

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE  $\beta$ -1,3 GLICANASES EM *Metarhizium  
anisopliae***

Dissertação de Mestrado

IRINA LÜBECK

Porto Alegre, 2004.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE  $\beta$ -1,3 GLICANASES EM *Metarhizium  
anisopliae***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre.

IRINA LÜBECK

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, 2004.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os recursos financeiros para financiamento do projeto foram oriundos do CNPq e PADCT.

## AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Marilene Henning Vainstein pela acolhida, apoio e orientação.

Ao Professor Dr. Augusto Schrank pelas sugestões e críticas no decorrer deste trabalho.

À Professora Dr. Irene Schrank pelo tempo despendido e sugestões.

Aos Professores Dr. Carlos Termignoni e Dra. Célia Carlini, membros da comissão de acompanhamento, pela disponibilidade e auxílio.

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia.

Aos colegas do laboratório 205 pela paciência, ensinamentos e discussões científicas.

Aos colegas e amigos dos laboratórios 213 e 208 pelo convívio agradável.

À Walquíria Arruda pelo apoio no início da minha jornada no laboratório e pelo incentivo a minha permanência nesta cidade.

À Roberta Bussamara pelo ombro amigo, generosidade e presteza.

Ao Juliano Porciúncula pela tolerância e auxílio.

À Adriana e Alexandre pela amizade, convívio, incentivo e compreensão.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Fábio pelo amor e apoio.

À minha família, por tudo...

A Deus.

Aos órgãos de fomento CNPq, FAPERGS e PADCT pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iv
SUMÁRIO.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT .....	xv
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 O entomopatógeno <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	1
1.2 Carrapato <i>Boophilus microplus</i> .....	5
1.3 Controle biológico do carrapato <i>Boophilus microplus</i> por <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	9
1.4 Processo de infecção.....	16
1.5 $\beta$ -1,3 glicanas e $\beta$ -1,3 glicanases .....	21
2. OBJETIVOS .....	31
2.1 Objetivo Geral .....	31
2.2 Objetivos específicos .....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1 MEIOS E SOLUÇÕES.....	32
3.1.1 Meio BDA (Agar Batata) .....	32
3.1.2 Meio TLE .....	32
3.1.3 Meio de Cove Completo (MCC).....	33
3.1.4 Solução de Sais.....	33
3.1.5 Solução de elementos traços.....	33
3.1.6 Tampão de extração – TEX.....	34
3.2 MICRORGANISMOS.....	34
3.2.1 Manutenção da Linhagem E <sub>6</sub> de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	34
3.2.2 Linhagem de <i>Rhizoctonia solani</i> .....	35
3.3 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PAREDE CELULAR DE <i>Rhizoctonia solani</i> .....	35
3.4 PREPARAÇÃO DE CUTÍCULA DE <i>Boophilus microplus</i> .....	36
3.5 CULTIVO DE <i>Metarhizium anisopliae</i> PARA PRODUÇÃO DE GLICANASES .....	36
3.5.1 Cultivos de <i>Metarhizium anisopliae</i> em diferentes fontes de carbono.....	36
3.5.1.1 Efeito da glicose na secreção de $\beta$ -1,3 glicanases por <i>M. anisopliae</i> .....	37

3.5.1.2 Detecção de $\beta$ -1,3 glicanases não secretadas .....	38
3.5.2 Cultivos em larga escala.....	38
3.6 ATIVIDADE DE $\beta$ -1,3 GLICANASE.....	39
3.7 ANÁLISE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA .....	39
3.8 PURIFICAÇÃO DE $\beta$ -1,3 GLICANASE DE <i>M. anisopliae</i> .....	41
3.9 SOUTHERN BLOT .....	43
3.9.1 Extração de DNA genômico de <i>M. anisopliae</i> .....	43
3.9.2 Clivagem do DNA com endonucleases de restrição .....	43
3.9.3 Preparo do fragmento de DNA contendo uma seqüência de glicanase .....	43
3.9.4 Hibridização pela técnica de <i>Southern</i> .....	44
4. RESULTADOS .....	45
4.1 PRODUÇÃO DE $\beta$ -1,3 GLICANASE POR <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	45
4.1.1 Secreção de $\beta$ -1,3 glicanases por <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	45
4.1.2 Efeito da glicose na secreção de $\beta$ -1,3 glicanases por <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	47
4.1.3 Detecção de $\beta$ -1,3 glicanases não secretadas no meio de cultivo.....	50
4.2 PURIFICAÇÃO DE $\beta$ -1,3 GLICANASES PRODUZIDAS POR <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	53
4.3 DETECÇÃO DE UM GENE QUE PROVAVELMENTE CODIFICA UMA GLICANASE EM <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	63
5. DISCUSSÃO .....	68
6. CONCLUSÕES.....	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	79

**LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES**

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
°C	Graus Celsius
BDA	Agar batata
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNS	Ácido 2,5 – dinitrossalicílico
DO	Densidade ótica
FPLC	Fast-protein Liquid chromatografy
g	Grama, aceleração da gravidade
h	Hora
hs	Horas
ITS	Espaçador transcrito interno
kDa	Quilodaltons
M	Molar
MCc	Meio de Cove Completo
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
n°	Número
NAG	N-acetilglicosamina
nm	Nanômetro
p/p	Peso por peso

p/v	Peso por volume
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	Pares de base
pH	Potencial hidrogeniônico
RDA	Análise da diferença representacional
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
seg	Segundos
TCA	Ácido tricloracético
TEMED	N,N,N',N' – tetrametil etilenodimetilamida
TEX	Tampão de extração
Tris	2 – amino – 2 – hidroximetilpropano –1,3 – diol
Tween	Polisorbitano
U	Unidade de atividade enzimática
V	Volts
v/v	Volume por volume

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Características morfológicas de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> .....	2
<b>Figura 2.</b>	Ciclo biológico do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	4
<b>Figura 3.</b>	Ciclo do carrapato <i>Boophilus microplus</i> em bovinos.....	8
<b>Figura 4.</b>	Modelo do mecanismo de penetração do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> em <i>Boophilus microplus</i> .....	18
<b>Figura 5.</b>	Estrutura química da $\beta$ -1,3 glicana (laminarina) e modo de ação das $\beta$ -1,3 glicanases.....	24
<b>Figura 6.</b>	Microscopia eletrônica de varredura de <i>M. anisopliae</i> infectando a cutícula de <i>B. Microplus</i> .....	29
<b>Figura 7.</b>	Etapas do processo de purificação de $\beta$ -1,3 glicanases produzidas por <i>M. anisopliae</i> em meio TLE suplementado ou com parede celular de <i>R. solani</i> 0,5% ou com NAG 0,5%.....	41
<b>Figura 8.</b>	Secreção de $\beta$ -1,3 glicanase por <i>M. anisopliae</i> cultivado em meio TLE suplementado com diferentes fontes de carbono.....	46
<b>Figura 9.</b>	Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE do sobrenadante do terceiro dia de cultivo de <i>M. anisopliae</i> , em meio TLE suplementado com diferentes fontes de carbono.....	49
<b>Figura 10.</b>	Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE do sobrenadante do quinto dia de cultivo de <i>M. anisopliae</i> , em meio TLE suplementado com diferentes fontes de carbono.....	49
<b>Figura 11.</b>	Avaliação do efeito da re-adição de glicose na produção de $\beta$ -1,3 glicanase em culturas de <i>M. anisopliae</i> .....	50

<b>Figura 12.</b> Produção enzimática da fração intracelular solúvel de cultivos de <i>M. anisopliae</i> em meio TLE suplementado com diferentes fontes de carbono.....	52
<b>Figura 13.</b> Perfil cromatográfico em coluna de troca iônica Q-Sepharose <i>Fast Flow</i> das proteínas secretadas por <i>M. anisopliae</i> .....	56
<b>Figura 14.</b> Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE das frações eluídas na coluna de troca iônica Q-Sepharose <i>Fast Flow</i> com gradiente de NaCl.....	57
<b>Figura 15.</b> Perfil cromatográfico em coluna de troca iônica Q-Sepharose <i>Fast Flow</i> das proteínas secretadas por <i>M. anisopliae</i> .....	58
<b>Figura 16.</b> Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE das frações eluídas na coluna de troca iônica Q-Sepharose <i>Fast Flow</i> com gradiente de NaCl.....	59
<b>Figura 17.</b> Perfil cromatográfico em coluna de filtração em gel Superdex 75 das proteínas secretadas por <i>M. anisopliae</i> .....	60
<b>Figura 18.</b> Perfil cromatográfico em coluna de filtração em gel Superdex 75 das proteínas secretadas por <i>M. anisopliae</i> .....	61
<b>Figura 19.</b> Purificação parcial da enzima com atividade de $\beta$ -1,3 glicanase produzida em fermentação do fungo <i>M. anisopliae</i> em meio TLE suplementado com parede celular de <i>R. solani</i> . ....	62
<b>Figura 20.</b> Purificação parcial da enzima com atividade de $\beta$ -1,3 glicanase produzida em fermentação do fungo <i>M. anisopliae</i> em meio TLE suplementado com NAG 0,5%.....	63
<b>Figura 21.</b> Purificação do fragmento de exo- $\beta$ -1,3 glicanase de <i>M. anisopliae</i> .....	65

- Figura 22.** Alinhamento da seqüência predita de aminoácidos do fragmento de 582pb de uma provável  $\text{exo-}\beta\text{-1,3}$  glicanase de *M. anisopliae* com seqüências de outras glicanases armazenadas em bancos de dados..... 66
- Figura 23.** Confirmação da presença da seqüência de  $\text{exo-}\beta\text{-1,3}$  glicanase no genoma de *M. anisopliae*..... 67

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Fungos entomopatogênicos comercializados ou em processo de comercialização utilizados no controle biológico de pragas.....	15
<b>Tabela 2.</b>	Características das $\beta$ -1,3 glicanases produzidas por diferentes microrganismos.....	30
<b>Tabela 3.</b>	Análise de proteínas totais e $\beta$ -1,3 glicanases em cultivos de <i>Metarhizium anisopliae</i> em diferentes fontes de carbono.....	48
<b>Tabela 4.</b>	Proteínas totais e atividade de $\beta$ -1,3 glicanases na fração intracelular solúvel de micélio cultivado em meio TLE suplementado com diferentes fontes de carbono.....	53

## RESUMO

*Metarhizium anisopliae* é um fungo cosmopolita com capacidade de infectar uma grande variedade de hospedeiros, estando entre eles o carrapato *Boophilus microplus*. A penetração de *M. anisopliae* em seus hospedeiros ocorre de forma ativa onde a cutícula constitui a principal barreira. A penetração é um processo multifatorial, porém, o emprego de pressão mecânica e a secreção de enzimas hidrolíticas parecem ser fundamentais para o seu sucesso. *M. anisopliae*, quando cultivado em meios com fontes de carbono que mimetizam a cutícula de seus hospedeiros, secreta enzimas como proteases, quitinases e lipases. Atualmente, o emprego de técnicas que identificam genes diferencialmente expressos (RDA) mostrou o possível envolvimento de outras enzimas, como as  $\beta$ -glicanases, durante o processo de penetração. A descoberta da ocorrência de modificações morfológicas como espessamento e perda da definição da parede celular nas extremidades das hifas que penetram na cutícula do carrapato sustentam ainda mais o possível envolvimento de enzimas que degradam as  $\beta$ -glicanas nas etapas iniciais da infecção. Neste trabalho, foi investigada a produção de  $\beta$ -1,3-glicanases pela linhagem E<sub>6</sub> de *M. anisopliae* como também, buscou-se purificar as enzimas produzidas. A síntese e secreção de  $\beta$ -1,3-glicanases foram verificadas em meio contendo diferentes fontes de carbono sendo a secreção diferenciada dependendo da condição testada. A utilização de glicose em determinadas concentrações pareceu inibir a secreção enzimática. Duas das condições testadas, N-acetilglicosamina (NAG) 0,5% e parede celular de *Rizoctonia solani* 0,5%, foram utilizadas para a produção enzimática em larga escala. O sobrenadante dos cultivos em fermentador foi submetido

ao processo de purificação que constou de três etapas: concentração por ultrafiltração com membrana de celulose regenerada, aplicação em coluna de troca iônica Q-Sepharose *Fast Flow* e aplicação em coluna de filtração em gel Superdex 75. O emprego deste protocolo permitiu a purificação parcial de uma  $\beta$ -1,3-glicanase com aproximadamente 95kDa, secretada durante a fermentação em presença de parede celular de *Rizoctonia solani*, e de outra, com aparentemente a mesma massa molecular secretada em fermentação utilizando NAG 0,5% como fonte de carbono. Durante este trabalho, também foi confirmada a presença de pelo menos um gene que codifica uma exo- $\beta$ -1,3-glicanase no genoma da linhagem E<sub>6</sub> de *M. anisopliae*. Por fim, o estudo das  $\beta$ -1,3 glicanases em *M. anisopliae* é justificado pela importância destas enzimas em variados aspectos do desenvolvimento do fungo bem como, pelo seu possível envolvimento na infecção de hospedeiros.

**Palavras-chave:** *Metarhizium anisopliae*, controle biológico,  $\beta$ -1,3-glicanases, purificação de  $\beta$ -1,3-glicanases, produção de  $\beta$ -1,3-glicanases.

## ABSTRACT

*Metarhizium anisopliae* is a cosmopolitan fungus with capacity to infect a variety of host range including the tick *Boophilus microplus*. *M. anisopliae* penetrates its host actively through the cuticle which consists the most important barrier to infection. Penetration is a multifactorial process, although, mechanical pressure and secretion of hydrolytic enzymes seems to be limiting to penetration steps. When *M. anisopliae* grows in media supplemented with carbon sources that mimetises infection as host cuticles, for instance, it secretes proteases, chitinases and lipases. Nowadays, the utilization of modern techniques capable to identify differentially expressed sequence tags has shown a possible role for other enzymes such as  $\beta$ -1,3-glucanases during penetration. The discovery of morphological differentiation like wider extremities and less defined cell walls in penetrating hyphae tips strongly supports the possible involvement of glucanases for fungi penetration. In this work we have investigated  $\beta$ -1,3-glucanase production by *M. anisopliae*, strain E<sub>6</sub>, as well as, attempted to purify some secreted glucanases. We have observed that *M. anisopliae* produces  $\beta$ -1,3-glucanase in media containing different carbon sources. Enzyme secretion varies according to the source employed and glucose seems to inhibit enzyme secretion. *M. anisopliae* glucanases were produced in large scale by fermentations using minimum medium supplemented with *Rizoctonia solani* purified cell walls 0,5% or with *N*-acetylglucosamine 0,5%. Culture supernatants were utilized in a three step purification procedure: concentration with regenerated cellulose membranes, application in an ion exchange column and finally application in a gel filtration column. This protocol allowed the partial purification of *M. anisopliae*  $\beta$ -1,3-glucanases secreted during the fermentations with the two carbon

sources tested. Both enzymes have approximately 95kDa. Here we also confirmed the occurrence of at least one exo- $\beta$ -1,3-glucanase gene in *M. anisopliae* genome. In conclusion, the study of  $\beta$ -1,3-glucanases in *M. anisopliae* is justified by the importance this enzymes to different aspects of fungal development as well as by their role in host infection.

**Keywords:** *Metarhizium anisopliae*, biological control,  $\beta$ -1,3-glicanases,  $\beta$ -1,3-glicanases production,  $\beta$ -1,3-glicanases purification.

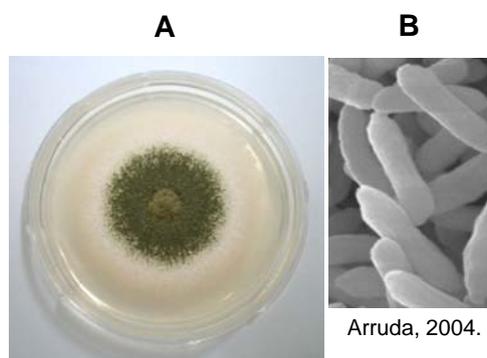
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*

O fungo *M. anisopliae* foi isolado pela primeira vez em 1879 pelo russo Elie Metschnikoff e denominado *Entomophthora anisopliae*. Este mesmo pesquisador, um ano mais tarde, o renomeou para *Isaria destructor*. Em 1883, Sorokin o descreveu como *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, permanecendo assim até os dias atuais (ALVES 1998).

Considera-se, principalmente por análise morfológica e coloração de seus conídios, que existam três espécies de *Metarhizium*: *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium flavoviride* e *Metarhizium album*. *M. anisopliae* possui fiálides cilíndricas sustentando cadeias de conídios cilíndricos de coloração verde e duas variedades são reconhecidas: *M. anisopliae* var. *majus*, com conídios medindo entre 10 e 14 $\mu$ m e var. *anisopliae* com conídios de 5 a 8 $\mu$ m (Figura 1). *M. flavoviride* possui fiálides estreitas com cadeias de conídios ovóides a elípticos, os quais são normalmente verdes, e também possui duas variedades de acordo com o tamanho de seus conídios: *M. flavoviride* var. *flavoviride* com conídios de 6 a 11 x 3 a 5 $\mu$ m e var. *minus* com 4 a 7 x 2 a 3 $\mu$ m (CURRAN *et al.*, 1994).

Em 2001, LIU *et al.* por análise de seqüências ITS (Espaçador Transcrito Interno) do DNA ribossômico de amostras de estroma de *Cordyceps* coletadas a campo e culturas de *Metarhizium* spp., identificaram a espécie *Cordyceps brittlebankisoides* como sendo a forma teleomórfica de *M. anisopliae* var. *majus* e com isto o fungo *M. anisopliae* passou a ser considerado um ascomiceto.



**Figura 1. Características morfológicas de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.** (A) Cultivo em meio complexo, mostrando uma colônia esporulada. (B) Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos conídios com tamanho de 5 a 8 $\mu$ m de comprimento.

Este entomopatógeno é capaz de infectar mais de 300 espécies de insetos. Alguns de seus hospedeiros são pragas na agricultura, como a cigarrinha da cana-de-açúcar (*Mahanarva fimbriolata*) (ALMEIDA & FILHO, 2001). DRIVER *et al.* (2000) reportaram o seu uso na Rússia para o controle do besouro do trigo (*Coleoptera: Scarabaeidae*) ainda, BATTA (2003) relata o seu emprego como biopesticida para o controle da mosca branca do tabaco (*Bemisia tabaci*) e da aranha vermelha da berinjela (*Tetranychus cinnabarinus*). Entre os hospedeiros alvos do fungo *M. anisopliae* estão também vetores de doenças importantes na saúde pública, como a doença de chagas e a malária. LUZ *et al.* (1998) relataram a grande susceptibilidade de ninfas de *Triatoma infestans* a infecção por *M. anisopliae* e SCHOLTE *et al.* (2003) descreveram o seu potencial para o controle dos mosquitos dos gêneros *Anopheles* e *Culex*.

O ciclo de vida de *M. anisopliae*, mostrado na Figura 2, é bastante simples: através de reprodução assexuada produz conidiósporos, que são as unidades infectivas; estes, quando liberados no ambiente, aderem à superfície do hospedeiro e germinam

dentro de 16 a 20h quando em condições favoráveis. Na superfície do hospedeiro, a hifa desenvolve uma estrutura especializada denominada de apressório, a qual se fixa na cutícula e forma um grampo de penetração responsável pela secreção de enzimas hidrolíticas e pressão mecânica, fundamentais para penetração ativa na cutícula do hospedeiro (BIDOCHKA *et al.*, 1997; LOMER *et al.*, 2001). Atingindo a cavidade corporal do hospedeiro, o fungo produz hifas que, após infestação massiva, emergem para a superfície produzindo novamente conidiósporos (CURRAN *et al.*, 1994).

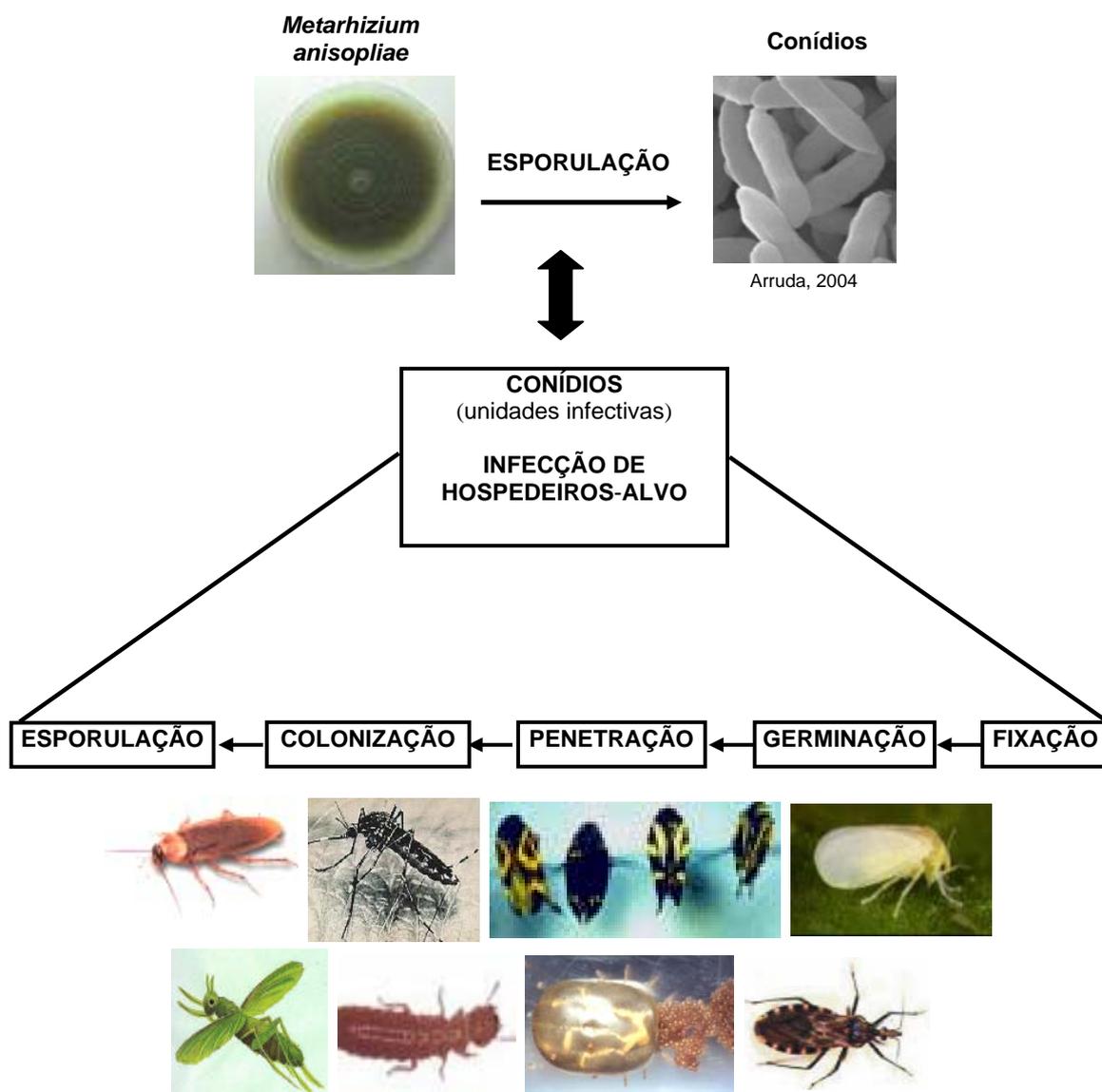


Figura 2. Ciclo biológico do fungo *Metarhizium anisopliae*.

## 1.2 Carrapato *Boophilus microplus*

O carrapato do boi *Boophilus microplus*, Canestrini, 1887 (Acari: Ixodidae), pertence ao filo Artropoda, classe Aracnida, ordem Acarina e superfamília Ixodidea (ROCHA, 2000). É o mais importante ectoparasita dos rebanhos bovinos do Brasil. Está presente em todas as áreas tropicais e subtropicais entre os paralelos 32° N e 32° S, correspondendo à faixa intertropical que abrange importantes zonas da América Central, América do Sul, África do Sul e Oceania. É originário do continente asiático, sendo introduzido na maioria dos países tropicais e subtropicais através da importação de gado bovino (HERNÁNDEZ *et al.*, 1998; MONTEIRO *et al.*, 1998).

Os carrapatos ixodídeos são ectoparasitos obrigatórios, necessitando passar, obrigatoriamente, uma fase de sua vida sobre o hospedeiro, ingerindo linfa, substratos teciduais e sangue. O hospedeiro preferencial do *B. microplus* é o bovino, sendo o *Bos taurus* mais sensível que o *Bos indicus*. São parasitos de grande importância tanto para o homem quanto para animais domésticos, pois, além de sugarem o sangue do hospedeiro, podem ser vetores de uma série de microrganismos, como bactérias, protozoários, riquetsias e vírus (BITTENCOURT, 2000). Estima-se que a fêmea ingira cerca de 0,5 a 3mL de sangue ao longo de sua vida, acarretando uma perda de 1kg por animal/ano (ATHAYDE *et al.*, 2001).

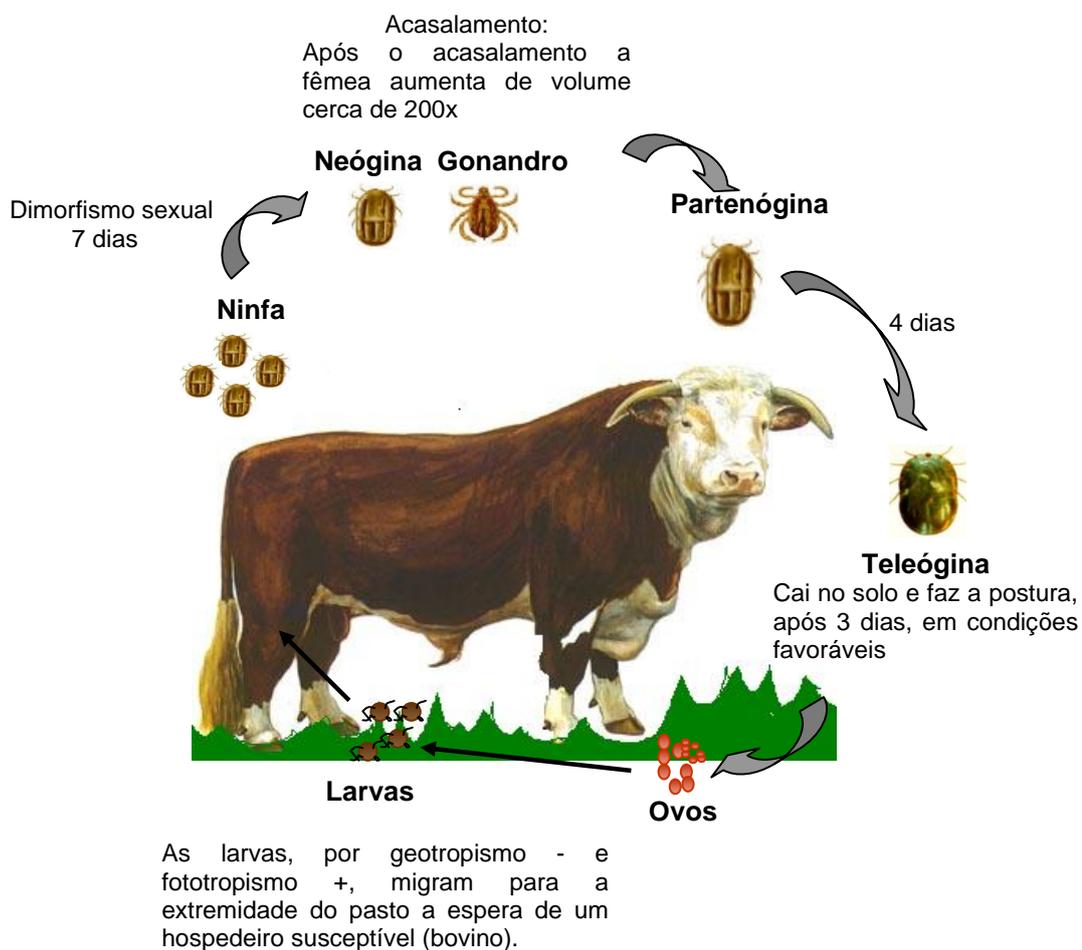
A infecção por *B. microplus* causa prejuízos de difícil mensuração, envolvendo perdas diretas e indiretas como mortalidade do gado, principalmente das raças européias; desenvolvimento lento dos animais parasitados, acarretando diminuição da produção de carne e leite; transmissão de agentes patogênicos; perdas na produção de couro; e gastos com produtos carrapaticidas (BITTENCOURT *et al.*, 1999).

ROCHA (2000), em uma revisão sobre os prejuízos causados pelos carrapatos aos bovinos, salientou que o desconforto causado pelos parasitos não permite que os bovinos realizem o pastejo, diminuindo sua taxa de conversão diária de alimento em carne/leite. A inoculação da saliva do carrapato na pele do boi também desencadeia uma reação alérgica com liberação de grande quantidade de histamina. Estas lesões, além de prejudiciais para a indústria do couro são portas de entrada para bactérias e larvas de mosca.

O ciclo biológico do carrapato *B. microplus*, mostrado na Figura 3, é completado pela passagem em apenas um hospedeiro e compreende duas fases; uma de vida livre, que se realiza no solo e dura em média 2 a 3 meses, dependendo das condições climáticas existentes, e outra de vida parasitária, que se realiza no corpo do animal, durando em média 22 dias. Nesta etapa, o carrapato apresenta três estágios de desenvolvimento: larva, ninfa e adulto. A larva infestante, ao entrar em contato com o bovino, fixa-se em regiões do corpo do hospedeiro tais como úbere região perianal, perineal, perivulvar e entrepernas. Inicialmente se alimenta de linfa e, em aproximadamente sete dias, dá-se a muda para o estágio de ninfa. Este por sua vez, permanece até que ocorra nova ecdise, para a diferenciação sexual, que ocorre, em média, após sete dias (GONZALES, 1995).

A fase não parasitária compreende os estágios de fêmea adulta (teleógina), ovo e larva não infestante. Após a diferenciação sexual, a fêmea inicia, no estágio adulto, o repasto sanguíneo. Após copular com o macho, aumenta o volume de sangue queingere o que resulta no aumento do seu peso corporal em até 200 vezes (VAZ JÚNIOR *et al.*, 2000).

O ciclo culmina com o desprendimento da fêmea ingurgitada do bovino em média aos 18 dias de infecção e sua queda ao solo ocorre geralmente ao amanhecer. O macho possui um tamanho 10 vezes menor que o da fêmea e, após a cópula, busca outras fêmeas para se acasalar. No solo, a fêmea ingurgitada procura um local protegido da luz solar para realizar a postura, que ocorre após dois ou três dias; cada fêmea coloca em torno de 3000 a 4000 ovos. A eclosão se dá após 18 dias, em condições de temperatura (26 – 27°C) e umidade (> 80%) adequadas. A larva migra por geotropismo negativo para a extremidade superior do pasto, onde localiza o hospedeiro pelo odor, pelas vibrações, pelo sombreamento, pelo fototropismo positivo e pelo gradiente de concentração de CO<sub>2</sub>, recomeçando assim a infecção. A fase de vida livre é bastante susceptível as interferências climáticas, trazendo alterações na duração de seus períodos que são especialmente afetados pela umidade e temperatura. Já a fase de vida parasitária possui período de duração praticamente constante em todas as regiões (GONZALES, 1995).



**Figura 3. Ciclo do carrapato *Boophilus microplus* em bovinos.**

### **1.3 Controle biológico do carrapato *Boophilus microplus* por *Metarhizium anisopliae***

O controle biológico pode ser definido como o uso de antagonistas naturais para diminuir a população de uma determinada praga que pode causar perdas na produção agrícola ou agropecuária quando presente em níveis elevados. O controle biológico pode ser completo, substancial ou parcial: no completo, somente a utilização de antagonistas naturais reduz permanentemente a população da praga para níveis aceitáveis; no substancial, ocorre a combinação com o tratamento químico, porém, com redução de até 75% no seu uso; e, no controle parcial, ocorre a redução na utilização de químicos em aproximadamente 50%. Existe um aumento crescente no interesse do setor industrial pelo estudo de candidatos para o controle biológico devido a alguns fatores como os problemas crescentes de resistência a drogas em combinação com os custos elevados para o desenvolvimento de novos produtos químicos e, principalmente, a crescente preocupação pública a respeito de resíduos químicos em produtos de origem animal e meio ambiente (GRONVOLD *et al.*, 1996).

O controle químico do carrapato com o uso de antiparasitários como organofosforados, imidinas e piretróides é o mais comum. Os organofosforados começaram a ser utilizados a partir dos anos 50. No início dos anos 70, foram introduzidos produtos do grupo das formamidinas e, ao final da década, os piretróides sintéticos (VAZ JUNIOR *et al.*, 2000).

O mercado mundial de defensivos agrícolas chega a valores próximos de US\$ 1,8 bilhão/ano, sendo os inseticidas e acaricidas responsáveis por 30% do total. Os

inseticidas a base de microrganismos entomopatogênicos ou bioinseticidas participam com apenas 1% do montante (ALMEIDA & FILHO, 2001).

O desenvolvimento de novas drogas para a substituição dos princípios ativos tem sido uma necessidade permanente devido ao aparecimento de populações resistentes. Além disso, este tipo de tratamento implica na presença de resíduos no leite e na carne, sendo esta uma situação não mais compatível com as exigências do mercado consumidor. Entretanto, o controle químico ainda é o mais usado nas criações de gado de leite e sistemas de produção de gado de corte, com ênfase naqueles em que a espécie usada é a *B. taurus*, principalmente por este tipo de controle proporcionar resultados diretos, rápidos e visíveis (CASTRO & NEWSON, 1993; MONTEIRO *et al.*, 1998).

A pesquisa de novas alternativas para o combate ao carrapato, como o desenvolvimento de vacinas e o controle biológico, vêm como uma alternativa para o controle carrapaticida, propiciando uma redução significativa do número populacional e respeitando a integridade do ambiente (ATHAYDE *et al.*, 2001). Em contrapartida ao uso de agrotóxicos, o controle biológico apresenta algumas vantagens, como seletividade de hospedeiros; capacidade de multiplicação no meio ambiente a partir de indivíduos da população; controle mais duradouro, podendo o patógeno permanecer por vários anos no ambiente; associação com inseticidas químicos em subdosagens, visando sinergismo; preservação do meio ambiente; e ausência de desenvolvimento de resistência à praga (SOUZA, 2001).

A utilização de microrganismos para o controle de *B. microplus* no Brasil já foi descrita. A infecção natural do carrapato pela bactéria *Cedecea lapagei* resulta na

degeneração do epitélio vaginal de fêmeas ingurgitadas, levando-as à morte (BITTENCOURT *et al.*, 1999).

CLARKSON & CHARNLEY (1996) citam que o potencial dos patógenos fúngicos para o controle de insetos praga na agricultura é reconhecido desde o final do século XIX, quando foi testada a aplicação de *Metarhizium anisopliae* contra o besouro do trigo *Anisopliae austriaca* e o curculicóide da beterraba *Cleonus punctiventris*. O estudo dos fungos como entomopatógenos, no Brasil, vem sendo descrito há mais de sessenta anos, porém, somente após 1964, com a ocorrência epizoótica de *M. anisopliae* em cigarrinhas da cana-de-açúcar é que se vislumbrou o seu potencial para o controle de pragas (ALVES, 1998).

Quando comparados aos outros sistemas disponíveis para o controle biológico como as bactérias, protozoários e vírus, os fungos apresentam como vantagem um mecanismo especializado de infecção que é ativo, não dependendo da sua ingestão para o início do processo infectivo (ALVES, 1998). Outra vantagem do seu uso para o controle biológico é a capacidade de multiplicação e dispersão no meio ambiente através de carrapatos infectados e presentes no solo, assumindo um caráter enzoótico, além da capacidade de causar epizootias em determinadas circunstâncias (MELO & AZEVEDO, 2000). O uso de fungos como entomopatógenos também é bastante interessante quando se considera a possibilidade de aplicação de técnicas de biologia molecular para alteração de algumas características entomopatogênicas (ROBERTS, 1989).

A maioria dos trabalhos descritos sobre a possibilidade do uso de *M. anisopliae* como biocontrolador foram desenvolvidos *in vitro*. Em 1998, MONTEIRO *et al.* observaram, em condições laboratoriais, uma alta mortalidade e uma redução em 70% na ovoposição de fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* infectadas com *M. anisopliae*. O

potencial acaricida deste entomopatógeno contra *B. microplus* também foi relatado por FRAZZON *et al.* (2000) e BITTENCOURT (2000), sendo descrita a capacidade de diferentes linhagens de provocarem alterações em estágios de desenvolvimento parasitário e estágios de vida livre como ovos e larvas não infestantes. A pulverização de esporos de *M. anisopliae* sobre pastagens ao longo de três aplicações sucessivas mostrou o efeito cumulativo da linhagem utilizada sobre larvas não alimentadas de *B. microplus*. A pulverização de uma suspensão com  $10^9$  esporos/mL no primeiro bioensaio apresentou um percentual de redução das larvas de 17,42, no segundo, 52,26 e, no terceiro, 53,78 (BITTENCOURT *et al.*, 2003).

Estudos realizados *in vivo* por CORREIA *et al.* (1998) evidenciaram que apesar de haver o desenvolvimento e esporulação do fungo nos carrapatos de bovinos estabulados, os índices de mortalidade obtidos em testes laboratoriais não se repetem provavelmente pelas alterações de umidade e temperatura que não se mantêm constantes no campo. A diminuição da eficiência do controle biológico por *M. anisopliae* em testes a campo foi também constatada, em 1999, por BITTENCOURT *et al.*, sendo a eficácia total média dos testes *in vitro* de 96,6% e, em animais naturalmente infestados por *B. microplus*, constatou-se uma diminuição de 53,5% na mortalidade de fêmeas ingurgitadas. Frente a estes resultados, foram sugeridos alguns fatores para a diminuição da eficiência acaricida nos testes *in vivo*, como a exposição dos bovinos às intempéries climáticas, sendo destacadas as chuvas, e a exposição dos esporos aos raios ultravioleta.

São necessárias grandes quantidades de partículas fúngicas infectivas durante longos períodos de tempo para que seja viável o seu emprego no controle biológico de pragas. Deve também ser considerada a relação do fungo com o meio ambiente,

evitando-se desequilíbrios ecológicos e, principalmente, se este não apresenta efeitos deletérios sobre a saúde humana. Justamente, a grande preocupação associada ao uso de agentes microbianos para o controle de pragas, seja ele em pequena ou grande escala, é o fato dos mesmos serem capazes de persistirem, multiplicarem-se, disseminarem-se no ambiente e causarem doenças epizoóticas em organismos benéficos, não-visados. No entanto, apesar das preocupações relacionadas ao uso dos biocontroladores, na prática, não se observa efeito prejudicial para organismos que não os hospedeiros-alvo (MELO & AZEVEDO, 2000).

O desenvolvimento de pesticidas biológicos fúngicos ainda é incipiente, devido a problemas relacionados à sobrevivência dos esporos no meio ambiente e a sua produção em larga escala. A eficiência da maioria dos fungos entomopatogênicos está relacionada a condições ambientais, principalmente à umidade (MCCOY & TIGANO-MILANI, 1992). Outro fator limitante para o emprego de fungos entomopatogênicos como biocontroladores é o tempo necessário para que ocorra a morte do hospedeiro-alvo, sendo este de aproximadamente cinco a dez dias pós-infecção (ST. LEGER *et al.*, 1996).

O emprego de *M. anisopliae* para o controle de outros carrapatos que não *B. microplus* tem sido descrito. BENJAMIN *et al.* (2002) avaliaram o seu efeito sobre o carrapato *Ixodes scapularis*, onde suspensões contendo  $4 \times 10^9$  esporos/mL do fungo causaram uma mortalidade de 95%, em ensaios laboratoriais, e de 53%, em estudos a campo. Os fungos entomopatogênicos são os maiores patógenos de carrapatos na natureza, devido a sua alta virulência, grande capacidade de dispersão e de sua habilidade em penetrar o hospedeiro de forma ativa, via cutícula. Frente a isto, GINDIN *et al.* (2002) testaram a patogenicidade de diferentes entomopatógenos sobre algumas espécies de carrapatos. As linhagens de *M. anisopliae* testadas induziram maior

mortalidade além de reduzirem a viabilidade dos ovos dos carrapatos. Cerca de 70 – 100% das larvas foram mortas com 4 – 7 dias de infecção e a mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *B. annulatus* e *Rhipicephalus sanguineus* atingiu 80 – 100%.

O emprego de inseticidas microbianos já está regulamentado em diversos países, inclusive no Brasil. As medidas prescritas por entidades normativas incluem o registro dos produtos e a avaliação da segurança em relação aos usuários, impactos no meio ambiente e implicações na saúde pública. Já existem formulações especiais de fungos registradas no Brasil como os produtos Metaquino, Metabiol e Biomax (ROBBS & BITTENCOURT, 1998) (Tabela 1).

**Tabela 1. Fungos entomopatogênicos comercializados ou em processo de comercialização utilizados no controle biológico de pragas (BUTT *et al.*, 2001).**

<b>Produto</b>	<b>Fungo</b>	<b>Alvo</b>	<b>Produtor</b>
Mycotal	<i>Verticillium lecanii</i>	Mosca branca	Koppert, Holanda
Vertalec	<i>V. lecanii</i>	Afídeos	Koppert, Holanda
Biogreen	<i>M. anisopliae</i>	Larva de escaravelho em pastagens	Biocare Technology, Austrália
Metaquino	<i>M. anisopliae</i>	Cigarrinhas	Brasil
Bio-Path	<i>M. anisopliae</i>	Gafanhotos	EcoScience, EUA
Bio-Blast	<i>M. anisopliae</i>	Cupins	EcoScience, EUA
Cobican	<i>M. anisopliae</i>	Cigarrinha da cana -de -açúcar	Probiagro, Venezuela
Conidia	<i>Beauveria bassiana</i>	Broca do café	Live Systems Technology, Colômbia
Ostrinil	<i>B. bassiana</i>	Broca do milho	Natural Plant Protection, França
Cornguard	<i>B. bassiana</i>	Broca do milho europeu	Mycotech, EUA
Mycotrol GH	<i>B. bassiana</i>	Gafanhotos	Mycotech, EUA
Mycotrol WP & Botanigard	<i>B. bassiana</i>	Mosca branca e afídeos	Mycotech, EUA
Naturalis-L	<i>B. bassiana</i>	Pragas do algodoeiro	Troy Biosciences, EUA
Proecol	<i>B. bassiana</i>	Lagarta	Probiagro, Venezuela
Boverin	<i>B. bassiana</i>	Besouro do Colorado	Antiga URSS
Boverol e Boverosil	<i>B. bassiana</i>	Besouro do Colorado	Antiga Tchecoslováquia
Engerlingspilz	<i>B. bassiana</i>	Besouros	Andermatt, Suíça
Schweizer	<i>B. brongniartii</i>	Besouros	Eric Schweizer, Suíça
Melocont	<i>B. brongniartii</i>	Besouros	Kwisda, Áustria
Green Muscle	<i>M. flavoviride</i>	Gafanhotos	CABI Bioscience, UK
PFR-97	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Mosca branca	ECO-Tek, EUA
Pae-Sin	<i>P. fumosoroseus</i>	Mosca branca	Agrobionsa, México
Laginex	<i>Lagenidium giganteum</i>	Larvas de mosquito	AgraQuest, EUA

#### 1.4 Processo de infecção

A cutícula de artrópodes é composta basicamente de duas camadas: a epicutícula e a procutícula. A epicutícula é uma camada delgada formada por proteínas cobertas por ácidos graxos, lipídeos e esteróis. A procutícula compõe a maior parte da cutícula e possui fibrilas de quitina embebidas em uma matriz protéica juntamente com lipídeos e quinonas (KANG *et al.*, 1999).

Os conídios produzidos durante a reprodução assexuada do fungo são liberados no meio ambiente e, quando em contato com hospedeiros suscetíveis, como o carrapato do boi, iniciam o processo de infecção (SHAH & PELL, 2003). Primeiramente, ocorre uma interação hidrofóbica entre a cutícula e os conídios, seguida da secreção de uma camada de muco adesiva ao redor das estruturas fúngicas (HEGEDUS & KHACHATOURIANS, 1995; MENDGEN *et al.*, 1996; BIDOCHKA *et al.*, 1997). A penetração do fungo inicia efetivamente com a diferenciação das extremidades das hifas para a formação de uma estrutura denominada de apressório. Acredita-se que a diferenciação seja estimulada por baixos níveis de complexos nitrogenados e também pelo catabolismo de componentes carbônicos. CLARKSON & CHARNLEY (1996) comentam que a formação desta estrutura de penetração também pode ser influenciada por condições topográficas, onde o apressório se forma somente após extenso crescimento sobre pregas da superfície do hospedeiro.

Vários trabalhos descrevem o envolvimento de fatores como pressão mecânica e degradação enzimática do tegumento durante a penetração, sendo a formação do apressório fundamental nas etapas iniciais (CLARKSON & CHARNLEY, 1996; BIDOCHKA *et al.*, 1997). BIDOCHKA *et al.* (1997) citam que o processo de infecção de

*M. anisopliae* em gafanhotos e cupins já foi estudado com o auxílio de técnicas de microscopia, com as quais foi possível observar a presença de depressões superficiais e zonas de hidrólise em alguns pontos de penetração, indicando, assim, o envolvimento de pressão mecânica e degradação enzimática.

Devido ao grande potencial de *M. anisopliae* como biocontrolador de *B. microplus*, a análise do processo de penetração cuticular nas etapas iniciais da infecção tem sido alvo de grande interesse por parte do meio científico, resultando no emprego de técnicas cada vez mais apuradas como a microscopia eletrônica de varredura (MEV) para o seu entendimento. BITTENCOURT *et al.* (1999), através de exame em microscópio eletrônico de varredura, descreveram pela primeira vez o processo de penetração do fungo *M. anisopliae* em carrapatos. A penetração ativa do fungo via cutícula foi confirmada pela adesão e germinação dos esporos sobre a cutícula, início da dilatação do tubo germinativo e formação do apressório aos três dias de infecção. Neste estudo também foi demonstrado que, ao contrário do que acontece no processo de infecção de outros insetos, não é verificada penetração inicial através dos sistemas reprodutor, digestivo e respiratório.

ARRUDA *et al.* (2005), também utilizaram MEV e observaram que no primeiro dia de infecção a maioria dos conídios está aderida à superfície do *B. microplus*, momento no qual já se inicia a penetração cuticular, sendo possível aos dois dias a visualização de hifas sob a superfície da cutícula do carrapato. Também foi verificado que, semelhantemente ao processo de infecção em insetos, no carrapato também ocorre a interação entre pressão mecânica e degradação enzimática para a transposição da cutícula devido a visualização de pequenas depressões no ponto de penetração do

apressório, pela deformação cuticular e diferenciação morfológica das extremidades das hifas as quais parecem perder a definição da parede celular.

Uma vez atravessada a cutícula, as hifas se tornam espessas e formam blastosporos, os quais nutrem o fungo com a degradação das fontes de carbono presentes na hemolinfa do hospedeiro. Durante o desenvolvimento de *M. anisopliae* passam a ser produzidos pelo fungo metabólitos secundários como ácido cítrico e oxálico e também toxinas (BIDOCHKA *et al.*, 1997). A morte do hospedeiro geralmente é verificada 3 a 7 dias após a infecção. Neste período as hifas emergem sobre a cutícula e, em condições adequadas de temperatura e umidade esporulam (SHAH & PELL, 2003) (Figura 4).

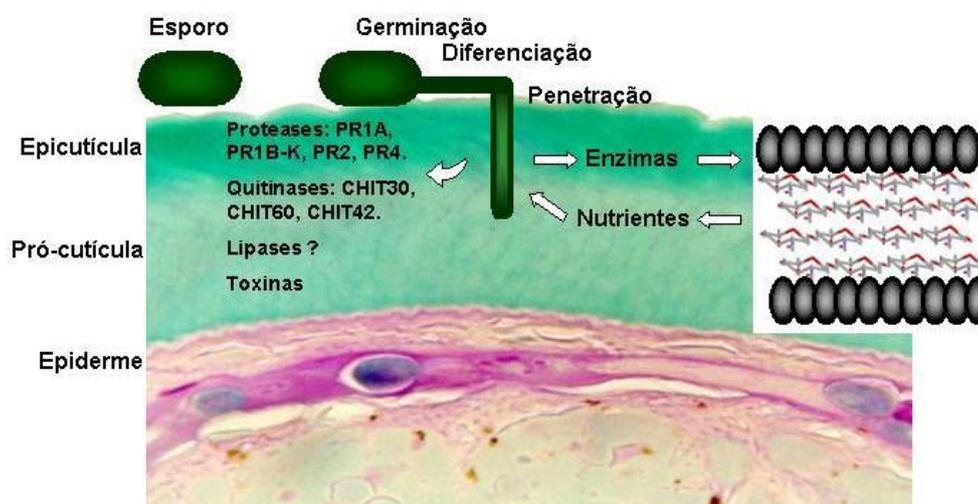


Figura 4. Modelo do mecanismo de penetração do fungo *Metarhizium anisopliae* em *Boophilus microplus* (SCHRANK, A., comunicação pessoal).

A produção de enzimas que degradam a cutícula durante a penetração do hospedeiro é bastante estudada. O fungo *M. anisopliae* produz uma série de enzimas hidrolíticas como proteases, quitinases e lipases (ST. LEGER *et al.*, 1986; ST LEGER *et al.*, 1989; ST. LEGER *et al.*, 1993; ST. LEGER *et al.*, 1998; COLE *et al.*, 1993; BARATTO *et al.*, 2003; MORAES *et al.*, 2003; BARRETO *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2004). Algumas das primeiras enzimas produzidas pelo fungo no momento da penetração, concomitantemente com a diferenciação da porção terminal da hifa em apressório são as endoproteases e aminopeptidases. A secreção de proteases e quitinases pelo entomopatógeno é fundamental para o sucesso da penetração. *M. anisopliae* produz várias enzimas quitinolíticas, a linhagem E<sub>6</sub> produz pelo menos duas enzimas com capacidade de degradar quitina (PINTO *et al.*, 1997; BOGO *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2004). Bogo *et al.* (1996) clonaram o gene *chit1*, que codifica uma enzima com massa molecular estimada de 42kDa.

Outra quitinase, a CHIT 30, purificada por PINTO *et al.* (1997), é codificada pelo gene *chi3* e expressa em meios contendo quitina, carapaça 1% e NAG em baixas concentrações (0,2%) e é reprimida por glicose e NAG 1%. A sua participação no processo de infecção de *M. anisopliae* em *B. microplus* foi avaliada por análises imunohistoquímicas. A utilização de soro anti-CHIT 30 em cortes de teleóginas infectadas com a linhagem E<sub>6</sub> mostrou a presença desta enzima 48h pós-inoculação com aumento na marcação após 72h (SILVA *et al.*, 2004).

As proteases desempenham papel adicional fornecendo nutrientes para o desenvolvimento do fungo antes, durante e após a penetração e as quitinases, são requeridas em curto espaço de tempo e agem somente após degradação da matriz protéica cuticular (ST. LEGER *et al.*, 1998). Uma das proteases mais importantes

secretadas por *M. anisopliae* durante a infecção de insetos é a PR1 (PR1A). A sua inserção em múltiplas cópias no genoma de *M. anisopliae* sob o controle de um promotor constitutivo aumentou a patogenicidade das linhagens transformadas a *Manduca sexta* (ST. LEGER *et al.*, 1996).

O papel da protease PR1A na infecção de *B. microplus* ainda não está esclarecido, a construção de transformantes superexpressando esta enzima não pareceram ter a patogenicidade alterada em bioensaios (FRANCESCHINI, manuscrito em preparação) sugerindo o envolvimento de outras proteases na penetração do entomopatógeno no carrapato do boi.

A utilização da técnica de análise de diferenças representacionais (RDA) para a análise de diferenças entre populações de mRNA foi recentemente descrita por DUTRA *et al.* (2004). Foram confrontados cultivos do fungo *M. anisopliae* em meio contendo como fonte de carbono glicose e outro suplementado com cutícula de *B. microplus*. Entre as seqüências deduzidas de aminoácidos de genes diferencialmente expressos no cultivo do fungo em meio contendo cutícula estão o da protease *pr1C* de *M. anisopliae*, um gene envolvido no metabolismo energético, o da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gapdh*) e um fragmento que codifica uma proteína com homologia a uma  $\alpha$ -1,3 glicanase de *Trichoderma harzianum*.

FREIMOSER *et al.* (2003) salientam que, com exceção das proteases, pouco se sabe sobre os fatores de virulência envolvidos na morte de insetos-alvo. Buscando justamente um maior entendimento destes determinantes de patogenicidade, foi feita a comparação de seqüências de ITS de duas variedades de *M. anisopliae*, *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum*, obtidas a partir de bancos de cDNA

construídos a partir dos fungos cultivados em meio suplementado com cutículas de inseto. A variedade *acridum* expressa em maior quantidade genes envolvidos com a síntese e degradação de paredes celulares, metabolismo de carboidratos, resposta a estresse, detoxificação e transporte transmembrana, em comparação com a variedade *anisopliae*; já esta, parece mobilizar um número maior de genes relacionados à síntese de metabólitos tóxicos, controle do ciclo e crescimento celulares, além das proteases do tipo tripsina e subtilisinas.

Estudos anteriores realizados por COSTA (2003) evidenciaram a secreção de enzimas do tipo  $\beta$ -1,3 glicanase por *M. anisopliae* quando cultivado em diferentes meios de cultura. Cultivos do fungo por 72h com suplementação de glicose a cada 24h não se mostraram eficientes para a produção da enzima. Porém, quando feito o cultivo em meio contendo cutícula do carrapato *B. microplus*, evidenciou-se um aumento de 97 vezes da sua secreção pelo entomopatógeno, sugerindo que a regulação da expressão de  $\beta$ -1,3 glicanase em *M. anisopliae* pode ser influenciada pela possível presença de  $\beta$ -1,3-glicanas na cutícula do carrapato.

### 1.5 $\beta$ -1,3-glicanas e $\beta$ -1,3-glicanases

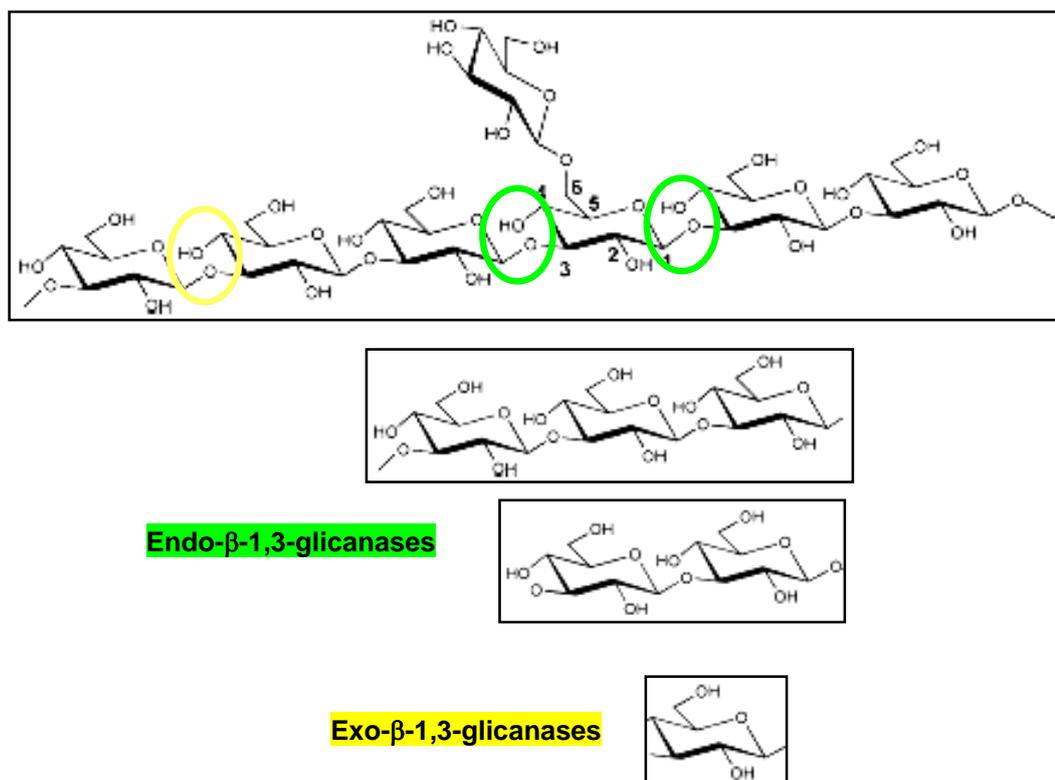
$\beta$ -glicanas são a classe mais abundante de polissacarídeos naturais devido à ocorrência da  $\beta$ -1,4-glicana, a celulose. Entretanto, muitas outras  $\beta$ -glicanas são produzidas tanto por fontes microbianas como não-microbianas. Enzimas de fungos que degradam  $\beta$ -glicanas não celulolíticas foram descritas pela primeira vez na década de sessenta por Reese & Chesters (*appud* PITSON, 1993).

$\beta$ -glicanas são homopolímeros de *D*-glicose ligadas em uma configuração  $\beta$ . Algumas são moléculas relativamente simples, consistindo de cadeias lineares de resíduos de glicosila unidos por ligações simples, enquanto outros são mais complexos e podem ser unidos por uma variedade de ligações tanto na forma linear quanto na ramificada (PITSON, 1993). Os polímeros de *D*-glicose ligados em uma configuração  $\beta$ -1,3 e arranjados em forma de hélice com poucas ramificações do tipo  $\beta$ -1,6 são também chamados de laminarina (COHEN-KUPIEK *et al.*, 1999).

Muitos fungos sintetizam  $\beta$ -glicanas intracelularmente e citoplasmicamente. No entanto, alguns pesquisadores ressaltam o seu papel como constituinte principal da parede celular, sendo esta importante para a sua estrutura (PITSON, 1993). As  $\beta$ -glicanas encontradas nas paredes celulares dos fungos são compostas, predominantemente, por glicanas do tipo  $\beta$ -1,3 ligadas a glicanas com ramificações de ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,6 (LA CRUZ & LLOBELL, 1999). COHEN-KUPIEK *et al.* (1999) reportaram que as paredes celulares dos fungos são constituídas por mais de 60% de laminarina ficando suas fibrilas distribuídas de forma amorfa por entre as camadas de quitina. Existem ligações químicas entre as glicanas e a quitina que, juntas, formam uma rede complexa de glicanas e oligômeros de *N*-acetilglicosamina.

Além da participação na manutenção da parede celular e proteção da célula, as  $\beta$ -glicanas também desempenham outras funções, dependendo da sua natureza e localização no interior das células. Acredita-se que possam ser degradadas e usadas como fonte nutricional em determinadas situações como as em que as fontes de energia externa são escassas ou quando são necessárias modificações na conformação celular, como na morfogênese (PITSON, 1993).

As  $\beta$ -1,3 glicanases hidrolisam as ligações O-glicosídicas das  $\beta$ -1,3-glicanas e são classificadas de acordo com o seu modo de ação. As exo- $\beta$ -1,3-glicanases (EC 3.2.1.58) degradam seqüencialmente resíduos da extremidade não-redutora da molécula, tendo como único produto a glicose, enquanto que as endo- $\beta$ -1,3-glicanases (EC 3.2.1.39) são capazes de hidrolisar ligações  $\beta$ -1,3 internas em pontos aleatórios da cadeia polissacarídica, liberando pequenos oligossacarídeos (PITSON, 1993; DE LA CRUZ *et al.*, 1995; KULMINSKAYA *et al.*, 2001). PITSON (1993) ainda descreve a existência de  $\beta$ -glicanases fúngicas com a capacidade de liberar glicose, dissacarídeos e oligossacarídeos maiores de  $\beta$ -glicanas, agindo sinergisticamente como endo e exoglicanases (Figura 5).



**Figura 5. Estrutura química da  $\beta$ -1,3-glicana (laminarina) e modo de ação das  $\beta$ -1,3-glicanases.** Os círculos delimitam ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,3. O círculo amarelo indica o alvo das exo- $\beta$ -1,3-glicanases gerando como produto de hidrólise a glicose e, os em verde, das endo- $\beta$ -1,3-glicanases que liberam pequenos oligossacarídeos.

PITSON (1993) comenta que a maioria das  $\beta$ -1,3-glicanases descritas é extracelular e que a secreção parece ser semelhante à das outras enzimas extracelulares secretadas. Após a síntese, são imediatamente empacotadas em vesículas derivadas do retículo endoplasmático e migram para a membrana

citoplasmática, fusionando-se à mesma e liberando o seu conteúdo no espaço periplasmático, entre a membrana e a parede celular. A passagem subsequente através da parede celular depende da porosidade da parede e do tamanho da enzima. Em alguns fungos, as  $\beta$ -glicanases ficam retidas no espaço periplasmático onde podem desempenhar várias funções, incluindo a mobilização de  $\beta$ -glicanas da parede celular. As  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6-glicanases fúngicas também podem ser retidas no citoplasma em vesículas, as quais, nos fungos filamentosos, estão usualmente localizadas apicalmente em locais adjacentes a regiões de ramificações das hifas, estando estas enzimas envolvidas na extensão das mesmas.

A síntese de várias enzimas com atividade de  $\beta$ -glicanase por um único organismo é comum nos fungos. As  $\beta$ -glicanases têm sido extensivamente estudadas em vários fungos e isto resultou não só no aumento do conhecimento sobre o modo de operação e regulação destas enzimas, como também mostrou a vasta variedade de propriedades fisicoquímicas deste grupo enzimático. As massas moleculares das  $\beta$ -glicanases fúngicas parecem variar consideravelmente não somente entre organismos, mas também em um mesmo organismo. A faixa comum varia de 20.000 a 80.000 Daltons com algumas exceções.  $\beta$ -glicanases fúngicas da mesma ou de diferentes fontes também mostraram variações em seu ponto isoelétrico, variando entre 4,0 e 8,0 nos fungos filamentosos. A atividade enzimática parece ser melhor em pHs ácidos entre 4,0 e 6,0 embora possam existir variações (PITSON, 1993).

A laminarina é hidrolisada principalmente por  $\beta$ -1,3-glicanases, que são enzimas amplamente distribuídas entre bactérias, fungos e vegetais superiores (COHEN-KUPIEK *et al.*, 1999). Estas enzimas são produzidas por fungos filamentosos e leveduras,

possivelmente em consequência da ampla disponibilidade de substrato, principalmente os que compõem a célula fúngica (PITSON, 1993). Em 2000, SUN *et al.*, descreveram pela primeira vez a existência de uma  $\beta$ -glicanase codificada por um vírus e, ao contrário do que se imaginava, a enzima não parece ter participação na degradação da parede celular de seu hospedeiro durante a infecção viral.

Espécies do gênero *Trichoderma* são utilizadas como micoparasitas contra vários fitopatógenos. Na interação micoparasitária, *Trichoderma harzianum* interage com o fungo hospedeiro e secreta enzimas líticas, como quitinases, glicanases e proteases, as quais são importantes no processo de penetração, pois degradam as paredes celulares do mesmo (COHEN-KUPIEC *et al.*, 1999; NORONHA & ULHOA, 2000). Em *T. harzianum*, as maiores atividades de enzimas do tipo glicanase são detectadas quando o micopatógeno é cultivado em meios contendo como única fonte de carbono parede celular, provavelmente, devido à alta concentração de  $\beta$ -glicana presente no substrato.

Vários trabalhos têm descrito a produção de glicanases neste fungo, sendo este um sistema complexo, onde são descritas pelo menos quatro diferentes enzimas: duas  $\beta$ -1,3-glicanases, com massas moleculares de 29 e 36 kDa (NORONHA e ULHOA, 2000; NORONHA *et al.*, 2000); uma exo- $\beta$ -1,3-glicanase, com 110 kDa (COHEN-KUPIEC *et al.*, 1999), e uma endo- $\beta$ -1,3-glicanase, com 78 kDa (DE LA CRUZ *et al.*, 1995). Acredita-se que a produção de glicanases nos fungos seja de forma constitutiva, embora tenha sido descrita a síntese em *T. harzianum* de outras controladas por mecanismos regulatórios, como indução e repressão catabólica (RAMOT *et al.*, 2000).

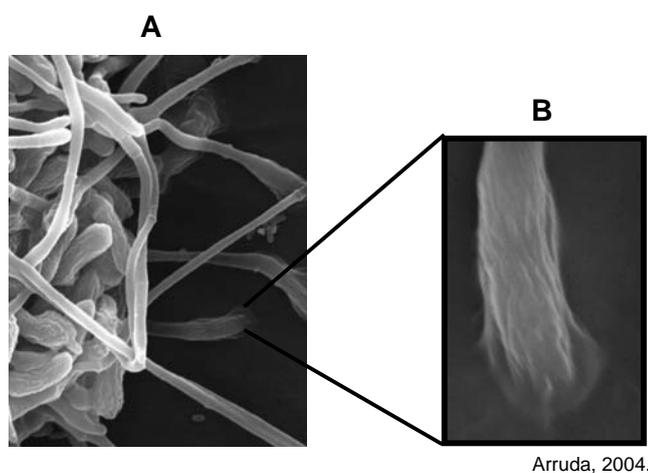
Muito pouco se sabe a respeito dos genes destas enzimas, se elas são produto de genes diferentes ou se somente diferentemente processadas a partir de um mesmo

gene. Somente dois genes de  $\beta$ -1,3-glicanases foram seqüenciados em *T. harzianum*, *bgn13.1* (DE LA CRUZ *et al.*, 1995) e *lam1.3* (COHEN-KUPIEK *et al.*, 1999). O primeiro codifica uma endo- $\beta$ -1,3-glicanase de 78kDa e a comparação da sua seqüência de aminoácidos com a de outras glicanases disponíveis em bancos de dados não mostrou homologia com  $\beta$  e nem com  $\alpha$ -glicanases tendo esta maior relação com celulases. O gene *lam1.3* codifica uma proteína madura de 110kDa, a LAM1.3. A análise da seqüência predita de aminoácidos com a de outras proteínas disponíveis em bancos de dados revelou uma maior homologia com a glicanase EXGI de *Cochliobolus carborum* do que com a outra glicanase (endo- $\beta$ -1,3 glicanase BGN13.1) de *T. harzianum* descrita.

A aplicação de enzimas hidrolíticas, mais especificamente de glicanases, em processos biotecnológicos é bastante promissora. Uma das aplicações mais estudadas é a do seu emprego como antifúngico vegetal, justamente devido a sua capacidade de degradar paredes celulares, incluindo as dos fitopatógenos. São também empregadas para a produção de  $\beta$ -glicanas, as quais são utilizadas industrialmente como estabilizantes, floculantes, geilificantes, emulsificantes (PITSON, 1993) e, mais recentemente, a sua utilização como imuno-estimulantes (HONG *et al.*, 2002). Podem ser empregadas na fabricação de bebidas, como vinho e cerveja, para o auxílio nos processos fermentativos e nas etapas de clarificação e filtração (PITSON, 1993).

Finalmente, a descoberta do envolvimento de glicanases com as leveduras de biótipo *killer* tem gerado interesse na produção de microrganismos modificados positivamente para esta característica vislumbrando o seu emprego em processos fermentativos, devido à geração de linhagens resistentes a contaminações e, na indústria de alimentos, como biocontroladores (IZGÜ & ALTIMBAY, 2004).

Até o presente, não existe a descrição de nenhuma enzima do tipo  $\beta$ -glicanase em *M. anisopliae*. Porém, em estudos anteriores, verificou-se a sua presença em cultivos do fungo em diferentes fontes de carbono (COSTA, 2003). Trabalhos desenvolvidos com a finalidade de estudar o processo de infecção do carrapato do boi pelo entomopatógeno *M. anisopliae* por MEV demonstraram o surgimento de modificações em algumas das extremidades das hifas, as quais estavam penetrando no parasita (Figura 6). Ainda, aliado a isto, foi detectado um segmento de cDNA correspondente a uma  $\text{exo-}\beta\text{-1,3-}$ glicanase pela técnica de RDA em cultivos de *M. anisopliae* em meio contendo cutícula como fonte de carbono. Estes dados experimentais sustentam a hipótese de que esta classe de enzimas poderia desempenhar algum papel durante o processo de infecção de *M. anisopliae* no carrapato *B. microplus*.



Arruda, 2004.

**Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura de *M. anisopliae* infectando a cutícula de *B. microplus*.** (A) Crescimento sobre a cutícula do carrapato com dois dias de infecção. 4500 X. (B) Detalhe demonstrando a alteração na extremidade das hifas que penetram no carrapato *B. microplus*. 14000 X.

**Tabela 2. Características das  $\beta$ -1,3-glicanases produzidas por diferentes microrganismos.**

Microrganismo	Enzima	Gene	MW	T	pH	Referências
	$\beta$ -1,3-glicanase	ND	29	50	4,4	Noronha & Ulhoa, 2000.
<i>T. harzianum</i>	endo- $\beta$ -1,3-glicanase	ND	36	ND	ND	Noronha <i>et al.</i> , 2000.
	endo- $\beta$ -1,3-glicanase	ND	74	60	4,5	El-Katani <i>et al.</i> , 2001.
	endo- $\beta$ -1,3-glicanase	<i>bgn13.1</i>	66	40	8,0	De La Cruz <i>et al.</i> , 1995.
	exo- $\beta$ -1,3-glicanase	<i>lam1.3</i>	110	ND	ND	Cohen-Cupiec <i>et al.</i> , 1999.
<i>T. asperellum</i>	exo- $\beta$ -1,3-glicanase	ND	83,1	55	5,1	Bara <i>et al.</i> , 2003.
<i>Sclerotium glucanicum</i>	endo- $\beta$ -1,3-glicanase	ND	85	55	4,7	
	exo- $\beta$ -1,3-glicanase	ND	78	55	4,5	Rapp, 1992.
	exo- $\beta$ -1,3-glicanase	ND	33,5	70	4,3	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	exo- $\beta$ -1,3-glicanase	<i>gp29</i>	29	ND	ND	Klebl & Tanner, 1989.
	exo- $\beta$ -1,3-glicanase I e II	<i>exgl</i>	47	ND	ND	Larriba <i>et al.</i> , 1995.
<i>Bacillus circulans</i>	$\beta$ -1,3-glicanase	<i>glcA</i>	72	ND	ND	Yahata <i>et al.</i> , 1990.
Vírus PBCV-1	endo- $\beta$ -1,3-glicanase	<i>A94I</i>	41	65	8	Sun <i>et al.</i> , 2000.

MW, massa molecular

T, temperatura ótima de atividade em graus Celsius

ND, Não determinado

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a possível participação de  $\beta$ -1,3-glicanases no processo de infecção de *Metarhizium anisopliae*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de diferentes fontes de carbono na atividade de  $\beta$ -1,3-glicanases por *M. anisopliae*;

- Purificar e caracterizar  $\beta$ -1,3-glicanases produzidas por *M. anisopliae*;

- Caracterizar a presença de genes que codificam  $\beta$ -1,3-glicanases em *M. anisopliae*.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MEIOS E SOLUÇÕES

##### 3.1.1 Meio BDA (Ágar-Batata)

Glicose	2% (p/v)
Caldo de batata cozida	20% (v/v)
Ágar	1,5% (p/v)

Completar com água destilada para 100mL e ajustar para pH 6,0.

Autoclavar a 120<sup>0</sup>C, durante 20min.

##### 3.1.2 Meio TLE

Peptona	0,1% (p/v)
Uréia	0,03% (p/v)
(NH) <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	0,14% (p/v)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2% (p/v)
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,03% (p/v)
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,02% (p/v)

Completar com água para 100mL e ajustar para pH 5,0.

Autoclavar 120<sup>0</sup>C, durante 20min.

Adicionar assepticamente:

Elementos-traço	0,1% (v/v)
-----------------	------------

### 3.1.3 Meio de Cove Completo (MCc)

Nitrato de sódio	0,6% (p/v)
Glicose	1% (p/v)
Extrato de levedura	0,05% (p/v)
Peptona	0,2% (p/v)
Caseína hidrolisada	0,15% (p/v)
Ágar	2% (p/v)

Completar com água destilada para 100mL e ajustar o pH para 6,0 com NaOH

1M.

Autoclavar 120<sup>0</sup>C, durante 20min e adicionar assepticamente:

Solução de sais 2% (v/v)

Solução de elementos-traço 0,04% (v/v)

### 3.1.4 Solução de Sais

KCl	2,6% (p/v)
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2,6% (p/v)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,6% (p/v)

### 3.1.5 Solução de elementos-traço

Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,004% (p/v)
FeSO <sub>4</sub>	0,001% (p/v)
MnSO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,08% (p/v)
NaMnO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,08% (p/v)
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,08% (p/v)

Adicionar HCl concentrado até a dissolução e completar com água destilada para 100mL.

### **3.1.6 Tampão de extração – TEX**

Tris-HCl pH 7,5	0,2M
NaCl	0,5M
EDTA	0,01M
SDS	1% (p/v)

## **3.2 MICRORGANISMOS**

O microrganismo utilizado para o desenvolvimento dos experimentos foi o fungo filamentoso *Metarhizium anisopliae* (METSCH) SOROKIN, linhagem E<sub>6</sub>, originalmente isolado de *Deios flavopicta* (Homoptera, Cercopidea), no Espírito Santo. A linhagem foi cedida pelo Professor João Lúcio de Azevedo, da Escola Superior de Agricultura Luis de Queirós (ESALQ-USP), Piracicaba.

### **3.2.1 Manutenção da Linhagem E<sub>6</sub> de *Metarhizium anisopliae***

As culturas de *M. anisopliae* foram mantidas a partir da semeadura em ponto de esporos do fungo em placas de Petri com Meio de Cove completo (MCc). As placas foram incubadas a 28<sup>o</sup>C até a esporulação com posterior estocagem em refrigerador a 4<sup>o</sup>C. Para o preparo das suspensões de esporos as culturas foram repicadas em estrias em meio MCc sólido e incubadas em estufa a 28<sup>o</sup>C até a esporulação. Com auxílio de uma alça de Drigalsky, os esporos foram ressuspensos em 5mL de solução de Tween

80 (0,1% , v/v) transferidos com pipeta de Pasteur para um tubo e centrifugados a 12000rpm por 10min. O sedimento de esporos foi lavado com água destilada e recentrifugado. Para obtenção de suspensão-estoque, adicionou-se aos esporos 2mL de solução de glicerol 10% (v/v). Todas as soluções e vidraria utilizadas para a confecção da suspensão foram anteriormente esterilizadas em autoclave.

### **3.2.2 Linhagem de *Rhizoctonia solani***

A manutenção da linhagem de *R. solani* utilizada foi feita pela passagem de uma porção do meio de cultivo com a linhagem para placas de Petri contendo o meio Ágar-Batata (BDA) e posterior incubação em estufa a 28<sup>o</sup>C, por 4 dias. Após o crescimento, as placas foram acondicionadas em refrigerador a 4<sup>o</sup>C.

### **3.3 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PAREDE CELULAR DE *Rhizoctonia solani***

A produção de parede celular foi realizada segundo o protocolo de MITCHEL & TAYLOR (1969). O repique de 5 discos (5mm diâmetro) de micélio de *R. solani* cultivado em BDA foram transferidos para um erlenmeyer (1L) contendo 300mL de BDA líquido. Após 4 dias de incubação em agitador, a 140rpm e 28<sup>o</sup>C, a cultura foi transferida para fermentador com 10L do mesmo meio e incubada por 5 dias. O micélio foi coletado por filtração em papel filtro Whatman #1, congelado e liofilizado. O material previamente congelado foi submetido ao congelamento com nitrogênio líquido e triturado com gral e pistilo até a formação de um pó fino; foi, então, ressuspenso em solução de uréia 8M (p/v), sonificado cinco vezes, por 30seg e incubado a temperatura ambiente, por 20min.

Decorrida a incubação, as amostras foram centrifugadas por 10min a 5000rpm e o sedimento lavado com água destilada. O produto foi ressuspendido em hidróxido de amônio 1M (v/v), sonicado duas vezes por 30seg e novamente centrifugado e lavado. O sedimento sofreu, ainda, sonicação por três vezes de 30seg, em solução de ácido fórmico 500mM, seguida de centrifugação e lavagem com água destilada. A parede celular obtida foi congelada e liofilizada para utilização como fonte única de carbono na multiplicação de *M. anisopliae*.

### **3.4 PREPARAÇÃO DE CUTÍCULA DE *Boophilus microplus***

As cutículas foram obtidas de teleóginas ingurgitadas do carrapato *B. microplus*. Foi feito corte na extremidade posterior dos carrapatos e feita secção medial total, partindo o ácaro em duas partes. As cutículas foram lavadas extensivamente e o sangue retirado por esmagamento. Depois de limpas, as cutículas foram esterilizadas em autoclave a 120°C por 20min e mantidas a 4°C para posterior utilização como fonte única de carbono nos meios suplementados com carapaça.

### **3.5 CULTIVO DE *Metarhizium anisopliae* PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE $\beta$ -1,3 GLICANASES**

#### **3.5.1 Cultivos de *Metarhizium anisopliae* em diferentes fontes de carbono**

Para a verificação da produção de enzimas do tipo  $\beta$ -1,3 glicanases por *M. anisopliae*, foi feito o seu cultivo em meio TLE suplementado com as diferentes fontes de carbono descritas a seguir:

- Glicose: 1% e 0,5%;
- N-acetilglicosamina (NAG) 1 e 0,5%;
- Quitina 0,5%;
- Cutícula de *B. microplus* 0,5%;
- Parede celular de *R. Solani* 0,5%.

O inóculo constou de suspensões de esporos na concentração de  $1 \times 10^6$  esporos/mL. Os cultivos foram mantidos a 28°C em agitador, com agitação de 120rpm.

Após o cultivo do fungo, foi feita a filtração do micélio em papel filtro (Whatman #1). O sobrenadante das culturas foi coletado e dialisado contra água por 24h a 4°C, para posterior análise da fração protéica secretada.

#### **3.5.1.1 Efeito da glicose na secreção de $\beta$ -1,3-glicanases por *M. anisopliae***

O efeito da glicose na secreção de  $\beta$ -1,3-glicanases por *M. anisopliae* foi verificado em cultivos do fungo em meio TLE com glicose 0,5%, no qual, após, 24h, foi feita uma adição extra da fonte de carbono na mesma concentração inicial (0,5%). Os cultivos foram incubados por sete dias a 28°C em agitador com rotação constante de 120rpm. O acompanhamento da secreção protéica total e da atividade enzimática foi feito em amostras do sobrenadante dos cultivos coletados com 6,12,24,36,48,72,96,120,144 e 168hs. As amostras coletadas foram dialisadas contra água destilada durante 12h e, posteriormente, mantidas a -20°C.

### 3.5.1.2 Detecção de $\beta$ -1,3-glicanases não secretadas

Os micélios de cultivos de *M. anisopliae* com três e cinco dias em meio TLE suplementado com as diferentes fontes de carbono citadas no item 3.5.1 foram utilizados para a análise da atividade de  $\beta$ -1,3-glicanases. Após o cultivo do fungo, foi feita a filtração do micélio em papel filtro (Whatman #1), este foi lavado com água destilada estéril, congelado e liofilizado. As amostras foram pesadas para obtenção da massa seca total e maceradas com nitrogênio líquido, até a sua pulverização, ressuspendidas em 25mL tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0 e centrifugadas a 7000rpm por 15min. O sobrenadante das amostras foi coletado e utilizado nos procedimentos analíticos como sendo a fração intracelular solúvel.

### 3.5.2 Cultivos em grande escala

A produção de glicanases foi realizada pelo cultivo de *M. anisopliae* em fermentador (*New Brunswick MF 14*) com capacidade para 10L em meio TLE suplementado com parede celular de *R. solani*, ou com NAG 0,5%. O inóculo para fermentação foi obtido a partir da inoculação prévia de  $1 \times 10^6$  esporos/mL do fungo em frasco Erlenmeyer contendo 300mL do meio anteriormente citado e incubação em agitador, a 120rpm, a 28°C, por 48h. A determinação do tempo necessário de cultivo para a produção de glicanases foi feita com o acompanhamento das fermentações pela coleta de amostras e detecção da atividade enzimática (conforme item 3.6) de 24 em 24h por um período de 5 dias.

### 3.6 ATIVIDADE DE $\beta$ -1,3-GLICANASE

A atividade da enzima foi verificada pela medida da quantidade de açúcar redutor liberado a partir do substrato laminarina. Foi feita a adição de 50 $\mu$ L da enzima a 100 $\mu$ L do substrato (solução de laminarina 0,25% em tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0) (NORONHA & ULHOA, 1996). Após incubação por 1h a 40°C a reação foi interrompida com a adição de 1mL de DNS (Ácido 2,5-dinitrossalicílico) (MILLER, 1959) e aquecida em água fervente por 3min. A atividade enzimática foi estimada em espectrofotômetro (550nm) pela liberação de açúcares redutores. A curva padrão foi preparada utilizando-se glicose. Uma unidade (U) da enzima foi definida como sendo a quantidade necessária para a produção de 1 $\mu$ M de açúcar redutor por minuto.

### 3.7 ANÁLISE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Foi utilizado o sistema *Mini-Protean II Electrophoresis Cell* (BioRad) para a montagem e eletroforese dos géis, seguindo os procedimentos do fabricante. As proteínas secretadas foram submetidas à análise em gel desnaturante de poliacrilamida segundo LAEMMLI (1970). A solução do gel separador (Tris-HCl 0,375M, pH 8,8/ SDS 0,1%/ acrilamida-bisacrilamida (29:1 p/v) 12%/ persulfato de amônia 0,05% (p/v)/ TEMED 0,05% (v/v) e a do gel concentrador (Tris-HCl 0,125M/ SDS 0,1%/ acrilamida-bisacrilamida 4% (29:1 p/v)/ persulfato de amônia 0,05% (p/v)/ TEMED 0,05% (v/v)) foram, após a polimerização, montados em cuba apropriada a qual foi preenchida com tampão de corrida 1X (Tris base 0,3% (p/v)/ glicina 1,44% (p/v)/ SDS 0,1% (p/v)). Para a confecção de géis não desnaturantes, foram utilizados os mesmos procedimentos,

porém, foram retiradas as soluções de SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol, tanto para preparação do gel quanto para preparação das amostras.

Antes da aplicação das amostras nos géis em condições desnaturantes, as mesmas foram concentradas por liofilização em concentrador *Centrивap* ou precipitadas com TCA 20% (v/v) e mantidas *overnight* a 4<sup>o</sup>C, centrifugadas (14000rpm por 5min), lavadas com acetona gelada e ressuspendidas em 20 $\mu$ L de tampão de amostra desnaturante 1X (Tris-HCl 0,05M pH 6,8/ 2-mercaptoetanol 4% (p/v)/ SDS 2% (p/v)/ glicerol 10% (v/v)/ traços de azul de bromofenol), incubadas por 3 minutos à 100<sup>o</sup>C e aplicadas no gel.

Após eletroforese (100V), os géis foram corados em solução de coloração ("Coomassie brilliant blue" – R 0,1% (p/v)/ metanol 40% (v/v)/ ácido acético 10% (v/v)) e descorados na mesma solução sem o corante.

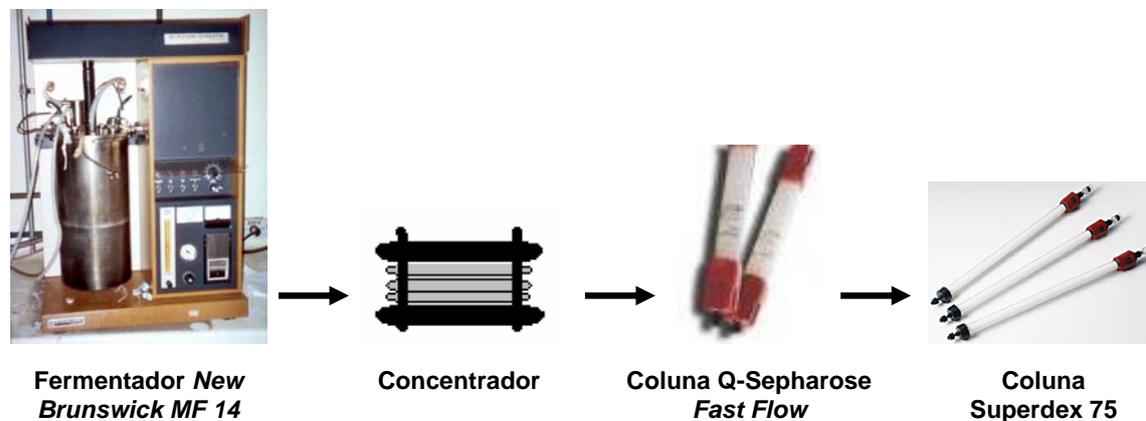
Os géis também foram submetidos à coloração com nitrato de prata descrita por BLUM *et al.* (1987). Para tanto, os mesmos foram submetidos a uma fixação por 1h (metanol p.a 50%/ ácido acético p.a 5%), lavagem por 20min (metanol 50%), sensibilização por 10min (tiosulfato de sódio 0,02%), enxágüe em água destilada duas vezes (1min cada), submersão em solução 0,1% de nitrato de prata gelada (4<sup>o</sup>C) por 1h, enxágüe duas vezes em água destilada, revelação em solução de 0,04% formalina 2% carbonato de sódio e inibição da revelação com ácido acético 1%.

Como padrões de massa molecular para os géis desnaturantes foram utilizados: fosforilase B (97kDa), albumina bovina (66kDa), ovoalbumina (45kDa), anidrase carbônica (29kDa), inibidor de tripsina (20,1kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14kDa).

Para os géis não desnaturantes foram utilizadas como padrão as proteínas: tiroglobulina (669kDa), ferritina (440kDa), catalase (232kDa), lactato desidrogenase (140kDa) e albumina bovina (66kDa).

### 3.8 PURIFICAÇÃO DE $\beta$ -1,3-GLICANASE DE *M. anisopliae*

O sobrenadante dos cultivos em larga escala (item 3.5.2) de *M. anisopliae* foram concentradas por ultrafiltração em membrana de celulose regenerada com poros de 10kDa, liofilizados e dialisados contra água destilada por cerca de 12h a 4°C. As amostras foram conservadas em freezer a -20°C. Um resumo das etapas empregadas para a purificação está representado na Figura 7.



**Figura 7. Etapas do processo de purificação de  $\beta$ -1,3-glicanases produzidas por *M. anisopliae* em meio TLE suplementado ou com parede celular de *R. solani* 0,5% ou com NAG 0,5%.**

Os concentrados provenientes tanto das fermentações com parede celular quanto das com NAG foram submetidos às mesmas etapas de purificação. As amostras foram

aplicadas, primeiramente, em coluna de troca iônica Q-sepharose *Fast Flow* (1,5 X 27 cm) equilibrada com tampão Tris-HCl (20mM, pH 8), utilizando o sistema *Äkta prime* (*Amersham Biosciences*), com fluxo de 2mL/min ou 3mL/min. Após a lavagem com o mesmo tampão de equilíbrio para a liberação das proteínas não retidas, foi feita a eluição das proteínas retidas com gradiente linear de sal (NaCl), de 0 – 1M para a amostra proveniente do cultivo com parede celular, e de 0 – 250mM, para a amostra proveniente do cultivo com NAG. Foram coletadas frações de 3mL e 5mL. A determinação da proteína total das frações foi feita pela leitura em espectrofotômetro a 280nm e a determinação da atividade realizada conforme descrito no item 3.6. O perfil protéico das frações com atividade foi determinado pela concentração de 300 $\mu$ L das mesmas com TCA 20% e a confecção de gel SDS-PAGE 12% conforme descrito no item 3.7.

As frações com atividade de glicanase foram reunidas, concentradas e aplicadas em uma coluna de filtração em gel Superdex 75 (10mm X 10cm), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl (20mM, pH 8) em sistema FPLC (*FPLC System Pharmacia*). A eluição foi feita em fluxo de 0,4mL/min com o mesmo tampão de equilíbrio e as amostras coletadas em frações de 1mL. Foi realizada nas diferentes frações a leitura da DO a 280nm e verificada a presença de atividade enzimática (item 3.6). As amostras com atividade foram concentradas em liofilizador *Centrivap* e analisadas em gel SDS-PAGE 12%. Frações com atividade eluídas da coluna de filtração em gel referentes à fermentação com NAG foram ainda, submetidas a eletroforese sob condições não-desnaturantes. Para tanto, foi feito procedimento eletroforético em gel de poliacrilamida 7,5%, sem a presença de SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol nas soluções.

### **3.9 SOUTHERN BLOT**

#### **3.9.1 Extração de DNA genômico de *M. anisopliae***

A extração de DNA foi realizada a partir do cultivo da linhagem E<sub>6</sub> em meio MCc por 48hs a 28°C sob agitação constante de 120rpm. O micélio foi filtrado, lavado com água destilada estéril e macerado com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. A cada 0,1g de micélio foi adicionado 0,2mL de tampão de extração (TEX) e 0,2mL de fenol:clorofórmio (v/v). A mistura foi agitada em vortex por 6min e, então adicionada de 0,3mL de TEX e 0,3mL de fenol:clorofórmio (v/v). Após 30seg, foi feita a centrifugação por 5min a 14000rpm. A fase aquosa foi utilizada para re-extração com 0,3mL de fenol:clorofórmio. Para a precipitação dos ácidos nucleicos, foram utilizados 2 volumes de etanol absoluto e acondicionamento a -20°C. O sedimento de ácidos nucleicos foi lavado com etanol 70% e após centrifugação por 2min a 14000rpm ressuspendido em água Milli-Q.

#### **3.9.2 Clivagem do DNA com endonucleases de restrição**

O DNA obtido foi clivado com as enzimas KpnI, EcoRV, EcoRI, BamHI, XhoI, BglI, HindIII e PstI na concentração de 1U/μg de DNA. As reações foram realizadas utilizando-se o tampão adequado à melhor eficiência enzimática e incubadas a 37°C por 3h.

#### **3.9.3 Preparo do fragmento de cDNA contendo uma seqüência de glicanase**

O fragmento de cDNA correspondente a uma glicanase putativa foi isolado originalmente pela aplicação da metodologia de RDA, conforme descrito por DUTRA *et*

*al.* (2004). O plasmídeo pUC18, contendo o fragmento de cDNA de 582pb foi clivado com 1 U/ $\mu$ g DNA das enzimas BamHI e EcoRI. As clivagens foram realizadas utilizando-se o tampão ótimo de reação para cada uma das enzimas e as reações foram incubadas por 3h a 37<sup>o</sup>C. O inserto liberado foi purificado (*Kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification, Amersham Biosciences*) e utilizado como sonda nos experimentos de *Southern*.

#### **3.9.4 Hibridização pela técnica de *Southern***

A análise pela técnica de *Southern* utilizando DNA genômico de *M. anisopliae*, linhagem E<sub>6</sub> e, como sonda, o fragmento de 582pb correspondente a uma glicanase putativa de *M. anisopliae* foi realizado por marcação não radioativa (*Kit Gene Images, Amersham Biosciences*) seguindo-se as recomendações do fabricante.

## 4. RESULTADOS

Objetivando purificar e caracterizar glicanases do fungo *Metarhizium anisopliae* procedemos a determinação de condições ótimas para a produção dessas enzimas. Duas  $\beta$ -1,3-glicanases foram parcialmente purificadas e, também, determinamos a presença de um gene que provavelmente codifica uma exo- $\beta$ -1,3 glicanase em *M. anisopliae*.

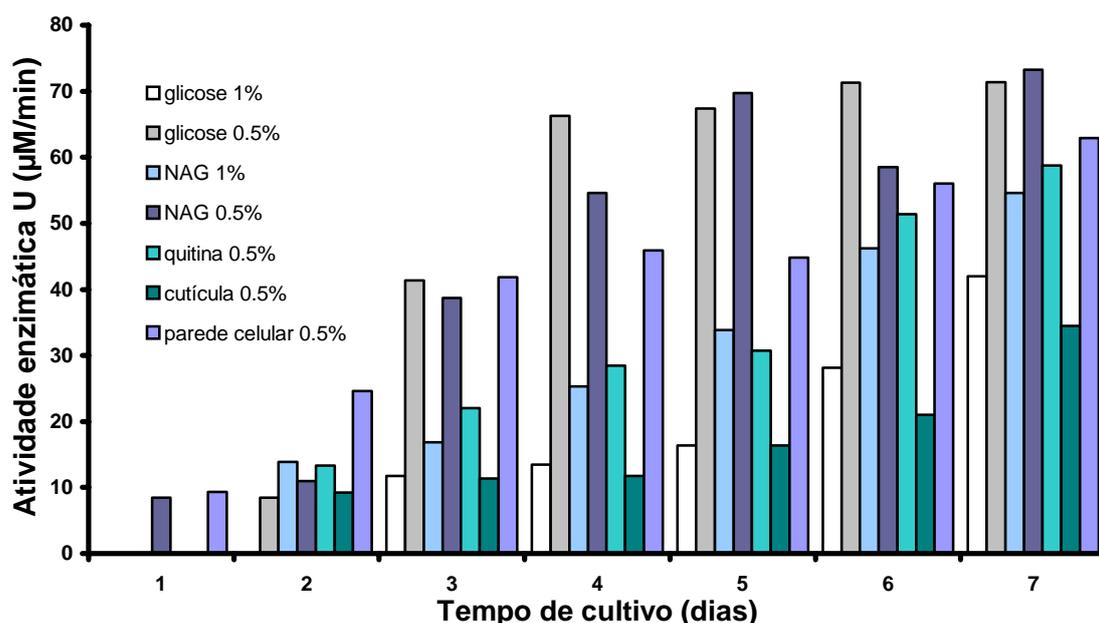
### 4.1 PRODUÇÃO DE $\beta$ -1,3 GLICANASE POR *Metarhizium anisopliae*

Para caracterizar enzimas com atividade de  $\beta$ -1,3 glicanase produzidas pela linhagem E<sub>6</sub> de *M. anisopliae*, foi realizado o cultivo por sete dias em meio TLE (MM) suplementado com diferentes fontes de carbono (3.5.1 e Figura 8). Após o cultivo, duas frações foram analisadas: o sobrenadante das culturas e o micélio do fungo. A atividade enzimática foi avaliada do primeiro ao sétimo dia de cultivo utilizando como substrato da reação a laminarina, que permite a detecção de glicanases do tipo  $\beta$ -1,3 (FLEET & PHAFF, 1974).

#### 4.1.1 Secreção de $\beta$ -1,3 glicanases por *Metarhizium anisopliae*

Em todas culturas, nos substratos utilizados, foi possível a detecção da atividade de  $\beta$ -1,3-glicanases no sobrenadante dos cultivos de *M. anisopliae*, linhagem E<sub>6</sub> (Figura 8). Dentre as fontes de carbono avaliadas, parede celular de *R. solani* 0,5%, glicose 0,5% e NAG 0,5% apresentaram as maiores atividades. A secreção de  $\beta$ -1,3 glicanases

em presença de NAG 0,5% e parede celular foi detectada já no primeiro dia de cultivo. A secreção destas enzimas nos meios contendo quitina e cutícula de carrapato foi inferior às outras condições. Atividades de  $\beta$ -1,3-glicanases crescentes até o último dia de cultivo foram observadas nas condições: glicose 1%, NAG 1%, quitina, cutícula e parede celular. Na cultura contendo glicose 1% foi detectada atividade de  $\beta$ -1,3-glicanase somente a partir de 72h de cultivo, mantendo-se baixa até 120hs, indicando que possivelmente este substrato desempenhe um efeito inibitório na secreção de  $\beta$ -1,3-glicanases.



**Figura 8. Secreção de  $\beta$ -1,3-glicanase por *M. anisopliae* cultivado em meio suplementado com diferentes fontes de carbono.** Foram coletadas e analisadas alíquotas de cada uma das culturas do primeiro ao sétimo dia de cultivo. Os sobrenadantes foram dialisados e a atividade de  $\beta$ -glicanases foi determinada (item 3.6).

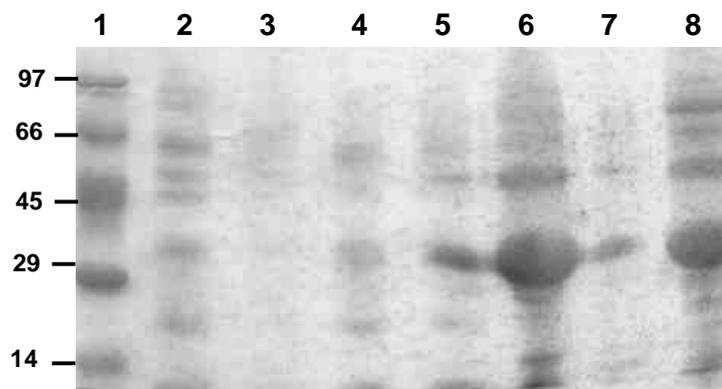
Sobrenadantes de cultivos com três e cinco dias de cultura foram ainda submetidos à quantificação de proteínas totais, atividade específica de  $\beta$ -1,3-glicanases e perfil eletroforético em gel SDS-PAGE 12% (Figuras 9 e 10). A Tabela 3 apresenta, resumidamente, os resultados de proteínas totais e atividade de  $\beta$ -1,3 glicanases, demonstrando maior atividade específica nos cultivos com três dias. As condições que apresentaram maior atividade específica com três dias de cultivo foram em ordem decrescente: glicose 0,5%, NAG 1%, quitina, parede celular de *R. solani* e cutícula de carrapato. Com exceção da quitina 0,5%, a atividade absoluta de  $\beta$ -1,3-glicanases foi maior com cinco dias de cultivo, porém, a atividade específica diminuiu devido a maior quantidade de proteínas totais secretadas.

#### **4.1.2 Efeito da glicose na secreção de $\beta$ -1,3 glicanases por *Metarhizium anisopliae***

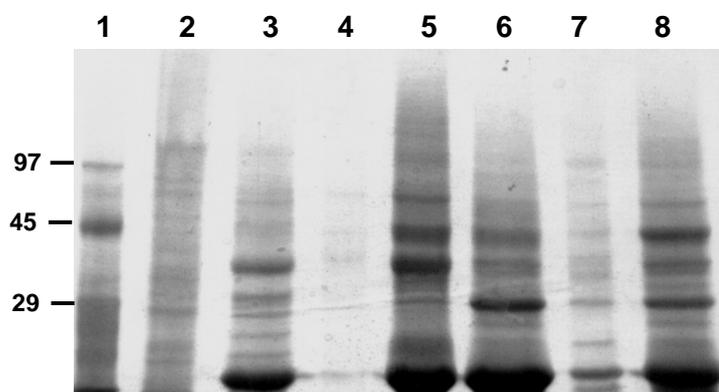
O efeito da suplementação continuada de glicose na secreção de  $\beta$ -1,3 glicanases por *M. anisopliae* foi avaliado em cultivos contendo inicialmente glicose 0,5%, que foi re-adicionada após 24hs. Alíquotas do sobrenadante foram coletadas após 6; 12; 24; 36; 48; 72; 96; 120; 144 e 168h de cultivo e utilizadas para a determinação da secreção protéica total (pela medida de proteína total do sobrenadante) e atividade enzimática de  $\beta$ -1,3 glicanases. A Figura 11 evidencia que a manutenção dos níveis de glicose no meio de cultivo de re-adição, inibiu a secreção de proteínas totais e também de  $\beta$ -1,3 glicanases ocorrendo a desrepressão enzimática na medida em que a concentração do substrato diminuiu.

**Tabela 3. Análise de proteínas totais e atividade de  $\beta$ -1,3-glicanases em cultivos de *Metarhizium anisopliae* em diferentes fontes de carbono.**

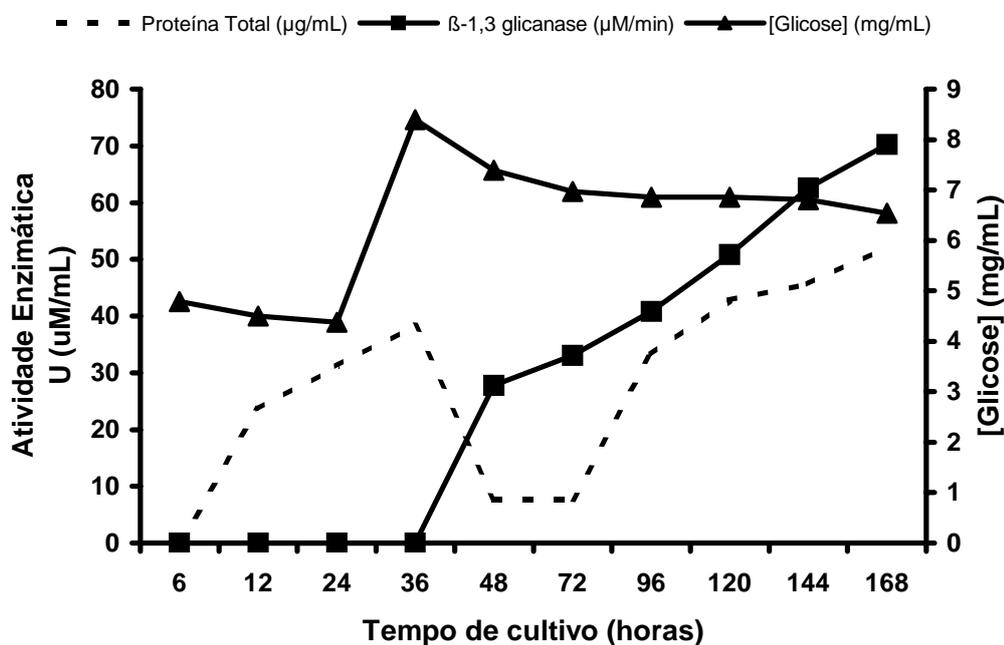
FONTE DE CARBONO	PROTEÍNA SECRETADA ( $\mu\text{g/mL}$ )		$\beta$ -1,3-glicanases SECRETADAS U ( $\mu\text{M/min}$ )		ATIVIDADE ESPECÍFICA (U. $\mu\text{gprot}$ )	
	3 dias	5 dias	3 dias	5 dias	3 dias	5 dias
Glicose 1%	29,25	46,67	13,2	17,16	0,45	0,36
Glicose 0,5%	25,81	92,89	58,28	70,53	2,26	0,76
NAG 1%	10,81	58,74	17,16	34,7	1,58	0,60
NAG 0,5%	25,81	66,5	26,85	73,8	1,04	1,1
Quitina 0,5%	30,46	47,7	46,79	31,43	1,53	0,65
Cutícula 0,5%	12,36	29,6	16,5	26,09	1,33	0,89
Parede celular 0,5%	33,39	63,74	48,58	51,04	1,45	0,8



**Figura 9.** Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE do sobrenadante do terceiro dia de cultivo de *M. anisopliae*, em meio TLE suplementado com diferentes fontes de carbono. Canaletas: 1, marcador de massa molecular (kDa); 2, glicose 1%; 3, glicose 0,5%; 4, NAG 1%; 5, NAG 0,5%; 6, quitina 0,5%; 7, cutícula 0,5% e parede celular de *R. solani* 0,5%. O sobrenadante dos cultivos (500 $\mu$ L) foi concentrado e aplicado no gel.



**Figura 10.** Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE do sobrenadante do quinto dia de cultivo de *M. anisopliae*, em meio TLE suplementado com diferentes fontes de carbono. Canaletas: 1, marcador de massa molecular (kDa); 2, glicose 1%; 3, glicose 0,5%; 4, NAG 1%; 5, NAG 0,5%; 6, quitina 0,5%; 7, cutícula 0,5% e parede celular de *R. solani* 0,5%. O sobrenadante dos cultivos (500 $\mu$ L) foi concentrado e aplicado no gel.



**Figura 11.** Avaliação do efeito da re-adição de glicose na produção de  $\beta$ -1,3-glicanase em culturas de *M. anisopliae*. O fungo foi cultivado durante sete dias sendo feita uma re-adição de glicose 0,5% após 24hs. Foram coletadas alíquotas do sobrenadante nos tempos de 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144 e 168h de cultivo para a determinação da secreção total de proteínas, atividade de  $\beta$ -1,3-glicanase (item 3.6) e concentração de glicose no meio.

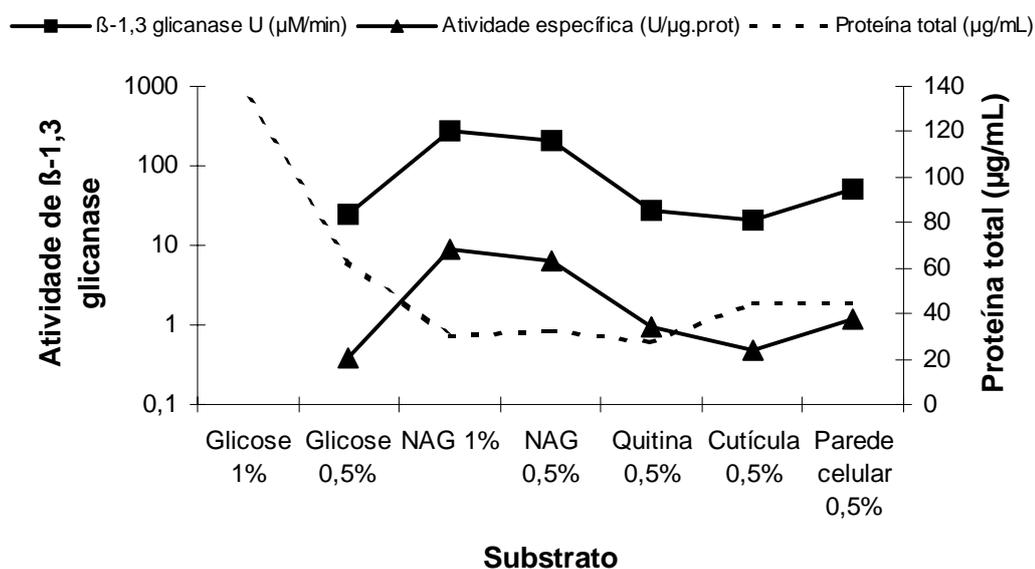
#### 4.1.3 Detecção de $\beta$ -1,3-glicanases não-secretadas no meio de cultivo

A atividade de  $\beta$ -1,3-glicanases não-secretadas, ou que permaneceram aderidas à hifa do fungo, também foi avaliada. Cultivos de *M. anisopliae* após três dias (Figura 12 A) e cinco dias (Figura 12 B) de cultivo, em meio TLE suplementado com diferentes fontes de carbono (as mesmas anteriormente citadas) foram preparados (3.5.1.2) e utilizados para a análise da atividade de  $\beta$ -1,3-glicanases.

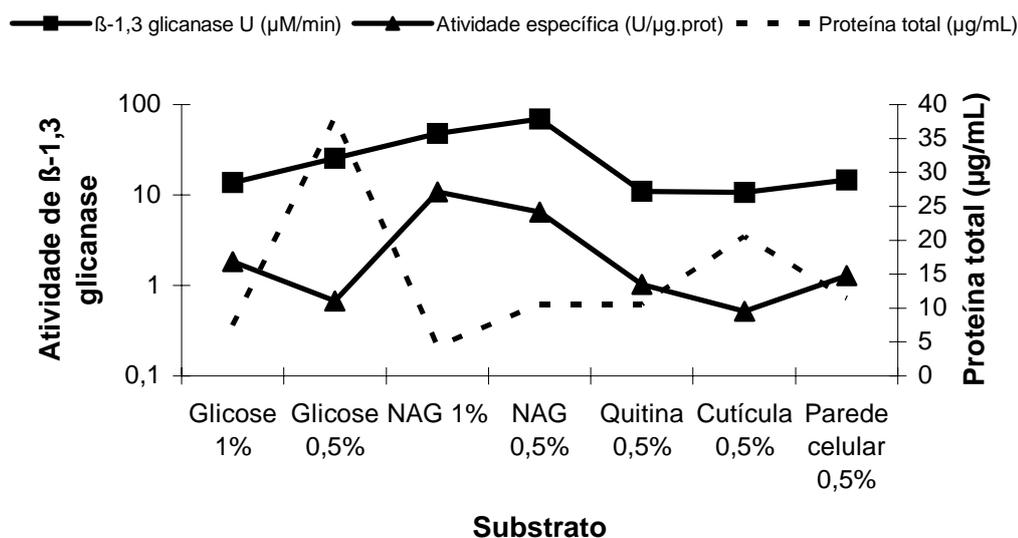
Após três dias de cultivo a produção de  $\beta$ -1,3-glicanases foi detectada na fração intracelular solúvel de cultivos de *M. anisopliae* em meio suplementado com diferentes fontes de carbono: glicose 0,5%, NAG 0,5% e 1%, quitina 0,5%, cutícula 0,5% e parede celular de *R. solani* 0,5%. Na fração intracelular dos cultivos suplementados com glicose 1% não foi detectada atividade de  $\beta$ -1,3-glicanase. A atividade específica de  $\beta$ -1,3-glicanases nos cultivos de *M. anisopliae* nas diferentes condições está tabulada na Tabela 4. Pode-se observar que após cinco dias de cultivo a atividade específica de  $\beta$ -1,3-glicanases, em valores absolutos, é um pouco superior àquelas encontradas após três dias de cultivo. Os cultivos com os substratos: NAG 1% e 0,5%, parede celular e quitina, apresentaram após três dias de cultivo, em ordem decrescente, as atividades específicas mais altas de  $\beta$ -1,3-glicanase. Nas frações intracelulares provenientes dos cultivos com mais de três dias contendo: NAG 1% e 0,5%, glicose 1%, parede celular de *R. solani* e quitina foram, em ordem decrescente, as maiores produtoras específicas de  $\beta$ -1,3-glicanases.

A produção de proteínas totais e de atividade de  $\beta$ -1,3-glicanases nas frações intracelulares após três dias de cultivo foi ligeiramente superior às encontradas em cultivos com maior período de incubação.

A



B



**Figura 12. Produção enzimática da fração intracelular solúvel de cultivos de *M. anisopliae* em meio TLE suplementado com diferentes fontes de carbono.** Os cultivos foram filtrados e o micélio coletado para a verificação da produção protéica total e atividade de  $\beta$ -1,3-glicanase (item 3.6) (A) Culturas de três dias; (B) Culturas de cinco dias.

**Tabela 4. Proteínas totais e atividade de  $\beta$ -1,3-glicanases na fração intracelular solúvel de micélio cultivado em meio TLE suplementado com diferentes fontes de carbono \*.**

FONTE DE CARBONO	PROTEÍNA TOTAL ( $\mu\text{g/mL}$ )		ATIVIDADE $\beta$ -1,3-GLICANASES			
			TOTAL U ( $\mu\text{M/min}$ )		ESPECÍFICA (U. $\mu\text{gprot}$ )	
	3 dias	5 dias	3 dias	5 dias	3 dias	5 dias
Glicose 1%	133,31	7,45	0	13,73	0	1,84
Glicose 0,5%	62,8	38,02	24,6	25,24	0,39	0,67
NAG 1%	29,96	4,37	275	47,5	9,17	10,87
NAG 0,5%	32,2	10,55	205	68,7	6,67	6,5
Quitina 0,5%	27,67	10,6	26,8	10,95	0,96	1,03
Cutícula 0,5%	44,71	20,54	21,25	10,62	0,47	0,51
Parede celular 0,5%	40,03	11,45	52,4	14,71	1,19	1,28

(\*), Os valores foram normalizados em relação à massa micelial.

#### 4.2 PURIFICAÇÃO DE $\beta$ -1,3-GLICANASES PRODUZIDAS POR *Metarhizium anisopliae*

Para a produção de  $\beta$ -1,3-glicanases em grande escala visando sua purificação, foram selecionados dois dos substratos testados. Os cultivos foram realizados em fermentador com meio TLE suplementado com parede celular de *R. solani* 0,5%, ou com NAG 0,5%. A parede celular foi escolhida pelo seu amplo emprego para a produção desta classe enzimática em diferentes microrganismos, pois constitui uma fonte rica em  $\beta$ -glicana, e a NAG 0,5%, por ter sido eficiente para a produção de  $\beta$ -1,3-glicanases pela

linhagem E<sub>6</sub> de *M. anisopliae*. A produção máxima de  $\beta$ -1,3-glicanases ocorreu em meio rico em  $\beta$ -glicana (parede celular) após 120h de cultivo que foi utilizado para a produção de  $\beta$ -1,3-glicanases. O emprego de NAG em baixas concentrações (0,5%) gerou uma maior produção de  $\beta$ -1,3-glicanases após 24h de cultivo.

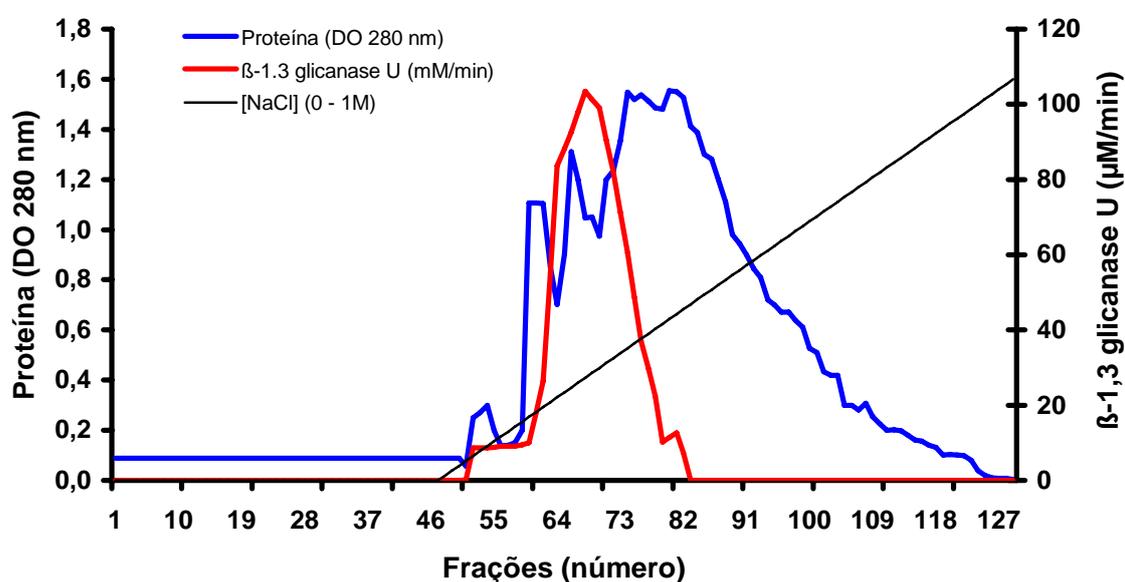
Para a otimização da purificação de  $\beta$ -1,3-glicanases produzidas pelo cultivo de *M. anisopliae* em meio contendo parede celular de *R. solani*, uma alíquota de 400mL do sobrenadante das culturas de *M. anisopliae* com cinco dias de cultivo, foi concentrada três vezes e aplicada em uma coluna de troca iônica, Q–Sepharose *Fast Flow*, equilibrada com tampão Tris-HCl (20 mM, pH 8,0) com fluxo de 2mL/ min (Figura 13). A coluna foi lavada com o mesmo tampão e as proteínas eluídas com gradiente crescente de 0 a 1 M de NaCl. As frações com volume de 2mL foram coletadas e utilizadas para a determinação de proteínas (DO 280nm), atividade de  $\beta$ -1,3-glicanase, bem como para avaliação do perfil enzimático em gel SDS-PAGE (Figura 14). O ensaio de atividade das frações eluídas resultou em um único pico com atividade máxima de  $\beta$ -1,3-glicanase, entre as frações 62 e 78. Estas frações foram reunidas e concentradas para a aplicação em uma coluna de gel-filtração (Superdex 75).

O sobrenadante da fermentação de *M. anisopliae* em meio com NAG 0,5% foi concentrado 21,4 vezes e aplicado em uma coluna Q–Sepharose *Fast Flow* (1,5cm X 27cm) (Figura 15). A eluição das proteínas foi feita com gradiente de NaCl (0 a 250mM), durante o qual a eluição com 150mM de sal foi realizada até a diminuição da leitura da absorbância a 280nm das frações. As frações (5mL) foram coletadas e a atividade de  $\beta$ -1,3-glicanase foi determinada, verificada a concentração de proteínas (DO 280nm) e análise em géis SDS-PAGE (Figura 16). Foi detectada atividade enzimática nas frações

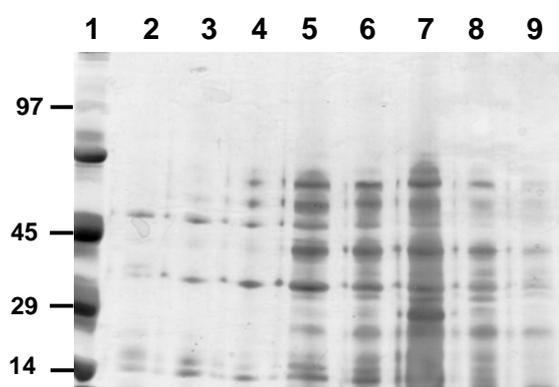
eluídas com 150mM de sal (frações 46 até 69). Aquelas contendo maior atividade de  $\beta$ -1,3 glicanases foram concentradas e utilizadas para a aplicação em uma coluna de gel-filtração (Superdex 75).

A segunda etapa da purificação (para as  $\beta$ -1,3-glicanases produzidas nas duas condições testadas) constou na aplicação de alíquotas de 200 $\mu$ L dos concentrados obtidos nas frações da coluna de troca iônica em uma coluna de filtração em gel (Superdex 75). A presença de  $\beta$ -1,3 glicanase foi detectada nas frações iniciais nas duas cromatografias. O padrão de eluição da segunda etapa de purificação da fermentação com parede celular está mostrado na Figura 17 e, o com NAG 0,5% na Figura 18.

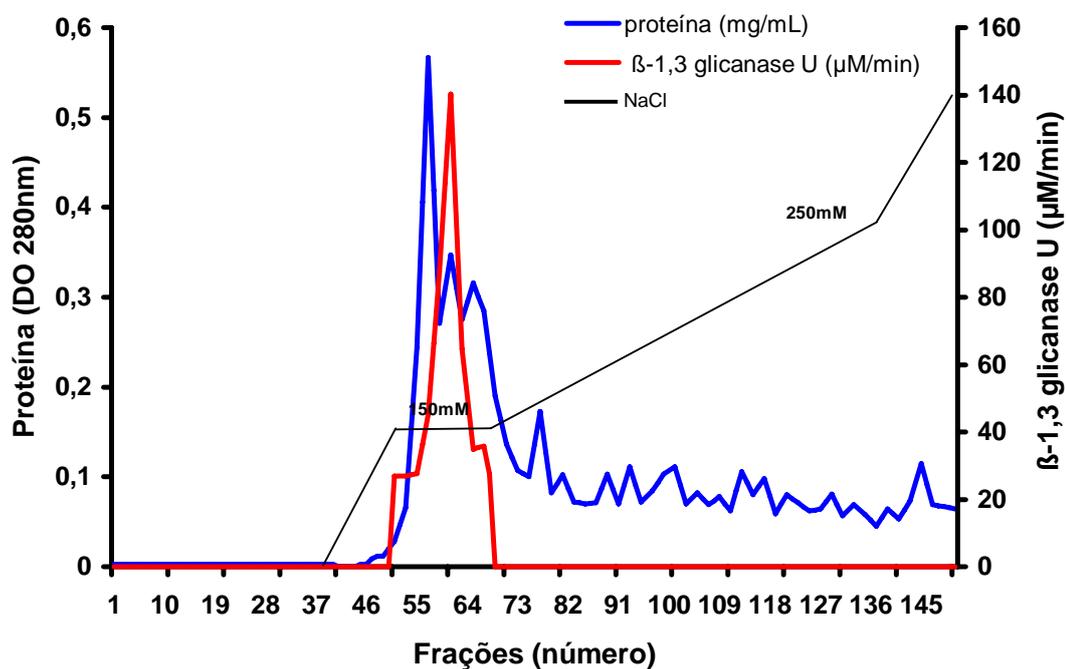
A utilização deste protocolo para a purificação de  $\beta$ -1,3 glicanases produzidas por *M. anisopliae* quando cultivado em meio contendo parede celular de *R. solani* 0,5% possibilitou a purificação parcial da enzima (Figura 19). A purificação da enzima produzida em meio contendo NAG 0,5% como fonte de carbono com a utilização seqüencial das colunas de troca iônica forte e de filtração em gel, inicialmente, não pareceu ter a mesma eficiência, pois, conforme mostrado na Figura 20 (A) nas frações com atividade provenientes da coluna Superdex 75 há a presença de mais de uma banda de proteína. Para a verificação da presença de outras proteínas ou se no gel desnaturante foram visualizadas subunidades de enzimas multiméricas, as amostras foram também separadas em gel nativo (7,5%) (Figura 20 B) onde foi possível detectar a presença de mais de uma banda de proteína em uma das frações, porém, na fração de número 11 uma única banda de proteína (aproximadamente 95kDa) foi observada.



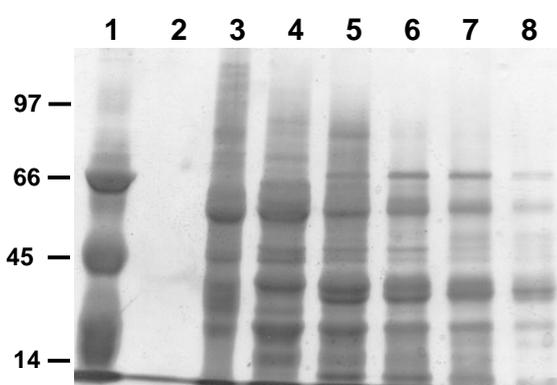
**Figura 13.** Perfil cromatográfico em coluna de troca iônica Q-Sepharose *Fast Flow* das proteínas secretadas por *M. anisopliae*. O fungo foi cultivado durante cinco dias em meio TLE suplementado com parede celular de *R. solani* 0,5%. A eluição das proteínas foi feita com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 (fluxo 2mL/min), gradiente de NaCl (0 – 1M) e as frações coletadas com volume de 2mL. Foi aplicado na coluna 73mg de proteína.



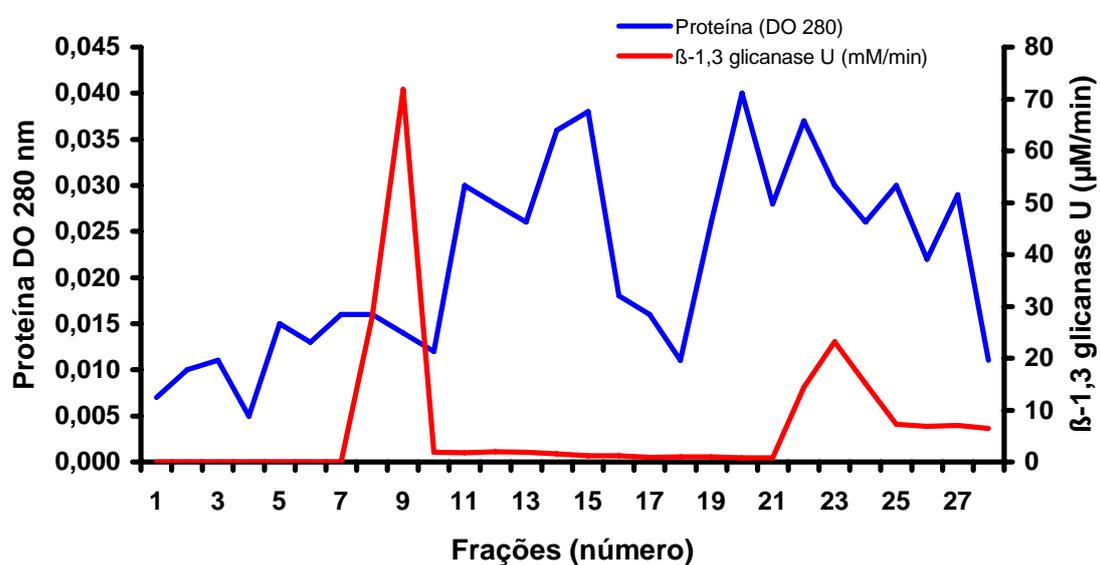
**Figura 14.** Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE das frações eluidas na coluna de troca iônica Q-Sepharose *Fast Flow* com gradiente de NaCl. Canaletas: 1, marcador de massa molecular (kDa); 2 a 9, frações do pico de atividade de  $\beta$ -1,3 glicanase (62 a 69) eluidas em coluna de troca iônica com tampão Tris-HCl 20mM, pH 8,0, fluxo de 2mL/min e gradiente de NaCl de 0 – 1M.



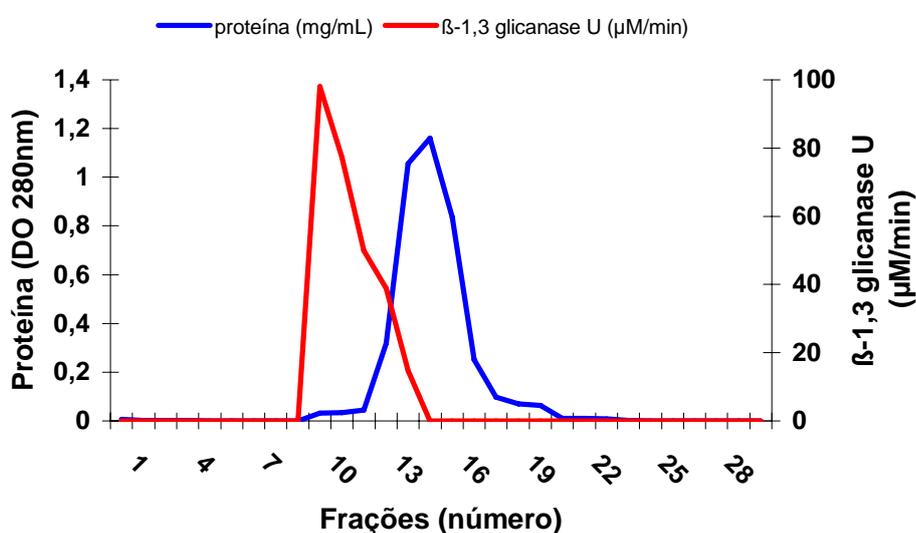
**Figura 15.** Perfil cromatográfico em coluna de troca iônica Q-Sepharose *Fast Flow* das proteínas secretadas por *M. anisopliae*. O fungo foi cultivado por 24 h em meio TLE suplementado com NAG 0,5. Um total de 210mg de proteína foram aplicados na coluna. A eluição das proteínas foi feita com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 (fluxo 3mL/min) e gradiente de NaCl (0 - 150 - 250mM) e as frações coletadas com volume de 5mL.



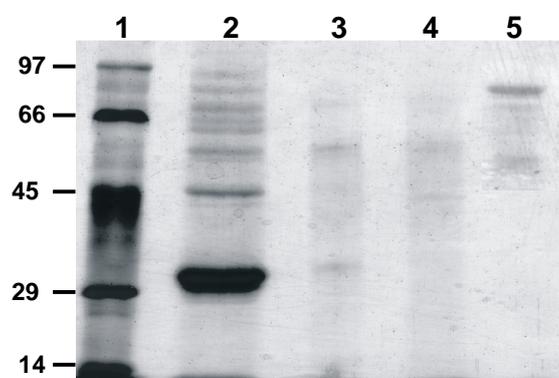
**Figura 16.** Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE das frações eluídas na coluna de troca iônica Q-Sepharose *Fast Flow* com gradiente de NaCl. Canaletas: 1, marcador de massa molecular (kDa); 2 a 8, frações do pico de atividade de  $\beta$ -1,3-glicanase (57 a 63) eluídas em coluna de troca iônica com tampão Tris-HCl 20mM, pH 8,0, fluxo de 3mL/min e concentração de sal de 150mM.



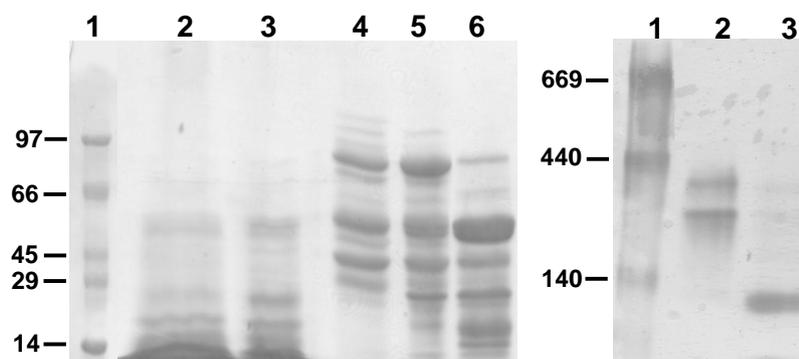
**Figura 17.** Perfil cromatográfico em coluna de filtração em gel Superdex 75 das proteínas secretadas por *M. anisopliae*. As frações obtidas durante a eluição com gradiente de sal em coluna de troca iônica Q-Sepharose *Fast Flow* com maior atividade de β-1,3-glicanase foram concentradas (1,5mg.prot) e aplicadas na coluna Superdex 75. A eluição das proteínas foi feita com a utilização de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 (fluxo 0,4 mL/min) e as frações coletadas (1mL).



**Figura 18. Perfil cromatográfico em coluna de filtração em gel Superdex 75 das proteínas secretadas por *M. anisopliae*.** As frações obtidas durante a eluição com gradiente de sal em coluna de troca iônica Q-Sepharose *Fast Flow* com atividade de  $\beta$ -1,3-glicanase foram concentradas e aplicadas (6mg de proteína) na coluna Superdex 75. A eluição das proteínas foi feita com a utilização de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 (fluxo 0,4 mL/min) e as frações coletadas (1mL).



**Figura 19.** Purificação parcial da enzima com atividade de  $\beta$ -1,3-glicanase produzida em fermentação do fungo *M. anisopliae* em meio TLE suplementado com parede celular de *R. solani*. Gel SDS-PAGE. Canaletas: 1, Marcador de massa molecular (kDa); 2, extrato bruto; 3 e 4, frações com atividade de  $\beta$ -1,3-glicanase oriundas da coluna Q-Sepharose *Fast Flow* e 5, fração número nove da coluna Superdex 75.

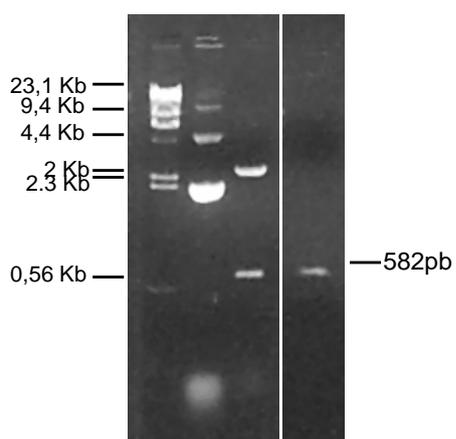


**Figura 20. Purificação parcial da enzima com atividade de  $\beta$ -1,3-glicanase produzida em fermentação do fungo *M. anisopliae* em meio TLE suplementado com NAG 0,5%. (A) Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE (12%) das enzimas com atividade de  $\beta$ -1,3-glicanase. Canaletas: 1, Marcador de massa molecular (kDa); 2, sobrenadante fermentação (filtrado); 3, fração da coluna de troca iônica com atividade de  $\beta$ -1,3-glicanase; 4 a 6, frações da coluna Superdex 75 com atividade de  $\beta$ -1,3-glicanase (10 a 12). (B) Perfil eletroforético em gel nativo (7,5%) das frações com maior atividade de  $\beta$ -1,3-glicanase da coluna Superdex 75. Canaletas: 1, marcador de massa molecular em kDa; 2, fração 10; 3, fração 11.**

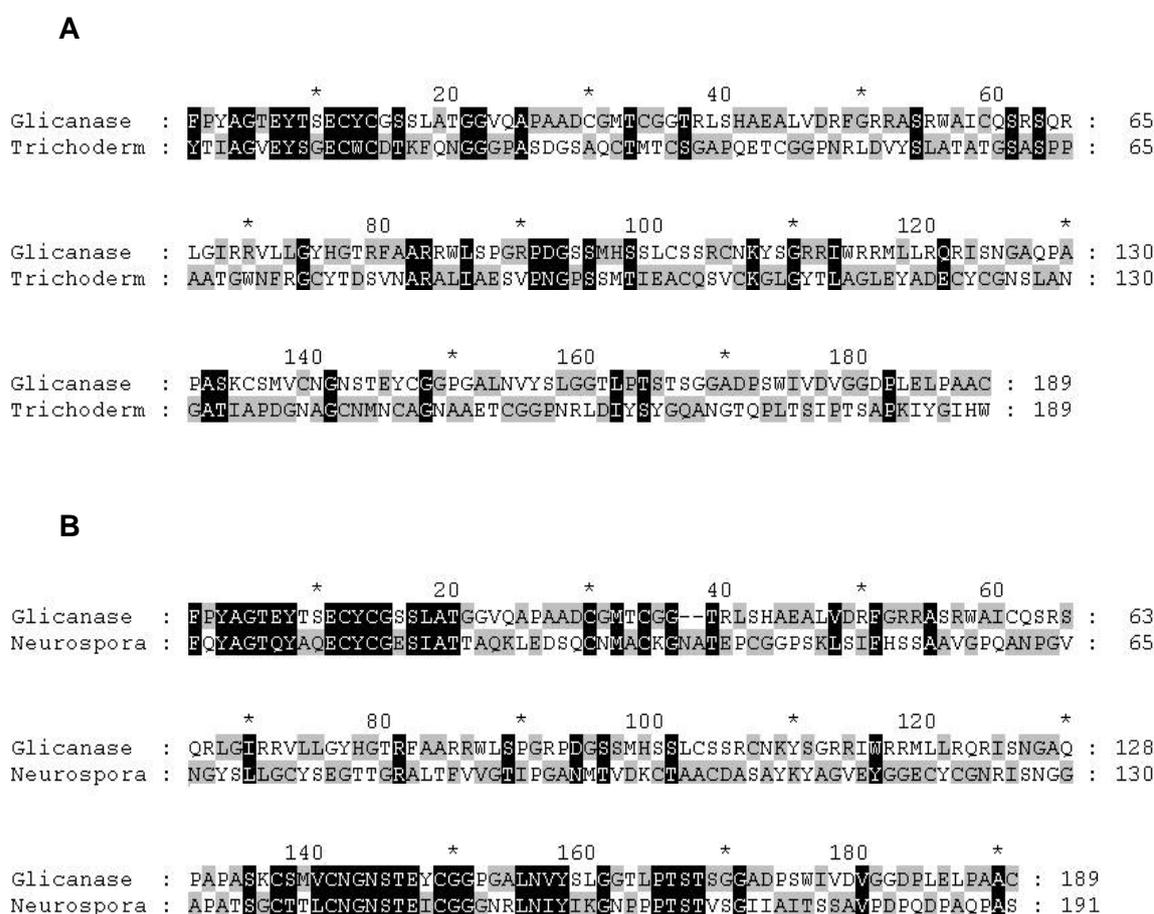
#### **4.3 DETECÇÃO DE UM GENE QUE PROVAVELMENTE CODIFICA UMA GLICANASE EM *Metarhizium anisopliae***

Uma seqüência correspondente a um ortólogo de exo- $\beta$ -1,3-glicanase, diferencialmente expresso em cultivos de *M. anisopliae*, linhagem E<sub>6</sub>, em presença de cutícula de carrapato (DUTRA *et al.*, 2004) foi utilizada para a verificação da presença do gene correspondente no genoma de *M. anisopliae*. O fragmento de DNA de 582pb

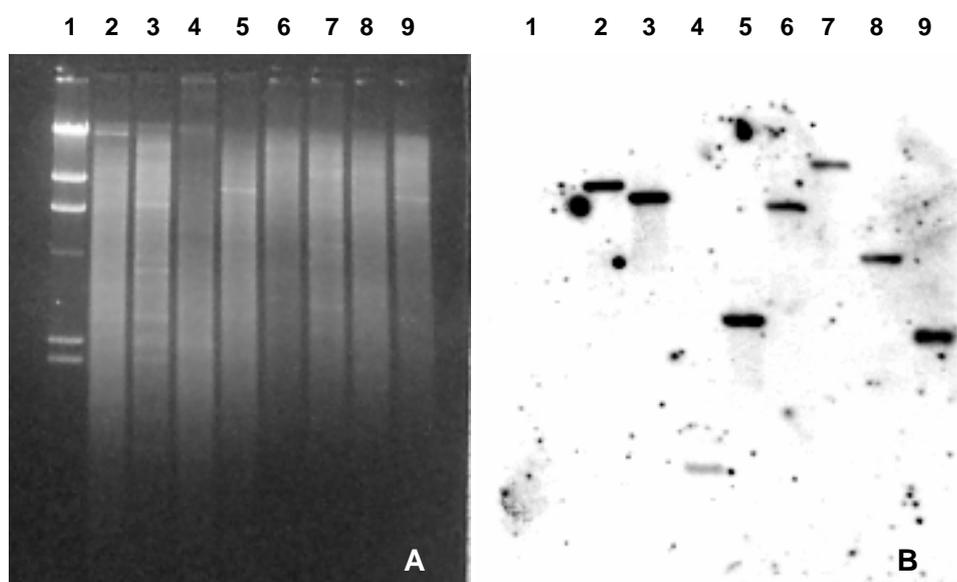
(Figura 21) foi seqüenciado e submetido à comparação em bancos de seqüências utilizando o programa *BLAST X* (ALTSCHERIL *et al.*, 1997). A seqüência deduzida de aminoácidos apresentou identidade de 28% e similaridade de 41% com um precursor de uma  $\alpha$ -1,3 glicanase de *T. harzianum* e, 28% de identidade e 38% de similaridade com uma proteína hipotética relacionada a um precursor de uma  $\beta$ -1,3 glicanase de *Neurospora crassa*. Para o alinhamento das seqüências foi utilizado o programa *Clustal X* e os índices de identidade e similaridade obtidos são referentes a uma maior homologia do fragmento de glicanase de *M. anisopliae* com a região C-terminal das demais glicanases analisadas (Figura 22, A e B). DNA genômico da linhagem E<sub>6</sub> de *M. anisopliae* foi submetido à clivagem com diferentes enzimas de restrição e hibridizado com o fragmento de DNA de 582pb. Ocorreu a hibridização em todas as clivagens de apenas um fragmento indicando assim, a presença deste gene de cópia única no genoma da linhagem analisada (Figura 23).



**Figura 21. Purificação do fragmento de  $\text{exo-}\beta\text{-1,3-glicanase}$  de *M. anisopliae*.** Canaletas: 1, marcador de tamanho molecular  $\lambda\text{Hind III}$ ; 2, DNA plasmidial; 3, clivagem com as enzimas de restrição Bam I e EcoRI e 4, fragmento purificado (*Kit GFX, Amersham*).



**Figura 22.** Alinhamento da seqüência predita de aminoácidos do fragmento de 582pb de uma provável  $\alpha$ -1,3-glicanase de *M. anisopliae* com seqüências de outras glicanases armazenadas em bancos de dados. Painel (A), alinhamento com um precursor de uma  $\alpha$ -1,3-glicanase de *T. harzianum* (T43253). Painel (B), alinhamento com uma proteína hipotética de um precursor de uma  $\beta$ -1,3-glicanase de *Neurospora crassa* (XP 322948.1). As seqüências marcadas em cinza e branco representam aminoácidos diferentes e, as em preto, aminoácidos similares.



**Figura 23. Confirmação da presença da seqüência de exo- $\beta$ -1,3-glicanase no genoma de *M. anisopliae*.** Painel (A), eletroforese em gel de agarose. Painel (B), autorradiografia da membrana hibridizada com o fragmento de cDNA de 582pb correspondente a uma exo- $\beta$ -1,3-glicanase de *M. anisopliae*. O DNA genômico foi clivado com as enzimas PstI (2), HindIII (3), BglII (4), XhoI (5), BamHI (6), EcoRI (7), EcoRV (8) e KpnI (9). A canaleta um representa o tamanho molecular dos fragmentos de  $\lambda$ HindIII.

## 5. DISCUSSÃO

O controle químico de pragas, com o uso de pesticidas, tem causado uma crescente preocupação devido aos seus efeitos deletérios sobre a saúde humana e o meio ambiente. Porém, a escassez de novas alternativas e a grande eficiência destes produtos fazem com que ocorra, ainda nos dias atuais, o seu amplo emprego. Neste ínterim, passou a ser conveniente a busca de alternativas menos lesivas para o controle de pragas dentre as quais se destaca o controle biológico.

O potencial de *M. anisopliae* como biocontrolador tem sido amplamente descrito, principalmente devido a sua capacidade de infectar uma ampla gama de hospedeiros, como insetos e ácaros (ALMEIDA & FILHO, 2001; LUZ *et al.*, 1998; BENJAMIN *et al.*, 2002).

*M. anisopliae* infecta seus hospedeiros de forma ativa, via penetração direta da cutícula. A secreção de enzimas hidrolíticas durante a penetração tem sido demonstrada como sendo de fundamental importância para o sucesso da infecção (CLARKSON & CHARNLEY, 1996; ST. LEGER *et al.*, 1993; ST. LEGER *et al.*, 1998). As proteases e quitinases têm recebido grande atenção, devido a sua atuação como fatores de virulência em fungos (SAMUELS & PATERSON, 1995; PINTO *et al.*, 1997; BOGO *et al.*, 1998). Atualmente, sabe-se que, além destas, outras enzimas como lipases, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase,  $\beta$ -1,3-exo-glicanases e superóxido-dismutases (FREIMOSER *et al.*, 2003; DUTRA *et al.*, 2004; BITTENCOURT *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2004), podem desempenhar um papel importante na patogênese. Acredita-se,

também, que o tipo de hospedeiro a ser infectado possa influenciar o padrão de secreção enzimática (FRANCESCHINI, dados não publicados).

A parede celular dos fungos é uma estrutura definida, onde os componentes estão arranjados em camadas. As  $\beta$ -glicanas e a quitina ficam embebidas em uma matriz de material amorfo onde as fibrilas de quitina são protegidas pela glicana. Existem ligações químicas entre estes polímeros estruturais, que, juntos, formam uma rede complexa de oligômeros de *N*-acetilglicosamina e  $\beta$ -glicana (COEN-KUPIEC *et al.*, 1999). A plasticidade desta estrutura é exigida nos processos morfogênicos e é mantida graças a um tenuous equilíbrio entre a síntese e degradação de seus componentes estruturais (AGUILAR-USCANGA & FRANÇOIS, 2003). Portanto, enzimas hidrolíticas, como quitinases e glicanases, são bastante importantes nos processos que ocorrem na parede celular. Foi verificado por MEV que, durante a penetração de *M. anisopliae* no carrapato *B. microplus*, as extremidades das hifas, durante o processo de penetração, tornam-se mais espessas e perdem a definição da parede celular, caracterizando assim uma modificação estrutural que pode exigir o envolvimento de glicanases (Arruda *et al.*, 2005).

A secreção de enzimas com capacidade de degradar as  $\beta$ -glicanas é uma característica atribuída a muitos microrganismos, como bactérias (FLEET & PHAFF, 1974; AONO *et al.*, 1992; MUTHUKUMAR *et al.*, 1993), vírus (SUN *et al.*, 2000) e fungos (KLEBL & TANNER, 1989; EL-KATATNY *et al.*, 2001; SATTAROVA, 2001), sendo importantes nos fungos devido à composição de sua parede celular. No entanto, até o presente, não existe a descrição de glicanases em *M. anisopliae*.

A detecção de glicanases se dá pela utilização de substratos específicos e pela análise de seus produtos de hidrólise. O substrato utilizado para a verificação da atividade enzimática neste trabalho foi a laminarina. Esta é um polissacarídeo composto por monômeros de glicose organizados majoritariamente em uma configuração  $\beta$ -1,3. Portanto, pôde-se inferir que a produção por *M. anisopliae* de enzimas com capacidade de degradar este substrato sejam classificadas como sendo  $\beta$ -1,3-glicanases.

A atividade de  $\beta$ -1,3-glicanases foi detectada em cultivos do fungo *M. anisopliae* nas diferentes fontes de carbono analisadas. A produção de glicanases é reportada como sendo expressa constitutivamente nos fungos, principalmente pela composição de sua parede celular, que é formada basicamente (60%) por  $\beta$ -1,3-glicanas (laminarina) (COHEN-KUPIEC *et al.*, 1999). Trinta e uma linhagens dos fungos *Acremonium* sp. e *Cephalosporium* sp. foram investigadas quanto a secreção de  $\beta$ -glicanases sendo a enzima detectada em todas as linhagens analisadas (PITSON *et al.*, 1997).

Nos fungos, as glicanases parecem constituir um sistema hidrolítico, onde a síntese de várias enzimas com esta atividade é comum em indivíduos da mesma espécie. Em *Sclerotium glucanicum*, três glicanases foram isoladas e purificadas (RAPP, 1992). Duas delas, uma com 33,5kDa e outra com 78kDa, foram classificadas como exo- $\beta$ -1,3-glicanases e a terceira, com 85kDa, apresentou um padrão de endo- $\beta$ -1,3-glicanase. Em *Saccharomyces cerevisiae*, uma  $\beta$ -1,3-glicanase associada à parede celular foi isolada. A sua superexpressão levou a uma diminuição significativa no crescimento das leveduras transformadas, porém, a disrupção gênica não resultou em alterações fenotípicas nos mutantes nulos, provavelmente devido à ação sinérgica entre outras glicanases (MRSA *et al.*, 1993). Três  $\beta$ -1,3-glicanases foram purificadas de

sobrenadantes de culturas de *Acremonium* sp. e, a comparação das suas seqüências preditas de aminoácidos com a de outras seqüências de glicanases depositadas em bancos de dados revelou uma maior homologia com  $\beta$ -1,3-glicanases com ação sobre as extremidades não redutoras dos substratos. O cultivo foi realizado em meio básico com substituição da fonte de carbono, sendo detectada atividade de  $\beta$ -1,3-glicanase na presença de laminarina ( $\beta$ -1,3) e pustulana ( $\beta$ -1,6). Quando a fonte de carbono era a glicose, ocorreu repressão da atividade de  $\beta$ -1,3-glicanase (McDOUGALL & SEVIOR, 2004). Esta repressão não pode, contudo, ser extrapolada para todos os fungos. PITSON *et al.* (1997) detectou atividades marcantes de  $\beta$ -1,3-glicanase em cultivos de *Cephalosporium* sp., linhagem OXF, e em *Acremonium strictum* quando cultivados em meio contendo 2,5% de glicose.

*T. harzianum* é empregado no controle de fitopatógenos e, durante a interação micoparasitária, produz enzimas líticas, tais como quitinases,  $\beta$ -1,3-glicanases, proteases e lipases (ULHOA & PEBERDY, 1991; CHET & INBAR, 1994). Do mesmo modo que demonstramos em *Metarhizium*, a secreção de  $\beta$ -1,3-glicanases em diferentes condições também é observada em *T. harzianum*. NORONHA *et al.* (2000) analisaram em gel de atividade o perfil de secreção de  $\beta$ -1,3-glicanases em diferentes condições de cultivo, constatando que existe uma variação na secreção dependendo do meio empregado. As amostras provenientes de cultivos em parede celular apresentaram três bandas com atividade de glicanase nos géis; com quitina, laminarina e NAG, duas e, nos cultivos com celulose e glicose, somente uma banda com atividade foi detectada.

Em nossos experimentos, a atividade de  $\beta$ -1,3-glicanases em *M. anisopliae* pareceu ser influenciada pelas concentrações de glicose no meio. Não foi detectada

atividade destas glicanases durante os dois primeiros dias de cultivo quando utilizada na concentração de 1% como também, a re-adição de glicose (0,5%) pareceu retardar a sua detecção no sobrenadante dos cultivos, sendo a atividade restaurada com a diminuição da concentração deste substrato. Nos fungos, *Trichoderma* sp. e *Acremonium* concentrações elevadas de monossacarídeos facilmente metabolisáveis, como a glicose, parecem ter efeito repressor quando em altas concentrações, sendo a atividade de  $\beta$ -1,3-glicanases restaurada na medida em que se extingue o nutriente do meio de cultivo. RAMOT *et al.* (2000) estudaram o efeito da exaustão de nutrientes na atividade de  $\beta$ -1,3-glicanases em *T. harzianum*. Foi observado que a atividade específica de  $\beta$ -1,3-glicanases após 10h de cultivo em meio sem fonte de carbono foi 20 vezes maior do que nos cultivos com NAG e que um maior número de glicanases foi secretado no meio mais rico. O aumento nos níveis de enzimas do tipo  $\beta$ -1,3-glicanases em cultivos com nenhuma ou pouca fonte de carbono pode ser explicado pelo papel que estas enzimas desempenham nos processos autolíticos. A falta de nutrientes parece induzir a secreção de glicanases para a mobilização das  $\beta$ -glicanas presentes na parede celular, tornando a autólise, nestes casos, importante para a sobrevivência do fungo à medida que regiões da cultura continuam a crescer em resposta à reciclagem dos produtos oriundos da degradação (WHITE *et al.*, 2002). O mecanismo de repressão causado pela glicose controla inúmeros genes que participam da metabolização de fontes de carbono. Em leveduras, a proteína Mig1 permanece ligada ao DNA, impedindo a transcrição de determinados genes. Outra proteína, a quinase Snf1 sequestra a Mig1 permitindo então, que ocorra a transcrição. Snf1 é controlada pelos níveis de glicose presentes no meio, sendo ativada em baixas concentrações (CARLSON, 1999).

Em nossos experimentos, a análise da fração intracelular solúvel dos cultivos de *M. anisopliae* nas diferentes fontes de carbono revelou a atividade de  $\beta$ -1,3-glicanases em todas as condições testadas, com exceção de glicose 1% em três dias de cultivo, indicando a presença de  $\beta$ -1,3-glicanases neste fungo no espaço intracelular e/ou associadas à parede. RAST *et al.* (2003), em uma revisão sobre enzimas associadas à parede celular nos fungos, descreve as glicanases como enzimas genuinamente associadas à parede celular estando também presentes no periplasma. Em *T. harzianum*,  $\beta$ -glicanases estão presentes no periplasma, ligadas à parede celular, ou secretadas no meio. Três  $\beta$ -glicanases purificadas a partir da massa micelial são descritas em *Aspergillus fumigatus* (FONTAINE *et al.*, 1997). Duas delas são exo-glicanases e a outra uma endo-glicanase. Em 1993, uma endo- $\beta$ -1,3-glicanase associada à parede celular de *S. cerevisiae* foi purificada (MRSA *et al.*, 1993).

A produção de  $\beta$ -1,3-glicanases por *M. anisopliae* em larga escala em meio de cultivo suplementado com parede celular de *R. solani* 0,5% ou NAG 0,5% foi realizada com o intuito de se aumentar a atividade total enzimática para a sua posterior purificação.

Enzimas com capacidade de degradar  $\beta$ -1,3-glicanas têm sido purificadas e caracterizadas em bactérias e fungos. Várias técnicas de cromatografia já foram descritas para a purificação de glicanases, como gel filtração, afinidade, troca iônica e interação hidrofóbica. Geralmente se faz necessária a utilização seqüencial de mais de uma técnica para a obtenção de enzimas puras (PITSON *et al.*, 1993). Em *S. cluvaricum*, três glicanases foram purificadas por RAPP (1992), com o emprego de uma coluna de troca iônica seguida de uma de filtração em gel. BARA *et al.* (2003), com a

utilização das mesmas resinas, entretanto na ordem inversa, purificaram uma exo- $\beta$ -1,3 glicanase de *T. asperellum*. Em 2000, RAMOT *et al.*, purificaram uma  $\beta$ -1,3-glicanase de *T. harzianum* pela adição de uma coluna de interação hidrofóbica entre as colunas de troca iônica e gel filtração.

O protocolo de purificação que utilizamos neste trabalho baseou-se, principalmente, naqueles descritos para a purificação de  $\beta$ -1,3-glicanases de fungos filamentosos como *Trichoderma* spp e consistiu no emprego de duas etapas: primeiramente foi utilizada uma coluna de troca iônica forte, Q-Sepharose *Fast Flow*; seguida de uma coluna de gel filtração (Superdex 75). Uma  $\beta$ -1,3-glicanase produzida a partir da fermentação em meio contendo parede celular foi parcialmente purificada sendo eluída na primeira etapa com, aproximadamente, 200mM de sal (NaCl). Na segunda etapa, a  $\beta$ -1,3-glicanase foi purificada nas frações iniciais da coluna Superdex 75. A sua massa molecular (95kDa) foi estimada em gel SDS-PAGE 12%. Embora não existam relatos da purificação de glicanases em *M. anisopliae*, a massa molecular estimada da proteína é condizente com as demais glicanases descritas em fungos filamentosos as quais são bastante variadas, tendo sido descrita uma de 83kDa em *T. asperellum* (BARA *et al.*, 2003) e outra de 85kDa em *S. cluconicum* (RAPP, 1992).

A  $\beta$ -1,3-glicanase produzida em fermentação com NAG 0,5% foi eluída na primeira etapa (coluna de troca iônica) em uma concentração de 150mM de sal e, na segunda, nas frações iniciais, de forma semelhante ao da enzima secretada em meio com parede celular. O protocolo de purificação, no entanto, não pareceu ser eficiente, pois o padrão em gel SDS-PAGE 12% revelou a existência de inúmeras bandas de proteína. Porém, em gel nativo, uma das frações da coluna de gel filtração mostrou uma

única banda de proteína de aproximadamente 95kDa. Devido às semelhanças existentes durante as etapas de purificação, pode-se supor que a proteína secretada em ambas as condições é a mesma, podendo a contaminação protéica existente ser devida à secreção de outras  $\beta$ -1,3-glicanases nos cultivos com NAG 0,5%. Porém, a existência de  $\beta$ -1,3-glicanases distintas com massas moleculares semelhantes também é descrita. Em *Acremonium* sp., enzimas com atividade de  $\beta$ -1,3-glicanase secretadas deste fungo no meio de cultivo foram purificadas com a passagem em coluna de troca iônica em sistema FPLC. Seu perfil eletroforético em gel SDS-PAGE 12% demonstrou a presença de uma única banda para cada uma das proteínas, tendo todas massa molecular de 81kDa (McDOUGALL & SEVIOUR, 2004).

Confirmamos a presença de um gene de  $\beta$ -1,3-glicanase no genoma de *M. anisopliae*, linhagem E<sub>6</sub>. A hibridização com um fragmento de 582pb com homologia a exo- $\beta$ -1,3-glicanases de fungos filamentosos resultou na marcação de bandas únicas de DNA no genoma de *M. anisopliae* indicando a presença deste gene em cópia única. Em *T. harzianum*, o gene de uma endo- $\beta$ -1,3-glicanase, a BGN13.1, também foi sugerido ser de cópia única no genoma (DE LA CRUZ *et al.*, 1995).

O fragmento de DNA de 582pb foi isolado a partir de um experimento de RDA por DUTRA *et al.* (2004). A seqüência predita de aminoácidos deste fragmento de DNA foi comparada com a de outras glicanases presentes em bancos de dados. Foi observada homologia parcial com um precursor de uma exo- $\beta$ -1,3-glicanase de *T. harzianum* e com uma proteína hipotética de um precursor de uma exo- $\beta$ -1,3-glicanase de *N. crassa*. A exo- $\beta$ -1,3-glicanase de *T. harzianum* foi purificada e o seu gene seqüenciado em 1999 por COHEN-KUPIEC *et al.* Esta proteína é sintetizada na forma de um precursor com

1.032pb e a sua clivagem resulta em uma proteína madura (LAM1.3) com 997 aminoácidos. A glicanase LAM1.3 apresenta 41% de identidade com a proteína EXG1 de *Cochliobolus carborum* e 30% com uma endo- $\beta$ -1,3-glicanase (BGN13.1) anteriormente descrita em *T. harzianum*. A região carboxi-terminal das proteínas BGN13.1 e LAM1.3 possui motivos ricos em cisteína, dando-lhes uma estrutura única a qual pode estar envolvida com a capacidade de se ligar a componentes da membrana celular. O fragmento de uma provável exo- $\beta$ -1,3-glicanase de *M. anisopliae* não possui motivos ricos em cisteína, porém, é necessário o isolamento do seu gene completo para uma análise mais detalhada.

As glicosil-hidrolases compõem um vasto grupo de proteínas e a principal forma de classificação é baseada na seqüência de aminoácidos. Neste sistema de classificação são formadas 87 famílias, sendo a 17 composta por  $\beta$ -1,3-glicanases de eucariotos. A seqüência primária e secundária das glicanases em fungos filamentosos parece ser bastante variada, HENRISSAT *et al.* (1995) comentam que nesta classe enzimática a estrutura conformacional (estrutura tridimensional) é mais importante do que a seqüência peptídica e, devido a isto, é possível que várias famílias formadas pela homologia de sua seqüência secundária compartilhem a mesma conformação. Muitas glicosil-hidrolases possuem uma estrutura modular consistindo de um domínio catalítico e de domínios não-catalíticos, estando alguns envolvidos na interação com o substrato. A topologia dos sítios ativos pode ser, basicamente, de três formas: cratera ou bolso, fenda ou luva e túnel. As  $\beta$ -1,3-glicanases possuem o sítio em forma de fenda e isto lhes permite a ligação aleatória de várias unidades de açúcar dos substratos poliméricos (DAVIES & HENRISSAT, 1995). A importância da estrutura conformacional pode, por

exemplo, explicar o fato de a endo- $\beta$ -1,3-glicanase, BGN13.1, de *T. harzianum* não apresentar homologia na estrutura secundária com outras  $\beta$  ou  $\alpha$  glicanases de bactérias, fungos ou plantas; mas sim, estar mais intimamente relacionada às celulases. A análise do fragmento da exo- $\beta$ -1,3-glicanase de *M. anisopliae* não permitiu uma classificação mais apurada dentro das glicosil-hidrolases, devido à inexistência de motivos conservados. Porém, como anteriormente mencionado, uma análise mais profunda só será permitida com o isolamento da seqüência completa do gene.

A presença de um gene referente a uma exo- $\beta$ -1,3-glicanase no genoma de *M. anisopliae*, bem como a detecção da atividade de  $\beta$ -1,3-glicanases em diferentes cultivos confirma a sua existência neste entomopatógeno. A importância das  $\beta$ -1,3-glicanases em variados aspectos do desenvolvimento dos fungos e o seu envolvimento na infecção de hospedeiros justifica o seu estudo em *M. anisopliae*.

A produção de anti-soro contra as  $\beta$ -1,3-glicanases obtidas auxiliará no estudo do processo de infecção de *M. anisopliae* em *B. microplus* e permitirá a realização de ensaios de imunohistoquímica para determinar a localização celular destas enzimas. Por fim, o isolamento de genes de glicanases de *M. anisopliae* possibilitará um melhor entendimento deste sistema hidrolítico e seu potencial biotecnológico pela utilização de técnicas de biologia molecular.

## 6. CONCLUSÕES

O entomopatógeno *M. anisopliae*, linhagem E<sub>6</sub>, produz enzimas do tipo  $\beta$ -1,3-glicanases quando cultivado em meio TLE suplementado com diferentes fontes de carbono;

A produção de  $\beta$ -1,3-glicanases pela linhagem E<sub>6</sub> de *M. anisopliae* é influenciada pela fonte de carbono utilizada;

Cultivos suplementados com glicose 1% mostram que a secreção de  $\beta$ -1,3-glicanases é inibida, sendo a atividade restaurada com a exaustão do monossacarídeo no meio de cultivo;

O protocolo empregado para a purificação de  $\beta$ -1,3-glicanases produzidas em fermentações de *M. anisopliae* em meio TLE suplementado com parede celular de *R. solani* ou NAG 0,5% foi eficiente para a purificação parcial enzimática;

A linhagem E<sub>6</sub> de *M. anisopliae* possui pelo menos um gene de exo- $\beta$ -1,3-glicanase putativa em cópia única no genoma.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR-USCANGA, B.; FRANÇOIS, J. M. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in Applied Microbiology*. 37: 268 – 274, 2003.

ALMEIDA, J. E., FILHO, A. B. Banco de microorganismos entomopatogênicos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 20: 30 – 35, 2001.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. GAPPED BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nuclei Acids Research*. 25(17): 3389 – 3402, 1997.

ALVES, S. B. *Controle microbiano de insetos*. FEALQ. Piracicaba, 1998.

AONO, R.; SATO, M.; YAMAMOTO, M.; HORIKOSHI, K. Isolation and partial characterization of an 87-kilodalton  $\beta$ -1,3-glucanase from *Bacillus circulans* IAM1165. *Applied and Environmental Microbiology*. 58 (2): 520 – 524, 1992.

ARRUDA, W.; LÜBECK, I.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* structures during the penetration events leading to the infection of the tick *Boophilus microplus*. *Experimental and Applied Acarology* (artigo submetido), 2004.

ATHAYDE, A. C. R.; FERREIRA, U. L.; LIMA, E. A. L.A. Fungos entomopatogênicos, uma alternativa para o controle do carrapato bovino *Boophilus microplus*. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 21: 12 -15, 2001.

BAGGA, S.; HU, G.; SCREEN, S. E.; ST. LEGER, R. J. Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene*. 324: 159 – 169, 2004.

BARA, M. T. F.; LIMA, A. L.; ULHOA, C. J. Purification and characterization of an exo- $\beta$ -1,3 glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. *FEMS Microbiology Letters*. 219: 81 – 85, 2003.

BARATTO, C. M.; SILVA, M. V.; SANTI, L.; PASSAGLIA, L.; SCHRANK, I. S.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Expression and characterization of the 42 kDa chitinase of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* in *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*. 49: 1 – 4, 2003.

BARRETO, C. C.; STAATS, C. C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of *N*-Acetylglucosamine in protein secretion. *Current Microbiology*. 48: 102 – 107, 2004.

BATTA, Y. A. Production and testing of novel formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Crop Protection*. 22 (2): 415 – 422, 2003.

BENJAMIN, M. A.; ZHIOUA, E.; OSTFELD, R. S. Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Vector Control and Pest Management Resistance*. 39 (5): 723 – 728, 2002.

BIDOCHKA, M. J.; ST. LEGER, R. J.; ROBERTS, D. W. Mechanism of deuteromycetes fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. *Memors of the Entomology Society of Canada*. 171: 213 - 224, 1997.

BITTENCOURT, V. P, Trials to control south American ticks with entomopathogenic fungi. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 916: 555 – 558, 2000.

BITTENCOURT, V. P; BAHIANSE, T. C.; FERNANDES, E. K. K.; SOUZA, E. J. Avaliação da ação *in vivo* de *Metarhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF, 1879) SOROKIN, 1883 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI:IXIDIDAE). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 12 (1): 38 – 42, 2003.

BITTENCOURT, S. E. T.; CASTRO, L. A.; FARIAS, S. E.; BAO, S. N.; SCHRANK, A.; VAINTEIN, M. H. Purification and ultrastructural localization of a copper–zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) from the entomopathogenic and acaricide fungus *Metarhizium anisopliae*. *Research in Microbiology*. 155: 681 – 687, 2004.

BITTENCOURT, V. P., MASCARENHAS, A. G., FACCINI, J. H., Mecanismo de Infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. *Ciência Rural*. 29 (2): 351 - 354, 1999.

BITTENCOURT, V. P., SOUZA E. J., PERALVA S. S., et al. Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschiokoff, 1879) Sorokin, 1883 em teste de campo com bovinos infestados por carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de medicina veterinária*. 21 (2): 78 - 82, 1999.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. Improved silver staining of plant proteins, RNA, and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis*. 8: 93 - 99, 1987.

BOGO, M. R.; ROTA, C. A.; PINTO, H.; OCAMPOS, M.; CORREA, C. T.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. A chitinase encoding gene (chit1 gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. *Current Microbiology*. 37: 221 – 225, 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analysis Biochemistry*. 72 : 248 - 254, 1976.

- BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, M. Introduction: fungal biological control agents: progress, problems and potential. In: *Fungi as Biocontrol Agents*. CAB International. 2001.
- CASTRO, J. J., NEWSON, R. M. Host resistance in cattle tick control. *Parasitology Today*. 9 (1): 13 - 17, 1993.
- CLARKSON J. M., CHARNLEY A. K. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology*. 4 (5): 197 - 203, 1996.
- COHEN-KUPIEC, R.; BROGLIE, K. E.; FRIESEM, D.; BROGLIE, R. M.; CHET, I. Molecular characterization of a novel  $\beta$ -1,3 exoglucanase related to mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *Gene*. 226: 147 – 154, 1999.
- COLE, S. C. J.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Purification and partial characterization of a novel trypsin-like cysteine protease from *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*. 113: 189 – 196, 1993.
- CORREIA, A. C. B.; FIORIN, A. C.; MONTEIRO, A. C., VERÍSSIMO, C. J. Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in stabled cattle. *Journal Invertebrate Pathology*. 71: 189 - 191, 1998.
- COSTA, A. M. Análise regulatória da síntese e da secreção de proteases e de  $\beta$ -1,3 glicanase do fungo *Metarhizium anisopliae*. Dissertação de mestrado. Porto Alegre, 2003.
- CURRAN, J., DRIVER, F., BALLARD, J.W.; BALLARD, J. W. O.; MILNER, R. J. Phylogeny of *Metarhizium*: analysis of ribosomal DNA sequence data. *Mycology Research*. 98 (5): 547 - 552, 1994.
- DAVIES, G.; HENRISSAT, B. structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*. 3: 853 – 859, 1995.
- DE LA CRUZ, J.; LLOBELL, A. Purification and properties of a basic endo- $\beta$ -1,6 glucanase (BGN16.1) from the antagonistic fungus *Trichoderma harzianum*. *European Journal of Biochemistry*. 265: 141 – 151, 1999.
- DE LA CRUZ, J.; PINTOR-TORO, J. A.; BENÍTEZ, T.; LLOBELL, A.; ROMERO, L. C. A novel endo- $\beta$ -1,3 glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *Journal of Bacteriology*. 177 (23): 6937 – 6945, 1995.
- DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, J. W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycology Research*. 104: 134 -150, 2000.

DUTRA, V.; NAKASATO, L.; BROETTO, L.; SCHRANK, I. S.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during infection process of the tick *Boophilus microplus*. *Research in Microbiology*. 155(4): 245 - 251, 2004.

EL-KATATNY, M. H.; GUDELJ, M.; ROBRA, K. M.; ELNAGRY, M. A.; GÜBITZ, G. M.; Characterization of a chitinase and an endo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 56: 137 – 143, 2001.

FLEET, G. H.; PHAFF, H. J. Glucanases in *Schizosaccharomyces*. *The Journal of Biological Chemistry*. 249 (6): 1717 – 1728, 1974.

FONTAINE, T.; HARTLAND, R. P.; DIAQUIN, M.; SIMENEL, C.; LATGE, J. P. Differentil patterns of activity displayed by two exo- $\beta$ -1,3-glucanases associated with the *Aspergillus fumigatus* cell wall. *Journal of Bacteriology*. 179 (10): 3154 – 3163, 1997.

FRAZZON, A. P., VAZ JUNIOR, I., MASUDA, A., SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. In vitro assesment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vetererinary Prasitology*. 94: 117 -125, 2000.

FREIMOSER, F. M.; SCREEN, S.; BAGGA, S.; HU, G.; ST. LEGER, R. J. Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. *Microbiology*. 149: 239 – 247, 2003.

GINDIN, G.; SAMISH, M.; ZANGI, G.; MISHOUTCHENKO, A.; GLAZER, I. The susceptibility of different species and stages of ticks to entomopathogenic fungi. *Experimental and Applied Acarology*. 28: 283 – 288, 2002.

GONZALES, J. C. O controle do carrapato do boi. Porto Alegre. 2ª ed. 1995.

GRONVOLD, J.; HENRIKSEN, S. A.; LARSEN, M.; NANSEN, P.; WOLSTRUP, J. Biological control aspects of biological control - with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. *Veterinary Parasitology*. 64: 47 – 64, 1996.

HEGEDUS, W. D.; KHACHATOURIANS, G. G. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotechnology Advances*. 13 (3): 455 – 490, 1995.

HENRISSAT, B.; CALLEBAUT, I.; FABREGA, S.; LEHN, P.; MORNON, G. P.; DAVIES, G. Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 92: 7090 – 7094, 1995.

HERNÁNDEZ, C. A.; MOSSARD, C. L.; FONSECA, A. H.; SOARES, C. O.; COSTA, F. A. Avaliação da infestação de carrapatos a campo em bovinos vacinados com o imunógeno recombinante Bm 86. *Revista Brasileira de Medicina veterinária*. 20 (4): 165 - 168, 1998.

HONG, T. Y.; CHENG, C. W.; HUANG, J. W.; MENG, M. Isolation and biochemical characterization of an endo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Streptomyces sioyaensis* containing a C-terminal family 6 carbohydrate-binding module that binds to 1,3- $\beta$ -glucan. *Microbiology*. 148: 1151 – 1159, 2002.

IZGÜ, F.; ALTINBAY, D. Isolation and characterization of the K5-type yeast killer protein and its homology with an exo- $\beta$ -1,3-glucanase. *Bioscience Biotechnology and Biochemyc*. 68 (3): 685 – 693, 2004.

KAAYA, G. P.; HASSAN, S. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. *Experimental and Applied Acarology*. 24: 913 – 926, 2000.

KANG, S. C.; PARK, S.; LEE, D. G. Purification and characterization of a noval chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 73: 276 – 281, 1999.

KLEBL, F.; TANNER, W. Molecular cloning of a cell wall exo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*. 171 (11): 6259 – 6264, 1989.

KULMINSKAYA, A. A.; THOMSEN, K. K.; SHABALIN, K. A.; SIDORENKO, I. A.; ENEYSKAYA, E. V.; SAVEL'EV, A. N.; NEUSTROEV, K. N. Isolation, enzymatic properties and mode of action of an exo- $\beta$ -1,3 glucanase from *Trichoderma viride*. *European Journal of Biochemistry*. 268: 6123 – 6131, 2001.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680 – 685, 1970.

LIU, Z. Y.; LIANG, Z. Q.; WHALLEY, A. J. S.; YAO, Y. J.; LIU, A. Y. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 78: 178 – 182, 2001.

LOMER, C. J.; BATEMAN, R. P.; JOHNSON, D. L.; LANGEWALD, J.; THOMAS, M. Biological control of locusts and grasshoppers. *Annual Review of Entomology*. 46: 667 – 702, 2001.

LUZ, C.; TIGANO, M. S.; SILVA, I. G.; CORDEIRO C. M. T.; ALJANABI, S. M. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. *Memorial do Instituto Oswaldo Cruz*. 93 (6): 839 – 846, 1998.

MCCOY, C. W.; TIGANO-MILANI, M. S. Use of entomopathogenic fungi in biological control: A world view. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 27: 87 – 93, 1992.

- MCDUGALL, J. B. M.; SERVIOUR, R. J. Purification and characterization of the  $\beta$ -1,3 glucanases from *Acremonium* sp. IMI 383068. *FEMS Microbiology Letters*. 230: 259 – 264, 2004.
- MELO, I. S., AZEVEDO, J. L. Controle Biológico. *Embrapa meio ambiente*. v. 2, Jaguariúna, SP, 2000.
- MENDGEN, K.; HAHN, M.; DEISING, H. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*. 34: 367 – 386, 1996.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31: 426 – 428, 1959.
- MITCHEL, A. D.; TAYLOR, I. E. Cell-Wall proteins of *Aspergillus niger* and *Clavetomium globosum*. *Journal of General Microbiology*. 50: 103 – 109, 1969.
- MONTEIRO, A. C.; FIORIN, A. C.; CORREIA, A. C. B. Pathogenicity of isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin towards the cattle tick *Boophilus microplus* (can.) (Acari:Ixodidae) Under laboratory conditions. *Revista de Microbiologia*. 29:109 - 112, 1998.
- MORAES, C. K.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Current Microbiology*. 46: 205 – 210, 2003.
- MRSA, V.; KLEBL, F.; TANNER, W. Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* gene product, a cell wall endo- $\beta$ -1,3-glucanase. *Journal of Bacteriology*. 175 (7): 2102 – 2106, 1993.
- MUTHUKUMAR, G.; SUHNG, S.; MAGEE, P. T.; JEWELL, R. D.; PRIMERANO, D. A. The *Saccharomyces cerevisiae* SPR1 gene encodes a sporulation-specific exo-1,3- $\beta$ -glucanase which contributes to ascospore thermoresistance. *Journal of Bacteriology*. 175 (2): 386 – 394, 1993.
- NORONHA, E. F.; ULHOA, C. J. Characterization of a 29-Kda  $\beta$ -1,3 glucanase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*. 183: 119 – 123, 2000.
- NORONHA, F. E.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; ULHOA, C. J. Regulation of 36-KDa  $\beta$ -1,3 glucanase synthesis in *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*. 188: 19 – 22, 2000.
- PINTO, A. S.; BARRETO, C. C.; SCHRANK, A.; ULHOA, C. J.; VAINSTEIN, M. H. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Microbiology*. 43: 322 - 327, 1997.

PITSON, S. M.; SEVIOUR, R. J.; McDOUGALL, B. M. Noncellulolytic fungal  $\beta$ -glucanases: Their physiology and regulation. *Enzyme Microbiology and technology*. 15: 178 – 192, 1993.

PITSON, S. M.; SEVIOUR, R. J.; McDOUGALL, B. M. Production of  $\beta$ -glucan degrading enzymes by *Acremonium* and *Cephalosporium* species. *Mycology Research*. 101 (2): 153 – 258, 1997.

RAMOT, O.; COHEN-CUPIEK, R.; CHET, I. Regulation of  $\beta$ -1,3-glucanase by carbon starvation in the mycoparasite *Trichoderma harzianum*. *Mycology Research*. 104 (4): 415 – 420, 2000.

RAPP, P. Formation, separation and characterization of three  $\beta$ -1,3-glucanases from *Sclerotium glucanicum*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1117: 7 – 14, 1992.

RAST, D. M.; BOUMGARTNER, D.; MAYER, C.; HOLLENSTEIN, G. O. Cell wall-associated enzymes in fungi. *Phytochemistry*. 64: 339 – 366, 2003.

ROBBS, C. F.; BITTENCOURT, A. M. Controle biológico de insetos: O controle biológico de insetos nocivos à agricultura com o emprego de fungos imperfeitos ou hifomicetos. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*. 1 (6): 10 – 12, 1998.

ROBERTS, D. W. World Picture of biological control of insects by fungi. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz*. 84: 89 - 100, 1989.

ROCHA, C. M. B. M. Aspectos relevantes da biologia do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Informativo técnico – Universidade Federal de Lavras*. 2000.

ROCHA, C. M. B. M. Importância do carrapato *Boophilus microplus*, Canestrini, 1887 (Acarina, Ixodiadae) no processo produtivo do leite. *Informativo técnico – Universidade Federal de Lavras*. 2000.

SAMUELS, R. I.; PATERSON, I. C.; Cuticle degrading proteases from insect moulting fluid and culture filtrates of entomopathogenic fungi. *Company of Biochemistry and Physiology*. 110B (4): 661 – 669, 1995.

SATTAROVA, R. S. Isolation, purification, and certain properties of  $\beta$ -1,3-glucanase from the fungus *Verticillium dahliae*. *Chemistry of Natural Compounds*. 37 (2): 177 – 180, 2001.

SCHOLTE, E. J.; NJIRU, B. N.; SMALLEGANGE, R. C.; TAKKEN, W.; KNOLS, B. G. Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malaria Journal*. 29 (2): 1 – 8, 2003.

SHAH, P. A.; PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 61: 413 – 423, 2003.

SILVA, W. O. B.; MITIDIERI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry* (in press).

SILVA, M. V.; SANTI, L.; STAATS, C. C.; COSTA, A. M.; DRIEMEIER, D.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. The cuticle-induced endo/exo acting-chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is induced by an ortholog of the *chi3* gene. *Research in Microbiology* (in press), 2004.

SOUZA, M. L. Utilização de microorganismos na agricultura. *Biotecnologia ciência e desenvolvimento*. 21: 28 - 31, 2001.

ST. LEGER, R. J.; BUTT, T. M.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Mycology*. 13: 253 – 262, 1989.

ST. LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Regulation of production of chitinolytic enzymes. *Journal of General Microbiology*. 132: 1509 – 1517, 1986.

ST. LEGER, R. J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; ROBERTS, D. W. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 93: 6349 – 6354, 1996.

ST. LEGER, R. J.; JOSHI, L.; ROBERTS, D. W. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Applied Environmental Microbiology*. 64: 709 - 713, 1998.

SUN, L.; GURNON, J. R.; ADAMS, B. J.; GRAVES, M. V.; VAN ETEN, J. L. Characterization of a  $\beta$ -1,3-glucanase encoded by Chorella virus PCBV-1. *Virology*, 276: 27 – 36, 2000.

ULHOA, C. J.; PEBERDY, J. F. Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. *Journal of General Microbiology*. 137: 2163 – 2169, 1991.

VAZ JÚNIOR, I., TERMIGNONI, C., MASUDA, A. Controle Imunológico do carrapato bovino. *A Hora Veterinária*. 115: 48 - 52, 2000.

WHITE, S.; McINTYRE, M.; BERRY, D. R.; McNEIL, B. The outolysis of industrial filamentous fungi. *Critical Reviews in Biotechnology*. 22 (1): 1 – 14, 2002.

YAHATA, N.; WATANABE, T.; NAKAMURA, Y.; YAMAMOTO, Y.; KAMIMIYA, S.; TANAKA, H. Structure of the gene encoding  $\beta$ -1,3-glucanase A1 of *Bacillus circulans* WL-12. *Gene*. 86: 113 – 117, 1990.

