

## Induction of Proteases from *Beauveria bassiana* by *Aedes aegypti* larvae and cuticle cicadas

### Indução de Proteases de *Beauveria bassiana* por larvas de *Aedes aegypti* e cutícula de cigarras

Títulos abreviados:

**Proteases of *Beauveria bassiana* induced by *Aedes aegypti* and cicadas**

**Proteases de *Beauveria bassiana* induzidas por *Aedes aegypti* e cigarras**

Danielle Cardoso Gimenes<sup>1\*</sup>; Thaís Dolfini Alexandrino<sup>1</sup>; Alana Carvalho Machado<sup>1</sup>;  
Geni da Silva Varéa<sup>1</sup>

#### ABSTRACT

The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* penetrates the cuticle of insects by action of extracellular hydrolytic enzymes such as proteases, lipases and chitinases. Proteases can be induced in cultivation submerged in presence of protein nature. Thus, the objective of this work is to evaluate the production of proteases of *B. bassiana* CG432 in cultivation submerged in minimal medium Vogel supplemented with cuticle cicadas, *Aedes aegypti*, casein, chitin, gelatin, urea and amino acids: methionine, proline, alanine and glycine as substrates inductors. The inoculum contained 10<sup>6</sup> spores and cultivation was conducted to 28°C, 200 rpm for 5 days. Enzymatic extracts obtained by centrifugation were analyzed for protein content, production biomass and protease activity. The substrates examined in cultivation, the cuticle of cicadas, the larvae of *A. aegypti* and casein showed higher protease activity and, among the amino acids, methionine was presented the best result. Among these inducers to cuticle and the larvae were that induced higher specific activity enzyme and casein contributed to the higher biomass fungal growth.

**Keywords:** *Beauveria bassiana*, proteases, induction, *Aedes aegypti*.

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Londrina – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia  
Caixa Postal 6001 – 95070-560 Londrina – Pr.

\*Autor para correspondência: [danicamcard@hotmail.com](mailto:danicamcard@hotmail.com)

#### RESUMO

O fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* penetra na cutícula de insetos por ação de enzimas hidrolíticas extracelulares como proteases, lipases e quitinases. As proteases podem ser induzidas em cultivos submersos na presença de indutores de natureza proteica. Desta forma, o objetivo do presente trabalho é avaliar a produção de proteases de *B. bassiana* CG432 em cultivo submerso em meio mínimo de Vogel suplementado com cutícula de cigarras, larvas de *Aedes aegypti*, caseína, quitina, gelatina, ureia e os aminoácidos metionina, prolina, alanina e glicina como substratos indutores. O inóculo continha 10<sup>6</sup> esporos e o cultivo foi conduzido a 28°C, 200 rpm durante 5 dias. Extratos enzimáticos obtidos pela centrifugação foram analisados quanto ao teor de proteínas, produção de biomassa e atividade de proteases. Dos substratos analisados nos meios de cultura, a cutícula de cigarras, as larvas de *A. aegypti* e a caseína apresentaram maior atividade de proteases e, entre os aminoácidos, a metionina foi que apresentou melhor resultado. Entre esses indutores a cutícula e as larvas foram os que induziram maior atividade específica da enzima e a caseína contribuiu para o maior crescimento da biomassa fúngica.

**Palavras Chave:** *Beauveria bassiana*, proteases, indução, *Aedes aegypti*

## INTRODUÇÃO

Os fungos entomopatogênicos tem aplicação no controle biológico de insetos com grande potencial para o controle no desenvolvimento de populações de insetos sugadores que causam sérios prejuízos à produção de alimentos de origem vegetal (OWNLEY et al., 2008) e animal (KAAYA e HASSAN, 2000), e ainda provocam doenças em humanos como o mosquito transmissor da malária (BUKHARI et al., 2011) e a dengue (DONG et al., 2012).

A forma de infecção diferencia os fungos entomopatogênicos de outros bioinseticidas microbianos, como bactéria e vírus, que necessitam ser ingeridos pelo inseto para seu desenvolvimento. Os fungos atravessam o exoesqueleto protetor e alcançam a hemolinfa onde se multiplicam causando infecção e morte do hospedeiro. Os conídios aderem à cutícula e desenvolvem apressórios infectantes que produzem e liberam enzimas extracelulares como proteases, lipases e quitinases em resposta à constituição química da cutícula, a qual é formada por uma fina camada externa contendo 95% de lipídeos e 5% proteínas, e uma espessa camada interna constituída por fibrilas de quitina embebidas em uma matriz contendo 61% de proteínas, 7% de lipídeos e 30% de quinonas (ANDERSEN, 2002). Finalmente, a força mecânica causada pelo crescimento das hifas e a cutícula fragilizada pela hidrólise enzimática, permitem que o fungo atravesse a cutícula e alcance a hemolinfa do inseto (BIDOCHKA, St LEGER e ROBERTS, 1997).

A composição química das diferentes camadas que constituem a cutícula influenciam de forma qualitativa e quantitativa a produção das enzimas hidrolíticas responsáveis pelo sucesso da invasão fúngica e acredita-se que a secreção de enzimas proteolíticas seja um dos mais importantes fatores patogênicos da adesão do fungo sobre a cutícula (St LEGER et al., 1987b). Bidochka e Khachatourians (1988) relataram elevada produção de proteases pelo fungo *Beauveria bassiana* em meio contendo 1% de gelatina

como única fonte de carbono, enquanto St Leger et al. (1987a) demonstraram a atividade caseinolítica do fungo *Metharhizium anisopliae*.

A indução de proteases de *B. bassiana* foi demonstrada em cultivos inoculados com conídios previamente crescidos em insetos vivos de broca do café, *Hypothenemus hampei* (ITO et al., 2007), e em cultivos adicionados de cutícula do mesmo inseto (DIAS et al., 2008).

Hackman e Goldberg (1987), relataram que a alanina é o aminoácido mais abundante encontrado em cutícula de natureza hidrofóbica de vários insetos. A análise da composição de aminoácidos de proteínas cuticulares da fase pupal de *Tribolium castaneum*, demonstrou alta porcentagem dos aminoácidos alanina, prolina, e valina, e ausência de cisteína (MISSIOS et al., 2000). Donatti et al. (2008) demonstraram a produção elevada e semelhante de proteases em cultivos de *B. bassiana* contendo metionina e/ou cutícula do gafanhoto *Rhammatocerus schistocercoides*.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi comparar a indução de proteases de *B. bassiana* CG432 em cultivos contendo cutícula de cigarras *Cicada orni* e larvas de *A. aegypti*, com a indução de proteases em cultivos contendo os polímeros: caseína, quitina e gelatina; e as biomoléculas simples: uréia e os aminoácidos metionina, glicina, alanina e prolina. Avaliou-se também a influência dos indutores sobre o crescimento da biomassa fúngica.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Ativação e preparo do inóculo

Suspensões contendo esporos do fungo *B. bassiana* cepa CG432 foram ativadas em meio de cultura solidificado otimizado por Alves (1998) constituído por 0,2 g de ágar, 10 g de D-glucose anidra, 5 g de extrato de levedura, 1,58 g de NaNO<sub>3</sub>, 1,05 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1 g de KCl, 0,6 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 0,36 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, água para 1 litro, incubado em estufa BOD a 26 °C em fotoperíodo de 12 horas por 10 dias ou até completa

esporulação. Estes esporos recém-ativados foram utilizados para preparar uma suspensão com aproximadamente  $10^8$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  em salina fisiológica contendo 0,01% de Tween 80.

### Indução de proteases

Cultivos submersos do fungo *B. bassiana* foram inoculados com  $10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  e conduzidos em triplicata utilizando frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 12,5 mL de meio mínimo de Vogel (1956) com 1% de glicose, à temperatura de 28 °C e agitação a 200 rpm em Incubadora Orbital (Shaker MA 420 Marconi). Para indução de proteases, os meios foram suplementados com 0,4% de uréia (Sigma); 0,5% dos aminoácidos glicina, alanina, prolina e metionina (Merck); 0,5 e 1% de gelatina (Acros organics, cod. 410875000); 1% de caseína (Riedel); 2% de quitina coloidal (Sigma); 0,5 e 1% de cutícula de cigarras (Homóptera: Cicadidae); 1% (150 mg) de larvas de *A. aegypti* (Diptera: Culicidae).

Cutículas de cigarras foram previamente tratadas em solução de tetraborato de sódio 1%, dessecadas em estufa a 37 °C e moídas em gral de porcelana (PATERSON et al., 1994; PATHAN et al., 2007). As larvas de *A. aegypti* foram sacrificadas em salina concentrada 10 vezes, filtradas a vácuo, secas em estufa a 60 °C por 20 minutos e mantidas a -20 °C.

Todos os cultivos foram interrompidos no quinto dia para obtenção de proteases, utilizando filtração a vácuo em banho de gelo seguida por centrifugação a 8.000  $\times g$  por 20 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram dialisados contra tampão TRIS-HCl 5 mM, pH 7,0 e os extratos livres de células (ELC) utilizados para determinação do teor de proteínas e da atividade de protease. Paralelamente, foram realizados cultivos controle sem adição de indutores contendo 1% de glicose como única fonte de carbono e um cultivo estéril para cada condição estudada.

### Determinação de atividade de protease

A atividade de proteases no ELC foi determinada segundo a técnica de Lemos et al. (1990). Alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  dos extratos enzimáticos foram adicionadas a 200  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8 e a 100  $\mu\text{L}$  albumina de soro bovino (ASB) 12,5  $\text{mg mL}^{-1}$ . A reação foi interrompida, após incubação em Banho Maria a 37 °C por 1 hora, pela adição de 250  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) gelado a 10%, seguida de centrifugação a 3.000 $\times g$  por 20 minutos.

Os peptídeos solúveis presentes no sobrenadante foram determinados pelo método de Hartree (1972) com base na equação de regressão  $y = 0,002x - 0,0027$  ( $R^2 = 0,9976$ ), obtida da curva de calibração com concentrações de 20 a 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ASB.

A atividade enzimática foi expressa em Unidades de Protease (UP), onde 1UP foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{g}$  de peptídeos solúveis pela ação da protease, por mL do extrato, nas condições da reação.

### Quantificação de proteínas e biomassa

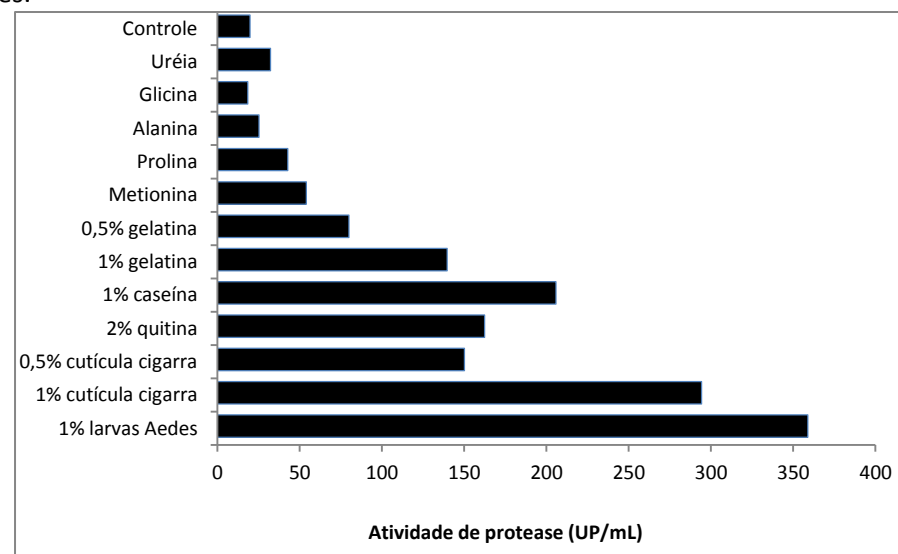
Foi realizada a quantificação das proteínas ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) presentes nos ELC pelo método de Bradford (1976), com base na equação de regressão  $y = 0,0045 + 0,0633$  ( $R^2 = 0,9987$ ), obtida da curva de calibração com concentrações de 50 a 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ASB. O crescimento do fungo foi avaliado pela quantificação da biomassa por gravimetria a 80 °C até peso constante.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de proteases (UP  $\text{mL}^{-1}$ ) nos cultivos suplementados de *B. bassiana* CG432, ocorreu em quantidades variadas para os diferentes agentes indutores testados, sendo que o uso da maioria deles, contribuiu para o aumento da produção de proteases, isto é visualizado pelo aumento

da atividade da enzima, em relação ao cultivo controle. Os resultados podem ser observados na figura 1, indicando que os ELC suplementados com todos os agentes indutores, com exceção da glicina, apresentaram maior produção de proteases, sendo que a uréia e os aminoácidos alanina e prolina induziram menor produção de proteases em relação aos demais indutores, com os resultados de atividade 1,6; 1,2; 2,2 vezes superiores ao resultado do cultivo controle. Campos et al. (2005) observaram que a adição do aminoácido alanina ao meio de cultivo do fungo *B. bassiana* reprimiu a atividade da protease Pr1, e essa enzima foi induzida quando o meio de cultivo foi suplementado com cutículas de *H. hampei*.

**Figura 1** Atividade de proteases dos extratos enzimáticos produzidos por *Beauveria bassiana* CG432 em cultivo submerso em meio de Vogel suplementado com diferentes indutores.



Os maiores valores de atividade de proteases ( $\text{UP mL}^{-1}$ ) obtidos foram dos cultivos suplementados com 1% de larvas de *A. aegypti* e 1% de cutícula de cigarras sendo, aproximadamente, 18 e 15 vezes superiores ao cultivo controle, respectivamente. Isso indica que o fungo produziu mais

proteases na presença de substratos mais complexos. De acordo com Bidochka, St. Leger e Roberts (1997), as proteínas são os principais constituintes da procutícula dos insetos (61%) e devido a isso, proteases extracelulares são produzidas pelo fungo *B. bassiana* em resposta a constituição da cutícula do inseto hospedeiro.

A presença de 1% de larvas de *A. aegypti* no meio de cultivo induziu maior produção de proteases, visto pelo aumento na atividade da enzima ( $359 \text{ UP mL}^{-1}$ ), em relação a 1% de cutícula de cigarras ( $294,42 \text{ UP mL}^{-1}$ ), figura 1. Essa diferença na indução da enzima pode ser devido a componentes da hemolinfa das larvas e também por diferenças nos polímeros constituintes de cada cutícula. Considerando que as larvas são muito pequenas, o tratamento para a extração da cutícula foi menos eficiente que para as cigarras. Os componentes proteicos da hemolinfa de *A. aegypti* provavelmente induziram maior produção de proteases. Nos trabalhos realizados por Pathan et al. (2007) e Wang; Gang e St. Leger (2005) foi observado que os fungos *B. bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em meios de cultivo suplementados com cutículas de insetos e hemolinfa apresentaram maior expressão dos genes de proteínas responsáveis pelo crescimento dos fungos.

A suplementação com 1% de caseína também apresentou maior produção de proteases, com resultado de atividade da enzima de  $205,8 \text{ UP mL}^{-1}$ , correspondente a, aproximadamente, 10,4 vezes superior a encontrada no cultivo controle (figura 1). A caseína é uma fosfoproteína que contém um grande número de resíduos de prolina que não interagem em suas cadeias laterais e não possui ponte de dissulfeto (KUNZ e LONNERDAL, 1990). Esse resultado sugere que a caseína é um substrato facilmente clivado pelas proteases no meio possibilitando ao fungo os nutrientes necessários para o seu crescimento e, conseqüentemente, uma maior produção dessa enzima.

A adição de 2% de quitina induziu a produção de proteases, visualizado no resultado da atividade enzimática de  $162,52 \text{ UP mL}^{-1}$ , sendo, aproximadamente, 8 vezes superior ao resultado do cultivo controle (figura 1). A quitina é um polissacarídeo constituído por um polímero de cadeia longa de N-acetilglicosamina, sendo o principal componente da parede celular dos fungos. Dhar e Kaur (2010) observaram a indução de proteases Pr1 em cultivos contendo 2% de quitina como agente indutor. Segundo esses autores, a produção de proteases pode ser induzida por substâncias poliméricas como os constituintes da cutícula de insetos, e a quitina, sendo o principal constituinte, aumenta a produção de proteases Pr1 possivelmente por ser um agente indutor dessa protease, ou por ser incapaz de produzir repressão catabólica.

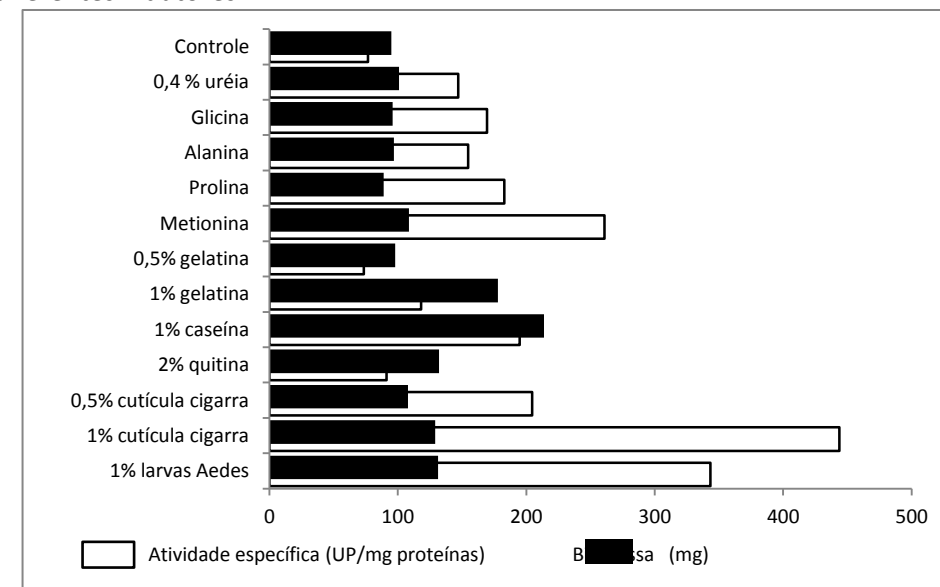
Nos cultivos de *B. bassiana* suplementados com 0,5 e 1% de gelatina houve indução de proteases, como mostra na figura 1, a atividade de proteases foi, aproximadamente, 4 e 7 vezes superiores em relação ao resultado do controle, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com o trabalho de Urtz e Rice (2000) que observaram maior atividade de proteases ( $15,5 \text{ UP mL}^{-1}$ ) por *B. bassiana* (isolado ARSEF 149) em meios de cultivos suplementados com gelatina 1%.

Dos cultivos suplementados com aminoácidos, a adição de 0,5% de metionina foi a que mais contribuiu para a produção de proteases ( $54 \text{ UP mL}^{-1}$ ), sendo, aproximadamente, 3 vezes superior ao resultado do cultivo controle (figura 1). Esses resultados estão de acordo com Donatti et al. (2008) que encontraram maiores níveis na produção de protease Pr1 ( $193,5 \text{ UP mL}^{-1}$ ), por *B. bassiana* cepa CG425, em meios suplementados com 0,5% de metionina. Esses autores relataram que o aminoácido metionina parece desempenhar um papel regulador na produção de protease Pr1 por *B. bassiana* e também foi observado que tanto a indução como a repressão desta enzima pode ser dependente da concentração de metionina presente no meio de cultura.

A análise da atividade específica de proteases, obtida nos cultivos suplementados, indicou que 1% de cutícula de cigarras e 1% de larvas de *A. aegypti* induziram uma maior atividade específica de protease, em relação aos outros indutores e ao cultivo controle, (figura 2).

Os cultivos suplementados com 1% de caseína e 1% de gelatina apresentaram maior crescimento de biomassa fúngica em relação aos demais, como mostra a figura 2.

**Figura 2** Atividade específica de proteases e biomassa dos extratos enzimáticos produzidos por *B. bassiana* CG432 em cultivo submerso em meio de Vogel suplementado com diferentes indutores.



Os cultivos de *B. bassiana* CG432 que apresentaram maior atividade específica de proteases, quando enriquecidos com cutícula de cigarras e larvas de *A. aegypti*, concordam com outros trabalhos da literatura (GUPTA et al., 1992; CAMPOS et al., 2005; DIAS et al., 2008; DONATTI et al., 2008), nos quais houve maior produção de proteases Pr1 e Pr2 em cultivos de *B. bassiana* suplementados com cutícula de diferentes insetos.

Essa especificidade enzimática deve-se ao fato de que os fungos entomopatogênicos podem diversificar a produção de fatores de virulência em resposta aos polímeros constituintes da cutícula de diferentes insetos. A produção de enzimas proteolíticas, em especial uma endoprotease subtilisina designada Pr1, é um fator de virulência essencial para a germinação dos esporos fúngicos e propagação das hifas na cutícula de insetos (MOINO-Jr, ALVES e PEREIRA, 1998).

A caseína e a gelatina foram os indutores que mais contribuíram para o crescimento do fungo, pois são proteínas simples e acessíveis no meio de cultura, com estrutura pouco complexa (KUNZ e LONNERDAL, 1990), facilitando a clivagem por proteases extracelulares e dessa forma, proporcionando ao fungo os nutrientes necessários para o seu crescimento.

Para o uso do fungo *B. bassiana* no controle biológico de insetos praga é importante se utilizar uma cepa com alta virulência, ou seja, que possua maior capacidade de produzir proteases com atividade específica para hidrolisar a cutícula de insetos, dentre outras enzimas (quitinases e lipases), os indutores larvas de *A. aegypti* e cutícula de cigarras contribuíram para essa resposta. A maior produção de biomassa, em cultivos suplementados com caseína e gelatina, é interessante, pois quanto maior a massa fúngica produzida, maior vai ser a capacidade do fungo de eliminar os insetos praga.

## CONCLUSÕES

Os substratos específicos presentes nas larvas de *A. aegypti* e cutícula de cigarras, e proteína caseína, e o aminoácido metionina induziram elevada produção de proteases pelo fungo *B. bassiana* CG432. A caseína também aumentou o crescimento da biomassa fúngica.

Estudos sobre a indução de proteases contribuem para a caracterização de cepas fúngicas que apresentem maior virulência e ação específica sobre insetos alvo.

Como visto neste trabalho as larvas de *A. aegypti* foram um dos melhores agentes indutores de proteases. Isto sugere que a cepa CG432 de *B. bassiana* poderá ser induzida em laboratório para posterior uso em bioensaios e controle biológico do mosquito *A. aegypti*.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem: à CAPES pela concessão de bolsa de Mestrado e a CNPq pela concessão de bolsa de iniciação científica; ao professor Dr. Pedro M. O. J. Neves pelo fornecimento da cepa de *Beauveria bassiana* CG432; ao professor Dr. Carlos Eduardo pelo fornecimento das cigarras; ao professor Dr. João Zequi pelo fornecimento das larvas de *Aedes aegypti*.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, S. O. Characteristic properties of proteins from pre-ecdysial cuticle of larvae and pupae of the mealworm *Tenebrio molitor*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 32, p. 1077–1087, 2002.
- BIDOCHKA, M.J., KHACHATOURIANS, G.G. N-Acetyl-D-Glucosamine-Mediated Regulation of Extracellular Protease in the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*, Canada; v. 54, n. 11, p. 2699-2704, 1988
- BIDOCHKA, M. J.; St. LEGER, R. J.; ROBERTS, D. W. Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, v. 171, p. 213-224, 1997.
- BRADFORD, M. M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BUKHARI, T., TAKKEN, W., KOENRAADT, C.J.M. Development of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* formulations for control of malaria mosquito larvae. *Parasites & Vectors*, Wageningen; v. 4, n. 23, p. 1-14, 2011.
- CAMPOS, R.A., ARRUDA, W., BOLDO, J.D., SILVA, M.V., BARROS, N.M., AZEVEDO, J.L., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M. H. *Boophilus microplus* Infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM Analysis and Regulation of Subtilisin-like Proteases and Chitinases. *Current Microbiology*; v. 50, p. 257–261, 2005.

- DHAR, P., KAUR, G. Production of cuticle - degrading proteases by *Beauveria bassiana* and their induction in different media. **African Journal of Biochemistry Research**, Africa; v. 4, n. 3, p. 65-72, 2010.
- DIAS, B.A., NEVES, P.M.O.J., MAIA, L.F., FURLANETO, M.C. Cuticle –Degrading Proteases Produced by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brazil; n. 39, p. 301-306, 2008.
- DONATTI, A.C., MAIA, F.L., FUNGARO, M.H.P., FURLANETO, M.C. Production and Regulation of Cuticle-Degrading Proteases from *Beauveria bassiana* in the Presence of *Rhammatocerus schistocercoides* Cuticle. **Current Microbiology**; v. 56, p. 256–260, Brasil, 2008.
- DONG, Y., MORTON, J.C., RAMIREZ, J.L., SOUSA, J.A., DIMOPOULOS, G. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* activate toll and JAK-STAT pathway-controlled effector genes and anti-dengue activity in *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, p. 126-132, 2012.
- GUPTA, S.C., LEATHERS, T.D., SAYED, G.N.E, IGNOFFO, C. M. Insect cuticle-degrading enzymes from the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*. **Experimental Mycology**, USA, v.16, p.132-137, 1992.
- HACKMAN, R. H.; GOLDBERG. M. Comparative study of some expanding arthropod cuticles: the relation between composition structures and function. **Journal Insect Physiology**, v. 33, p. 39-50, 1987.
- HARTREE, E.F. Determination of Protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, p. 422-427, 1972.
- ITO, E.T., PEREIRA, G.V., MIYAGUI, D.T., PINOTTI, M.H.P., NEVES, P.M.O.J. Production of Extracellular Protease by a Brazilian Strain of *Beauveria bassiana* Reactivated on Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Brazil; v. 50, n. 2, p. 217-223, 2007.
- KAAYA, G., HASSAN, S. Entomogenous Fungi as Promising Biopesticides for Tick Control. **Experimental & Applied Acarology**, v. 24, n. 12, p. 913-926, 2000.
- KUNZ, C., LONNERDAL, B. Human-milk proteins: analysis of casein and casein subunits by anion-exchange chromatography, gel electrophoresis, and specific staining methods. **The American Journal of Clinical Nutrition**, USA, v. 51, p. 37-46, 1990.
- LEMOS, F.J.A., CAMPOS, F.A.P., SILVA, C.P., XAVIER-filho, J. Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfaciatus* reared on cowpea *Vigna unguiculata* seeds. **Entomologia Experimental et Applicata**, v. 56, p. 219-227, 1990.
- MISSIOS, S.; DAVIDSON, H. C.; LINDER. D.; MORTINER, L.; OKOBI, A. O.; DOCTOR, J. S. Characterization of cuticular proteins in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Africa, v. 30, p. 47-56, 2000.
- MOINO-Jr., A.; ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M. Efficacy of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin isolates for control of stored-grain pests. **Journal of Applied Entomology**, 122, 301-305, 1998.
- OWNLEY, B.H., GRIFFIN, M.R., KLINGEMAN, W.E., GWINN, K.D., MOULTON, J.K., PEREIRA, R.M. *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. **Journal of Invertebrate Pathology**, USA; v. 28, p. 267–270, 2008.
- PATERSON, L.C., CHARNLEY, A.K., COOPER, R.M., CLARKSON, J.M. Specific Induction of a cuticle-degrading protease of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Microbiology**, v. 140, p. 185-189, 1994.
- PATHAN, A.A.K., DEVI, K.U., VOGEL, H., REINEKE, A. Analysis of differential gene expression in the generalist entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin grown on different insect cuticular extracts and synthetic medium through cDNA-AFLPs. **Fungal Genetics and Biology**, Germany; n. 44, p. 1231–1241, 2007.
- St LEGER, R.J.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Caracterização of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Archives Biochemistry Biophysics**, v.253, p.221-232, 1987a.
- St LEGER, R.J.; COOPER, R. M; CHARNLEY, A. K. Distribution of Chymoelastase and Trypsin-like Enzymes in Five Species of Entomopathogenic Deuteromycetes. **Archives Biochemistry Biophysics**, v.258, p.123-131, 1987b.
- URTZ, B.E., RICE, W. C. Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**, United Kingdom; v. 2, n. 104, p. 180-186, 2000.
- VARÉA, G. S.; OLIVEIRA, J. A. Y.; SUGAHARA, V. H.; ITO, E. T.; PINTO, J. P.; TREVISAN, D.; RAMOS, H. J. O.; MAGALHÃES, D. M.; PEREIRA, L. F. P. Identificação de proteases produzidas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. Cepa CG432 previamente ativada em insetos vivos de broca do café (*Hypothenemus hampei*). **Semina: Agrárias**, v. 33, supl., p. 3055-3068, 2012.
- VOGEL, H.J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Microbial Genetics Bulletin**, v.13, p. 42-43, 1956.
- WANG, C., GANG, H., St. LEGER, R.J. Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, p. 704 – 718, 2005.

RECEIVED 25 Sep 2013

ACCEPTED 10 Sep 2014