

PRODUÇÃO DE ENZIMAS DEGRADADORAS PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762) A PARTIR DE METABÓLICOS PRODUZIDOS POR FUNGOS ISOLADOS DO SOLO DO BOSQUE DA CIÊNCIA/INPA

Cláudia Patrícia da Silva TAVARES¹

Wanderli Pedro TADEI²

Michael Rubem Miranda TIAGO³

¹Bolsista IC INPA PIBIC/CNPq; ²Orientador CSAS/INPA; ³Colaborador CSAS/INPA

INTRODUÇÃO

O *Aedes aegypti* é um mosquito de origem africana, encontrado principalmente em países de clima tropical e subtropical. O principal vetor do vírus da Dengue é o *Aedes aegypti*, que também pode ser transmissor do vírus da febre amarela urbana e do vírus chikungunya (MS 2015). A dengue é uma doença infecciosa, causada por um vírus do gênero *Flavivirus* pertencente à família Flaviviridae. O vírus é transmitido ao homem pela fêmea adulta, durante o repasto sanguíneo para o processo de maturação dos ovos. Até o momento, o controle do vetor se apresenta com a única forma de controlar a doença (Barreto 2005). Por isso, novas formas de controle têm sido desenvolvidas nos últimos anos visando reduzir a propagação do inseto vetor. O controle biológico é uma alternativa vantajosa em relação ao controle químico, especialmente quanto ao impacto do meio ambiente, custos e desenvolvimento de resistência (Santi 2009). Os fungos mais amplamente usados em controle biológico são os entomopatogênicos. Estes fungos causam doenças em uma grande variedade de insetos em diferentes fases de desenvolvimento (Oliveira 2013). Atividades larvicida e adulticida de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em mosquitos já foram descritas em condições de laboratório (Leles 2009). Durante a infecção, o *M. anisopliae* e outros fungos entomopatogênicos produzem enzimas hidrolíticas que degradam a cutícula do inseto, dentre as quais estão as quitinases (Oliveira 2011).

O objetivo do trabalho é verificar a eficiência de caldos metabólicos produzidos a partir de linhagens de fungos isolados do solo do Bosque da ciência/INPA, em larvas de *Aedes aegypti*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas seis amostras de solo em pontos distintos no Bosque da Ciência/INPA localizado em Manaus, Amazonas. Cada amostra foi coletada a uma profundidade máxima de 5 cm sendo utilizado tubos Falcon de 50 ml e espátulas de madeira para a coleta do solo. As amostras foram transportadas até o Laboratório de Malária e Dengue/INPA, onde foi conduzido o experimento. As amostras de solo foram transferidas para placas de Petri estéreis para o isolamento dos fungos, sendo utilizados 20 g de Quitina (Himedia®) de carapaça de camarão, como isca. As placas foram incubadas à temperatura ambiente. Os fungos que cresceram sobre a quitina foram transferidos da quitina colonizada para tubos de ensaio contendo batata dextrose ágar (BDA) e cloranfenicol (Lacaz *et al.* 2002). Para a produção dos caldos metabólicos, 33 linhagens isoladas do solo foram inoculadas em placas de petri contendo BDA. Após o crescimento, ¼ da colônia foi semeado em 150 mL de meio líquido (13 g de Caldo nutrientes, 5 g de fosfato de potássio monobásico, 250 mg de antibiótico, 15 g de frutose e 1,5 g de quitina) para 1L de água destilada. Após o inóculo em meio líquido, as amostras foram inseridas na incubadora com agitação orbital (Shaker) a 120 rpm durante 20 dias para a produção de enzimas degradadoras. As amostras fúngicas foram preservadas pelo método de Castellani (Figueiredo *et al.* 1989). Após o período de 20 dias, as amostras foram filtradas com filtro Millipore Millex GP Celulose com porosidade de 0,22 µm. Foi montado um bioensaio para

cada linhagem, com quatro copos contendo dez larvas de 2º e/ou 3º estádios. Três copos foram usados como triplicata e um para o grupo controle contendo água corrente e alimento. As larvas foram colocadas em 3 mL dos caldos metabólicos sem diluição, nas triplicatas. As leituras foram realizadas com 24, 48 e 72 horas. A identificação foi feita por meio de cultivo sobre lâmina, que consistia em colocar um pequeno bloco de meio de cultivo específico (BDA) sobre a lâmina contida em placa de Petri e repicar a amostra a ser identificada no bloco de meio de cultura e cobrir com uma lamínula, sendo incubada à temperatura ambiente, até que o crescimento alcançasse o tamanho suficiente sobre a lâmina e lamínula, posteriormente retirada da placa e corada com azul de lactofenol para a observação em microscópio óptico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 33 linhagens que foram isoladas e testadas nos bioensaios: P3-04; P3-05; P3-06; P3-10; P5-01; P5-03; P5-05; P6-08; P3-01 A; P3-05 B; P5-01 B; P6-01 B; P6-03 A; P2-04 B; P2-05 B; P5-03 B; P6-01 A; P6-02 A; P1-01 A; P1-02 A; P1-03 B; P1-04 B; P3-01 B; P4-01 B; P5-04 B; P1-04 A; P2-06 B; P4-03 B; P3-04 A; P3-04 B; P2-04 A; P2-03 A e P1-03 A, todas apresentaram resultados positivos em larvas de 2º e/ou 3º estádios de *Aedes aegypti*. A linhagem P3-04 matou 86,6% das larvas em 48 horas. As linhagens P5-05, 83,3% e P3-10, 76,6% mataram as larvas em 72 horas, sendo que algumas larvas permaneceram vivas ou emergiram. As linhagens: P3-05 B; P6-03 A; P1-02 A P1-03 B; P3-04 A e P2-03 A causaram 100% de morte das larvas em 48 horas. As linhagens: P3-05 B; P5-01; P5-03; P6-08; P3-01 A e P6-01 B, causaram 100% de morte das larvas em 72 horas. As linhagens mais eficientes foram: P3-06; P5-01 B; P2-04 B; P2-05 B; P5-03 B; P6-01 A; P6-02 A; P1-01 A; P1-04 B; P1-04 A; P3-01 B; P4-01 B; P5-04 B; P2-06 B; P4-03 B; P3-04 B; P2-04 A e P1-03 A, matando todas as larvas (100%) em 24 horas (Tabela 1).

A ação de enzimas no entomoparasitismo por fungos não está amplamente elucidada. Estudos mais recentes afirmam que as várias classes de hidrolases secretadas durante a penetração da cutícula são fundamentais para a eficiência do processo, ocorrendo um sinergismo entre as enzimas para a invasão do hospedeiro. Em *Metarhizium anisopliae* as proteases são produzidas primeiro para a degradação da cutícula e em seguida as quitinases. Essa ação inicial das proteases é o que permite as quitinases penetrar na cutícula de determinados Artrópodes, levando a concluir que as duas enzimas agem em sinergismo para a degradação da cutícula (Palma 2006). Resultados observados em estudos com fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* (Moraes *et al.* 2001), verificou a morte de larvas de *A. aegypti* em 24 horas de contato com o fungo, que apresentaram a capacidade de colonizar as larvas ainda vivas, causando a morte das larvas por infecção. Foram identificados seis gêneros, sendo eles: *Trichoderma* (61,1%), *Fusarium* (11,1%), *Pestalotiopsis* (5,5%), *Penicillium* (5,5%) *Scopulariopsis* (5,5%) e *Gliocladium* (11,1%). O fungo do gênero *Trichoderma* foi o mais frequente. O gênero *Trichoderma* é um fungo natural de solo, muito utilizado no controle biológico por apresentar diversos mecanismos de ação contra patógenos. De acordo com Costa (2014), o *Trichoderma*, produz enzimas do grupo das quitinases e/ou glucanases que são responsáveis pela supressão de diversos patógenos, quebrando a parede celular e rompendo as células. Em estudo realizado por Tanzini (2002), o fungo *Trichoderma* sp., causou a mortalidade de 78% em ninfas de percevejo-de-renda (*Leptopharsa heveae*).

Tabela 1. Percentual de eficiência na mortalidade de larva de *A. aegypti*, no uso de caldos metabólicos de fungos filamentosos isolados do solo do Bosque da Ciência/INPA/Manaus-AM.

Linhasgens	Mortalidade de larvas nos bioensaios			Vivos Nº / (%)	Emergiram Nº / (%)
	24 h Nº / (%)	48 h Nº / (%)	72 h Nº / (%)		
P3-04	-	26 / (86,6%)	-	1 / (3,3%)	3 / (9,9%)
P3-05	-	-	30 / (100%)	-	-
P3-06	30 / (100%)	-	-	-	-
P3-10	-	-	23 / (76,6%)	-	7 / (23,3%)
P5-01	-	-	30 / (100%)	-	-
P5-03	-	-	30 / (100%)	-	-
P5-05	-	-	25 / (83,3%)	1 / (3,3%)	4 / (13,3%)
P6-08	-	-	30 / (100%)	-	-
P3-01 A	-	-	30 / (100%)	-	-
P3-05 B	-	30 / (100%)	-	-	-
P5-01 B	30 / (100%)	-	-	-	-
P6-01 B	-	-	30 / (100%)	-	-
P6-03 A	-	30 / (100%)	-	-	-
P2-04 B	30 / (100%)	-	-	-	-
P2-05 B	30 / (100%)	-	-	-	-
P5-03 B	30 / (100%)	-	-	-	-
P6-01 A	30 / (100%)	-	-	-	-
P6-02 A	30 / (100%)	-	-	-	-
P1-01 A	30 / (100%)	-	-	-	-
P1-02 A	-	30 / (100%)	-	-	-
P1-03 B	-	30 / (100%)	-	-	-
P1-04 B	30 / (100%)	-	-	-	-
P3-01 B	30 / (100%)	-	-	-	-
P4-01 B	30 / (100%)	-	-	-	-
P5-04 B	30 / (100%)	-	-	-	-
P1-04 A	30 / (100%)	-	-	-	-
P2-06 B	30 / (100%)	-	-	-	-
P4-03 B	30 / (100%)	-	-	-	-
P3-04 A	-	30 / (100%)	-	-	-
P3-04 B	30 / (100%)	-	-	-	-
P2-04 A	30 / (100%)	-	-	-	-
P2-03 A	-	30 / (100%)	-	-	-
P1-03 A	30 / (100%)	-	-	-	-

CONCLUSÃO

Dos 33 caldos metabólicos produzidos com as linhagens isolados do solo, as linhagens: P3-06; P5-01 B; P2-04 B; P2-05 B; P5-03 B; P6-01 A; P6-02 A; P1-01 A; P1-04 B; P1-04 A; P3-01 B; P4-01 B; P5-04 B; P2-06 B; P4-03 B; P3-04 B; P2-04 A e P1-03 A, foram as mais eficientes de todas as linhagens testadas, matando todas as larvas de *Aedes aegypti* em 24 horas. O meio líquido testado foi eficiente para a produção de enzimas degradadoras. Porém, novas análises dos caldos devem ser realizadas para compreensão dos compostos produzidos e que estão envolvidos com a morte das larvas. Observou-se também que entre os fungos que foram identificados, o fungo *Trichoderma* sp. foi o mais frequente.

REFERÊNCIAS

- Barreto, C.F. 2005. *Aedes aegypti* - Resistência aos inseticidas químicos e as novas alternativas de controle. *Rev. Elet. FMB*, 1: 62-73.
- Costa, L.B. 2014. *Efeito da radiação ultravioleta-B sobre Trichoderma spp. e Clonostachys rosea, agentes de biocontrole de fitopatógenos*. Lavras, MG. 80pp.
- Figueiredo, M.B.; Pimentel, C.P.V. 1989. Métodos de preservação de fungos em cultura. *O Biológico*, 55(1/2): 27-33.
- Lacaz, C.S.; Porto, E.; Martins, J.E.C.; Vaccari, E.M.H.; Melo, N.T. 2002. *Tratado de micologia médica*. 9ª ed. São Paulo: Sarvier.
- Leles, R.N. 2009. *Efeito de fungos entomopatogênicos na mortalidade de adultos, oviposição e eclosão de larvas de Aedes aegypti*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. Goiânia, GO. 46pp.
- Moraes, A.M.L.; Costa, G.L.; Barcellos, M.Z.C.; Oliveira, R.L.; Oliveira, P.C. 2001. The entomopathogenic potential of *Aspergillus* spp. in mosquitoes vectors of tropical diseases. *J. Basic Microbiol.*, 41(1): 45-49.
- Ministério da Saúde (MS). 2015. Portal da Saúde. Informações Técnicas: vetores. Disponível em: (<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/informacoes-tecnicas-dengue>). Acesso em: 04/01/2015.
- Oliveira, N.S. 2011. Diversidade de quitinases em isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Resumo. Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.
- Oliveira, F.R. 2013. *Prospecção de fungos para o controle de Anticarsia gemmatalis Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae)*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. 69pp.
- Palma, L.P. 2006. *Análise do padrão da expressão dos genes chit1, chi2 e chi3 que codificam quitinases no fungo entomopatogênico Metarhizium anisopliae*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS. 84pp.
- Santi, L. 2009. *Relação patógeno-hospedeiro: análise bioquímica e proteômica da interação do fungo Metarhizium anisopliae e seus hospedeiros artrópodes*. Tese de Doutorado. Porto Alegre, RS. 140pp.
- Tanzini, M.R. 2002. *Controle do percevejo-de-renda-da-seringueira (Leptopharsa heveae) com fungos entomopatogênicos*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo. Piracicaba, São Paulo. 140pp.