

74240 - POTENCIAL DA FIBRA DA ALGAROBA PARA A PRODUÇÃO DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO METARHIZIUM ANISOPLIAE VAR. ANISOPLIAE

Gilanna Falcão Ferreira¹, Geisi Maria Henrique da Silva², Laísa Macedo Tavares³, Nathália Souza Bezerra⁴, Adrielly Silva Albuquerque de Andrade⁵, Emanuele Cardoso Dias⁶, Andréa Farias de Almeida⁷, Adna Cristina Barbosa de Sousa⁸

¹Graduanda do Curso em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail: gilannaferreira@gmail.com

²Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail: geisimaria.jr@gmail.com

³Graduanda do Curso de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail: macedolaisa@gmail.com

⁴Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail: nathaliasouza_13@hotmail.com

⁵Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail: adrielly_saa@hotmail.com

⁶Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail: dias_sigma@hotmail.com

⁷Doutora e Professora de Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail: andreaafalm@cbiotec.ufpb.br

⁸Doutora e Professora de Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail: adnasousa@cbiotec.ufpb.br

RESUMO: *Metarhizium anisopliae* é utilizado como bioinseticida no biocontrole de diversas pragas agrícolas. Para a sua utilização no biocontrole é necessário à produção

de conídios em larga escala. Os conídios são produzidos no arroz e devido ao alto custo de produção, há interesse em encontrar substratos alternativos que garantam a viabilidade e produção de conídios em grande escala com baixo custo. Portanto, o nosso objetivo foi analisar o potencial da fibra da algaroba como substrato alternativo para conidiogênese de *M. anisopliae* e a sua viabilidade sobre a formiga cortadeira. Para conidiogênese foi inoculado 1×10^8 conídios/mL em 30 g da fibra de algaroba e analisados durante 10 dias. Para análise da viabilidade/patogenicidade foram utilizadas 30 formigas cortadeiras. As formigas foram mergulhadas em uma suspensão de 1×10^8 conídios/mL. Foi realizado um bioensaio com três repetições, mais o grupo controle. A fibra da algaroba garantiu o crescimento e esporulação de *M. anisopliae*. Os conídios produzidos na fibra da algaroba foram viáveis com uma porcentagem de germinação em torno de 98,21%. A patogenicidade foi confirmada na formiga cortadeira após adesão e germinação dos conídios na superfície da cutícula ocasionando 100% de morte, com exceção do grupo controle. Após 120 h foi observada a total mumificação das formigas e originando novos conídios, garantindo a perpetuação do fungo. A fibra da algaroba indicou ser um substrato alternativo para a produção de *M. anisopliae*, para uso no controle biológico de vários insetos-praga, para minimizar os danos ecotóxicos na produção animal e vegetal.

Palavras chave: Biocontrole; Fungos entomopatogênicos; Algaroba.

POTENTIAL OF ALGAROBA FIBER FOR THE PRODUCTION OF ENTOMOPATOGENIC FUNGO *METARHIZIUM ANISOPLIAE* VAR. *ANISOPLIAE*

ABSTRACT: *Metarhizium anisopliae* is used as a bio-insecticide in the biocontrol of several agricultural pests. For its use in biocontrol it is necessary to produce large-scale conidia. Conidia are produced in rice and due to the high cost of production, there is interest in finding alternative substrates that guarantee the viability and production of large-scale conidia with low cost. Therefore, our objective was to analyze the potential of the algaroba fiber as an alternative substrate for the conidiogenesis of *M. anisopliae* and its viability on the cutter ant. For conidiogenesis, 1×10^8 conidia/mL were inoculated into 30 g of the algaroba fiber and analyzed for 10 days. For viability/pathogenicity analysis, 30 leaf cutting ants were used. The ants were immersed in a suspension of 1×10^8 conidia/mL. A bioassay was performed with three replicates plus the control group. The algaroba fiber guaranteed the growth and sporulation of *M. anisopliae*. The conidia

produced in the fiber of the algaroba were viable with a percentage of germination around 98.21%. The pathogenicity was confirmed in the cutter ant after adhesion and germination of the conidia on the cuticle surface causing 100% death, except for the control group. After 120 h the total mummification of the ants and new conidia were observed, guaranteeing the perpetuation of the fungus. The algaroba fiber indicated to be an alternative substrate for the production of *M. anisopliae*, for use in the biological control of several pest insects, to minimize the ecotoxic damages in animal and vegetal production.

Keywords: Biocontrol; Entomopathogenic fungi; Algaroba.

1. INTRODUÇÃO

O controle biológico pode ser aplicado pela proteção ou manutenção do desenvolvimento de um antagonista natural ou através da introdução de um competidor, patógeno ou predador exógeno. A aplicação de um organismo exógeno em um meio ambiente a fim de controlar uma praga constitui-se no emprego do controle biológico clássico. Porém, é de fundamental importância controlar a adaptação e o sucesso deste agente exógeno no ambiente de aplicação, para que haja o controle da praga alvo de maneira harmoniosa e sem impactar outras espécies nativas (14, 22).

Entre os organismos utilizados como agentes no controle biológico de pragas, destacam-se os fungos filamentosos, pois estes não necessitam ser ingeridos para que possam efetivar o controle do organismo alvo. Eles desenvolvem-se de forma ativa sobre o tegumento de seu hospedeiro (6).

Os fungos entomopatogênicos são responsáveis por cerca de 80 % das doenças causadas em insetos. Existindo cerca de 90 gêneros e mais de 700 espécies de fungos patogênicos de invertebrados já descritos. Apesar disso, a maioria dos trabalhos refere-se apenas a duas espécies de fungos: *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* (23).

M. anisopliae infecta mais de 300 espécies de artrópodes, incluindo pragas importantes tanto para agricultura como para pecuária (5). Muitos países, tais como os Estados Unidos, Austrália, Irlanda, China e Brasil utilizam *M. anisopliae* para o controle de diversas pragas (17). Segundo Alves (5), no Brasil os principais programas de controle de pragas empregando este entomopatógeno são o controle das cigarrinhas da

cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata* e *Mahanarva fimbriolata*), das cigarrinhas das pastagens (*Deois* sp. e *Zulia* sp.), do cupim das pastagens (*Cornitermes cumulans*) e da cana-de-açúcar (*Heterotermes* sp.), do gorgulho da cana-de-açúcar (*Metamasuis hemipterus*), da broca da bananeira (*Cosmopolites sordidus*) e da broca dos citrus (*Diploschema rotundicolle*), entre outros.

Diversos autores têm relatado a eficácia da utilização de *M. anisopliae* no controle de ácaros, principalmente dos gêneros *Boophilus*, *Ripicephalus*, *Amblyoma*, *Ixodes*, e sarnas dos gêneros *Psorites* e *Varroa* (7-9).

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, lípases, 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 (15).

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 (6).

A produção de fungos entomopatogênicos representa uma etapa crítica e limitante no desenvolvimento de um programa de controle microbiano para uma determinada praga. A pesquisa de novas metodologias de sistemas de produção é muito

importante para tornar o controle microbiano de pragas economicamente viável para ser aplicado em grande escala (24).

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 (2, 27).

O arroz é o substrato mais utilizado para a produção de conídios. Isto se deve, provavelmente, à combinação de fatores como balanço nutricional, custo, ampla disponibilidade mundial, características físicas como tamanho e forma do grão, propriedades de hidratação e integridade estrutural mesmo após a colonização pelo fungo (1, 10).

Devido o elevado preço do arroz, o custeio do substrato para o fungo tem acarretado despesas crescentes aos produtores de conídios. Estudos têm sido realizados desde a década de 80 com o objetivo de avaliar substratos alternativos e mais baratos, incluindo substratos agroindustriais (3), promovendo uma tendência para a regionalização da produção (4).

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 substratos alternativos que, além de propriedades nutricionais importantes, possuem grande disponibilidade e baixo custo (10).

A algaroba pertence ao gênero *Prosopis* da família Leguminosae, subfamília Mimosoideae contendo 44 espécies. Árvore de grande porte, atingindo em alguns casos 20 metros de altura, mas também podem ser visto arbustos de tamanho médio. É um legume com elevados teores de açúcares e proteínas. Também possui alta capacidade de fixação de nitrogênio ao solo, muito relevante para ecossistemas como o semiárido nordestino. Diferentes espécies de *Prosopis*, mesmo crescendo próxima a água, podem se desenvolver em lugares secos, onde dificilmente outras plantas sobrevivam. Toleram e possuem crescimento rápido em solos salinos, ácidos e com baixa fertilidade. Esses aspectos foram importantes para sua adaptação quando introduzidas no Brasil, na região Nordeste, na localidade de Serra Talhada em Pernambuco, há quase 80 anos (11).

Possui alto teor de açúcares e fibras, mas precisamente a sacarose, como também proteínas e alguns minerais importantes para o desenvolvimento humano (19).

Devido as suas características adaptativas e propriedades, a algaroba pode ser um substrato alternativo para a produção de fungos entomopatogênicos.

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 (18, 24). Partindo dessas considerações, este estudo tem por objetivo analisar o potencial de utilização da fibra da algaroba na composição de meios de cultura sólidos para a produção de *M. anisopliae*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Linhagem fúngica: a linhagem de *Metarhizium anisopliae* foi gentilmente cedida pela Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE (Tabela 1).

Tabela 1. Origem da linhagem.

Nº do acesso	•URM 4920
Substrato	<i>Mahanarva posticata</i>
Origem geográfica	Usina Serra Grande – Maceió – AL
Ano de registro	2005

•URM - University Recife Mycologia. Fonte: Autor

Origem dos insetos: as formigas foram coletadas de formigueiros presentes na reserva de Mata Atlântica localizada na Universidade Federal da Paraíba (Tabela 2).

Tabela 2. Origem das formigas cortadeiras.

Descrição da coleta	<i>In situ</i>
Origem geográfica	Reserva de Mata Atlântica – João Pessoa/PB
Ano da coleta	2017

Fonte: Autor

Origem do substrato: foi utilizado a algaroba (fibra obtida após processo de prensagem das vagens) como substrato alternativo para crescimento de *M. anisopliae*. A algaroba foi coletada na Cidade Japi/RN (Região do Semiárido).

Prensagem da algaroba: as vagens de algaroba foram devidamente selecionadas, descartando as atacadas por fungos e insetos. Pesadas em uma balança eletrônica (Gural - modelo Esse - 15), carga máxima de 15 kg e mínima de 0,005 Kg. Em seguida, foram imergidas em uma solução de hipoclorito de sódio a 3 % durante 5 minutos, a remoção dos resíduos sanitizantes foi promovida pelo enxágue em água corrente. Após esse procedimento, foram hidratadas em água destilada aquecida a 65 ± 2 °C, na proporção de 1:1 m/v (1 kg de vagem para 1 L de água) durante 3 horas. Ao final desse processo, as vagens hidratadas foram submetidas à prensagem em prensa hidráulica manual a uma pressão de 50 Kgf/cm² (20).

Meio de manutenção da linhagem fúngica: ágar-Sabouraud-dextrose: 10 g de peptona de carne, 40 g dextrose, 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada. pH 5,6. As amostras foram repicadas em tubos de ensaio contendo meio ágar-Sabouraud-dextrose, onde a cultura foi mantida à temperatura ambiente durante 15 dias e em seguida, sob refrigeração à 4 °C.

Produção e viabilidade dos conídios: o fungo foi inoculado em meio de cultura para conidiogênese (esporulação) (Meio Completo - MC) (5). 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 adicionados aos conídios água destilada + 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.

Teste preliminar para ajustar a umidade do substrato para 70 %: o teste foi realizado para medir o volume de água destilada em 10 g do substrato, contidos em erlenmeyer de 250 mL. Os erlenmeyers foram autoclavados e, após resfriamento, foram feitas as pesagens. Em seguida, os erlenmeyers foram levados à estufa (80 °C) para secagem dos materiais até o peso constante. Posteriormente, foi realizada uma nova pesagem e, após a subtração da massa seca, foi calculado o volume de água adicionado a cada

substrato de forma a resultar numa umidade em torno de 70 % após a autoclavagem. O volume de líquido adicionado ao meio foi baseado na equação especificada abaixo:

$$m_{H2O} = \frac{m_s(x_2 - x_1)}{1 - x_2}$$

Sabendo que:

m_s = massa de substrato

X_1 = umidade inicial do substrato

X_2 = umidade desejada

Avaliação da produção de *Metarhizium anisopliae* na algaroba: o experimento foi realizado em erlernmeyer de 250 mL, contendo 10 g do substrato com umidade em torno de 70 %. Foram preparados três frascos do substrato. Foram inoculados 1×10^8 conídios/mL e em seguida os frascos foram incubados ($T = 29 \pm 1$ °C) e analisados durante 10 dias. Após esse período, foi adicionado 0,9 de água destilada + tween 80 a 0,01 % para se obter uma diluição final de 1:10 e coletado uma alíquota de 0,1 mL para realização da contagem dos conídios em câmara de Neubauer ao microscópio óptico (21).

Avaliação da viabilidade dos conídios: amostras dos conídios produzidos na algaroba foram tomadas e submetidas a diluições seriadas, até se obter uma concentração de 1×10^8 conídios/mL. Desta suspensão, inoculou-se, em triplicata, 100 mL em placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Ágar-Dextrose), que em seguida foram incubadas por 18 horas ($T = 29 \pm 1$ °C). Após esse período, foram realizadas as contagens em cada placa, de 200 a 300 conídios viáveis ou não, sob microscópio de luz (aumento de 400x) (21).

Bioensaio: para avaliação da atividade inseticida foram utilizadas 30 formigas cortadeiras, coletadas *in situ* com o auxílio de pinça entomológica e colocadas em frascos de vidro com tampa e trazidos para o laboratório. No laboratório foi realizada a esterilização com uma solução de hipoclorito a 1 %, por cerca de três segundos. Após a esterilização as formigas foram colocadas em contato com papel de filtro contendo água destilada autoclavada + tween (0,01 %) e uma suspensão de conídios (1×10^8 conídios mL⁻¹) por cerca de 24 h. Após 24h de contato, as formigas foram transferidas

individualmente para uma nova placa úmida, contendo uma dieta artificial (solução de mel 10 %), que era renovada a cada 48 h. Cada câmara úmida continha 10 formigas. As placas foram mantidas em temperatura ambiente e avaliadas a cada 24 h durante 10 dias. Os insetos mortos foram esterilizados superficialmente com álcool 70° GL e água destilada autoclavada e transferidos para novas câmaras, mantidas em iguais condições, visando à verificação da mortalidade. A colonização do fungo sobre os cadáveres das formigas foi avaliada durante 10 dias após a inoculação. O controle negativo foi utilizado água destilada autoclavada + tween (0,01 %) e mantendo-as nas mesmas condições citadas anteriormente (6).

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 (12).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção e viabilidade dos conídios

M. anisopliae demonstrou um bom crescimento e esporulação na fibra da algaroba (Figura 1). Resultado justificado em razão da alta concentração de açúcares e a presença de minerais importantes para o desenvolvimento celular. Esses resultados são similares ao encontrado por Guimarães (13). Seu estudo evidenciou a conidiogênese de *B. bassiana* na fibra da algaroba.



Figura 1. Aspecto macroscópico da colonização de *Metarhizium anisopliae* na fibra da algaroba. Fonte: Autor.

Para analisar a viabilidade dos conídios produzidos na fibra da algaroba, foi inoculado em placas de petri contendo meio ágar-Sabouraud-dextrose, conforme descrito na metodologia. Foi observado que após 72 h de inoculação, havia mais de 1000 conídios viáveis. Esses resultados demonstram a possibilidade de utilização da algaroba como substrato para crescimento celular e conidiogênese de fungos entomopatogênicos, em especial *M. anisopliae* (Figura 2).

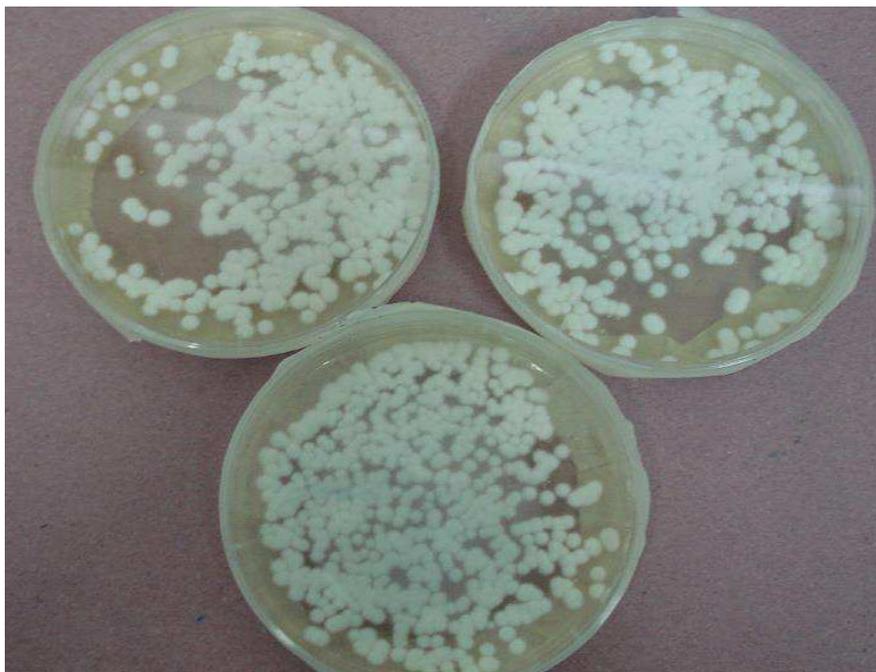


Figura 2. Análise da viabilidade dos conídios de *Metarhizium anisopliae* em meio ágar-Sabouraud-dextrose, dos conídios produzidos na fibra da algaroba. Fonte: Autor.

Avaliação da patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* sobre a formiga cortadeira

Os conídios de *M. anisopliae* produzidos na fibra da algaroba mostrou um efeito letal na concentração testada (1×10^8 conídios/mL). O controle biológico foi analisado utilizando a porcentagem de formigas mortas e colonizadas ao longo dos 10 dias de avaliação (Figuras 3 e 4). Foi observado que às 96 h mais 80 % das formigas estavam mortas. Para a comprovação da morte das formigas pelo fungo entomopatogênico, relacionamos os dados de morte com os de colonização do fungo na superfície do inseto. Foi observado a presença do fungo na superfície do inseto morto, a partir das 96 h. Às 144 h cerca de 60 % das formigas mortas haviam sido colonizadas pelo fungo, comprovando assim a morte por *M. anisopliae*. A mumificação completa de todas as formigas mortas foi observada no último dia do experimento. Após a mumificação, foi observado a esporulação do fungo sobre a cutícula da formiga. No grupo controle foi observado morte natural das formigas devido ao *stress* do ambiente, mas não foi observado a colonização do fungo.

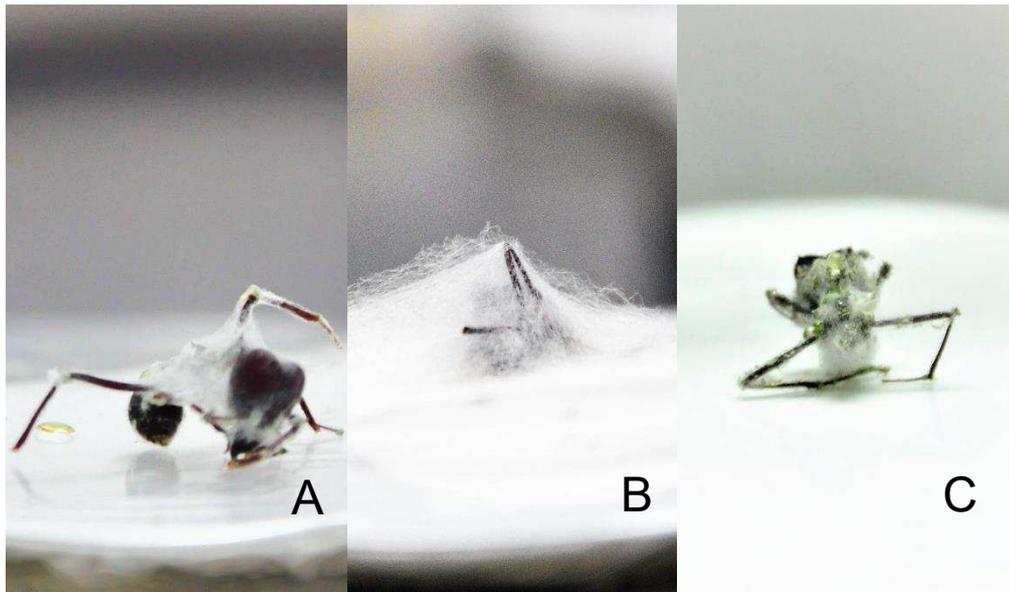


Figura 3. Cadáveres de formigas cortadeiras colonizadas pelo fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. (A) Colonização inicial – 96 h. (B) Colonização às 144 h (mumificação total). (C) Esporulação do fungo sobre a cutícula da formiga. Fonte: Autor.

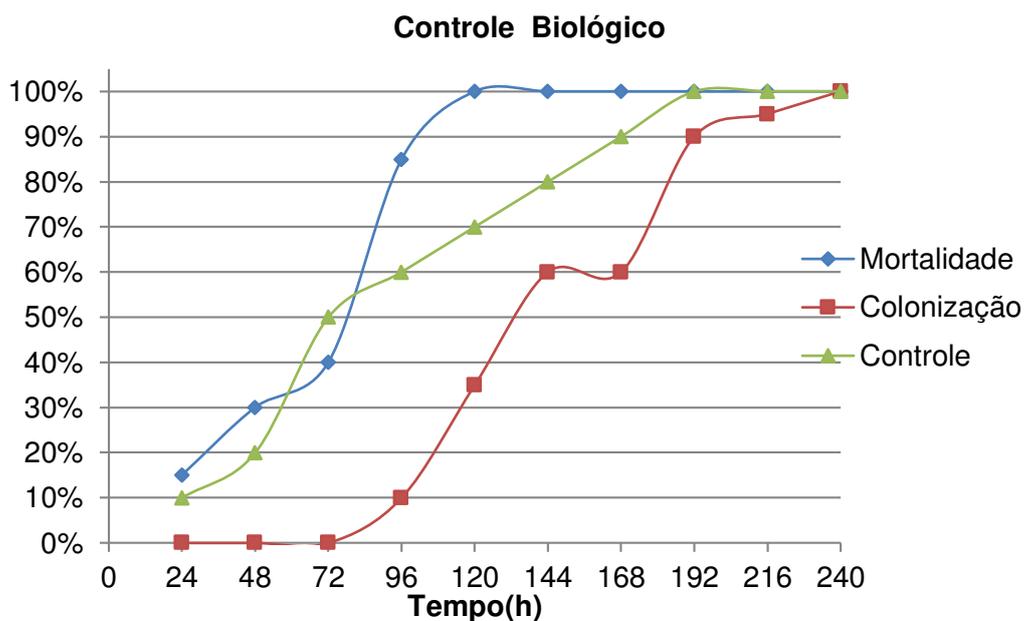


Figura 4. Análise da mortalidade das formigas do gênero *Atta* utilizando *Metarhizium anisopliae* para o controle biológico. Fonte: Autor.

Verificou-se que nos estágios iniciais, a infecção causou alterações fisiológicas como a diminuição dos movimentos, seguidos de paralisia (16). Esses dados confirmam os resultados obtidos por Vey et al. (26), onde os hospedeiros infectados [carrapato *Ixodes ricinus* (L.)] exibiam os primeiros sinais de colonização, que são: inquietação, perda de coordenação motora, parada de ingestão de alimentos e morte.

A virulência de *M. anisopliae* não foi afetada devido ao seu crescimento na fibra da algaroba após 10 dias de cultivo, sem nenhum suplemento nutricional. A capacidade de infecção, ocasionada inicialmente pela germinação dos conídios na cutícula do inseto, pode estar associada a fatores como patogenicidade (dimensões dos conídios, taxa de crescimento e atividades enzimáticas), virulência, especificidade e tolerância do hospedeiro (25).

4. CONCLUSÃO

Algaroba, sem nenhum suplemento nutricional, garantiu o crescimento de *M. anisopliae*; Os conídios produzidos na algaroba foram viáveis e apresentaram efeito letal na concentração testada; A taxa de mortalidade das formigas após infecção com os conídios produzidos na algaroba superaram 80% de mortalidade; A algaroba é indicada para produção de fungos entomopatogênicos por concentrar umidade e garantir a esporulação de *M. anisopliae*; A utilização desse substrato pode fornecer uma redução nos custos de produção de conídios de fungos entomopatogênicos utilizados no controle biológico de vários insetos-praga.

REFERÊNCIAS

1. Agostinetto D, Fleck NG, Rizzardi MA, Merotto Junior A, Vidal R A. Arroz vermelho: ecofisiologia e estratégias de controle. *Ciência Rural*. 2001; 31: 341-349.
2. Almeida JEM, Batista Filho A. Controle biológico da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar com o fungo *Metarhizium anisopliae*. *Boletim Técnico do Instituto Biológico*. 2006; 16: 1-19.
3. Alves LFA, Alves S, Capalbo DMF. Production of *Bacillus thuringiensis Berliner* var. *kurstaki* grown in alternative media. *Biocontrol Science and Technology*. 1997a; 7: 377-378.
4. Alves LFA, Alves SB, Pereira RM, Capalbo DMF. 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*. 1997b; 26: 379-382.

5. Alves SB. Fungos entomopatogênicos. In: Alves SB, editores. Controle microbiano de insetos. FEALQ, Piracicaba, 1998a. p. 145-174.
6. Alves SB. Fungos entomopatogênicos em controle microbiano de insetos. 1^a ed. Malone Ltda, Piracicaba; 1998b.
7. Benjamin MA, Zhioua E, Ostfeld RS. Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*. 2002; 39: 723-728.
8. Brooks AJ, Waal R. Infection of *Psoroptes mites* with the fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental and Applied Acarology*. 2001; 25: 869-880.
9. Da Costa GL, Sarquis MIM, De Moraes AML, Bittencourt VREP. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathologia*. 2002; 154: 207-209.
10. Dalla Santa HS, Dalla Santa OR, Brand D, Vandenberghe LPS, Soccol CR. Spore production of *Beauveria bassiana* from agroindustrial residues. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2005; 48: 51-60.
11. El Hag MG, Al Shargi KM, Eid AA. The nutrient composition of animal feeds available in the Sultanate of Oman. *Agriculture and Fisheries Research Bulletin*. 2000; 1: 1-14.
12. Ferreira DF. Sisvar: versão 4.3. 1^a ed. Lavras: DEX/UFLA, 2003.
13. Guimarães AGLP. Produção de conídios e enzimas hidrolíticas por *Beauveria bassiana* (Bals) vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) em diferentes substratos. [Tese]. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa; 2016.
14. Howart FG. Environmental impacts of classical biological control. *Annual Review in Entomology*. 1996; 36: 485-509.
15. Kershaw MJ, Moorhouse ER, Bateman R, Reynolds SE, Charnley AK. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1999; 74: 213-223.
16. Leal AT, Freitas DRJ, Vaz JS. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. *Acta Scientia e Veterinaria*. 2003; 31: 1-11.
17. Lord JD. From Metchnikoff to Monsanto and beyond the path of microbial control. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2005; 89: 19-29.
18. Macedo N, Macedo D. As pragas de maior incidência nos canaviais e seus controles. *Visão Agrícola*. 2004; 1: 38-46.
19. Pegado CMA et al. Efeitos da invasão biológica de algaroba-*Prosopis juliflora* (Sw.) DC. sobre a composição e a estrutura do estrato arbustivo-arbóreo da caatinga no Município de Monteiro, PB, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*. 2006; 20: 887-898.
20. Silva CG, Mata MERMC, Braga MED, Queiroz VS. Extração e fermentação do caldo de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC) para obtenção de aguardente, *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. 2003; 5: 51-56.

21. Sene L, Alves LFA, Lobrigatte MFP, Thomazoni D. Produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* em meio sólido à base de resíduos agroindustriais. Arq. Inst. Biol. 2010; 7: 449-456.
22. Shah PA, Pell JK. Entomopathogenic fungi as biological control agents. Applied Microbiology and Biotechnology. 2003; 61: 413-423.
23. Sturmer AT, Luangsa-Ard JJ, Roberts DW. Estabilidade de proteases produzidas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. Científica, Ciências Biológicas. Saúde. 2003; 6: 85-88.
24. Tanzini MR. Controle do percevejo-de-renda-da-seringueira (*Leptopharsa heveae*) com fungos entomopatogênicos. [Tese] Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba; 2002.
25. Vargas LRR, Rossato M, Ribeiro RTT, Barros NM. Characterization of *Nomuraea rileyi* strains using polymorphic DNA, virulence and enzyme activity. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2003; 46: 13-18.
26. Vey A, Matha V, Dumas C. Effects of the mycotoxin e on insect haemocytes and on dynamics and efficiency of the multicellular immune reaction. Journal of Invertebrate Pathology. 2002; 80: 177-187.
27. Zimmermann G. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. Pesticide Science. 1993; 37: 375-379.