

Eixo Temático ET-03-001 - Meio Ambiente e Recursos Naturais

**RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS UTILIZADOS COMO SUBSTRATO PARA A
PRODUÇÃO DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae*
(DEUTEROMYCOTINA: HYPHOMYCETES)**

Eveline de Arruda Martins, Cibele Queiroz, Lucas Brendo Pimenta Bandeira,
Adna Cristina Barbosa de Sousa

Universidade Federal da Paraíba, Centro de Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, Cidade Universitária, s/n - Castelo Branco III, João Pessoa-PB, Brasil.

RESUMO

Metarhizium anisopliae é utilizado no controle biológico de vários insetos-praga na agropecuária. Os custos de produção de conídios, em larga escala, no substrato padrão (arroz e cevada) utilizado atualmente onera o processo de produção. Encontrar alternativas como forma de minimizar os custos do processo, levou a necessidade de averiguar a eficiência de substratos alternativos. Portanto, o nosso objetivo foi analisar o potencial de resíduos agroindustriais para produção de *M. anisopliae* e avaliar a viabilidade dos conídios produzidos em formigas cortadeiras do gênero *Atta*. O experimento para produção de conídios foi realizado em erlernmeyer contendo 30 g dos substratos e 0,3 µL da suspensão de conídios (1×10^8 conídios/mL⁻¹). Após 10 dias de incubação, foi coletada uma alíquota de conídios de 1×10^8 conídios/mL⁻¹ e colocada em placa de Petri contendo papel filtro umedecido e as formigas. Foi feito um experimento com três repetições, mais o grupo controle. A viabilidade dos conídios de *M. anisopliae* produzidos nos diferentes substratos foi garantida pela mortalidade das formigas infectadas. A taxa média de mortalidade a partir dos conídios produzidos nos três substratos foi de 99,9 % (arroz), 96,4 % (malte) e de 77,9 % (bagaço da cana-de-açúcar). Diante dos resultados obtidos, os substratos alternativos utilizados (resíduos de malte e bagaço-de-cana), para crescimento de *M. anisopliae* possuem potencial para conidiogênese e conseqüentemente, pode fornecer uma redução nos custos de produção de *M. anisopliae*.

Palavras-chave: Controle biológico; Fungo entomopatogênico; Resíduos agroindustriais.

INTRODUÇÃO

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin é um agente microbiano utilizado no controle biológico de insetos-praga. Este fungo naturalmente parasita mais de 300 espécies de insetos de diversas ordens, incluindo pragas da agricultura e da pecuária, sendo os principais: cupins, gafanhotos, cigarrinhas e besouros (LEAL et al., 2003). Nos estados do Nordeste, *M. anisopliae* vem sendo utilizado com sucesso no controle biológico da cigarrinha da cana-de-açúcar, *Mahanarva posticata* (Hemiptera: Cercopidae) (MACEDO; MACEDO, 2004)

Entre os organismos utilizados como agentes no controle biológico de pragas, os fungos entomopatogênicos se destacam por não necessitarem ser ingeridos para que possam efetivar o controle do organismo alvo. Eles desenvolvem-se de forma ativa sobre o tegumento de seu hospedeiro (ALVES, 1998b).

O processo de infecção de *M. anisopliae* em seus hospedeiros ocorre em fases sucessivas de germinação, diferenciação, penetração, colonização, reprodução e disseminação. A infecção inicia-se pela adesão e germinação de conídios do fungo sobre a superfície do artrópode, seguida de penetração da hifa através da cutícula. Na penetração estão envolvidos os fatores físicos (pressão da hifa que rompe áreas membranosas ou esclerosadas) e químicos, resultante da ação de enzimas (esterases, proteases, lipases, e quitinases) que facilitam a

penetração mecânica. Na germinação, o conídio diferencia-se em um tubo germinativo com uma dilatação na extremidade das hifas para a formação do apressório, uma estrutura especializada de penetração, estimulada pelo contato físico. Após a formação do apressório, ocorre o desenvolvimento de estruturas denominadas grampos de penetração, que mantêm o contato com a cutícula. Após atravessar a cutícula, *M. anisopliae* encontra um ambiente rico em nutrientes, disseminando-se rapidamente através da hemolinfa por todos os tecidos, produzindo toxinas como as dextruxinas e citocalasinas, que ocasionam paralisia e conseqüentemente, a morte do hospedeiro (KERSHAW et al., 1999).

Os sintomas observados após a infecção do hospedeiro incluem inquietação, perda da sensibilidade, perda de coordenação dos movimentos e paralisia, ocasionando a morte. O ciclo total da doença é de 8 a 10 dias. Os insetos infectados tornam-se duros e recobertos por uma camada pulverulenta de conídios. Ao final da conidiogênese, a colônia possui uma coloração que pode variar de verde claro a escuro, acinzentada ou esbranquiçada com uma massa de conídios verdes. Essa patologia é conhecida como muscardine verde (ALVES, 1998b).

As estruturas mais produzidas e comercializadas de *M. anisopliae* são os conídios produzidos na superfície de meio de cultura sólido, dentro de diferentes recipientes conforme o objetivo e escala de produção (ALMEIDA; BATISTA-FILHO, 2006).

As crescentes despesas com o custo do meio para o cultivo e produção em grande escala de conídios de *M. anisopliae* levantam a necessidade de analisar a eficiência de alguns resíduos industriais que, além de propriedades nutricionais importantes, possuem grande disponibilidade e baixo custo. A pesquisa de novas metodologias de sistemas de produção de conídios é muito importante para tornar o controle biológico de pragas economicamente viável para ser aplicado em grande escala (TANZINI, 2002).

O arroz e a cevada são os substratos mais utilizados para a produção de conídios. Isto se deve, provavelmente, à combinação de fatores como balanço nutricional, custo, ampla disponibilidade mundial, características físicas, propriedades de hidratação e integridade estrutural mesmo após a colonização pelo fungo (DALLA SANTA et al., 2005).

Devido o elevado preço do arroz e da cevada, o custeio do substrato para o crescimento e esporulação do fungo tem acarretado despesas crescentes. Estudos têm sido realizados desde a década de 80 com o objetivo de avaliar substratos alternativos e mais baratos, incluindo substratos agroindustriais (ALVES et al., 1997a), promovendo uma tendência para a regionalização da produção (ALVES et al., 1997b).

O resíduo úmido da produção de cerveja, também chamado de farelo ou bagaço de cevada, pode ser descrito como uma massa resultante da aglutinação da casca com resíduos do processo de mosturação. Os altos índices de proteínas e açúcares resultantes das reações de hidrólise do conteúdo amiláceo do cereal são os maiores atrativos neste resíduo, embora ocorra variação na sua composição bromatológica em função do processo industrial no qual foi gerado (CABRAL FILHO, 1999).

Outros resíduos agroindustriais têm sido utilizados como meio de cultura alternativo para produção de conídios em meios sólidos, tais como: arroz vermelho (AGOSTINETTO et al., 2001); resíduos de mandioca e fécula (CEREDA, 1996) e melaço (DALLA SANTA et al., 2005), dentre outros. Esses resíduos têm representado uma alternativa viável e mais barata para a produção de fungos entomopatogênicos, porém esses substratos recebem algum tipo de suplemento para garantir o crescimento do fungo. Diante dessas informações, o objetivo deste trabalho foi analisar o potencial de dois resíduos agroindustriais (resíduos de malte e bagaço de cana-de-açúcar) sem suplemento nutricional para produção de *M. anisopliae* e avaliar a viabilidade dos conídios produzidos em formigas cortadeiras, visando à seleção para uso no controle biológico de insetos-praga na região Nordeste.

MATERIAL E MÉTODO

Foi utilizado um isolado do fungo *M. anisopliae*, coletado de solo de um sistema agroflorestal (zona da mata de Pernambuco), no ano de 2016.

As formigas soldados de *Atta sexdens* foram coletadas de saueiro isento da aplicação de produtos fitossanitários, em área de reserva de mata atlântica pertencente à Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2017. Esse inseto foi usado para o teste de viabilidade dos conídios produzidos nos dois resíduos agroindustriais, devido ao impacto que essa praga pode causar a diversas culturas agrícolas e espécies vegetais.

Origens dos substratos: arroz polido (meio padrão) – arroz comercializado; resíduo de malte (cervejaria artesanal – João Pessoa/PB); bagaço de cana-de-açúcar (barraca de caldo-de-cana, localizada da região metropolitana de João Pessoa/PB).

Produção de conídios: o fungo foi inoculado em meio de cultura para conidiogênese (Meio Completo - MC) (ALVES, 1998b). Em seguida, as placas foram incubadas a 25° C e fotofase de 12 horas, por um período de 7 a 10 dias para crescimento e conidiogênese do fungo. Após esse período, os conídios foram coletados, raspando-se a superfície do meio de cultura e transferidos para tubos de ensaio fechados com filme PVC e armazenados sob refrigeração a 4° C por um período não superior a 10 dias. Para o preparo da suspensão, foram adicionadas aos conídios água destilada autoclavada mais Tween 80 a 0,01 %. Em seguida, foi estimada a concentração dos conídios em câmaras de Neubauer e as suspensões foram padronizadas em 1×10^8 conídios/mL⁻¹.

Avaliação do crescimento de *Metarhizium anisopliae* em meio sólido à base de resíduos agroindustriais: foram utilizados substratos ricos em carboidratos como arroz polido (meio padrão), resíduo de malte e bagaço de cana-de-açúcar. O experimento foi realizado em erlernmeyer de 250 mL, contendo 30 g do substrato arroz, 30 g do substrato resíduo de malte e 15 g do substrato bagaço de cana-de-açúcar com umidade em torno de 70 %. Foram preparados três frascos para cada meio de cultura. Foram inoculados 1×10^8 conídios/mL⁻¹ e em seguida os frascos serão incubados a 25° C e fotofase de 12 horas durante 7 dias. Após esse período, foi coletado uma alíquota de 0,1 mL e adicionado 0,9 de água + Tween 80 a 0,01 % para se obter uma diluição final de 1:10 para realização da contagem dos conídios em câmara de Neubauer ao microscópio.

Avaliação da atividade bioinseticida – bioensaio: os exemplares das formigas foram coletados com o auxílio de pinça entomológica, em dias de intensa atividade no saueiro, colocados em tubo cônico tipo falcon – 50 mL e levados para o laboratório. Foram utilizadas 30 formigas. Foi realizado um experimento com três repetições. Em cada repetição foram utilizadas 10 formigas. As formigas foram mergulhadas subsequentemente em solução de hipoclorito de sódio e água destilada esterilizada. Em seguida, foram colocadas em placa de Petri contendo papel filtro umedecido com uma suspensão de conídios (1×10^8 conídios mL⁻¹). Após 24 horas, as formigas foram transferidas para placa de Petri contendo papel filtro umedecidos com água destilada autoclavada. As placas foram deixadas em temperatura ambiente e avaliadas durante 10 dias. A cada 24 horas era adicionado 1 mL de água destilada e a cada 48 horas era adicionado a dieta das formigas (mel a 10 %). O controle negativo foi realizado imergindo as formigas em água destilada autoclavada e mantendo-as nas mesmas condições citadas anteriormente. Após a morte, as formigas (exceto grupo controle) foram esterilizadas com álcool 70 % superficialmente e mantidas em recipientes estéreis individuais, com papel filtro úmido para confirmação da morte pelo fungo.

Análise estatística: os experimentos foram realizados segundo o delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo os dados obtidos analisados estatisticamente quanto à variância (teste *F*) e as médias comparadas entre si (Teste de Tukey), ambos ao nível de 5,0 % de probabilidade, utilizando-se o programa computacional Sisvar Star (FERREIRA, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação do crescimento de *Metarhizium anisopliae*

O crescimento micelial de *M. anisopliae* foi avaliado durante 10 dias no arroz polido (substrato padrão), resíduos de malte e bagaço de cana-de-açúcar. Os resultados estão descritos na Tabela 1.

O arroz e o malte apresentaram uma maior produção de conídios e foram os substratos que ao decorrer dos 10 dias tiveram as menores perdas de umidade, apresentando umidade final de 67,56 % e 68,99 %, respectivamente. Já o bagaço da cana-de-açúcar teve uma perda de umidade considerada, apresentando umidade final de 55,98 %.

Após 10 dias de incubação, pode-se observar que os substratos arroz e malte apresentaram maior crescimento visual de *M. anisopliae* e proporcionaram maior produção de conídios. O substrato bagaço de cana-de-açúcar apresentou baixo crescimento de *M. anisopliae* e proporcionou uma conidiogênese menor. Esses diferentes resultados podem ser justificados pela textura e suporte nutricional de cada substrato. Observou-se um grande crescimento no malte devido à alta presença de teor de açúcares fermentescíveis. O bagaço de cana-de-açúcar apesar de ser um substrato rico em polissacarídeos e apresentar característica fibrosa que favorece a aeração e crescimento durante o cultivo teve uma perda de umidade. A perda de umidade levou à baixa disponibilidade de nutrientes, afetando o crescimento do fungo e produção de conídios. Além disso, o baixo crescimento de *M. anisopliae* pode ser justificado pela camada espessa de lignina da cana-de-açúcar. O bagaço de cana-de-açúcar originado após a extração do caldo rico em sacarose é um material com abundância em lignocelulose (RABELO et al., 2011). A lignina é o componente estrutural mais importante da parede celular de plantas superiores, apresentando funções vitais como, por exemplo, promover rigidez ao sistema vascular, permitindo que as plantas tenham crescimento vertical; conferir hidrofobicidade ao xilema, o que auxilia o transporte de água, e conferi defesa estrutural contra micro-organismos (HERRMANN, 1995; MARTONE et al., 2009).

Tabela 1. Variação da umidade nos diferentes substratos utilizados para o cultivo de *Metarhizium anisopliae* após 10 dias de incubação ($T = 29 \pm 1^\circ \text{C}$).

Substratos	Umidade (Volume de água destilada) ⁰	Umidade inicial (%)	Umidade final (%)
Arroz polido (meio padrão)	30 mL	71,50	67,56
Malte	30 mL	76,67	68,99
Bagaço da cana-de-açúcar	60 mL	66,87	55,98
CV% ⁴		5,56	4,78

⁰Volume de água destilada necessária para se obter 70 ± 10 % de umidade em 30 g de substrato bruto.

Avaliação da patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* sobre a formiga

Os conídios de *M. anisopliae* produzidos no arroz polido, malte e bagaço da cana-de-açúcar mostrou efeito letal na concentração testada (1×10^8 conídios/mL⁻¹) (Figura 1). Os resultados obtidos com os conídios produzidos no arroz evidenciaram mortalidade de todas as formigas às 96 h após a infecção e 100 % das formigas mortas pelo fungo foi confirmado às 216 h. Os resultados obtidos com os conídios produzidos no malte evidenciaram mortalidade de todas as formigas às 129 h após a infecção e 97 % das formigas mortas pelo fungo foi confirmado às 240 h. Os resultados obtidos com os conídios produzidos no bagaço de cana-de-açúcar evidenciaram mortalidade de todas as formigas às 192 h após a infecção e 50 % das formigas mortas pelo fungo foi confirmado às 240 h.

Os primeiros indícios da invasão da superfície cuticular caracterizaram-se pelo surgimento de pontuações esbranquiçadas, evidenciando a exteriorização das hifas. Este processo marca o começo da mumificação do inseto. Alguns autores sugerem que a quantidade de conídios aplicada nos hospedeiros reflete na precocidade da mortalidade e da colonização. Segundo Fernandes e Alves (1992), quanto mais conídios penetram, mais toxinas ou enzimas são liberadas, aumentando a mortalidade do inseto. Todavia, a velocidade de ação do fungo depende, além da dosagem, das espécies hospedeiras envolvidas (SOSA-GÓMEZ; MOSCARDI, 1992).

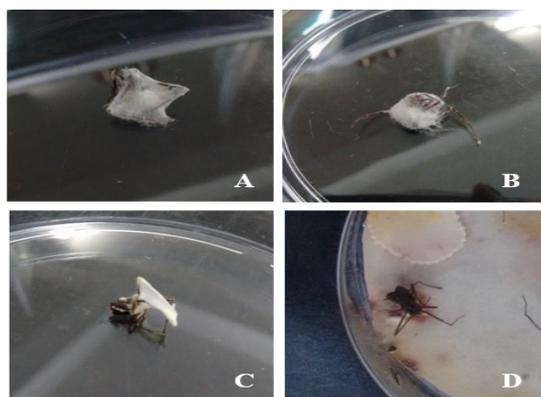


Figura 1. Infecção da formiga com *Metarhizium anisopliae*. Bioensaio realizado em água destilada autoclavada. Conídios produzidos no arroz (A), malte (B) e bagaço de cana-de açúcar (C). Controle negativo (D).

A composição da cutícula influencia na virulência dos fungos entomopatogênicos (ST LEGER et al., 1991). O tegumento dos insetos é essencialmente composto por proteínas e quitina associadas com lipídios e compostos fenólicos (FERRON, 1978), que possuem aldeídos presentes que podem inibir a germinação dos conídios de *M. anisopliae* e atrasar o desenvolvimento do tubo germinativo (BORGES et al., 1993; SOSA-GÓMEZ et al., 1997). Os sintomas de infecção inicialmente observados nas formigas foram à diminuição dos movimentos, seguidos de paralisia. Esses dados são idênticos aos resultados obtidos por Vey et al. (2002), onde os hospedeiros infectados (carrapato *Ixodes ricinus* L.) exibiam os primeiros sinais de colonização: inquietação, perda de coordenação motora, parada de ingestão de alimentos e morte.

Os distúrbios fisiológicos gerados nos hospedeiros, provavelmente foram provocados pela produção de micotoxinas. As dextrinas, metabólitos secundários produzidos pelos fungos, são as principais toxinas que afetam os canais de transportes de íons, envolvidos nas respostas musculares e na integridade das membranas celulares. Portanto, estes fatores apontam que as micotoxinas estão envolvidas na sintomatologia exibida nos primeiros estágios de infecção (SHAH; PELL, 2003).

A taxa de mortalidade das formigas após infecção com os conídios produzidos nos substratos arroz e malte não diferiram estatisticamente superando 95 % de mortalidade. (Tabela 2). Já a taxa de mortalidade das formigas após infecção com os conídios produzidos no substrato bagaço de cana-de-açúcar foi de aproximadamente 78 %. No grupo controle foi observado uma mortalidade de 1,0 %. Esse resultado era esperado devido ao estresse causado durante o período de avaliação, mas não foi observado a colonização com o fungo (Tabela 2).

Tabela 2. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* produzido em diferentes substratos sobre a formiga cortadeira em condições de laboratório na concentração de 1×10^8 conídios/mL⁻¹. Período de incubação - 10 dias.

Substratos	Taxa de mortalidade confirmada (%) (\pm EP) ³
Arroz (substrato padrão)	99,9 \pm 21,40
Malte	96,4 \pm 10,02
Bagaço da cana-de-açúcar	77,9 \pm 12,10
Controle	1,01 \pm 0,11
CV%	10,4

CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que o isolado utilizado de *M. anisopliae* foi considerado patogênico para *A. sexdens* devido à especificidade ao hospedeiro, sugerindo que este fungo tem potencial para uso no controle biológico para minimizar os danos ecotóxicos na produção vegetal; Utilização de resíduos de malte e bagaço de cana-de-açúcar na composição de meios de cultura sólidos para a produção de *M. anisopliae* foi eficiente; Os conídios produzidos a partir dos substratos não convencionais foram viáveis e apresentaram efeito letal na concentração testada; As taxas de mortalidade das formigas após infecção com os conídios produzidos nos diferentes substratos superaram 75 % de mortalidade; Os substratos utilizados pode representar um meio de cultura alternativo para a produção de *M. anisopliae*, uma vez que nestes substratos o fungo manteve alta conidiogênese sem a perda da atividade inseticida. No entanto, outros estudos com outras linhagens fúngicas e bioensaios com outros insetos são necessários.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINETTO, D.; FLECK, N. G.; RIZZARDI, M. A.; MEROTTO JUNIOR, A.; VIDAL, R. A. Arroz vermelho: ecofisiologia e estratégias de controle. **Ciência Rural**, v. 31, p. 341-349, 2001.
- ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A. Controle biológico da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar com o fungo *Metarhizium anisopliae*. **Boletim Técnico do Instituto Biológico**, v. 16, p. 1-19, 2006.
- ALVES, L. F. A.; ALVES, S. CAPALBO, D. M. F. Production of *Bacillus thuringiensis* Berliner var. kurstaki grown in alternative media. **Biocontrol Science and Technology**, v. 7, p. 377-378, 1997a.
- ALVES, L. F. A.; ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M.; CAPALBO, D. M. F. Seleção de material-prima para a elaboração de meio de cultura para a produção de *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki Berliner. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 26, p. 379-382, 1997b.
- ALVES, S. B. **Fungos entomopatogênicos em controle microbiano de insetos**. São Paulo: Malone, Piracicaba: FEALQ, 1998b.
- ALVES, S. B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: ALVES, S. B. (Coord.). **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo: Manole, 1998. p. 21-37.
- BELL, J. V.; HAMALLE, R. J. Three Fungi tested for control of the cowpea curculio, *Chalcodermus aeneus*. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 15, p. 477-450, 1970.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; SOUZA, E. J.; PERALVA, S. L. F. S. E REIS, R. C. S. Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 em teste de campo com bovinos infestados por carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **R. bras. Med. Vet.**, v. 21, p. 78-82, 1999.

BORGES, M.; S. C. M. LEAL; TIGANO-MILANI, M. S.; VALADARES, M. C. C. Efeito do feromônio de alarme do percevejo verde, *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae), sobre o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 22, p. 505-512, 1993.

BRADY, B. L. Fungi as parasites of insectes and mites. **Biocont. N. Informat.**, v. 2, p. 281-290, 1981.

CABRAL FILHO, S. L. S. **Avaliação do resíduo de cervejaria em dietas de ruminantes através de técnicas nucleares e correlatas**. 1999. 68f. Dissertação. (Mestrado em Ciências – Área de Tecnologia Nuclear na Agricultura) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

CEREDA, M. P. **Caracterização, usos e tratamentos de resíduos da industrialização da mandioca**. Botucatu: Centro de Raízes Tropicais, Universidade Estadual Paulista, 1996.

CUISANCE, D.; BARRE, N.; DEKEN, R. Ectoparasites of animals: methods of ecological, biological, genetic and mechanical control. **Rev. Sci. Tech.**, v. 13, p. 1305-1356, 1994.

DALLA SANTA, H. S.; DALLA SANTA, O. R.; BRAND, D.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Spore production of *Beauveria bassiana* from agroindustrial residues. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 51-60, 2005.

DRUMMOND, R. O.; ERNEST, S. E.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W. J.; GRAHAM, O. H. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae): Laboratory tests of insecticides. **J. Econ. Entomol.**, v. 66, p. 130-133, 1973.

FARIA, M. R.; ALMEIDA, D. O.; MAGALHÃES, B. P. Food Consumption of *Rhammtocerus schistocercoides* Rehn (Orthoptera: Acrididae) Infected by the Fungus *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal. **An. Soc. Entomol. Brasil.**, v. 28, p. 91-99, 1999.

FERNANDEZ-RUVALCABA, M.; CRUZ-VAZQUEZ, C.; SOLANO-VERGARA, J. AND GARCIA-VAZQUEZ, Z. Anti-tick effects of *Stylosanthes humilis* and *Stylosanthes hamata* on plots experimentally infested with *Boophilus microplus* larvae in Morelos, Mexico. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 23, p. 171-175, 1999.

FERREIRA, D. F. (Ed.). Sisvar: versão 4.3. Lavras: DEX/UFLA, 2003.

HERRMANN, K. M. The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. **Plant Physiology**, v. 107, p. 7-12, 1995.

FRISCH, J. E. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. **I. J. Parasitol.**, v. 29, p. 57-71, 1999.

FUXA, J. R. Ecological considerations for the use of entomopathogens in IPM. **Ann. Rev. Entomol.**, v. 32, p. 225-251, 1987.

FUXA, J. R.; TANADA, Y. Epidemiological concepts applied to insect pathology. In: FUXA, J. R.; TANADA, Y. **Epizootiology of Insect Diseases**. New York: John Wilwy & Sons, 1987. p. 3-22.

GARCIA, J. F.; OZAKI, L. S. Perspectivas de controle imunológico de carrapatos parasitos de rebanhos bovinos. **A H. Vet.**, v. 71, p. 9-12, 1993.

GOETTEL, M. S.; JOHONSON, D. L.; INGLIS, G. D. The role of fungi in the control of grasshoppers. **Can. J. Bot.**, v. 73, p. S71-S75, 1995.

- GREEN, P. E.; CONNOLE, D. M. Screening of fungal metabolites for insecticidal activity against the sheep bowfly *Lucilia cuprina* and the cattle tick *Boophilus microplus*. **Gen. Appl. Entomol.**, v. 13, p. 11-14, 1981.
- GRONVOLD, J.; HENRIKSEN, S. A.; LARSEN, M.; NANSEN, P.; WOLSTRUP, J. Biological control. Aspects of biological control with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. **Vet. Parasitol.**, v. 64, p. 47-64, 1996.
- HOGSETTE, J. A. Management of ectoparasites with biological control organisms. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, p. 147-151, 1999.
- HORN, S. C. **Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos**. Inquérito. Secretaria de Defesa Animal do Ministério da Agricultura, Brasília. 1983.
- KHALAF-ALLAH, S. S. Control of *Boophilus microplus* ticks in cattle calves by immunization with a recombinant Bm86 glucoprotein antigen preparation. **DTW Dtsch Tierarztl Wochenschr.**, v. 106, p. 248-251, 1999.
- KERSHAW, M. J.; MOORHOUSE, E. R.; BATEMAN, R.; REYNOLDS, S. E.; CHARNLEY, A. K. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 74, p. 213-223, 1999.
- KUNZ, S. E.; KEMP, D. H. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. **Rev. Sci. Tech.**, v. 13, p. 1249-1286, 1994.
- LEAL, A. T.; FREITAS, D. R. J.; VAZ JR., I. S. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. **Acta Scientia e Veterinaria**, v. 31, p. 1-11, 2003.
- LOUREIRO, E. S.; MONTEIRO A. C. Patogenicidade de isolados de três fungos entomopatogênicos a soldados de *Atta sexdens sexdens*. **R. Árvore**, v. 29, p. 553-561, 2005.
- LUNA, A. L. **Características Citológicas e Genética de Linhagens Selvagens, Mutantes e Diplóides de *Metarhizium anisopliae* (Metsc) Sorokin**. Rio de Janeiro. Tese (Doutorado), UFRJ, 1985.
- MACEDO, N.; MACEDO, D. As pragas de maior incidência nos canaviais e seus controles. **Visão Agrícola**, v. 1, p. 38-46, 2004.
- MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELLO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. v. 1.
- MONTEIRO, A. C.; FIORIN, A. C.; CORREIA, A. C. B. Pathogenicity of isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin towards the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.) (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Rev. de Microbiol.**, v. 29, p. 109-112, 1998.
- MOREIRA, M. A. B.; MAGALHÃES, B. P.; VALADARES, M. C. C.; CHAGS, M. C. M. Occurrence of *Metarhizium favoviride* Gams and *Rozsypal* (Hyphomycetes) on *Schistocerca pallens* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae) in Rio Grande do Norte, Brasil. **An. Soc. Entomol.**, v. 25, p. 359-361, 1996.
- NARI, A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. **Vet. Parasitol.**, v. 57, p. 153-165, 1995.
- ONOFRE, S. B.; VARGAS, L. R. B.; ROSSATO, M.; BARROS, N. M.; BOLDO, J. T.; NUNES, A. R. F.; AZEVEDO, J. L. Controle biológico de pragas na agropecuária por meio de fungos entomopatogênicos. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biociência: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002.
- SHAH, P. A.; PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 61, p. 413-423, 2003.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; MOSCARDI, F. Epizootiologia: chave dos problemas para o controle microbiano com fungos. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 3., 1992, Águas de Lindóia. Anais. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, p. 64-69, 1992.

TANZINI, M. R. **Controle do percevejo-de-renda-da-seringueira (*Leptopharsa heveae*) com fungos entomopatogênicos**. 2002. Tese (Doutorado em Ciências – Área de Entomologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

VILAS BOAS, A. M.; ANDRADE, R. M.; OLIVEIRA, J. V. Diversificação de meios de cultura para a produção de fungos entomopatogênicos. **Arq. Biol. Tec.**, v. 39, p. 123-128, 1996.