

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**VETERINÁRIAS**

**DISSERTAÇÃO**

**Avaliação do perfil protéico da postura de fêmeas de**  
***Rhipicephalus microplus* infectadas por *Metarhizium***  
***anisopliae***

**Patrícia Silva Golo**

**2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL PROTÉICO DA POSTURA DE FÊMEAS DE  
*Rhipicephalus microplus* INFECTADAS POR *Metarhizium anisopliae***

**PATRÍCIA SILVA GOLO**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt**

*e Co-orientação da Professora*  
**Cristiane Martins Cardoso de Salles**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração de Parasitologia Veterinária.

Seropédica, RJ  
Julho de 2011

595.429

G627a

T

Golo, Patrícia Silva, 1987-

Avaliação do perfil protéico da postura de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* infectadas por *Metarhizium anisopliae* / Patrícia Silva Golo - 2011.

54 f.: il.

Orientador: Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 35-44.

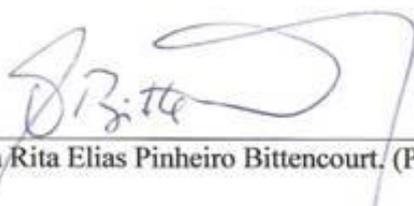
1. Carrapato - Controle - Teses. 2. Fungos entomopatogênicos - Controle biológico - Teses. 3. *Boophilus microplus* - Teses. 4. *Boophilus microplus* - Ovos - Teses. 5. *Metarhizium anisopliae* - Teses. I. Bittencourt, Vânia Rita Elias Pinheiro, 1959-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

PATRICIA SILVA GOLO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

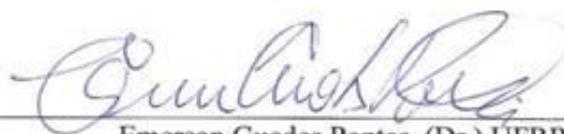
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 19/08/2011



Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt. (Ph.D.) UFRRJ



Everton Kort Kamp Fernandes. (Dr.) UFG



Emerson Guedes Pontes. (Dr.) UFRRJ

*Dedico este trabalho  
aos meus pais, aos meus guias,  
e a todos que amam a ciência!*

## AGRADECIMENTOS

O meu primeiro obrigado vai para o nosso *Senhor*, obrigado meu Deus por estar sempre ao meu lado, mesmo quando eu fazia questão de não te ver. Obrigado por nunca me deixar!

Agradeço aos meus pais *Marco Antonio de Paula Gôlo* e *Josedilma Silva Gôlo*. Pai e mãe eu amo vocês, ontem, hoje e sempre. Obrigado por sempre me apoiarem, pela ajuda de toda uma vida, pela dedicação, pelo amor incondicional, pelos conselhos e por sempre me ouvirem! Obrigado aos meus irmãos *Paulo Henrique Silva Gôlo* e *Marcos Paulo Silva Gôlo* pelo apoio de sempre e é claro por sempre me fazerem rir! Amo vocês Ique e MP!

Gostaria de agradecer imensamente a minha orientadora *Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt* por me guiar, me fazendo caminhar da melhor forma possível por estradas nem sempre fáceis; obrigado pelas palavras amigas, pela segurança e apoio! Muito obrigado mesmo! Eu não seria metade do que sou sem sua ajuda!

Obrigado as minhas queridas amigas e “roommates” *Mariana Guedes Camargo*, *Virginia Coimbra Zuvanov*, *Ana Paula Rodrigues de Moraes Badini*. Mari sua amizade e ajuda foram fundamentais para a realização desse trabalho, não tenho palavras para te agradecer, eu te amo! Vir, minha querida, sua amizade é algo que quero pra sempre! Obrigado pelas conversas, conselhos e gentileza de sempre! Ana, sua luz é tão intensa que me ilumina até de Macuco!

Obrigado a minha querida amiga *Isabele da Costa Angelo*. Clins não sei o que faria sem a sua ajuda! Obrigado por estar sempre presente e disposta a me ajudar, por me ouvir nas questões de trabalho e pessoais, pelos conselhos, por ter revisado essa dissertação e tantos outros trabalhos milhões de vezes e nem assim reclamar! Te amo! Obrigado a *Huarrisson Azevedo Santos* e a *Pedro Angelo Santos* por estarem ao lado da minha amiga. Huarrisson, obrigado pelo uso dos equipamentos! Fundamental!

Obrigado aos meus amigos e companheiros de laboratório *Wendell Marcelo de Souza Perinotto*, pela ajuda e por sempre torcer por mim! *Simone Quinelato Bezerra*, por me lembrar que não podia (nunca) perder a calma, *Fillipe Araujo de Sá* por estar sempre pronto a me ajudar. *Caio Marcio de Oliveira Monteiro*, garotinho você é 10! E *Caio Junior Balduino Coutinho Rodrigues* por me fazer rir em momentos de aflição.

Obrigado a professora *Cristiane Martins Cardoso de Salles* pela co-orientação, ensinamentos e por sempre estar pronta a me ajudar! O obrigado à professora *Rosane Nora* pela ajuda aos “45 minutos do segundo tempo”, pela paciência e conhecimentos passados.

Obrigado também a todos os funcionários da Estação Experimental W. O. Neitz que contribuíram para a limpeza do laboratório e manutenção dos animais nos estábulos; a CAPES pelo auxílio financeiro que foi primordial para a execução deste trabalho e aos colegas e professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Obrigado aos meus amigos *Thiago dos Santos Gonçalves*, *Ana Rita Carvalho Pereira* e *Raquel Sartori Dias* que mesmo longe dos experimentos e do laboratório estiveram sempre presentes na minha vida! Amo vocês amigos!

A todos vocês meu MUITO OBRIGADO!

## BIOGRAFIA

Patrícia Silva Gôlo, filha de Marco Antônio de Paula Gôlo e Josedilma Silva Gôlo, nasceu em 10 de Abril de 1987, na cidade de Santa Isabel do Ivaí, Paraná.

Cursou o ensino fundamental e médio no colégio Prioridade Hum no município do Rio de Janeiro, tendo concluído em dezembro de 2004.

Em maio de 2005 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no curso de Medicina Veterinária, concluindo-o em fevereiro de 2010. Durante esses anos foi estagiária do Laboratório de Controle Microbiano na UFRRJ por um período de oito meses e bolsista de iniciação científica PIBIC-CNPq, no mesmo laboratório, por dois anos e meio, apresentando trabalhos em congressos e simpósios.

Durante o período de iniciação científica, em 2008 e 2009, foi premiada duas vezes com o XI e XII Prêmios de Iniciação Científica pelos trabalhos apresentados, respectivamente, durante a XVIII e XIX Jornadas de Iniciação Científica da UFRRJ. Em 2008, também, foi premiada com menção honrosa pelo destaque na apresentação do trabalho “Metodologias para infecção, coleta e conservação de hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, utilizando os fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*” durante a XVIII Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ.

Em março de 2010 foi aprovada no processo de seleção ao nível de mestrado, no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, na área de concentração em Parasitologia Veterinária, na UFRRJ, onde foi bolsista CAPES durante 18 meses.

## RESUMO

GOLO, Patrícia Silva. **Avaliação do perfil protéico da postura de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* infectadas por *Metarhizium anisopliae***. 2011. 54p Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Área de Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

Os danos econômicos causados pelo carrapato *Rhipicephalus microplus* faz desse parasito um importante alvo de pesquisas. O seu controle é realizado, principalmente, com acaricidas químicos. A utilização de fungos para controlar carrapatos é uma escolha interessante uma vez que os fungos apresentam boa capacidade de dispersão, capacidade de penetrar via cutícula dos carrapatos e algumas cepas específicas para artrópodes, contribuindo para a preservação de organismos não-alvo. Estudos relacionados ao processo de infecção fúngica, sua repercussão na maturação dos oócitos e disponibilização de nutrientes para o embrião são aspectos importantes para se compreender melhor os efeitos desta infecção em carrapatos, contribuindo para avanço no controle deste ectoparasito. Dentro deste contexto, o presente trabalho avaliou as possíveis alterações no perfil proteico da postura de fêmeas de *R. microplus* infectadas com o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* s.l. Cinco grupos (quatro tratados com *M. anisopliae* s.l. e um grupo controle), contendo 50 fêmeas cada, foram utilizados no bioensaio que consistiu na imersão das fêmeas nas concentrações conidiais ( $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$  ou  $1 \times 10^5$  conídios/mL) ou em água destilada estéril acrescida de Tween 80 0,1% (grupo controle) por três minutos. A postura diária de cada grupo foi separada e armazenada individualmente, durante 10 dias. Essas massas de ovos foram homogeneizadas separadamente, maceradas em tampão de lise celular e centrifugadas. O conteúdo protéico do sobrenadante foi determinado pelo método de Lowry modificado. O perfil proteico da postura diária foi analisado por SDS-PAGE 12. Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) quando o conteúdo proteico do grupo controle foi comparado com o dos grupos tratados. Na análise dos géis foram evidenciadas 19 bandas protéicas. Não foi observada diferença no perfil de bandas entre o grupo controle e os grupos tratados, bem como na comparação entre os perfis dos grupos tratados. Uma análise cromatográfica foi realizada para avaliação das possíveis diferenças entre os peptídeos presentes na postura de fêmeas do grupo tratado com  $1 \times 10^8$  conídios/mL e o grupo controle. Cada amostra foi pré-purificada em três concentrações de acetonitrila (ACN) (5, 40 e 80%). Após concentradas, foram submetidas à Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando uma coluna analítica de fase reversa tipo C18. A atividade antimicrobiana das frações coletadas foi testada contra *Candida albicans* e *M. anisopliae* s.l. Nove amostras reduziram o crescimento de *C. albicans* em mais de 35%. O pico que apresentou maior atividade antimicrobiana contra a levedura pertenceu ao oitavo dia de postura do grupo infectado. Este pico resultou da pré-purificação em 5% de ACN e não foi observado em nenhum outro cromatograma. Este pico foi responsável por, em média, 80,94% de redução no crescimento da levedura. Não houve atividade microbiana destas amostras contra *M. anisopliae* s.l. O presente trabalho reporta, pela primeira vez, resposta induzida na postura de fêmeas de *R. microplus* infectadas com o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* s.l.

**Palavras-chave:** fungos entomopatogênicos, carrapatos, atividade antimicrobiana, ovos.

## ABSTRACT

GOLO, Patricia Silva. **Protein profile of eggs from *Rhipicephalus microplus* ticks infected by *Metarhizium anisopliae*.** 2011. 54p Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Área de Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

*Rhipicephalus microplus* ticks are an important research target because it causes severe economic losses. Parasite control, in general, is based on the use of chemical acaricides. Entomopathogenic fungi are potential candidates as biocontrol agents due to its dispersibility, its ability to penetrate through the arthropods's cuticle and the relatively specificity to arthropods, contributing to the preservation of non-target organisms. Therefore, studies of fungal infection mechanism and of the effects of the infection on oocytes maturation and on nutrients availability to the embryo are aspects demanded to be explored for further comprehension of the fungi infection, as well as, the ticks' defense mechanisms. These investigations would significantly contribute to advances in tick control. The present study evaluates possible changes in the protein profile of eggs layed by *R. microplus* females infected with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* s.l. Ma 959 isolate. Bioassay was composed by five groups: four groups treated with *M. anisopliae* s.l. and one control group. Each group lead 50 females. Ticks were immersed in 1 ml of 0.1% Tween 80 aqueous conidial suspension at  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$  or  $1 \times 10^5$  conidia  $\text{ml}^{-1}$  for three minutes. The control group was immersed in 1 ml of 0.1% Tween 80 aqueous solution with no conidia. Eggs were separated daily, for the first ten days of oviposition and stored at  $-20^\circ\text{C}$ . Egg masses were separately homogenized, ground with lyses buffer and centrifuged. The protein content of supernatant was determined by the method of Lowry with modifications. Samples were analyzed through a 12%-polyacrylamide electrophoresis gel under denaturing conditions (SDS-PAGE). There was no significant ( $p \leq 0.05$ ) difference in the total protein content between the eggs from infected and non-infected groups. Nineteen protein bands were observed on the SDS-PAGE. No difference was observed in the bands profile between the control and the infected groups. In addition, no differences was observed in the profiles of groups treated with different concentrations of conidia. Eggs from females infected with the highest fungal concentration or from non-infected females were used for HPLC analysis. Samples were pre-purified by solid phase extraction. Elution steps were performed with 5, 40, and 80% acetonitrile (ACN). Samples were then submitted to a HPLC using an analytic C18 reverse-phase column. The antimicrobial activity of samples collected by HPLC was tested against *Candida albicans* and *M. anisopliae* s.l. Nine samples reduced *C. albicans* growth over than 35%. The fraction with the highest antimicrobial activity to *C. albicans* was collected from eggs from day 8 of oviposition of infected engorged females. This fraction was pre-purified in 5% of ACN, caused 80.94% reduction of growth of *C. albicans* and was not observed in any other chromatogram. There was no antimicrobial activity against *M. anisopliae* s.l. The present study reportes, for the first time, induced response in eggs from *R. microplus* females infected by the entomopathogenic fungus *M. anisopliae* s.l.

**Key words:** entomopathogenic fungi, ticks, antimicrobial activity, eggs.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Conteúdo protéico total, expresso em micrograma de proteína por miligrama de ovos de *Rhipicephalus microplus*, dos grupos controle ou dos grupos de fêmeas infectadas por *Metarhizium anisopliae* s.l., em diferentes concentrações conidiais, sob condições controladas de laboratório ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $\text{UR} \geq 80\%$ , escotofase). As médias são seguidas pelo desvio padrão.  
..... 16

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus microplus*. Fixação da larva no hospedeiro seguida de alimentação sanguínea (1); muda para ninfa, nova alimentação sanguínea (2) e muda para adulto (3); a fêmea adulta totalmente ingurgitada cai ao solo e realiza a postura (4); ovos desenvolvendo-se no ambiente e eclosão das larvas, que procuram por hospedeiro (5). ..... 3

**Figura 2.** Conteúdo protéico total, expresso em  $\mu\text{g}$  de proteína/mg de ovos de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* infectadas por diferentes concentrações de *Metarhizium anisopliae* s.l. ou tratadas com água destilada estéril acrescida de Tween 80 (controle). O conteúdo protéico do homogenato de ovos foi determinado pelo método de Lowry. As barras indicam o desvio padrão para cada amostra. Durante o período de postura, as fêmeas foram mantidas sob condições controladas de laboratório ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $\text{UR} \geq 80\%$ , escotofase). ..... 17

**Figura 3.** SDS-PAGE (12%) dos ovos de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* infectadas por *Metarhizium anisopliae* s.l., ao longo dos quatro primeiros dias de postura sob condições controladas ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $\text{UR} \geq 80\%$ , escotofase). P- Padrões de peso molecular: **198 kDa, 115 kDa, 96 kDa, 53 kDa, 37 kDa, 29 kDa, 19 kDa, 6 kDa**; Ctr-Grupo controle;  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  - postura de fêmeas tratadas com suspensão de *M. anisopliae* s.l. nas concentrações de  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  conídios/mL, respectivamente. .... 19

**Figura 4.** SDS-PAGE (12%) dos ovos de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* infectadas por *Metarhizium anisopliae* s.l., ao longo do quinto, sexto, sétimo e oitavo dias de postura sob condições controladas ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $\text{UR} \geq 80\%$ , escotofase). P- Padrões de peso molecular: **198 kDa, 115 kDa, 96 kDa, 53 kDa, 37 kDa, 29 kDa, 19 kDa, 6 kDa**; Ctr-Grupo controle;  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  - postura de fêmeas tratadas com suspensão de *M. anisopliae* s.l. nas concentrações de  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  conídios/mL, respectivamente. .... 20

**Figura 5.** SDS-PAGE (12%) dos ovos de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* infectadas por *Metarhizium anisopliae* s.l., ao longo do nono e décimo dias de postura sob condições controladas ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $\text{UR} \geq 80\%$ , escotofase). P- Padrões de peso molecular: **198 kDa, 115 kDa, 96 kDa, 53 kDa, 37 kDa, 29 kDa, 19 kDa, 6 kDa**; Ctr-Grupo controle;  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  - postura de fêmeas tratadas com suspensão de *M. anisopliae* s.l. nas concentrações de  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  conídios/mL, respectivamente. .... 21

**Figura 6.** Exemplos de cromatogramas obtidos. A figura mostra cromatogramas do homogenato de ovos de *Rhipicephalus microplus* do grupo controle e do terceiro dia de postura de fêmeas tratadas com *Metarhizium anisopliae* s.l. Cada homogenato foi eluído em 5, 40 ou 80% de acetonitrila (ACN) em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto. A absorbância foi monitorada a 220 nm. .... 22

**Figura 7.** Cromatogramas do homogenato de ovos de *Rhipicephalus microplus* do grupo controle e dos quinto, oitavo e nono dias de postura de fêmeas tratadas com *Metarhizium anisopliae* s.l. Cada homogenato foi eluído em 5% de acetonitrila (ACN) em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto. A absorvância foi monitorada a 220 nm. Em sombreado as frações que apresentaram atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*. ..... 23

**Figura 8.** Cromatogramas do homogenato de ovos do quinto e sexto dias de postura de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* infectadas por *Metarhizium anisopliae* s.l. Cada homogenato foi eluído em 40% de acetonitrila (ACN) em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e um fluxo de 1mL/minuto. A absorvância foi monitorada a 220 nm. Em sombreado as frações que apresentaram atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*. ..... 24

**Figura 9.** Cromatograma do homogenato de ovos do quinto dia de postura de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* infectadas por *Metarhizium anisopliae* s.l. O homogenato foi eluído em 80% de acetonitrila (ACN) em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e um fluxo de 1mL/minuto. A absorvância foi monitorada a 220 nm. Em sombreado as frações que apresentaram atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*. ..... 24

**Figura 10.** Avaliação do crescimento de *Candida albicans* através de espectrofotometria. A postura do grupo controle e do quinto dia de postura de *Rhipicephalus microplus* infectadas por *Metarhizium anisopliae* s.l., foi pré purificada com 5, 40 ou 80% de acetonitrila (ACN). Essas frações foram submetidas à CLAE em coluna C18 fase reversa (gradiente de 65 a 100% de ACN). Vinte µL de cada pico recolhido durante a cromatografia foi acrescido de 80 µL da cultura de *C. albicans* ( $4 \times 10^5$  células/mL) e incubados a 30°C por 18 horas. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa ( $p \geq 0.05$ ) entre a absorvância do branco e dos picos. As setas indicam os picos que foram utilizados no bioensaio com *M. anisopliae* s.l. (Figura 11). ..... 25

**Figura 11.** Avaliação do crescimento de *Candida albicans* através de espectrofotometria. A postura do sexto, sétimo, oitavo e nono dias de *Rhipicephalus microplus*, infectadas por *Metarhizium anisopliae* s.l., foi pré-purificada com 5, 40 ou 80% de acetonitrila (ACN). Essas frações foram submetidas à CLAE em C18 fase reversa (gradiente de 65 a 100% de ACN). Vinte µL de cada pico recolhido durante a cromatografia foi acrescido de 80 µL da cultura de *C. albicans* ( $4 \times 10^5$  células/mL) e incubados a 30°C por 18 horas. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre a absorvância do branco e dos picos. As setas indicam os picos que foram utilizados no bioensaio com *M. anisopliae* s.l. (Figura 12). ..... 26

**Figura 12.** Teste de difusão em meio sólido com *Metarhizium anisopliae* s.l. usando os picos que apresentaram interferência no crescimento de *Candida albicans*. Nenhuma das frações apresentou atividade antimicrobiana contra *M. anisopliae* s.l. **A:** discos imersos em água destilada estéril (controle do teste de difusão em meio sólido); **B:** fração da postura do grupo controle eluída em 5% acetonitrila

(ACN), tempo de retenção (TR) de 11.764' na CLAE em C18 fase reversa (FR); **C:** fração do quinto dia de postura eluída em 5% ACN, TR de 11.053' na CLAE C18 FR; **D:** fração do quinto dia de postura eluída em 40% de ACN, TR de 5.029' na CLAE C18 FR; **E:** fração do quinto dia de postura eluída em 80% de ACN, TR de 2.642' na CLAE C18 FR; **F:** fração quinto dia de postura eluída em 80% de ACN, TR de 4.266' na CLAE C18 FR; **G:** fração do quinto dia de postura eluída em 80% de ACN, TR de 4.833' na CLAE C18 FR; **H:** fração do sexto dia de postura eluída em 40% de ACN, TR de 5.046' na CLAE C18 FR; **I:** fração do sétimo dia de postura eluída em 5% de ACN, TR de 2.762 na CLAE C18 FR; **J:** fração do oitavo dia de postura eluída em 5% de ACN, TR de 1.074 na CLAE C18 FR; **K:** fração do nono dia de postura eluída em 5% ACN, TR de 2.017' na CLAE C18 FR. As setas indicam os discos. .... 28

## LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\times g$  – força da gravidade

°C: graus Celcius

Abs: absorbância

ACN: acetonitrila

ANOVA: análise de variância

BDA: batata dextrose Agar

BHI: Caldo de infusão de cérebro e coração

CBB-G250: Comassie Coloidal

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ : sulfato de cobre hidratado

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

kDa: kilodalton

M: molar

mAbs: miliabsorbância

mL: mililitro

mm: milímetro

$\text{Na}_2\text{CO}_3$ : carbonato de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

nm: nanômetros

pH: potencial hidrogeniônico

PSMF: fenilmetilsulfonil fluoreto

rpm: rotações por minuto

TR: tempo de retenção

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

SNK: teste de Student-Newman-Keuls

T: temperatura

TFA: ácido trifluoracético

TEMED: N, N, N'- Tetrametiletlenodiamino

TLCK: N-tosil-L-lisina-clorometilcetona

Tris: trishidroximetilaminometano

UR: unidade relativa

V: volts

v/v: volume/volume

p/v: peso/volume

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>3</b>
2.1 O Carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	3
2.2 Controle Biológico Utilizando Fungos Entomopatogênicos	4
2.3 Dinâmica da Infecção Fúngica	5
2.4 O Sistema Imune de Carrapatos	7
2.5 Proteínas e Peptídeos Antimicrobianos	8
2.6 Aspectos Gerais da Anatomia e Fisiologia do Sistema Reprodutor Feminino de <i>Rhipicephalus microplus</i>	9
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>11</b>
3.1 Local do Experimento	11
3.2 Manutenção da Colônia de <i>Rhipicephalus microplus</i>	11
3.3 Obtenção e Manutenção do isolado fúngico	11
3.4 Preparo da Suspensão de <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.	11
3.5 Viabilidade dos Conídios	12
3.6 Infecção das Fêmeas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	12
3.7 Reisolamento Fúngico	12
3.8 Dosagem das Proteínas dos Ovos	12
3.8.1 Preparo das amostras de ovos	12
3.8.2 Conteúdo protéico dos ovos	12
3.9 Análise Estatística das Concentrações Protéicas	13
3.10 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida – SDS PAGE	13
3.10.1 Preparo das amostras de ovos para o SDS-PAGE	13
3.10.2 Migração eletroforética	13
3.10.3 Coloração por Coomassie	13
3.11 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência- CLAE	14
3.11.1 Preparo das amostras para a CLAE	14
3.11.2 Obtenção dos perfis cromatográficos	14
3.12 Ensaios de Atividade Antimicrobiana	14
3.12.1 Atividade antimicrobiana contra fungo leveduriforme	14
3.12.2 Atividade antimicrobiana contra <i>M. anisopliae</i> s.l.	15
3.12.2.1 Uso das frações recolhidas na CLAE	15
3.12.2.1 Uso do macerado dos ovos	15
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>16</b>
4.1 Viabilidade da Suspensão Conidial	16
4.2 Dosagem de Proteínas	16
4.2 SDS-PAGE	18
4.4 Cromatogramas	22
4.5 Atividade Antimicrobiana Contra Fungo Leveduriforme	23
4.6 Teste de Difusão em Meio Sólido Contra <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.	27
4.6.1 Uso das frações recolhidas na CLAE	27
4.6.2 Uso do macerado dos ovos	27

<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>29</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>34</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>35</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>45</b>
<b>A- Fórmula do tampão de lise duas vezes concentrado</b>	<b>46</b>
<b>B- Solução alcalina</b>	<b>47</b>
<b>C- Fórmula do gel de empilhamento 5% - 5 mL</b>	<b>48</b>
<b>D- Fórmula do gel de corrida 12% - 25 mL</b>	<b>49</b>
<b>E- Fórmula do tampão de amostra</b>	<b>50</b>
<b>F- Descrição das siglas que representam as eluições nos cartuchos de extração em fase sólida</b>	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Rhipicephalus microplus*, conhecido como carrapato dos bovinos, é um ectoparasito hematófago que ocorre em quase todas as regiões brasileiras, acarretando enormes danos econômicos. Esses prejuízos são evidenciados principalmente pela ingestão de sangue, danos ao couro causados por reações inflamatórias à picada do carrapato, diminuição na produção de carne e leite, gastos com o controle e aumento à propensão de miíases. Este carrapato também está envolvido com a transmissão de patógenos como protozoários do gênero *Babesia* e é provavelmente o vetor de rickettsias do gênero *Anaplasma*. Os maiores problemas referentes às doenças transmitidas por carrapatos estão relacionadas às raças altamente produtivas introduzidas em áreas propícias a infestação por carrapatos uma vez que estas raças não estão bem adaptadas ao parasitismo e às doenças transmitidas por este artrópode.

O combate a este ectoparasita é feito mais comumente com o uso de acaricidas químicos aplicados sobre os animais. Além dos custos relacionados a esse tipo de controle, seu uso inadequado (frequência de uso maior que a necessária e sub-diluição dos produtos) culmina em casos de populações de carrapatos resistentes, contaminação do meio ambiente e resíduos na carne e leite.

O controle de carrapatos utilizando fungos entomopatogênicos é uma alternativa à utilização de acaricidas químicos. Esse tipo de controle vem sendo considerado uma abordagem interessante, haja vista a crescente preocupação com aspectos relacionados à segurança do meio ambiente, à saúde humana e ao aumento dos custos relacionados ao uso de produtos químicos. Os fungos apresentam boa capacidade de dispersão, penetração via cutícula dos carrapatos e algumas cepas são específicas para artrópodes contribuindo para a preservação de organismos não-alvo. Testes *in vitro* demonstraram que diversos isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* s.l. possuem alta patogenicidade contra carrapatos, incluindo *R. microplus*.

Tratando-se de carrapatos, muitos aspectos relacionados à infecção fúngica não estão bem esclarecidos. Portanto, informações relacionadas ao processo de infecção fúngica, sua repercussão na maturação dos oócitos e disponibilização de nutrientes para o embrião são aspectos que precisam ser explorados para que se possa compreender melhor os efeitos causados por fungos entomopatogênicos e a capacidade do hospedeiro em responder a essa infecção, contribuindo para avanço do controle de carrapatos.

A resposta imune dos artrópodes, frente a infecções, pode ser dividida em celular e humoral. A resposta celular está relacionada aos processos de fagocitose, formação de nódulos e encapsulamento. A resposta humoral, em carrapatos, está relacionada ao encapsulamento humoral, hemaglutinação, fatores de coagulação, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, produção de enzimas, peptídeos antimicrobianos, entre outros. Ao destacar as substâncias antimicrobianas, observa-se que estas são capazes de afetar um grande número de micro-organismos, dentre eles vírus, bactérias, nematóides e fungos.

Sabe-se ainda que fatores antimicrobianos podem ser naturalmente expressos (resposta constitutiva) ou transcritos devido ao estímulo provocado por infecção (resposta induzida) e, além disso, são traduzidos e/ou estão presentes em diversos órgãos de carrapatos, incluindo os ovários.

Não existem, entretanto, estudos relacionados às alterações no perfil protéico da postura de fêmeas tratadas com agentes antimicrobianos. Sabe-se, contudo, que a eclodibilidade das larvas de *R. microplus* não é prejudicada após a infecção de fêmeas com determinados isolados de *M. anisopliae* s.l., sugerindo que este artrópode dispõe de

mecanismos que possibilitam a manutenção de seus descendentes após a infecção com este entomopatógeno.

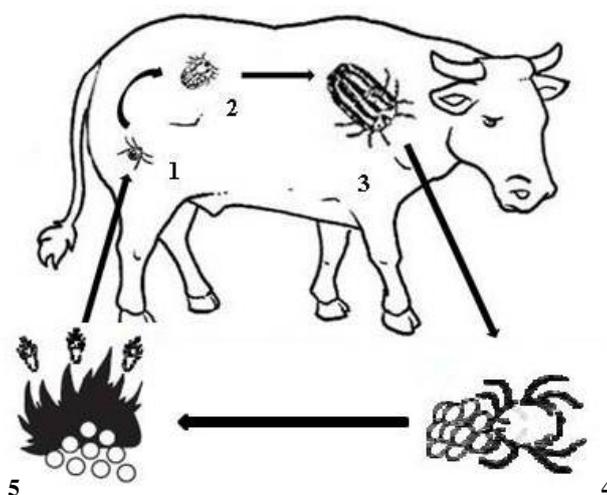
O presente estudo integra a linha de pesquisa “Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Médica e Veterinária” desenvolvida na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Este estudo avaliou as possíveis alterações no perfil protéico da postura de fêmeas de *R. microplus* infectadas pelo fungo entomopatogênico *M. anisopliae* s.l. O objetivo específico foi avaliar o perfil protéico e cromatográfico da postura das fêmeas infectadas por *M. anisopliae* s.l. através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Além disso, avaliou-se a atividade antimicrobiana da postura de fêmeas infectadas por *M. anisopliae* s.l.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O Carrapato *Rhipicephalus microplus*.

*Rhipicephalus microplus* Canestrini, 1888 (Acari: Ixodidae) (MURREL; BARKER, 2003), conhecido como carrapato dos bovinos, é um ectoparasito hematófago originário da Ásia (WHARTON, 1967). Este carrapato é homoxeno e monoxeno, ou seja, utiliza um único hospedeiro durante seu ciclo de vida e possui alta especificidade por bovinos. Entretanto, ovelha, cavalo, veado, cão, cabra, homem (GONZALES, 1974), búfalos, gatos, coelhos, cangurus, porcos e onças também podem ser hospedeiros em épocas de grande infestação nas pastagens (PEREIRA, 1980).

O ciclo de vida de *R. microplus* (Figura 1) compreende duas fases, uma parasitária e outra não parasitária. A fase parasitária realiza-se sobre o hospedeiro e envolve os estágios de larva, ninfa e adulto. A fase não parasitária realiza-se no solo e inicia-se quando a fêmea, totalmente ingurgitada, desprende-se do hospedeiro para realização da oviposição. São necessários de três a seis semanas para a postura, cerca de 22 dias para a eclosão das larvas e de dois a três dias para o fortalecimento de suas cutículas, para que então, as larvas estejam aptas à infestação iniciando-se assim a fase parasitária (FURLONG, 1993).



**Figura 1.** Ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus microplus*. Fixação da larva no hospedeiro seguida de alimentação sanguínea (1); muda para ninfa, nova alimentação sanguínea (2) e muda para adulto (3); a fêmea adulta totalmente ingurgitada cai ao solo e realiza a postura (4); ovos desenvolvendo-se no ambiente e eclosão das larvas, que procuram por hospedeiro (5).

O carrapato dos bovinos está amplamente distribuído em áreas tropicais e subtropicais do mundo (LEAL, et al. 2003) e acarreta, no Brasil, danos econômicos anuais estimados em dois bilhões de dólares (GRISI et al. 2002). Esses prejuízos são evidenciados principalmente pela ingestão de sangue, que pode chegar a 2 mL de sangue por fêmea (CARVALHO; BORELLI, 2008), danos ao couro, causados por reações inflamatórias à picada do carrapato, propensão à miíases e diminuição na produção de carne e leite (SUTHERST et al., 1983; GRISI et al., 2002).

Além das perdas relacionadas ao parasitismo propriamente dito, este carrapato atua como vetor de patógenos causadores de doenças, dentre eles, protozoários do gênero *Babesia*. (HORN; ARTECHE, 1985). Este artrópode também está provavelmente envolvido na transmissão de rickettsias do gênero *Anaplasma*, representando assim um importante agente transmissor de doenças. Os maiores problemas referentes às doenças transmitidas por carrapatos relacionam-se com a introdução de raças altamente produtivas em áreas propícias a infestação por carrapato, pois apesar da alta produtividade, estes animais tendem a ficar muito debilitados quando em contato primário com o patógeno (GEORGE et al., 2004).

Atualmente as infestações são controladas, principalmente, através da utilização de acaricidas químicos. Os maiores problemas relacionados à utilização de produtos químicos para o controle deste ectoparasito estão relacionados aos casos de resistência (GEORGE et al., 2004), ao elevado custo do controle, aos resíduos na carne e no leite e à contaminação ambiental devido ao uso inadequado desses acaricidas (FERNANDES; BITTENCOURT, 2008).

## **2.2 Controle Biológico Utilizando Fungos Entomopatogênicos.**

O uso de micro-organismos para o controle de pragas e insetos vetores foi proposto primeiramente em meados do século XIX (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). Segundo Alves (1998), os fungos foram os primeiros patógenos de insetos a serem utilizados no controle microbiano, isso porque aproximadamente 80% das doenças em insetos têm como agentes patogênicos estes micro-organismos, pertencentes a mais de 700 espécies agrupadas em cerca de 90 gêneros.

Dentre os diversos métodos utilizados no controle biológico de carrapatos, a utilização de fungos entomopatogênicos é uma das opções mais promissoras devido à capacidade de dispersão, espectro de hospedeiros e capacidade de penetrar via cutícula dos carrapatos (SAMISH; REHACEK, 1999). As crescentes preocupações sobre a segurança do meio ambiente, a saúde humana, o aumento dos custos relacionados a produtos químicos, morte de organismos não-alvo e o aumento da resistência de carrapatos aos acaricidas químicos são fatores que tornam o uso do controle biológico uma boa alternativa (ALONSO-DÍAZ et al., 2007; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008).

Os fungos que apresentam patogenicidade para ácaros e carrapatos formam, provavelmente, um subgrupo dentro do grupo de fungos patogênicos para insetos, organizando-se filogeneticamente da mesma forma, porém com uma variedade menor de hospedeiros. Os carrapatos são hospedeiros em potencial para organismos como os fungos, pois, geralmente, habitam ambientes úmidos e ao abrigo do sol favorecendo a infecção e a transmissão desses patógenos (CHANDLER et al., 2000).

Os ascomicetos *Beauveria bassiana* s.l. e *Metarhizium anisopliae* s.l. são os fungos entomopatogênicos mais bem caracterizados e amplamente utilizados em programas de controle biológico de pragas (ALVES, 1998; ZIMMERMANN, 2007a, 2007b; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). Além destas

espécies, outras como *B. brongniartii* s.l., *Lecanicillium lecanii* (= *Verticillium lecanii*), *Isaria farinosa* (= *Paecilomyces farinosus*) e *I. fumosorosea* (= *P. fumosoroseus*) também apresentam potencial patogênico contra carrapatos e ácaros, além de insetos (ALVES, 1998; CHANDLER et al., 2000; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008; ANGELO et al., 2010a).

*Beauveria bassianai* s.l. é a mais largamente distribuída espécie do gênero e é geralmente encontrada em insetos infectados tanto em regiões de clima temperado como em regiões de clima tropical (ZIMMERMANN, 2007a). Vários trabalhos reportam o potencial patogênico desse fungo contra o carrapato *R. microplus* e seus respectivos estágios de vida (BITTENCOURT et al., 1996; CASTRO et al., 1997; PAIÃO et al., 2001a; FERNANDES et al., 2003; POSADAS; LECUONA, 2009). Atualmente *B. bassiana* s.l. é considerado um agregado de 5 espécies: *B. bassiana*, *B. pseudobassiana*, *B. varroae*, *B. kipukae* e *B. australis* (RELINER et al., 2011).

*Metarhizium* pode ser encontrado facilmente nos solos, nas rizosferas de plantas ou em cadáveres de artrópodes e possui uma distribuição mundial que vai dos trópicos ao ártico (ZIMMERMANN, 2007b; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). No solo é capaz de sobreviver por longos períodos e acredita-se que ocorra naturalmente em mais de 300 espécies de insetos, incluindo importantes pragas (ALVES, 1998).

Estudos vêm demonstrando que isolados de *M. anisopliae* s.l. apresentam variabilidade genética, sugerindo então que *M. anisopliae* seria, não uma espécie, mas sim, um agregado de espécies (BIDOCHKA et al., 2005; FERNANDES et al., 2010). Bischoff et al. (2009) propuseram uma reorganização para as espécies do gênero *Metarhizium*, classificando *M. anisopliae* como um complexo constituído por sete espécies: *M. pingshaense*, *M. anisopliae*, *M. robertsii*, *M. brunneum*, *M. majus*, *M. guizhounse* e *M. lepidiotae*. Sendo assim, as espécies de *M. anisopliae* que ainda não foram identificadas de acordo com Bischoff et al. (2009) devem ser consideradas pertencentes ao complexo *M. anisopliae* e referenciadas como *M. anisopliae sensu lato* (s.l.).

No Brasil o primeiro relato de ocorrência natural de *M. anisopliae* s.l. infectando fêmeas de *R. microplus* foi realizado por Costa et al. (2002). Testes *in vitro* e de estábulo demonstraram que diversos isolados de *M. anisopliae* s.l. possuem alta virulência contra carrapatos, incluindo *R. microplus* (BITTENCOURT et al., 1994; REIS et al., 2001; BAHIANSE et al., 2007; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008).

Atualmente surgem cada vez mais produtos formulados a base de fungos para controlar pragas. Segundo Faria e Wraight (2007), dentre 171 pesticidas destinados ao controle de ácaros e insetos, 33,9% são à base de *M. anisopliae* s.l. O uso deste entomopatógeno é considerado seguro, apresentando riscos mínimos para vertebrados, humanos e ao meio ambiente (ZIMMERMANN, 2007b).

A literatura também aponta trabalhos que mostram o sinergismo entre fungos e bases químicas (MOINO; ALVES, 1998; PAIÃO et al., 2001b, 2001c). Um estudo realizado por Bahiense et al. (2006) reportou a compatibilidade de deltametrina (uma base química usada para controle de carrapatos) e *M. anisopliae* s.l. Nesse estudo foi verificado que havia compatibilidade entre o fungo e a deltametrina, e foi demonstrado que a associação pode assegurar a redução da concentração da base química, redução dos custos relacionados, otimização dos benefícios além do aumento da segurança e eficácia do produto.

### 2.3 Dinâmica da Infecção Fúngica por *Metarhizium anisopliae* s.l.

Segundo Bittencourt et al. (1999), *M. anisopliae* s.l. penetra em *R. microplus* pelo tegumento e a infecção se inicia com a deposição dos conídios na cutícula do carrapato.

Estudos mostram que *M. anisopliae* s.l. secreta enzimas com ação lipolítica que podem otimizar a adesão conidial (BEYS da SILVA et al., 2009; 2010). Além disso, em insetos, a estrutura e a composição química da cutícula são fatores que também influenciam na fixação dos conídios (PEDRINI et al., 2007).

Uma vez aderidos e em boas condições de temperatura e umidade, há a germinação dos conídios (BITTENCOURT et al., 1999). A germinação se inicia com a hipertrofia dos mesmos, favorecida por alta umidade, e é disparada por mensageiros, geralmente carboidratos, presentes na cutícula dos artrópodes (DÍAZ et al., 2006). Após a hipertrofia do conídio, há a formação do tubo germinativo e desenvolvimento do apressório, uma estrutura especializada formada no tubo germinativo (DÍAZ et al., 2006). O apressório serve para ancorar o conídio e facilitar a penetração do fungo no hospedeiro e, apesar de não ser um estágio obrigatório do processo de infecção (ST LEGER et al., 1991), sua formação indica alta virulência fúngica (MENT et al., 2010). Paralelamente, o fungo libera enzimas específicas como quitinases, proteases e lipases para degradar os constituintes cuticulares, rompendo as primeiras barreiras oferecidas pelo hospedeiro (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010).

Dentre o vasto número de proteases secretadas por fungos, encontram-se aquelas semelhantes à subtilisina, fundamentais para transpor a cutícula do hospedeiro, colonizar e digerir tecidos. A presença dessas enzimas possibilita a estes micro-organismos sobreviver em diversos nichos no meio ambiente, além de influenciar na virulência fúngica e especificidade pelo hospedeiro (SANTI et al., 2010). As lipases secretadas por fungos também são apontadas como fatores de virulência (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). A degradação da camada lipídica que cobre a cutícula de insetos foi relacionada com o crescimento pré-penetração de *M. anisopliae* nestes hospedeiros (JARROLD et al., 2007). É importante ressaltar que a variação na produção de lipases por micro-organismos depende não só da fonte de lipídios, mas também da sua concentração (CORZO; REVAH, 1999; MAIA et al., 2001). Um trabalho realizado por Silva *et al.* (2005) mostrou que dentre diferentes fontes de lipídios, a que melhor induziu a produção de lipase em *M. anisopliae* s.l. foi o óleo de arroz. Essa informação é importante para que se possam desenvolver técnicas que aumentem a virulência fúngica, além de contribuir para o esclarecimento do processo de infecção fúngica.

A hemolinfa do carrapato pode apresentar fragmentos de hifas de *M. anisopliae* s.l. 24 horas após o tratamento fúngico (BITTENCOURT et al., 1995). Após a penetração no hospedeiro, as hifas se diferenciam em blastosporos, células leveduriformes, o que facilita a dispersão do fungo e a generalização da infecção (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). Bittencourt *et al.* (1995) observaram a impressão em lâminas, da parte externa dos órgãos de *R. microplus* tratadas com *M. anisopliae* s.l., e verificaram a presença de hifas nesses tecidos a partir do quarto dia após o tratamento.

A eficiência de *M. anisopliae* s.l. infectando insetos não se deve somente pela ação física proliferativa do fungo, mas também por ação química. A destruxina é um metabólito secundário tóxico para insetos e estruturalmente classificada como um hexadepsipeptídeo cíclico, composto geralmente por cinco aminoácidos e um ácido  $\alpha$ -hidroxi. Essa toxina é produzida por vários fungos, incluindo *M. anisopliae* s.l. e possui bioatividade inseticida e herbicida comprovada (HU et al., 2009). Estudos com insetos apontam uma relação direta entre a virulência de *M. anisopliae* s.l. e a produção de destruxina (PAL et al., 2007). Até o momento já foram reportados 35 análogos dessa substância (HU et al., 2009), sendo alguns análogos mais tóxicos que outros. Dumas *et al.* (1996) apontam a destruxina E como a mais tóxica para invertebrados, especialmente insetos, entretanto não existem dados na literatura que apontem os efeitos da destruxina sobre carrapatos.

Em geral, a morte do hospedeiro infectado com fungos entomopatogênicos ocorre em um período de três a 10 dias (CHANDLER et al., 2000). Sob condições favoráveis, o fungo esporula sobre o cadáver do hospedeiro favorecendo novas infecções de hospedeiros na população com o objetivo de manter seu ciclo no ambiente (CHANDLER et al., 2000).

## 2.4 O Sistema Imune de Carrapatos.

Para atingir um organismo invertebrado, o patógeno deve transpor uma série de barreiras físicas e químicas. Além disso, alguns aspectos comportamentais dos invertebrados também dificultam as infecções. O tegumento e o intestino representam as primeiras barreiras de uma maneira geral. À medida que micro-organismos conseguem transpor essas barreiras uma série de reações ao nível celular e humoral ocorrem (TAYLOR, 2006).

Acreditava-se, entretanto, que os invertebrados defendiam-se das infecções através de um sistema imune inato sem conseguir estabelecer memória imunológica (HOFFMANN, 2003), entretanto, respostas de memória imunológica foram descritas em organismos invertebrados (MULLER et al., 2008; RODRIGUES et al., 2010). Rodrigues *et al.* (2010) estimularam a nível sistêmico o sistema imune de *Anopheles gambiae* utilizando protozoários do gênero *Plasmodium*, e após uma re-estimulação a resposta ao parasito foi mais efetiva, uma vez que o mosquito pôde adaptar-se modulando a quantidade e capacidade de resposta das diferentes populações de hemócitos.

Taylor (2006) fez uma ampla revisão sobre o sistema imune de carrapatos e destacou as respostas mediadas por células (hemócitos) e a resposta humoral. Os hemócitos estão relacionados aos processos de fagocitose, formação de nódulos e encapsulamento. A fagocitose é responsável por remover da hemolinfa invasores circulantes através do reconhecimento, englobamento e destruição intracelular (SILVA et al., 2006; LEMAITRE; HOFFMANN, 2007). A nodulação e o encapsulamento foram verificados no carrapato *Dermacentor variabilis*; e são mecanismos de suma importância na resposta imune mediada por células (EGGENBERGER et al., 1990; CERAUL et al., 2002). O encapsulamento está relacionado ao aprisionamento de partículas ou invasores maiores que os hemócitos e utiliza-se de várias camadas de células afim de isolá-los da circulação ativa (TAYLOR, 2006).

Cinco classes de hemócitos foram identificadas em carrapatos: pro-hemócitos, que possivelmente são células precursoras dos outros hemócitos (SONENSHINE, 1991); plasmatócitos, responsáveis pelo processo de fagocitose, exibindo respostas não específicas a antígenos corpusculares, partículas inertes e células estranhas (PEREIRA et al., 2001; SILVA et al., 2006); granulócitos I e II, envolvidos no processo de fagocitose, encapsulamento e deposição de substâncias na superfície do invasor que impedem sua união aos tecidos do hospedeiro; esferulócitos e oenocitóides (SONENSHINE, 1991).

Três principais tipos de respostas humorais têm sido caracterizados em artrópodes: o encapsulamento humoral, hemaglutinação e produção de substâncias antimicrobianas (TAYLOR, 2006). O encapsulamento humoral envolve a formação de um agregado frouxo de material melanótico que vai sendo acumulado ao redor da partícula ou organismo invasor, tornando-se cada vez mais denso até envolver totalmente o material estranho (TAYLOR, 2006).

As hemaglutininas (ou lectinas) presentes nos invertebrados estão envolvidas nos processos de adesão celular, opsonização, fagocitose e citólise (VASTA; MARCHALONIS, 1983). As lectinas nos carrapatos atuam, aparentemente, da mesma forma que em outros invertebrados e vertebrados, ligando-se a invasores, facilitando a fagocitose ou a citólise

(TAYLOR, 2006). Apesar de ainda não estar muito bem caracterizado, sugere-se que as lectinas possam mediar o processo de nodulação (MARMARAS; LAMPROPOULOU, 2009).

As substâncias antimicrobianas são capazes de afetar um grande número de micro-organismos, dentre eles: vírus, bactérias, fungos e nematóides. Apesar do modo de ação dos peptídeos antimicrobianos não estar totalmente esclarecido, aparentemente as interações lipoprotéicas e os processos mediados por reconhecimento de receptores são as principais maneiras de ação dessas substâncias. Os peptídeos antimicrobianos interagem com componentes de membranas citoplasmáticas e podem também atuar em alvos intracelulares sem, necessariamente, romper a membrana celular. (MOOKHERJEE; HANCOCK, 2007).

Compreender melhor a resposta imune de carrapatos à infecção por fungos entomopatogênicos ajuda a esclarecer melhor o processo de infecção fúngica e esta informação é útil na escolha de isolados mais apropriados para o controle biológico desses artrópodes.

## 2.5 Proteínas e Peptídeos Antimicrobianos.

Peptídeos antimicrobianos estão largamente distribuídos na natureza, presentes em insetos, carrapatos, plantas e em animais que possuem sistema imune mais complexo (MOOKHERJEE; HANCOCK, 2007) e representam uma resposta humoral efetiva a partículas/organismos estranhos atacando diretamente esses micro-organismos invasores. Esses fatores antimicrobianos podem ser expressos naturalmente (constitutivos) (FOGAÇA et al., 2004, ESTEVES et al., 2009) ou transcritos devido ao estímulo provocado por infecção (JOHNS et al., 2001). Além disso, são traduzidos e/ou estão presentes em diversos órgãos de carrapatos, incluindo glândulas salivares (VALENZUELA et al., 2002; LIMA et al., 2006), intestino (FOGAÇA et al., 1999; SONENSHINE et al., 2005; ZHOU et al., 2006), corpo gorduroso (órgão biossintético análogo ao fígado dos vertebrados) (HYNES et al., 2005; LIMA et al., 2006), hemócitos (HYNES et al., 2005; FOGAÇA et al., 2006; ZHOU et al., 2006), ovários (FOGAÇA et al., 2004; LIMA et al., 2006) e hemolinfa (JOHNS et al., 1998, 2001; FOGAÇA et al. 2004).

Dentre as principais proteínas e peptídeos com atividade antimicrobiana encontrados em carrapatos destacam-se as lisozimas, cistatinas, defensinas, fragmentos de hemoglobina e microplusinas. As lisozimas são enzimas que podem ser encontradas em grande parte dos organismos e são responsáveis pela hidrólise de peptideoglicanos presentes na parede celular de bactérias (WOHLKÖNIG et al., 2010). As lisozimas foram o primeiro fator antimicrobiano a ser estudado na hemolinfa de insetos e vem sendo identificada também em carrapatos (SONENSHINE et al., 2005; TAYLOR, 2006).

As cistatinas são inibidores reversíveis de cisteíno-proteases amplamente estudadas em vertebrados devido a sua função de mediar a proteólise nos lisossomos e prevenir danos causados por cisteíno-proteases encontradas fora dessas vesículas enzimáticas (TAYLOR, 2006). Lima *et al.* (2006) mostraram que genes de cistatina eram expressos nos ovários e corpo gorduroso de fêmeas engurgitadas de *R. microplus*. Segundo esses autores, cistatinas foram detectadas em géis de poliacrilamida dos ovários, corpo gorduroso e glândulas salivares, entretanto não foram detectadas em extratos de ovos e larvas.

Dos peptídeos antimicrobianos descritos em carrapatos, quatro já foram caracterizados em *R. microplus*: defensina, ixodidina, Hb 33-61 e microplusina (FOGAÇA et al., 1999; 2004; 2006; ESTEVES et al., 2009). Fogaça *et al.* (2004) isolaram um peptídeo antimicrobiano com massa molecular de 4285 Da e seis resíduos de cisteína da hemolinfa de *R. microplus* com similaridade aos membros da família de defensinas de insetos. A análise de

sua sequência gênica demonstrou que esse peptídeo antimicrobiano é expresso na forma de pró-pré-peptídeo assim como as defensinas dos insetos. A ixodidina foi isolada de hemócitos e possui 7103 Da e dez resíduos de cisteína (FOGAÇA et al., 2006). Este peptídeo antimicrobiano foi capaz de inibir o crescimento de *Escherichia coli* e *Micrococcus luteus*. A microplusina foi identificada na hemolinfa de *R. microplus* e a expressão de seu gene foi observada em ovários, corpo gorduroso e hemócitos desse carrapato (FOGAÇA et al., 2004). Esteves *et al.* (2009) reportaram a presença desse mesmo peptídeo antimicrobiano no macerado e na superfície de ovos de *R. microplus*. A microplusina tem atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e fungos (ESTEVES et al., 2009) e é expressa na forma de pré-peptídeo com um peptídeo sinal composto de 20 aminoácidos (FOGAÇA et al., 2004).

O peptídeo antimicrobiano Hb 33-61 foi purificado do tubo digestivo de fêmeas de *R. microplus* ingurgitadas. A sequência de aminoácidos que dá origem a esse peptídeo foi obtida e observou-se que havia semelhança com um fragmento da cadeia  $\alpha$  da hemoglobina bovina. O Hb 33-61 possui 3205,7 Da, é obtido através da ação de enzimas digestivas específicas do carrapato e apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e fungos (FOGAÇA et al., 1999).

A maior parte dos estudos sobre o sistema imunológico de carrapatos se concentram, principalmente, nos estágios de ninfa e adulto (TAYLOR, 2006; SONENSHINE; HYNES, 2008). Até o momento, não foram encontrados na literatura estudos que identifiquem componentes da resposta imune nos ovos de carrapatos após infecção fúngica das fêmeas; entretanto, o avanço do controle desses ectoparasitos com o uso de fungos entomopatogênicos requer profundo conhecimento do processo de patogenicidade e suas correspondentes características durante todos os estágios de desenvolvimento.

## **2.6 Aspectos Gerais da Anatomia e Fisiologia do Sistema Reprodutor Feminino de *Rhipicephalus microplus*.**

O sistema reprodutor feminino dos carrapatos ixodídeos é composto por ovário, ovidutos, útero, tubos conectores, vagina, glândulas acessórias, receptáculo seminal e a abertura genital, além de um órgão encontrado somente em carrapatos, o Órgão de Gené, localizado na parte anterior do carrapato e imprescindível para a viabilidade dos ovos (SONENSHINE, 1991). O ovário de *R. microplus* consiste num órgão no formato de ferradura, tubular, único, que é composto por um lúmen delimitado por uma parede de pequenas células epiteliais no qual os oócitos, de vários tamanhos e estágios de desenvolvimento, estão aderidos através de um pedicelo (SAITO et al., 2005). A variação na morfologia dos oócitos relaciona-se com a falta de uniformidade no desenvolvimento destas estruturas. Uma vez maduros, os oócitos são liberados para o interior do lúmen.

O desenvolvimento dos oócitos pode ser classificado em cinco estágios diferentes (I, II, III, IV e V) (BALASHOV, 1968). Após o acasalamento, os oócitos expandem-se enormemente acumulando vitelina (estágios III e IV), um complexo protéico fundamental para nutrição e desenvolvimento do embrião (ROSELL-DAVIS; COONS, 1991; SONENSHINE, 1991; LOGULLO et al., 2002). Para que isso ocorra, os oócitos internalizam, por micropinocitose, um precursor: a vitelogenina, proteína sintetizada principalmente nos trofócitos do corpo gorduroso e também em células especializadas do epitélio intestinal. A vitelogenina é uma proteína complexa composta por subunidades glicolipoprotéicas de alto peso molecular e está presente na hemolinfa. Esta proteína é internalizada por oócitos de

terceiro estágio e após ser internalizada é transformada em vitelina (CHINZEI; YANO, 1985; SONENSHINE, 1991; LOGULLO et al., 2002).

Os oócitos vitelogênicos maduros passam para o lúmen ovariano (processo de ovulação) (estágio V) e uma vez no lúmen, os espermióforos (espermatozoides maduros) penetram nos óvulos; entretanto, a fusão dos núcleos haplóides só ocorre após a oviposição (SONENSHINE, 1991). Antes da oviposição, os ovos são envolvidos por uma substância secretada pelo órgão de Gené que está situado anteriormente no corpo das fêmeas ingurgitadas de ixodídeos, ventralmente ao escudo. Este órgão, na subfamília Ixodinae, consiste em um amplo pedúnculo dividido em quatro partes; cada uma representa uma glândula ou prega de tecido glandular que se diferencia durante a sucção sanguínea. Muitos aspectos relacionados a sua função necessitam ser mais bem esclarecidos, entretanto sabe-se que esse conjunto de glândulas produz uma substância que é depositada na superfície desses ovos ao longo do processo de ovogênese e ovoposição, conferindo maior proteção aos ovos. (BALASHOV, 1968).

Os ovos de *R. microplus* são então depositados no ambiente onde podem permanecer, dependendo das condições de umidade e temperatura, por um período de até três semanas até que as larvas eclodirem. Portanto a presença de fatores protetores na superfície e/ou interior dos ovos é essencial para prevenir possíveis infecções por micro-organismos oriundos do ambiente em que esses ovos foram postos, e assegurar o completo desenvolvimento embrionário.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local do Experimento.

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Médica Veterinária (LCM), localizado na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas Wilhemn Otto Neitz (EEPPWON). As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, e no Laboratório de Análises Cromatográficas, Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

#### 3.2 Manutenção da Colônia de *Rhipicephalus microplus*.

Fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram coletadas de bovinos naturalmente infestados na Estação de Bovinocultura de Leite da PESAGRO, no município de Seropédica, RJ. Os animais estavam sem contato prévio com carrapaticidas químicos por um período mínimo de 20 dias. Após a coleta, as fêmeas ingurgitadas foram acondicionadas em placas de Petri e dispostas em câmaras climatizadas sob temperatura e umidade relativa (UR) ideais ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $\text{UR} \geq 80\%$ ). A colônia de *R. microplus* foi mantida na EEPPWON, UFRRJ. Dois bezerros foram infestados com aproximadamente 6000 larvas provenientes de 0,3 g de ovos de *R. microplus*. Vinte e um dias após a infestação, as fêmeas totalmente ingurgitadas foram coletadas no chão das baias. No LCM, foram lavadas em água corrente, imersas em solução de hipoclorito de sódio a 1%, para assepsia da cutícula, e secas em papel toalha estéril. Parte das fêmeas foi utilizada no bioensaio, enquanto a outra parte foi mantida em câmara climatizada, com as mesmas condições de temperatura e umidade descritas acima, para manutenção da colônia.

#### 3.3 Obtenção e Manutenção do Isolado Fúngico.

O fungo utilizado no experimento, *M. anisopliae* s.l. (Ma 959), é mantido no LCM/UFRRJ. Este isolado foi cedido ao LCM pelo Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP, tendo sido isolado de *Deois flavopicta* (Homoptera: Cercopidae) na cidade do Rio de Janeiro, RJ.

#### 3.4 Preparo da Suspensão de *Metarhizium anisopliae* s.l.

O isolado Ma 959 foi cultivado em meio batata-dextrose-agar (BDA) (HIMEDIA® M 096 Potato Dextrose Agar) e incubado sob temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $\text{UR} \geq 80\%$  durante 15 dias.

Para o preparo das suspensões, a superfície da placa de Petri com *M. anisopliae* s.l. foi raspada com auxílio de um cabo e lâmina de bisturi e os conídios suspensos em 20 mL de água destilada estéril e espalhante adesivo Tween 80 0,1% (LUZ et al., 1998). A suspensão foi quantificada com auxílio da câmara de Neubauer sob microscópio óptico, segundo Alves (1998), e ajustada à concentração  $1 \times 10^8$  conídios/mL.

As concentrações:  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^5$  conídios/mL foram preparadas através de diluições seriadas a partir da concentração  $1 \times 10^8$  conídios/mL. Dois mililitros dessa suspensão foram acrescidos de 18 ml de água destilada estéril e Tween 80 0,1%, resultando na

concentração de  $1 \times 10^7$  conídios/mL. A mesma metodologia foi utilizada para o preparo das demais concentrações.

### **3.5 Viabilidade dos Conídios.**

Uma amostra de 10  $\mu$ L da concentração  $1 \times 10^7$  conídios/mL foi colocada numa placa de Petri contendo meio de cultura BDA para avaliação da viabilidade dos conídios de *M. anisopliae* s.l. As placas foram incubadas a  $25 \pm 1$  °C e UR  $\geq 80\%$ . Após 24 horas, foi efetuada a contagem de conídios germinados, através da visualização direta ao microscópio. Duzentos conídios foram contados. Procedeu-se o cálculo de germinação, obtido através da divisão do número de conídios germinados pelo total de conídios contados, e esse resultado foi multiplicado por 100 (ALVES, 1998).

### **3.6 Infecção das Fêmeas de *Rhipicephalus microplus*.**

Cinco grupos (quatro tratados com *M. anisopliae* s.l. e um grupo controle), contendo 50 fêmeas cada, foram utilizados para o bioensaio. Os grupos eram constituídos por fêmeas com pesos homogêneos. O tratamento consistiu na imersão das fêmeas nas suspensões conidiais ( $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$  ou  $1 \times 10^5$  conídios/mL) ou em água destilada estéril acrescida de Tween 80 0,1% (grupo controle) por três minutos. Após o tratamento, as fêmeas foram dispostas em placas de Petri e acondicionadas em câmaras climatizadas ( $27 \pm 1$ °C e UR  $\geq 80\%$ , escotofase) para realização da postura. A postura diária de cada grupo, durante 10 dias, foi separada e armazenada em tubos de microcentrifugação graduados (1,5 mL) e estocadas a - 20°C.

### **3.7 Reisolamento Fúngico.**

Após o décimo dia de postura, amostras de fêmeas tratadas e do grupo controle foram incubadas em câmara úmida e mantidas em temperatura e umidade controladas já descritas, para propiciar a exteriorização fúngica sobre a cutícula das fêmeas. Após sete dias, as colônias fúngicas que cresceram sobre a cutícula dos cadáveres foram semeadas em meio de cultura BDA acrescido de cloranfenicol (0,05%) e incubadas a  $25 \pm 1$ °C e UR 80% durante 15 dias. Posteriormente, foi realizado o microcultivo entre lâmina e lamínula para a identificação das características micromorfológicas do fungo (RIVALIER; SEYDEL, 1932). Após 14 dias, foram confeccionadas lâminas temporárias coradas em Lactofenol de Amman com azul de algodão (HAWKSWORTH, 1977) para identificação dos fungos.

### **3.8 Dosagem de Proteínas dos Ovos.**

#### **3.8.1 Preparo das amostras de ovos.**

Para realização das análises, os ovos estocados a - 20°C foram descongelados à temperatura ambiente e macerados. Cem miligramas da postura diária de cada grupo foi retirada e macerada, em gral e pistilo estéreis, com 100 $\mu$ L de solução de tampão de lise celular (Anexo A) (RAIA, 2007). As amostras foram centrifugadas a  $10.000 \times g$  para retirada do material sedimentado.

#### **3.8.2 Conteúdo protéico dos ovos.**

O conteúdo protéico do homogeneizado foi determinado pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1971), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

Para determinação da concentração de proteínas, misturou-se 0,01 mL de cada amostra diluída em 0,2 mL de água destilada com 1,0 mL de solução alcalina (Anexo B) (preparada no momento do uso). Os tubos foram agitados e permaneceram em repouso por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado à mistura 0,2 mL do reativo de fenol Folin Ciocalteau (Merck®) diluído na proporção de 1,5:0,5 com água destilada (preparado no momento do uso). Agitou-se cuidadosamente o tubo e deixou-se a mistura em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente. A leitura das absorbâncias (ABS) foi realizada em 660 nm. As concentrações de proteína total foram determinadas utilizando uma curva padrão de albumina obtida nas mesmas condições do ensaio.

### **3.9 Análise Estatística das Concentrações Protéicas.**

Para análise dos dados de concentração de proteína foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) para comparação entre as médias, com nível de significância 5% ( $p \leq 0,05$ ) (SAMPAIO, 2002).

### **3.10 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida – SDS-PAGE.**

O perfil protéico da postura diária foi analisado por eletroforese em SDS-PAGE a 12%. O sistema utilizado para eletroforese foi o sistema vertical de gel descontínuo (LAEMMLI, 1970). O macerado dos ovos sofreu uma primeira corrida, no gel de empilhamento a 5% (Anexo C), à corrente constante de 20 volts (V). Quando o padrão de peso molecular (BIO-RAD® Prestained SDS-PAGE Standards Broad range 161-0318) entrou no gel de resolução a 12% (Anexo D) a corrida foi realizada sob corrente constante de 100 V (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

#### **3.10.1 Preparo das amostras de ovos para o SDS-PAGE.**

Cada amostra do macerado dos ovos foi diluída na proporção de 1:1 (v/v) em tampão de amostra (Anexo E). Em seguida, as amostras foram submetidas a banho-maria a 90°C por três minutos. O tampão dos eletrodos utilizado foi Tris 0,123 M, glicina 0,96 M e SDS 0,5%, pH 8.3.

#### **3.10.2 Migração eletroforética.**

Trinta microgramas de cada amostra ou 5µL do padrão de peso molecular (BIO-RAD® Prestained SDS\_PAGE Standards Broad range 161-0318) foram aplicados nos géis. O padrão de peso molecular continha as seguintes proteínas e peptídeos: miosina (198,8 kDa), β-galactosidase (115,7 kDa), albumina sérica bovina (96,7 kDa), ovalbumina (53,5 kDa), anidrase carbonica (37,1 kDa), inibidor de tripsina da soja (29,1 kDa), lisozima (19,5 kDa) e aprotinina (6,9 kDa). Após o término da corrida, os géis foram lavados em água destilada e colocados em cuba contendo fixador (ácido tricloroacético 12%) por 2 horas, em temperatura ambiente.

#### **3.10.3 Coloração por Comassie.**

Os géis foram corados em Comassie Coloidal (CBB-G250): 0.1% p/v CBB-G250 em ácido fosfórico 2%, sulfato de amônia 10% e metanol 20%. Após 24 horas de incubação, os géis foram descorados em água destilada e escaneados para análise das bandas (Quantity One Software versão 4.6.3 BIO-RAD®).

### **3.11 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência- CLAE.**

#### **3.11.1 Preparo das amostras para a CLAE.**

Um miligrama de ovos do grupo controle (do quinto dia) e do grupo tratado com suspensão de  $10^8$  conídios/mL (do primeiro ao décimo dia) foi homogeneizado e macerado, separadamente, segundo a metodologia de Esteves *et al.* (2009) com modificações. Cada massa de ovos macerada em 2,5 mL de ácido acético 2M com gral e pistilo. As amostras foram, então, submetidas à agitação lenta em banho gelado por 30 minutos, centrifugadas a  $10.000 \times g$  por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi pré-purificado utilizando-se cartuchos de extração em fase sólida (Milli-SPE® C18) previamente equilibrados com água acidificada (ácido trifluoracético – TFA 0,05%). Para cada amostra foram realizadas três eluições com 5%, 40% e 80% de acetonitrila (ACN) em água acidificada (TFA 0,05%). As frações pré-purificadas foram concentradas e secas em centrífuga a vácuo e ressuspensas em 200 µL de água ultra pura (obtida a partir de um ultrapurificador de água PURELAB Option Q). A descrição das siglas que representam as eluições nos cartuchos de extração está listada no anexo F.

#### **3.11.2 Obtenção dos perfis cromatográficos.**

As amostras obtidas foram submetidas à cromatografia de fase reversa em um cromatógrafo líquido de alto desempenho (LC-20AT Shimadzu®) utilizando uma coluna analítica de fase reversa tipo C18 (5 µm, 4,6 mm x 250mm, Sunfire®). Para a eluição das amostras foi utilizado um gradiente linear de 65% a 100% de ACN em água acidificada (TFA 0,05%), durante 20 minutos, sob um fluxo de 1 mL/minuto. A ABS do eluente foi monitorada a 220 nm.

Todas as frações foram coletadas e concentradas em uma centrífuga a vácuo e ressuspensas em 120 µL de água ultra pura e estocadas à - 20°C para avaliação da atividade antimicrobiana.

### **3.12 Ensaios de Atividade Antimicrobiana.**

#### **3.12.1 Atividade antimicrobiana contra fungo leveduriforme.**

A cepa de *C. albicans*, cedida pelo Laboratório de Micologia da UFRRJ, foi cultivada em caldo infuso de cérebro e coração (BHI) (bioBRÁS Diagnósticos®) e a quantificação da suspensão realizada em câmara de Neubauer, segundo Alves (1998). Vinte microlitros de cada uma das frações cromatográficas foram adicionados a 60 µL de suspensão de  $4 \times 10^5$  células/mL de *Candida albicans* em meio BHI e incubadas em microplacas de 96 poços. Como controle, 60 µL da suspensão contendo as leveduras foram incubados com 20 µL de água destilada estéril. Após 18 horas de incubação a 30°C, a densidade óptica a 595 nm foi determinada em um leitor de microplacas. As absorbâncias foram analisadas pelo teste de

Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para comparação entre as ordenações médias. *P*-valores menores que 0.05 foram considerados significativos.

### **3.12.2 Atividade antimicrobiana contra *M. anisopliae* s.l.**

#### **3.12.2.1 Uso das frações recolhidas na CLAE.**

As frações que apresentaram inibição média de 35% ou mais no crescimento de *C. albicans* foram testadas contra *M. anisopliae* s.l. O isolado fúngico utilizado foi o mesmo utilizado no bioensaio com as fêmeas ingurgitadas, Ma 959.

Para avaliação da atividade antimicrobiana foi utilizado teste de difusão em meio sólido. Cem microlitros da suspensão de *M. anisopliae* s.l. ( $2 \times 10^7$  conídios/mL) foram semeados em meio de cultura batata dextrose ágar acrescido de antibiótico (cloranfenicol 0,05%), utilizando-se swabs estéreis.

Foram utilizados discos de papel filtro, de nove mm de diâmetro, impregnados com antibiótico (solução aquosa de cloranfenicol a 0,05%), autoclavados (120°C/20 minutos) e secos em forno Pasteur (100°C/30 minutos). Os discos foram embebidos em 4 µL das frações da CLAE e posteriormente colocados nas placas semeadas com os fungos. Cada placa continha três discos e foram utilizadas duas placas por pico. Os discos do grupo controle foram imersos em água destilada estéril. As placas foram observadas diariamente quanto à formação do halo de inibição até completarem 96 horas.

#### **3.12.2.2 Uso do macerado dos ovos.**

Cinquenta miligramas de ovos de cada um dos grupos (ovos do dia 1 a 10 do grupo tratado com fungo na concentração de  $10^8$  conídios mL<sup>-1</sup> e ovos do grupo controle) foram macerados em 100 µL de tampão fosfato pH 7.4 e submetidos ao teste de difusão em meio sólido para avaliação da atividade antimicrobiana do macerado contra *M. anisopliae* s.l., isolado Ma 959. A metodologia foi a mesma utilizada no item 3.12.2.1.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Viabilidade da Suspensão Conidial.

Os conídios do isolado Ma 959 de *M. anisopliae* s.l. apresentaram 100% de germinação, sob temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $\text{UR} \geq 80\%$ , após o período de 24 horas, demonstrando que a suspensão fúngica estava apta a ser utilizada.

### 4.2 Dosagem de Proteínas.

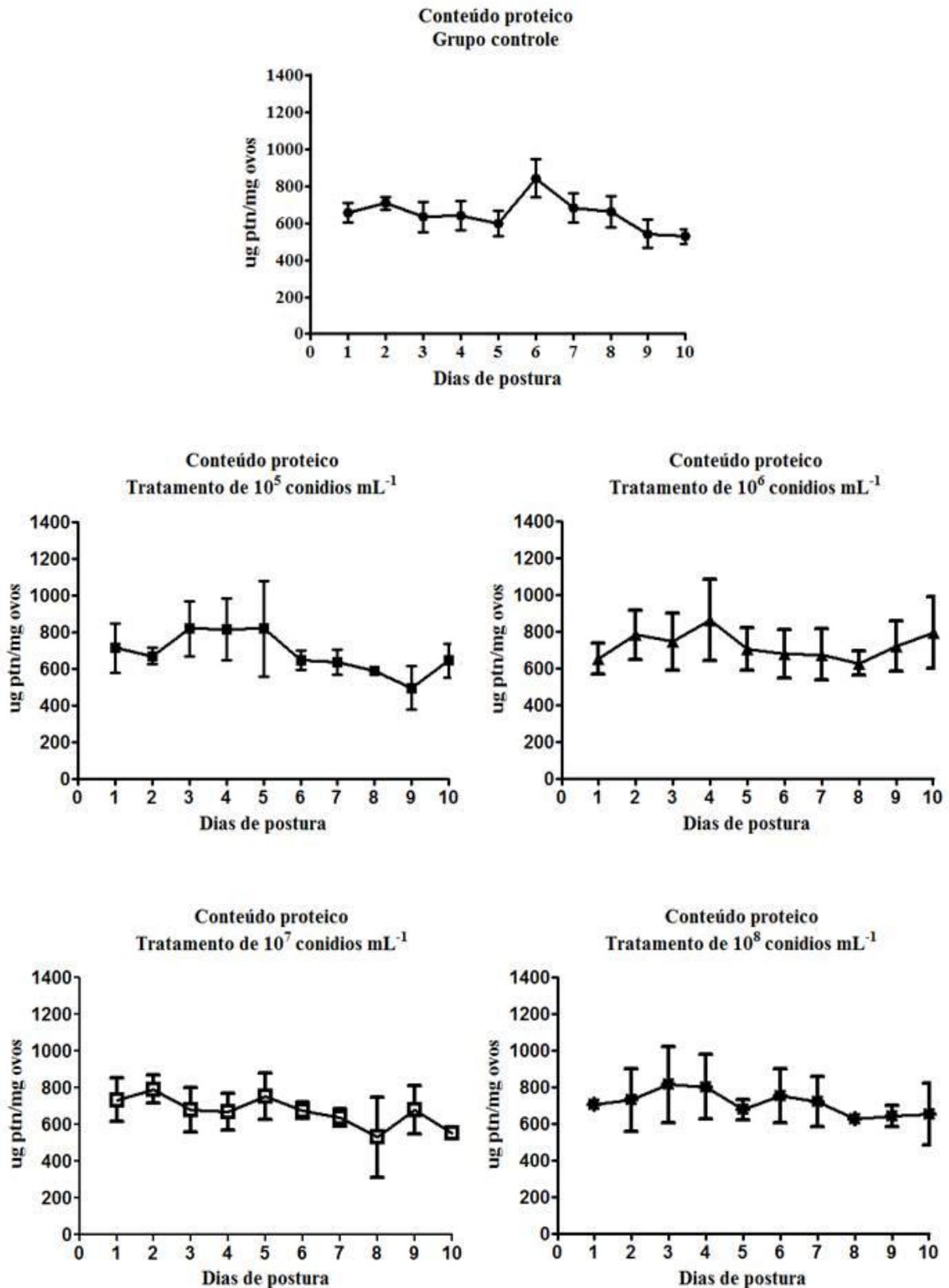
Não houve diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) quando o conteúdo protéico do grupo controle foi comparado com o dos grupos tratados. A tabela 1 apresenta as médias, seguidas pelos respectivos desvios padrões, das concentrações protéicas dos ovos de *R. microplus* do dia 1 ao dia 10 de postura. Através da Figura 2 pode-se observar a dinâmica das concentrações de proteína total ao longo dos dias de postura.

**Tabela 1.** Conteúdo protéico total, expresso em micrograma de proteína por miligrama de ovos de *Rhipicephalus microplus*, dos grupos controle ou dos grupos de fêmeas infectadas por *Metarhizium anisopliae* s.l., em diferentes concentrações conidiais, sob condições controladas de laboratório ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $\text{UR} \geq 80\%$ , escotofase). As médias são seguidas pelo desvio padrão.

Dias de Postura	Controle*	$10^5$ conídios $\text{mL}^{-1}$ *	$10^6$ conídios $\text{mL}^{-1}$ *	$10^7$ conídios $\text{mL}^{-1}$ *	$10^8$ conídios $\text{mL}^{-1}$ *
1	$653,2 \pm 52,5^a$	$712,8 \pm 133,3^a$	$653,3 \pm 84,5^a$	$732,6 \pm 118,3^a$	$706,3 \pm 24,2^a$
2	$705,5 \pm 36,1^a$	$669,6 \pm 44,5^a$	$783,7 \pm 135,1^a$	$791,8 \pm 78,1^a$	$730,8 \pm 170,7^a$
3	$633,3 \pm 82,0^a$	$817,7 \pm 148,7^a$	$745,8 \pm 153,4^a$	$678,8 \pm 122,7^a$	$815,1 \pm 208,0^a$
4	$638,4 \pm 79,4^a$	$815,5 \pm 167,2^a$	$864,3 \pm 222,1^a$	$669,7 \pm 100,6^a$	$801,7 \pm 176,8^a$
5	$597,6 \pm 70,4^a$	$817,6 \pm 261,6^a$	$705,6 \pm 114,9^a$	$750,4 \pm 126,2^a$	$678,0 \pm 55,2^a$
6	$841,6 \pm 101,5^a$	$646,9 \pm 53,5^a$	$678,0 \pm 131,5^a$	$675,8 \pm 46,7^a$	$752,1 \pm 146,9^a$
7	$682,7 \pm 80,0^a$	$636,4 \pm 69,1^a$	$675,3 \pm 138,9^a$	$636,4 \pm 49,5^a$	$719,7 \pm 136,6^a$
8	$660,9 \pm 83,1^a$	$589,6 \pm 16,2^a$	$628,9 \pm 66,2^a$	$531,0 \pm 218,9^a$	$627,7 \pm 24,0^a$
9	$539,8 \pm 76,6^a$	$494,5 \pm 119,0^a$	$722,4 \pm 137,9^a$	$678,2 \pm 131,3^a$	$643,0 \pm 58,7^a$
10	$526,3 \pm 41,3^a$	$644,8 \pm 92,5^a$	$794,6 \pm 195,1^a$	$551,4 \pm 31,3^a$	$653,2 \pm 168,7^a$

Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ )

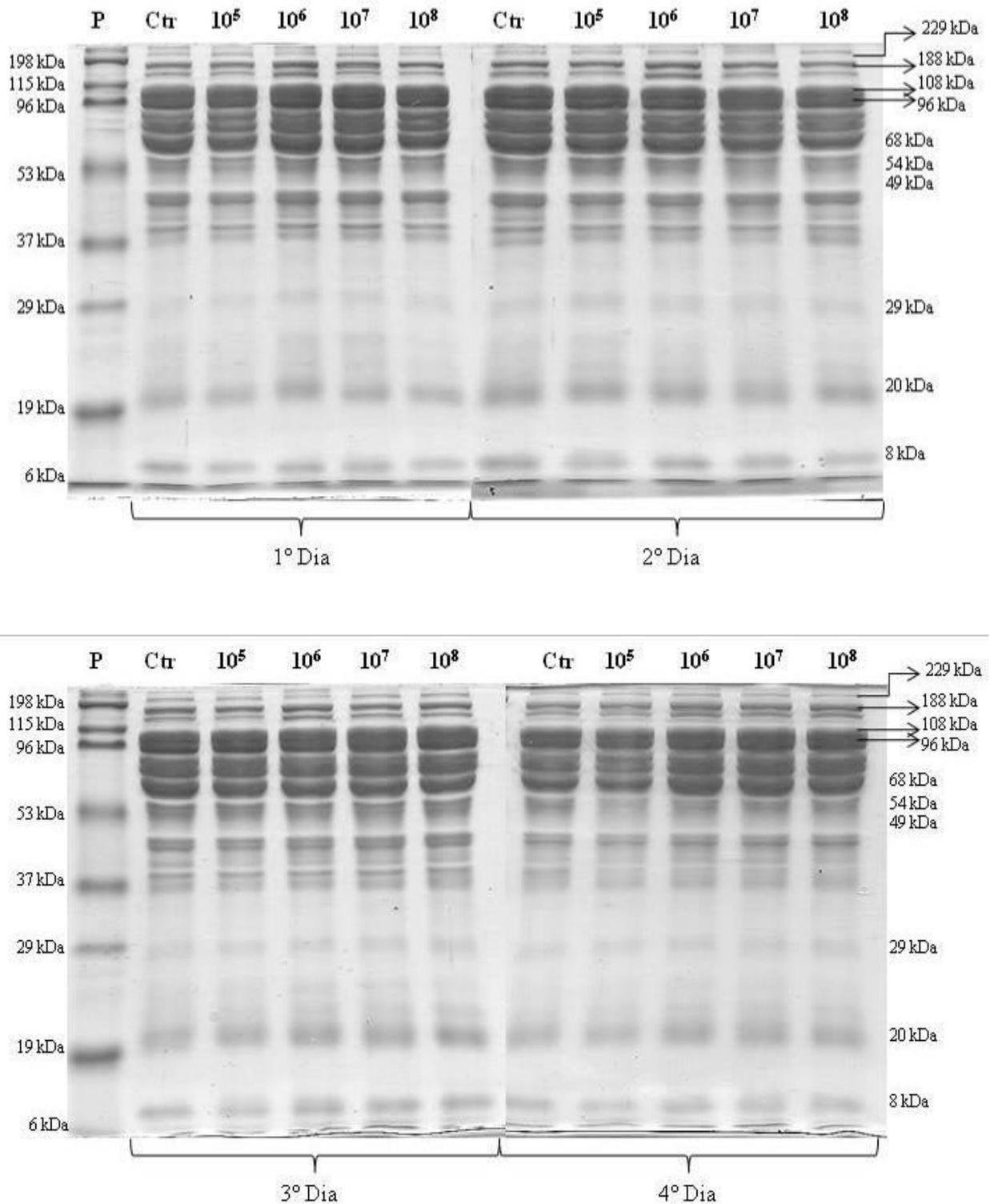
\*Valores expressos em  $\mu\text{g}$  de proteína por  $\text{mg}$  de ovos de *R. microplus*.



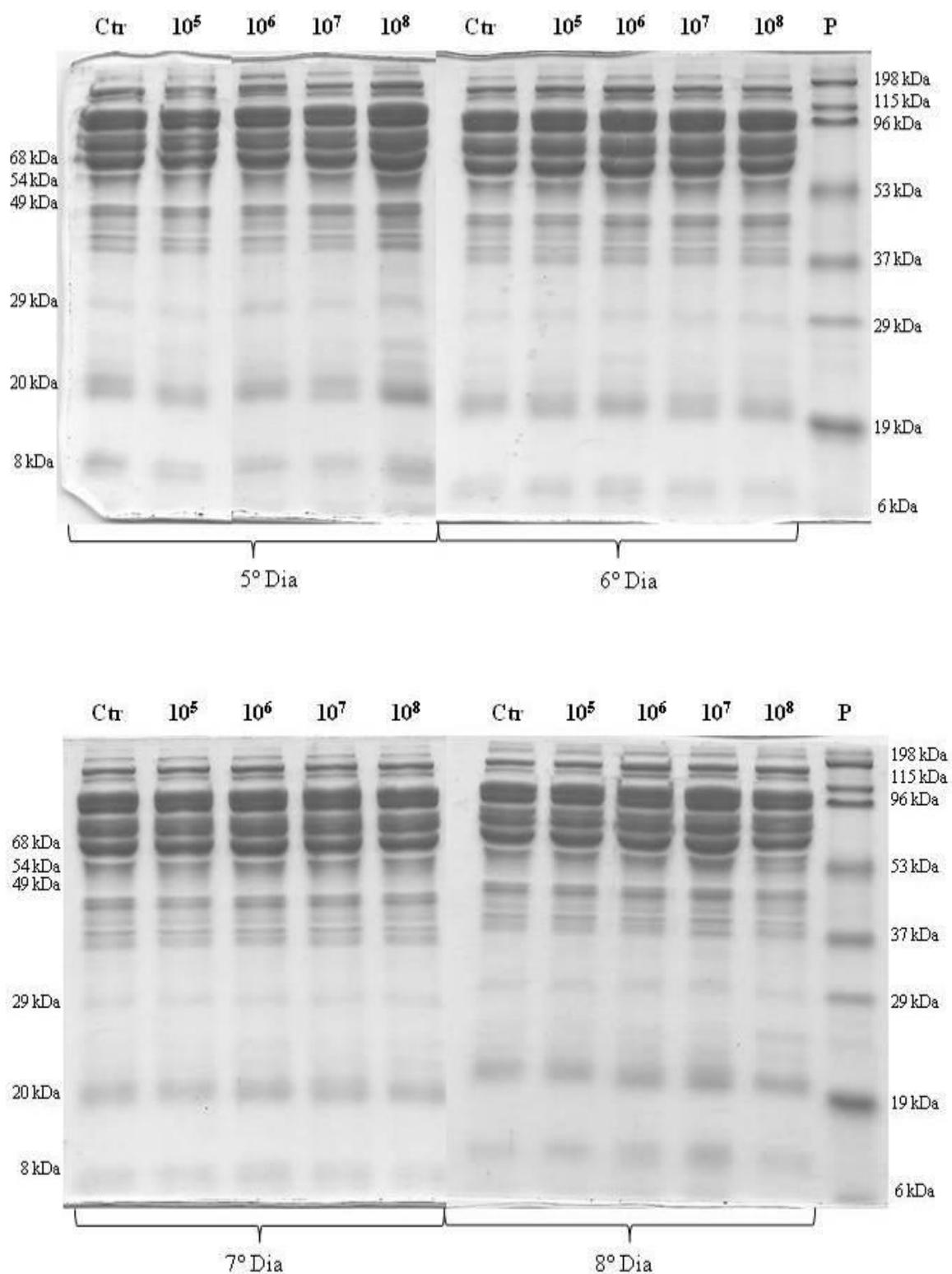
**Figura 2.** Conteúdo protéico total, expresso em  $\mu\text{g}$  de proteína/mg de ovos de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* infectadas por diferentes concentrações de *Metarhizium anisopliae* s.l. ou tratadas com água destilada estéril acrescida de Tween 80 (controle). O conteúdo protéico do homogenato de ovos foi determinado pelo método de Lowry. As barras indicam o desvio padrão para cada amostra. Durante o período de postura, as fêmeas foram mantidas sob condições controladas de laboratório ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , UR  $\geq 80\%$ , escotofase).

### **4.3 SDS-PAGE.**

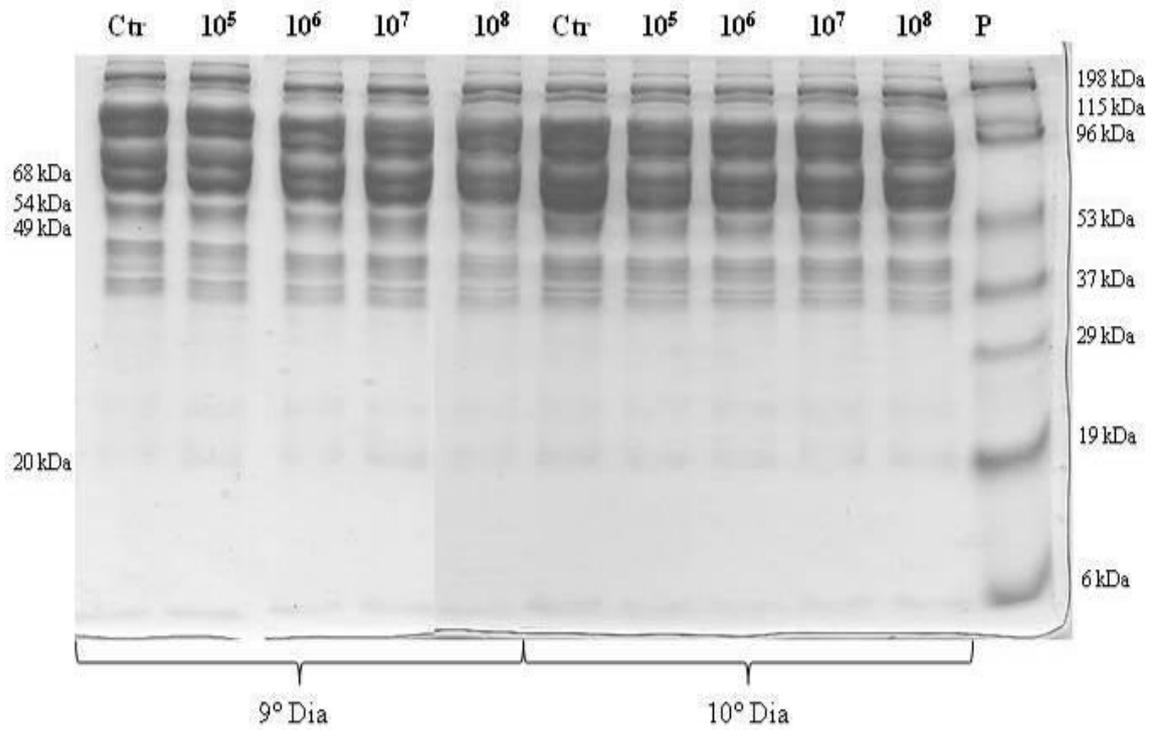
Na análise dos géis foram evidenciadas 19 bandas protéicas com pesos moleculares aproximados de 229 kDa, 188 kDa, 150 kDa, 108 kDa, 96 kDa, 85 kDa, 79 kDa, 68 kDa, 54 kDa, 49 kDa, 46 kDa, 45 kDa, 41 kDa, 39 kDa, 37 kDa, 29 kDa, 26 kDa, 20 kDa, 8 kDa e 6 kDa (Figuras 3, 4 e 5). A partir do nono dia de postura as bandas com peso molecular de 29 kDa e 8 kDa não foram mais observadas (Figura 5). Não foi observada diferença no perfil de bandas entre o grupo controle e os grupos tratados, bem como na comparação entre os perfis grupos tratados.



**Figura 3.** SDS-PAGE (12%) dos ovos de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* infectadas por *Metarhizium anisopliae* s.l., ao longo dos quatro primeiros dias de postura sob condições controladas ( $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{UR}\geq 80\%$ , escotofase). **P**- Padrões de peso molecular: **198 kDa**, **115 kDa**, **96 kDa**, **53 kDa**, **37 kDa**, **29 kDa**, **19 kDa**, **6 kDa**; **Ctr**-Grupo controle; **10<sup>5</sup>**, **10<sup>6</sup>**, **10<sup>7</sup>**, **10<sup>8</sup>** - postura de fêmeas tratadas com suspensão de *M. anisopliae* s.l. nas concentrações de  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  conídios/mL, respectivamente.

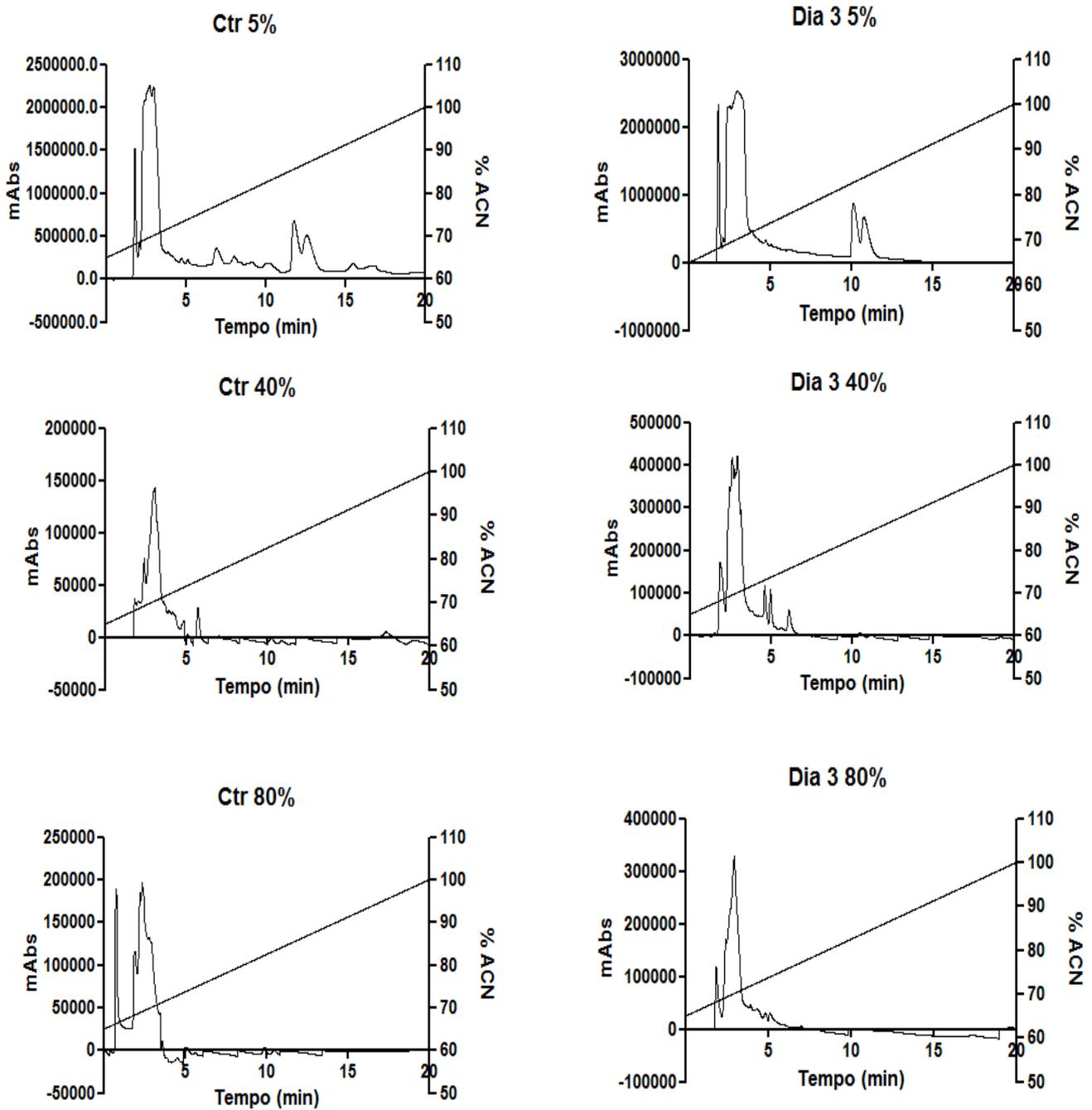


**Figura 4.** SDS-PAGE (12%) dos ovos de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* infectadas por *Metarhizium anisopliae* s.l., ao longo do quinto, sexto, sétimo e oitavo dias de postura sob condições controladas ( $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{UR}\geq 80\%$ , escotofase). **P-** Padrões de peso molecular: **198 kDa, 115 kDa, 96 kDa, 53 kDa, 37 kDa, 29 kDa, 19 kDa, 6 kDa**; **Ctrl-**Grupo controle; **10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>** - postura de fêmeas tratadas com suspensão de *M. anisopliae* s.l. nas concentrações de  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  conídios/mL, respectivamente.



**Figura 5.** SDS-PAGE (12%) dos ovos de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* infectadas por *Metarhizium anisopliae* s.l., ao longo do nono e décimo dias de postura sob condições controladas ( $27\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $\text{UR}\geq 80\%$ , escotofase). **P**- Padrões de peso molecular: **198 kDa, 115 kDa, 96 kDa, 53 kDa, 37 kDa, 29 kDa, 19 kDa, 6 kDa**; **Ctrl**-Grupo controle;  **$10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$**  - postura de fêmeas tratadas com suspensão de *M. anisopliae* s.l. nas concentrações de  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  conídios/mL, respectivamente.

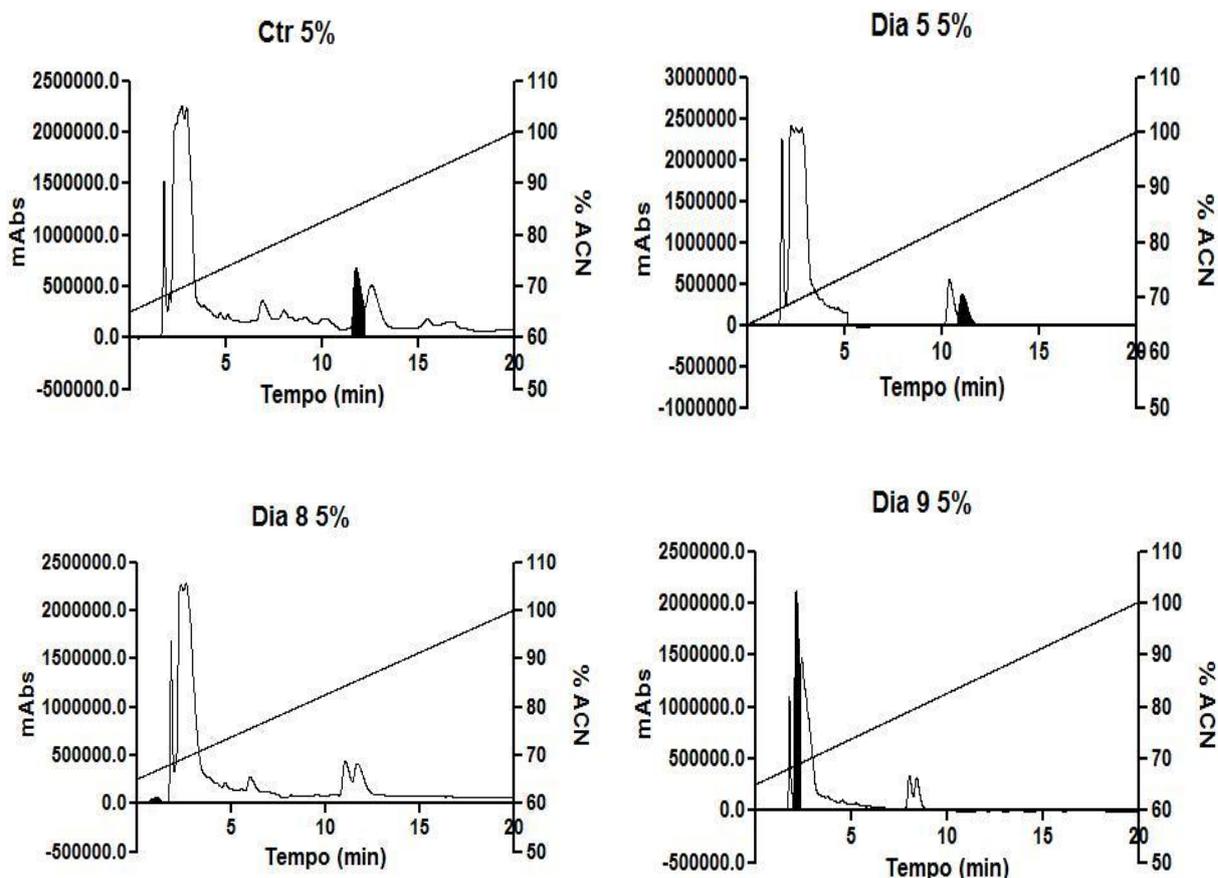
#### 4.4 Cromatogramas.



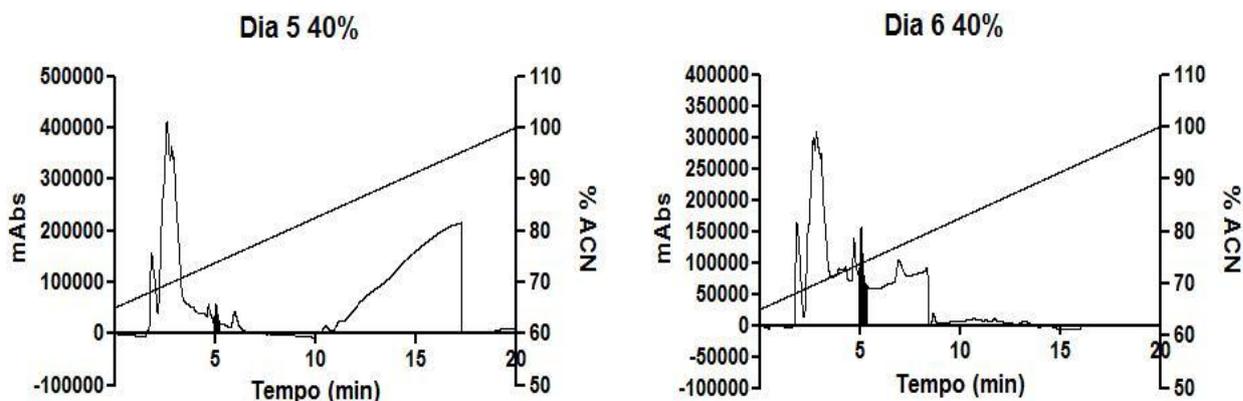
**Figura 6.** Exemplos de cromatogramas obtidos. A figura mostra cromatogramas do homogenato de ovos de *Rhipicephalus microplus* do grupo controle e do terceiro dia de postura de fêmeas tratadas com *Metarhizium anisopliae* s.l. Cada homogenato foi eluído em 5, 40 ou 80% de acetonitrila (ACN) em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto. A absorbância foi monitorada a 220 nm.

#### 4.5 Atividade Antimicrobiana Contra Fungo Leveduriforme.

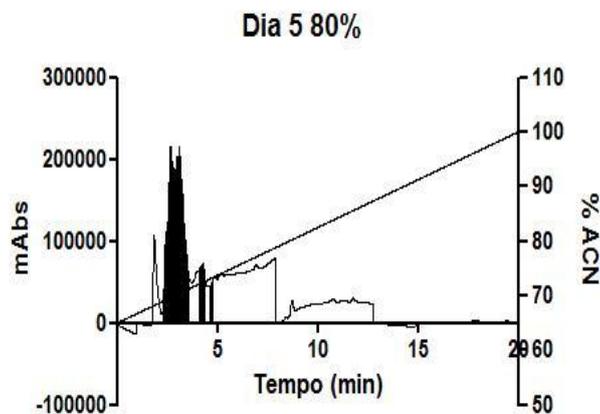
Todos os picos recolhidos durante a eluição das amostras na coluna C18 fase reversa (item 3.11.2), foram testados contra *C. albicans* (item 3.12.1). Os picos que causaram redução média de 35% ou mais no crescimento de *C. albicans* apresentavam os seguintes grupos/tempos de retenção: CTR 5% 11,764'; Dia 5 5% 11,053'; Dia 5 40% 5,029'; Dia 5 80% 2,642', 4,266', 4,833'; Dia 6 40% 5,046'; Dia 8 5% 1,074'; Dia 9 5% 2,017', e causaram respectivamente 78,69%, 35,42%, 38,3%, 40,8%, 39,68%, 57,84%, 35%, 80,94% e 46,18% de redução no crescimento da levedura levando em consideração o branco como 100%. As Figuras 6, 7 e 8 mostram os cromatogramas dos grupos com atividade antimicrobiana. As Figuras 9 e 10 destacam a análise espectrofotométrica do crescimento de *C. albicans* incubada com os picos. Estas frações, com atividade contra *C. albicans* foram testadas contra *M. anisopliae*.



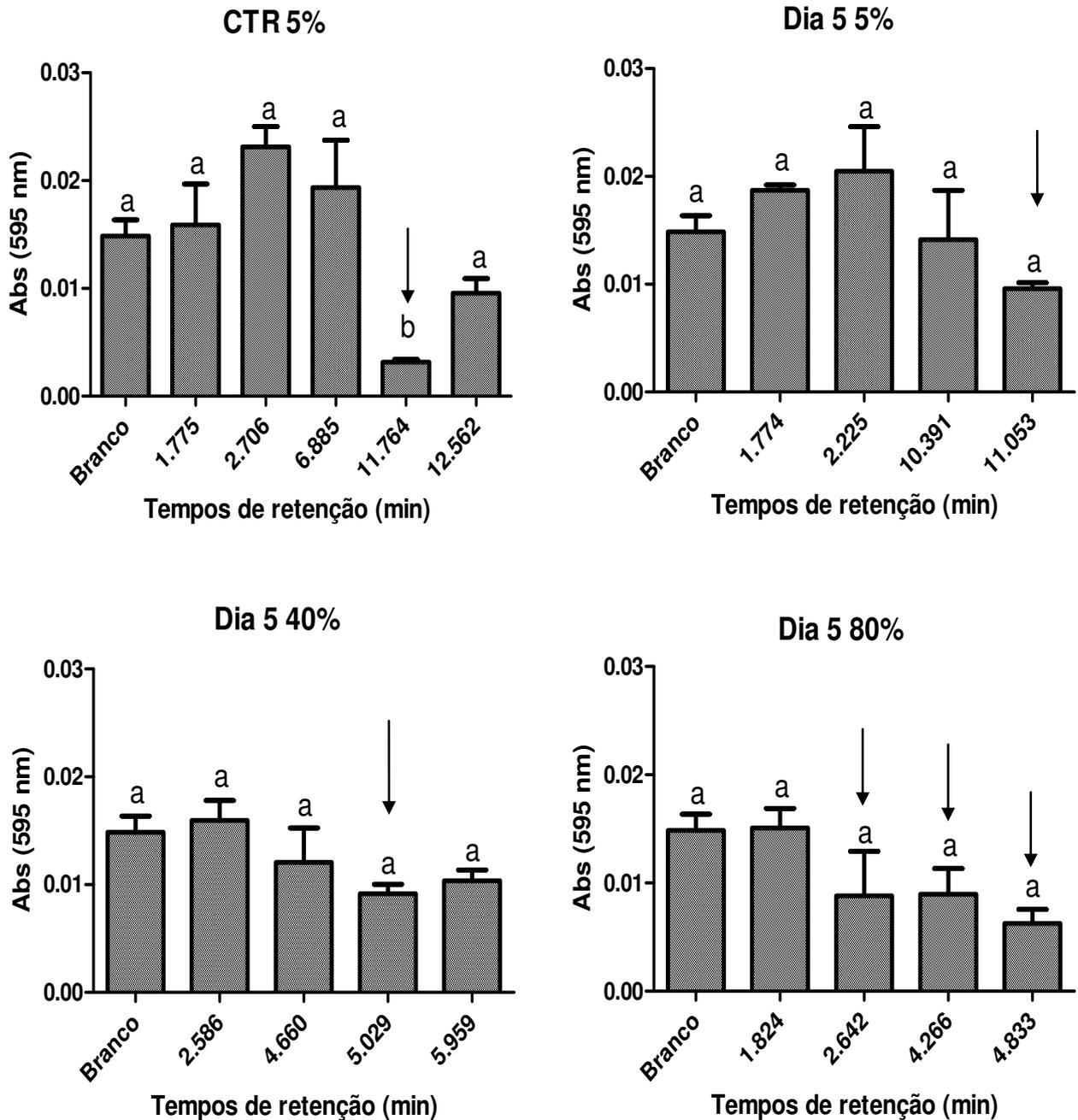
**Figura 7.** Cromatogramas do homogenato de ovos de *Rhipicephalus microplus* do grupo controle e dos quinto, oitavo e nono dias de postura de fêmeas tratadas com *Metarhizium anisopliae* s.l. Cada homogenato foi eluído em 5% de acetonitrila (ACN) em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto. A absorbância foi monitorada a 220 nm. Em sombreado as frações que apresentaram atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*.



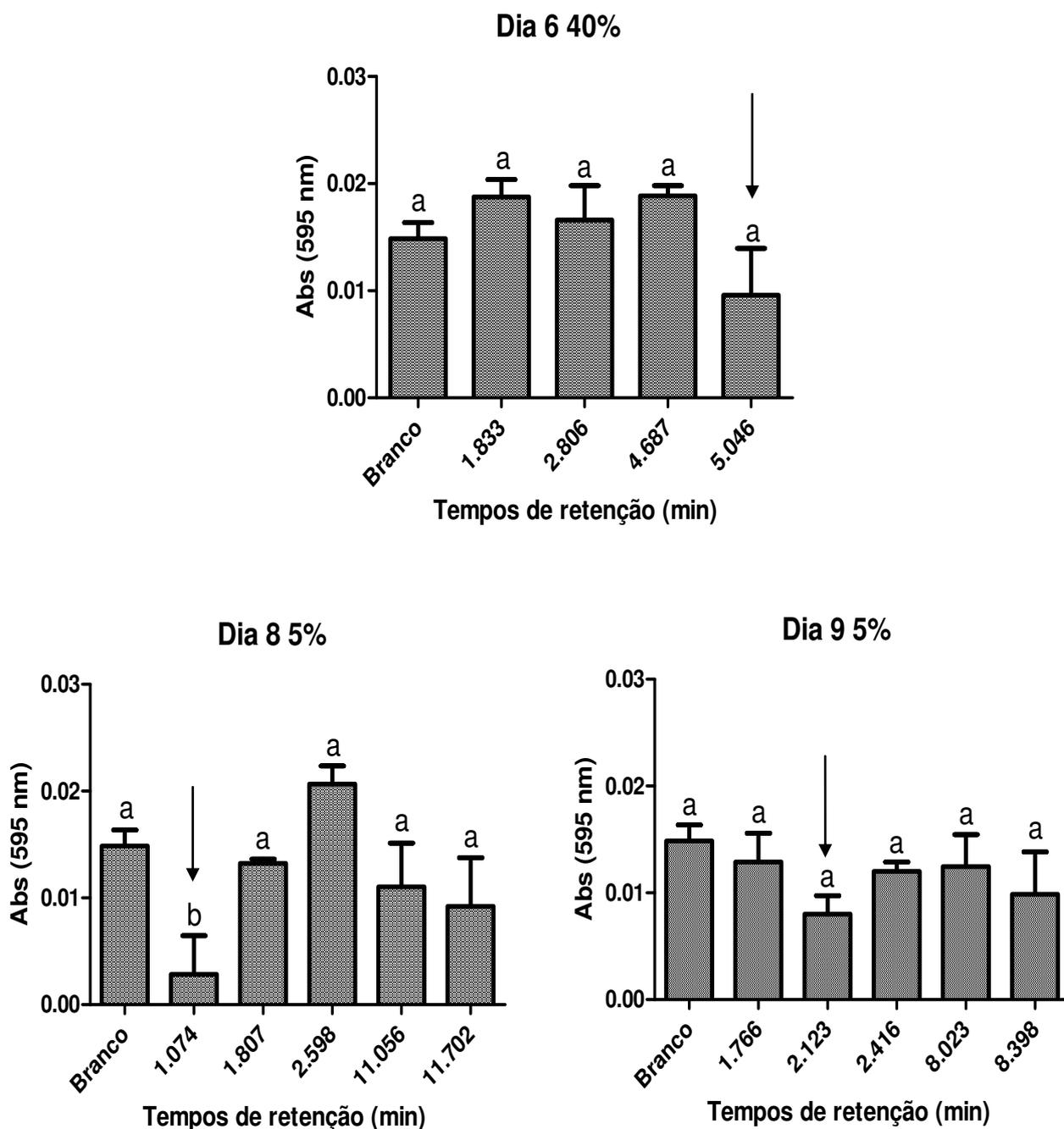
**Figura 8.** Cromatogramas do homogenato de ovos do quinto e sexto dias de postura de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* infectadas por *Metarhizium anisopliae* s.l. Cada homogenato foi eluído em 40% de acetonitrila (ACN) em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e um fluxo de 1mL/minuto. A absorbância foi monitorada a 220 nm. Em sombreado as frações que apresentaram atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*.



**Figura 9.** Cromatograma do homogenato de ovos do quinto dia de postura de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* infectadas por *Metarhizium anisopliae* s.l. O homogenato foi eluído em 80% de acetonitrila (ACN) em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e um fluxo de 1mL/minuto. A absorbância foi monitorada a 220 nm. Em sombreado as frações que apresentaram atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*.



**Figura 10.** Avaliação do crescimento de *Candida albicans* através de espectrofotometria. A postura do grupo controle e do quinto dia de postura de *Rhipicephalus microplus* infectadas por *Metarhizium anisopliae* s.l., foi pré purificada com 5, 40 ou 80% de acetonitrila (ACN). Essas frações foram submetidas à CLAE em coluna C18 fase reversa (gradiente de 65 a 100% de ACN). Vinte  $\mu\text{L}$  de cada pico recolhido durante a cromatografia foi acrescido de 80  $\mu\text{L}$  da cultura de *C. albicans* ( $4 \times 10^5$  células/mL) e incubados a 30°C por 18 horas. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre a absorbância do branco e dos picos. As setas indicam os picos que foram utilizados no bioensaio com *M. anisopliae* s.l. (Figura 12).



**Figura 11.** Avaliação do crescimento de *Candida albicans* através de espectrofotometria. A postura do sexto, sétimo, oitavo e nono dias de *Rhipicephalus microplus*, infectadas por *Metarhizium anisopliae* s.l., foi pré-purificada com 5, 40 ou 80% de acetonitrila (ACN). Essas frações foram submetidas à CLAE em C18 fase reversa (gradiente de 65 a 100% de ACN). Vinte  $\mu\text{L}$  de cada pico recolhido durante a cromatografia foi acrescido de 80  $\mu\text{L}$  da cultura de *C. albicans* ( $4 \times 10^5$  células/mL) e incubados a 30°C por 18 horas. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre a absorvância do branco e dos picos. As setas indicam os picos que foram utilizados no bioensaio com *M. anisopliae* s.l. (Figura 12).

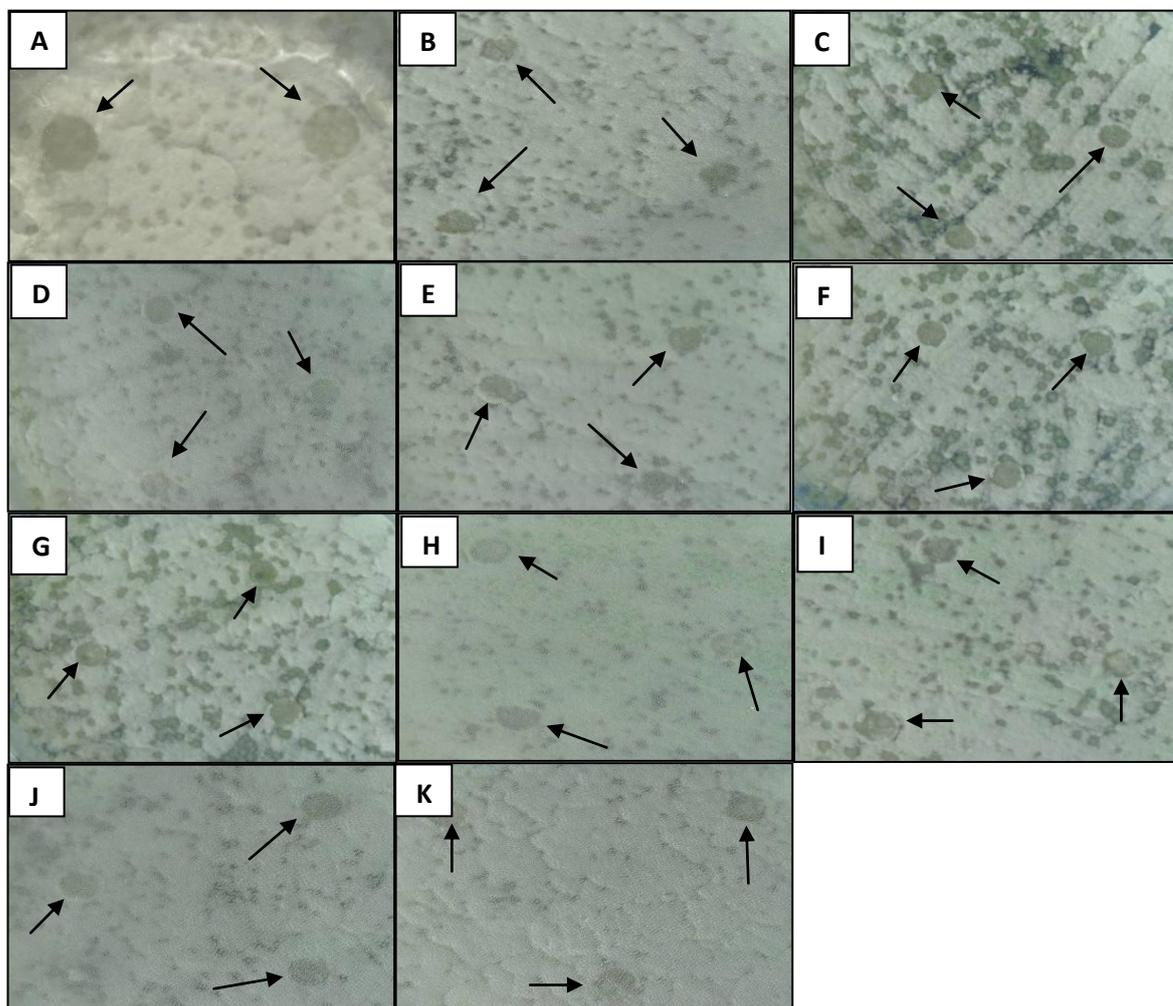
## **4.6 Teste de Difusão em Meio Sólido Contra *Metarhizium anisopliae* s.l.**

### **4.6.1 Uso das frações recolhidas na CLAE.**

Os picos que causaram redução média de 35% ou mais de redução no crescimento de *C. albicans* (representados por setas nas figuras 10 e 11) foram testados contra *M. anisopliae* s.l. através de teste de difusão em meio sólido. Nenhum pico testado apresentou atividade antimicrobiana contra *M. anisopliae* s.l. (Figura 12)

### **4.6.2 Uso do macerado dos ovos.**

O macerado dos ovos de cada grupo foi testado contra *M. anisopliae* s.l. através de teste de difusão em meio sólido. Nenhum grupo apresentou atividade antimicrobiana contra *M. anisopliae* s.l.



**Figura 12.** Teste de difusão em meio sólido com *Metarhizium anisopliae* s.l. usando os picos que apresentaram interferência no crescimento de *Candida albicans*. Nenhuma das frações apresentou atividade antimicrobiana contra *M. anisopliae* s.l. **A:** discos imersos em água destilada estéril (controle do teste de difusão em meio sólido); **B:** fração da postura do grupo controle eluída em 5% acetoneitrila (ACN), tempo de retenção (TR) de 11.764' na CLAE em C18 fase reversa (FR); **C:** fração do quinto dia de postura eluída em 5% ACN, TR de 11.053' na CLAE C18 FR; **D:** fração do quinto dia de postura eluída em 40% de ACN, TR de 5.029' na CLAE C18 FR; **E:** fração do quinto dia de postura eluída em 80% de ACN, TR de 2.642' na CLAE C18 FR; **F:** fração quinto dia de postura eluída em 80% de ACN, TR de 4.266' na CLAE C18 FR; **G:** fração do quinto dia de postura eluída em 80% de ACN, TR de 4.833' na CLAE C18 FR; **H:** fração do sexto dia de postura eluída em 40% de ACN, TR de 5.046' na CLAE C18 FR; **I:** fração do sétimo dia de postura eluída em 5% de ACN, TR de 2.762 na CLAE C18 FR; **J:** fração do oitavo dia de postura eluída em 5% de ACN, TR de 1.074 na CLAE C18 FR; **K:** fração do nono dia de postura eluída em 5% ACN, TR de 2.017' na CLAE C18 FR. As setas indicam os discos.

## 5 DISCUSSÃO

O fungo entomopatogênico *M. anisopliae* s.l. é um micro-organismo de distribuição cosmopolita e teve seu potencial inseticida explorado logo após a sua identificação (ZIMMERMANN, 2007b). Este entomopatógeno vem sendo testado com êxito em estudos que investigam o controle biológico de *R. microplus* e de outros carrapatos (BITTENCOURT et al., 1994; CASTRO et al., 1997; MONTEIRO et al., 1998; BITTENCOURT et al., 1999; MELO et al., 2006).

Apesar da vulnerabilidade de ovos de carrapatos a patógenos, devido a sua imobilidade, os estudos das reações imunes deste artrópode estão focados principalmente nos estágios de ninfa e adulto (TAYLOR, 2006; SONENSHINE; HYNES, 2008; ANGELO et al., 2010b). Alguns estudos, entretanto, reportam atividade antimicrobiana na superfície e no macerado de ovos de carrapatos. Esteves *et al.* (2009) identificaram atividade antimicrobiana em *R. microplus* contra *C. albicans* e *Micrococcus luteus*. Estudos realizados com o argasídeo *Ornithodoros moubata*, (NAKAJIMA et al., 2002) e com o carrapato do gado africano, *Amblyomma hebraeum* (ARRIETA et al., 2006), também demonstraram atividade antimicrobiana na postura.

Não existem estudos relacionados às alterações no perfil protéico da postura de carrapatos tratados com fungos entomopatogênicos; sabe-se, contudo, que alguns parâmetros biológicos (como os períodos de pré-postura, período e peso de postura, período de incubação de ovos e porcentagem de eclosão de larvas), das fêmeas infectadas apresentam-se alterados em relação às fêmeas não infectadas (BITTENCOURT et al., 1992; 1994; MELO et al., 2006).

A escolha do período de análise da postura no presente trabalho (10 dias) foi baseada no estudo de Bittencourt *et al.* (1995). Estes autores verificaram que no segundo dia pós tratamento já havia hifas de *M. anisopliae* s.l. na hemolinfa das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, e que a partir do quarto dia pós tratamento as hifas foram detectadas em lâminas de impressão de órgãos. Neste sentido, alterações no conteúdo ou perfil protéico dos ovos seriam detectadas como um reflexo da infecção instalada nos órgãos internos, inclusive nos ovários, no período de 10 dias de investigação.

A infecção por *M. anisopliae* s.l. leva a fêmea de carrapato à morte em decorrência do crescimento fúngico no interior de seu organismo. Essa morte não é instantânea, e geralmente ocorre de 7 a 12 dias após a infecção fúngica (BITTENCOURT et al., 1994; 1999). Entretanto, antes de morrer, a fêmea infectada não interrompe sua postura. Trabalhos realizados por Bittencourt *et al.* (1992; 1994) reportaram que há um aumento do período de pré-postura das fêmeas infectadas por *M. anisopliae* s.l. comparando-as com fêmeas não infectadas. Contudo, um estudo mais recente realizado por Perinotto (2010) demonstrou que o período de pré-postura de fêmeas de *R. microplus* tratadas com fungos entomopatogênicos pode diminuir. Essa redução geralmente vem acompanhada de uma maior massa de ovos nos primeiros dias de postura (dados não publicados). Sugere-se que o estresse causado pela infecção fúngica desencadeia um comportamento no carrapato que favorece a manutenção de seus descendentes. Esse comportamento pode ser expresso pela redução do período de pré-postura e/ou início da postura com um volume de ovos maior que a habitual e caracteriza este artrópode como um estrategista (SONENSHINE, 1991).

No presente estudo o perfil protéico do primeiro dia da postura de fêmeas de *R. microplus* infectadas artificialmente com *M. anisopliae* s.l. foi avaliado. Os ovos apresentavam, portanto, o mesmo estágio de desenvolvimento embrionário. A diferença ocorreu em relação à evolução da infecção fúngica no organismo da fêmea.

Foi evidenciado que tanto o conteúdo, quanto o perfil protéico não sofreram alterações significativas comparando-se o grupo controle com os grupos infectados, nos dez dias analisados. Apesar de não haver diferença significativa observa-se que o desvio padrão dos grupos infectados por *M. anisopliae* s.l. (Figura 3) foi maior se comparado com a mesma variação no grupo controle, e mesmo não havendo diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ), sugere-se que o desafio causado pelo fungo aumenta a probabilidade de variação no conteúdo protéico dos ovos.

Com o objetivo de esclarecer alguns mecanismos intrínsecos da biologia da oviposição e embriogênese, Raia (2007) também avaliou o conteúdo e o perfil protéico dos ovos de *R. microplus*, mas sem nenhum tratamento prévio, e observou que as concentrações de proteína nos ovos se mantiveram constantes até os últimos dias de postura, quando houve um aumento abrupto do conteúdo protéico. Durante os dez primeiros dias, Raia (2007) observou valores inferiores, mas proporcionalmente iguais, aos encontrados no presente estudo (Tabela 1). Essa diferença nos valores do conteúdo protéico pode ser explicada pelos diferentes métodos empregados na preparação das amostras; no presente trabalho, o macerado dos ovos foi homogeneizado em tampão de lise e posteriormente centrifugado, para que o sobrenadante pudesse ser utilizado nas análises, já Raia (2007), filtrou o homogenato da postura em membranas de 0,45  $\mu\text{m}$ , o que provavelmente reduziu a quantidade de proteínas.

O resultado encontrado na análise dos perfis protéicos, no presente estudo, sugere que a infecção causada por *M. anisopliae* s.l. não leva a modificações no metabolismo protéico do processo de maturação dos oócitos. Apesar de não terem sido detectadas alterações no perfil protéico da postura de fêmeas infectadas, Angelo *et al.* (2010b) observaram uma redução na quantidade de proteínas totais na hemolinfa de *R. microplus* 48 horas após a inoculação de *M. anisopliae*. Em 2011, Angelo também reportou alterações na intensidade da expressão de proteínas de amostras de hemolinfa de fêmeas de *R. microplus* infectadas por *M. anisopliae* s.l., *B. bassiana* ou *Fusarium oxysporum*, demonstrando que as infecções causadas por fungos alteram a expressão de proteínas constitutivas na hemolinfa. A associação destes resultados com os encontrados no presente trabalho ratifica a afirmação de que o carrapato é um estrategista (SONENSHINE, 1991), uma vez que mesmo apresentando uma hemolinfa com déficit de proteínas, devido à infecção fúngica, este artrópode é capaz de maturar os oócitos e ovipor, embora para isso, geralmente, necessite reduzir o período de pré-postura e iniciar a postura com uma quantidade de ovos maior que a habitual.

Em SDS-PAGE o perfil protéico da postura de fêmeas de *R. microplus* infectadas por *M. anisopliae* s.l. apresentaram bandas (Figura 3, 4 e 5) que correspondem, ao perfil encontrado para vitelina por Logullo *et al.* (2002). A maturação dos oócitos envolve, majoritariamente, a síntese desse complexo protéico, chamado vitelina, fundamental para nutrição e desenvolvimento do embrião (ROSELL; COONS, 1991; SONENSHINE, 1991; LOGULLO *et al.*, 2002). Esta é a principal proteína formadora do ovo de organismos como insetos e carrapatos, e representa cerca de 80 a 90% do conteúdo protéico total presente nestes ovos (CHINZEI *et al.*, 1983; ROSELL; COONS, 1989; 1991; LOGULLO, 2002). Em *R. microplus* possui cerca de 492 kDa e apresenta, sob condições desnaturantes, nove subunidades que vão de 205 kDa a 20 kDa (LOGULLO *et al.*, 2002). Portanto, os resultados obtidos no presente estudo confirmam a hipótese de que a infecção fúngica não altera a síntese de vitelina.

Além de fornecer substratos para o desenvolvimento do embrião, a vitelina de *R. microplus* apresenta-se como fonte de heme para o embrião (LOGULLO *et al.*, 2002). Heme é fundamental à organismos vivos uma vez que atua como grupo prostético de moléculas essenciais, como os citocromos e a hemoglobina. A literatura reporta que além de fêmeas de

*R. microplus* não serem capazes de sintetizar heme (BRAZ et al., 1999), o embrião e larvas não alimentadas também não possuem essa capacidade (LOGULLO et al., 2002). A molécula de heme é adquirida por fêmeas de *R. microplus* através da digestão da hemoglobina proveniente do sangue ingerido, e se liga, na hemolinfa, a proteínas transportadoras como a HeLP (uma hemolipoproteína) (MAYA-MONTEIRO et al., 2000) o que evita sua degradação e a formação de substâncias danosas ao carrapato (RITTER; TYRREL, 2000). A vitelina é também, portanto, uma fonte de heme para o desenvolvimento embrionário (SORGINE et al., 2000) e o seu metabolismo deve ser um dos alvos para estudos relacionados ao avanço no controle de carrapatos.

Para que os componentes da vitelina sejam disponibilizados para o embrião, a hidrólise dessa molécula é necessária. Até o momento três enzimas envolvidas na degradação da vitelina já foram descritas: as endopeptidases aspárticas BYC (*Boophilus* yolk procathepsin), THAP (tick heme-binding aspartic proteinase) e a VTDCE (vitellin-degrading cysteine endopeptidase). A BYC é uma catepsina que, sob condições desnaturantes, apresenta duas bandas com cerca de 54 e 49 kDa cada (LOGULLO et al., 1998). A ação desta catepsina contribui para a disponibilidade de nutrientes para o embrião e bandas com pesos homólogos às de suas subunidades puderam ser observadas nas figuras 3, 4 e 5 do presente estudo. A THAP é uma enzima regulada através da ligação com moléculas de Heme, e apresenta, sob condições desnaturantes, duas subunidades com 32 e 37 kDa (SORGINE et al., 2000) que também podem ser evidenciadas nas figuras 3, 4 e 5. A VTDCE é a mais ativa dentre as três descritas e apresenta, sob condições desnaturantes, duas subunidades com 17 e 22 kDa (SEIXAS et al., 2003). As subunidades de VTCDE não estão visíveis nos géis das figuras 3, 4 e 5 pois a quantidade de proteína total, por amostra, para que isso ocorresse teria que ter sido muito grande. Seixas *et al.* (2003) apresentaram em seu trabalho um gel de poliácridamida (14%) contendo as respectivas subunidades de VTCDE e informaram que foram necessários 50 µg da proteína purificada. No presente estudo foram utilizadas 30 µg de proteína total por amostra.

Dessa forma, baseado nos resultados dos perfis protéicos encontrados no presente estudo, pode-se sugerir que a infecção fúngica não altera a síntese das enzimas envolvidas na degradação de vitelina, uma vez que, baseado no peso molecular, as bandas que correspondem às endopeptidases BYC e THAP podem ser visualizadas nos géis.

Analisando as figuras 3 e 4, e comparando-as com a figura 5, pode-se observar que existem bandas protéicas, especialmente as de menor peso molecular (29, 20 e 8 kDa), que passam a não ser mais observadas ou estão em menor quantidade. Essa característica pode ser observada a partir do nono e décimo dias de postura, no entanto, não é exclusiva dos grupos infectados por *M. anisopliae* s.l., sendo, portanto um processo fisiológico. Raia (2007) sugere que essas alterações no perfil das bandas refletem alterações na disponibilidade de proteínas. Correlacionando-se este aspecto com a biologia de *R. microplus*, sugere-se que a diminuição na disponibilidade protéica pode contribuir, junto com outros fatores, para a redução na taxa de eclosão nos últimos dias de postura (COSTA, 1982).

Uma vez que não houve diferença em relação ao perfil protéico em gel de poliácridamida, uma análise cromatográfica (CLAE) foi realizada como alternativa para avaliação das possíveis diferenças nas substâncias protéicas presentes na postura de fêmeas do grupo tratado com a maior concentração fúngica ( $10^8$  conídios/mL) e do grupo controle.

Após a extração de proteínas, o macerado dos ovos foi analisado em CLAE utilizando-se uma coluna C18 fase reversa. Para esta análise foi utilizado um único controle, uma vez que os ovos foram coletados diariamente e o desenvolvimento embrionário paralisado devido ao congelamento das amostras, logo a postura apresentava o mesmo estágio de

desenvolvimento. A diferença entre o grupo controle e os grupos tratados foi verificada, portanto, na ausência ou presença de infecção fúngica, e a diferença entre os grupos tratados estava na evolução desta infecção no organismo da fêmea. Para cada dia ou para o grupo controle foram obtidos 3 perfis cromatográficos. Como pode ser observado com os exemplos da Figura 6, cromatogramas pré-purificados em concentrações de ACN semelhantes apresentam aparentemente as mesmas características, entretanto substâncias com tempos de retenção semelhantes podem apresentar ou não atividade antimicrobiana.

Para testar a capacidade desses picos de inibir o crescimento fúngico, todos os picos das respectivas amostras foram coletados e a atividade antimicrobiana de todas essas frações foi testada contra o fungo leveduriforme *C. albicans*. O bioensaio contra *C. albicans* mostrou atividade antimicrobiana de algumas frações (Item 4.4). Esteves *et al.* (2009) também reportaram atividade antimicrobiana do macerado e superfície de ovos de *R. microplus* contra *C. albicans*, identificando o peptídeo responsável pela inibição, a microplusina. No presente estudo, uma fração proveniente do grupo sem tratamento (CTR 5% 11,764') também apresentou atividade antimicrobiana contra *C. albicans*, entretanto sugere-se que essa atividade não seja devido à ação da microplusina descrita por Esteves *et al.* (2009), uma vez que estes autores determinaram os níveis de RNAm da microplusina em diferentes estágios de desenvolvimento dos ovários e dos ovos e verificaram que no primeiro dia de oviposição não havia expressão do gene nos ovos.

Esta fração do grupo controle com atividade antimicrobiana devia estar presente em todas as frações eluídas em ACN a 5%, uma vez que representa uma resposta constitutiva; no entanto, o teste de atividade antimicrobiana mostrou que frações com o mesmo tempo de retenção nos grupos tratados não apresentaram atividade semelhante contra *C. albicans*. Sugere-se então que a resposta imune do carrapato foi modulada pela infecção fúngica, o que, conseqüentemente, alterou a expressão de algumas substâncias antimicrobianas.

Além da atividade contra *C. albicans* encontrada no grupo controle, houve também atividade antimicrobiana em frações pertencentes a grupos de fêmeas infectadas (Figuras 9 e 10). Analisando os cromatogramas representados nas figuras 7, 8 e 9 podemos observar que as amostras eluídas nos cartuchos de extração com as mesmas concentrações de ACN (5, ou 40, ou 80%) apresentam perfis cromatográficos semelhantes. Entretanto mesmo tendo sido submetidos à mesma eluição e possuindo picos com tempos de retenção próximos, algumas amostras não apresentaram o mesmo comportamento na atividade antimicrobiana contra *C. albicans*. O pico que apresentou maior atividade antimicrobiana contra o fungo leveduriforme (Figura 7) pertence à amostra do dia 8 pré-purificada em 5% de ACN (Dia 8 5% TR 1,074') e não pôde ser observado em nenhum outro cromatograma. Este pico foi responsável por, em média, 80,94% de inibição no crescimento de *C. albicans* (Figura 11), embora a quantidade de substância inibitória tenha sido pequena, o que pode ser observado pelo valor da ABS do pico na figura 7.

Análises mais profundas das frações recolhidas seriam necessárias para identificar as substâncias responsáveis pela interferência no crescimento de *C. albicans* e avaliar se tais substâncias também estão presentes no período de desenvolvimento embrionário, o que não foi o objetivo no presente estudo.

As frações que apresentaram, em média, 35% ou mais de inibição no crescimento de *C. albicans* foram testadas contra *M. anisopliae* s.l., em teste de difusão em meio sólido e, contudo, não apresentaram atividade antimicrobiana. Além das frações, o macerado bruto dos ovos de todos os grupos tratados e do grupo controle também foi testado contra *M. anisopliae* s.l., e novamente, não foi evidenciada interferência no crescimento fúngico. Esses resultados

sugerem que a fêmea desafiada com *M. anisoplae* s.l. não é capaz de desencadear, na postura, uma resposta específica de combate ao organismo invasor, fato que é ratificado pela eficiência na eclosão das larvas após a infecção fúngica das fêmeas.

Um estudo de 1997, realizado por Lemaitre *et al.* (2007) demonstrou que o fungo entomopatogênico *B. bassiana* é capaz de induzir uma resposta antifúngica específica na hemolinfa de *Drosophila*; Angelo (2011) reportou a indução de atividade antimicrobiana na hemolinfa de *R. microplus* contra *B. bassiana* 48 horas após a imersão com o mesmo fungo. Estes estudos demonstram que fungos entomopatogênicos são capazes de desencadear, em seus hospedeiros, respostas imunes com elevada especificidade, entretanto, com base nos resultados obtidos no presente trabalho, sugere-se que este tipo de resposta não está presente na postura de fêmeas de *R. microplus* desafiadas com fungo entomopatogênico.

Apesar da ausência de uma resposta específica de combate ao fungo entomopatogênico testado, dados de um estudo recente (PERINOTTO, 2010) realizado com diferentes populações de *R. microplus* demonstraram não haver diferença estatisticamente significativa na eclodibilidade de larvas provenientes de ovos de fêmeas tratadas com *M. anisoplae* s.l. (isolado 959), sugerindo que mesmo infectadas, as fêmeas são capazes de produzir postura viável. Os resultados encontrados por Perinotto (2010) confirmam os dados obtidos no presente estudo, pois mesmo infectadas, as fêmeas são capazes de produzir ovos com um perfil protéico semelhante aos ovos de fêmeas não infectadas. Estes resultados demonstram que a infecção causada por este isolado fúngico não é, atualmente, rápida o suficiente para interferir nos dez primeiros dias de postura de uma fêmea infectada.

Mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos no processo de ovogênese e embriogênese de fêmeas de *R. microplus* infectadas por fungos entomopatogênicos. Além disso, identificar a natureza das substâncias presentes nos ovos de *R. microplus* que apresentam atividade antimicrobiana contra *C. albicans* contribuiria para o conhecimento da fisiologia desta espécie de carrapato, e conseqüentemente auxiliaria no desenvolvimento de maneiras mais eficazes de controle do carrapato *R. microplus*.

## 6 CONCLUSÕES

A infecção por *M. anisopliae* s.l., isolado Ma 959, não altera significativamente o conteúdo e o perfil protéico dos ovos de fêmeas de *Rhipicephalus microplus*.

Os ovos de fêmeas de *R. microplus* infectadas ou não pelo isolado Ma 959 de *M. anisopliae* s.l. apresentam atividade antimicrobiana contra o fungo leveduriforme *Candida albicans*.

Os ovos de fêmeas de *R. microplus* infectadas pelo isolado Ma 959 de *M. anisopliae* s.l. não apresentam substâncias com atividade antimicrobiana contra este fungo entomopatogênico.

O fungo entomopatogênico *M. anisopliae* s.l., isolado Ma 959, modula a atividade antimicrobiana dos ovos de fêmeas de *R. microplus* infectadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO-DIAZ, M.A., GARCIA, L., GALINDO-VELASCO, E., LEZAMA-GUTIERREZ, R., ANGEL SAHAGUN, C.A., RODRIGUEZ-VIVAS, R.I., FRAGOSO-SANCHEZ, H. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari : Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 3-4, p. 336-340, 2007.

ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.

ANGELO, I.C.; FERNANDES, E.K.K.; BAHIENSE, T.C.; PERINOTTO, W.M.S.; MORAES, A.P.R.; TERRA, A.L.M.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 172, n. 3-4, p. 317-322, 2010a.

ANGELO, I.C.; GOLO, P.S.; CAMARGO, M.G.; KLUCK, G.E.G.; FOLY, E. BITTENCOURT, V.R.E.P. Haemolymph protein and lipid profile of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infected by fungi. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 57, n. 1-2, p. 79-83, 2010b.

ANGELO, I.C. **Avaliação dos perfis protéico e lipídico na resposta de *Rhipicephalus microplus* à infecção com fungos**. 2011. 143p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Animal)-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2011.

ARRIETA, M.C.; LESKIW, B.K.; KAUFMAN, W.R. Antimicrobial activity in the egg wax of the African cattle tick *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 39, n. 3-4, p. 297-313, 2006.

BAHIENSE, T.C.; FERNANDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 3-4, p. 319-324, 2006.

BAHIENSE, T.C.; FERNANDES, E.K.K.; ANGELO, I.C.; PERINOTTO, W.M.S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Avaliação do potencial de controle biológico de *Metarhizium anisopliae* sobre *Boophilus microplus* em teste de estábulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 4, 243-245, 2007.

BALASHOV, Y.S. **Bloodsucking Ticks (Ixodoidea) – Vectors of Diseases of Man and Animals**. (English translation) ed H. Hoogstraal & R. J. Tatchell. Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America, 1968, 376p.

BEYS DA SILVA, W.O.; SANTI, L.; BERGER, M; PINTO A.F.M.; GUIMARÃES J.A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 829-834, 2009.

BEYS DA SILVA, W.O.; SANTI, L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infection. **British Mycological Society**, v. 114, p. 10-15, 2010.

BIDOCHKA, M.J.; SMALL, C.L.; SPIRONELLO, M. Recombination within sympatric cryptic species of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Environmental Microbiology**, v.7, n. 9, p.1361-1368, 2005.

BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v.101, n. 4, p.512-530, 2009.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Uso do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Arquivo da Universidade Rural do Rio de Janeiro**, v.15, n.2, p.197-202, 1992.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico de *Boophilus microplus*. **Revista Universidade Rural, Séries Ciências da Vida**, v. 16, n. 1-2, p. 49-55, 1994.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Dinâmica da infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista da Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, v. 17, n. 1, p. 83-88, 1995.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; PERALVA, S.L.E.S.; VIEGAS, E.C.; ALVES, S.B. Avaliação dos efeitos do contato de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. com ovos e larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.5, n. 2, p. 81-84, 1996.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASCARENHAS, A.G.; FACCINI, J.L.H. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 29, n. 2, p. 351-354, 1999.

BRAZ, G.R.C.; COELHO H.S.L.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, P.L. A missing metabolic pathway in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Current Biology**, v. 9, n. 13, p. 703-706, 1999.

CARVALHO, T.D.; BORELLI, I.C. Controle de carrapatos em bovinos. Revista científica eletrônica de medicina veterinária. 2008 Acesso <http://www.revista.inf.br/veterinaria10/revisao/edic-vi-n10-RL22.pdf> Dezembro 2010.

CASTRO, A.B.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; DAEMON, E.; VIEGAS, E.C. Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre o carrapato *Boophilus microplus* em teste de estábulo. **Revista da Universidade Rural, Série Ciências da Vida, Seropédica**, v.19, n.1-2, p.73-82, 1997.

CERAUL, S.M.; SONENSHINE D.E.; HYNES, W.L. Resistance of the tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) following challenge with the bacterium *Escherichia coli* (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae). **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 2, p. 376-378, 2002.

CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; PELL, J.K.; BALL, B.V.; SHAW, K.; SUNDERLAND, K.D. Fungal biocontrol of Acari. **Biocontrol Science and Technology**, v. 10, n. 4, p. 357-384, 2000.

CHINZEI, Y.; CHINO, H.; TAKAHASHI, K. Purification and properties of vitellogenin and vitellin from a tick, *Ornithodoros moubata*. **Journal of Comparative Physiology**, v.152B, n. 1, p.13-21, 1983.

CHINZEI, Y.; YANO, I. Fat body is the site of vitellogenin synthesis in the soft tick, *Ornithodoros moubata*, **Journal of Comparative Physiology**, v. 155B, n. 6, p. 671-678, 1985.

CORZO, G.; REVAH, S. Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 2, p. 173–180, 1999.

COSTA, A.L. **Bioecologia de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina:Ixodidae) no estado do Rio de Janeiro: oviposição e sazonalidade. Considerações preliminares.** 1982. 48p. Mestrado (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Animal)-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1982.

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

DÍAZ, M.P.; MACÍAS, A.F.; NAVARRO, S.R.; TORRE, M. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. **Interciencia**, v. 31, n. 12, p. 856-860, 2006.

DUMAS, C.; RAVALLEC, M.; MATHA, V.; VEY, A. Comparative study of the cytological aspects of the mode of action of destruxins and other peptidic fungal metabolites on target epithelial cells. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 67, n. 2, p. 137-146, 1996.

EGGENBERGER, L.R.; LAMOREAUX, W.J.; COONS, L.B. Hemocytic encapsulation of implants in the tick *Dermacentor variabilis*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 9, n. 279-287, 1990.

ESTEVES, E.; FOGAÇA, A. C.; MALDONADO, R.; SILVA, F.D.; MANSO, P.P.A.; PELAJO-MACHADO, M.; VALLE, D.; DAFFRE, S. Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs: Cellular localization and temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 33, n. 8, p. 913-919, 2009.

FARIA, M.R.; WRAIGHT, S.P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, n. 3, p. 237-256, 2007.

FERNANDES, E.K.K.; COSTA, G.L.; SOUZA, E.J.; MORAES, A.M.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P. *Beauveria bassiana* isolated from engorged females and tested against eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 393-398, 2003.

FERNANDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Entomopathogenic fungi against South American tick species. **Experimental and Applied Acarology**, v. 46, n. 1-4, p.71-93, 2008.

FERNANDES, É.K.K.; KEYSER, C.A.; CHONG, J.P.; RANGEL, D.E.N.; MILLER, M.P.; ROBERTS, D.W. Characterization of *Metarhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity. **Journal of Applied Microbiology**, v.108, n. 1, p.115-128, 2010.

FOGACA, A.C.; DA SILVA P.I.; TERESA J.R.M.; MIRANDA M.; BIANCHI, A.G.; MIRANDA, A.; RIBOLLA, P.E.M.; DAFFRE, S. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 36, p. 25330-25334, 1999.

FOGACA, A.C.; LORENZINI, D.M.; KAKU, L.M.; ESTEVES, E.; BULET, P.; DAFFRE, S. Cysteine-rich antimicrobial peptides of three cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 28, n. 3, p. 191-200, 2004.

FOGACA, A.C.; ALMEIDA, I.C.; EBERLIN, M.N.; TANAKA, A.S.; BULET, P.; DAFFRE, S. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. **Peptides**, 27, n. 4, p. 667-674, 2006.

FURLONG, J. Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária UFMG**, Belo Horizonte, n.8, p.49-61, 1993.

GEORGE, J.E.; POUND, J.M.; DAVEY, R.B. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S353-S366, 2004.

GONZALES, J.C. **O carrapato do boi: vida, resistência e controle**. São Paulo: Mestre Jou, 1974. 101p.

GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA-BORJA, G.E.; PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.

HAWKSWORTH, D.L. **Micologist's handbook**. 2ªed. England, Kew Surrey: CAB Press, 1977. 231p.

HYNES, W. L.; CERAUL, S.M.; TODD, S.M.; SEGUIN, K.C.; SONENSHINE, D.E. A defensin-like gene expressed in the black-legged tick, *Ixodes scapularis*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 19, n. 4, p. 339-344, 2005.

- HOFFMANN, J.A. The immune response of *Drosophila*. **Nature**, v. 426, n. 6962, p. 33-38, 2003.
- HORN, S.C.; ARTECHE, C.C.P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. **A hora Veterinária**, v. 4, n. 23, p. 12-32, 1985.
- HU Q.; AN X.; JIN F.; FREED S.; REN S. Toxicities of destruxins against *Bemisia tabaci* and its natural enemy *Serangium japonicum*. **Toxicon**, v. 53, n. 1, p. 115-121, 2009.
- JARROLD, S.L.; MOORE, D.; POTTER, U.; CHARNLEY, A.K. The contribution of surface waxes to pre-penetration growth of an entomopathogenic fungus on host cuticle. **Mycological Research**, v. 111, p. 240-249, 2007.
- JOHNS, R.; SONENSHINE, D.E.; HYNES, W.L. Control of bacterial infections in the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae): evidence for the existence of antimicrobial proteins in tick hemolymph. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, n. 4, p. 458-464, 1998.
- JOHNS, R.; SONENSHINE, D.E.; HYNES, W.L. Identification of a defensin from the hemolymph of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, n. 9, p. 857-865, 2001.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LEAL, A.T.; FREITAS, D.R.J. Perspectivas para o controle bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 31, n. 1, 2003.
- LEMAITRE, B.; REICHHART, J.; HOFFMANN, J. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA, v. 94, n. 26, p.14614-14619, 1997.
- LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster* **Annual Review of Immunology**, v.25, p.697-743, 2007.
- LIMA, C.A.; SASAKI, S.D.; TANAKA, A.S. Bmcystatin, a cysteine proteinase inhibitor characterized from the tick *Boophilus microplus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 347, n.1, p. 44-50, 2006.
- LOGULLO, C.; DA SILVA VAZ, I.; SORGINE, M.H.F.; PAIVA-SILVA, G.O.; FARIA, F.S.; ZINGALI, R.B.; DE LIMA, M.F.R.; ABREU, L.; FIALHO OLIVEIRA, E.; ALVES, E.W.; MASUDA, H.; GONZALES, J.C.; MASUDA, A.; OLIVEIRA, P.L. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. **Parasitology**, v. 116, n. 6, p. 525-532, 1998.
- LOGULLO, C.; MORAES, J.; DANSA-PETRETSKI, M.; VAZJR, I.S.; MASUDA, A.; SORGINE, M.H.F.; BRAZ, G.R.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, P.L. Binding and storage of heme by vitellin from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, n. 12, p. 1805-1811, 2002.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1971.

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*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 6, p. 839-846, 1998.

MAIA, M.M.D.; HEASLEY, A; CAMARGO DE MORAIS, M.M.; MELO, E.H.M.; MORAIS JR, M.A.; LEDINGHAM, W.M.; LIMA FILHO, J.L. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. **Bioresource Technology**, v. 76, n. 1, p. 23–27, 2001.

MARMARAS. V.J.; LAMPROPOULOU, M. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. **Cellular Signalling**, v.21, n. 2, p.186-195, 2009.

MAYA-MONTEIRO, C.M.; DAFFRE, S.; LOGULLO, C.; LARA, F.A.; ALVES, E.W.; CAPURRO, M.L.; ZINGALI, R.; OLIVEIRA, P.L. HeLp, a heme lipoprotein from the hemolymph of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 47, p. 36584–36589, 2000.

MELO, D.R.; REIS, R.C.S; BITTENCOURT, V.R.E.P. Patogenicidade *in vitro* do fungo *Metarhizium anisoplaie* (Metschinikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Brasileira de Parasitologia Veteirnária**, v. 15, n.4, p. 157-162, 2006.

MENT D.; GINDIN G.; SOROKER, V.; GLAZER, I.; ROT, A.; SAMISH, M. *Metarhizium anisopliae* conidial responses to lipids from tick cuticle and tick mammalian host surface. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, n. 2, p. 132-139, 2010.

MOINO JR, A.M.; ALVES, S.B. Efeito de imidacloprid e fipronil sobre *Bauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e no comportamento e limpeza de *Heterotermes tenuis*. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 10, n. 4, p. 611-619, 1998.

MONTEIRO, S.G.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; DAEMON, E.; FACCINI, J.L.H. Pathogenicity under laboratory conditions of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on larvae of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 7, n. 2, p. 113-116, 1998.

MOOKHERJEE, N.; HANCOCK, R.E. Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n.7-8, p. 922-933, 2007

MULLER, U.; VOGEL, P.; ALBER, G.; SCHAUB, G. The Innate Immune System of Mammals and Insects. Egesten A, Schmidt A, Herwald H (eds): **Trends in Innate Immunity**. Contributions to Microbiology. Basel, Karger, v. 15, p. 21-44, 2008.

NAKAJIMA, Y.; VAN DER GOES VAN NATERS-YASUI, A.; TAYLOR, D.; YAMAKAWA, M. Antibacterial peptide defensin is involved in midgut immunity of the soft tick, *Ornithodoros moubata*. **Insect Molecular Biology**, v. 11, n. 6, p. 611-618, 2002.

MURREL, A.; BARKER, S.C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**. v. 56, p. 169-172, 2003.

PAIÃO, J.C.V.; MONTEIRO, A.C.; KRONKA, S.N. Susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) to isolates of the fungus *Beauveria bassiana*. **World Journal of Microbiology and Biochemistry**, v. 17, n. 3, p. 245-251, 2001a.

PAIÃO, J.C.V.; MONTEIRO, A.C.; KRONKA, S.N. Compatibilidade de *Metarhizium anisopliae* com carrapaticidas químicos utilizados no controle de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). In: SIMPOSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 7, 2001b, Poços de Caldas, **Anais**. Minas Gerais, 2001, p. 117.

PAIÃO, J.C.V.; MONTEIRO, A.C.; KRONKA, S.N. Desempenho de *Metarhizium anisopliae* submetidos a diferentes doses de carrapaticidas químicos usados no controle de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). In: SIMPOSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 7, 2001c, Poços de Caldas, **Anais**. Minas Gerais, 2001, p. 160.

PAL, S.; ST LEGER, R.J.; WU, L.P. Fungal Peptide Destruxin A Plays a Specific Role in Suppressing the Innate Immune Response in *Drosophila melanogaster*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282 n. 12, p. 8969–8977, 2007.

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

PEREIRA, L.S.; OLIVEIRA, P.L.; BARJA-FIDALGO, C.; DAFFRE, S. Production of reactive oxygen species by hemocytes from the cattle tick *Boophilus microplus*. **Experimental Parasitology**, v. 99, n. 2, p. 66–72, 2001.

PEREIRA, M.C. *Boophilus microplus*: Revisão taxionômica e morfo-biológica. 1980. 126f. Tese (Mestrado)- Universidade de São Paulo, São Paulo. 1980.

PERINOTTO, W.M.S. **Ação dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre diferentes cepas do carrapato *Boophilus microplus***. 2010. 47p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Animal) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.

POSADAS, J.; LECUONA, R. Selection of native isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) for the microbial control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 2, p. 284-291, 2009.

RAIA, V. A. **Avaliação quantitativa e qualitativa das proteínas dos ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Rhipicephalus (Rhipicephalus) sanguineus* (Acari:**

**Ixodidae) durante a oviposição e embriogênese.** 2007. 44p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Animal) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

RELINER, S.A.; MINNIS, A.M.; SUNG, G.; LUANGSA-ARD, J.J.; DEVOTTO, L.; HUMBER, R.A. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. **Mycologia**. *In press*: doi 10.3852/10-302

REIS, R.C.S.; MELO, D.R.; SOUZA, E.J.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Ação *in vitro* dos fungos *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok sobre ninfas e adultos de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p. 544-547, 2001.

RITTER, S.W., TYRREL, R.M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. , p. 289-30, 2000.

RIVALIER, E.; SEYDEL, S. Nouveau procede de culture sur lames gélosés appliqué al'étude microscopique de champignons deteignes. **Annals of Parasitology**, v.10, n.5, p.444-452, 1932.

RODRIGUES, J.; BRAYNER, F.A.; ALVES, L.C; DIXIT, R.; BARILLAS-MURY, C. Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. **Science**, v.329, n. 5997, p.1353-1355, 2010.

ROSELL-DAVIS, R.; COONS, L.B. Relationship between feeding, mating, vitellogenin production and vitellogenesis in the tick *Dermacentor variabilis*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 7, n. 1, p. 95-105, 1989.

ROSELL-DAVIS, R.; COONS, L.B. Purification and partial characterization of vitellin from the eggs of the hard tick, *Dermacentor variabilis*. **Insect Biochemistry**, v. 21, n. 8, p. 871-885, 1991.

SAITO, K. C.; BECHARA, G.H.; NUNES, E.T.; OLIVEIRA, P.R.; DENARDI, S.E.; MATHIAS, M. I. C. Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 3-4, p. 299 – 311, 2005.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. p. A8.1-A8.55.

SAMISH, M.; REHACEK, J. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. **Annual Review of Entomology**, v. 44, p. 159-182, 1999.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLASER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**, v.129, n. S1, p. S389-S403, 2004.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. 3. ed -reimpressão. Belo Horizonte: FEPMVZ- Editora, 2010. 264p. ISBN 85-87144-07-3

SANTI, L.; SILVA, W.O.B.; BERGER, M.; GUIMARÃES, J.A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. **Toxicon**, v. 55, p. 874-880, 2010.

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

SEIXAS, A.; DOS SANTOS, P.C.; VELLOSO, F.F.; DA SILVA VAZ JR. I.; MASUDA, A.; HORN, F.; TERMIGNONI, C. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. **Parasitology**, v. 126, n. 2, p. 155-163, 2003.

SILVA, S.B.; SAVASTANO, G.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Tipos celulares envolvidos na resposta imune de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* inoculadas com *Metarhizium anisopliae* e *Penicillium* sp. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.15, n.3, p.129-131, 2006.

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**, v. 40, n. 1, p. 321-326, 2005.

SONENSHINE, D.E. **Biology of ticks**. Old Dominion University, Norfolk, Virginia. Oxford University Press, 1991. 447 p. v. 1. ISBN 0-19-505910.

SONENSHINE, D.E.; HYNES, W.L.; CERAUL, S.M.; MITCHELL, R.; BENZINE, T. Host blood proteins and peptides in the midgut of the tick *Dermacentor variabilis* contribute to bacterial control. **Experimental & Applied Acarology**, v. 36, n. 3, p. 207-223, 2005.

SONENSHINE, D.E.; HYNES, W.L. Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, n. 18, p. 7046-7063, 2008.

SORGINE, M.H.F.; LOGULLO, C.; ZINGALI, R.B.; PAIVA-SILVA, G.O.; JULIANO, L.; OLIVEIRA, P.L. A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick *Boophilus microplus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 37, p. 28659-28665, 2000.

ST LEGER, R.J.; GOETTEL, M.; ROBERTS, D.W.; STAPLES, R.C. Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, n. 2, p. 168-179, 1991.

SUTHERST, R.W.; MAYWALD, G.F.; KERR, J.D.; STEGEMAN, D.A. The effect of cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* X *B. taurus* Steers. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 34, n. 3, p. 317-327, 1983.

TAYLOR, D. Innate Immunity in Ticks: A review. **Journal of the Acarological Society of Japan**, v. 15, n. 2, p. 109-127, 2006.

VALENZUELA, J.G.; FRANCISCHETTI, I.M.; PHAM, V.M.; GARFIELD, M.K.; MATER, T.N.; RIBEIRO, J.M. Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. **Journal of Experimental Biology**, v. 205, n. 18, p. 2843-2864, 2002.

VASTA, G.R.; MARCHALONIS, J.J. Humoral recognition factors in the arthropoda. The specificity of chelicerate serum lectins. **Integrative and Comparative Biology**, v. 23, n. 1, p. 157-171, 1983.

WHARTON, R.H. Acaricide resistance and cattle tick control. **Australian Veterinary Journal**, v. 43, p. 394-398, 1967.

WOHLKÖNIG, A.; HUET, J.; LOOZE, Y.; WINTJENS, R. Structural relationships in the lysozyme superfamily: significant evidence for glycoside hydrolase signature motifs. **PloS One**, v. 5, n. 11, p. e15388, 2010.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 9, n. 5-6, p. 553-596, 2007a.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 9, p. 879-920, 2007b.

ZHOU, J.; UEDA, M.; UMEMIYA, R.; BATTSETSEG, B.; BOLDBAATAR, D.; XUAN, X.; FUJISAKI, K. A secreted cystatin from the tick *Haemaphysalis longicornis* and its distinct expression patterns in relation to innate immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 7, p. 527-535, 2006.

## **ANEXOS**

Anexo A- Fórmula do tampão de lise duas vezes concentrado.

Anexo B- Solução alcalina.

Anexo C- Fórmula do gel de empilhamento 5% - 5 mL.

Anexo D- Fórmula do gel de corrida 12% - 25 mL.

Anexo E- Fórmula do Tampão de Amostra.

Anexo F- Descrição das siglas que representam as eluições nos cartuchos de extração em fase sólida.

Anexo A- Fórmula do tampão de lise duas vezes concentrado

Trishydroxymethylaminomethane (TRIS)	1,21 g
Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)	0,372 g
Nonidet P-40	4,0 mL
N-tosyl-L-lysine-chloromethylketone (TLCK)	2,0 mL
Phenylmethysulphonyl fluoride (PMSF)	2,0 mL
H <sub>2</sub> O destilada	q.s.p. 200 mL

Anexo B- Solução alcalina	
$\text{Na}_2\text{CO}_3$ a 2% em NaOH 0,5	14,7 mL
Tartarato de sódio e potássio	0,15 mL
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 6,4%	0,15mL

Anexo C- Fórmula do gel de empilhamento 5% - 5 mL	
H <sub>2</sub> O destilada	3,4 mL
Acilamida-Bis 30%	0,83 mL
Tris 1,5 M pH 6,8	0,63 mL
SDS 10%	0,05 mL
Ammonium persulfate (APS) 10%	0,05 mL
N, N, N'- Tetramethylethylenediamine (TEMED)	0,005 mL

Anexo D- Fórmula do gel de corrida 12% - 25 mL

H <sub>2</sub> O destilada	8,2 mL
Acrilamida-Bis 30%	10,0 mL
Tris 1,5 M pH 8,8	6,3 mL
SDS 10%	0,25 mL
APS 10%	0,25 mL
TEMED	0,01 mL

Anexo E- Fórmula do tampão de amostra

H <sub>2</sub> O destilada	4 mL
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	1,0 mL
Glicerol 10%	0,8 mL
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 10%	1,6 mL
2-β-Mercaptoetanol	0,4 mL
Azul de bromofenol 0,05%	0,4 mL

Anexo F- Descrição das siglas que representam as eluições nos cartuchos de extração em fase sólida.

Sigla	Descrição do Grupo
CTR 5%	Postura do grupo controle eluída em 5% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
CTR 40%	Postura do grupo controle eluída em 40% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
CTR 80%	Postura de <i>R. microplus</i> do grupo controle eluída em 80% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 1 5%	Primeiro dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com <i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 5% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 1 40%	Primeiro dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com <i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 40% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 1 80%	Primeiro dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com <i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 80% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 2 5%	Segundo dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com <i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 5% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 2 40%	Segundo dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com <i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 40% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 2 80%	Segundo dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com <i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 80% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 3 5%	Terceiro dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com <i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 5% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna

	C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 3 40%	Terceiro dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com <i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 40% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 3 80%	Terceiro dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com <i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 80% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 4 5%	Quarto dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com <i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 5% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 4 40%	Quarto dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com <i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 40% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 4 80%	Quarto dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com <i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 80% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 5 5%	Quinto dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com <i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 5% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 5 40%	Quinto dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com <i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 40% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 5 80%	Quinto dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com <i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 80% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 6 5%	Sexto dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com <i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 5% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 6 40%	Sexto dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com

	<i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 40% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 6 80%	Sexto dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com <i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 80% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 7 5%	Sétimo dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com <i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 5% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 7 40%	Sétimo dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com <i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 40% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 7 80%	Sétimo dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com <i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 80% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 8 5%	Oitavo dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com <i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 5% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 8 40%	Oitavo dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com <i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 40% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 8 80%	Oitavo dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com <i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 80% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 9 5%	Nono dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com <i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 5% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 9 40%	Nono dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com <i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 40% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN

	durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 9 80%	Nono dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com <i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 80% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 10 5%	Décimo dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com <i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 5% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 10 40%	Décimo dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com <i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 40% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.
Dia 10 80%	Décimo dia de postura de fêmeas de <i>R. microplus</i> tratadas com <i>M. anisopliae</i> s.l. eluída em 80% de ACN em cartuchos de extração em fase sólida, submetidos à CLAE em coluna C18 fase reversa, a um gradiente de 65% a 100 % de ACN durante 20 minutos e fluxo de 1mL/minuto.

---