



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

ISABELA SANTOS DE MELO WIERMANN

**METABÓLITOS COM ATIVIDADE INSETICIDA PRODUZIDAS
POR FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS**

SÃO JOÃO DEL REI - MG

DEZEMBRO DE 2022

ISABELA SANTOS DE MELO WIERMANN

**METABÓLITOS COM ATIVIDADE INSETICIDA PRODUZIDAS
POR FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São João del-Rei, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Wellington Garcia de Campos

**Co-orientadora: Dra. Michelle Oliveira Campagnani
de Mendonça**

SÃO JOÃO DEL REI – MG

DEZEMBRO DE 2022

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

W648m Wiermann, Isabela Santos de Melo.
METABÓLITOS COM ATIVIDADE INSETICIDA PRODUZIDAS
POR FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS / Isabela Santos de
Melo Wiermann ; orientador Wellington Garcia de
Campos; coorientadora Michelle Oliveira Campagnani
de Mendonça. -- São João del-Rei, 2022.
32 p.

Trabalho de Conclusão (Graduação - Biotecnologia)
- Universidade Federal de São João del-Rei, 2022.

1. Principais fungos entomopatogênicos . 2.
Enzimas e proteínas secretados por
fungosentomopatogênicos. 3. Toxinas e
metabólitossecundários . 4. Interaçãopatógeno
hospedeiro. 5. Mecanismos de infecção. I. Garcia de
Campos, Wellington , orient. II. Oliveira Campagnani
de Mendonça, Michelle , co-orient. III. Título.

ISABELA SANTOS DE MELO WIERMANN

**METABÓLITOS COM ATIVIDADE INSETICIDA PRODUZIDAS
POR FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São João del-Rei, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovado em 07 de dezembro de 2022

Banca examinadora:

Prof. Dr. Ivan Carlos dos Santos

Dra. Dra. Michelle Oliveira Campagnani de Mendonça

Prof. Dr. Wellington Garcia de Campos

Prof. Wellington Garcia de Campos
Orientador

AGRADECIMENTOS

Foram longos anos de caminhada até chegar aqui. Nem sempre foi fácil, mas hoje celebro a conclusão desse ciclo que se encerra. Sou muito grata a Deus por me guiar e proteger durante essa trajetória. Agradeço a minha mãe, que esteve ao meu lado me incentivando, dando forças e fazendo tudo que era necessário para ajudar a me manter firme durante a jornada, junto ao meu padrasto. Ao meu pai que também me incentivou e deu forças em diversos momentos. Aos meus irmãos, que estão comigo o tempo todo e são necessários caminhando ao meu lado sempre. A minha namorada, que me apoiou diariamente, não me deixou desanimar e aguentou comigo dias difíceis. Aos meus grandes amigos, os antigos e os novos, que a vida trouxe durante esse período e levarei comigo. Ao meu avô e minha avó, e também a todos os meus familiares, que sempre contribuíram de alguma maneira e são essenciais em minha vida. Agradeço também a UFSJ e aos meus professores por me garantirem todo aprendizado adquirido. Obrigada Michelle e Wellington pela orientação e auxílio. Sou muito feliz por ter tanta pessoa incrível ao meu redor e esta conquista só foi possível por estarem comigo. Um ciclo está se encerrando, para que um novo se inicie, mais um passo foi dado para a construção da busca dos meus objetivos. A caminhada só está no começo. Muito obrigada!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Organização estrutural dos domínios de três subgrupos das quitinases fúngicas (Seidl, 2008).....	16
Figura 2: Estutura química da oosporeína (Fonte: PubChem).....	17
Figura 3: Estrutura química da beauvericina (Wang & Xu, 2012).	18
Figura 4: Estrutura química da bassianolida (Xu et al., 2008).....	18
Figura 5: Estrutura química das destruxinas A, B e E (Taibon, 2017).	19
Figura 6: Ciclo da relação patógeno-hospedeiro. (Fonte: Adaptado de Silva, 2012).	20
Figura 7: Eletromicrografias de varredura de larvas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> após a infecção experimental com suspensão conidial de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Garcia et al., 2008)	20
Figura 8: Eletromicrografias de varredura de ninfas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> após a infecção experimental com suspensão conidial de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Garcia et al., 2008)	21
Figura 9: Estrutura da cutícula de insetos (Salgado, 2013).....	22

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	6
RESUMO	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	10
2.1 Objetivos gerais	10
2.2 Objetivos específicos.....	10
3 METODOLOGIA.....	11
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
4.1 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS	11
4.2 PRINCIPAIS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS.....	12
4.2.1 <i>Metarhizium anisopliae</i>	12
4.2.2 <i>Beauveria bassiana</i>	13
4.3 ENZIMAS E PROTEÍNAS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS	13
4.4 TOXINAS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS	17
4.5 INTERAÇÕES ENTRE PATÓGENO-HOSPEDEIRO	19
4.5.1 ESTRUTURA DA CUTÍCULA DO HOSPEDEIRO	21
4.6 MECANISMOS DE INFECÇÃO	22
4.6.1 Adesão	23
4.6.2 Germinação.....	23
4.6.3 Formação do apressório.....	24
4.6.4 Penetração.....	24
4.6.5 Colonização.....	25
4.6.6 Disseminação fúngica	26
5 CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

RESUMO

Os fungos entomopatogênicos são os principais causadores de doenças de insetos. Afim de reduzir a utilização de inseticidas químicos, estes fungos são utilizados no controle biológico de pragas na agricultura. Seus hospedeiros são infectados por penetração direta nos exoesqueletos ou cutículas. A cutícula dos insetos age contra a ação de microrganismos entomopatogênicos. Sendo constituída por lipídeos, aminoácidos e amino-açúcares, esses constituintes são fontes favoráveis de nutrientes para o desenvolvimento destes fungos. Os fungos entomopatogênicos são capazes de sintetizar enzimas hidrolases, tais como lipases, quitinases, proteases, e também, secretam abundantes metabólitos secundários. Além disso, secretam outras enzimas que não estão diretamente envolvidas na digestão da cutícula, mas desempenham um papel importante na patogênese, como a trealase ácida. O conhecimento do mecanismo de ação destas enzimas permite manipulá-las para aumentar a virulência de determinadas linhagens de fungos entomopatogênicos.

Palavras-chave: fungos entomopatogênicos, controle microbiano de insetos, enzimas produzidas por fungos, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*.

1. Introdução

Os fungos distribuem-se no mundo todo, colonizando diversos ambientes, seja em plantas e animais vivos ou mortos, serapilheiras ou ambientes que contenham matéria orgânica de possível colonização (Bononi, 1998). Eles possuem papéis nos ecossistemas, como: decompositores, simbiontes, controladores naturais de pragas, fixadores de nitrogênio atmosférico e bioindicadores de poluição (Sotão *et al.*, 2004).

Os fungos entomopatogênicos são os principais causadores de doenças em insetos e podem ser encontrados nos filos Zygomycota, Ascomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Basidiomycota e Deuteromycota, sendo que a maioria das espécies entomopatogênicas pertencem aos dois primeiros grupos. Além disso, por esses fungos possuírem uma grande variabilidade genética, têm vantagens no controle microbiano de insetos (Alves, 1998).

Afim de reduzir a utilização de inseticidas químicos, que são nocivos tanto para os animais quanto para os humanos, provocam resistência de insetos, ressurgência, desequilíbrios biológicos, resíduos nos alimentos, água e solo (Parra, 2002). Devido à segurança atribuída a esses fungos, maiores conhecimentos acerca dos fatores de virulência permitirão o desenvolvimento de novas metodologias de cultivo e aplicação, podendo elevar a mortalidade de insetos-praga hospedeiros (Crawford, 1998). Neste contexto, os fungos entomopatogênicos têm progressivamente despertado a atenção para uso no controle biológico de pragas na agricultura (Lecuona & Riba, 1991).

Os fungos entomopatogênicos são fontes de compostos bioativos com potencial para o manejo de pragas, visto que secretam diferentes tipos de enzimas quando irrompem nos insetos. Seus hospedeiros são infectados por penetração direta nos exoesqueletos ou cutículas, sem a necessidade da ingestão (St. Leger *et al.*, 1991). Porém, a infecção também pode acontecer pelo aparelho bucal, espiráculos, ânus, sifão respiratório, tarso e membranas intersegmentais do abdome (Alves, 1998).

Os insetos possuem uma cutícula que age contra a ação de microrganismos entomopatogênicos, sendo constituída por lipídeos, aminoácidos e amino-açúcares. Esses constituintes são fontes favoráveis de nutrientes para o desenvolvimento destes fungos. O processo de contaminação acontece quando ocorre o contato do fungo com o inseto (Cruz, 2016). Então inicia-se a germinação e penetração dos esporos do fungo na cutícula. Neste estágio ocorre hidrólise enzimática, em que o microrganismo produz uma grande quantidade de polímeros que formam enzimas capazes de transformar partes do corpo do inseto infectado

em substâncias que favorecem o seu desenvolvimento. Esta produção de enzimas é uma condição que caracteriza a virulência dos fungos entomopatogênicos (Alves, 1998).

O tempo em que ocorre as diferentes fases do processo de interação entre o fungo e o seu hospedeiro, depende muito das espécies dos insetos que serão atacadas (fatores bióticos) e das variações climáticas (fatores abióticos). Desse modo, para que essas relações entre fungo-inseto ocorram de maneira favorável, alguns fatores são importantes como: temperatura, luz, umidade, radiação solar e condições nutricionais (Lima, 2007).

Um importante aspecto a ser abordado no estudo de fungos entomopatogênicos é a variabilidade entre os isolados da mesma espécie, que podem apresentar diferentes níveis de similaridade genética e virulência. A grande variabilidade genética apresentada por esses fungos possibilita a seleção de isolados fúngicos altamente virulentos, mais específicos e tolerantes às condições agrícolas para serem utilizados como inseticidas microbianos (Shah *et al.*, 2003).

Os principais fungos entomopatogênicos pertencem aos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Sporothrix*, *Lecanicillium*, *Nomuraea*, *Hirsutella*, *Aschersonia*, *Isaria*, *Paecilomyces* e *Entomophthora*. Porém, os mais estudados são os fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, e são os mais utilizados como agentes microbiológicos para o controle inundativo de pragas. Eles infectam os insetos por penetração direta da cutícula, funcionando como bioinseticidas de contato, diferente de bactérias e vírus, e também são utilizados como modelos para diversos estudos de interação fungo-inseto (Khan *et al.*, 2012).

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

- Revisão da literatura sobre metabólitos com atividades inseticidas produzidas por fungos entomopatogênicos.

2.2 Objetivos Específicos

- Revisar os principais tipos de enzimas e seus mecanismos de ação sobre o organismo do inseto hospedeiro;

- Avaliar os mecanismos que poderiam ser manipulados pela biotecnologia, de modo a melhorar a eficiência do controle de pragas por esse grupo de patógenos.

3 Metodologia

O trabalho apresentado foi desenvolvido por meio da revisão e leitura de livros, jornais digitais, teses, dissertações e artigos científicos retirados em bases de dados como PubMed, SicELO, Web of Science, Google Acadêmico entre os anos de 1986 e 2022 e do livro “Controle Microbiano de Insetos” de Sérgio Batista Alves (1998), abrangendo evidências científicas.

Para a pesquisa, foram utilizadas palavras-chave, em português e inglês, como: “fungos entomopatogênicos”, “biotecnologia de microrganismos”, “controle microbiano de insetos”, “enzimas produzidas por fungos”, “*Beauveria bassiana*” e “*Metarhizium anisopliae*”.

4 Revisão bibliográfica

4.1 Métodos de caracterização de fungos entomopatogênicos

A identificação correta de fungos entomopatogênicos, pode ser realizada por métodos microbiológico clássicos como: observar aspectos comportamentais e fisiológicos por meio do conhecimento da virulência, patogenicidade, taxa de crescimento, capacidade reprodutiva e produção de metabólitos, sendo possível avaliar o potencial de utilização de um fungo. A caracterização bioquímica pode ser feita pela determinação da produção de exoenzimas e avaliação de atividades enzimáticas, diferenciando as espécies (Alves, 1998). Por fim, os métodos moleculares são os mais eficientes, com grande capacidade de detecção, caracterização e quantificação dos fungos, além de permitirem uma identificação direta e a análise das características genéticas (Inglis *et al.*, 2012).

O método de caracterização molecular mais aplicado é a tecnologia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que se baseia em uma síntese enzimática *in vitro*, obtendo diversas cópias de um segmento específico de DNA, na presença da enzima DNA polimerase. Nesse método, ocorre o anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos usados como primers, os quais delimitam a sequência de DNA de fita dupla alvo na amplificação. Sendo assim, é possível comparar o tamanho dos fragmentos entre diferentes linhagens e espécies de fungos (Ferreira & Grattapaglia, 1996). Uma variação da técnica de PCR, conhecida como

Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico (RAPD) ou Polimorfismo Amplificado - Reação em Cadeia da Polimerase (AP-PCR), não necessita conhecer as sequências de nucleotídeos que compõem as extremidades de DNA de interesse. Logo, os fragmentos de DNA são amplificados no genoma com o uso de oligonucleotídeos simples de sequências arbitrárias (Alves, 1998).

Marcadores moleculares também vem sendo utilizados para diferenciar isolados. Um marcador molecular representa qualquer fenótipo oriundo de um gene expresso, como no caso das isoenzimas ou de um segmento de DNA que corresponde a regiões expressas ou não do genoma. As isoenzimas apresentam diferentes formas relacionadas estruturalmente, mas que diferem em suas características imunológicas ou químicas pela presença de mais de um gene codificado. A técnica consiste na análise eletroforética de extratos proteicos e na visualização dos produtos enzimáticos por métodos histoquímicos (Alves, 1998).

Outra técnica molecular, Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP), consiste na obtenção de sequências de DNA homólogas que podem ser detectadas pela presença de fragmentos de diferentes comprimentos após a digestão das amostras de DNA em questão com endonucleases de restrição específicas. O RFLP, como marcador molecular, é específico para uma única combinação de clone/enzima de restrição. RFLP de genes do DNA ribossomal (rDNA) ou do DNA mitocondrial (mDNA), oferecem resultados seguros sobre aspectos taxonômicos e filogenéticos para fungos entomopatogênicos. As regiões do rDNA são empregadas para identificar e diferenciar os isolados (Rehner *et al.*, 2011). Regiões entre os genes 18S e 28S do rDNA são intercaladas por sequências intergênicas, conhecidas como regiões ITS (Internal Transcribed Spacer) e IGS (Intergenic Spacer), e estas são áreas que acumulam maior variabilidade e são usadas na diferenciação de gênero e espécies (Alves, 1998).

4.2 Principais fungos entomopatogênicos

4.2.1 *Metarhizium anisopliae*

Fungos do gênero *Metarhizium* são Ascomicetos da família Clavicipitaceae que se caracterizam por infectar grande número de espécies de insetos. Podem ser encontrados facilmente nos solos, onde sobrevive por longos períodos. Possuem conídios uninucleados, hialinos ou fracamente coloridos e se formam sobre conidióforos simples que, justapostos, resultam em uma massa regular sobre o inseto. Os conídios podem se formar sobre ramificações compostas de um conjunto de micélio. As fiáldes clavadas ou cilíndricas são originárias do

vértice de hifas e se colocam um ao lado da outra. A massa estromática é composta de um agrupamento de conídios em cadeias que dão origem a estruturas prismáticas compostas (Alves, 1998).

Metarhizium anisopliae usa uma combinação de enzimas e força mecânica para penetrar na cutícula do hospedeiro e acessar a hemolinfa rica em nutrientes. A infecção fúngica é chamada muscardine verde, sendo baseada na incrustação de artrópodes com conídios verdes (St. Leger, 2008).

4.2.2 *Beauveria bassiana*

Fungos do gênero *Beauveria* são Ascomicetos, da família Cordycipitaceae, e estes são parasitas de um grande número de artrópodes, ocorrendo em mais de 200 espécies de insetos e ácaros, incluindo carrapatos. Possuem conídios globosos, ovoides, cilíndricos, verrugosos, curvados ou não, aparecem sobre as hastes das fiálides, que podem ser simples, com algumas ramificações na parte superior, ou em ziguezague. As fiálides são representadas por células com a região basal mais volumosa que se organizam nos conidióforos, densamente agrupadas em espirais ou solitárias (Alves, 1998).

Beauveria bassiana tem um ciclo biológico que permite sua caracterização como um parasita facultativo. Seus conídios podem penetrar em qualquer parte da cutícula do inseto. A penetração dos conídios é mediada por enzimas, podendo também ocorrer pelos aparelhos respiratório e digestório. Muscardine branca é nome dado a infecção causada por este fungo (Dalzoto, 2009).

4.3 Enzimas e proteínas de fungos entomopatogênicos

Os fungos entomopatogênicos são capazes de sintetizar enzimas hidrolases, tais como lipases, proteases, quitinases, glucanases, de modo que estas enzimas podem ser utilizadas para o controle biológico (Mora *et al.*, 2016). Enzimas extracelulares (endoproteases, aminopeptidases, lipases, esterases e quitinases) são produzidas em grandes quantidades por *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Para que ocorra a hidrólise das proteínas cuticulares é necessária a adsorção de proteases na cutícula (St. Leger *et al.*, 1986).

No estágio inicial da infecção, em que o esporo fúngico adere à cutícula, são produzidos dois tipos de proteínas: hidrofobinas, cujas camadas se desintegram durante a esporulação dos

esporos, e adesinas que permitem tanto a adesão próxima à cutícula do inseto quanto o reconhecimento do hospedeiro pelo fungo patógeno (Litwin *et al.*, 2020).

O fungo *B. bassiana* expressa duas Hidrofobinas (Hyd1 e Hyd2) que promovem adesão às superfícies hidrofóbicas e virulência (Ortiz-Urquiza & Keyhani, 2013). As Hyd1 possuem fibras amilóides funcionais responsáveis pela formação da camada de Rodlet presentes na superfície da parede celular e altamente hidrofóbicas, sendo insolúveis em água, dodecil sulfato de sódio (SDS) e ácidos fortes. As Hyd2 não possuem hastes fibrilares, diminuindo a hidrofobicidade e tornando possível a solubilização com solventes orgânicos e SDS (Velsecchi *et al.*, 2017). Em *M. anisopliae*, foram identificadas duas adesinas, denominados Mad1 e Mad2. Essas proteínas contêm peptídeos de sinal, regiões ricas em treonina-prolina, e estão implicadas na adesão à cutícula de insetos, e ainda, são responsáveis pela organização adequada do citoesqueleto e divisão celular (Ortiz-Urquiza & Keyhani, 2013).

As enzimas líticas são responsáveis pela hidrólise dos componentes da cutícula do inseto, permitindo que os apressórios penetrem nas coberturas externas dos artrópodes. Logo que o esporo adere à cutícula e começa a formar o apressório, estas enzimas são produzidas (Santi *et al.*, 2010). As lipases são produzidas primeiro e hidrolisam os lipídios e lipoproteínas localizadas na epicutícula do inseto (cutícula externa) (Pedrini *et al.*, 2007). Essas enzimas hidrolisam as ligações éster dos triacilgliceróis, o que leva à liberação de ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (Silva *et al.*, 2009). Além disso, as lipases suportam a adesão de esporos em germinação às cutículas de insetos, aumentando as interações hidrofóbicas entre o fungo e a superfície da cutícula (Santi *et al.*, 2010).

Um fator muito importante na virulência dos fungos são as enzimas proteolíticas que hidrolisam as ligações peptídicas das cutículas dos insetos, levando à exposição das fibrilas de quitina (Litwin *et al.*, 2020). Elas são classificadas em quatro classes diferentes: serina, cisteína, metalo e aspartil, das quais as mais estudadas é a serina-protease (Pr1) tipo subtilisina e a protease (Pr2) tipo tripsina. Quando a epicutícula é degradada pelas lipases, o fungo produz grandes quantidades de protease Pr1, que degrada o material proteico. As proteínas solubilizadas são degradadas por aminopeptidases e exopeptidases até aminoácidos, servindo como nutrientes para fungos entomopatogênicos (St. Leger, 1994).

Essas proteases são secretadas durante a primeira etapa de degradação da cutícula e estão sujeitas a um mecanismo de transdução de sinal com a ativação da proteína quinase A (PKA) mediada pelo AMPc (Fang *et al.*, 2009). Tem sido demonstrado que a protease Pr1 é a chave extracelular envolvida na penetração da cutícula e que sem esta enzima, o processo infeccioso

não pode ser alcançado. Além disso, a protease Pr1 é um indicador de virulência para os fungos entomopatogênicos (Sun, 2006).

Outro tipo de enzima encontrado são as quitinases, elas são classificadas como endoquitinases (hidrolisam a ligação β -1,4-glicosídica dentro da molécula de quitina, produzindo uma N, N'-diacetilquitobiose predominante, o qual é decomposto pela quitobiose em monômero de N-acetil glucosamina (GlcNAc)) e exoquitinases (hidrolisam N-acetilglucosamina oligômeros formados durante a ação de endoquitinases). A ação combinada de endo e exoquitinases é necessária para a degradação completa da quitina do inseto (Duo-Chuan, 2006). A quitina é o principal componente estrutural das paredes celulares dos fungos e do exoesqueleto dos invertebrados (Seidl, 2008).

As ações fisiológicas das quitinases fúngicas compreendem a remodelação da parede celular durante o ciclo de vida do fungo e possuem papéis durante o crescimento das hifas, ramificação, fusão das hifas e autólise. É importante para a utilização dos produtos de degradação como fonte de nutrientes, competição e defesa contra outros fungos ou artrópodes no ambiente fúngico (Seidl, 2008). Quitinases do gene *chi3* em *M. anisopliae* e *B. bassiana* é uma enzima especializada com atividade exoquitinase e endoquitinase, envolvida na adaptação ao estresse térmico (Staats, 2013).

As quitinases fúngicas são pertencentes à família GH 18 (Glicosil Hidrolases 18), assim como, bactérias, vírus, plantas e animais. Fundamentado nas sequências genômicas, uma análise filogenética mostra que as quitinases fúngicas podem ser classificadas em três subgrupos (Figura 1) (Seidl, 2008). Esta família apresenta uma estrutura de multi-domínios, constante a) o domínio N-terminal, que pode conter ou não peptídeo-sinal (sinal de secreção); b) domínio catalítico, onde ocorre a hidrólise do substrato; c) região rica em serina/treonina, normalmente glicosilada pós-traducionalmente gerando a proteína madura; d) uma região de ligação ao substrato (quitina); e) a região C-terminal (Seidl, 2005).

Os subgrupos A e B, que correspondem às classes V e III, são os que foram previamente identificados como quitinases fúngicas, enquanto o subgrupo C inclui um novo grupo de quitinases de alto peso molecular 140 - 170 kDa, identificadas em fungos filamentosos. As quitinases pertencentes ao subgrupo A têm apenas um domínio catalítico, mas não o domínio de ligação ChBD, tem peso molecular de 40 - 50 kDa e estão presentes em todos os genomas dos fungos. As enzimas pertencentes ao subgrupo B apresentam tamanho e estrutura de domínio extremamente variáveis. Eles têm um peso molecular que pode estar localizado entre 30 - 90 kDa. Estas podem ser agrupadas em quitinases de baixo peso molecular (30 - 45 kDa) contendo ChBD, característica que não está presente no subgrupo A, e quitinases de alto peso molecular

(90 kDa). O número de enzimas (Subgrupo B) é variável, mas ainda assim, estão presentes em diferentes espécies de fungos ascomicetos (Seidl, 2005).

O subgrupo C apresenta um peso molecular de 140 - 170 kDa, que possuem peptídeo-sinal, domínio catalítico GH18, domínio de ligação a quitina e domínio LysM (Peptideoglicano), tendo um papel importante na degradação da quitina (Seidl, 2008). Além disso, *B. bassiana* expressa 20 quitinases divididas em três subgrupos: oito pertencentes ao subgrupo A (sem ligação a ChBD); quatro pertencentes ao subgrupo B (um ChBD no extremo C terminal) e oito pertencentes ao subgrupo C com dois sítios de ligação de ChBD (Xiao *et al.*, 2012).

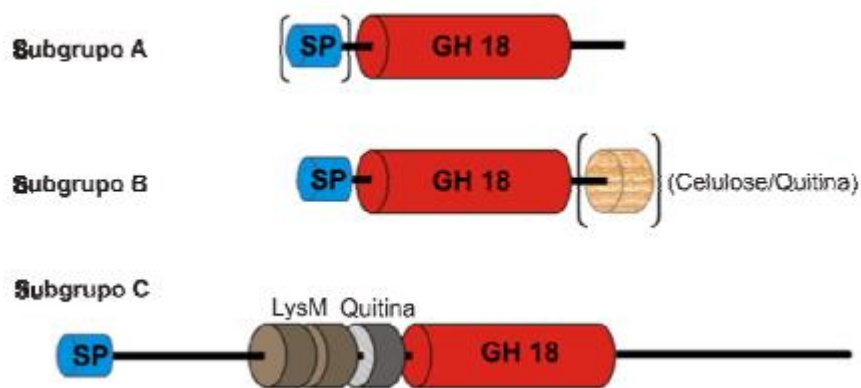


Figura 1: Organização estrutural dos domínios de três subgrupos das quitinases fúngicas. SP-sinal peptídico; GH18-família de glicosídeo hidrolase 18; BD-domínio de ligação (Seidl, 2008).

Além das proteases, lipases e quitinases, os fungos entomopatogênicos também podem produzir outras enzimas que não estão diretamente envolvidas na digestão da cutícula, mas desempenham um papel importante na patogênese. Uma delas é a trealase ácida (ATM1) que hidrolisa a trealose, o principal dissacarídeo da hemolinfa do inseto, com a liberação de duas moléculas de glicose, fornecendo assim um nutriente para o fungo. Estudos anteriores mostraram que a trealose é o principal açúcar na hemolinfa de vários insetos, desempenhando papéis importantes como vôo, crescimento e desenvolvimento. Portanto, o consumo de trealose da hemolinfa pelo fungo não apenas resulta em competição direta com seu hospedeiro por nutrientes, mas também afeta a sobrevivência do hospedeiro de outras maneiras (Jin *et al.*, 2015).

Assim, a hidrólise da trealose no inseto hospedeiro pela ATM1 contribui para a virulência de fungos entomopatogênicos do gênero *Metarhizium*, principalmente por influenciar o crescimento do fungo na hemolinfa e a aptidão do inseto hospedeiro (Jin *et al.*, 2015).

4.4 Toxinas e metabólitos secundários de fungos entomopatogênicos

Os fungos entomopatogênicos secretam abundantes compostos orgânicos de baixo peso molecular chamados metabólitos secundários, especialmente em resposta às condições ambientais. O número de compostos produzidos sugere que eles são necessários tanto para manter as funções vitais quanto para infectar efetivamente os hospedeiros, danificando o sistema nervoso ou reduzindo a resistência dos insetos (Donzelli & Krasnoff, 2016). Entre as toxinas estão ácidos orgânicos, como o ácido oxálico e ácido dipicolínico, policetídeos sendo a oosporeína (Weng *et al.*, 2019) e peptídeos não-sintetizados no ribossomo, como beauvericina, bassianolide e destruxina (Gibson *et al.*, 2014).

O ácido oxálico é considerado um veneno para organismos vivos no geral. Cristais de oxalato foram encontrados na superfície de insetos mortos por *B. bassiana*. A origem dos cristais se dá pela reação entre o ácido oxálico produzido pelo metabolismo do fungo, com o cálcio presente na hemolinfa do inseto (Alves, 1998). Em estudos realizados com o fungo *Isaria fumosorosea*, o ácido dipicolínico foi o metabólito mais abundante com atividade inseticida contra as ninfas de mosca-branca. Porém, a produção do ácido dipicolínico está diretamente correlacionada com o crescimento fúngico (Weng, 2019).

A oosporeína (Figura 2) isolada principalmente de *B. bassiana* é um depsipeptídeo altamente reativo com atividade inseticida e antiviral (Feng *et al.*, 2015). A atividade inseticida da oosporeína baseia-se na estimulação da infecção e não na ação direta. A oosporeína possui propriedades imunossupressoras e contribui para uma maior e mais rápida mortalidade de insetos (Mc Namara *et al.*, 2019).

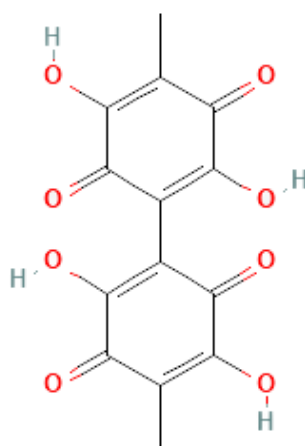


Figura 2: Estrutura química da oosporeína (Fonte: PubChem).

A beauvericina (Figura 3) é produzida, por exemplo, por *B. bassiana*. Ela provavelmente age como um ionóforo - composto químico que se liga reversivelmente e transporta íons por meio de membranas biológicas - capaz de formar complexos com cátions bivalentes. A beauvericina é citotóxica e possui propriedades inseticidas (Wang & Xu, 2012).

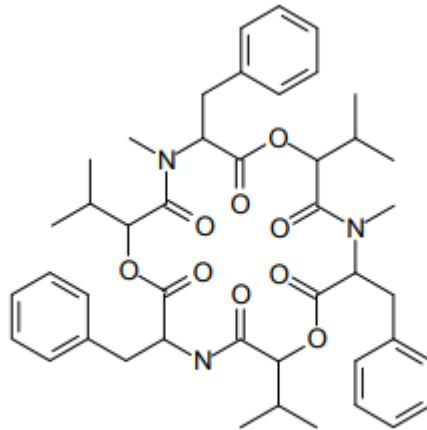


Figura 3: Estrutura química da beauvericina (Wang & Xu, 2012).

Bassianolida (Figura 4) é um metabólito tóxico de *B. bassiana* que foi detectada em cadáveres de larvas, demonstrando que a produção desse metabólito coincide com a infecção e morte do inseto e ela age como um ionóforo (Kwon *et al.*, 2000). A bassianolida foi indicada como um fator de virulência altamente significativo para *B. bassiana*, com efeito nas contrações musculares de três diferentes lepidópteros (Xu *et al.*, 2008).

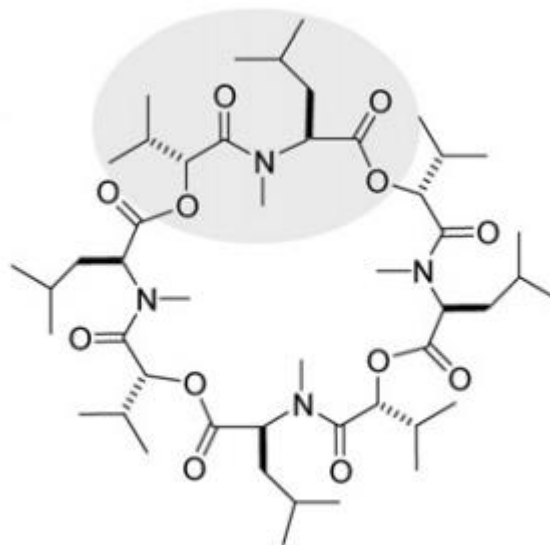


Figura 4: Estrutura química da bassianolida (Xu et al., 2008).

As destruxinas (Figura 5) são hexadepsipeptídeos cíclicos isolados principalmente de *Metarhizium sp.* Mais de 40 tipos de destruxinas foram relatados, dos quais A, B e E são os mais significativos no processo de patogênese. Destruxinas são bem conhecidos por sua atividade inseticida e fitotoxicidade. Apresentam várias propriedades biológicas como propriedades antimicrobianas, antivirais, antiproliferativas, citotóxicas e imunossupressoras (Arroyo-Manzanares *et al.*, 2017). As destruxinas A e a destruxina E apresentam uma maior taxa de mortalidade sobre o inseto-alvo, tendo atividades tóxicas e inseticidas elevadas, fato que é justificado pelas suas diferentes composições em suas cadeias químicas laterais (Ravidran *et al.*, 2016).

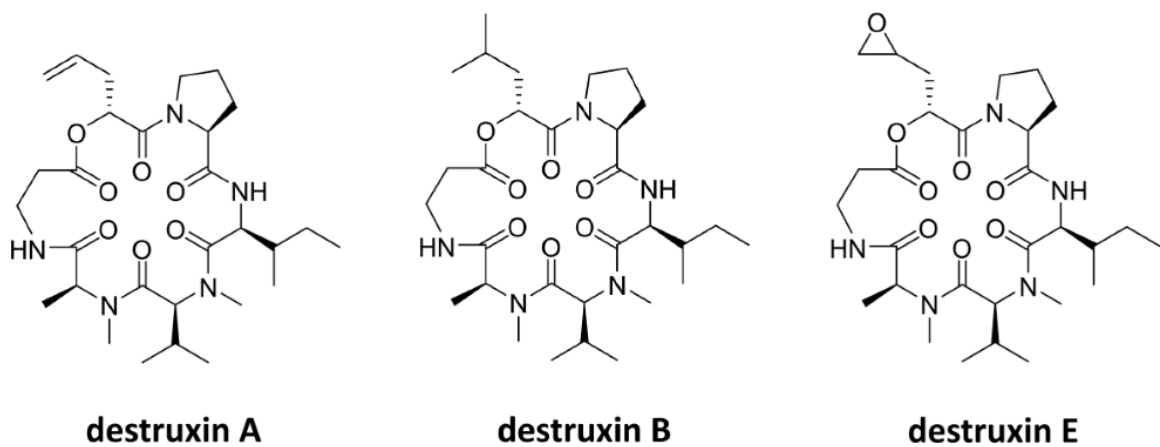


Figura 5: Estrutura química das destruxinas A, B e E (Taibon, 2017).

4.5 Interações entre patógeno-hospedeiro

A interação fungo-inseto se inicia com a infecção, na qual, conídios ou blastósporos começam a se fixar na cutícula do hospedeiro. A expressão de uma variedade de enzimas hidrolíticas, como proteases, quitinases e lipases, promovem a germinação e crescimento do fungo através da superfície do hospedeiro. Durante este processo, o fungo produz inúmeras estruturas de infecção especializadas que podem incluir pinos de penetração ou apressórios, permitindo as hifas, que estão em crescimento, penetrem no tegumento do inseto. É essencialmente nos estágios posteriores desse processo que o patógeno encontra o sistema imunológico do hospedeiro. Após a penetração, o fungo coloniza a hemocele do inseto provocando, então, sua morte e posteriormente dissemina no ambiente externo (Figuras 6, 7 e 8) (Ortiz-Urquiza & Keyhani, 2013).

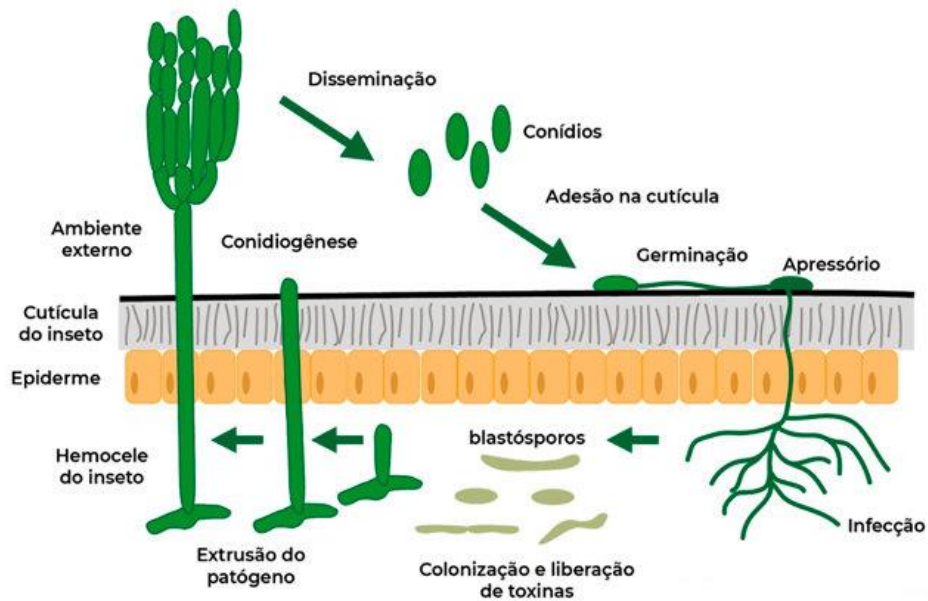


Figura 6: Ciclo da relação patógeno-hospedeiro. (Fonte: Adaptado de Silva, 2012).

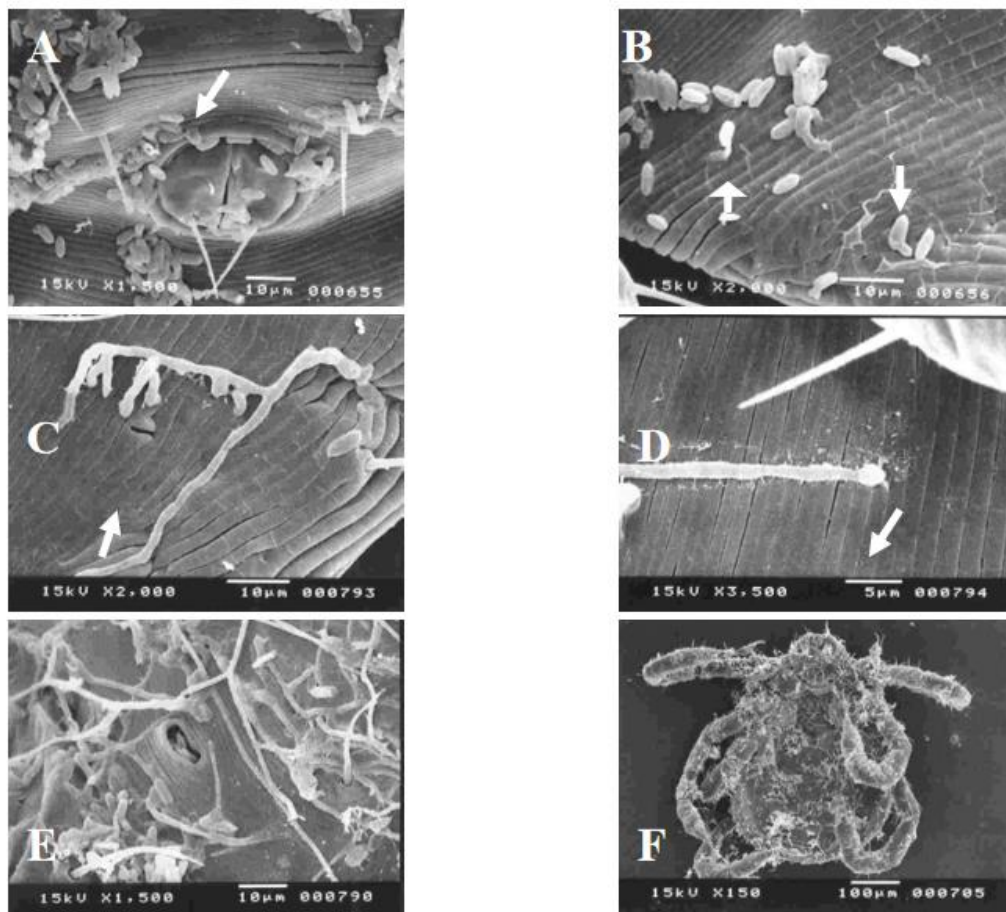


Figura 7: Eletromicrografias de varredura de larvas de *Rhipicephalus sanguineus* após a infecção experimental com suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae*. A: conídios aderidos (seta) 1h após a infecção; B: germinação dos conídios (seta) 18h após a infecção; C: formação de corpos hifais (seta) sobre a cutícula externa; D: formação do apressório e penetração do fungo (seta) dois dias após a infecção; E: extrusão de *M. anisopliae* sobre o corpo da larva; F: larva seis dias após a infecção (Garcia *et al.*, 2008).

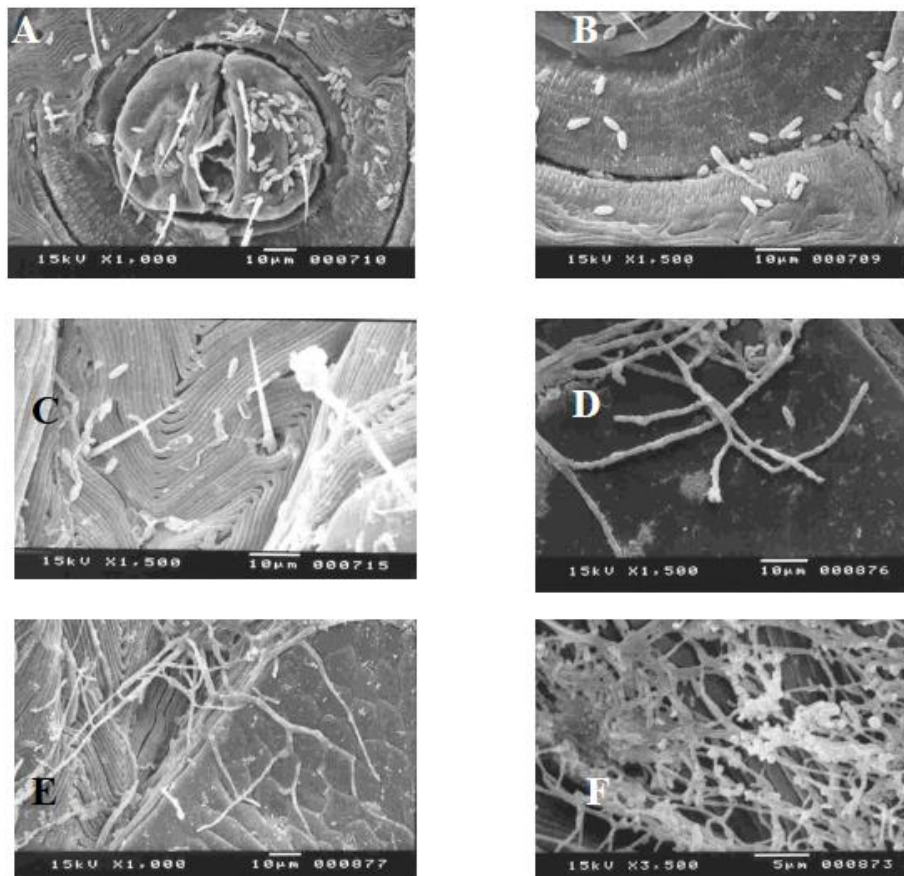


Figura 8: Eletromicrografias de varredura de ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* após a infecção experimental com suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae*. A: Conídios aderidos à cutícula 1h após a infecção; B: germinação do conídio 18h após a infecção; C, D e E: formação de micélio na cutícula; F: extrusão e conidiogênese de *M. anisopliae* na superfície de *R. sanguineus* morto (Garcia *et al.*, 2008).

4.5.1 Estrutura da cutícula do hospedeiro

A cutícula dos artrópodes (Figura 9) é composta por três camadas principais: epicutícula (cutícula externa), procutícula (dividida em exo e endocutícula) e a epiderme (camada celular) (Kramer *et al.*, 1995). A cutícula do inseto é uma estrutura altamente heterogênea que pode variar muito em composição, mesmo durante os vários estágios de vida de um inseto em particular. A epicutícula ou camada mais externa fornece uma barreira hidrofóbica rica em lipídios e é seguida pela procutícula que contém quitina e proteína esclerotizada, seguida pelas células que constituem a epiderme, que circunda as estruturas internas do inseto (Ortiz-Urquiza & Keyhani, 2013). Com estas três camadas, a cutícula dos insetos constitui a maior barreira contra a penetração, por este motivo os microrganismos necessitam da ação conjunta de várias enzimas, para a degradação desta cutícula e posterior penetração (St. Leger *et al.*, 1991).

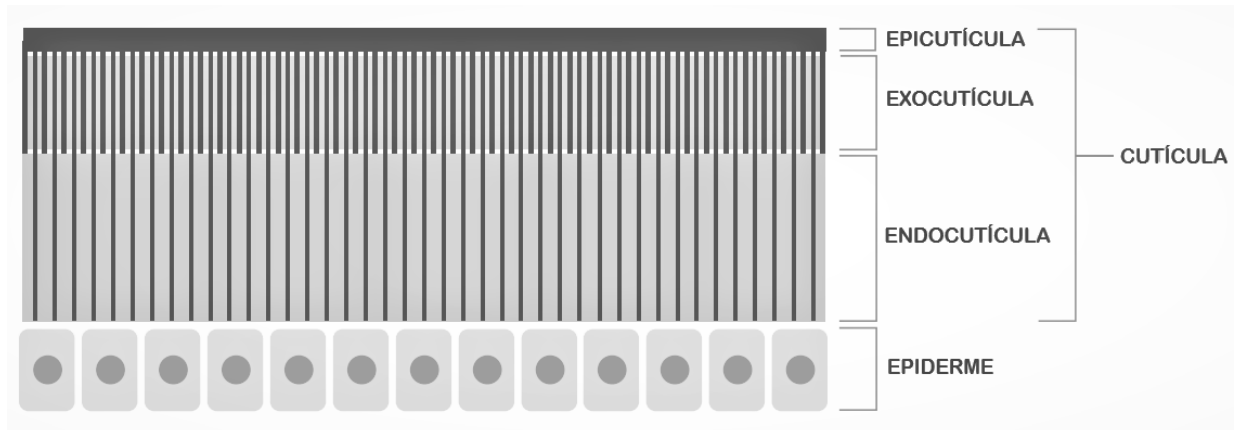


Figura 9: Estrutura da cutícula de insetos (Salgado, 2013).

Na camada superficial da cutícula encontra-se uma barreira rígida e camadas de cera que possuem em sua composição lipídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos, ésteres, álcoois, cetonas e aldeídos. Os quais possuem funções importantes nas interações ambientais e comportamentais dos insetos. Os constituintes epicuticulares protegem insetos da dessecação, estão envolvidos na comunicação química (dentro e entre espécies de insetos) e defesa (Howard & Blomquist, 2005).

Além dos lipídios cuticulares, as defesas antifúngicas de superfície incluem toxinas de pequenas moléculas (incluindo peptídeos), proteínas, inibidores de quitinase e protease derivados de insetos e peptídeos antimicrobianos (AMPs) (Vilcinskas, 2010). Compostos fenólicos cuticulares acoplados à atividade das tirosinases resultam em melanização, muitas vezes como resposta ao ataque microbiano. A melanina e os tecidos melanizados podem ser diretamente tóxicos para os micróbios inibindo a germinação e o crescimento de hifas, podem ser mais resistentes à penetração mecânica ou à ação de enzimas degradativas fúngicas e podem atuar como uma barreira para limitar a absorção de nutrientes pelo patógeno. A atividade da protease por parte do fungo, no entanto, demonstrou contribuir para a solubilização da melanina ligada à cutícula (St. Leger *et al.*, 1988).

4.6 Mecanismos de infecção

Primeiramente, a transmissão fúngica requer a liberação de grande número de esporos ou superfícies de esporos pegajosos, além de substâncias que maximizam a adesão de outras maneiras no hospedeiro. Em segundo lugar, os esporos devem germinar para assim iniciar a penetração no exoesqueleto sólido do inseto de forma relativamente rápida, e também manter a sobrevivência aos mecanismos de resistência do hospedeiro. Outro ponto, é que as células

fúngicas devem proliferar dentro da hemocele, músculos ou outros tecidos do corpo do hospedeiro para colapsar o sistema imunológico para que ele não sobreviva. Por fim, o patógeno fúngico deve gerenciar o cadáver hospedeiro para otimizar a produção e dispersão de esporos sob condições ambientais predominantes. Portanto, são necessárias várias etapas no desenvolvimento da infecção por esses patógenos (Vega *et al.*, 2012).

4.6.1 Adesão

A primeira relação entre fungo-hospedeiro ocorre após a deposição do fungo sobre o inseto e visa a preparação do local para a fase de penetração. Nesta fase ocorre interações moleculares entre o patógeno e a superfície do hospedeiro que lhe servirá de alimento (Alves, 1998). O processo de adesão depende da presença de enzimas, que ocorrem na superfície dos conídios não-germinativos e que alteram a superfície do tegumento do inseto, favorecendo a nutrição e a germinação do fungo (St. Leger *et al.*, 1991). A inoculação ocorre por contato direto entre cadáveres infecciosos e hospedeiros suscetíveis, indiretamente por meio de esporos transportados pelo ar ou esporos depositados na vegetação e partículas do solo (Hesketh *et al.*, 2010).

O primeiro passo para a infecção é a união dos propágulos fúngicos à cutícula do hospedeiro. Essa ligação envolve mecanismos de adesão não específicos controlados pelas propriedades hidrofóbicas da parede celular dos conídios. O processo refere-se à interação entre as proteínas localizadas nos conídios e a superfície hidrofóbica do exoesqueleto dos insetos suscetíveis (Fang *et al.*, 2005). Este processo ocorre em três fases sucessivas: 1. adsorção dos esporos à superfície através do reconhecimento de receptores glicoproteicos específicos no inseto; 2. adesão ou consolidação da interface entre os esporos pré-germinados e a epicutícula; 3. germinação e desenvolvimento até a formação de apressório iniciando a fase de penetração (Téllez-Jurado *et al.*, 2009).

O processo de adesão entre o esporo e a cutícula do inseto é mediado pela presença de moléculas sintetizadas pelo fungo, como as adesinas (MAD1 e MAD2) e hidrofobinas (HYD1 e HYD2) que estão localizadas na superfície dos conídios (Pava-Ripoll *et al.*, 2011).

4.6.2 Germinação

A germinação ocorre quando o conídio encontra condições adequadas de umidade, temperatura e pH. E, também, pela presença de nutrientes como aminoácidos, esterol, hexoses e substâncias químicas, como ácidos graxos (C6 a C12), lipídios, fenóis e pela microflora saprofítica presente na superfície do inseto (Alves, 1998). Assim como outras exigências

nutricionais, químicas e físicas na cutícula, podendo produzir estruturas de penetração como tubos germinativos e apressórios. Ou uma substância mucilaginosa que se liga para iniciar a formação do tubo germinativo que penetra pelos poros ou camadas mais externas da epicutícula (Mora *et al.*, 2017).

4.6.3 Formação do apressório

Uma vez que um conídio se aderiu à cutícula, na extremidade do tubo germinativo ocorre uma dilatação das hifas, formando a estrutura apressório. Ocorre, nesta fase, a migração do conteúdo citoplasmático para o tubo germinativo, transformando esse local em um centro de elevada atividade metabólica que se caracteriza pela presença de mitocôndrias, ribossomos e outros componentes nucleares (Alves, 1998).

O apressório é a estrutura de infecção a partir da qual ocorre a penetração no hospedeiro por meio de um grampo de penetração ou infecção. Alguns fungos entomopatogênicos não formam apressórios e podem penetrar na cutícula diretamente do tubo germinativo (Hajek & Delalibera, 2010).

A degradação lipídica na camada externa tem sido associada como uma fase de crescimento anterior à penetração do fungo (Beys da Silva *et al.*, 2010). As enzimas hidrolíticas presentes nesse processo são as proteases, lipases e quitinases, elas que degradam a cutícula e liberam nutrientes para o fungo (Franco *et al.*, 2011). Na parte inferior do apressório pode ocorrer uma diferenciação da hifa, tornando-a mais fina e saliente, a qual teria a função de iniciar o processo de penetração da epicutícula e procutícula do tegumento do inseto (Alves, 1998).

4.6.4 Penetração

A forma em que os fungos entomopatogênicos penetram no inseto depende das propriedades da cutícula, como espessura, esclerotização, presença de substâncias antifúngicas e nutricionais (Charnley, 2003). Para que a infecção seja bem-sucedida, o fungo deve penetrar na cutícula do inseto, composta por uma rede de polímeros polissacarídeos incorporados a uma matriz proteica (Vega *et al.*, 2012).

Na penetração ocorrem dois processos principais, o físico (pressão mecânica), devido à pressão da hifa terminal que rompe as áreas membranosas ou esclerosadas, e o químico, pela produção de enzimas degradadoras de cutícula. As proteases, quitinases e lipases degradam compostos para que o fungo obtenha nutrição e facilitam a penetração mecânica do fungo e o metabolismo do tubo germinativo (Alves, 1998). A ação dessas enzimas pode ser auxiliada pela secreção de ácidos orgânicos como o ácido oxálico (Khachatourians, 1991).

As lipases são responsáveis pelo fracionamento dos lipídios existentes na superfície dos insetos, para posterior metabolização pelos microrganismos. Os alcanos da camada de lipídios da epicutícula podem ser utilizados como fonte de nutrientes para os estágios iniciais de desenvolvimento (St. Leger, 1988). As quitinases, promovem a hidrólise da quitina dos insetos, a qual é feita por um sistema quitinolítico que envolve duas hidrolases (quitinase e quitobiase) que atua sequencialmente. Na área da procutícula, ao redor do local de penetração, aparecem sintomas de histólise (decomposição do tecido por ação enzimática) (Alves, 1998).

4.6.5 Colonização

A partir da penetração inicia-se o processo de colonização do hospedeiro pelo fungo. A hifa que penetra sofre um engrossamento e se ramifica inicialmente no tegumento do inseto e posteriormente na hemocele. Para tal, são formados nos fungos estruturas como protoplastos, blastósporos e outros corpos de hifas. O tempo de colonização pode variar de 72 a 120 horas, dependendo do inseto, patógeno e das condições ambientais (Alves, 1998).

No interior do inseto, os fungos precisam lidar com os mecanismos de resposta do sistema imunológico, por isso são desenvolvidas estratégias defensivas e imunossupressoras. Eles promovem alterações estruturais na parede celular, como a encapsulação. E também, secretam toxinas como a oosporina, ácido oxálico, beauvericina, bassianolida e destruxinas. As quais são responsáveis por danificar o sistema muscular do inseto, afetando sua capacidade de alimentação e movimentação (Pal *et al.*, 2007).

O inseto pode responder à infecção por meio de mecanismos humorais (fenoloxidasas, lectinas, proteínas e peptídeos de defesa), celulares (fagocitose, encapsulamento) ou ambos. Porém, a micose induz sintomas fisiológicos de anormalidades no inseto, como convulsões, falta de coordenação, comportamento alterado e paralisia (Mora *et al.*, 2017).

A protease PR1 é considerada um importante fator de virulência e a super expressão dessa enzima reduz o tempo de morte em 25% (St. Leger *et al.*, 1996). Da mesma forma, a super expressão do gene que codifica a quitinase acelera o processo de morte em 23% nos insetos. Assim, podemos demonstrar a importância da secreção dessas enzimas hidrolíticas na virulência de fungos entomopatogênicos (Fan *et al.*, 2007).

Os metabólitos inseticidas produzidos pelos fungos têm vários modos de ação e em muitos casos são a causa direta da morte do inseto. Eles atuam nas células especializadas do sistema imunológico do seu hospedeiro (Téllez-Jurado *et al.*, 2009). A morte resulta de uma combinação de efeitos que compreendem o dano físico dos tecidos, toxicidade, desidratação das células por perda de líquidos e consumo de nutrientes (Bustillo, 2001).

4.6.6 Disseminação fúngica

Após as hifas atravessarem o tegumento, elas podem permanecer na fase vegetativa ou iniciar o processo de esporulação (fase reprodutiva) dentro de 24 a 48 h, dependendo da umidade relativa (Srivastara *et al.*, 2009). As hifas formam conidióforos, dando origem a esporos assexuados que são unidades infectantes com função de disseminação (Cañedo & Ames, 2004). Fatores ambientais controlam a produção de conídios, sua sobrevivência e germinação, de modo que são críticos para o desenvolvimento de epizootias (Carruthers & Soper, 1987).

Quando as condições de temperatura e umidade são favoráveis, as hifas podem atravessar o tegumento do inseto, ocorrendo a emergência do fungo para o exterior. Geralmente, a emergência ocorre nas regiões menos escleróticas do tegumento, como a membrana intersegmentar ou espiráculos, mas isso também dependerá do hospedeiro e do estágio de desenvolvimento. A esporulação normalmente ocorre em cadáveres, mas também pode ocorrer em insetos vivos. A dispersão dos conídios pode ser um processo ativo ou passivo e depende das características específicas de cada linhagem (Tanada, 1993).

Portanto, após a formação dos propágulos infectivos, estes se dispersam pelo ambiente, auxiliados pelos fatores bióticos e abióticos, tais como vento, chuva, homem e animais (Alves, 1998).

5 Conclusão

Durante a revisão bibliográfica foram analisadas as proteínas: hidrofobinas e adesinas; as enzimas hidrolíticas: proteases, lipases, quitinases, trealase ácida e toxinas como ácido oxálico, oosporeína, beauvericina, bassinolida, destruxinas, dos fungos entomopatogênicos especificamente de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. As quais são secretadas, provocando a morte do inseto-hospedeiro. Foram avaliados os mecanismos em que os compostos são liberados ao infectar e colonizar seu hospedeiro, e se disseminar pelo ambiente. Conhecendo a ação destes metabólitos, pode-se manipulá-los a fim de expressar enzimas de interesse altamente virulentas de determinadas linhagens fúngicas e promovendo melhor eficiência no controle de pragas por estes fungos.

Referências bibliográficas

ALVES, R. T. **Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos**. Documentos / Embrapa Cerrados, 2010. Disponível em: <<https://core.ac.uk/download/pdf/15445765.pdf>>

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: Fealq, 1998.

ARROYO-MANZANARES, N.; HUERTAS-PÉREZ, J. F.; GÁMIZ-GRACIA, L. & GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. **Simple and efficient methodology to determine mycotoxins in cereal syrups**. Food Chemistry, 177, 274–279, 2015.

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

BONONI, V.L.R. (Org.). **Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas**. São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 1998.

BUSTILLO, A. **Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia**. In: Seminario Uso de entomopatógenos en Colombia. Sociedad Colombiana de Entomología. Bogotá, p.30-53, 2001.

CAÑEDO, V.; AMES, T. **Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos**. Lima: Centro International de la Papa (CIP), 2004.

CARRUTHERS, R.I.; SOPER, R.S. **Epizootiology of Insect Diseases**. New York: John Wiley & Sons, p.357-416, 1987.

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

CRAWFORD, P. J.; BROOKS, W. M.; ARENDS, J. J.; **Efficacy of field-isolated strains of *Beauveria bassiana* as microbial control agents of the lesser mealworm**. Journal of Economic Entomology, v. 19, n. 06, p. 1295-1301, 1998.

CRUZ, C. E. M.; GRAFF, A. C.; RODRIGUES, M. **Controle microbiano de pulgões empregando fungos filamentosos *Isaria fumosoroseus* (*Paecilomyces fumosoroseus*) e *Metarhizium anisopliae* em plantas de cultivo de morango**. Lajeado, SP, 36 p, 2016.

DALZOTO, P.R.; UHRY, K.F. **Controle biológico de pragas no brasil por meio de *Beauveria bassiana* (bals.) Vuill.** Biológico, São Paulo, v.71, n.1, p.37-41, jan./jun., 2009.

DONZELLI, B.G.; KRASNOFF, S.B. **Molecular Genetics of Secondary Chemistry in *Metarhizium Fungi***. Adv Genet. 94:365-436, 2016.

- DUO-CHUAN, L. **Review of fungal chitinases.** Mycopathologia 161, 345-360, 2006.
- FAN, Y.; FANG, W.; GUO, S.; PEI, X.; ZHANG, Y.; XIAO, Y.; LI, D.; JIN, K.; BIDOCHKA, M.J.; PEI, Y. **Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase.** Applied Environmental Microbiology, v.73, p.295-302, 2007.
- FANG, W.; LENG, B.; XIAO, Y.; JIN, K.; MA, J.; FAN, Y., *et al.* **Cloning of *Beauveria bassiana* Gene *Bbchit1* and Its Application to Improve Fungal Strain Virulence.** Applied and Environmental Microbiology, 71, 363-370, 2005.
- FANG, W.; PAVA-RIPOLI, M.; WANG, S.; ST. LEGER, RJ. **A proteína quinase A regula a produção de determinantes de virulência pelo fungo entomopatogênico, *Metarhizium anisopliae*.** Fungal Genetic Biology, 46, 277-285, 2009.
- FENG, P.; SHANG, Y.; CEN, K.; WANG, C. **Fungal biosynthesis of the bibenzoquinone oosporein to evade insect immunity.** Proc Natl Acad Sci USA, 2015.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas.** 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1996.
- FRANCO, K.; RODRÍGUEZ, S.; CERVANTES, J.; BARRANCO, J. **Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial como insecticidas y fungicidas.** Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente, v.11, p.22, 2011.
- GARCIA, MV; MONTEIRO, AC; SZABÓ, MPJ; PRETTE, N. **Eventos externos e internos da infecção de larvas e ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* por *Metarhizium anisopliae*.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.60, n.4, p.855-863, 2008.
- GIBSON, D.M.; DONZELLI, B.G.; KRASNOFF, S.B.; KEYHANI, N. **Discovering the secondary metabolite potential encoded within entomopathogenic fungi.** Natural Product Reports, v.31, n.10, p.1287-1305, 2014.
- HAJEK, A.E.; DELALIBERA, I. **Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods.** BioControl, v.55, p.147-158, 2010.
- HESKETH, H.; ROY, H.E.; EILENBERG, J.; PELL, J.K.; HAILS, R.S. **Challenges in modelling complexity of fungal entomopathogens in semi-natural populations of insects.** BioControl, v.55, p.55- 73, 2010.
- HOWARD, RW; BLOMQUIST, GJ. **Aspectos ecológicos, comportamentais e bioquímicos de insetos hidrocarbonetos.** Ana Rev. Entomol 50, 371-393, 2005.
- INGLIS, G. D.; ENKERLI, J.; GOETTEL, M. S. **Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales** IN: LACEY, L. A. (Ed.) Manual of Techniques in Invertebrate Pathology, 2 ed. Academic Press, San Diego, cap.7, p. 189-251, 2012.

JIN, K.; PENG, G.; LIU, Y.; XIA, Y. **A trealase ácida, ATM1, contribui para o crescimento *in vivo* e virulência do fungo entomopatogênico *Metarhizium acridum*.** Fungal Genet Biol 77:61-67, 2015.

KHACHATOURIANS, G.G. **Physiology and genetics of entomopathogenic fungi.** In: Arora, D.K.; Ajello, L Mukerji, K.G.(Eds.). Handbook of Applied Mycology. Humans, animals and insects. Marcel Dekker. Nueva York, EEUU, v.2. p.613-661, 1991.

KHAN, S. *et al.* **Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent.** Molecular Plant Breeding, v. 3, n. 1, 2012.

KWON, A. C. *et al.* **Cytotoxic cyclodipeptides of *Bombycis corpus* 101 A.** Yakhak Hoechi, v. 44, p. 115-118, 2000.

KRAMER, K. J.; HOPKINS, T. L. & SCHAEFER, J. **Applications of solids NMR to the analysis of insect sclerotized structures.** Insect Biochemistry and Molecular Biology 25, 1067-1080, 1995.

LECUONA, R.E.; RIBA, G. **Primeras etapas del ciclo de desarrollo de hongos entomopatogénos.** Pergamino: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 1991.

LIMA, E. L. O. **Produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. E *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre estruturas infectivas desses entomopatogénos.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botocatu, SP, 2007.

LITWIN, A.; NOWARK, M.; RÓZALSKA, S. **Entomopathogenic fungi: unconventional applications.** Rev Environ Sci Biotechnol 19:23–42, 2020.

MC NAMARA, L.; DOLAN, S.K.; WALSH, J.M.D. *et al.* **Oosporeina, um metabólito abundante em *Beauveria caledonica*, com mecanismo de indução de feedback e papel na virulência de insetos.** Fungal Biol 123:601-610, 2019.

MORA, M. A. E.; CASTILHO, A. M. C; FRAGA, M. E. **Fungos Entomopatogênicos: enzimas, toxinas e fatores que afetam a diversidade.** Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.18, n.3, p.335-349, 2016.

MORA, M.A.E.; CASTILHO, A.M.C.; FRAGA, M.E. **Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi.** Arquivos Do Instituto Biológico, 2017.

ORTIZ-URQUIZA, A.; KEYHANI, N.O. **Action on the Surface: Entomopathogenic Fungi versus the Insect Cuticle.** Insects. Jul 16; 4(3):357-74, 2013.

ORTIZ-URQUIZA A; KEYHANI N.O; QUESADA-MORAGA, E. **Culture conditions affect virulence and production of insect toxic proteins in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*.** Biocontrol Science and Technology, v.23, n.10, p.1199-1212, 2013.

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***. Journal Biological Chemistry, v.282, p.8969-8977, 2007.

PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. **Controle biológico: terminologia. In: Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, p.1- 16, 2002.

PAVA-RIPOLL, M.; ANGELINI, C.; FANG, W.; WANG, S.; POSADA, F.J.; ST. LEGER, R. **The rhizosphere-competent entomopathogen *Metarhizium anisopliae* expresses a specific subset of genes in plant root exudate**. Microbiology, v.157, p.47-55, 2011.

PEDRINI, N.; ROSANA, C.; PATRICIA JUAREZ, M. **Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi**. Comp Biochem Physiol 146:124–137, 2007.

PUBCHEM COMPOUND SUMMARY for CID 135426831, **Oosporein**. National Center for Biotechnology Information, 2022.

RAVIDRAN, K.; AKUTSE, K. S.; SIVARAMAKRISHNAN, S.; WANG, L. **Determination and characterization of destruxin production in *Metarhizium anisopliae* Tk6 and formulations for *Aedes aegypti* mosquitoes control at the field level**. Toxicon. n. 120, p. 89-96, Jul, 2016.

REHNER, 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***. Mycology, v. 103(5), p. 1055–1073, 2011.

SALGADO, V. L. **BASF Insecticide Mode of Action Technical Training Manual**. p.35, 2013.

SANTI, L; BEYS DA SILVA, WO; BERGER, M. **Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis**. Toxicon 55:874–880, 2010.

SEIDL, V. **Chitinases of Filamentous Fungi: A Large Group of Diverse Proteins with Multiple Physiological Functions**. Fungal Biology Reviews, 22, 36-42, 2008.

SEIDL, V.; HUEMER, B.; SEIBOTH; B. AND KUBICEK, C.P. **A Complete Survey of Trichoderma Chitinases Reveals Three Distinct Subgroups of Family 18 Chitinases**. FEBS Journal, 272, 5923-5939, 2005.

SHAH, P. A.; PELL, J. K. **Entomopathogenic fungi as biological control agents**. Applied microbiology and biotechnology, v. 61, n. 5-6, p. 413-423, 2003.

SILVA, R.A. **Estudo de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok: Toxicidade a compostos extraídos de *Tibraca limbativentris* Stal (Heteroptera: Pentatomidae), efeitos**

de agroquímicos utilizados na cultura do arroz e aumento da patogenicidade a *T. limbativentris* com doses subletais de inseticidas químicos. Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, para a obtenção do título de Doutor em Química, 2012.

SILVA, W.O.B; SANTI L, B.M. *et al.* **Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae***. *Process Biochem* 44:829–834, 2009.

SOTÃO, H.M.P.; CAMPOS, E.L. DE; COSTA, S. DO P.S.E. **Micologia diversidade dos fungos na Amazônia**. Série Cadernos de Alfabetização científica, v.1, 2004.

SRIVASTARA, N.; MAURYA, P.; SHARMA, P.; MOHAN, L. **Prospective role of insecticides of fungal origin**: Review. *Entomology Research*, v.39, p.341-355, 2009.

STAATS, C.C.; KMETZSCH, L.; LUBECK, I.; JUNGES, A.; VAINSTEIN, M.H. AND SCHRANK, A. ***Metarhizium anisopliae* Chitinase CHIT30 Is Involved in Heat-Shock Stress and Contributes to Virulence against *Dysdercus peruvians***. *Fungal Biology*, 117, 137-144, 2013.

ST. LEGER, R.; COOPER, R. & CHARNLEY, A. **Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae***. *Journal of Invertebrate Pathology* 58, 415-426, 1991.

ST. LEGER, R.J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M.D. **Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.93, p.6349-6354, 1996.

ST LEGER, R.J.; COOPER, R. M. & CHARNLEY, A. K. **Cuticle-degrading Enzymes of Entomopathogenic Fungi: Regulation of Production of Chitinolytic Enzymes**. *Microbiology*, 132(6), 1509–1517, 1986.

ST. LEGER, R.J; BIDOCHKA, M.J; ROBERTS, D.W. **Isoforms of the Cuticle-Degrading Pr1 Proteinase and Production of a Metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae***. *Arquivos de Bioquímica Biofísica*, 313, 1-7, 1994.

ST LEGER, R.J. **Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil**. *J Invertebr Pathol* 98: 271-276, 2008.

ST LEGER, R.J; COOPER, R.M; CHARNLEY, A.K. **The effect of melanization of *Manduca sexta* cuticle on growth and infection by *Metarhizium anisopliae***. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.52, I: 3, 459-470, 1988.

SUN, M.H; LIU, X.Z. **Exigências de carbono de alguns hifomicetos entomopatogênicos e micoparasitários como agentes de biocontrole fúngico**. *Mycopathology*, 161, 295-305, 2006.

TAIBON, J; STURM, S; SEGER, C; STRASSER, H; STUPPNER, H. **Combination of A Quechers-Based Extraction Protocol with A Fast and Selective UHPLC-QTOF-MS assay For The Detection And Quantification Of *Metarhizium Brunneum* Metabolites From Honey samples.** SOJ Pharm Pharm Sci, 4(1), 1-5, 2017.

TANADA, Y.; KAYA, H.K. **Insect Pathology.** San Diego: Academic Press, 1993.

TÉLLEZ-JURADO, A.; CRUZ, R.M.G.; FLORES, M.Y.; ASAFF, T.A.; ARANA CUENCA, A. **Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos.** Revista Mexicana de Micología, v.30, p.73-80, 2009.

VALSECCHI, I; DUPRES, V; STEPHEN-VICTOR, E; GUIJARRO, JI; GIBBONS, J; BEAU, R; BAYRY, J; COPPEE, JY; LAFONT, F; LATGÉ, JP; BEAUVAIS A. **Role of Hydrophobins in *Aspergillus fumigatus*.** Journal of Fungi (Basel), v.24, 2017.

VEGA, F.E.; MEYLING, N.; LUANGSA-ARD, J.; BLACKWELL, M. **Fungal Entomopathogens.** Insect Pathology, p.171-220, 2012.

VEY A; HOAGLAND R; BUTT TM. **Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: Fungi as biocontrol agents progress, problems and potential.** Ed. by Butt TM, Jackson CW, Magan N, CABI Publishing, Wallingford, UK, 311–346, 2001.

VILCINSKAS, A. **Coevolução entre proteinases derivadas de patógenos e inibidores de proteinase de insetos hospedeiros.** Virulência 1, 20-214, 2010.

WANG, Q.; XU, L. **Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi; a short review.** Molecules. n.17, p. 2367-2377, Feb, 2012.

WANG, J.; LOVETT, B.; ST. LEGER, R.J. **The secretome and chemistry of *Metarhizium*; a genus of entomopathogenic fungi.** Fungal Ecology, v.38, p.7-11, 2019.

WENG, Q.; ZHANG, X.; CHEN, W.; HU, Q. **Secondary metabolites and the risks of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*.** Molecules, v.24, n.4, p.664, 2019.

XIAO, G.; YING, S.H.; ZHENG, P.; WANG, Z.L.; ZHANG, S.; XIE, X.Q. *et al.* **Genomic Perspectives on the Evolution of Fungal Entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*.** Scientific Reports, 2, Article No. 483, 2012.

XU, Y. *et al.* **Biosynthesis of the cyclo-oligomer depsipeptide beauvericin, a virulence factor of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* ATCC 7159.** Chemistry and Biology, v. 15, p. 898–907, 2008.

ZIMMERMANN, G. **Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*.** Biocontrol Science and Technology, v.17, p.553-596, 2007.

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