

**74087 - RESÍDUO DE MALTE E BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR:
SUBSTRATOS ALTERNATIVOS PARA PRODUÇÃO DO FUNGO
ENTOMOPATOGÊNICO *METARHIZIUM ANISOPLIAE* VAR. *ANISOPLIAE*
(DEUTEROMYCOTINA: HYPHOMYCETES)**

*Laísa Macedo Tavares*¹, *Nathália Souza Bezerra*², *Geisi Maria Henrique da Silva*³,
*Caroline Targino Alves da Silva*⁴, *Kristerson Reinaldo de Luna Freire*⁵, *Andréa Farias
de Almeida*⁶, *Adna Cristina Barbosa de Sousa*⁷

¹Graduanda 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

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: nathaliasouza_13@hotmail.com

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

⁴Graduanda do Curso de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba –
CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB,
58051-900, e-mail: carolinetargino.as@gmail.com

⁵Doutor e Professor de Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade
Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail:
kristerson@cbiotec.ufpb.br

⁶Doutora 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

⁷Doutora 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 no controle biológico de vários insetos-praga na agropecuária. Os custos de produção de seus conídios, em larga escala, no substrato padrão (arroz) 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). Após 10 dias de incubação, foi coletada uma alíquota de conídios de 1×10^8 conídios/mL 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 de 50 % nos custos de produção de *M. anisopliae*.

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

MALT RESIDUE AND SUGARCANE BAGASSE: ALTERNATIVE SUBSTRATES FOR THE PRODUCTION OF THE ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS *METARHIZIUM ANISOPLIAE* VAR. *ANISOPLIAE* (DEUTEROMYCOTINA: HYPHOMYCETES)

ABSTRACT: *Metarhizium anisopliae* is used in the biological control of several pest insects in agriculture. The production costs of its conidia, on a large scale, in the standard substrate (rice) currently used, affects the production process. Finding alternatives as a way of minimizing process costs has led to the need to ascertain the efficiency of alternative substrates. Therefore, our objective was to analyze the potential of agroindustrial residues for the production of *M. anisopliae* and to evaluate the viability of the conidia produced in cutter ants of the genus *Atta*. The experiment for conidia production was performed in erlernmeyer containing 30 g of the substrates and 0.3 µL of the conidial suspension (1×10^8 conidia/mL). After 10 days of incubation, an aliquot of conidia of 1×10^8 conidia/mL was collected and placed in a Petri dish containing moistened filter paper and the ants. An experiment was performed with three replicates, plus the control group. The viability of the conidia of *M. anisopliae* produced in the

different substrates was guaranteed by the mortality of the infected ants. The mean mortality rate from the conidia produced on the three substrates was 99.9% (rice), 96.4 (malt) and 77.9 (sugarcane bagasse). Considering the results obtained, the alternative substrates used (malt residues and sugarcane bagasse) for *M. anisopliae* growth have potential for conidiogenesis and consequently can provide a 50 % reduction in *M. anisopliae* production costs.

Keywords: Biological control; Entomopathogenic fungus; Agroindustrial residue.

1. INTRODUÇÃO

Metarhizium anisopliae (Metchnikoff) Sorokin é um importante agente microbiano utilizado no controle biológico de pragas. 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 (48, 51, 53).

Nos estados do Nordeste, *M. anisopliae* vem sendo utilizado com sucesso no controle biológico das cigarrinhas da cana-de-açúcar, *Mahanarva posticata* (Hemiptera: Cercopidae) (6). A ocorrência de altas populações de cigarrinhas é um problema sério a ser equacionado, tanto pelos enormes prejuízos econômicos que ocasiona, quanto pelas limitadas informações sobre os métodos de controle (38, 42). O controle biológico realizado por intermédio de agentes microbianos mostra-se uma alternativa relevante e viável (5, 37, 46).

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 (36, 38, 45).

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).

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 (9, 13, 14, 39). Apesar disso, a maioria dos trabalhos refere-se apenas a duas espécies de fungos: *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana* (50).

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 (34, 51).

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).

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 (19).

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).

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 (15).

Outros resíduos agroindustriais têm sido utilizados como meio de cultura alternativo para produção de conídios em meios sólidos, tais como: arroz vermelho (1); resíduos de mandioca e fécula (17) e melaço (19), dentre outros. Esses resíduos têm representado uma alternativa viável e mais barata para a produção de fungos entomopatogênicos. Diante dessas informações, o objetivo deste trabalho foi analisar o potencial de dois resíduos agroindustriais (resíduos de malte e bagaço de cana-de-açúcar) 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.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Linhagem fúngica: foi utilizada uma linhagem de *M. anisopliae* cedida pela Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE (Tabela 1).

Tabela 1. Origem da linhagem de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.

<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	
Número de acesso	*University Recife Mycologia (URM) 4920
Substrato	<i>Mahanarva posticata</i>
Origem geográfica	Usina Serra Grande – Maceió - AL
Ano de registro	2005

* Linhagem utilizada no controle biológico das cigarrinhas da cana-de-açúcar no norte, nordeste e sudeste. Fonte: Autor.

Origem das formigas: As formigas soldados (*Atta sexdens*) foram coletadas de saubeiro isento da aplicação de produtos fitossanitários, em área de reserva de mata atlântica pertencente à Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB. Essa espécie foi usada para o teste de viabilidade dos conídios produzidos nos dois resíduos agroindustriais. Esse inseto foi selecionado devido ao impacto que essa praga causa por atacar diversas culturas agrícolas, pastagens e os reflorestamentos, atuando sobre muitas espécies vegetais.

Origens dos substratos: foram utilizados três substratos especificados na Tabela 2.

Tabela 2. Origens dos substratos.

Substrato	Origem
Arroz polido (substrato padrão)	Produto comercializado
Resíduos de malte	Laboratório de Química Orgânica Aplicada CBIotec - UFPB (João Pessoa - PB)
Bagaço da cana-de-açúcar	Barraca de caldo-de-cana (Região metropolitana de João Pessoa - PB)

Fonte: Autor.

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 replicadas 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 de conídios: o fungo foi inoculado em meio de cultura para conidiogênese (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 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.

Teste preliminar para ajustar a umidade dos meios de cultura para 70 %: o teste foi realizado para medir o volume de água destilada em 30 g de cada 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 a massa 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 e x_2 = umidade desejada.

Avaliação da produção 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 e em seguida os frascos foram 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 viabilidade dos conídios: amostras dos conídios produzidos nos diferentes substratos 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) e 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 400×).

Avaliação da atividade inseticida – bioensaio: os exemplares de soldados 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 saúva soldados. Foi realizado um experimento com três repetições. Em cada repetição foram utilizadas 10 formigas saúva. As formigas foram mergulhadas subseqüentemente em solução de hipoclorito de sódio e água destilada esterilizada. Em seguida, os insetos foram colocados 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 os insetos em água destilada autoclavada e mantendo-os 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 (23).

3. 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. Alguns fatores ambientais como temperatura e umidade podem influenciar o crescimento e desenvolvimento do fungo. A variação da umidade nos diferentes substratos utilizados para o cultivo de *M. anisopliae* após 10 dias de incubação em temperatura ambiente ($T = 29 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) está descrita na Tabela 1.

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

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%¹		5,56	4,78

⁰Volume de água destilada necessária para se obter $70 \pm 10 \%$ de umidade em 30 g de substrato bruto. ¹Coefficiente de variação. Fonte: Autor.

A umidade dos substratos após inoculação com o fungo variou ao longo dos 10 dias de cultivo. 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 %; 68,99 %, respectivamente. Já o bagaço da cana-de-açúcar teve uma perda de umidade considerada, apresentando umidade final de 55,98 %.

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

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). Os resultados obtidos com os conídios produzidos no arroz evidenciaram mortalidade de todas as formigas às 96 horas 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 (Figura 1).

A taxa de mortalidade das formigas após infecção com os conídios produzidos nos substratos arroz e malte não diferiram estatisticamente superando 95 % de mortalidade, já a taxa de mortalidade das formigas após infecção com os conídios produzidos no substrato bagaço de cana-de-açúcar foi de aproximadamente 78 % (Tabela 2).

O arroz polido foi utilizado como padrão porque atualmente é o substrato mais empregado na produção para comercialização de conídios, devido a uma combinação de fatores como, características nutricionais, conservação da umidade, preço, ampla disponibilidade mundial e características físicas como tamanho e forma do grão (52).

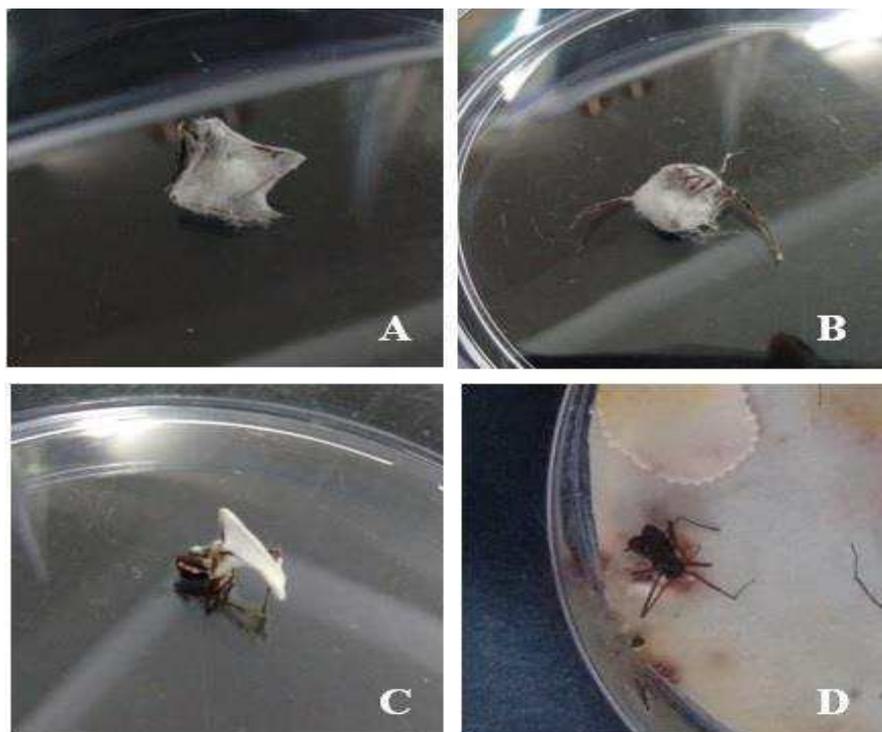


Figura 1. Infecção da formiga com *Metarhizium anisopliae*. Bioensaio realizado em água destilada autoclavada. Conídios produzidos no arroz (A), malte (B) e bagaço de cana-de-açúcar (C). Controle negativo (D). Fonte: Autor.

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

*Coeficiente de variação. Fonte: Autor.

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 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 ao longo dos 10 dias de incubação. 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 (16). 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 conferir defesa estrutural contra micro-organismos (22, 24).

Os resultados obtidos a partir do bioensaio mostraram que o isolado de *M. anisopliae* foi patogênico para as formigas cortadeiras. Foi observada a adesão e germinação dos conídios na superfície da cutícula da formiga, a partir das 72 h após a infecção. A colonização mais intensa só foi observada após 120 h. A partir deste período de infecção, foi observada a total mumificação da formiga (Figura 1). Não foi observado produção de conídios na colonização da formiga. Diante destes resultados, é possível inferir que o processo de infecção ainda não estava concluído, indicando que os nutrientes das formigas ainda não haviam se esgotado.

A taxa média de mortalidade de *M. anisopliae* produzido no resíduo de malte foi muito próxima da taxa média de mortalidade de *M. anisopliae* produzido no arroz. As duas ficaram acima de 95 %. A taxa média de mortalidade de *M. anisopliae* produzido no bagaço de cana-de-açúcar comparado com os outros substratos foi significativamente inferior, pouco mais de 75 %. Esses resultados podem ser justificados pelo baixo crescimento de *M. anisopliae* no substrato bagaço de cana-de-açúcar. Com base na análise estatística, as médias nos três substratos não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey, mas houve diferença significativa de mortalidade ao grupo controle.

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 micelial. Alguns autores sugerem que

a quantidade de conídios aplicada nos hospedeiros reflete na precocidade da mortalidade e da colonização. Segundo Fuxa e Tanada (27), 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 (25, 40, 49).

A composição da cutícula influencia na virulência dos fungos entomopatogênicos (47). O tegumento dos insetos é essencialmente composto por proteínas e quitina associadas com lipídios e compostos fenólicos (31), que possuem aldeídos presentes que podem inibir a germinação dos conídios de *M. anisopliae* e atrasar o desenvolvimento do tubo germinativo (11, 25, 49). Os sintomas de infecção inicialmente observados em nas formigas foram à diminuição dos movimentos, seguidos de paralisia (30, 31, 42). Esses dados são idênticos aos resultados obtidos por Garcia et al. (28), 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 (46, 47). 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 (32, 33, 48).

O malte e o bagaço da cana-de-açúcar podem representar um meio de cultura alternativo para a produção de conídios de *M. anisopliae*, visto que nestes meios de cultura, o fungo manteve elevada esporulação, sem perda da atividade inseticida. No entanto, fazem-se necessários estudos com outros isolados fúngicos e bioensaios com outros insetos.

Ressalta-se que os dois substratos brutos utilizados no presente estudo podem ser utilizados em grande escala, levando-se em consideração a importante redução do custo de produção de conídios de fungos entomopatogênicos e a sua disponibilidade na região Nordeste em todas as épocas do ano.

4. CONCLUSÃO

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; 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; *M. anisopliae* apresentou bom desenvolvimento e resposta aos experimentos realizados *in vitro*, apontando esta linhagem fúngica como um possível agente entomopatogênico a ser explorado para minimizar os danos ecotóxicos na produção animal e vegetal.

REFERÊNCIAS

1. Agostinetto D, Fleck NG, Rizzardi MA, Merotto Junior A, Vidal RA. 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*. 1ª ed. Malone Ltda, Piracicaba; 1998b.
7. Alves, S.B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: Alves SB, editores. *Controle Microbiano de Insetos*. Manole, São Paulo, 1998. p. 21-37.
8. Bell JV, Hamalle RJ. Three Fungi tested for control of the cowpea curculio, *Chalcodermus aeneus*. *J. Invertebr. Pathol.* 1970; 15: 477-450.
9. 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.
10. Bittencourt VREP, Souza EJ, Peralva SLFSE, Reis RCS. 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.* 1999; 21: 78-82.

11. Borges MSCM, Leal MS, Tigano-Milani MCC. 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. 1993; 22: 505-512.
12. Brady BL. Fungi as parasites of insectes and mites. Biocont. N. Informat. 1981; 2: 281-29.
13. Brooks AJ, Waal R. Infection of *Psoroptes mites* with the fungus *Metarhizium anisopliae*. Experimental and Applied Acarology. 2001; 25: 869-880.
14. 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.
15. Cabral Filho SLS. Avaliação do resíduo de cervejaria em dietas de ruminantes através de técnicas nucleares e correlatas. [Tese]. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo; 1999.
16. Carroll A, Somerville C. Cellulosic biofuels. Annual Review of Plant Biology. 2009; 60: 165-182.
17. Cereda MP. Caracterização, usos e tratamentos de resíduos da industrialização da mandioca. 1ª ed. Botucatu: Centro de Raízes Tropicais, Universidade Estadual Paulista, 1996.
18. Cuisance D, Barre N, Deken R. Ectoparasites of animals: methods of ecological, biological, genetic and mechanical control. Rev. Sci. Tech. 1994; 13: 1305-1356.
19. 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.
20. Drummond RO, Ernest SE, Trevino JL, Gladney WJ, Graham OH. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae): Laboratory tests of insecticides. J. Econ. Entomol. 1973; 66: 130-133.
21. Faria MR, Almeida DO, Magalhães BP. Food Consumption of *Rhammtocerus schistocercoides* Rehn (Orthoptera: Acrididae) Infected by the Fungus *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal. An. Soc. Entomol. Brasil. 1999; 28: 91-99.
22. Fernandez-Ruvalcaba M, Cruz-Vazquez C, Solano-Vergara J, 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. 1999; 23: 171-175.
23. Ferreira DF. Sisvar: versão 4.3. 1ª ed. Lavras: DEX/UFLA, 2003.
24. Herrmann KM. The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. Plant Physiology. 1995; 107: 7-12.
25. Frisch JE. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. I. J. Parasitol. 1999; 29: 57-71.

26. Fuxa JR. Ecological considerations for the use of entomopathogens in IPM. *Ann. Rev. Entomol.* 1987; 32: 225-251.
27. Fuxa JR, Tanada Y. Epidemiological concepts applied to insect pathology. In: Fuxa JR, Tanada Y, editors. *Epizootiology of Insect Diseases*. John Willy & Sons, New York. 1987. p. 3-22.
28. Garcia JFE, Ozaki LS. Perspectivas de controle imunológico de carrapatos parasitos de rebanhos bovinos. *A H. Vet.* 1993; 71: 9-12.
29. Goettel MS, Johnson DL, Inglis GD. The role of fungi in the control of grasshoppers. *Can. J. Bot.* 1995; 73: S71-S75.
30. Green PE, Connole DM. Screening of fungal metabolites for insecticidal activity against the sheep blowfly *Lucilia cuprina* and the cattle tick *Boophilus microplus*. *Gen. Appl. Entomol.* 1981; 13: 11-14.
31. Gronvold J, Henriksen SA, Larsen M, Nansen P, Wolstrup J. Aspects of biological control with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. *Vet. Parasitol.* 1996; 64: 47-64.
32. Hogsette JA. Management of ectoparasites with biological control organisms. *Int. J. Parasitol.* 1999; 29: 147- 151.
33. Horn SC. Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos. Inquérito. 1ª ed. Secretaria de Defesa Animal do Ministério da Agricultura, Brasília. 1983.
34. Howart FG. Environmental impacts of classical biological control. *Annual Review in Entomology.* 1996; 36: 485-509.
35. Khalaf-Allah SS. Control of *Boophilus microplus* ticks in cattle calves by immunization with a recombinant Bm86 glucoprotein antigen preparation. *DTW Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 1999; 106: 248-251.
36. 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.
37. Kunz SE, Kemp DH. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. *Rev. Sci. Tech.* 1994; 13: 1249-1286.
38. Leal AT, Freitas DRJ, Vaz JIS. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. *Acta Scientia e Veterinaria.* 2003; 31: 1-11.
39. Lord JD. From Metchnikoff to Monsanto and beyond the path of microbial control. *Journal of Invertebrate Pathology.* 2005; 89: 19-29.
40. Loureiro ES, Monteiro AC. Patogenicidade de isolados de três fungos entomopatogênicos a soldados de *Atta sexdens sexdens*. *R. Árvore.* 2005; 29: 553-561.
41. Luna AL. Características Citológicas e Genética de Linhagens Selvagens, Mutantes e Diplóides de *Metarhizium anisopliae* (Metsc) Sorokin. [Tese]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1985.

42. Macedo N, Macedo D. As pragas de maior incidência nos canaviais e seus controles. *Visão Agrícola*. 2004; 1: 38-46.
43. Melo IS. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: Mello IS, Azevedo JL, editores. *Controle biológico*. Jaguariúna: EMBRAPA. 1998. p. 264.
44. Monteiro AC, Fiorin AC, Correia ACB. Pathogenicity of isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin towards the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.) (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Rev. de Microbiol.* 1998; 29: 109-112.
45. Moreira MAB, Magalhães BP, Valadares MCC, Chags MCM. Occurrence of *Metarhizium favoviride* Gams and *Rozsypal* (Hyphomycetes) on *Schistocerca pallens* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae) in Rio Grande do Norte, Brasil. *An. Soc. Entomol.* 1996; 25: 359-361.
46. Nari A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. *Vet. Parasitol.* 1995; 57: 153-165.
47. Onofre SB, Vargas LRB, Rossato M, Barros NM, Boldo JT, Nunes ARF, Azevedo JL. Controle biológico de pragas na agropecuária por meio de fungos entomopatogênicos. In: Serafini LA, Barros NM, Azevedo JL, editores. *Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria*. Caxias do Sul: EDUCS. 2002. p. 433.
48. Shah PA, Pell JK. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003; 61: 413-423.
49. Sosa-Gómez DR, Moscardi F. Epizootiologia: chave dos problemas para o controle microbiano com fungos. In: *Simpósio de Controle Biológico*. Águas de Lindóia. Anais. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA. 1992. p. 64-69.
50. Sturmer AT, Luangsa-Ard JJ, Roberts DW. Estabilidade de proteases produzidas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. *Científica, Ciências Biológicas. Saúde*. 2003; 5: 85-88.
51. Tanzini MR. Controle do percevejo-de-renda-da-seringueira (*Leptopharsa heveae*) com fungos entomopatogênicos. [Tese]. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo; 2002.
52. Vilas Boas AM, Andrade RME, Oliveira JV. Diversificação de meios de cultura para a produção de fungos entomopatogênicos. *Arq. Biol. Tec.* 1996; 39: 123-128.
53. Zimmermann G. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potencial a as biocontrol agent. *Pesticide Science*. 1993; 37: 375-379.