants. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 16, n. 5, p. 5825–5835, 2018.

KIM, J. S.; JE, Y. H. A novel biopesticide production: Attagel-mediated precipitation of chitinase from *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant for thermotolerance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 5, p. 1639–1648, ago. 2010.

KIM, K. H.; KABIR, E.; JAHAN, S. A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. **Science of the total environment**, v. 575, p. 525-535, 2017.

KNAPP-LAWITZKE, F.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; DEMELER, J. Elevated temperatures and long drought periods have a negative impact on survival and fitness of stronglylid third stage larvae. **International Journal for Parasitology**, v. 46, n. 4, p. 229-237, 2016.

LEE, S. J. *et al.* Genomic analysis of the insect-killing fungus *Beauveria bassiana* JEF-007 as a biopesticide. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1–12, 2018.

LITWIN, A. *et al.* Accumulation of pyrethroids induces changes in metabolism of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*—Proteomic and lipidomic background. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 249, p. 114418, 2023.

LITWIN, A.; NOWAK, M.; RÓŻALSKA, S. Entomopathogenic fungi: unconventional applications. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 19, n. 1, p. 23–42, 2020.

LOI, M. *et al.* Fungal laccases: the forefront of enzymes for sustainability. **Journal of Fungi**, v. 7, p. 1–25, 2021.

MADSEN, H.; STAUFFER, J. R. Zoonotic trematode infections; their biology, intermediate hosts and control. In: **Parasitic Helminths and Zoonoses-From Basic to Applied Research**. IntechOpen, 2022.

MANTZOUKAS, S.; ELIOPOULOS, P. A. Endophytic entomopathogenic fungi: A valuable biological control tool against plant pests. **Applied Sciences**, v. 10, n. 1, p. 360, 2020.

MANTZOUKAS, S. *et al.* Entomopathogenic fungi: interactions and applications. **Encyclopedia**, v. 2, p. 646-656, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/encyclopedia2020044>.

MARSKOLE, P. *et al.* Prevalence and burden of gastrointestinal parasites in cattle and buffaloes in Jabalpur, India. **Veterinary World**, v. 9, n. 11, p. 1214, 2016.

MASCARIN, G. M. *et al.* Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 165, p. 46–53, 2019.

MASCARIN, G. M.; JARONSKI, S. T. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 11, p. 1–26, 2016.

MINGO, V.; LÖTTERS, S.; WAGNER, N. The impact of land use intensity and associated pesticide applications on fitness and enzymatic activity in reptiles—a field study. **Science of the Total Environment**, v. 590, p. 114-124, 2017.

MIRAGLIA, M. *et al.* Climate change and food safety: an emerging issue with special focus on Europe. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 5, p. 1009-1021, 2009.

MOHANTA, U. K. *et al.* Morphological and molecular characterization of *Eurytrema cladorchis* parasitizing cattle (*Bos indicus*) in Bangladesh. **Parasitology Research**, v. 114, p. 2099-2105, 2015.

MONDAL, S. *et al.* Journey of enzymes in entomopathogenic fungi. **Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering**, v. 18, n. 2, p. 85–99, 2016.

MONTEZANO, D. G. *et al.* Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. **African Entomology**, v. 26, n. 2, p. 286-300, 2018.

NAVEED, M.; NADEEM, F.; MEHMOOD, T.; BILAL, M.; ANWAR, Z.; AMJAD, F. Protease—a versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications: An updated review. **Catalysis Letters**, v. 151, p. 307–323, 2021.

NEVES, J. H. D. *et al.* Diagnosis of anthelmintic resistance in cattle in Brazil: A comparison of different methodologies. **Veterinary Parasitology**, v. 206, n. 3, p. 216–226, 2014.

NIXON, S. A. *et al.* Where are all the anthelmintics? Challenges and opportunities on the path to new anthelmintics. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 14, p. 8-16, 2020.

OKAJIMA, J. *et al.* Current status and its epidemiological consideration of *Fasciola* and *Eurytrema* infections in beef cattle of Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 78, n. 5, p. 785-790, 2016.

OLIVEIRA, C. M. *et al.* Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop Protection**, v. 56, p. 50–54, 2014.

ORTIZ-URQUIZA, A.; KEYHANI, N. O. Molecular Genetics of *Beauveria bassiana* Infection of Insects. Em: Genetics and Molecular Biology of Entomopathogenic Fungi. **Advances in Genetics**. 1. ed. Academic Press, 2016. v. 94, p. 165–249.

OVERTON, K. *et al.* Global crop impacts, yield losses and action thresholds for fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*): A review. **Crop Protection**, v. 145, p. 105641, 2021.

PATTEN, T. *et al.* Gastrointestinal nematode control practices on lowland sheep farms in Ireland with reference to selection for anthelmintic resistance. **Irish Veterinary Journal**, v. 64, p. 1-6, 2011.

PEDRINI, N. Molecular interactions between entomopathogenic fungi (Hypocreales) and their insect host: Perspectives from stressful cuticle and hemolymph battlefields and the potential of dual RNA sequencing for future studies. **Fungal Biology**, v. 122, n. 6, p. 538–545, 2018.

QUESADA-MORAGA, E. *et al.* Key role of environmental competence in successful use of entomopathogenic fungi in microbial pest control. **Journal of Pest Science**, p. 1–15, 2023.

QUESADA-MORAGA, E.; YOUSEF, M.; GARRIDO-JURADO, I. Advances in the use of entomopathogenic fungi as biopesticides in suppressing crop pests. Em: Biopesticides for Sustainable Agriculture. 1. ed. **Burleigh Dodds Science Publishing**, p. 63–98, 2020.

RAMAKUWELA, T. *et al.* Establishment of *Beauveria bassiana* as a fungal endophyte in pecan (*Carya illinoensis*) seedlings and its virulence against pecan insect pests. **Biological Control**, v. 140, p. 104012, 2020.

RAMOS, F. *et al.* Field and Molecular Evaluation of Anthelmintic Resistance of Nematode Populations from Cattle and Sheep Naturally Infected Pastured on Mixed Grazing areas at Rio Grande do Sul, Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 65, n. 1, p. 118–127, 2020.

RANI, L. *et al.* An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. **Journal of Cleaner Production**, v. 283, p. 124657, 2021.

REKIK, H.; JAOUADI, N.; GARGOURI, F.; BEJAR, W.; FRIKHA, F.; JMAL, N.; JAOUADI, B. Production, purification and biochemical characterization of a novel detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus safensis* strain RH12. **International Journal Biological Macromolecules**, v. 121, p.1227-1239, 2019.

RODRIGUES, L. C. C.; FORTINI, R. M.; NEVES, M. C. Impacts of the use of biological pest control on the technical efficiency of the Brazilian agricultural sector. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 20, n. 1, p. 1-16, 2023.

SOTELO-MUNDO, R. R. *et al.* The Lysozyme from Insect (*Manduca sexta*) Is a Cold-Adapted Enzyme. **Protein & Peptide Letters**, v. 14, n. 8, p. 774–778, 2007.

SABBAHI, R. *et al.* A global perspective of entomopathogens as microbial biocontrol agents of insect pests. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 10, p. 100376, 2022.

SAKAMOTO, H. *et al.* Clinicopathological findings in cattle infected with *Eurytrema coelomaticum*. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 78, n. 5, p. 785-790, 1980.

SAKAMOTO, T.; OIKAWA, T. Cubic crystal protein inclusions in the neoderms of the pancreatic fluke, *Eurytrema pancreaticum*, and *Eurytrema coelomaticum*. **Parasitology Research**, v. 101, p. 1393-1399, 2007.

SASSÁ, D. C. *et al.* Avaliação de parâmetros cinéticos de quitinases produzidas por *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 29, n. 4, p. 807–814, 2008.

SAVARY, S. *et al.* The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature Ecology and Evolution**, v. 3, n. 3, p. 430–439, 2019.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1267–1274, 2010.

SEIBER, J. N. *et al.* Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 11613–11619, 2014.

SEYED-TALEBI, F. S. *et al.* Variable induction of cuticle-degrading enzymes of *Beauveria bassiana* isolates in the presence of different insect cuticles. **Journal of Crop Protection**, v. 9, n. 4, p. 563–576, 2020.

SHARMA, J. *et al.* Partial Purification Of An Alkaline Protease From A New Strain Of *Aspergillus Oryzae* AWT 20 And Its Enhanced Stabilization In Entrapped Ca-Alginate Beads. **The Internet Journal of Microbiology**, v. 2, p. 1–14, 2005.

SILVA, I. *et al.* Identificação de lepidópteros-praga no complexo milho-soja. **Embrapa**, 2015.

SILVA, W. W. *et al.* Multiple resistances of gastrointestinal nematodes to anthelmintic groups in cattle of semiarid of Paraíba, Brazil. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 2, p. 29–32, 2017.

SINGH, D. K.; DHALIWAL, G. S.; SINGH, B. Pesticides and environment. **Pestic. Chemical Toxicology**, v. 1, p. 114-122, 2012.

SKINNER, M.; PARKER, B. L.; KIM, J. S. Role of Entomopathogenic Fungi in Integrated Pest Management. Em: Integrated Pest Management. 1. ed. **Academic Press**, 2014. p. 169–191.

SRIVANI, M. V. K.; JALAJA, N. Efficacy of Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* in Pest Management. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 16, n. 4, p. 553–561, 2022.

ST. LEGER, R. J.; BIDOCHKA, M. J.; ROBERTS, D. W. Isoforms of the cuticle-degrading Pr1 proteinase and production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 313, n. 1, p. 1–7, 1994.

STRASSEMeyer, J. *et al.* SYNOPSIS-WEB, an online tool for environmental risk assessment to evaluate pesticide strategies on field level. **Crop Protection**, v. 97, p. 28-44, 2017.

SUBEDI, S.; THAPA, B.; SHRESTHA, J. Root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) and its management: a review. **Journal of Agriculture and Natural Resources**, v. 3, n. 2, p. 21–31, 2020.

SUNG, J.-M. *et al.* *Cordyceps bassiana* and Production of Stromata *in vitro* Showing *Beauveria anamorph* in Korea. **Mycobiology**, v. 34, n. 1, p. 1–6, 2006.

SUO, F. *et al.* Rapid removal of triazine pesticides by P doped biochar and the adsorption mechanism. **Chemosphere**, v. 235, p. 918–925, 2019.

SVADZHYAN, P. K.; FROLKOVA, L. V. Ants as first and second intermediate hosts of some trematodes and cestodes. **Zoologicheskii Zhurnal**, v. 45, n. 2, p. 213-219, 1966.

TANDON, V. *et al.* Neglected tropical diseases: trematodiasis—the Indian scenario. Proceedings of the National Academy of Sciences, **India Section B: Biological Sciences**, v. 85, p. 901-907, 2015.

TANG, C. T. *et al.* Studies on the epidemiology of *Eurytrema pancreaticum* in the eastern Nei Mongol Autonomous Region with some experimentations on *Eurytrema coleomaticum*. **Acta Zoologica Sinica**, v. 29, n. 2, p. 113-114, 1979.

TANG, Z.; TANG, C. The biology and epidemiology of *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet, 1892) and *Eurytrema pancreaticum* (Janson, 1889) in cattle and sheep in China. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 1, p. 49-60, 1977.

TEREFE, M.; TEFERA, T.; SAKHUJA, P. K. Effect of a formulation of *Bacillus firmus* on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infestation and the growth of tomato plants in the greenhouse and nursery. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 100, n. 2, p. 94–99, 2009.

THAMBUGALA, K. M. *et al.* Fungi vs. Fungi in Biocontrol: An Overview of Fungal Antagonists Applied Against Fungal Plant Pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 604923, 2020.

THANASUWAN, S.; PIRATAE, S.; TANKRATHOK, A. Prevalence of gastrointestinal parasites in cattle in Kalasin Province, Thailand. **Veterinary World**, v. 14, n. 8, p. 2091, 2021.

TOLEDO, R. *et al.* New Insights into the Treatment of Foodborne Trematode Infections. **Neglected Tropical Diseases: Drug Discovery and Development**, p. 289-323, 2019.

TORGERSON, P. R.; MACPHERSON, C. N. The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: global trends. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 1, p. 79-95, 2011.

TORRES-ACOSTA, J. F. J.; HOSTE, H. Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v. 77, p. 159–173, 2008.

TUDI, M. *et al.* Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 3, p. 1112, 2021.

TYŚKIEWICZ, R. *et al.* *Trichoderma*: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 4, p. 2329, 2022.

VALERO-JIMENEZ, C. A. *et al.* Comparative genomics of *Beauveria bassiana*: uncovering signatures of virulence against mosquitoes. **BMC Genomics**, v. 17, p. 986, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3339-1>.

VAN LIEROP, P. *et al.* Global forest area disturbance from fire, insect pests, diseases and severe weather events. **Forest Ecology and Management**, v. 352, p. 78-88, 2015.

VEGA, F. E. *et al.* Fungal Entomopathogens. Em: Insect Pathology. 2. ed. **Springer**, 2012. p. 171–220.

VIERA, W.; JACKSON, T. Ecuador demonstrates a sustainable way forward for small farmer producers. **Chronica horticultrae**, v. 60, p. 19–22, 2020.

WANG, W. *et al.* Gender differences in pesticide use knowledge, risk awareness and practices in Chinese farmers. **Science of The Total Environment**, v. 590–591, p. 22–28, 2017.

WILLIAMS, E. G. *et al.* Gastrointestinal nematode control practices in ewes: identification of factors associated with application of control methods known to influence anthelmintic resistance development. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 24, p. 100562, 2021.

XIAO, G. *et al.* Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. **Scientific Reports**, v. 2, p. 483, 2012.

## SEGUNDA PARTE

**ARTIGO 1.** Produção de enzimas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* e sua aplicação no controle de nematoides (*Haemonchus* spp. e *Meloidogyne incognita*) *in vitro*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Artigo publicado no periódico Journal of Natural Pesticide Research:  
<https://doi.org/10.1016/j.napere.2024.100077>

**Produção de enzimas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* e sua aplicação no controle de nematoides (*Haemonchus* spp. e *Meloidogyne incognita*) *in vitro***

Liseth Bibiana Puentes Figueroa<sup>1\*</sup>, Ruth Celestina Condori Mamani<sup>1\*</sup>, Debora Castro de Souza<sup>1</sup>, Jhennifer Cristina de Souza Alves<sup>1</sup>, Stefany Amorim de Souza<sup>1</sup>, Cecilia Balduino Ferreira<sup>1</sup>, Tiago Facury Moreira<sup>3</sup>, Willian César Terra<sup>2</sup>, Filippe Elias de Freitas Soares<sup>1a</sup>

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

2 Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Nematologia, Universidade Federal de  
Lavras

3 Faculdade de Medicina Veterinária, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária,  
Universidade Federal de Minas Gerais.

<sup>a</sup>**Correspondência:** – [filippe.soares@ufla.br](mailto:filippe.soares@ufla.br)

**Resumo**

O Brasil é afetado pela infecção de nematoides gastrointestinais (*Haemonchus* spp.) pois causa doenças subclínicas em pequenos ruminantes, afetando diretamente o peso e a produção de leite, o que gera riscos à saúde dos animais. Da mesma forma, o, *Meloidogyne incognita*, um sério problema que parasita as raízes do tomateiro, causando danos como má absorção de nutrientes e levando a perdas significativas de produtividade. Para minimizar o impacto econômico desses nematóides, é importante estabelecer novas estratégias de controle. O fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* é um micoinseticida utilizado para controlar muitas ordens de insetos, como lepidópteros e hemípteros. O fungo tem a capacidade de produzir enzimas extracelulares, que desempenham um papel importante no controle do processo de infecção por pragas. Porém, o objetivo deste estudo foi avaliar a produção de proteases e

quitinases de *B. bassiana* em diferentes meios de cultura sólidos e líquidos, e sua aplicação *in vitro* para o controle de *Haemonchus* spp. e *Meloidogyne incognita*. Para alcançar esse objetivo, as enzimas foram produzidas em condições de fermentação sólida e líquida para determinar a maior atividade quitinolítica e proteolítica de duas cepas comerciais de *B. bassiana* (IBCB 66 e ESALQ PL63), usando como 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 e farinha de crisálida misturada com arroz. Além disso, foi medida a ação nematicida dos 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 sólido de arroz com soro, no isolado de *B. bassiana* ESALQ PL63 onde o valor foi de 36 U/mg, em comparação com todos os meios testados. Por outro lado, foi identificado que o isolado de *B. bassiana* ESALQ PL63, no meio SDY foi o melhor indutor para a produção de quitinase, com valor de 0,90 U/mg. Em relação à atividade nematicida dos extratos brutos, o percentual de redução foi de 58% para ESALQ PL63 no caso de parasitas animais e para os parasitas de plantas, o percentual de redução foi de 19% para ESALQ PL63 e 71%. Assim, o uso de extratos brutos ricos em enzimas apresenta-se como uma opção promissora para o controle de pragas.

**Palavras-chave:** *Beauveria bassiana*, protease, quitinase, atividade nematicida, fermentação.

## 1. Introdução

Ao longo da história, muitas espécies de nematóides parasitas de plantas e animais causaram série de problemas, incluindo a interrupção do fluxo de nutrientes para a planta, o que pode levar à redução do crescimento e da produção das culturas, além de causar anemia, perda de peso e morte em animais infectados. Esses danos impactam severamente na sociedade por

seus efeitos negativos na produção de alimentos e no desenvolvimento econômico (He et al., 2021).

Nesse contexto, a agricultura e a pecuária dependem 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 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 nematóides 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, destaca-se a eficiência no controle de pragas de insetos. 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).

A espécie fúngica de *Beauveria bassiana* tem sido amplamente utilizada em formulações comerciais de produtos biológicos para o controle de pragas de insetos. Este fungo tem a capacidade de produzir enzimas e metabólitos secundários que desempenham um papel importante no processo de infecção de insetos, aracnídeos e ácaros (Ebani e Mancianti, 2021; Soares et al., 2023).

O mecanismo de infecção de *B. bassiana* em seus hospedeiros depende da ação combinada de dois processos: o mecânico, devido à pressão do apresório que rompe as áreas membranosas ou ligeiramente esclerotizadas 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 (RKNs) (*Meloidogyne* spp.), caracterizado por ser patógenos do solo com ampla gama de hospedeiros, distribuição mundial e alta capacidade reprodutiva. Os nematodocidas químicos são uma solução prática para o controle de RKNs. No entanto, compostos químicos tradicionais, como brometo de metila e organofosforados, foram retirados do mercado (U.S Environmental Protection Agency, 2008; Zasada et al., 2010).

Por outro lado, os nematoides intestinais são outro problema que afeta o setor pecuário. Quando não controlados, podem levar a perdas de 30-40% no desempenho animal (Lino et al., 2016). Além disso, os principais nematoides que afetam pequenos ruminantes e de maior importância econômica são *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus axei* (Silva et al., 2017). Ainda mais, *Haemonchus* é o gênero com maior prevalência, correspondendo a níveis acima de 80% na carga parasitária de pequenos ruminantes (Amarante e Oliveira, 2007, Da silva et al., 2018).

Existe um consenso de que a aplicação de *B. bassiana* 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. Neste ponto, vale ressaltar que tanto os nematóides quanto os insetos fazem parte do superfilo Ecdysozoa, um importante clado animal que reúne todos os animais que sofrem muda (Dunn et al., 2008). Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a produção de protease e quitinase extracelulares de *B. bassiana* em diferentes meios de cultura, e verificar a aplicação dessas enzimas no controle de nematóides parasitas de animais e plantas.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1 Isolados e obtenção dos inóculos**

As cepas de *B. bassiana* usados nos experimentos foram isolados a partir de produtos comerciais. *B. bassiana* (IBCB 66) fornecido como Bouveriz<sup>®</sup>, respectivamente. *B. bassiana* (ESALQ PL63) adquirido como Boveril<sup>®</sup>, respectivamente.

Estes isolados foram repicados em placas de Petri contendo Ágar Batata Dextrose (BDA) 2,0 %, a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , no escuro, por 10 dias. Em seguida, foi adicionado uma solução aquosa estéril de Tween 80 a 0,040 % (v/v) em cada placa inoculada e retirar, de cada uma delas, uma alíquota para contagem do número de conídios na câmara de Neubauer, a fim de obter-se uma concentração da ordem de  $10^7$  conídios/mL. Após este procedimento, foi utilizado a suspensão de conídios para inoculação em meios líquidos e sólidos com o objetivo de produzir enzimas extracelulares, tais como proteases e quitinases.

### **2.2 Produção enzimática**

Todos os ensaios foram realizados com pelo menos três repetições. Todos os meios de cultura foram autoclavados previamente à inoculação.

### **2.3 Preparação dos meios de cultura líquidos**

#### **2.3.1 Amido solúvel com extrato de levedura**

Para a produção do meio de cultura líquido foi utilizada a metodologia adaptada descrita por Kim et al. (2011). Uma alíquota de 0,50 mL de conídios, preparada conforme descrito na seção 2.1, foi inoculada em frascos que contém 50 mL de meio composto por amido solúvel e extrato de levedura, ambos com concentrações de 10 g/L, com pH inicial igual

a 6,00. Todos os frascos foram incubados sob agitação rotativa a 150 rpm, a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  por 4 dias.

### **2.3.2 Sintético**

O meio de cultura sintético foi utilizado para crescimento dos isolados de acordo com Bhadani et al. (2021). Uma alíquota de 0,50 mL de conídios, preparada conforme descrito na seção 2.1, e inoculada em frascos que contém 50 mL de meio composto por:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,0 (g/L),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,50 (g/L),  $\text{MgSO}_4$  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% m/v), extrato de levedura (1% m/v), caseína (1% m/v), em pH inicial de 6,00. Os frascos foram submetidos a agitação rotativa a 150 rpm, a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  por 4 dias.

### **2.3.3 Caldo SDY (amido, dextrose e extrato de levedura)**

O caldo SDY foi preparado de acordo com a metodologia de Dhar and Kau (2010). Uma alíquota de 0,50 mL de conídios, preparada conforme descrito na seção 2.1, foi inoculada em frascos que contém 50 mL de meio composto por (m/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 recolhida e inoculada em frascos contendo 50 mL de meio de indução composto por caseína (1,0%) (m/v). O pH inicial dos meios de cultura foi ajustado no valor de 8,00 e as culturas foram incubadas a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e 150 rpm, por três dias.

### **2.3.4 YPG (extrato de levedura, peptona e glicose)**

O caldo YPG foi preparado de acordo com a metodologia Nahar et al. (2004). Uma alíquota de 0,50 mL de conídios, preparada conforme descrito na seção 2.1, foi inoculada em frascos que contém 50 mL de meio composto por (m/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. De igual maneira, foi utilizado um meio com quitina para a produção induzida de quitinases, tendo como composição:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3,0 (g/L);  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,0 (g/L);  $\text{MgSO}_4$  0,7 (g/L); NaCl 0,50 (g/L);  $\text{CaCl}_2$  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.

### **2.3.5 Obtenção do extrato bruto a partir dos meios de cultura líquidos**

Após o período de incubação, os meios de cultivo foram filtrados a vácuo em funil utilizando papel Whatman nº4, separando-se a biomassa produzida do conteúdo líquido. Em seguida, o filtrado foi centrifugado a  $10,000 \times g$  por 15 min (Kim et al. 2011). O sobrenadante coletado em cada meio de cultivo foi denominado como extrato bruto para cada um dos isolados e utilizado nos ensaios posteriores.

## **2.4 Preparação dos meios de cultura sólidos**

### **2.4.1 Arroz com farinha de crisálida do bicho-da-seda (*Bombyx mori*)**

Para a preparação do meio sólido foi utilizado a metodologia descrita por Santoro et al. (2005). Uma alíquota de 0,50 mL de conídios, preparada conforme descrito na seção 2.1, foi inoculada em frascos que contém 50 g de arroz pré-cozido e 50 g de farinha de crisálida do bicho-da-seda (*Bombyx mori*). As amostras foram mantidas na incubadora BOD, em condições de luz, a  $27\pm 1^\circ\text{C}$  por 25 dias.

#### **2.4.2 Arroz com soro de leite**

Outro meio de cultura avaliado foi suplementado com um resíduo da indústria de laticínios, o soro de leite. O meio de cultura proposto foi adaptado da metodologia descrita por Santoro et al. (2005). Uma alíquota de 0,50 mL de conídios, preparada conforme descrito na seção 2.1 foi inoculada em frascos que contém 40 g de arroz pré-cozido e 20 mL de soro de leite. As amostras foram mantidas na incubadora de demanda bioquímica de oxigênio (BOD), em condições de luz, a  $27\pm 1^\circ\text{C}$  por 10 dias. Foi necessário agitar as amostras inoculadas a cada três dias para dispersar os conídios, com o objetivo de melhorar o contato e a germinação.

#### **2.4.3 Obtenção do extrato bruto a partir dos meios de cultura sólido**

As amostras foram homogeneizadas com água destilada estéril e levadas à agitação por um período de 2 horas e filtradas a vácuo em funil utilizando papel Whatman nº4, separando-se a biomassa produzida do conteúdo líquido. Em seguida, o filtrado foi centrifugado a 10,000 x g por 15 min (Kim et al. 2011). O sobrenadante coletado foi denominado como extrato bruto para cada um dos isolados e utilizado nos ensaios posteriores.

### **2.5 Atividade enzimática**

#### **2.5.1 Atividade de protease total**

A atividade proteolítica dos extratos brutos foi mensurada de acordo com Soares et al. (2013). As condições de ensaio foram:  $37^\circ\text{C}$  e pH 7,15. Um zero reacional foi preparado nas mesmas condições do ensaio enzimático, contudo, a reação foi interrompida por TCA, ácido tricloroacético, 10% (m/v) antes da adição do extrato contendo enzimas. Uma unidade de protease foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0  $\mu\text{g}$  de tirosina por minuto nas condições do ensaio.

### **2.5.2 Atividade de quitinase total**

A atividade de quitinase dos extratos brutos foi mensurada pela quantificação de açúcares redutores (Miller 1959). As condições de ensaio foram: 37°C e pH 7,15. Uma unidade de atividade de quitinase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1.0 µM de N-acetilglicosamina por minuto, nas condições de ensaio.

### **2.5.3 Determinação de proteínas totais**

A concentração de proteínas totais foi estimada de acordo com o método de Bradford (1976), no qual foi utilizado albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

### **2.5.4 Atividade específica**

A atividade específica das enzimas foi calculada por meio da divisão do valor obtido da atividade enzimática com o valor mensurado de proteínas totais e foi expressa em U/mg de proteína.

## **2.6 Obtenção de nematoides**

### **2.6.1 Obtenção de nematoides parasitas de animais**

Larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de nematoides pertencentes a *Haemonchus* spp. (~70%) e *Trichostrongylus* spp. (~30%) foram coletadas depois de coprocultura segundo (Soares et al. 2019), na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), na cidade de Belo Horizonte, obtidas de fezes de caprinos (*Capra aegagrus hircus*) e ovinos (*Ovis aries*) naturalmente infectados.

### 2.6.2 Obtenção de nematoides parasitas de plantas

*Meloidogyne incognita* foi identificado e caracterizado de acordo com a metodologia de eletroforese vertical modificada por Ornstein (1964) e Davis (1964). *M. incognita* foi multiplicado em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), cultivar Santa Clara, em condições de casa de vegetação. Os ovos foram extraídos de raízes de tomateiro usando a técnica descrita por Hussey e Barke (Boneti e Ferraz 1981). Os juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) foram obtidos usando a técnica do funil de Baermann (Baermann 1917). Para os ensaios *in vitro*, foram utilizados J<sub>2</sub> coletados 48 h após o estabelecimento da câmara de incubação. Os J<sub>2</sub> eclodidos 24 h após o início da câmara de incubação foram descartados.

### 2.6.3 Ensaio nematicida *in vitro*

A análise da atividade nematicida foi realizada com enzimas produzidas por *B. bassiana*, formando três grupos experimentais: um grupo de controle e dois grupos tratados (Soares et al. 2013). O grupo controle foi tratado com: 60 µL de água destilada e 60 µL de uma suspensão contendo 30± 0,943 nematoides. Cerca de 30 nematoides foram tratados com extrato enzimático bruto desnaturado (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 o extrato enzimáticos, utilizando o meio de cultura que produz a maior atividade proteolítica, para cada um dos isolados avaliados de *B. bassiana*. O ensaio foi realizado com *Haemonchus* spp. (~70%), *Trichostrongylus* spp. (~30%) e *Meloidogyne incognita*.

## 2.7 Análise estatística

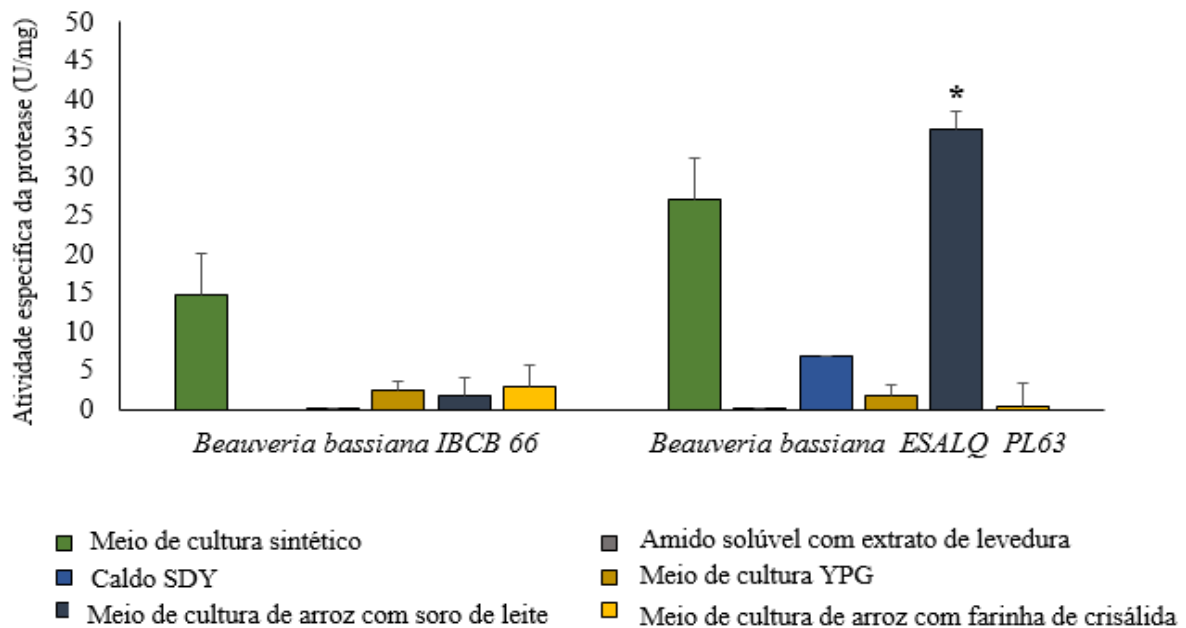
Os dados obtidos foram interpretados estatisticamente por ANOVA com níveis de significância de 1 e 5%. A eficiência da destruição de nematoides, em comparação com o controle, foi realizada pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade, usando o software Bioestat 5.0 (Ayres et al. 2003). Posteriormente, a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

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

## 3. Resultados

### 3.1 Produção e atividade enzimática

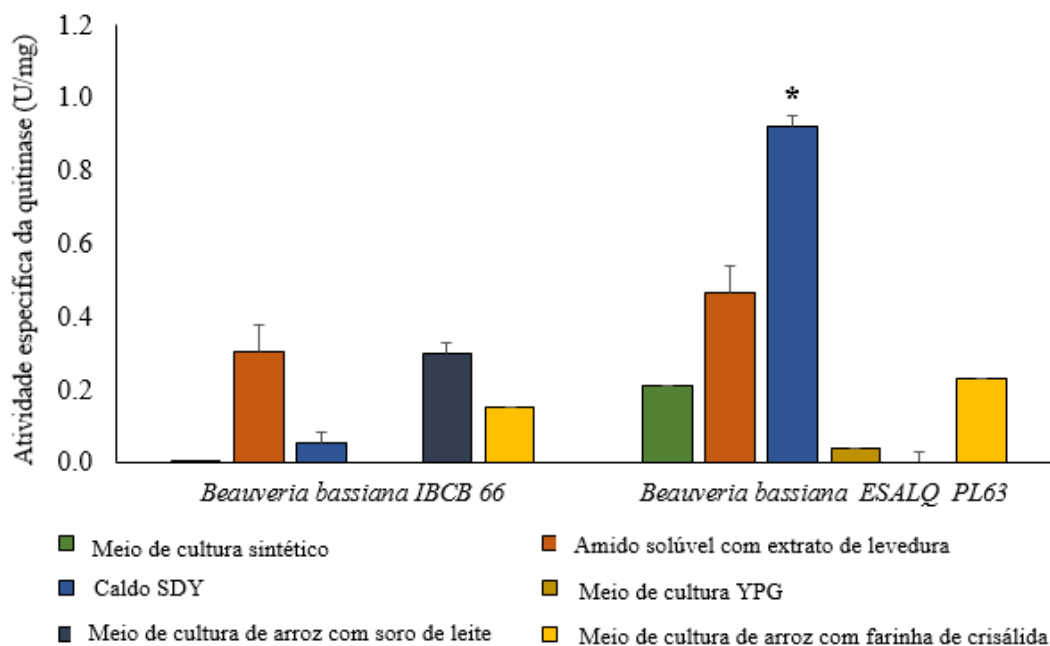
Os resultados obtidos no teste de atividade total de protease para as diferentes linhagens comerciais de *B. bassiana*, observou-se uma diferença significativa ( $p < 0,01$ ) na produção de protease por *B. bassiana* ESALQ PL63 utilizando o meio arroz com soro (36 U/mg) em comparação a todos os meios testados, incluindo aqueles avaliados para *B. bassiana* IBCB 66 (Figura 1).



**Fig. 1.** Atividade específica da protease (U/mg) do sobrenadante da cepa de *Beauveria bassiana* IBCB 66 e ESALQ PL63, que foi produzido na combinação de diferentes meios de cultura líquidos e sólidos.

\* *Beauveria bassiana* IBCB 66 em meio de cultura arroz com soro apresentou diferença significativa pelo teste estatístico de Tukey de ( $p < 0,01$ ) em relação a *Beauveria bassiana* ESALQ PL63 e entre os demais meios de cultura avaliados.

No entanto, a atividade específica da quitinase para a linhagem *B. bassiana* ESALQ PL63 cultivada em caldo SDY produziu um extrato bruto com 0,90 U/mg, valor superior aos demais meios (Figura 2). A diferença foi significativa ( $p < 0,01$ ) em relação aos valores de atividade dos outros meios de cultura testados, incluindo aqueles avaliados para *B. bassiana* IBCB 66.



**Fig. 2.** Atividade específica da quitinase (U/mg) do sobrenadante de *Beauveria bassiana* cepa IBCB 66 e ESALQ PL63, que foi produzida na combinação de diferentes meios de cultura líquidos e sólidos.

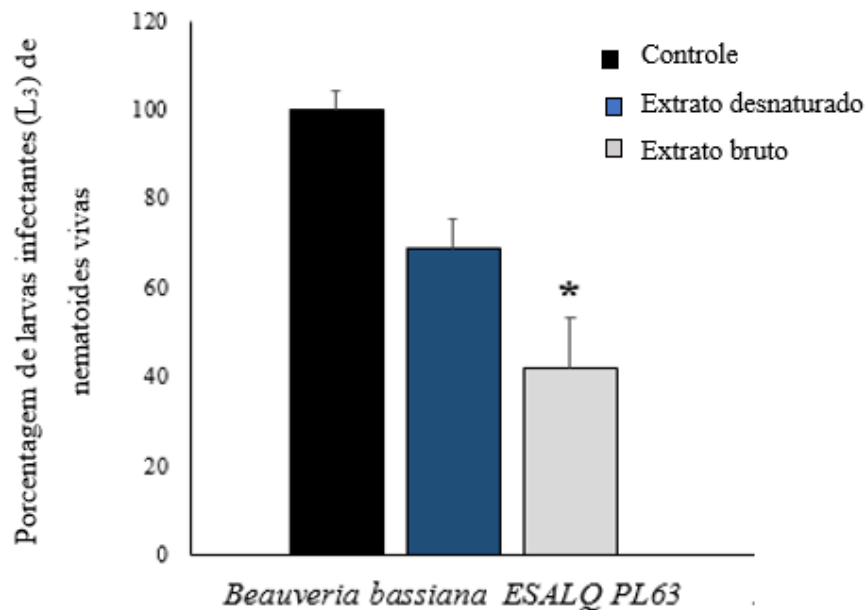
\* *Beauveria bassiana* ESALQ PL63 em caldo SDY apresentou diferença significativa pelo teste estatístico de Tukey de ( $p < 0,01$ ) em relação a *Beauveria bassiana* IBCB 66 e entre os demais meios de cultura avaliados.

### 3.2 Atividade Nematicida

O extrato bruto com a maior atividade específica de protease produzido pela cepa de *B. bassiana* (ESALQ PL63) foi selecionado para os ensaios nematicidas.

No ensaio com os nematoides parasitas de pequenos ruminantes ( $L_3$ ), para a cepa comercial de *B. bassiana* ESALQ PL63 foi observada uma diferença estatística ( $p < 0,01$ )

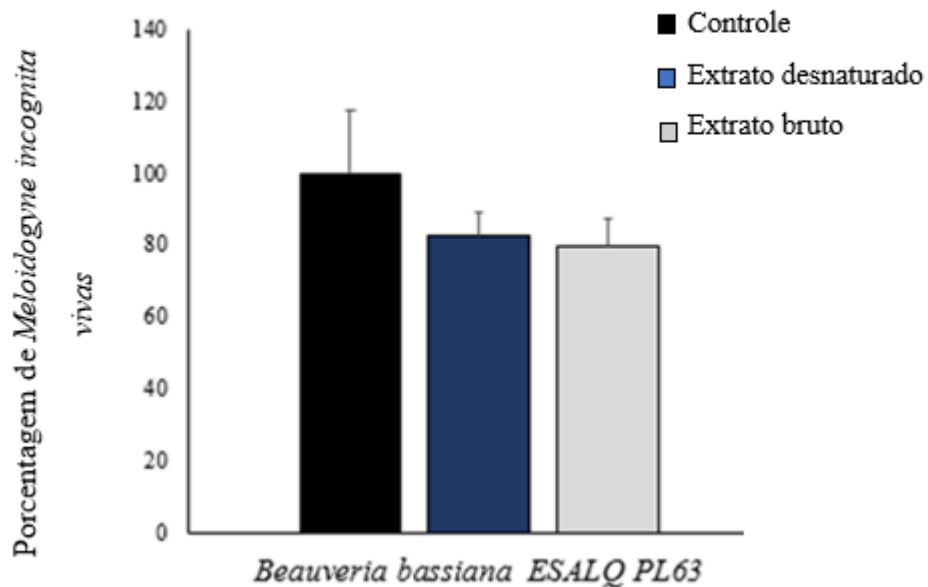
(Figura 3) do extrato ativo em comparação ao controle e ao grupo desnaturado. Os percentuais de redução obtidos foram: 30 % para o extrato com a enzima desnaturada e 58 % para o extrato com enzimas ativas, em relação ao grupo controle.



**Fig. 3.** Porcentagens médias de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de nematoides recuperadas nos dois grupos tratados (extrato de *Beauveria bassiana* ESALQ PL63; extrato desnaturado) e um grupo controle (contendo apenas água destilada e larvas infectantes de nematoides L<sub>3</sub>) após incubação por 24 horas a 27°C. O tratamento representado com um asterisco (\*) apresentou diferença significativa ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo desnaturado e ao grupo controle pelo teste t e teste de Tukey

Seguidamente, utilizando-se o mesmo extrato, avaliou-se a atividade nematicida sobre juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *M. incognita*. O extrato bruto produzido por *B. bassiana* ESALQ PL63 não representou diferença estatística relevante ( $p > 0,01$ ) em comparação ao tratamento controle. O percentual de redução para este isolado foi: extrato com enzima

desnaturada (17%) e extrato com enzima ativa (19%) em comparação com o controle (Figura 4).



**Fig. 4.** Porcentagens médias de juvenis de *Meloidogyne incognita* recuperados nos grupos tratados (extrato de *Beauveria bassiana* ESALQ PL63; extrato desnaturado) e um grupo controle (contendo apenas água destilada e *M. incognita*) após incubação por 24 horas a 27°C. O tratamento representado com um asterisco não apresentou diferença significativa ( $p > 0,01$ ) em relação ao grupo desnaturado e ao grupo controle pelo teste t e teste de Tukey.

#### 4. Discussão

As cepas comerciais do fungo entomopatogênico *B. bassiana* IBCB 66 e ESALQ PL63 utilizadas no presente estudo produziram protease e quitinase, alcançando um alto nível de atividade enzimática. Além disso, o resultado mostrou que, após avaliar diferentes meios de cultivo, o meio de soro de arroz foi o que induziu a maior produção de protease (Fig. 1).

O arroz é o substrato mais utilizado no processo industrial de multiplicação de fungos. Este meio é econômico e tem efeitos positivos na germinação fúngica, proporcionando uma

superfície que permite uma rápida colonização fúngica 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 é um excelente meio de cultivo para a produção de proteases e quitinases por cepas comerciais de *B. bassiana*. Além disso, este meio permite que a cepa de *B. bassiana* produza protease e quitinase, demonstrado no estudo de Kim et al. (2013).

Por outro lado, a cepa de *B. bassiana* ESALQ PL63 utilizada no presente estudo produziu altos níveis de atividade quitinolítica no meio de cultivo que continha caldo SDY (Fig. 2). Uma das principais fontes de nitrogênio deste meio, além da peptona, é o extrato de levedura, assim como para aqueles avaliados nos diferentes isolamentos em meio de amido e YPG (Montesinos-Matías et al. 2021). Vale a pena mencionar que a cutícula do inseto e o extrato de levedura no meio de cultivo podem fornecer os nutrientes necessários, que não estão presentes nos meios comerciais, melhorando a maioria das características envolvidas na patogenicidade de *B. bassiana* (Montesinos-Matías et al. 2021).

Este resultado corrobora que o uso deste tipo de meio de cultivo pode promover a germinação de conídios e induzir a produção de enzimas, como as quitinases, em *B. bassiana*. Sun et al. (2023) selecionaram mutantes de *B. bassiana* que foram cultivados em caldo (SDY) e foram avaliados para atividades de quitinase. A atividade enzimática foi maior no mutante (6M) nos dias 5, 9 e 10. No caso do mutante (8M), a atividade de quitinase aumentou nos dias 5 e 6 em comparação com o controle. Especialmente, a germinação de conídios e a produção de enzimas estão profundamente influenciadas pelas condições do meio de cultivo (Kim et al. 2010). De maneira similar, Kim et al. (2011) avaliaram diferentes fontes de carboidratos e nitrogênio para a otimização de um meio que produzia sobrenadante de *B. bassiana* SFB-205 efetivo com parâmetro de atividade quitinolítica. Além disso, a produção de quitinase foi

incrementada ainda mais com a adição individual de fontes de nitrogênio ao amido solúvel (combinação carboidrato+nitrogênio) e se maximizou combinando-o com extrato de levedura.

No presente estudo, foi avaliado arroz com farinha de crisálida de bicho-da-seda (*B. mori*) para a produção de protease e quitinase, o que nos permite sugerir que ao suplementar meios de cultivo sólidos com cutícula de inseto, foi possível induzir a produção de enzimas extracelulares como proteases e quitinases, tendo em conta os resultados obtidos neste estudo. Esse meio de cultura é um subproduto da indústria da seda, como fonte de nitrogênio. Zhang et al. (2004) demonstraram que a produção de quitinase foi melhorada na fermentação em estado sólido em escala laboratorial utilizando farelo de trigo misturado com cutícula de inseto para o isolamento de *B. bassiana* Bb174.

Dentre as características de *B. bassiana*, destaca-se o seu potencial como agente de biocontrole para pragas de plantas e nematoides, mas a pesquisa sobre seu uso para o controle de nematoides é limitada (Waill et al. 2021). No entanto, tem sido demonstrado que o extrato enzimático de *B. bassiana* pode ter efeito nematicida sob *M. incognita*, *M. hapla*, *Aphelenchoides besseyi* e *Heterodera glycines* (Liu et al. 2008; Zhao et al. 2013). Isso se deve ao fato de que a cutícula dos nematoides é composta de colágenos e cuticulinas, que são os alvos das enzimas presentes no extrato de *B. bassiana* (Page et al. 2014).

Outros autores também demonstraram o efeito antagonista significativo dos fungos *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Paecilomyces lilacinus* contra o nematoide-das-galhas *M. incognita*, reduzindo significativamente sua população e melhorando posteriormente o crescimento e o rendimento das plantas de 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 *B. bassiana*, mostrou atividade nematicida contra juvenis de segundo estágio de *M. incognita*. Este resultado pode ser comparado com o relatado por Soares et al. (2015), onde foi avaliada a ação nematicida

de quitinases extracelulares produzidas por fungos nematófagos em *Panagrellus redivivus*. Soares et al. (2015) forneceram evidências de que a enzima quitinase está envolvida no mecanismo molecular de penetração da cutícula e digestão celular dos nematoides. Além disso, os extratos enzimáticos mostraram uma ação significativa sobre as proteínas da cutícula dos juvenis. Chen e Peng (2019) mencionaram que a quitina é o componente essencial da casca do ovo e da faringe de alguns nematoides, o que pode indicar o efeito das quitinases obtidas de extratos brutos na porcentagem de redução observada nos resultados.

Em relação aos nematoides parasitas de animais, outros autores propõem o uso dos seguintes gêneros, frequentemente isolados do ambiente externo, para o controle de infecções por helmintos gastrointestinais em pequenos ruminantes: *Arthrobotrys* spp., *Candelabrella* spp., *Arundo* spp., *Andropogon* spp., *Trichoderma* spp., *Beauveria* spp., *Clonostachys* spp. e *Lecanicillium* spp. (Soto-Barrientos et al. 2011). No entanto, vale a pena notar que este artigo é o primeiro relatório da ação enzimática de extratos brutos de *B. bassiana* sobre nematoides parasitas de ruminantes. De fato, isso demonstra que as proteases produzidas por este fungo reconhecem e catalisam a hidrólise de proteínas em juvenis de nematoides, não apenas em insetos (Fig. 3-4).

Atualmente, o mercado de biocontrole de pragas é o mercado de crescimento mais rápido, com uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 13,6%. Por isso, espera-se que o mercado de biocontrole cresça de aproximadamente US\$5 bilhões atualmente para US\$15 bilhões até 2029 (Marrone 2024). Atualmente, os pesticidas microbianos podem desempenhar um papel importante na melhoria da saúde ambiental e humana ao reduzir os pesticidas químicos tóxicos, permitindo que os biopesticidas ganhem uma aceitação mais ampla nas práticas de produção agrícola sustentável (Kumar et al. 2018; Mishra et al. 2015).

## 5. Conclusão

A cepa comercial de *B. bassiana* produziu com sucesso enzimas extracelulares, utilizando o meio de cultura de arroz suplementado com soro de leite, sendo o meio de cultura mais eficaz. A enzima protease nesta pesquisa exibiu atividade nematicida contra *Haemonchus* spp e *Trichostrongylus* spp, assim como, *Meloidogyne incognita*, mostrando seu potencial como biopesticida.

## 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](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. *Annals of the New York Academy of Sciences* 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/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>

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>

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, C.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 aphicidal 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 aphicidal *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. *Journal of invertebrate pathology* 165: 74-81. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.10.008>

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)

Marrone, P., 2024. Status of the biopesticide market and prospects for new bioherbicides. *Pest Management Science*, 80: 81-86. <https://doi.org/10.1002/ps.7403>

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., 2015. Biopesticides: where we stand?. In *Plant microbes symbiosis: applied facets*. New Delhi: Springer India: 37-75. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2068-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2068-8_2)

Montesinos-Matías, R., Ordaz-Hernández, A., Angel-Cuapio, A., Colin-Bonifacio, Y., Garcia-Garcia, 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/jobm.202000627>

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>

Ornstein, L., 1964. Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. *Annals of the New York Academy of Sciences* 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.ijpddr.2014.05.003>

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., Ruskowski, 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., 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>

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.jspr.2013.02.004>

Viera, W., Jackson, T., 2020. Ecuador demonstrates a sustainable way forward for small farmer producers. *Chron Horticult* 60:19-22.

Waill, E., Ghoson., D., Gaziea., S., 2021. The Anti-nemic 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 *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.** Estudo *in silico* e *in vitro* do potencial ovicida de proteases de *Beauveria bassiana* sobre o trematódeo *Eurytrema pancreaticum*<sup>2</sup>

<sup>2</sup> Artigo elaborado conforme as normas do periódico Applied Microbiology and Biotechnology

**Estudo *in silico* e *in vitro* do potencial ovicida de proteases de *Beauveria bassiana*  
sobre o trematódeo *Eurytrema pancreaticum***

Liseth Bibiana Puentes Figueroa<sup>1</sup>, Amanda do Carmo Alves<sup>1</sup>, Adriane Toledo da Silva<sup>1</sup>,  
Debora Castro de Souza<sup>1</sup>, Nivia Kelly Lima Sales<sup>1</sup>, Lorrana Verdi Flores<sup>2</sup>, Tiago Facury  
Moreira<sup>3</sup>, Fabio Ribeiro Braga<sup>4</sup>, Filippe Elias de Freitas Soares<sup>1a</sup>

1 Laboratório de Biotecnologia e Bioquímica Aplicada, Departamento de Química,  
Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, Brasil

2 Laboratório Central de Biologia Molecular, Departamento de Química, Universidade  
Federal de Lavras, Lavras – MG, Brasil

3 Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade  
Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, Brasil

4 Laboratório de Parasitologia Experimental e Controle Biológico, Universidade Vila-  
Velha, Brasil.

<sup>a</sup> Corresponding author – [filippe.soares@ufla.br](mailto:filippe.soares@ufla.br)

## **Resumo**

Na busca por novas alternativas para o controle de agentes parasitários, as proteases de *Beauveria bassiana* se destacam. Este estudo caracterizou *in silico* e *in vitro* o potencial antihelmíntico das proteases de *B. bassiana* contra ovos do trematódeo *Eurytrema pancreaticum*. A produção enzimática do isolado IP 361 de *B. bassiana* foi feita em condições de fermentação sólida no meio de cultura de arroz com soro de leite; após este processo as proteínas foram precipitadas utilizando acetona na proporção 1:4 (sobrenadante/solvente orgânico) e determinada a atividade específica. Por meio de análise *in silico*, o perfil das proteases presentes no precipitado foi avaliado por meio de um zimograma. Além disso,

determinou-se o efeito inibitório do Fluoreto De Fenilmetilsulfonil (PMSF) e o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) frente à atividade proteolítica. A árvore filogenética foi representada e o modelo tridimensional foi desenhado. Ovos de *E. pancreaticum* foram empregados na avaliação anti-helmíntica *in vitro* das proteases. Os resultados demonstraram que a precipitação aumentou significativamente a atividade proteolítica ( $p < 0,01$ ), em relação ao extrato bruto. No entanto, não foi detectada atividade para quitinase. O perfil proteolítico do precipitado revelou cinco bandas com pesos moleculares de 25,6 a 66,9 kDa. A análise *in silico* identificou a linhagem das proteases Pr1 e Pr2. Nos ensaios *in vitro*, as proteases reduziram significativamente ( $p < 0,01$ ) o número dos ovos íntegros de *E. pancreaticum* com um percentual de 53% em comparação com o controle com enzimas desnaturadas. Estes resultados indicam que as proteases de *B. bassiana* possuem efeito ovicida com potencial uso futuro no controle ambiental.

**Palavras-chaves:** Fungo entomopatogênico, protease, euritrematose, estrutura 3D, zimograma.

## **Introdução**

O avanço da indústria global e o conhecimento aprofundado sobre enzimas impulsionaram seu uso na criação de produtos de alta qualidade, como bioinseticidas, tornando-as ferramentas relevantes no controle biológico (Sandoval and Hyster 2020). As enzimas, catalisadores biológicos encontrados em todos os seres vivos, assumem um papel crucial na química verde como ferramentas promissoras para processos industriais mais sustentáveis e economicamente viáveis dada a alta especificidade e eficiência (Naveed et al. 2021; Rekik et al. 2019; Page and Di Cera 2008).

Os fungos entomopatogênicos são agentes de controle biológico bem estabelecidos, que estão gradualmente substituindo os produtos químicos sintéticos no controle de pragas dada a capacidade de produção de maquinaria enzimática (Bara and Laing 2020; Dhawan and Joshi 2017). Como resultado, muitos estudos têm se dedicado ao potencial de vários fungos entomopatogênicos para a produção de enzimas importantes e outros metabólitos com destaque para: *Beauveria bassiana* (Rojas-Osnaya et al. 2020; Liu et al. 2020; dos Reis et al. 2018). As principais enzimas produzidas por *B. bassiana* são: lipases ((EC 3.1.1.3), proteases (EC. 3.4) e quitinases (EC 3.2.1.14) (Amobonye et al. 2020; Grogan and Holland 2000).

As proteases, enzimas hidrolíticas que catalisam a clivagem das proteínas em cadeias menores de peptídeos e grupos de aminoácidos, são importantes na indústria dada as suas propriedades físico-químicas, mecanismos de ação, além de ter participação fundamental em processos fisiológicos no controle biológico (Negi et al. 2023; Semenova et al. 2020; Dar et al 2017).

A ação de proteases extracelulares é um fator crucial na infecção de fungos entomopatogênicos como *B. bassiana* em artrópodes. Nesse contexto, as enzimas proteolíticas mais frequentemente estudadas para esse fungo são a serino-protease tipo subtilisina Pr1 e a protease ácida tipo tripsina Pr2 (Dhawan et al. 2020; Semenova et al. 2020).

Infecções parasitárias esquecidas ou negligenciadas surgiram ou ressurgiram ao longo do tempo em populações humanas e animais. A Euritrematose está entre as doenças parasitárias mais negligenciadas em humanos (Toledo et al. 2019; Tandon et al. 2015) e também receberam pouca atenção em pequenos ruminantes por um longo período devido ao tempo prolongado de permanência dos ovos no meio ambiente (de Sousa et al. 2021; Rojo-Vazquez et al. 2012). O gênero *Eurytrema* pertence à família Dicrocoeliidae e a classe Tremátoda, o qual compreende os principais parasitas dos ductos pancreáticos de ruminantes (de Sousa and de Castro 2022).

A administração de anti-helmínticos sem nenhum critério técnico de seleção, de forma empírica e indiscriminada gera como consequência a presença de medicamentos no animal que pode ser transmitido a toda cadeia alimentícia (Ramos et al. 2020). Desta forma, a aplicação das proteases extracelulares, obtidas de *B. bassiana* apresenta potencial como uma alternativa sustentável ao uso de inseticidas sintéticos para atingir o desenvolvimento dos ovos presentes nas fezes de ruminantes infectados.

O objetivo deste estudo foi caracterizar *in silico* e *in vitro* o potencial ovicida de proteases de *B. bassiana* sobre o trematódeo *E. pancreaticum*.

## **Materiais e métodos**

### **Obtenção e extração de enzimas extracelulares**

O isolado IP 361 de *B. bassiana* s.l, usado no presente estudo foi gentilmente cedido pelo Professor Christian Luz da coleção do Laboratório de Patologia de invertebrados do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás. Este fungo foi cultivado em placas de Petri contendo 2,0% de ágar Batata Dextrose (BDA), a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , no escuro, por 10 dias.

Um inóculo contendo uma concentração de  $10^7$  conídios/mL, foi preparado a partir de uma solução aquosa estéril de Tween 80 a 0,040% (v/v) obtida de cada placa e foi contabilizado o número de conídios na câmara de Neubauer. A partir desta solução de conídios foi adicionado 0,50 mL em frascos contendo 40 g de arroz pré-cozido e 20 mL de soro de leite, previamente autoclavados. Os meios foram mantidos em uma incubadora BOD, em condições de luz (24h), a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , por 10 dias. Cada amostra foi agitada manualmente a cada três dias para homogeneização dos conídios, a fim de melhorar o contato e a germinação Figueroa et al. (2024).

Após o período de fermentação no estado sólido, foram adicionados 30 mL de água destilada estéril aos meios de cultura e levados em agitação por 2 horas, a uma agitação orbital de 120 RPM. Os extratos foram filtrados a vácuo usando papel Whatman nº 4 e centrifugado a 10.000 g por 15 minutos. O sobrenadante obtido, contendo enzimas e livre de células fúngicas, foi denominado extrato bruto, conforme foi estabelecido por Figueroa et al. (2024).

### **Concentração**

As enzimas foram concentradas através da precipitação com solvente orgânico, seguindo a metodologia de Doonan (2004). Uma alíquota de sobrenadante na proporção 1:4 (v/v) foi misturada com o solvente/sobrenadante, resultando na concentração das proteínas. As amostras foram incubadas a 4°C por 1 h e centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado obtido foi ressuspensão em 100 µL de água destilada, para posterior uso.

### **Atividade da protease total**

Para determinar a atividade da protease total, foram utilizados 20µL de amostra e foi incubado a 37°C na presença de 500µL de caseína 1,0% (m/v) e 480µL de tampão Tris-HCl 50mM (pH 7,15), por 30 min. Após esse período, a reação foi interrompida com adição de 1mL de ácido tricloroacético (TCA – P.A. – ACS/Dinâmica) 10,0% (m/v). As suspensões foram centrifugadas a 10.000 g por 10min e o sobrenadante foi utilizado para leitura de absorbância a 280nm. Uma unidade de atividade enzimática de protease foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1 µg de tirosina por minuto nas condições experimentais acima mencionadas (Braga et al. 2011).

### **Atividade da quitinase total**

Para determinar a atividade da quitinase total, foram utilizados 20 $\mu$ L de amostra incubada a 37°C na presença de 500 $\mu$ L de quitina coloidal 1,0% (m/v) e 480 $\mu$ L de tampão Tris-HCl 50mM (pH 7,15), por 60 min. Após esse período, a reação foi interrompida com adição de 1mL de DNS e levada em banho fervente por 5 min. As suspensões foram centrifugadas a 10.000 g por 10min e o sobrenadante foi utilizado para leitura de absorbância a 540nm. Uma unidade de atividade de quitinase foi definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a liberação de 1,0  $\mu$ M de N-acetilglucosamina por minuto, nas condições do ensaio (Miller 1959).

### **Determinação da proteína total e atividade específica**

A concentração total de proteína foi estimada empregando albumina sérica bovina (BSA) como padrão, seguindo o protocolo descrito por Bradford (1976), a partir dos dados obtidos, foi calculada a atividade específica da protease e quitinase dividindo a atividade enzimática pela concentração de proteínas totais, sendo expressa em U mg<sup>-1</sup> de proteína.

### **Caracterização enzimática**

#### **Zimograma**

Para realizar uma análise do perfil das proteases presentes no extrato precipitado ativo do fungo *B. bassiana* (IP 361), foi produzido um zimograma usando a caseína como substrato (Casein-SDS-PAGE), conforme descrito por Braga et al. (2013), com algumas modificações. As amostras foram submetidas a eletroforese em um gel de poliacrilamida a 10% contendo 1% de caseína. As amostras foram misturadas com tampão de amostra (sem  $\beta$ -mercaptoetanol) e

aplicadas sem aquecimento prévio. Após a eletroforese, o gel foi incubado em uma solução de 2,5% de Triton X-100 a por uma hora, seguidamente foi realizado de três lavagens com água destilada. O gel foi então incubado em 50 mM de tampão de reação Tris-HCl (pH 7,15) por 2 h a 37 °C. Para maior desenvolvimento, o gel foi corado com 0,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250 em uma solução aquosa contendo: 10% de ácido acético e 30% de metanol. A presença de ação enzimática foi evidenciada pela formação de halos brancos no gel.

### **Efeitos de inibidores na atividade proteolítica**

A atividade proteolítica foi determinada a partir de 20µL do extrato precipitado na presença de caseína como substrato e dos seguintes inibidores na concentração de 10 mM: iodoacetamida, Fluoreto De Fenilmetilsulfonil (PMSF, como inibidores de serino) e ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA, como inibidor de metaloproteases). As condições utilizadas no ensaio foram: pH 7,15 (tampão Tris-HCl 50mM), a 37 °C por 30 min. Para o ensaio proteolítico, foi montado um grupo controle sem a presença dos inibidores. Todos os grupos foram realizados em triplicatas (Xiao et al. 2015).

### **Análises *in silico***

As sequências FASTA foram selecionadas da base de dados da National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando como precursor as proteases de *B. bassiana* ARSEF 2860 (GCF\_000280675.1); *Metarhizium robertsii* ARSEF 23 (GCF\_000187425.2); *Purpureocillium lilacinum* (GCF\_001653265.1); *Cordyceps fumosorosea* ARSEF 2679 (GCF\_001636725.1); *Fusarium culmorum* (GCA\_016952355.1) e *Trichoderma harzianum* CBS 226.95 (GCF\_003025095.1). A sequência alvo foi pesquisada por sequências similares usando o BLASTp (ferramenta básica de comparação local de proteína-proteína) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Para prever as características das proteínas tais como, ponto isoelétrico teórico (pI), o peso molecular e a localização foram utilizadas as ferramentas Pepstats e DeepLoc 2.0 ([https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss\\_pepstats/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_pepstats/)) (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/DeepLoc-2.0/>)

O alinhamento global das sequências selecionadas foi obtido por meio do software MAFFT v7.490 (default), e o alinhamento foi editado usando o software CIAAlign v1.0.18 (`-remove_insertions -crop_ends -remove_short -remove_min_length 100`). A árvore filogenética foi obtida por meio do método de máxima verossimilhança implementada com o programa MEGA v.11. O suporte de ramificação foi estabelecido através do método UFBoot (5000 replicatas). O perfil de domínios para anotação da árvore filogenética foi gerado a partir do HMM, pelo programa hmmscan v3.3.2, tendo sido selecionados os domínios que apresentaram *e-value* de no máximo  $1e-5$ .

Para predição *in silico* da estrutura tridimensional (3D) das proteases de *B. bassiana* foi prevista através da modelagem de proteína usando a ferramenta ColabFold: (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>) . As sequências FASTA das proteases identificadas de *B. bassiana* foram editadas, após a eliminação dos resíduos de aminoácidos que codificam o peptídeo sinal, usando a plataforma SignalP-5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>).

### **Obtenção de ovos de *E. pancreaticum***

Os adultos de *E. pancreaticum* foram removidos manualmente do pâncreas de bovinos após o óbito, na fazenda da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brasil. Posteriormente, os helmintos foram homogeneizados em água e filtrados em tamises metálicos de 250 malhas por polegada. Em seguida, o método de

sedimentação foi empregado para a recuperação dos ovos (Dennis et al. 1954). A viabilidade dos ovos foi avaliada por microscopia óptica utilizando objetiva de 10x.

### **Efeito ovicida *in vitro***

Foram definidos dois grupos experimentais para avaliar *in vitro* o efeito ovicida das proteases sobre *E. pancreaticum*. O primeiro grupo foi composto pelo extrato precipitado ativo (EPA) e o segundo grupo continha o extrato precipitado desnaturado (EPD-extrato previamente fervido durante 2h). Cada grupo continha 100 µL dos extratos precipitados ativo e desnaturado e 100 µL com cerca de  $70 \pm 7,20$  ovos para *E. pancreaticum*, respectivamente. Para cada grupo experimental foram feitas 6 réplicas. O experimento foi mantido a  $28^\circ\text{C} \pm 1$  no escuro por 24h. Após esse período foi realizada a contagem do número de ovos íntegros presente em cada repetição. A contagem foi feita utilizando um microscópio óptico na objetiva de 10x.

### **Análise estatística**

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) dos dados obtidos com níveis de significância de 1 a 5%. A eficiência de destruição dos ovos pelos grupos tratados com EPA em comparação com o grupo EPD, foi avaliada pelo teste de Tukey a 1 a 5 % de significância (Ayres et al. 2003). Para o cálculo da porcentagem média de redução do número de ovos intactos foi utilizado a seguinte equação (Mendoza-De- Gives and Prates, 1994):

$$\% \text{Redução} = \frac{\bar{X}_{\text{ovos intactos EPD}} - \bar{X}_{\text{ovos intactos EPA}}}{\bar{X}_{\text{ovos intactos EPD}}}$$

## Resultados

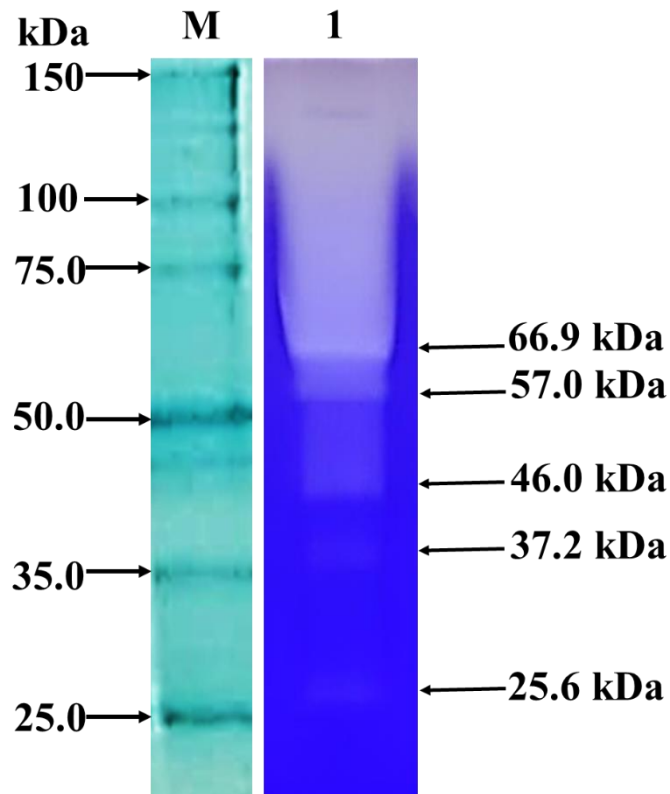
### Atividade específica das enzimas extracelulares

A atividade proteolítica obtida da produção no meio sólido de arroz com soro de leite para o extrato bruto foi de  $15 \text{ U mg}^{-1}$  apresentando diferença significativa ( $p < 0,01$ ) em relação a atividade após a precipitação, onde foi de  $180 \text{ U mg}^{-1}$ . O valor de atividade proteolítica após a otimização foi aproximadamente 12 vezes maior. No entanto, os valores da atividade quitinolítica do extrato bruto foi de  $0,282 \text{ U mg}^{-1}$ , no entanto após a precipitação não se evidenciou atividade enzimática. A partir deste extrato enzimático precipitado, enriquecido em proteases foram desenvolvidas as análises de caracterização enzimática e atividade anti-helmíntica dos ovos de *E. pancreaticum*.

### Caracterização enzimática

#### Zimograma

A partir dos resultados identificados na Fig. 1, o extrato precipitado ativo (EPA) apresentou cinco proteases. Os pesos moleculares das proteases visualizadas no zimograma foram de aproximadamente 25.6, 37.2, 46.0, 57.0 e 66.9 kDa. Os pesos moleculares das proteínas identificadas foram comparados com as sequências de proteases de *B. bassiana* ARSEF 2860 depositadas no NCBI. Os pesos coincidiram com as seguintes proteases: Trypsin-related protease (~25,6 kDa), subtilisin-like protease Pr1F (~37,2 kDa), subtilisin-like protease Pr1A (~46,0 kDa), subtilisin-like protease (~57,0 kDa) e alkaline serine protease (~66,9 kDa). A atividade proteolítica foi observada como bandas claras no gel contendo como substrato caseína (1% m/v).



**Fig. 1** Zimograma do extrato precipitado ativo produzido pelo isolado de *Beauveria bassiana* IP 361 s.l. no meio de cultura de arroz com soro de leite. **Faixa M-** marcador de massa molecular de proteína (Thermo Scientific). **Faixa 1-** Extrato precipitado ativo. Bandas claras, indicadas por setas pretas, mostrando a atividade da protease em um gel PAGE nativo a 10% contendo 1% (m/v) de caseína.

### Efeitos de inibidores na atividade proteolítica

Diversos inibidores foram avaliados quanto aos efeitos sobre as proteases de *B. bassiana* IP 361. O inibidor de serino-protease (PMSF) apresentou inibição significativa da atividade enzimática (100%) em relação ao controle (sem inibidores), enquanto EDTA não demonstrou inibição com um valor de 0% (Tabela 1).

**Tabela 1.** Percentual de inibição da atividade proteolítica de extrato precipitado do isolado de *Beauveria bassiana* IP 361 s.l.

TRATAMENTO	CONCENTRAÇÃO [mM]	INIBIÇÃO [%]
CONTROLE	0	0
PMSF	10	100
EDTA	10	0

A presença de serino-proteases no extrato precipitado de *B. bassiana* foi confirmada por esta análise, fornecendo dados essenciais para a construção da árvore filogenética.

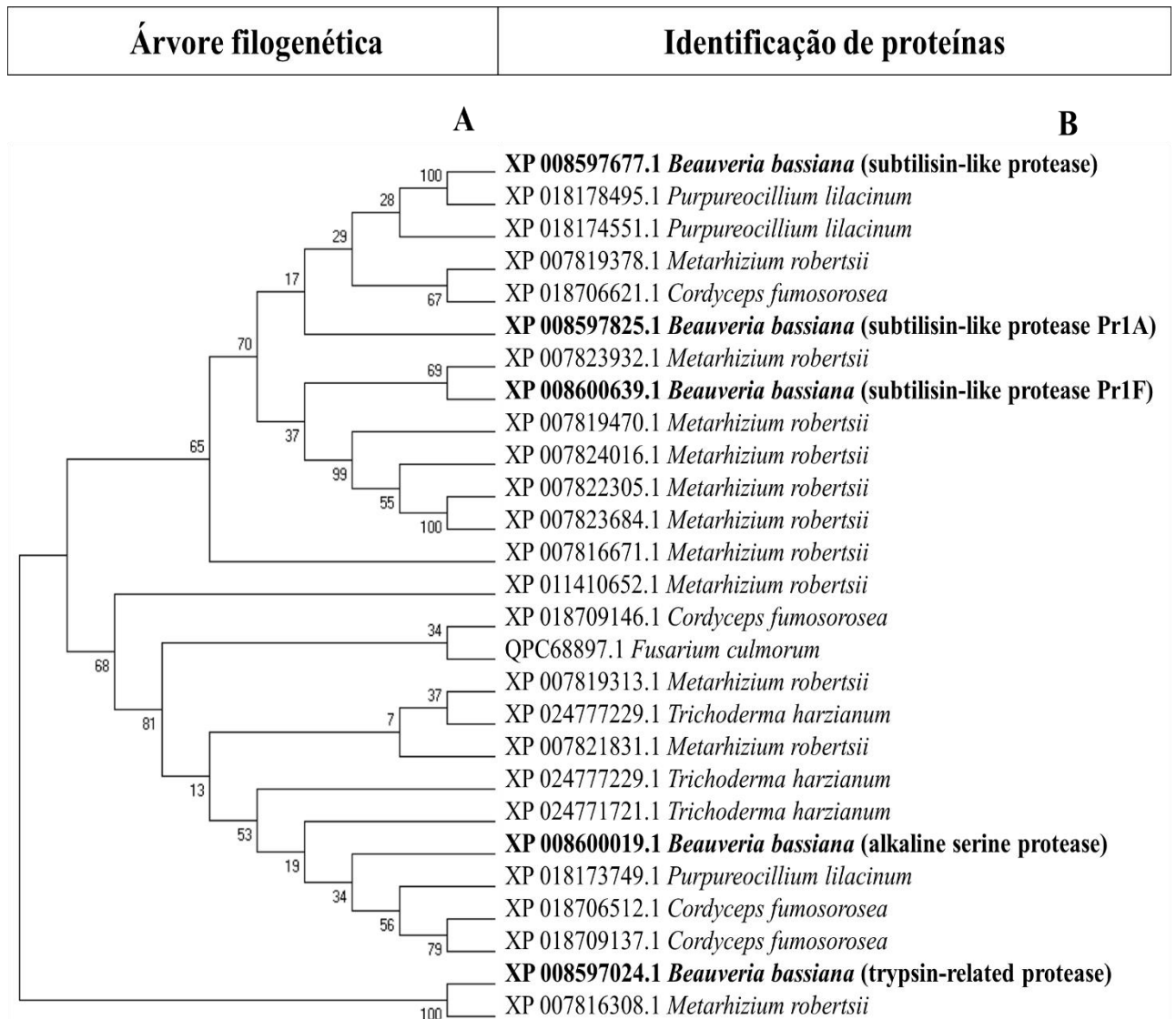
#### **Análises *in silico***

A árvore filogenética dos fungos foi realizada para elucidar as relações filogenéticas entre as proteases identificadas por SDS-PAGE acoplada a um zimograma do isolado de *B. bassiana* IP 361 e aquelas descritas na literatura. Para a construção da árvore, foram utilizadas sequências de serino-protease de *Metarhizium robertsii* ARSEF 23, *Purpureocillium lilacinum*, *Cordyceps fumosorosea* ARSEF 2679, *Fusarium culmorum*, *Trichoderma harzianum* CBS 226.95 e *B. bassiana* ARSEF 2860, disponíveis no NCBI. A análise comparativa foi baseada nos domínios conservados de serino-proteases tipo subtilisina Pr1 (Família: Peptidase\_S8) e tipo tripsina Pr2 (Família: Trypsin) de *B. bassiana*.

Na Fig. 2a, foi observado o agrupamento das serino-proteases de *B. bassiana* com as de outras espécies de fungos, sugerindo a presença de um ancestral comum. A análise filogenética revelou que essas proteínas se organizam em quatro subclados distintos. O primeiro subclado contém seis grupos de serino-proteases (Família: Peptidase\_S8), demonstrando uma relação evolutiva entre as subtilisin-like protease e subtilisin-like protease Pr1 isoforma A de *B.*

*bassiana* e os microrganismos *P. lilacinum*, *M. robertsii* e *C. fumosorosea*. O segundo subclado é composto por sete proteases, incluindo dois grupos de *M. robertsii* e a isoforma F da subtilisin-like protease (Pr1) de *B. bassiana*. O terceiro subclado agrupa a alkaline serine protease de *B. bassiana*, indicando sua proximidade com os domínios conservados evolutivamente das proteases dos microrganismos *P. lilacinum*, *T. harzianum* e *C. fumosorosea*. No entanto, evidenciou-se uma relação evolutiva um pouco mais distante com as alkaline serine proteases de *M. robertsii* e *Fusarium culmorum*.

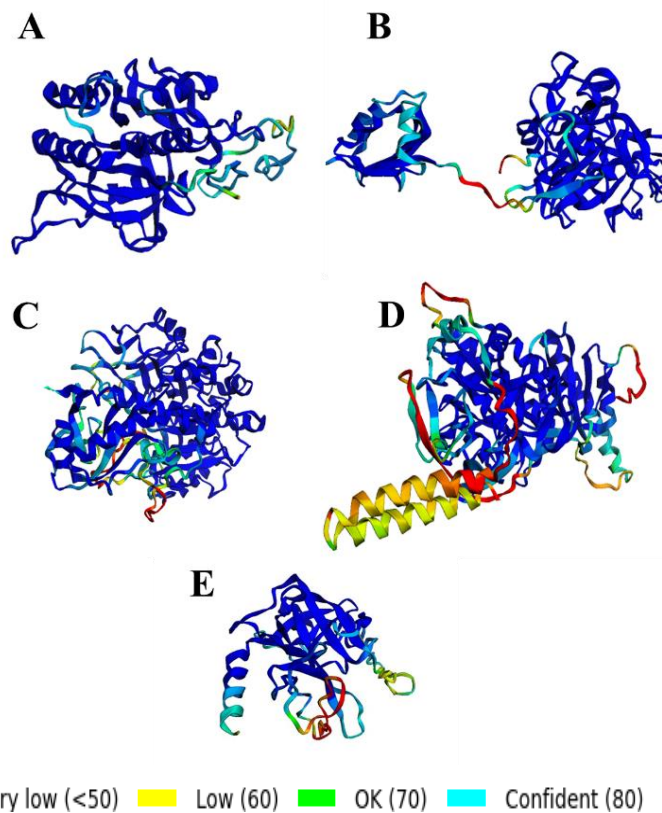
O quarto subclado foi identificado para as serino-proteases tipo tripsina, demonstrando um ancestral comum e uma relação evolutiva distinta em comparação com as do tipo subtilisina. A trypsin-related protease de *B. bassiana* compartilha o mesmo subclado que a chymotrypsin de *M. robertsii*, como observado em 100% das 5.000 iterações realizadas para determinar a árvore filogenética.



**Fig. 2** Árvore filogenética construída por meio do método de máxima verossimilhança no programa MEGA v.11, baseado nos domínios conservados das proteases de diferentes espécies de fungos entomopatogênicos em relação a *Beauveria bassiana* ARSEF 2860. (a) Relações filogenéticas determinadas por valores de bootstrap de 5000 replicações. (b) Identificação das sequências proteicas do banco de dados de NCBI.

A estrutura tridimensional (Fig. 3) das serino-proteases de *B. bassiana* foi modelada utilizando o software ColabFold para previsão de estruturas de proteínas. Esta ferramenta gera uma pontuação de confiança do modelo por resíduo (pLDDT), variando entre 0 e 100. Regiões com pontuação inferior a 580 pLDDT podem não apresentar uma estrutura bem definida

isoladamente. Na Fig. 3 (a-d), são apresentadas as modelagens das estruturas para as sequências com domínio conservado na Família: Peptidase\_S8, incluindo Subtilisin-like protease Pr1F, Subtilisin-like protease Pr1A, Alkaline serine protease e Subtilisin-like protease. Adicionalmente, a estrutura da serino-protease pertencente à Família Trypsin é demonstrada na Fig. 3e.

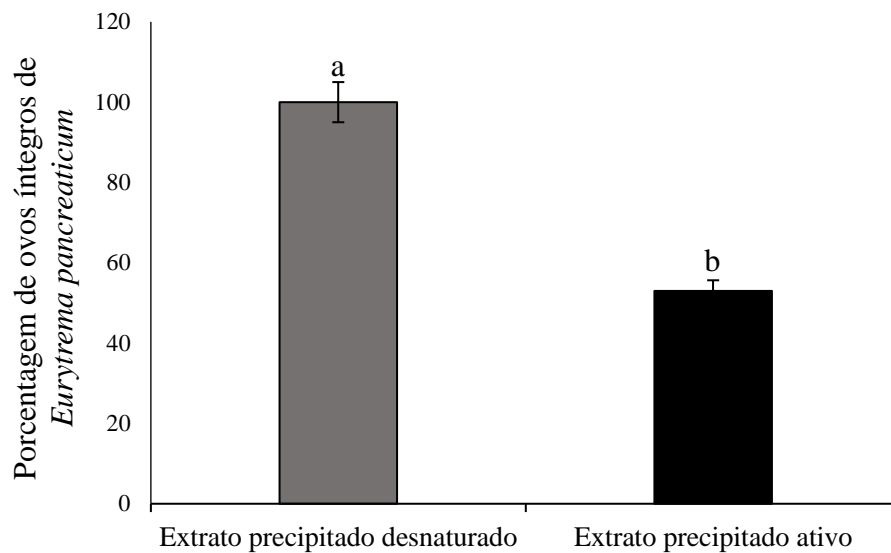


**Fig. 3** Estruturas tridimensionais (3D) das proteases de *Beauveria bassiana* por meio da ferramenta de modelagem ColabFold, usando a pontuação de confiança do modelo por resíduo (pLDDT) (a) Subtilisin-like protease Pr1F. (b) Subtilisin-like protease Pr1A. (c) Alkaline serine protease. (d) Subtilisin-like protease. (e) Trypsin-related protease.

### Efeito ovicida *in vitro*

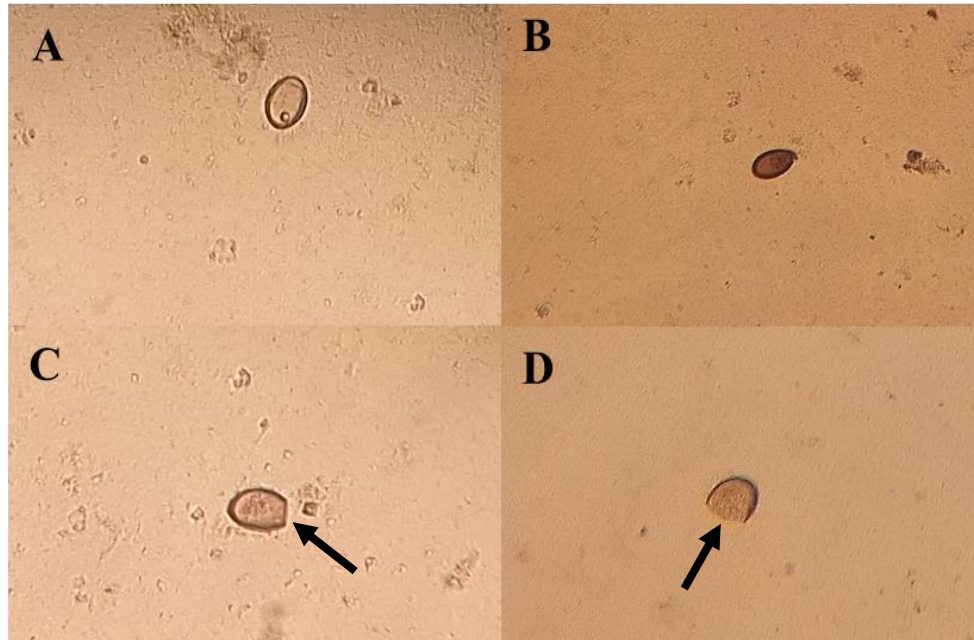
As proteases presentes no EPA produzido por *B. bassiana* causaram redução significativa ( $p < 0,01$ ) no número de ovos intactos de *E. pancreaticum*, em comparação ao grupo

EPD, indicando seu efeito ovicida *in vitro*. O percentual de redução, em relação ao grupo EPD, foi de: 53% (Fig. 4).



**Fig. 4** Avaliação do efeito ovicida das proteases de *Beauveria bassiana* em *Eurytrema pancreaticum*, após 24 horas de incubação a  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$  no escuro. Letras diferentes indicam que o grupo de controle com extrato desnaturado e o grupo tratado com o extrato ativo apresentaram diferença significativa ( $p < 0,01$ ).

Na Fig. 5 c-d é demonstrada a ação digestiva das proteases sobre a casca dos ovos e posteriormente sobre o conteúdo interno de *E. pancreaticum*. Nesse caso, é nítida a digestão das barreiras e conteúdo dos ovos.



**Fig.5** Efeito ovicida *in vitro* das proteases de *Beauveria bassiana* sobre ovos de *Eurytrema pancreaticum*. (a) Extrato precipitado desnaturado. (b), (c) e (d) Extrato precipitado ativo. As setas pretas indicam a digestão da casca e do conteúdo interno devido à ação das proteases.

## Discussão

Para obter níveis ótimos na produção de enzimas extracelulares de *B. bassiana*, foi utilizado o meio de cultura de arroz suplementado como soro de leite. Este meio de cultura ao conter açúcares e compostos contendo nitrogênio pode aumentar a produção de conídios, melhorar a persistência e aumentar a germinação em condições ótimas de umidade relativa. A produção de biomassa microbiana a partir de soro de queijo tem sido considerada como uma opção (Figuerola et al. 2024; Kassa et al. 2008).

Diversos estudos comprovam a viabilidade da produção enzimática por meio da fermentação sólida, demonstrando resultados promissores. Alves et al. (2020) otimizaram a produção de enzimas extracelulares de *B. bassiana* em fermentação sólida, obtendo um aumento significativo na atividade de exocelulase (10%), endocelulase (63%), quitinase (60%) e  $\beta$ -1,3-glucanase (61%). Porém, os resultados do presente trabalho evidenciam o potencial da fermentação sólida como uma estratégia eficaz e sustentável para a produção de enzimas.

A atividade proteolítica foi potencializada pelo processo de precipitação em comparação com o extrato bruto livre de células ( $p < 0,01$ ). No entanto, não foi evidenciado atividade quitinolítica do extrato precipitado. Este resultado é baseado na função da acetona como solvente orgânico, o que aumentou o grau de purificação cerca de doze vezes e reduziu a atividade da quitinases, além das impurezas residuais presentes do meio de cultura.

A precipitação por acetona se destaca como uma técnica eficaz para fracionamento, concentração e purificação de proteínas em sistemas biológicos complexos (Bryjak and Rekuć 2010). Estudos como o de Baghalabadi and Doucette (2020) demonstraram a seletividade da precipitação por acetona, favorecendo a precipitação de proteínas de alto peso molecular, o que a torna uma ferramenta valiosa para concentração de proteínas específicas.

O zimograma destacou-se como uma ferramenta valiosa para a identificação e caracterização das proteases presente no extrato precipitado ativo. Em nosso estudo, foi evidenciado a presença de cinco bandas expressas pela atividade proteolítica por meio da formação de halos de digestão da caseína no extrato precipitado do isolado IP 361 de *B. bassiana* (Fig. 1). O peso molecular estimado para essas bandas está em concordância com o peso molecular de serino-proteases do tipo subtilisina e tripsina, previamente reportadas para o isolado *B. bassiana* ARSEF 2860, na base de dados de NCBI (Xiao et al. 2012). Monte et al (2017) relataram que esta técnica permite detectar formas latentes e ativas de enzimas, em

diferentes amostras como células, extratos, tecidos ou fluidos biológicos, a torna uma técnica robusta e versátil.

Arias-Aravena et al. (2022) utilizaram a técnica de zimograma para identificar exoenzimas secretadas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria pseudobassiana* RGM 2184 em diferentes meios de cultura. Essa técnica revelou a presença de três proteases no sobrenadante, com pesos moleculares estimados em aproximadamente 36, 105 e 113 kDa. Os autores sugeriram que essas proteases pertencem ao complexo de protease Pr1, similar à subtilisina, e podem desempenhar um papel crucial na patogenicidade do fungo.

Correlacionando com os resultados do nosso estudo, podemos sugerir a presença de duas isoformas de serino-proteases no isolado IP 361 de *B. bassiana*, a subtilisin-like protease Pr1F e a subtilisin-like protease Pr1A (Fig. 1). As serino-proteases do tipo subtilisina (Pr1) e tripsina (Pr2) são as enzimas proteolíticas mais estudadas em fungos entomopatogênicos, com onze isoformas relacionadas ao gene codificador de Pr1 em *B. bassiana* (AlGhanimi et al. 2020; Vikhe et al. 2016). O estudo desenvolvido por Gao et al. (2020) demonstrou que as proteases Pr1 conservadas atuam na degradação da cutícula de insetos, com cinco delas (Pr1C, Pr1G, Pr1A2, Pr1B1 e Pr1B2) contribuindo individualmente para 19-29% da virulência de *B. bassiana*.

A grande variação no peso molecular de proteases de diferentes cepas de *B. bassiana*, variam de 32 kDa a 105 kDa. Além disso, estas proteases demonstraram exibir atividades proteolíticas em uma ampla gama de substratos, desde colágeno, caseína e elastina (Amobonye et al. 2020; Borgi et al. 2016; Firouzbakht et al. 2015; Urtz and Rice 2000).

Na Tabela 1, o efeito de inibidores de serino-proteases e metaloproteases na atividade proteolítica do precipitado de *Beauveria bassiana* (IP 361) é descrito. A inibição pelo PMSF (100%) se encontra relacionado com as serino-protease e a ausência de efeito do EDTA (0%) sugerem que o precipitado do isolado IP 361 não apresenta inibição nas metaloproteases.

Estudos como o relatado por AlGhanimi et al. (2020) mencionaram que concentrações de 1 e 5 mM de PMSF inibiram completamente a atividade de proteases, indicando a presença de serino-proteases, onde os resíduos de aminoácido no sítio ativo é sulfonado pelo inibidor. No entanto, neste mesmo estudo, o EDTA induziu a atividade a 144,13% e 163,75% usando 1 e 5 mM, respectivamente.

A Fig. 2 apresenta a classificação filogenética das proteases subtilisin-like protease PR1F, subtilisin-like protease Pr1A, alkaline serine protease, subtilisin-like protease e trypsin-related protease de *B. bassiana* ARSEF 2860, incluindo anotações de homólogos em fungos entomopatogênicos. Esse resultado indica uma relação filogenética entre os microrganismos analisados, sugerindo que a proximidade ou distância entre eles reflete a divergência de alguns membros da família subtilisina e tripsina durante a evolução da patogenicidade em insetos por fungos da Ordem Hypocreales.

Dentro do domínio conservado da família Peptidase\_S8, as proteases Pr1 se destacam por sua relevância na busca por nutrientes e na patogenicidade de insetos. Essa família se divide em duas classes principais, sendo a subtilisina da classe II (like-protease), subdividida em subfamílias extracelulares 1 (Pr1A, Pr1B, Pr1G, Pr1I e Pr1K) e 2 (Pr1D, Pr1E, Pr1F e Pr1J) (Gao et al. 2020).

Da mesma forma, estudos como o de Shankar and Laxman (2015) relataram que as proteases de tipo alcalina pode estar presente na cepa de *Beauveria* sp. (MTCC 5184) mostrando a existência de proteases alcalinas. As enzimas proteolíticas da família da subtilisina S8 são, em sua maioria, endopeptidases que são mais conhecidas por sua termoestabilidade, inespecificidade e são particularmente ativas em pH neutro e levemente alcalino (Rawlings et al. 2017).

Na Fig. 2 foi evidenciada a ancestralidade compartilhada dos subclados das sequências proteicas previstas *in silico* de *B. bassiana* e *M. robertsii*, as quais apresentam concordância

com os resultados do zimograma para as cinco proteases caracterizadas no isolado IP 361 de *B. bassiana*. As distintas histórias das linhagens na evolução da patogenicidade dos insetos sugerem a possibilidade de que as Pr1 são fundamentais para a degradação da cutícula do hospedeiro, sendo possivelmente mais conservadas em *B. bassiana* do que no complexo *M. anisopliae*, no qual a família das Peptidase\_S8, vem sendo diversificada através da evolução molecular (Andreis et al. 2019). Assim mesmo, Xiao et al. (2010) demonstraram que o genoma de *B. bassiana* possui um número similar de proteases ao de *M. robertsii*.

Em relação a serino-protease da Família Trypsin (Pr2), foi identificada proximidade na linhagem de *B. bassiana* com *M. robertsii*. Sánchez-Pérez et al. (2014) identificaram que a atividade catalítica na degradação da cutícula por Pr1 e Pr2 no tegumento dos insetos ocorreu por microrganismos como *B. bassiana* e *M. anisopliae*. No entanto, a caracterização bioquímica da Pr2 ainda não foi elucidada (Shin et al. 2020).

A estrutura tridimensional das proteases subtilisin-like protease Pr1F, subtilisin-like protease Pr1A, alkaline serine protease, subtilisin-like protease e trypsin-related protease de *B. bassiana* ARSEF 2860 foi elucidada e modelada *in silico* a partir de sequências FASTA de proteínas obtidas do banco NCBI. Essa modelagem permitiu a geração preditiva da conformação tridimensional de cada protease (Fig. 3).

A princípio, sugere-se que todas as serino-peptidases poderiam ser catalogadas como homólogas à quimotripsina. As enzimas subtilisinas são proteases que contêm a tríade catalítica na ordem dos resíduos de ácido aspártico (Asp39), histidina (His69) e a serina (Ser224), que evoluíram independentemente (Azrin et al. 2022; Gilliland and Teplyakov 2011). Assim mesmo, Dhawan et al. (2020) descreveram que a estrutura molecular da protease tipo subtilisina Pr1 consiste em cinco cisteínas formando duas pontes dissulfeto.

A peptidase tipo tripsina Pr2, tem como função catalisar a clivagem das cadeias de peptídeos principalmente no lado carboxílico dos aminoácidos Arginina e Lisina, e as ligações

formadas por resíduos hidrofóbicos são catalisadores na clivagem pela Pr1 (Semenova et al. 2020) (Fig. 3e).

Ramos-Llorca et al. (2023) constataram que a atividade catalítica das aminopeptidases da família tripsina é dependente de um resíduo de ácido aspártico localizado na base do sítio primário de ligação ao substrato.

Os resultados da caracterização preditiva das proteases de *B. bassiana* IP 361 reforçam a importância da subtilisina-like (Pr1) e da tripsina-like (Pr2) no processo patogênico de fungos entomopatogênicos. A Pr1 atua na catálise abrangente da proteína cuticular dos insetos, sendo secretada nas etapas iniciais da penetração fúngica. Já a Pr2 funciona como uma protease suplementar, colaborando com a Pr1 na catálise da degradação proteica (Pour et al. 2021; Dias et al. 2008).

As infecções causadas por trematódeos em ruminantes se tornaram um problema recorrente devido à dificuldade de erradicar esses parasitas do ambiente. O uso de métodos alternativos, como o controle bioquímico, com o uso das proteases de *B. bassiana*, é apresentado como uma ferramenta para o controle *in vitro* dessa doença parasitária.

Os resultados deste estudo, demonstram a ação *in vitro* das proteases de *B. bassiana* na degradação das proteínas da casca, como se encontra evidenciado na Fig. 4. A redução significativa no percentual de ovos íntegros em comparação ao extrato desnaturado ( $p < 0,01$ ) sugere que as proteases atuam na degradação da casca dos ovos de *E. pancreaticum*, permitindo a liberação do conteúdo interno (Fig. 5). O estudo desenvolvido por Pinheiro et al. (2015) detalhou a morfologia dos ovos de *E. coelomaticum*, revelando uma casca espessa com  $3,70 \pm 0,56 \mu\text{m}$  nas extremidades e  $2,32 \pm 0,43 \mu\text{m}$  lateralmente. Essa rigidez é atribuída à composição da casca, rica em proteínas estruturais como esclerotina e queratina, com cadeias de aminoácidos ligadas por pontes cruzadas.

A aplicação do precipitado pode ser um complemento ao controle de parasitas no ambiente e oferece diversas vantagens. Em primeiro lugar, reduz a necessidade do uso excessivo de anti-helmínticos, minimizando a presença desses medicamentos no meio ambiente e nos alimentos. Isso, por sua vez, diminui os riscos de intoxicação e o desenvolvimento de resistência anti-helmíntica (Charlier et al. 2022; Fissiha et al. 2021).

Estudos anteriores demonstraram a atividade antiparasitária das proteases do extrato bruto de *B. bassiana* ESALQ PL63, com redução de 58% nas larvas infectantes (L<sub>3</sub>) do nematoide *Haemonchus* spp. em comparação ao controle e ao grupo desnaturado após 24 horas de incubação (Figuerola et al. 2024).

Embora ainda existam poucos estudos sobre o uso de proteases de fungos entomopatogênicos como *B. bassiana* no controle de doenças parasitárias negligenciadas em humanos, este trabalho apresenta o primeiro relato da ação *in vitro* das proteases de *B. bassiana* sobre ovos de *E. pancreaticum*. Este estudo produziu informações que permitem vislumbrar novas pesquisas para o uso *in vitro* de extratos enzimáticos do isolado IP 361 de *B. bassiana*, impulsionando novas pesquisas com foco no controle ambiental dessa doença negligenciada. Além disso, estudos moleculares aprofundados sobre a identificação e caracterização das isoformas da Pr1 e Pr2 em *B. bassiana* são necessários para elucidar seu papel na virulência de insetos-praga.

## Referências

- Alghanimi AAJ, Alebadi SMA, Al-ethari AYH (2020) Partial purification and characterization of protease from local isolate of *Beauveria bassiana*. Sci. J. Med. Res 4: 17-22.
- Alves EA, Schmaltz S, Tres MV, Zobot GL, Kuhn RC, Mazutti MA (2020) Process development to obtain a cocktail containing cell-wall degrading enzymes with insecticidal

activity from *Beauveria bassiana*. *Biochem. Eng. J* 156:107484.

<https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107484>

Amobonye A, Bhagwat P, Pandey A, Singh S, Pillai S (2020) Biotechnological potential of *Beauveria bassiana* as a source of novel biocatalysts and metabolites. *Crit. Rev. Biotechnol* 40:1019-1034. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1805403>

Andreis FC, Schrank A, Thompson CE (2019) Molecular evolution of Pr1 proteases depicts ongoing diversification in *Metarhizium* spp. *Mol Genet Genomics* 294: 901–917. <https://doi.org/10.1007/s00438-019-01546-y>

Arias-Aravena M, Altimira F, Gutiérrez D, Ling J, Tapia E (2022) Identification of exoenzymes secreted by entomopathogenic fungus *Beauveria pseudobassiana* RGM 2184 and their effect on the degradation of cocoons and pupae of quarantine pest *Lobesia botrana*. *J. Fungi* 8: 1083. <https://doi.org/10.3390/JOF8101083/S1>

Ayres M, Ayres JRM, Ayres, DL, Santos, AS (2003) Aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas. Sociedade civil mamirauá: Brasília CNPq, Belém.

Azrin NAM, Ali MSM, Rahman RNZR, Oslan SN, Noor NDM (2022) Versatility of subtilisin: A review on structure, characteristics, and applications. *Biotechnol Appl Biochem* 69: 2599-2616. <https://doi.org/10.1002/bab.2309>

Baghalabadi V, Doucette AA (2020) Mass spectrometry profiling of low molecular weight proteins and peptides isolated by acetone precipitation. *Anal. Chim. Acta* 1138: 38-48. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.08.057>

Bara GT, Laing MD (2020) Entomopathogens: potential to control thrips in avocado, with special reference to *Beauveria bassiana*. *Hortic Rev* 47:325–368. <https://doi.org/10.1002/9781119625407.ch7>

- Borgi I, Dupuy JW, Blibech I, Lapaillerie D, Lomenech AM, Rebai A, Gargouri A (2016) Hyper-proteolytic mutant of *Beauveria bassiana*, a new biological control agent against the tomato borer. *Agron. Sustain. Dev* 36:1-9. <https://doi.org/10.1007/s13593-016-0394-6>
- Braga FR, Araújo JVD, Soares FEDF, Araujo JM, Ferreira SR, Tavela ADO, Queiroz JHD (2013) Proteolytic action of the crude extract of *Duddingtonia flagrans* on cyathostomins (Nematoda: Cyathostominae) in coprocultures. *Rev. Bras. Parasitol. Vet* 22:143-146. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612013000100026>
- Braga FR, Araújo JV, Soares FEF, Araujo JM, Geniêr HLA, Silva AR, Ferreira SR (2011) Optimizing protease production from an isolate of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* using response surface methodology and its larvicidal activity on horse cyathostomins. *J. helminthol.* 85: 164-170. <https://doi.org/10.1017/S0022149X10000416>
- Bryjak J, Rekuć A (2010) Effective purification of *Cerrena unicolor* laccase using microfiltration, ultrafiltration and acetone precipitation. *Appl Biochem Biotechnol* 160:2219–2235. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8791-9>
- Charlier J, Bartley DJ, Sotiraki S, Martinez-Valladares M, Claerebout E, von Samson-Himmelstjerna G, Rinaldi L (2022) Anthelmintic resistance in ruminants: Challenges and solutions. *Adv. parasitol.* 115:171-227. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2021.12.002>
- Dar SA, Rather BA, Kandoo AA (2017) Insect pest management by entomopathogenic fungi. *J. Entomol. Zool. Stud* 5:1185-1190.
- de Sousa DER, de Castro MB (2022) Pancreatic eurytrematosis in small ruminants: A forgotten disease or an untold history?. *Vet. Parasitol* 311:109794. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2022.109794>
- de Sousa DER, Barbosa EDFG, Wilson TM, Machado M, Oliveira WJ, Duarte MA, de Castro MB (2021) *Eurytrema coelomaticum* natural infection in small ruminants: a neglected condition. *Parasitol* 148:576-583. <https://doi.org/10.1017/S0031182020002358>

Dennis WR, Stone WM, Swanson LE (1954) A new laboratory and field diagnostic test for fluke ova in feces. *J Am Vet Med Assoc* 124:47–50. PMID: 13117747

Dhawan M, Joshi N (2017) Enzymatic comparison and mortality of *Beauveria bassiana* against cabbage caterpillar *Pieris brassicae* LINN. *Braz J Microbiol* 48:22–529. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.08.004>

Dhawan M, Joshi N, Ghuman S, Sandhu S, Sharma M (2020) Deciphering the relationships among enzymatic systems and virulence of *Beauveria bassiana*: A Review. *J. Exp. Biol. Agric. Sci* 8:730–742. <https://doi.org/10.20944/preprints202009.0696.v1>

Dias BA, Neves PMOJ, Furlaneto-Maia L, Furlaneto MC (2008) Cuticale degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. *Braz J Microbiol* 39:301–306. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000200019>

Doonan S (2004) Bulk purification by fractional precipitation. In: Cutler P (ed) *Protein Purification Protocols: Methods in Molecular Biology*. Methods in Molecular Biology. Humana Press, New York, pp 117-24. <https://doi.org/10.1385/1-59259-655-x:117>

dos Reis CBL, Sobucki L, Mazutti MA, Guedes JVC (2018) Production of chitinase from *Metarhizium anisopliae* by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. *Ind Biotechnol* 14:230–234. <https://doi.org/10.1089/ind.2017.0031>

Figueroa LBP, Mamani RCC, de Souza DC, de Souza Alves JC, de Souza SA, Ferreira CB, Soares FEF (2024) 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*. *J. Nat. Pest. Res.* 8:100077. <https://doi.org/10.1016/j.napere.2024.100077>

Firouzbakht H, Zibae A, Hoda H, Sohani MM (2015) Purification and characterization of the cuticle-degrading proteases produced by an isolate of *Beauveria bassiana* using the cuticle of

the predatory bug, *Andrallus spinidens* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae). J. Plant Prot. Res 55:179-186. <https://doi.org/10.1515/jppr-2015-0024>

Fissiha W, Kinde MZ (2021) Anthelmintic resistance and its mechanism: A review. Infect Drug Resist 14:5403-5410. <https://doi.org/10.2147/IDR.S332378>

Gao BJ, Mou YN, Tong SM, Ying SH, Feng MG (2020) Subtilisin-like Pr1 proteases marking the evolution of pathogenicity in a wide-spectrum insect-pathogenic fungus. Virulence 11:365–380. . <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1749487>

Gilliland GL, Teplyakov A (2011) Structural calcium (trypsin, subtilisin). In: Messerschmidt A, Huber R, Poulas T, Wiegardt K, Cygler M, Bode W (eds) Handbook of Metalloproteins. Hoboken, New Jersey, pp 1–14. <https://doi.org/10.1002/9781119951438.eibc0522>

Grogan GJ, Holland HL (2000) The biocatalytic reactions of *Beauveria* spp. J Mol Catal B Enzym 9:1–32. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(99\)00080-6](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(99)00080-6)

Kassa A, Brownbridge M, Parker BL, Skinner M, Gouli V, Gouli S Hata T (2008) Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Mycol. Res 112: 583-591. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.12.004>

Liu Y, Li Y, Tong S, Yuan M, Wang X, Wang J, Fan Y (2020) Expression of a *Beauveria bassiana* chitosanase (BbCSN-1) in *Pichia pastoris* and enzymatic analysis of the recombinant protein. Protein Expr Purif 166:105519. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.105519>

Marion 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)

Mendoza-De Gives P, Vazquez-Prats VM (1994) Reduction of *Haemonchus contortus* infective larvae by three nematophagous fungi in sheep faecal cultures. Vet Parasitol 55:197-203. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(93\)00646-G](https://doi.org/10.1016/0304-4017(93)00646-G)

Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. J Anal Chem 31: 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

Monte JFS, Moreno CJG, Monteiro JPMFL, de Oliveira Rocha HA, Ribeiro AR, Silva MS (2017) Use of Zymography in Trypanosomiasis Studies. In: Wilkesman J, Kurz L (eds) Zymography: Methods in Molecular Biology. Humana Press, New York, pp 213–220. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7111-4\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7111-4_20)

Naveed M, Nadeem F, Mehmood T, Bilal M, Anwar Z, Amjad F (2021) Protease—a versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications: An updated review. Catal Lett 151:307–323. <https://doi.org/10.1007/s10562-020-03316-7>

Negi R, Sharma B, Kaur S, Kaur T, Khan SS, Kumar S, Yadav AN (2023) Microbial antagonists: diversity, formulation and applications for management of pest–pathogens. Egypt. J. Biol. Pest Control 33:105. <https://doi.org/10.1186/s41938-023-00748-2>

Page MJ, Di Cera E (2008) Serine peptidases: classification, structure and function. Cell Mol Life Sci 65:1220-1236. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7565-9>

Pinheiro J, Franco-Acuña DO, Oliveira-Menezes A, Brandolini SVPB, Adnet FAO, Torres EL, Damatta RA (2015) Additional study of the morphology of eggs and miracidia of *Eurytrema coelomaticum* (Trematoda). Helminthologia 52:244-251. <https://doi.org/10.1515/helmin-2015-0039>

Pour SA, Zibae A, Rostami MG, Hoda H, Shahriari M (2021) Mortality and immune challenge of a native isolate of *Beauveria bassina* against the larvae of *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). Egypt. J. Biol. Pest Control 31:1-9. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00386-6>

Ramos F, Marques CB, Reginato CZ, Bräunig P, Osmari V, Fernandes F, Vogel FSF (2020) Field and molecular evaluation of anthelmintic resistance of nematode populations from cattle

and sheep naturally infected pastured on mixed grazing areas at Rio Grande do Sul, Brazil. *Acta Parasit* 65:118-127. <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00137-6>

Ramos-Llorca A, Decraecker L, Cacheux VM, Zeiburlina I, De Bruyn M, Battut L, Augustyns K (2023) Chemically diverse activity-based probes with unexpected inhibitory mechanisms targeting trypsin-like serine proteases. *Front. Chem* 10:1089959. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.1089959>

Rawlings ND, Barrett AJ, Thomas PD, Huang X, Bateman A, Finn RD (2018) The *MEROPS* database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.* 46:D624–32. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134>

Rekik H, Jaouadi NZ, Gargouri F, Bejar W, Frikha F, Jmal N, Jaouadi B (2019) Production, purification and biochemical characterization of a novel detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus safensis* strain RH12. *Int. J. Biol. Macromol* 121:1227-1239. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.139>

Rojas-Osnaya J, Rocha-Pino Z, Nájera H, González-Márquez H, Shirai K (2020) Novel transglycosylation activity of  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase of *Lecanicillium lecanii* produced by submerged culture. *Int J Biol Macromol* 145:759–767. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.237>

Rojo-Vázquez FA, Meana A, Valcárcel F, Martínez-Valladares M (2012) Update on trematode infections in sheep. *Vet. Parasitol* 189:15-38. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.029>

Sánchez-Pérez LDC, Barranco-Florido JE, Rodríguez-Navarro S, Cervantes-Mayagoitia JF, Ramos-López MÁ (2014) Enzymes of entomopathogenic fungi, advances and insights. *Adv Enzyme Res* 2:65-76. <https://doi.org/10.4236/aer.2014.22007>

Sandoval BA, Hyster TK (2020) Emerging strategies for expanding the toolbox of enzymes in biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol* 55:45–51. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.12.006>

- Semenova TA, Dunaevsky YE, Beljakova GA, Belozersky MA (2020) Extracellular peptidases of insect-associated fungi and their possible use in biological control programs and as pathogenicity markers. *Fungal Biol* 124:65-72. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.11.005>
- Shankar S, Laxman RS (2015) Biophysicochemical characterization of an alkaline protease from *Beauveria* sp. MTCC 5184 with multiple applications. *Appl Biochem Biotechnol* 175:589–602. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1314-3>
- Shin TY, Lee MR, Park SE, Lee SJ, Kim WJ, Kim JS (2020) Pathogenesis-related genes of entomopathogenic fungi. *Arch Insect Biochem Physiol* 105:e21747. <https://doi.org/10.1002/arch.21747>
- Tandon V, Shylla JA, Ghatani S, Athokpam VD, Sahu R (2015) Neglected tropical diseases: Trematodiasis—the Indian scenario. *Proc. Natl. Acad. Sci. India, Sect. B Biol. Sci* 85:901–907. <https://doi.org/10.1007/s40011-014-0465-x>
- Toledo R, Cortés A, Álvarez-Izquierdo M, Muñoz-Antoli C, Esteban JG (2019) New Insights into the Treatment of Foodborne Trematode Infections. In: Swinney D, Pollastri M, Mannhold R, Buschmann H, Holenz J (eds) *Neglected Tropical Diseases: Drug Discovery and Development*. Boston, pp 289-323. <https://doi.org/10.1002/9783527808656.ch11>
- Urtz BE, Rice WC (2000) Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Beauveria bassiana*. *Mycol. Res* 104:180-186. <https://doi.org/10.1017/S0953756299001215>
- Xiao G, Ying SH, Zheng P, Wang ZL, Zhang S, Xie XQ, Shang Y, St Leger RJ, Zhao GP, Wang C, Feng MG (2012) Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Sci Rep* 2:483. <https://doi.org/10.1038/srep00483>
- Xiao YZ, Wu DK, Zhao SY, Lin WM, Gao XY (2015) Statistical optimization of alkaline protease production from *Penicillium citrinum* YL-1 under solid-state fermentation. *Prep Biochem Biotechnol* 45:447-462. <https://doi.org/10.1080/10826068.2014.923450>

**ARTIGO 3.** Efeito *in vitro* das enzimas extracelulares e conídios de *Beauveria bassiana*  
sobre pupas de *Spodoptera frugiperda*<sup>3</sup>

<sup>3</sup> Artigo elaborado conforme as normas do periódico Crop Protection

**Efeito *in vitro* das enzimas extracelulares e conídios de *Beauveria bassiana* sobre pupas de *Spodoptera frugiperda***

Liseth Bibiana Puentes Figueroa<sup>a</sup>, Adriane Toledo da Silva<sup>a</sup>, Elias Honorato Gomes<sup>a</sup>,  
Amanda do Carmo Alves<sup>a</sup>, Nivia Kelly Lima Sales<sup>a</sup>, Eliana Donizete Andrade<sup>b</sup>, Geraldo  
Andrade Carvalho<sup>b</sup>, Filippe Elias de Freitas Soares<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Biotecnologia e Bioquímica Aplicada, Departamento de Química,  
Universidade Federal de Lavras (UFLA), 7200-900; Lavras - MG, Brasil

<sup>b</sup> Laboratório de Ecotoxicologia e MIP, Departamento de Entomologia, Universidade  
Federal de Lavras (UFLA), 37203-202 – Lavras-MG, Brasil

\* Corresponding author – [filippe.soares@ufla.br](mailto:filippe.soares@ufla.br)

**Resumo**

*Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuídae) tem causado perdas econômicas e desafios de segurança alimentar, levando ao uso excessivo de pesticidas sintéticos para seu controle. Desta forma, este estudo avaliou o efeito *in vitro* concomitante das enzimas extracelulares e os conídios de *Beauveria bassiana* sobre pupas de *S. frugiperda*. As enzimas foram produzidas no meio de cultura sólido (arroz com soro de leite) utilizando o isolado IP 361 de *B. bassiana*. As enzimas foram concentradas pelo método de precipitação e a atividade específica foi determinada. Para o ensaio de virulência *in vitro* para pupas de *S. frugiperda* foram estabelecidos os seguintes grupos: G1 controle negativo (água destilada); G2: controle positivo (inseticida com princípio ativo clorpirifos: 480g/L); T1: conídios ( $10^7$  conídios/mL); T2: extrato precipitado ativo; T3: extrato precipitado desnaturado; T4: conídios ( $10^7$  conídios/mL) + extrato precipitado ativo. A porcentagem de mortalidade foi calculada

diariamente até a completa emergência dos insetos. Após a precipitação a atividade específica para protease foi de  $180 \text{ U mg}^{-1}$  e quitinase de  $0,207 \text{ U mg}^{-1}$ . O percentual de mortalidade de pupas de *S. frugiperda* para o extrato ativo foi de 100% em comparação aos tratamentos controle e desnaturado ( $p < 0,01$ ). Não houve diferença significativa ( $p > 0,01$ ) entre o ativo com o controle positivo. As suspensões de conídios com extrato ativo e só conídios causaram mortalidades de 73% ( $p > 0,01$ ) e 63% ( $p > 0,01$ ). Os resultados indicam que o uso *in vitro* dessas enzimas de *B. bassiana* pode ter o mesmo efeito letal que o inseticida clopirifós, sendo uma possível alternativa sustentável para o controle de *S. frugiperda*.

**Palavras-chaves:** Fungo entomopatogênico, protease, quitinase, lagarta-militar, precipitação.

## 1.Introdução

A lagarta-do-cartucho-do-milho (FAW), *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuídae), é um inseto lepidóptero amplamente reconhecido como uma praga de culturas agrícolas na América do Norte e do Sul, e na última década, tem se tornado uma importante praga invasora em escala global (Tay et al., 2023).

No Brasil, é considerada a praga mais destrutiva do milho (Jaramillo-Barrios et al., 2020; Cruz et al., 2012). Esse inseto tem sido caracterizado em mais de 350 espécies de plantas hospedeiras devido à sua natureza polifágica. *Spodoptera frugiperda* causa um atraso no desenvolvimento da cultura e uma queda na produtividade porque consome o tecido vegetal nas fases iniciais da cultura, alimentando-se das folhas jovens, do verticilo levando a graves perdas de rendimento se não forem controladas em tempo hábil (Udayakumar et al., 2021; Toepfer et al., 2021; Jaramillo-Barrios et al., 2020; Hernández-Trejo et al., 2018).

Essa praga é frequentemente controlada com a aplicação de inseticidas sintéticos de contato e de ingestão (Zhang et al., 2021; Kumela et al., 2018). Contudo, os efeitos adversos desses produtos superam os benefícios da redução das populações de pragas, pois podem levar ao desenvolvimento de resistência nos insetos (Sari et al., 2023; Zhang et al., 2021). Além disso, contaminam o meio ambiente e deixam resíduos tóxicos nos produtos agrícolas, representando um risco significativo à saúde humana (Sari et al., 2023; Harrison et al., 2019).

No controle das pragas, os biopesticidas surgem como alternativa sustentável aos pesticidas sintéticos, o qual são classificados pela EPA (2023) em três categorias: incorporados em plantas (PIPs), pesticidas bioquímicos (substâncias que interferem no acasalamento, como feromônios sexuais de insetos e enzimas extracelulares) e microrganismos (produtos obtidos de Bt), os biopesticidas oferecem controle eficaz e menor impacto ambiental (Ferreira and Soares, 2023).

*Beauveria bassiana* é um dos melhores fungos entomopatogênicos para controlar insetos-praga (Srivani and Jalaja, 2022). Diversas cepas de *B. bassiana* desempenham um papel fundamental no controle de diferentes tipos de pragas. Trata-se de um micoinseticida ecológico que produz enzimas e metabólitos secundários que desempenham papel importante no controle biológico de pragas (Ebani and Mancianti, 2021).

O processo infeccioso de *B. bassiana* no hospedeiro é mediado por uma combinação sinérgica de mecanismos bioquímicos e mecânicos. A pressão exercida pelo apressório fúngico rompe áreas membranosas da cutícula do inseto, abrindo caminho para a ação de enzimas hidrolíticas extracelulares, como proteases (EC 3.4) e quitinases (EC 3.2.11.14). Essas enzimas catalizam a degradação da cutícula, permitindo a penetração do fungo na hemolinfa do hospedeiro. A colonização da hemocele do inseto permite a proliferação de corpos hifais capazes de evadir as defesas imunes inatas (Figueroa et al., 2024; Srivani e Jalaja, 2022; Collette and Lorenz, 2011).

A produção e aplicação destas enzimas hidrolíticas pode reduzir as doses necessárias e minimizar o uso de pesticidas químicos, promovendo uma tecnologia verde e sendo sustentável, assim como eficiente para o controle de pragas (Soares et al., 2023; Ferreira and Soares, 2023).

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito *in vitro* das enzimas extracelulares em concomitância com os conídios de *B. bassiana* no controle de pupas de *S. frugiperda*.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1. Isolado fúngico**

O isolado IP 361 de *Beauveria bassiana* s.l. usado no experimento foi obtido da coleção de fungos entomopatogênicos do Laboratório de Patologia de Invertebrados do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (gentilmente cedido pelo Professor Christian Luz).

O isolado foi crescido em placas de Petri contendo 2,0% de ágar Batata Dextrose (BDA) a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  no escuro por 10 dias. A partir desse isolado foi adicionada uma solução aquosa estéril de Tween 80 a 0,040% (v/v) à cada placa, e uma alíquota foi utilizada para contabilizar o número de conídios na câmara de Neubauer, até obter uma concentração de  $10^7$  conídios/mL. Posteriormente, a suspensão de conídios foi usada para inoculação no meio sólido a fim de produzir enzimas extracelulares (proteases e quitinases).

### **2.2. Produção enzimática**

#### **2.2.1. Preparação de meios de cultura sólidos (arroz com soro de leite)**

O meio de cultura proposto foi estabelecido seguindo a metodologia descrita por Figueroa et al. (2024). O experimento foi repetido em três dias diferentes utilizando seis

réplicas para cada día avaliado. Os frascos contendo 40 g de arroz pré-cozido e 20 mL de soro de leite, foram previamente autoclavados antes da adição de uma alíquota de 0,50 mL de conídios, descrito na seção 2.1. Os meios foram mantidos em incubadora BOD, a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , UR de  $60 \pm 10\%$  e fotofase de 24h durante 10 dias. Cada amostra foi agitada manualmente a cada três dias para homogeneização dos conídios, à fim de melhorar o contato e a germinação.

### **2.2.2 Preparação do extrato bruto**

Aos meios de cultura sólido foram adicionados 30 mL de água destilada estéril. Em seguida, os meios foram mantidos em agitação por 2 h, em incubadora com agitação orbital, a 120 RPM. Então, foram filtrados a vácuo usando papel Whatman nº 4. Seguindo a metodologia descrita por Figueroa et al. (2024), o filtrado foi centrifugado a 10.000 g por 15 minutos. O sobrenadante coletado, contendo enzimas e livre de células fúngicas, foi denominado extrato bruto.

### **2.3 Concentração**

A uma alíquota contendo 15 mL do extrato bruto, foi precipitada adicionando acetona P.A (Êxodo científica, Brasil) na proporção 1:2 (sobrenadante/solvente), respectivamente. Em seguida, as soluções foram incubadas a  $4^\circ\text{C}$  por 1 h e centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 100  $\mu\text{L}$  de água destilada. Em seguida, a atividade enzimática foi avaliada (Doonan, 2004).

## **2.4. Ensaio enzimático**

### **2.4.1. Atividade proteolítica total**

A atividade proteolítica foi mensurada de acordo com a metodologia modificada proposta por Braga et al. (2011). Neste experimento, foram utilizados 50 $\mu$ L de amostra incubada a 37°C na presença de 500 $\mu$ L de caseína 1,0% (m/v) e 450 $\mu$ L de tampão Tris-HCl 50mM (pH 7,15), por 30 min. Após esse período, a reação foi interrompida com adição de 1mL de ácido tricloroacético (TCA – P.A. –Dinâmica) 10,0% (m/v). Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 10.000 g por 10min e o sobrenadante foi utilizado para leitura de absorbância a 280nm. Uma unidade de atividade enzimática de protease foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1  $\mu$ g de tirosina por minuto nas condições experimentais acima mencionadas.

### **2.4.2. Atividade quitinolítica total**

A atividade quitinolítica do extrato foi medida pela quantificação de açúcares redutores (Miller, 1959). Neste experimento, foram utilizados 20 $\mu$ L de amostra incubada a 37°C na presença de 500 $\mu$ L de quitina coloidal 1,0% (m/v) e 480 $\mu$ L de tampão Tris-HCl 50mM (pH 7,15), por 60 min. Após esse período, a reação foi interrompida com adição de 1mL de DNS e levada em banho fervente por 5 min. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 10.000 g por 10min e o sobrenadante foi utilizado para leitura de absorbância a 540nm. Uma unidade de atividade de quitinase foi definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a liberação de 1,0  $\mu$ M de N-acetilglucosamina por minuto, nas condições do ensaio.

### **2.4.3. Determinação da proteína total**

A concentração total de proteína foi estimada empregando albumina sérica bovina (BSA) com padrão, seguindo o protocolo descrito por Bradford (1976).

### **2.4.4. Atividade específica**

A atividade específica da protease e quitinase foi calculada dividindo a atividade enzimática pela concentração de proteínas totais, sendo expressa em U mg<sup>-1</sup> de proteína.

## **2.5. Obtenção de *S. frugiperda***

Para o presente estudo foram utilizadas pupas de *S. frugiperda* obtidas da criação do Laboratório de Ecotoxicologia e Manejo Integrado de Pragas (MIP) do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras. As quais, foram mantidas em sala climatizada a 25 ± 2°C, UR de 60 ± 10% e fotoperíodo de 12:12 (L:D) horas.

### **2.5.1. Ensaio de virulência *in vitro***

O experimento para avaliar a virulência do extrato fúngico precipitado e os conídios de *B. bassiana* foi realizado por meio da formação de dois grupos controle e quatro tratamentos. Cada grupo e tratamento continha 10 réplicas de pupas de *S. frugiperda*. Este bioensaio foi realizada em triplicada em dias diferentes. Os grupos controles foram compostos por G1: controle negativo (água destilada) e G2: controle positivo (inseticida com princípio ativo clorpirifos: 480g/L e marca comercial Klorpan 480 EC) e os tratamentos foram agrupados da seguinte forma: T1: suspensão de conídios do isolado IP 361 (10<sup>7</sup> conídios/mL); T2: extrato precipitado ativo; T3: extrato precipitado desnaturado a 100 °C por 2 h; T4: suspensão de conídios (10<sup>7</sup> conídios/mL) + extrato precipitado ativo.

As pupas de *S. frugiperda* foram imersas por 3 segundos em solução (3 mL) do respectivo tratamento, por três dias consecutivos, e mantidas em laboratório à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , UR  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 12 h. Foram feitas avaliações diárias durante 10 dias consecutivos do número de pupas mortas até a emergência de todos os adultos. Calculou-se a porcentagem de emergência pela fórmula de Ferreira et al. (2024), onde:

$$\text{Mortalidade (\%)} = \frac{(\text{n}^\circ \text{ de insetos mortos})}{(\text{n}^\circ \text{ total de insetos vivos})} \times 100$$

### **2.5.2 Avaliação de alterações morfológicas das pupas e adultos de *S. frugiperda***

No bioensaio 2.5.1, os possíveis efeitos danosos após a imersão dos insetos nos diferentes tratamentos foram avaliados utilizando um estereoscópio. As deformidades no corpo dos insetos e a emergência incompleta de adultos nas pupas, indicadores de toxicidade induzida pelos tratamentos, foram observadas e registradas. Esta análise permitiu a identificação dos efeitos prejudiciais causados pelos diferentes tratamentos aos insetos.

### **2.5.3 Re-isolamento e caracterização morfológica de *B. bassiana* (IP 361) em pupas de *S. frugiperda***

Após os 10 dias de aplicação do bioensaio, os tratamentos com a suspensão de conídios do isolado IP 361 ( $10^7$  conídios/mL (T1) e suspensão de conídios ( $10^7$  conídios/mL) + extrato precipitado ativo (T4), a morfologia das colônias foi caracterizada visualmente a partir do crescimento do fungo após de 7 dias a  $27^\circ\text{C}$  em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA. Tanto a caracterização macroscópica quanto a microscópica do isolado foram realizadas por observação das características morfológicas como cor micelial, forma e cor da colônia. A caracterização microscópica do isolado foi feita por microscopia óptica (Wang et al., 2020).

## 2.6. Análise estatística

Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente por meio da análise de variância ANOVA e realizado o teste de Tukey a 1 e 5% de significância usando o software Bioestat 5.0 (Ayres et al., 2003).

## 3. Resultados e discussão

### 3.1 Produção enzimática e atividade específica

A partir dos resultados deste estudo foi evidenciado que a formulação do meio de cultivo composto pelo arroz com o soro de leite demonstrou ser ideal para o desenvolvimento de *B. bassiana* IP 361, estimulando tanto o crescimento fúngico quanto a produção de enzimas extracelulares. A presença de fontes de carbono e nitrogênio facilmente assimiláveis no meio, proporcionou condições ótimas para a colonização fúngica. A viabilidade dos conídios e a eficiência da produção enzimática, observadas neste estudo, corroboram os resultados de Taylor et al. (2013) que destacaram as vantagens econômicas e a alta eficiência desse meio de cultivo para o aumento da germinação fúngica.

Com relação a atividade específica da protease no isolado de *B. bassiana* IP 361, teve como valor no extrato bruto de 26 U mg<sup>-1</sup>. A concentração das proteases por meio da precipitação resultou em um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) na atividade específica, alcançando 180 U mg<sup>-1</sup>. Em relação à atividade quitinolítica, o extrato bruto apresentou atividade específica de 0,153 U mg<sup>-1</sup>. A concentração das quitinases por meio da precipitação também foi efetiva, com um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) na atividade específica, com um valor final de 0,207 U mg<sup>-1</sup>. Esses resultados indicam que os valores das atividades específicas das proteases e quitinases tiveram aumentos quando a acetona foi utilizada como agente de precipitação na proporção 1:2 (sobrenadante /solvente), o que permitiu concentrar o extrato enzimático fúngico

e remover alguns outros componentes, como pequenas moléculas orgânicas e peptídeos de meio de cultura, assim como metabólitos secundários que poderiam interferir na atividade enzimática.

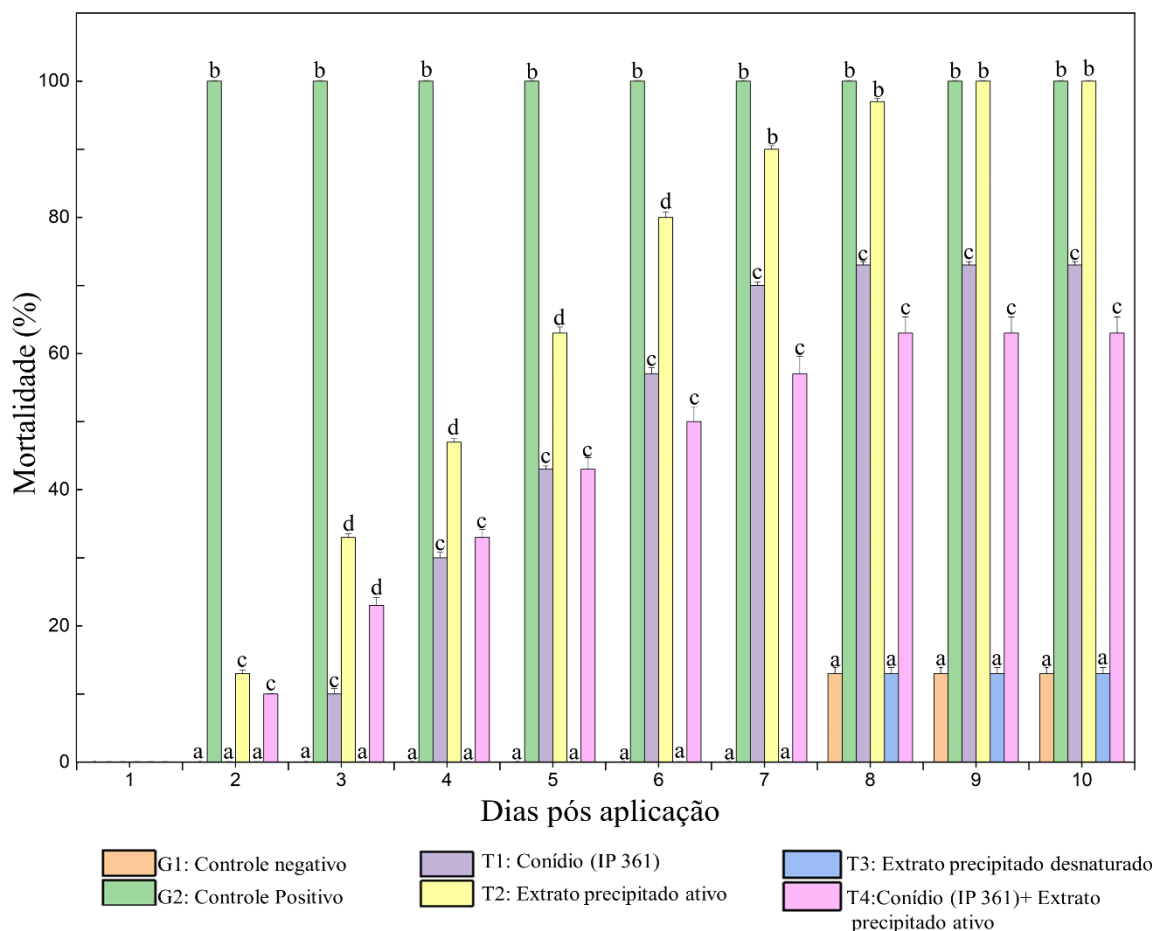
No estudo realizado por Figueroa et al. (2024), foram testados os meios de cultura líquidos caldo SDY, meio de cultura YPG, meio sintético e o meio de amido solúvel com extrato de levedura, além dos meios sólidos como arroz suplementado com soro e farinha de crisálida do bicho-da-seda (*Bombyx mori*) misturada com arroz. Aqueles autores observaram que o meio de cultura de arroz suplementado com soro de leite foi o que induziu a maior produção de protease com um valor de 36 U mg<sup>-1</sup> e quitinase de 0,90 U mg<sup>-1</sup>, para o isolado de *B. bassiana* ESALQ PL63, demonstrando o potencial deste meio na produção enzimática.

Nesse sentido, no estudo de Chen et al. (2019), os autores utilizaram a metodologia de precipitação para concentrar lipases de *Aspergillus niger* GZUF36, onde obtiveram resultados significativos no processo de concentração e relataram que o conteúdo excessivo de acetona resulta na inativação parcial da lipase.

### **3.2 Ensaio de virulência *in vitro***

O propósito deste estudo foi avaliar o potencial das enzimas extracelulares (proteases e quitinases) obtidas de *B. bassiana* a partir de processos fermentativos em concomitância com os conídios do fungo nas pupas de *S. frugiperda*.

Os resultados obtidos do bioensaio de virulência *in vitro* dos tratamentos podem ser observados na Figura 1.



**Fig. 1.** Percentual de mortalidade de pupas de *Spodoptera frugiperda*. Foram avaliados seis grupos: grupo controle negativo: água destilada (G1); controle positivo (inseticida com princípio ativo clorpirifos 480g/L) (G2); suspensão de conídios do isolado IP 361(T1); extrato precipitado ativo (T2); extrato precipitado desnaturado (T3); suspensão de conídios (IP 361) + extrato precipitado ativo (T4). Para o ensaio, as pupas foram submersas no volume total de 3 mL de solução usada no respectivo controle ou tratamento durante 3 segundos e incubados a temperatura 25°C e a umidade relativa de 75%, respectivamente. Todos os grupos avaliados foram analisados estatisticamente após o tratamento, por comparação a cada dia, de acordo com o teste de Tukey. Letras iguais representam grupos estatisticamente iguais ( $p > 0,01$ ) e letras diferentes denotam grupos estatisticamente ( $p < 0,01$ ).

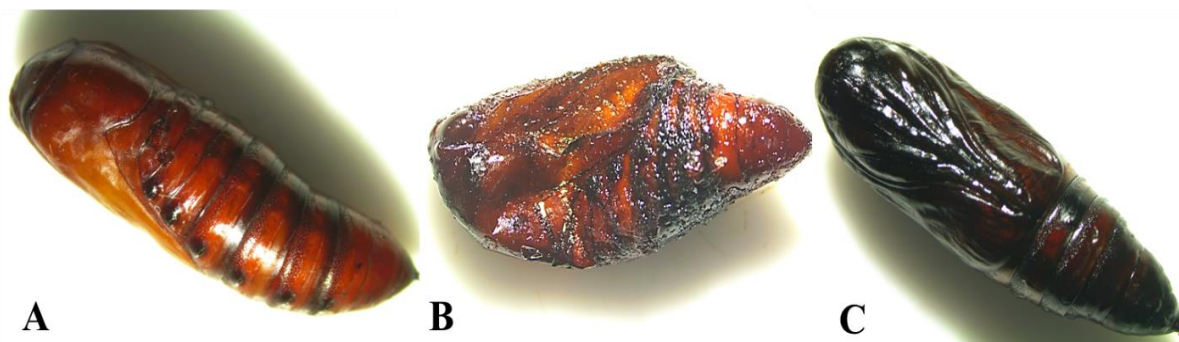
O grupo G2 apresentou diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) em relação aos grupos G1, T1, T3 e T4 durante os primeiros 10 dias após aplicação dos tratamentos em pupas de *S.*

*frugiperda*. No entanto, a partir do dia 7, a diferença entre o grupo G2 e o grupo T2 não foi mais significativa ( $p > 0,01$ ). Os resultados reportados destacam que o grupo T2 apresentou diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) em relação aos grupos G1, T1 e T3 para todos os dias da avaliação. Por outro lado, nos dias 2 e 3, não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,01$ ) entre os grupos T2 e T4. No entanto, a partir do dia 4, foi possível identificar diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) entre os grupos T2 e T4. Em relação aos grupos T1 e T4 não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,01$ ) entre eles, contudo estes grupos apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) com respeito aos grupos G1, G2, T2 e T3. O controle negativo (G1) e o tratamento com extrato precipitado desnaturado (T3) não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,01$ ) entre eles, e no dia 8 até dia 10, apresentou 13% de mortalidade (Fig. 1).

Os resultados obtidos neste estudo, demonstram que o tratamento com o extrato precipitado ativo (T2), rico em proteases e quitinases, apresentou o mesmo efeito *in vitro* no controle de *S. frugiperda* comparável ao inseticida, induzindo 100% de mortalidade em 10 dias. Esses dados sugerem que as enzimas exerceram um papel crucial na degradação da cutícula do inseto, comprometendo sua viabilidade. No entanto, foi evidenciada melanização da cutícula dos insetos no tratamento T2 sugerindo um possível mecanismo de ação do extrato (Fig. 2 c). Essa similaridade na taxa de mortalidade pode estar relacionada ao alto potencial das enzimas proteolíticas e quitinolíticas presentes no extrato T2 na virulência e morte do inseto. As proteases e quitinases facilitam a catálise de quitina, proteínas e lipídeos presentes na cutícula do inseto (Golzan et al., 2023; Lu and St. Leger, 2016). Essas macromoléculas são alvos primários para as enzimas hidrolíticas secretadas por fungos entomopatogênicos (Lu and St. Leger, 2016; Charnley and St. Leger, 1991).

No estudo recente de Golzan et al. (2023), foi destacado o papel fundamental das enzimas hidrolíticas secretadas por *B. bassiana* e *Metarhizium anisopliae* na virulência contra

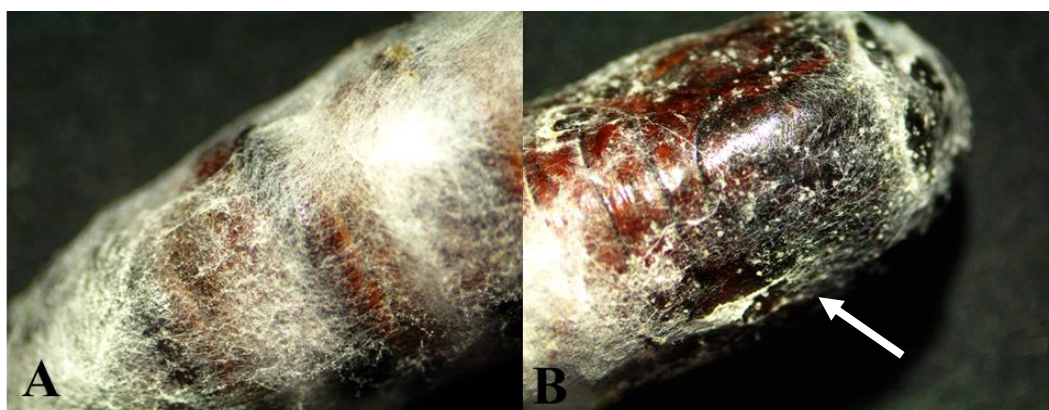
o inseto *Plodia interpunctella* Hubner (Lepidoptera: Pyralidae). Os autores demonstraram que o nível de virulência dos isolados fúngicos pode estar associado a mecanismos fisiológicos específicos, como a secreção de enzimas e a capacidade de suprimir a resposta imune desse microlepidóptero praga.



**Fig. 2.** Pupas de *Spodoptera frugiperda* após tratamento. As pupas foram imersas no volume total de 3 mL de solução usada no respectivo controle ou tratamento durante 3 segundos. A. Controle negativo (água destilada) (G1). B. Controle Positivo (clorpirifos: 480g/L) (G2). C. Tratamento com extrato precipitado ativo (enzimas proteases e quitinases) (T2). Após o tratamento com o extrato precipitado ativo as pupas apresentaram uma coloração marrom escura e no grupo do inseticida observou-se cristalização do inseto. Ocorreram emergências de adultos de *S. frugiperda* somente nos tratamentos controles, enquanto que no tratamento com extrato precipitado todas as pupas morreram.

A ação sinérgica de quitinases e proteases na catálise da degradação dos componentes da cutícula, abre caminho para a infecção fúngica e a morte do inseto. Assim, o desenvolvimento de formulações à base de extratos fúngicos ricos nessas enzimas pode criar oportunidades para alternativas mais sustentáveis em comparação ao uso de pesticidas sintéticos para o ambiente (Ullah et al., 2022; Tang et al., 2019).

Em relação aos grupos T1 e T4, observou-se crescimento micelial a partir do dia 3, com taxas de mortalidade de 10% e 23%, atingindo no dia 10 de 73% e 63%, respectivamente evidenciado na Figura 1. A análise dos resultados revela que o tratamento T4, contendo tanto conídios quanto extrato ativo, proporcionou o controle das pupas de *S. frugiperda*, com início da esporulação no segundo dia de tratamento. O tratamento composto pela suspensão de conídios de *B. bassiana* (T1), demonstrou crescimento micelial a partir do terceiro dia, conforme evidenciado na Figura 3. A morfologia das colônias e a taxa de esporulação sugerem que a combinação das enzimas e os conídios do tratamento (T4) potencializou a ação do fungo, acelerando o processo infeccioso. A virulência desse fungo entomopatogênico está intrinsecamente ligada à sua capacidade de reconhecer e aderir à superfície do hospedeiro. Conforme descrito por Srivani e Jalaja (2020), os conídios interagem com a cutícula do inseto por meio de forças físicas e químicas, facilitando a formação do apressório. Essa estrutura especializada desempenha um papel fundamental na penetração da cutícula e no estabelecimento da infecção fúngica (Seyed-Talebi et al., 2020; Vega et al., 2012).



**Fig. 3.** Pupas de *Spodoptera frugiperda* após tratamento com isolado IP 361 de *Beauveria bassiana*. As pupas foram imersas no volume total de 3 mL de solução usada no respectivo

controle ou tratamento durante 3 segundos. A. Tratamento com suspensão de conídios do isolado IP 361(T1). B. Suspensão de conídios (IP 361) + extrato precipitado ativo (T4). Após o tratamento, observou-se o crescimento de micélio nas pupas em ambos os tratamentos.

Alguns autores descrevem que o mecanismo de infecção do fungo é produzido a partir de dois processos. O primeiro processo deles é o físico, devido à pressão da hifa que rompe as áreas membranosas ou levemente esclerotizadas. O outro processo é o bioquímico, resultante da secreção de enzimas como proteases (EC 3.4), quitinases (EC 3.2.11.14). As proteases catalisam a quebra das ligações peptídicas, presentes como primeira barreira de defesa do inseto constituída pelas proteínas da epicutícula, exocutícula e endocutícula, expondo as fibras de quitina. As exoquitinases e endoquitinases atuam de forma conjunta para catalisar as quebras das fibras de quitina (Ferreira and Soares, 2023; Arias et al., 2022; Seyed-Talebi et al., 2020).

Como resultado da infecção progressiva, o corpo do inseto, torna-se rígido devido à absorção de líquidos (Skinner et al., 2014), além de finalizar o ciclo de infecção pela presença do conidióforo na camada externa da cutícula do inseto, como se pode identificar na (Fig. 3 b).

Os resultados do presente estudo demonstram o alto potencial para uso dessas enzimas no controle de pragas. Idrees et al. (2023) relataram que fungos entomopatogênicos como *B. bassiana*, são agentes de biocontrole com alta virulência contra insetos-pragas de grande impacto como *S. frugiperda*.

### 3.3 Avaliação de alterações morfológicas das pupas e adultos de *S. frugiperda*

A partir das observações diárias, foram identificadas alterações morfológicas nas asas dos adultos, bem como a emergência incompleta de insetos adultos como é evidenciado na Fig. 4 b. Os adultos vivos no tratamento composto pela suspensão de conídios (IP 361) + extrato precipitado ativo (T4), apresentaram principalmente tamanho assimétrico e deformações nas asas. As pupas anormais resultaram no aumento da mortalidade dos insetos. As asas dos adultos se tornaram assimétricas em comparação com o controle (Fig. 4 c). Os adultos malformados com asas assimétricas não conseguiram abrir suas asas completamente, e isto pode torná-los mais vulneráveis à predação por formigas ou outros predadores, interferindo negativamente para a formação de uma nova progênie.



**Fig. 4.** Morfologia dos adultos de *Spodoptera frugiperda* após tratamento com suspensão de conídios (IP 361) + extrato precipitado ativo (T4) de *Beauveria bassiana*. A. Adulto controle negativo (água destilada). B. Pupa íntegra e pupa com eclosão incompleta. C. Adulto com malformações nas asas.

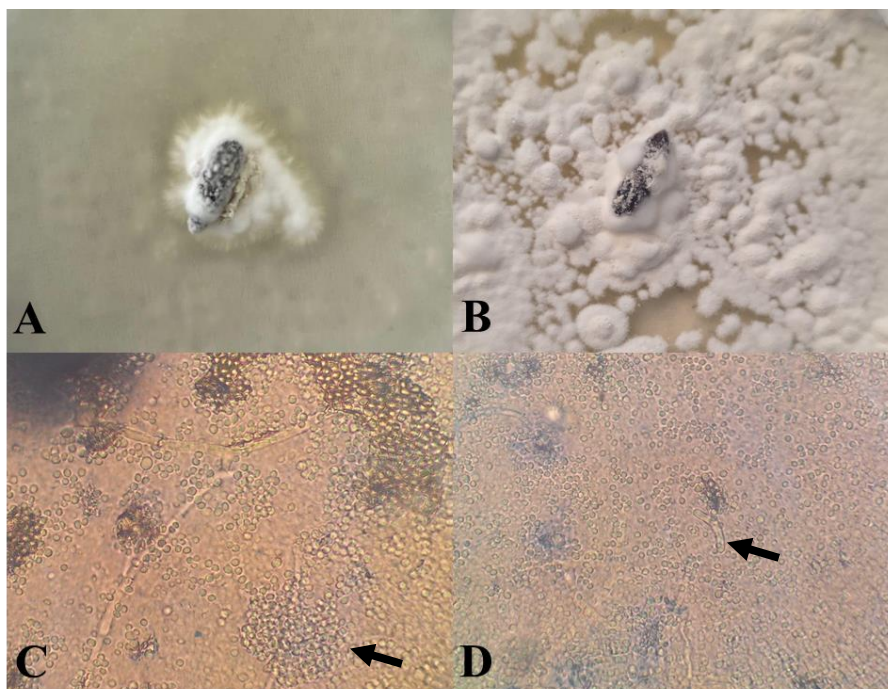
Sari et al. (2023) avaliaram o efeito de *B. bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre o crescimento de *S. frugiperda* por inoculação de sementes (endófito), obtendo como resultado formação de pupas e adultos com alterações morfológicas o que resultou em mortalidade significativa.

Esse resultado é determinado pelo efeito integrado das enzimas extracelulares (quitinase e protease) e os conídios de *B. bassiana*, no mecanismo de infecção, pois a principal função das enzimas é catalisar a hidrólise dos componentes da cutícula do inseto, o que permite a penetração do fungo no inseto (Litwin et al., 2020; St. Leger et al., 1986).

Além disso, é possível que a germinação rápida de conídios e o crescimento do tubo de germinativo possam ser potencializados pela adição de enzimas extracelulares, uma vez que as enzimas ajudam a liberar componentes nutricionais, permitindo um aumento na velocidade de colonização e invasão da hemolinfa (Lovera et al., 2020; Jackson et al., 2010).

#### **3.4 Re-isolamento e caracterização morfológica de *B. bassiana* (IP 361) em pupas de *S. frugiperda***

Após os 10 dias de aplicação dos tratamentos compostos pela suspensão de pela suspensão de conídios (IP 361) + extrato precipitado ativo (T4) e suspensão de conídios (T1), foi observado a crescimento e colonização do fungo *B. bassiana* nas pupas de *S. frugiperda*. Na Figura 5 (a-b) observou-se a formação de colônias circulares, de coloração branca e textura algodonosa, evidenciando a colonização do fungo no meio de cultivo BDA, conforme esperado. Em relação à caracterização microscópica, os conídios apresentaram forma redonda a oval, incolores ou hialinos, com conidióforos ramificados, e com a presença de hifas septais (Fig.5 c-d).



**Fig. 5.** Caracterização morfológica de *Beauveria bassiana* s.l. (IP 361) após 7 dias de crescimento a 27°C em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA. A. Macroscopia do isolado do tratamento compostos pela suspensão de conídios (IP 361) + extrato precipitado ativo (T4). B. Macroscopia do isolado do tratamento com suspensão de conídios (T1). C-D. Estrutura conidial e hifas de *B. bassiana* (IP 361).

A presença de *B. bassiana* IP 361 nas pupas de *S. frugiperda* foi confirmada pela análise das características macroscópicas e microscópicas das colônias fúngicas. Nossos resultados estão em concordância com os resultados do estudo de Geremew et al. (2023), onde os autores isolaram e caracterizaram fungos endofíticos de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium robertsii* da rizosfera de plantas de tomate e seu efeito de virulência sobre a *Galleria melonella*.

#### 4. Conclusão

As enzimas extracelulares de *B. bassiana*, após concentração por precipitação, possuem efeito letal sobre as pupas de *S. frugiperda*. Além disso, comparado ao método convencional, o tratamento composto pelas enzimas causou 100% de mortalidade nos ensaios *in vitro*.

A aplicação de enzimas como proteases e quitinases de *B. bassiana in vitro* surge como uma alternativa promissora no controle bioquímico de *S. frugiperda*, mas requer investigações aprofundadas, levando ao desenvolvimento de formulações estáveis para as enzimas extracelulares para uso à campoem. As informações obtidas no presente estudo contribuem para a busca de soluções inovadoras e ambientalmente responsáveis para o manejo de *S. frugiperda*, com potencial para reduzir significativamente uma das etapas de desenvolvimento e interferindo na proliferação de uma nova progênie.

## 5. Referências

- Ali, S., Ren, S., Huang, Z., 2014. Extracellular lipase of an entomopathogenic fungus effecting larvae of a scale insect. *J. Basic Microbiol.* 54, 1148–1159. <https://doi.org/10.1002/jobm.201300813>
- Arias-Aravena, M., Altimira, F., Gutiérrez, D., Ling, J., Tapia, E., 2022. Identification of exoenzymes secreted by entomopathogenic fungus *Beauveria pseudobassiana* RGM 2184 and their effect on the degradation of cocoons and pupae of quarantine pest *Lobesia botrana*. *J. Fungi.* 8, 1083. <https://doi.org/10.3390/JOF8101083/S1>
- 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, pp. 290.
- Boomsma, J.J., Jensen, A.B., Meyling, N.V., Eilenberg, J., 2014. Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi. *Annu. Rev. Entomol.* 59, 467-485. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162054>
- Braga, F.R., Araújo, J.V., Soares, F.E.F., Araujo, J.M., Geniêr, H.L. A., Silva, A. R., Ferreira, S.R., 2011. Optimizing protease production from an isolate of the nematophagous fungus

*Duddingtonia flagrans* using response surface methodology and its larvicidal activity on horse cyathostomins. *J. Helminthol.* 85, 164-170. <https://doi.org/10.1017/S0022149X10000416>

Charnley, A. K., St. Leger, R.J., 1991. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In: Cole, G.T., Hoch, H.C. (Eds.), *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. Springer, Boston, pp. 267-286. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2635-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2635-7_12)

Chen, C., Tian, H., Xing, S., Li, C., Zeng, X., He, L., 2019. Influence of different parameters on reverse micelle extraction combined with acetone precipitation to purify sn-1, 3 extracellular lipase from *Aspergillus niger* GZUF36. *J. Food Technol.* 56, 2899-2908. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03743-4>

Collette, J.R., Lorenz, M.C., 2011. Mechanisms of immune evasion in fungal pathogens. *Curr Opin Microbiol.* 14, 668-675. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.09.007>

Cruz, I., Figueiredo, M.L.C., Da Silva, R.B., da Silva, I.F., Paula, C.S., Foster, J.E., 2012. Using sex pheromone traps in the decision-making process for pesticide application against fall worm (*Spodoptera frugiperda*) [Smith] [Lepidoptera: Noctuidae] larvae in maize. *Int. J. Pest Manag.* 58(1), 83-90. <https://doi.org/10.1080/09670874.2012.655702>

Doonan, S., 2004. Bulk purification by fractional precipitation. *Methods Mol. Biol.* 244, 117-124. <https://doi.org/10.1385/1-59259-655-x:117>

Ebani, V.V., Mancianti, F., 2021. Entomopathogenic fungi and bacteria in a veterinary perspective. *Biol.* 10, 479. <https://doi.org/10.3390/biology10060479>

Ferreira, J.M., Fernandes, É. K., Kim, J. S., Soares, F.E.F., 2024. The Combination of Enzymes and Conidia of Entomopathogenic Fungi against *Aphis gossypii* Nymphs and *Spodoptera frugiperda* Larvae. *J. Fungi.* 10(4), 292. <https://doi.org/10.3390/jof10040292>

- Ferreira, J.M., Soares, F.E., 2023. Entomopathogenic fungi hydrolytic enzymes: a new approach to biocontrol?. *J. Nat. Pest. Res.* 3, 100020. <https://doi.org/10.1016/j.napere.2023.100020>
- Figueroa, L.B.P., Mamani, R.C.C., de Souza, D.C., de Souza Alves, J.C., de Souza, S.A., Ferreira, C.B., Soares, F.E.F., 2024. 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*. *J. Nat. Pest. Res.* 8, 100077. <https://doi.org/10.1016/j.napere.2024.100077>
- Geremew, D., Shiberu, T., Leta, A., 2023. Isolation, morphological characterization, and screening a virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium robertsii* as bioagents. *F1000Research.* 12, 827. <https://doi.org/10.12688/f1000research.134020.4>
- Golzan, S.R., Talaei-Hassanloui, R., Homayonzadeh, 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(2), 102038. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2023.102038>
- Harrison, R. D., Thierfelder, C., Baudron, F., Chinwada, P., Midega, C., Scha, U., Van Den Berg, J., 2019. Agro-ecological options for fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith) management: Providing low-cost, smallholder friendly solutions to an invasive pest. *J. Environ. Manage.* 243, 318-330. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.05.011>
- Hernández-Trejo, A., Osorio-Hernández, E., López-Santillán, J.A., Ríos-Velasco, C., Varela-Fuentes, S.E., Rodríguez-Herrera, R., 2018. Insectos benéficos asociados al control del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.). *Agroproductividad.* 11(1), 9-14.

- Idrees, A., Afzal, A., Qadir, Z.A., Li, J., 2023. Virulence of entomopathogenic fungi against fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory conditions. *Front. physiol.* 11, 07434. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1107434>
- Jackson, M.A., Dunlap, C.A., Jaronski, S.T., 2010. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *Bio. Cont.* 55, 129–145. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9240-y>
- Jaramillo-Barrios, C.I., Varón-Devia, E.H., Monje-Andrade, B., 2020. Economic injury level and action thresholds for *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in maize crops. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín.* 73(1), 9065-9076. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v73n1.78824>
- Kumela, T., Simiyu, J., Sisay, B., Likhayo, P., Gohole, L., Tefera, T., 2018. Farmers' knowledge, perceptions, and management practices of the new invasive pest, fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) in Ethiopia and Kenya. *Int. J. Pest Manag.* 65, 1-9. <https://doi.org/10.1080/09670874.2017.1423129>
- St. Leger, R.S., Charnley, A.K., Cooper, R.M., 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* 48(1), 85-95. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(86\)90099-6](https://doi.org/10.1016/0022-2011(86)90099-6)
- Litwin, A., Nowak, M., Różalska, S., 2020. Entomopathogenic fungi: unconventional applications. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 19(1), 23-42. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09525-1>
- Lovera, A., Belaich, M., Villamizar, L., Patarroyo, M.A., Barrera, G., 2020. Enhanced virulence of *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis* using a soluble recombinant enzyme with endo- and exochitinase activity. *Biol. Cont.* 144, 104211. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104211>

Lu, H.L., St. Leger, R.J., 2016. Chapter 7 - Insect Immunity to Entomopathogenic Fungi. In: Lovett, B., St. Leger, R.J. (Eds.), *Advances in Genetics* (Vol. 94). Academic Press. US, pp. 251-285. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.11.002>

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)

Mejía, C., Ardila, H.D., Espinel, C., Brandão, P.F.B., Villamizar, L., 2021. Use of *Trichoderma koningiopsis* chitinase to enhance the insecticidal activity of *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis*. *J. Basic Microbiol.* 61, 814-824. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100161>

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>

Sari, J.M.P., Herlinda, S., Suwandi, S., Elfita, E., 2023. Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the growth of *Spodoptera frugiperda* by seed inoculation. *Biodiversitas.* 24(4), 2350-2357. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d240449>

Seyed-Talebi, F.S., Safavi, S.A., Hassanloui, R.T., Bandani, A., 2020. Variable induction of cuticle-degrading enzymes of *Beauveria bassiana* isolates in the presence of different insect cuticles. *J. Crop Prot.* 9(4), 563-576.

Skinner, M., Parker, B.L., Kim, J.S., 2014. Role of Entomopathogenic Fungi in Integrated Pest Management. In: Dharam P.A. (Eds.), *Integrated Pest Management* (Vol. 10). Academic Press. US, pp. 169-191. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398529-3.00011-7>

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. *J. Nat. Pest. Res.* 4, 100025. <https://doi.org/10.1016/j.napere.2023.100025>

- 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>
- Tang, J., Liu, X., Ding, Y., Jiang, W., Xie, J., 2019. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* for rice planthopper control and its synergy with selected insecticides. *J. Crop Prot.* 121, 132-138. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.04.002>
- Tay, W.T., Meagher, R.L., Czepak, C., Groot, A.T., 2023. *Spodoptera frugiperda*: ecology, evolution, and management options of an invasive species. *Annu Rev Entomol.* 68, 299–317. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120220-102548>
- 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>
- Toepfer, S., Fallet, P., Kajuga, J., Bazagwira, D., Mukundwa, I.P., Szalai, M., Turlings, T.C.J., 2021. Streamlining Leaf Damage Rating Scales for the Fall Armyworm on Maize. *J. Pest Sci.* 94, 1075–1089. <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01359-2>
- Udayakumar, A., Shivalingaswamy, T.M., Bakthavatsalam, N., 2021. Legume-Based Intercropping for the Management of Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* L. in Maize. *J. Plant Dis. Prot.* 128, 775–779. <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00401-2>
- United States Environmental Protection Agency (EPA), 2023. Ingredients Used in Pesticide Products: Pesticides. What Are Biopesticides?. <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/what-are-biopesticides/>.(Accessed 17 June 2024).
- Ullah, S., Raza, A.B.M., Alkafafy, M., Sayed, S., Hamid, M.I., Majeed, M.Z., Asim, M., 2022. Isolation, identification and virulence of indigenous entomopathogenic fungal strains against the peach-potato aphid, *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae), and the fall armyworm,

*Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Egypt. J. Biol. Pest Control. 32(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00500-8>

Vega, F.E., Meyling, N.V., Luangsa-ard, J.J., Blackwell, M., 2012. Chapter 6 - Fungal Entomopathogens. In: Fernando E.V., Harry K.K. (Eds.), Insect pathology (Second edition). Academic Press. US, pp. 171-220. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384984-7.00006-3>

Wang, Y., Tang, D. X., Duan, D. E., Wang, Y. B., Yu, H., 2020. Morphology, molecular characterization, and virulence of *Beauveria pseudobassiana* isolated from different hosts. J. Invertebr. Pathol. 172, 107333. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107333>

Zhang, D., Xiao, Y., Xu, P., Yang, X., Wu, Q., Wu, K., 2021. Insecticide resistance monitoring for the invasive populations of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* in China. J Integr Agric. 20, 783-791. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63392-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63392-5)

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de *B. bassiana* em agroecossistemas tem se expandido devido ao seu extraordinário potencial no controle de fitopatógenos e insetos-pragas. Além de eliminar populações resistentes a pesticidas sintéticos, esse fungo garante a sobrevivência da microbiota do solo. Este estudo identificou o potencial biopesticida das enzimas extracelulares de *B. bassiana* no controle de insetos-pragas e doenças parasitárias.

De acordo com os resultados deste estudo, pode-se concluir que tanto as proteases e quitinases obtidas em processos de fermentação sólida possuem atividade nematicida *in vitro*, assim como a atividade inseticida contra *S. frugiperda*, afetando a metamorfoses pupa-adulto e sobrevivência de pupas, mantendo o mesmo efeito que inseticidas sintéticos. Além disso, o presente estudo permitiu identificar *in silico* os fatores de virulência associados às serino proteases Pr1 e Pr2.

Os resultados desta dissertação indicam que o uso das enzimas de *B. bassiana* possui potencial para ser uma nova medida sustentável em contraste aos compostos químicos sintéticos, que são prejudiciais ao ambiente e à saúde humana. No entanto, estudos posteriores *in vivo* e sobre formulações otimizadas na viabilidade e estabilidade para uso no meio ambiente são necessários.

## ANEXO A – Artigo 1 Publicado no periódico Journal of Natural Pesticide Research

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](http://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*

Lisseth Bibiana Puentes Figueroa<sup>a,1</sup>, Ruth Celestina Condori Mamani<sup>a,1</sup>,  
 Debora Castro de Souza<sup>a</sup>, Jhennifer Cristina de Souza Alves<sup>a</sup>, Stefany Amorim de Souza<sup>a</sup>,  
 Cecilia Balduino Ferreira<sup>a</sup>, Tiago Facury Moreira<sup>c</sup>, Willian César Terra<sup>b</sup>, Filipe Elias de  
 Freitas Soares<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry, Laboratory of Biochemistry and Applied Biotechnology, Federal University of Lavras, Brazil

<sup>b</sup> Department of Phytopathology, Laboratory of Nematology, Federal University of Lavras, Brazil

<sup>c</sup> 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](mailto:filipe.soares@ufla.br) (F.E.F. Soares).

<sup>1</sup> 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 Metarriz® 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 10<sup>7</sup> 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: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 (g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.50 (g/L), MgSO<sub>4</sub> 0.50 (g/L), FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.20 (g/L), ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 3.34 (g/L), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 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: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.0 (g/L); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 (g/L); MgSO<sub>4</sub> 0.7 (g/L); NaCl 0.50 (g/L); CaCl<sub>2</sub> 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  $37^\circ\text{C}$  and pH 7.15. For *M. anisopliae*, the conditions were  $37^\circ\text{C}$  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  $1.0 \mu\text{g}$  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  $37^\circ\text{C}$  and pH 7.15. For *M. anisopliae*, the conditions were  $37^\circ\text{C}$  and pH 5.35. One unit of chitinase activity was defined as the amount of enzyme required to release  $1.0 \mu\text{M}$  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 ( $L_3$ ) of nematodes belonging to *Haemonchus* spp. ( $\sim 70\%$ ) and trychostrongylid ( $\sim 30\%$ ) 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 Barke (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  $\mu\text{L}$  of distilled water and 60  $\mu\text{L}$  of a suspension containing approximately 30 nematodes. About 30 nematodes were treated with denatured crude extract of enzyme (boiled at  $100^\circ\text{C}$  for 2 hours) 60  $\mu\text{L}$  of denatured extract and 60  $\mu\text{L}$  of suspension of nematodes. The group treated with active enzyme extract was formed by: 60  $\mu\text{L}$  of active enzyme extract and 60  $\mu\text{L}$  of a suspension containing about 30 nematodes. All groups were incubated for a period of 24 hours at  $27^\circ\text{C}$  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. ( $\sim 70\%$ ), trychostrongylid ( $\sim 30\%$ ) 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).

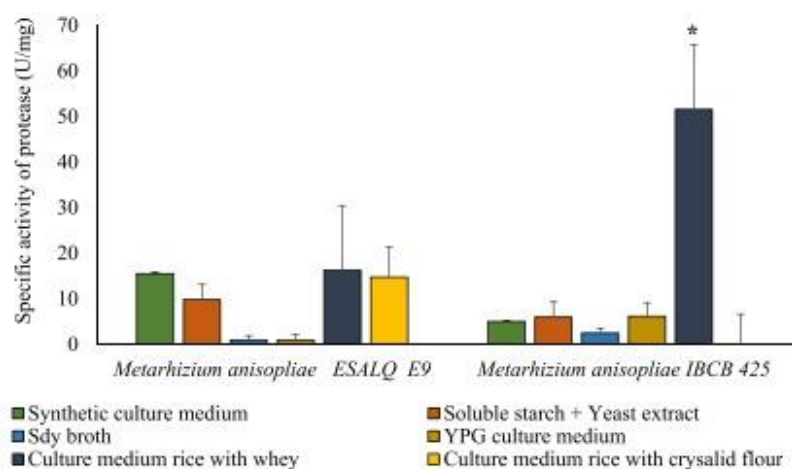


Fig. 1. Specific activity of protease (U/mg) from *Metarhizium anisopliae* strain IBCB 425 and *M. anisopliae* strain ESALQ E9. \**Metarhizium anisopliae* protease production in culture medium rice with whey showed a significant difference according to Tukey's statistical test of ( $p < 0.01$ ) in relation 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 ( $L_3$ ), 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

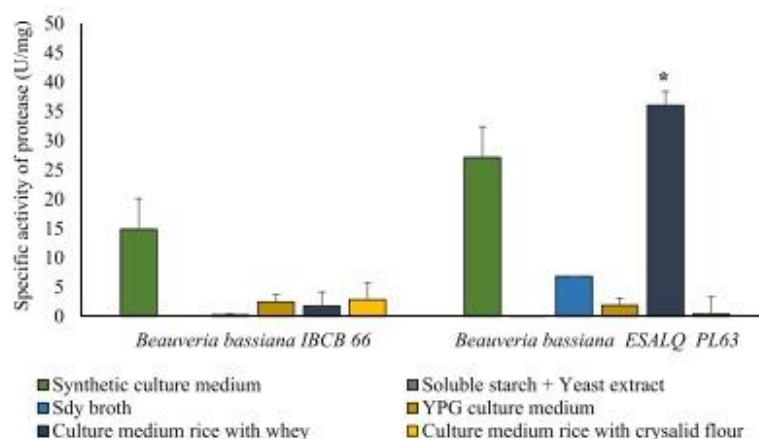


Fig. 2. Specific activity of protease (U/mg) from *Beauveria bassiana* strain IBCB 66 and *B. bassiana* strain ESALQ PL63. \**Beauveria bassiana* IBCB 66 protease production in culture medium rice with whey showed a significant difference according to Tukey's statistical test of ( $p < 0.01$ ) in relation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

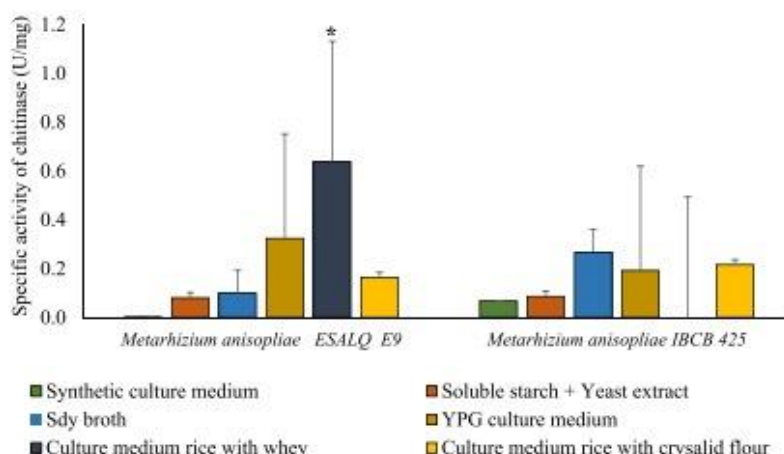


Fig. 3. Specific activity of chitinase (U/mg) from *Metarhizium anisopliae* strain IBCB 425 and *M. anisopliae* strain ESALQ E9 using liquid and solid culture media. \**Metarhizium anisopliae* ESALQ E9 chitinase production in culture medium rice with whey showed a significant difference according to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

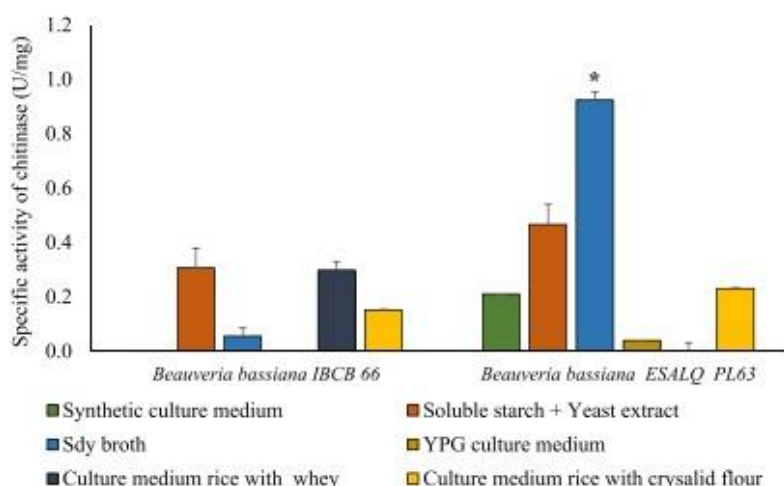


Fig. 4. Specific activity of chitinase (U/mg) from *Beauveria bassiana* strain IBCB 66 and *B. bassiana* strain ESALQ PL63 using liquid and solid culture media. \**Beauveria bassiana* ESALQ PL63 chitinase production in SDY broth showed a significant difference according to Tukey's statistical test of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

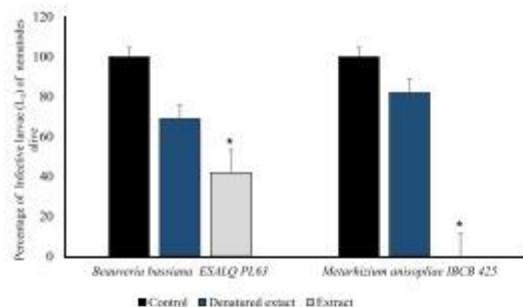
## 6. Discussion

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

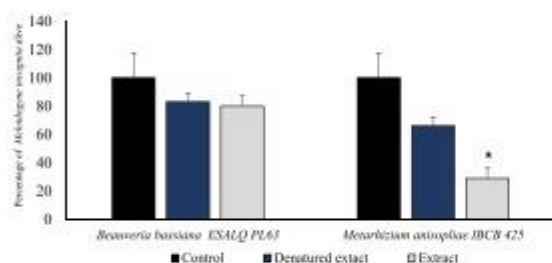
present study produced protease and chitinase, reaching high level of enzymatic activity. Furthermore, our result showed that after the evaluation of different culture media, for all isolates tested the medium rice whey medium was the one that induced the highest protease production.

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<sub>3</sub>) of nematodes *Haemonchus* spp. (~70%) and trichostrongylid (~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<sub>3</sub>) 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, chitinase 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. interpunctell* 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. tritans* 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 *Paecilomyces 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: *Arthroobrya oligospora*, *Candelabrella musiformis*, *Arundo conooides*, *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. Filippe Elias de Freitas Soares designed this study. Filippe Elias de Freitas Soares and Willian César Terra analyzed data. Lisseth Bibiana Puentes Figueroa, Ruth Celestina Condori Mamani and FEFS wrote the manuscript. Filippe 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. **Filippe Elias de Freitas Soares:** Writing – review & editing, Supervision, Conceptualization. **Willian César Terra:** Writing – review & editing, Supervision. **Tiago Facury Moreira:** 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 *Ankylostoman* (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*, Nietner) using *Metarhizium anisopliae*. Int. J. Res. Appl. Sci. Eng. Tech. 5, 1800–1804. <https://doi.org/10.22214/IRASET.2017.10264>.
- Bhadani, R.V., Gajera, H.P., Hirpara, D.G., Kachhadia, 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>.
- Boneti, J.S., Ferraz, S., 1981. Modification of the Hissey and Barker method for generating *Meloidogyne exigua* 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\(76\)90527-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-1).
- 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](https://doi.org/10.1007/978-981-13-7318-3_10).

- Da Silva Roberto, F.F., dos Santos Difante, G., Zanos, 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>.
- Ehani, 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., 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., Assela, 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>.
- Ghoreishi, 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>.
- Golzan, S.R., Taleai-Hassanlou, R., Homayonzadeh, 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.jaspen.2023.102038>.
- He, D.C., He, M.H., Amalin, D.M., Liu, W., Alvinia, 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., 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, C.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 aphicidal 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 aphicidal *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., Ortunho, V.V., 2016. Benefícios do bem-estar animal na produtividade e na sanidade de ovinos. *Petód. Eletro. 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 hapia*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 113–118. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9446-1>.
- Marrone, P., 2024. Status of the biopesticide market and prospects for new bioherbicides. *Pest Manag. Sci.* 80, 81–86. <https://doi.org/10.1002/ps.7403>.
- Mehri, D., Perendeci, N.A., Goksunur, 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/a60147a030>.
- Mishra, J., Tewari, S., Singh, S., Arora, N.K., 2015. Biopesticides: where we stand? *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*. Springer India, New Delhi, pp. 37–75. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2068-8\\_2](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 *Haemaphysalis 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., Colón-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/jobm.202000627>.
- 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>.
- Orinstein, L., 1964. Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 321–349.
- Page, A., Stepek, G., Winter, A., Perrah, 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>.
- 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. *Semin. Ciênc. Agr.* 26 (3), 313–320. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2005v26n3p313>.
- Silva, D.G., Metzger, B.M., Bettencourt, A.F., Faurz, A.C., Corrêa, M.B., Rusakowski, G., Martins, A.A., Bruun, 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 nematophagous fungus *Monacrosporium thausasium*. *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., Hlira, E., Braga, F.R., 2015. Nematicidal action of chitinases produced by the fungus *Monacrosporium thausasium* 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., Saito, 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 marmoratus*. *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-Marcedino, L., 2023. Biological control 2.0: use of nematophagous 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 nematophagous 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.v59n1.3177>.
- 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 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>.
- Sun, Y., Zhang, B., Zhang, W., Wang, Q., Toufeng, 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.jspr.2013.02.004>.
- Viera, W., Jackson, T., 2020. Ecuador demonstrates a sustainable way forward for small farmer producers. *Chron. Hortic.* 60, 19–22.
- Waili, E., Ghoson, D., Gaziea, 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 *Faenclomyces laticrus* as biocontrol agents against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on Cowpea. *Bull. Natl. Res. Cent.* 44, 112. <https://doi.org/10.1186/s42269-020-00367-4>.
- Zasada, I., Halbrecht, J., Kokalis-Burelle, N., LaMondia, J., McKenry, M., Nollig, 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.