UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Estudo de meios de cultura para o cultivo do fungo *Metarhizium anisopliae.*

Renata Pimentel da Silva

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia- MG
Abril- 2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Estudo de meios de cultura para o cultivo do fungo *Metarhizium anisopliae*.

Renata Pimentel da Silva

Prof°. Dr. Euclídes Honório de Araújo.

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia- MG
Abril- 2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Estudo de meios de cultura para o cultivo do fungo *Metarhizium anisopliae*.

Renata Pimentel da Silva

Aprovado Pela Banca Examinadora Em 24/4/02 Nota 9,0

Prof.° Dr. Euclides Honório de Araújo.

Prof.° Dr. Eloízio Júlio Ribeiro.

Prof.ª Angela Mª. A. H. Beicher.

Uberlândia, 24 de abril de 2002.

Resumo

Os fungos foram os primeiros patógenos de insetos utilizados no controle microbiano. Esses endopatógenos são estudados no Brasil há mais de sessenta anos, todavia, somente depois de 1964, com a ocorrência epzoótica de *Metarhizium anisopliae* em cigarrinhas da cana de açúcar, que os fungos receberam mais atenção. Aproximadamente, 80 % das doenças verificadas nos insetos tem como agentes etiológicos os fungos. Com técnicas apropriadas de bioensaios é possível selecionar isoladamente os fungos altamente virulentos, específicos ou não, com características adequadas para serem usados como inseticidas microbianos, visando o controle de grande número de pragas das culturas econômicas. Assim, o objetivo do presente trabalho foi estudar as melhores condições de cultivo do fungo filamentoso *Metarhizium anisopliae* com o propósito de maximizar sua concentração celular. Fatores de rendimento Célula/ Substrato foram conseguidos na ordem de 20 % através de um meio básico contendo glicose e outros micro-nutrientes comuns. Durante as fermentações foram acompanhados o pH, o crescimento da massa celular e o consumo de glicose. Os melhores resultados de crescimento foram conseguidos com meios numa concentração de glicose de 30 g/L. O pH final se estabilizou em torno de 4,0, mostrando uma acidificação durante a fermentação. Uma característica observada durante os experimentos realizados é a de que o *M. anisopliae* cresceu na forma de pellets durante as fermentações.

Palavras- chave: Fermentação, *Metarhizium,* Glicose.

Este singelo trabalho é dedicado às pessoas que renunciaram seus sonhos para a concretização dos meus: MEUS PAIS, Fábio e Neusa, meus verdadeiros heróis.

AGRADECIMENTOS

- Ao " MEU PAI" , Euclídes Honório de Araújo, pela oportunidade, pela paciência, compreensão, pela amizade e principalmente por estar presente em todos os meus passos, ensinando-me com os erros e vibrando com as minhas conquistas.
- À Roberta Fusconi, peça fundamental em minha formação, sem palavras...serei sua eterna aprendiz.
- Ao meu companheiro, Anderson Martins, que hoje é muito além de companheiro de pesquisa, é um grande amigo que a vida me presenteou.
- À Faculdade de Engenharia Química, pelo espaço, e principalmente pela recepção.
- À Zuleide e Roberta, pela atenção e por atender meus pedidos sempre sorrindo.
- À Profª. Angela Mª H. Beicher, por abrir as janelas que mostraram-me este mundo invisível.
- Ao Jefferson, Júlia, Manduca e Patrícia Angélica, pela "farra laboratorial", pelos ensinamentos e experiências compartilhadas, pela eterna lembrança que guardarei de vocês.
- À Fernanda e Cristian, pela dedicação em levar este trabalho a frente, conquistando novos rumos.
- Ao Prof. José Roberto, por socorrer-me com muito carinho em minhas tarefas.
- Às amigas Karynne e Rachel, que renunciaram algumas horas de descanso para fazer companhia nos finais de semana, e principalmente pelo apoio.
- Aos meus irmãos (Fabiana, Kamilla e Fábio) e amigos que souberam ouvir meus "lamentos" e o mais importante sempre depositaram confiança em meus sonhos.
- À todos que estiveram presentes nestes momentos, auxiliando com um sorriso, muito obrigada, isto foi e sempre será muito importante.

" Sonho que se sonha só,
é só um sonho que se sonha só.
Mas sonho que se sonha junto,
é realidade."
(Raul Seixas)

ÍNDICE

1- INTRODUÇÃO.....01
1.1- *Metarhizium anisopliae*.....01
1.2- Ciclo das relações Fungo- Hospedeiro.....02
1.3- Estruturas de Preservação do Fungo.....05
1.4- Produção de Enzimas.....05
1.5- Produção de Toxinas.....07
1.6- Produção de Fungos Entomopatôgenicos.....07

2- OBJETIVOS.....09

3- MATERIAL E MÉTODOS.....10
3.1- Microrganismo.....10
3.2- Meios de Cultura.....10
3.3- Preparação do Ágar.....11
3.4- Cultivo de *Metarhizium anisopliae*.....11
3.4.1- Pré- Cultura.....11
3.4.2- Testes de Cultivo.....12
3.4.3- Análises Químicas e Físicas.....12
3.4.4- Construção da Curva de Calibração.....13

4- RESULTADOS E DISCUSSÕES.....14
4.1- Ensaios em Mini Fermentador.....14
4.2- Ensaios em Incubadora com Agitação.....19

5- CONCLUSÕES.....20
5.1- Propostas para Futuros Trabalhos no Cultivo do *Metarhizium anisopliae*.....21

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....22

1-Introdução

Alguns fungos são patógenos de largo espectro. São capazes de atacar insetos aquáticos e fitófagos que vivem na parte aérea das plantas e no solo, podendo causar epizootias naturais. Podem infecctar diferentes estágios dos hospedeiros, como ovos, larvas, pupas e adultos, sendo esta característica desejável e muito peculiar deste grupo. Alguns são virulentos e a maioria é altamente especializada na penetração via tegumento, o que os coloca em vantagem quando comparados com outros grupos de patógenos que só entram no inseto por via oral (ALVES,1998).

Estima-se que sejam conhecidas 1 milhão de espécies de insetos, de um total de mais de 2,5 milhões que, provavelmente, ocorrem sobre a Terra. Desse total, cerca de 10% podem ser consideradas pragas da agricultura ou pragas urbanas (CADATAL et al, 1970).Mais de setecentas espécies de fungos já foram encontradas parasitando insetos ou mantendo com estes outros tipos de interações. E, de acordo com ALVES (1985), fungos podem ser específicos ou causar doenças em um grande número de hospedeiros, como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. Além do aspecto relacionado aos possíveis danos, devido à multiplicação dos fungos sobre certos hospedeiros, eles precisam ser estudados quanto à segurança das toxinas que podem produzir.

1.1- *Metarhizium anisopliae*

O Gênero *Metharizuim* está classificado dentro da Subdivisão Deuteromicotina, Classe Hifomicetos e na Família Moniliceae (HERREIRA &ULLOA, 1998); outros gêneros importantes representados na mesma classificação são: *Aspergillus, Paecilomyces* e *Beauveria*, todos podendo ter como hospedeiros os insetos (ALVES, 1983).

Os endopatógenos vem sendo estudados no Brasil há mais de sessenta anos, contudo foi somente a partir de meados dos anos sessenta, com a ocorrência epzoótica de *Metarhizium anisopliae* sobre as cigarrinhas da cana-de-açúcar, que os fungos receberam mais atenção dos pesquisadores (ALVES, 1995).

Em artigo recente FRAZÃO et al (2000) foi demonstrada a vantagem do *Metarhizium anisopliae* var. *Acridum* com relação a *Beauveria bassiana* em esporulações realizadas em cadáveres de gafanhotos.

Um programa muito conhecido de utilização do fungo no país é o controle da cigarrinha *Mahanarva posticata* em cana-de-açúcar com *M. anisopliae*. Em 1987, foram tratados 130.000 hectares de cana-de-açúcar com este patógeno. Mais recentemente a ESALQ-USP vem desenvolvendo e demonstrando a possibilidade de uso deste fungo no combate de carrapatos, pernilongos, baratas e pragas de grãos armazenados, conforme relatos de ALVES (1998).

1.2- O Ciclo das Relações Fungo-Hospedeiro

O ciclo das relações fungo-hospedeiro depende das condições ambientais, como: temperatura, umidade, luz, radiação ultra-violeta, assim como as condições nutricionais e suscetibilidade do hospedeiro , apresentando as seguintes fases:

A **adesão** representa um evento complexo, sendo o primeiro do ciclo das relações fungo-hospedeiro, que ocorre após a deposição do fungo sobre o inseto e visa a preparação do local para a fase de penetração.

Os deuteromicetos, de modo geral, podem entrar em contato com inseto, sendo levados passivamente pelos agentes de disseminação (BALFOUR-BOOWNE, 1960).

Os mecanismos envolvidos na adesão ainda não são totalmente conhecidos. Para alguns fungos, a adesão parece ser um processo simples, mas, para outros, esse fenômeno só pode ser explicado através de interações moleculares entre o patógeno e a superfície do hospedeiro que lhe servirá de alimento(ALVES, 1998).

Fungos como *Verticillium lecanii, Hirsutella thompsonii, Entomophthora muscae* (*Entomophthorales*) possuem determinados tipos de conídios envolvidos por uma substância transparente, mucilaginosa e aparentemente viscosa, que além de proteger contra a dessecação, facilita a adesão desses conídios à superfície do hospedeiro (VIÈGAS 1939, SAMSON et al.1980). O muco que envolve os conídios de *M. anisopliae* possui altos níveis de aminopeptidases, que podem criar condições favoráveis para a atuação das enzimas extracelulares(ST. LEGER et al. 1987).

Durante a **germinação**, encontrando condições favoráveis de umidade, temperatura, pH, oxigênio e nutrição, o fungo germina sobre o inseto, produzindo um tubo germinativo (a germinação bipolar pode ocorrer em *Verticillium* e outros). As condições ótimas para germinação dependem da espécie e da origem dos isolados. De modo geral, para os deuteromicetos, em condições de laboratório, a germinação pode ocorrer no mínimo em 12 horas, a uma temperatura de 23 a 30°C e umidade relativa acima de 90%. Para os Entomophthorales, o processo é mais rápido e ocorre em aproximadamente 6 horas entre 20 e 28°C. Os fungos mais específicos também possuem condições especiais para o processo de germinação. Assim, isolados de *M. anisopliae* específicos para escarabeídeos necessitam de elevados níveis de nutrientes nitrogenados para germinação(ST. LEGER et al. 1991).

Na extremidade do tubo germinativo ocorre uma dilatação das hifas, formando uma estrutura denominada **apressório.** Ocorre, nesta fase, a migração do conteúdo citoplasmático para o tubo germinativo, transformando este local em um centro de elevada atividade metabólica que se caracteriza pela presença de mitocôndrias, ribossomos e outros componentes nucleares. Essa estrutura ocorre em *Beauveria, Metarhizium, Erynia, Neozygites*, mas pode também se formar de modo característico em determinadas

condições. Para *N. rileyi* e outros fungos que normalmente não produzem apressório, pode-se formar uma massa mucilaginosa ao redor do tubo germinativo, a qual também pode ocorrer uma reunião de várias hifas, dando origem a uma estrutura apressorial que tem ação na penetração do fungo(ALVES, 1998).

A formação de **grampo de penetração** ocorre na parte inferior do apressório pode ocorrer uma diferenciação da hifa, tornando-a mais fina e saliente, a qual teria a função de iniciar o processo de penetração da epicutícula e procutícula do tegumento do inseto. Nem todos os fungos apresentam essa estrutura muito característica.

Na **penetração** estão envolvidos dois processos principais, o físico, devido à pressão da hifa terminal que rompe as áreas membranosas ou esclerosadas, e o químico, resultante da elaboração de enzimas (proteases, lipases e quitinases), as quais facilitam a penetração mecânica do fungo e o metabolismo do tubo germinativo. Na área da procutícula, ao redor do local de penetração, aparecem sintomas de histólise (decomposição do tecido por ação enzimática). Algumas enzimas podem estar correlacionadas com a agressividade de certos fungos para determinados hospedeiros, porém a morte do inseto é ocasionada por uma série complexa de eventos, o que dificulta o estudo dessa correlação (BOUCIAS, et al 1988).

O aparelho bucal, espiráculos, ânus, sifão respiratório e tarsos são locais de penetração, porém as membranas intersegmentais do abdome são tidas como a porta de entrada mais comum para os fungos em geral. Segundo WRAIGHT et al. (1990), apenas 3% das penetrações de *Z. radicans* ocorrem na cabeça de *E. fabae*, 16% no tórax e 74% no abdome, sendo que, deste último percentual, 61% dos conídios estão localizados nas membranas intersegmentais.

A penetração via oral pode ocorrer, para alguns fungos, em pernilongos. Esta via de penetração também é utilizada por *M. anisopliae em Schistocerca gregaia, N. rileyi em A. gemmatalis, B. bassiana* em operárias grandes de *Solenopsis spp.* E outros. No entanto, alguns insetos, como as operárias pequenas de *S. invicta*, possuem estruturas no tubo digestivo capazes de filtrar os conídios de determinados fungos (SIEBENEICHER et al.1992).

A partir da penetração inicia-se o processo de **colonização** do hospedeiro pelo fungo. A hifa que penetra sofre um engrossamento e se ramifica inicialmente no tegumento do inseto e posteriormente na hemocele. A partir deste estágio, visando uma possível proteção contra o sistema de defesa do inseto (encapsulação), são formadas estruturas como protoplastos, no caso de Entomophthorales (*Entomophthora*), blastósporos e outros corpos hifais. Normalmente não ocorre grande crescimento hifal dentro do inseto antes da sua morte. No inseto morto, o fungo cresce interiormente e todos os tecidos são penetrados por hifas filamentosas. Não ocorre a desintegração dos tecidos por microrganismos saprófitas que vivem dentro e sobre o inseto, porque o patógeno secreta substâncias antibióticas, como a oosporina, responsável pela coloração rosa dos cadáveres. A colonização dos diversos órgãos apresenta, provavelmente, a seguinte seqüência: corpos gordurosos, sistema digestivo e tubos de Malpighi, hipoderme e sistema nervoso, músculos e traquéias. Durante o processo de colonização, os fungos secretam toxinas que podem afetar as células e as reações do hospedeiro. Também, durante esse estágio, os hospedeiros desencadeiam na hemocele as suas reações celulares e humorais de defesa contra a presença do fungo, tais como encapsulação, nodulação e outras (HERREIRA,et al 1998).

O tempo para colonização pode variar de 72 a 120 horas, dependendo do inseto, patógeno e das condições ambientais.

A **reprodução** dos fungos pode ser por processo assexual e sexual. Assim, a reprodução assexual (estágio anamorfo) pode ocorrer por diversos tipos de estruturas ou propágulos, tais como os zoósporos móveis que possuem um ou dois flagelos, como em Mastigomycotina (*Coelomomyces* etc). Os conídios e aplanósporos são propágulos assexuais que não possuem motilidade e assim são disseminados pelo vento, chuva. Esses conídeos ocorrem em Zygomycotina (Entomophthorales), sendo ejetados dos esporângios. Os Entomophthorales também podem produzir os azigósporos ou clamidósporos que são de origem assexual e têm grande quantidade de reservas, paredes espessas, sendo responsáveis pela preservação do fungo no solo. Os conídios assexuais são os principais propágulos de Deuteromycotina (*Beauveria, Metarhizium, Nomuraea* etc.), aparecendo em Basidiomycotina (*Septobasidium, Uredinella* etc.).

Os sintomas iniciais da doença podem aparecer como manchas escuras nas pernas, regiões intersegmentais ou distribuídas por todo o tegumento. O inseto cessa a alimentação, tornando-se fraco, apresenta sintomas de paralisia, perde a coordenação dos movimentos e fica desorientado. Posteriormente, o tegumento torna-se róseo (no caso de *B. bassiana* e *M. anisopliae* infectando lagartas), para depois o inseto assumir coloração esbranquiçada, devido ao crescimento do micélio (HERLICH, et al 1975).

Após a morte do inseto, que ocorre entre dois a oito dias após a inoculação (alguns insetos, como os cupins, baratas etc., quando submetidos a elevado potencial de inóculo podem morrer em um período de 12 a 24 horas), as hifas começam a emergir pelos espiráculos e usando pressão mecânica saem através das áreas mais fracas (região intersegmentar) e depois pela cutícula mais grossa. O micélio cobre toda a superfície do corpo, iniciando pelos espiráculos e áreas intersegmentais. Associado ao crescimento micelial ocorre, sob condições de temperatura e umidade favoráveis, a esporulação ou conidiogênese do fungo, que pode ser reconhecida por uma formação pulverulenta que recobre todo o corpo do inseto. A produção de conídios ocorre 24 a 48 horas após a emergência das hifas sob condições de elevada umidade e temperatura, na faixa de 20 a 30 °C, dependendo do patógeno. A conidiogênese em *Erynia*, por exemplo, ocorre cerca de 6 horas após a colonização. A curva de esporulação depende da umidade, temperatura, espécie de inseto, raça do fungo e das condições de tempo. Segundo SOSA-GÓMEZ (1990), quando o hospedeiro é *D. saccharalis* e as condições de umidade relativa são ótimas, a maior produção de conídios acontece entre o quarto e o sétimo dia após a morte do inseto.

A morte ocorre devido à produção de micotoxinas, mudanças patológicas na hemocele, ação histolítica, bloqueio mecânico do aparelho digestivo devido ao crescimento do micélio e do início do processo de esporulação do fungo (LEUCONA, 1986). O cadáver apresenta, nessa fase, colorações variáveis conforme a espécie de fungo envolvida na doença. Assim, em condições de campo, essa característica pode auxiliar na identificação do fungo envolvido no ataque (Tabela 1), porém exames microscópicos são indispensáveis para o diagnóstico correto dos agentes.

Tabela –1 Alguns sintomas apresentados por insetos em decorrência de ataque de alguns fungos entomopatogênicos

Grupo de insetos	Sinais ou coloração	Fungo
Cigarrinhas, lagartas e percevejos	Verde, verde – oliva ou verde acinzentado	*Metarhizium*

Lagartas da soja, algodão e da cana de açúcar	Verde – claro	*Nomuraea*
Moscas, ácaros e pulgões	Amarelo escuro ou esverdeado	*Aspergillus*

A **disseminação do fungo** ocorre após a formação dos propágulos infectivos, estes se dispersam pelo ambiente , auxiliados pelos fatores bióticos a abióticos, tais como o vento, chuva, homem, animais. Também o hospedeiro moribundo pode concorrer para a disseminação dos fungos (SMITH, et al 1981).

1.3- Estruturas de Preservação do Fungo

Os Entomophthorales, após a morte do inseto, podem ser preservados dentro do cadáver na forma de clamidósporos. Essas estruturas, como já foi referido, são as principais responsáveis pela preservação dos fungos no solo, podendo resistir sob temperaturas baixas e altas (80 a 100°C). Também, microescleródios formados pela reunião compacta de hifas podem ser encontrados. Essas estruturas já foram observadas em *M. anisopliae* em condições de laboratório (ALVES,1998). O fungo *N. rileyi* também pode produzir, dentro de cadáveres, hifas de paredes espessas e esporos de repouso, além de clamidósporos aéreos (PENDLAND, 1982).

São comuns os sinêmios que crescem ao lado de cadáveres de insetos atacados por fungos. As hifas externas dessas estruturas protegem as internas dos fatores do tempo. São também consideradas estruturas de resistência de fungos os ascocarpos de alguns ascomicetos.

1.4- Produção de Enzimas

As enzimas atuam no processo de penetração dos fungos, inclusive na fase de adesão, antes mesmo da germinação dos conídios. São liberadas pelo tubo germinativo, o qual tem fundamental importância na produção dessas enzimas, que degradam a cutícula dos insetos, favorecendo o processo nutricional entre o fungo e o hospedeiro. As proteases, além de estarem envolvidas nos processos de formação e germinação dos esporos, têm funções nutricionais importantes, sendo capazes de hidrolisar as cadeias polipeptídicas em moléculas menores, que são absorvidas pelas células.

De outro lado, as lipases são responsáveis pelo fracionamento dos lipídeos (óleos e gorduras) existentes na superfície dos insetos, para posterior metabolização pelos microrganismos. Os alcanos da camada de lipídios da epicutícula podem ser utilizados como fonte de nutrientes para os estágios iniciais de desenvolvimento de *M. anisopliae* (ST. LEGEER, 1988). As quitinases, por sua vez, promovem a hidrólise da quitina dos insetos, a qual é feita por um sistema quitinolítico que envolve duas hidrolases (quitina e quitobiase) que atuam seqüencialmente.

A produção de enzimas por esses patógenos tem sido estudada com várias finalidades, sendo uma delas a de correlacioná-la com os processos de especificidade, patogenicidade e virulência. Apesar da importância das enzimas no processo doença, torna-se difícil correlacionar produção em meios artificiais com virulência dos fungos, já que a

morte do inseto ocorre em função de uma complexa seqüência de eventos, porém trabalhos têm sido realizados com essa finalidade.

PARIS & SEGRETAIN (1978) relataram que a virulência de *B. bassiana* estava relacionada à produção de lipase, o que facilitaria a seleção das raças com essa característica. A incapacidade de produção de quitinase e lipase por *B. brongniartii* pode estar correlacionada com a incapacidade desse patógeno de infectar *Melohotha melolontha* (PARIS & FERRON, 1979). ROBINSON (1966) estudou o processo de penetração dos fungos *Aspergillus flavus, B. bassiana, M. anisopliae, P. farinosus e Cordyceps militaris,* através do tegumentos de *Tenebrio molitor,* comparando com outros fungos não-patogênicos e que não penetram a exocutícula. O autor atribuiu a capacidade de produção de enzimas quitinolíticas ou proteolíticas à eficiência de penetração, embora estejam envolvidos no processo aspectos de ordem mecânica, como pressão de hifas exercida mediante a ação dos apressórios.

Já se verificou, através de estudos específicos, a produção de esterases e N-acetilglucosaminase no processo de penetração das hifas de *M. anisopliae* no tegumento de Oryctes rhinocerus (RATAULT & VEY, 1977). Por outro lado, AL-AIDOOS & SEIFERT (1980) demonstram que um mutante de *M. anisopilae* possuía a habilidade de degradar amido, e crescia sobre meios de cultura contendo essa substância, comportava-se de forma altamente virulenta para o pernilongo *Culex pipiens*, em testes de laboratório. Os mutantes virulentos de *M. anisopliae* estão correlacionados com altas produções de proteases (quimoelastases), as quais causam a lise das proteínas do tegumento, agilizando o processo de penetração do fungo (ST. LEGEER, et al.1988).Entretanto, elevada atividade lipolítica foi observada nos isolados mais virulentos de *M. anisopliae*, provenientes de diversas regiões do Brasil, segundo SOSA-GÓMEZ & ALVES (1983). Esse fungo, dependendo dos isolados, produz diferentes níveis das seguintes enzimas extracelulares: endoproteases, aminopeptidases, carboxipeptidases, lipases, esterases, quitinases e N-acetilglicoaminases, havendo também variações na seqüência temporal das produções enzímicas (ST. LEGEER et al.1986).

Tem sido constatada a variabilidade intra-específica no sistema de esterases dos fungos *M. anisopliae e B. bassiana,* quando submetidos e eletroforese, a qual vem sendo utilizada como um parâmetro para caracterização de raças desse patógenos (CONTI et al. 1980. ROSATO et al. 1981, ALVES 1982, SOSA-GÓMEZ & ALVES 1983, SOSA-GÓMEZ, 1990).

Uma aplicação prática no uso de enzimas foi conseguida recentemente no Boyce Thompson Institute localizado em Ithaca, EUA, que, usando técnica de engenharia genética, introduziu em M. anisopliae um gene que controla a degradação da cutícula (Prl-protease), conseguindo induzir em 25% o tempo letal de larvas de lepidópteros através da indução do processo de melanização.

1.5- Produção de Toxinas

Os fungos entomopatogênicos possuem a capacidade de sintetizar toxinas que são utilizadas no ciclo das relações patógeno-hospedeiro.

Segundo ROBERTS (1981), as toxinas dos fungos são estudadas com os seguintes objetivos: a) elucidar o modo de ação do fungo sobre o inseto; b) procurar novos produtos

químicos para o controle de pragas; c) avaliar a segurança de fungos promissores para o controle de pragas; d) estudos químicos de base em produtos naturais. É também possível selecionar isolados de fungos, altamente toxicogênicos, para serem utilizados no controle microbiano de insetos-pragas. Esse isolados provavelmente existem nas populações naturais de fungos entomopatogênicos, os quais apresentam grande variabilidade genética. Por outro lado, as espécies de fungos no controle microbiano podem ser melhoradas geneticamente, com relação a esse caráter.

Outro aspecto a ser explorado futuramente, é a utilização de metabólitos tóxicos de fungos, com eficácia sobre insetos e de baixa toxicidade para o homem. As vantagens seriam o seu baixo período de carência, em condições de campo (biodegradabilidade), além da facilidade de aplicação (PATRICK, et al 1993).

São conhecidas toxinas produzidas por diversas espécies de fungos (Tabela 2). A beauvericina é produzida por *B. bassiana* e as destruxinas são encontradas em *M. anisopliae,* porém ainda não existe no mercado um produto comercial baseado em toxinas de fungos entomopatogênicos.

Tabela 2 - Algumas toxinas produzidas por fungos entomopatógenos

Fungos	Toxinas	Ação tóxica sobre
B. bassiana	Beauvericina	Larvas de pernilongos e moscas adultas
P. fumosoroseus	Beauvericina	Larvas de pernilongos e moscas adultas
B. bassiana e B. brongniartii	Beauverolides	Baratas

De acordo com TAMELER (1998), a produção do alcalóide swainsonine depende dos efeitos do pH durante o processo de fermentação, e este ainda interfere na concentração de biomassa .

1.6- Produção de Fungos Entomopatogênicos

Os fungos, para serem utilizados no controle microbiano de insetos como inseticidas biológicos, precisam estar disponíveis em grandes quantidades. Isso se deve ao fato de insetos normalmente necessitarem de um elevado potencial de inóculo para serem colonizados por esses patógenos (ALVES & PEREIRA, 1998).

A produção de qualquer agente de controle biológico deve levar em consideração a formulação final do produto. Isso porque a formulação, que deve ser encarada como etapa final do desenvolvimento do produto microbiano, vai depender de vários aspectos da fase de cultivo dos patógenos, como, por exemplo: a) o tipo de propágulo produzido; b) certos tratamentos dados aos microrganismos durante a produção; c) materiais adequados para o uso no meio de cultura; d) separação dos propágulos do meio de cultura; e) outros aspectos próprios de cada patógeno e formulação (ALVES, 1998).

2– Objetivos

Este trabalho apresenta como principais objetivos:

2.1 –Verificar a influência de diferentes concentrações de glicose na produção de massa celular de *Metarhizium anisopliae*;

2.2 – Testar diferentes condições operacionais durante as fermentações, definindo as melhores para seu cultivo;

3- Material e Métodos

3.1 – Microrganismo

O fungo filamentoso *Metarhizium anisopliae* (n°- 3220) foi obtido pela coleção de culturas Tropicais da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello, de Campinas, S.P., na forma liofilizada.

3.2-Meios de Cultura

a) Ágar Sabouraud Dextrosado (g/L):

Peptona de Carne (5,0 g/L), Glucose (20,0 g/L), Ágar (15,0 g/L).

b) Meio de Glicose 1:

Glicose (50,0 g/L), Extrato de Malte (15,0 g/L), Extrato de Levedura (15,0 g/L), Sulfato de Amônio (25,0 g/L), Fosfato de Potássio (25,0 g/L).

c) Meio de Glicose 2:

Glicose (40,0 g/L), Extrato de Malte (1,0 g/L), Extrato de Levedura (1,0 g/L), Sulfato de Amônio (5,0 g/L), Fosfato de Potássio (4,0 g/L).

d) Meio de Glicose 3:

Glicose (50,0 g/L), Extrato de Malte (15,0 g/L), Extrato de Levedura (7,5 g/L), Sulfato de Amônio (25,0 g/L), Fosfato de Potássio (25,0 g/L), Aveia em Flocos (40,0 g/L).

e) Meio de Glicose 4:

Glicose (20,0 g/L), Extrato de Malte (1,0 g/L), Extrato de Levedura (0,1 g/L), Sulfato de Amônio (5,0 g/L), Fosfato de Potássio (3,5 g/L), Aveia em Flocos (10,0 g/L).

f) Meio de Glicose 5:

Glicose (30,0 g/L), Extrato de Malte (1,0 g/L), Extrato de Levedura (1,0 g/L), Sulfato de Amônio (5,0 g/L), Fosfato de Potássio (4,0 g/L).

g) Meio de Glicose 6:

Glicose (20,0 g/L), Extrato de Malte (1,0 g/L), Extrato de Levedura (1,0 g/L), Sulfato de Amônio (5 g/L), Fosfato de Potássio (4,0 g/L).

Os meios foram preparados adicionando-se 1000 mL de água destilada. Com exceção dos meios 3 e 4 que tiveram de ser filtrados.
Após a homogeneização destas substâncias, foram esterelizados em autoclave por 20 minutos a 121° C sobre pressão de 1 kgf/cm².
As diferenças nas concentrações de substratos presentes nos meios acima relacionados foram baseados em literaturas do cultivo de *Aspergillus* sp.

3.3-Preparação do Ágar

A cepa do fungo *Metarhizium anisopliae* foi aberto e suspenso em aproximadamente 3 mL de água destilada e esterelizada. Em seguida com o auxílio de uma pipeta foi efetuada a inoculação em tubos de ensaio previamente autoclavados e tampados com chumaço de algodão, contendo 10 mL de Ágar Sabouraud Dextrosado da marca Biobrás, o qual foi solidificado com os tubos inclinados para aumentar a área superficial, sendo todo o procedimento descrito acima realizado em câmara de fluxo laminar.

Após esta primeira etapa o microrganismo sempre foi mantido em estoque e ativo, para tanto foram feitos repiques a cada 2 meses. Para a realização do repique, um tubo de ensaio contendo o fungo em cultura pura foi aberto e suspenso em água destilada e esterelizada. Com o auxílio de uma alça de platina previamente flambada raspou-se levemente a superfície, posteriormente com o uso de uma pipeta graduada, transferiu-se cerca de 0,5 mL desta suspensão para outros tubos de ensaio contendo também 10 mL de Ágar Sabouraud Dextrosado, solidificado na posição inclinada, e autoclavados, sendo os mesmos tampados com chumaço de algodão. Tal procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar.

Os tubos inoculados foram colocados em temperatura ambiente por 48 horas para verificar o sucesso da inoculação e observar se houve contaminação do meio de cultura por outro microrganismo. Após esta etapa, os tubos de ensaio contendo a cultura pura foram

mantidos em uma câmara fria (5° C) para diminuir o metabolismo do fungo, e mantidos até futura necessidade de uso (FERREIRA, 2000).

3.3- Cultivo de *Metarhizium anisopliae*

3.3.1- Pré- Cultura

No preparo da pré- cultura, o meio utilizado foi o de glicose 6, distribuído em erlenmeyers, contendo 100ml em cada. O inóculo consistia na raspagem dos esporos com o auxílio de uma alça de platina, obtidos dos tubos de ensaio contendo cultura pura. Posteriormente este meio era levado para a incubadora com agitação durante 72 horas.

Para a inoculação em meio líquido é necessário conhecer-se a quantidade de esporos, expressa em esporos/mL. Isto foi realizado com o auxílio de uma câmara de Neubauer, da Optik Labor, com profundidade de 0,1 mm e área do menor quadrado de 0,0025 mm^2, possuindo portanto um volume de 0,0025 mm^3 que é uma lâmina para microscópio onde há divisões quadriculares com volume conhecido, onde é possível contar os esporos presentes.

A partir da solução filtrada, retira-se uma amostra com auxílio de uma pipeta Pasteur colocando-a na câmara de Neubauer. Em seguida, com o auxílio de um microscópio com objetiva de 40X conta-se a quantidade de esporos presentes em 5 quadros aleatórios com volume conhecido de cada quadro de 4.10^{-4} mL e em seguida fez o cálculo da média do número de células contadas (RIBEIRO & SOARES, 1993).

3.3.2- Testes de Cultivo

a) Em Mini fermentador

Para a análise da influência das diferentes concentrações de glicose no crescimento do fungo *Metarhizium anisopliae* em mini fermentador com condições operacionais de 30° C de temperatura, 400 rpm de agitação, foram utilizados os meios de glicose 1,2,3,4,5 e 6.

As retiradas das amostras foram realizadas a cada 24 horas, onde eram feitos as análises de massa seca (item 3.3.3 a) e açúcares redutores (item 3.3.3 b).

b) Em Incubadora com Agitação:

Os ensaios realizados na incubadora com agitação, foram mantidos em elernmeyers com um volume total de 110 mL de inóculo, durante 96 horas a uma temperatura de 30°C e agitação constante de 150 rpm. Para estes experimentos, utilizou-se os meios de glicose 1, 5 e 6, efetuando as análises para massa seca e açúcares redutores a cada 24 horas.

3.3.3- Análises Físicas e Químicas

a) Massa Seca

1- Filtração- A massa seca foi determinada filtrando-se o material retirado com o auxílio de uma bomba a vácuo, com papel filtro de faixa branca de 9 cm de diâmetro, previamente pesado.

A massa filtrada juntamente com o papel foi colocada na estufa na temperatura de 30°C por um período de 24 horas para eliminar a umidade presente. A seguir era feita uma nova pesagem dos papéis de filtro, agora contendo a massa filtrada, e a massa seca foi obtida por diferença da massa líquida do papel. A pesagem foi feita em balança analítica com precisão de 4 casas decimais.

2- Centrífugação- utiliza-se a centrífugação por um intervalo de 5 minutos, numa temperatura de 15°C a uma velocidade de 15000 rpm em centrífuga automática, ao final da centrifugação, retirava-se a massa e colocava em um papel de filtro na estufa na temperatura de 30°C por 24 horas.

b) Açúcares Redutores

A determinação da concentração dos açúcares no meio foi feito pelo método do DNS (MILLER, 1959). Este método dosa a concentração de açúcares redutores.

3.3.4- Construção da Curva de Calibração

Para a obtenção das concentrações de Glicose foi construída uma curva de calibração para a glicose, com valores de concentração em função da transmitância obtida pela leitura no espectrofotômetro.

Para a construção desta curva foram preparadas soluções de concentrações conhecidas de glicose em 10 balões volumétricos de 100 mL cada, com concentrações na faixa de 0,1 a 1,0 g/L.O método utilizado para a construção da curva foi o DNS.

A Tabela 3 apresenta os valores de concentração e transmitância usados na construção da curva de calibração, a Figura 1 mostra a curva obtida juntamente com a equação empírica ajustada e sua correlação.

Tabela 3 – Dados para a construção da curva de calibração da glicose

CONCENTRAÇÃO (G/L)	TRANSMITÂCIA (%)
0,1	97,0
0,2	91,2
0,3	85,0
0,4	80,3
0,5	73,9
0,6	69,1
0,7	64,7
0,8	58,3
0,9	55,9
1,0	51,8

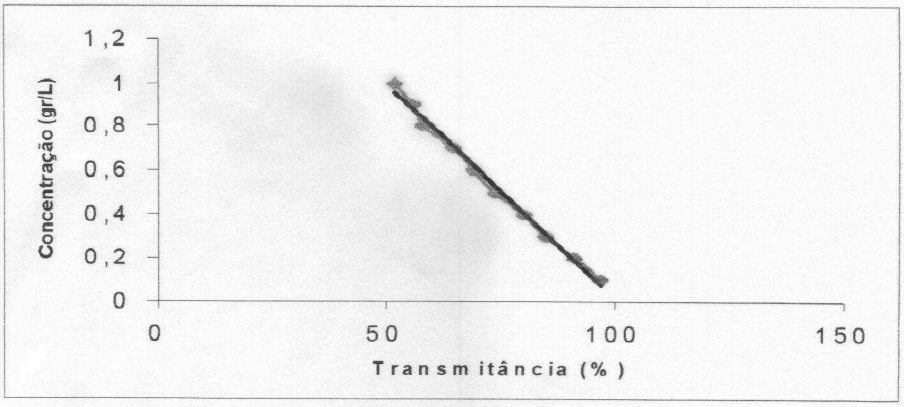


Figura 1 – Curva de calibração da Glicose

Pela curva de calibração com $R^2 = 0,9937$ obteve-se a Equação 1 que relaciona a concentração de Glicose em função da transmitância:

$$C(g/L) = -0.0195.T(\%) + 1,9711 \quad (1)$$

4– Resultados e Discussões

4.1- Ensaios em Mini fermentador

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos no mini fermentador, utilizando como meio de cultura glicose 1, numa temperatura constante de 30 ^{0}C.

Tabela 4 – Resultados da fermentação 1.

Tempo (horas)	Transmitância (%)	pH	Conc. Celular (g/L)	Conc. Glicose no filtrado (g/L)
24	60,5	6,80	0,2247	39,0
48	69,5	6,60	0,3696	29,0
72	97,5	5,58	0,487	5,50
96	88,9	5,50	0,499	12,0
120	87,1	5,50	0,503	13,0
144	88,8	5,49	0,511	12,0

A Figura 2 descreve o comportamento da concentração de Glicose com o tempo, mediante os valores da Tabela4, obtidos no mini fermentador.

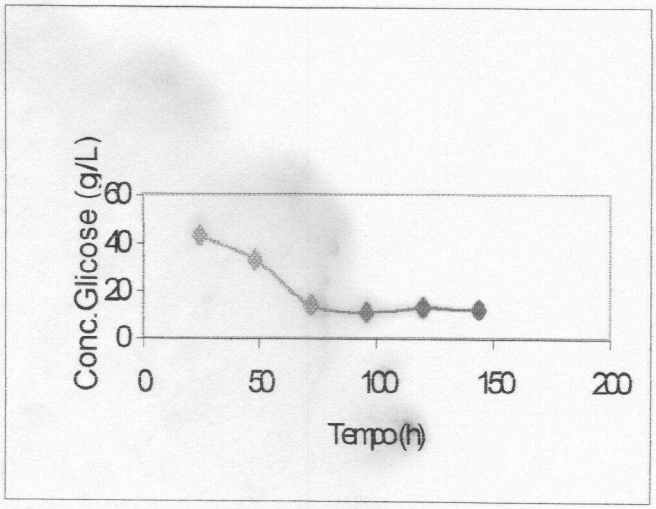


Figura 2 – Consumo de glicose para o Ensaio 1

Com base nos resultados obtidos, observou-se o consumo de substrato no decorrer do tempo. O meio relacionado à composição apresentava uma coloração marrom de intensidade média, o que não facilitava a visualização de pequenas esferas que formavam com o crescimento do fungo ao longo do tempo.

ALVES (1998) ressalta que durante o processo de fermentação, é comum em produção de fungos em meios líquidos, a formação de pequenas esferas de micélio, de aproximadamente 5 mm de diâmetro.

Decidiu-se reduzir as quantidades de substratos para valores expressos na composição do meio de glicose 4, realizando-se uma fermentação, cujos resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5– Resultados obtidos no mini fermentador.

Tempo (horas)	Transmitância (%)	PH	Conc. Celular (g/L)	Conc. Glicose no filtrado (g/L)
24	71,3	5,9	3,690	18,0375
48	83,2	5,5	4,495	15,435
72	89,6	4,9	4,975	11,195
96	92,1	4,6	5,105	8,7575
120	94,3	4,6	6,465	6,6125
144	95,0	4,5	7,155	5,93
168	97,2	4,5	9,155	3,785

A Figura 3 descreve os dados contidos na Tabela 5 no que diz respeito ao decréscimo da concentração de Glicose e aumento da concentração celular.

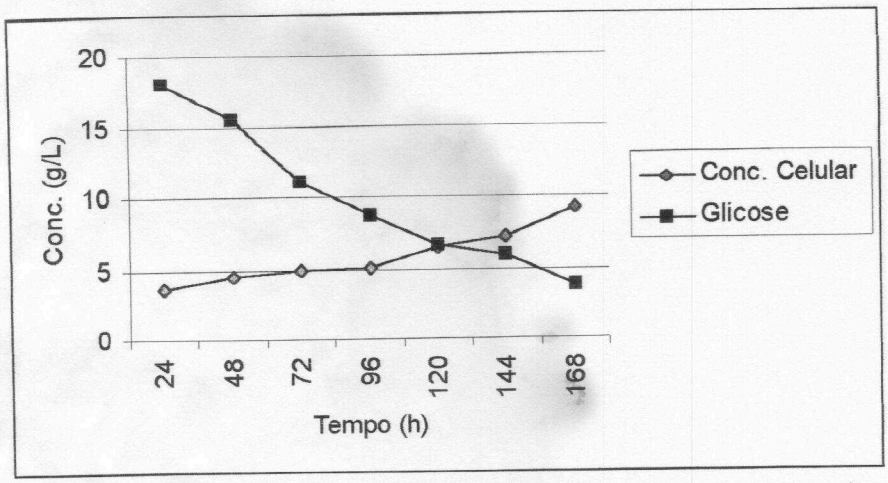


Figura 3 – Concentração de Glicose e de Massa celular ao longo do tempo

Com esta composição do meio, a visualização do crescimento dos fungos foi melhor devido à maior nitidez da mistura. Observou-se um melhor crescimento do microrganismo, partindo-se de uma concentração de 3,69 g/L para um valor quase três vezes maior, conseguindo-se nesse ensaio uma conversão de 0,383, ou seja 38,3%, o que se mostra muito superior ao resultado da etapa anterior e que reflete o bom aceitamento do meio de cultura por parte do microrganismo e as boas condições de assepsia, que evitaram a ocorrência de qualquer contaminação.

Já a Tabela 6 apresenta os resultados obtidos no mini fermentador, de acordo com as condições operacionais (item 3.3.2) e o meio de glicose 2.

Tabela 4 – Resultadosda fermentação com o meio 2..

Tempo (horas)	Transmitância (%)	PH	Conc.Celular (g/L)	Conc. Glicose no filtrado (g/L)
0	69,7	6,2	0,965	30,59
24	79,4	5,7	1,335	21,14
48	81,8	5,1	2,9	18,80
72	88,3	4,5	3,19	12,46
96	95,1	4,3	5,00	5,831

Verifica-se na Tabela 6 um aumento de concentração celular de mais de cinco vezes e grande consumo de açúcar.

Os resultados da Tabela 6 são apresentados na Figura 4.

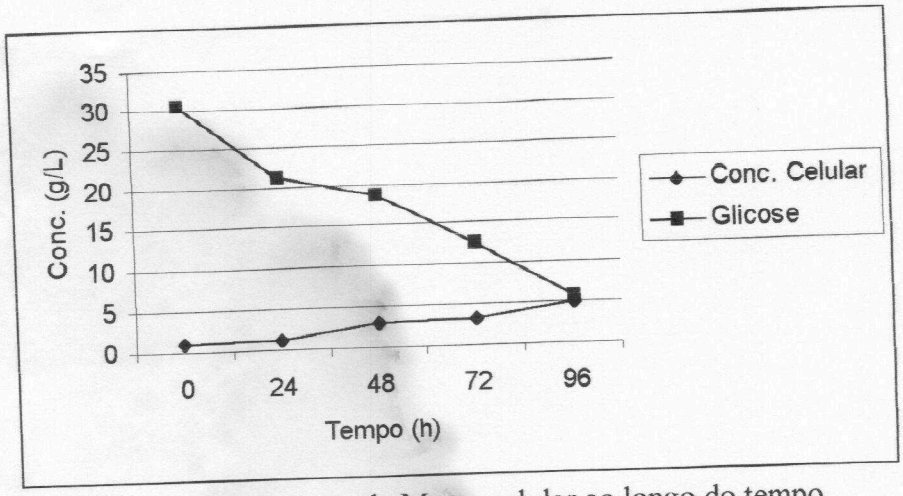


Figura 4 – Concentração de Glicose e de Massa celular ao longo do tempo

Note que o ensaio terminou antes da fase estacionária, onde as concentrações começam a se estabilizar. Isto ocorreu devido ao menor volume de meio de cultura e ao maior volume retirado de amostras para análises, porém o comportamento das curvas não fugiram ao seu padrão. A conversão foi de 0,163, que se mostra menor que aquela atingida no segundo ensaio, isso demonstra que o microrganismo não aceitou bem o aumento da concentração de Glicose. Pode ter ocorrido uma inibição pelo substrato, uma vez que a possibilidade de contaminação foi descartada, pois quando esta ocorre o meio se torna aquoso com formação de uma grande massa na superfície, sem visualização de péllets.

Na Tabela 7 estão descritos o consumo de glicose e produção de massa seca durante 168 horas de fermentação, utilizando o meio de glicose 5.

Tabela 7- Resultados obtidos no mini fermentador.

Tempo(h)	M. Seca (g/L)	Glicose (g/L)
24	3,69	29,0
48	4,50	17,4
72	4,98	11,2
96	5,11	8,8
120	6,47	6,6
144	7,16	5,9
168	9,16	3,8

Na Figura 5 estão descritos os comportamentos do crescimento celular e da concentração de glicose relativos aos dados da Tabela 7. Note que a massa aumenta claramente com o consumo do substrato.

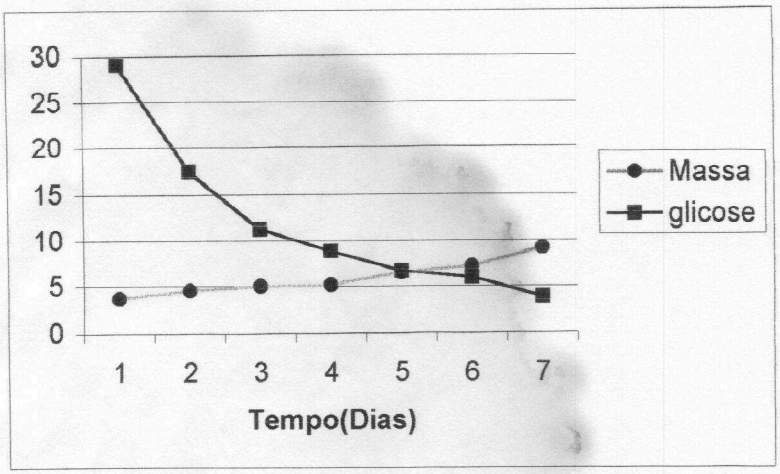


Figura 5 – Resultados do ensaio 5

Comparando este com o ensaio 4,obteve-se valores melhores de conversão, porém como já observado, o cultivo do *M. anisopliae* é lento.

Na Tabela 8 são apresentados os resultados obtidos através da utilização do meio de glicose 6, este ensaio o pH inicial foi de 6,2 e no final obteve-se o valor de 4,3.

Tabela 8 – Resultados obtidos no mini fermentador.

Tempo(h)	M. Seca (g/L)	Glicose (g/L)
0	0,97	30,2
24	1,34	21,1
48	2,90	18,8
84	3,19	12,5
120	5,00	5,8

Na Figura 6 estão descritos os comportamentos do crescimento da massa seca e da concentração de glicose relativos à Tabela 6.

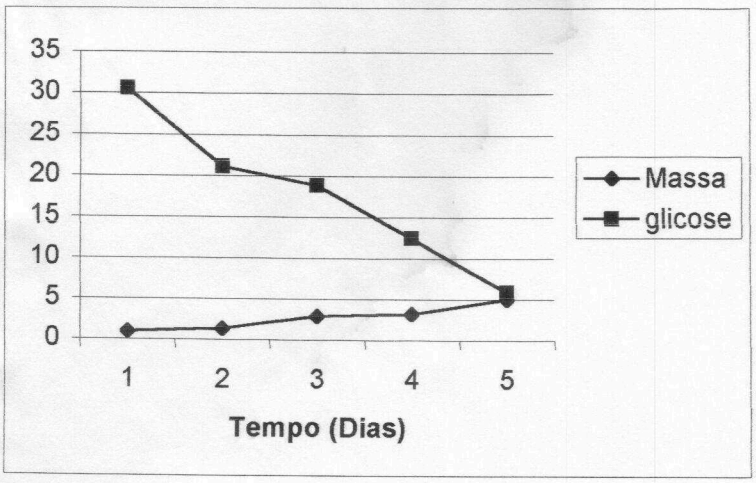


Figura 6 – Resultados do ensaio

Nota-se um comportamento análogo ao do Gráfico 4 porém num menor intervalo de tempo. Isto provavelmente devido à quantidade de substrato presente no meio. Observa-se também uma acidificação do meio, uma vez que este não era fixo.

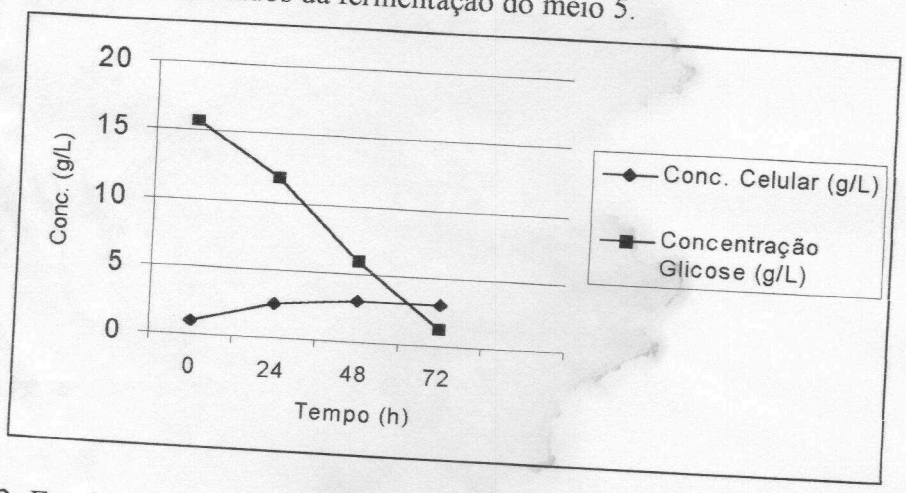
A Tabela 9 mostra os resultados obtidos através da utilização do meio de glicose 5, numa fermentação em mini fermentador.

Tabela 9 – Resultados obtidos no mini fermentador.

Tempo (h)	Conc. Celular (g/L)	Concentração Glicose (g/L)
0	1,00	15,58
24	2,60	11,75
48	3,10	5,96
72	3,10	1,24

A curta duração do ensaio de fermentação se deu por uma contaminação que impediu a continuidade do experimento. Neste caso, ocorre a formação de uma massa contínua na parte superior do recipiente do mini fermentador e o meio se torna aquoso.Os resultados da Tabela 9 são apresentados na Figura 7.

Figura 7 - Resultados da fermentação do meio 5.



4.2- Ensaios em Incubadora com Agitação

A Tabela 10 mostra os resultados obtidos em meio de glicose 5, sendo todo o experimento processado em incubadora com agitação, de acordo com suas condições operacionais descritas no item 3.3.2.

Tabela 10 – Resultados obtidos na incubadora.

Tempo (h)	Conc. Celular (g/L)	Concentração Glicose (g/L)
0	1,40	14,51
24	2,26	5,86
48	3,19	4,98
72	4,47	4,03
96	5,20	2,91

Os resultados da Tabela 7 são apresentados na Figura 8.

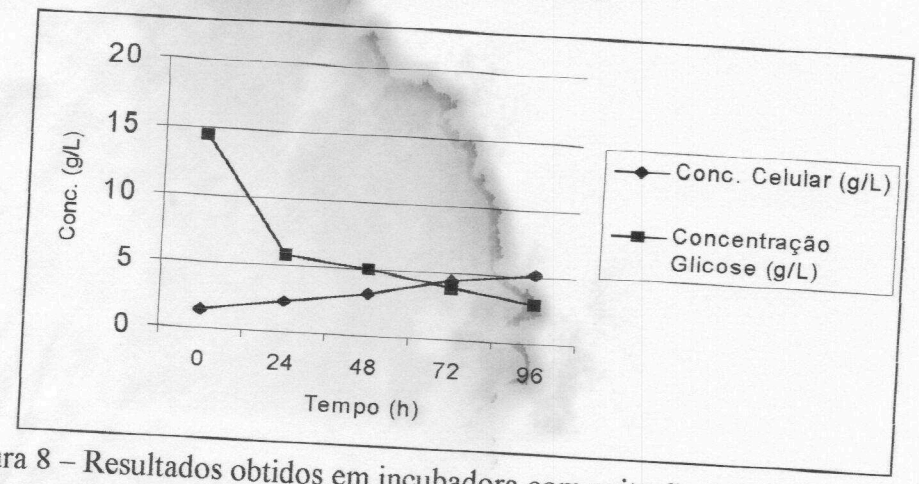


Figura 8 – Resultados obtidos em incubadora com agitação, para a fermentação do meio 5.

Observa-se que o comportamento do crescimento celular e o consumo de glicose foram análogos aos ensaios ocorridos em mini fermentador. A diferença está no risco de contaminação que na incubadora com agitação é maior, e como este é um fator importante neste trabalho, realizou-se mais ensaios em mini fermentador.

Na Figura 9, é mostrado a caracterização da estrutura do fungo *Metarhizium anisopliae*, esta imagem foi produzida a partir da cultura pura mantida em tubos de ensaio no laboratório da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, as fotos foram realizadas no laboratório de Ecologia do Instituto de Biologia desta mesma entidade.

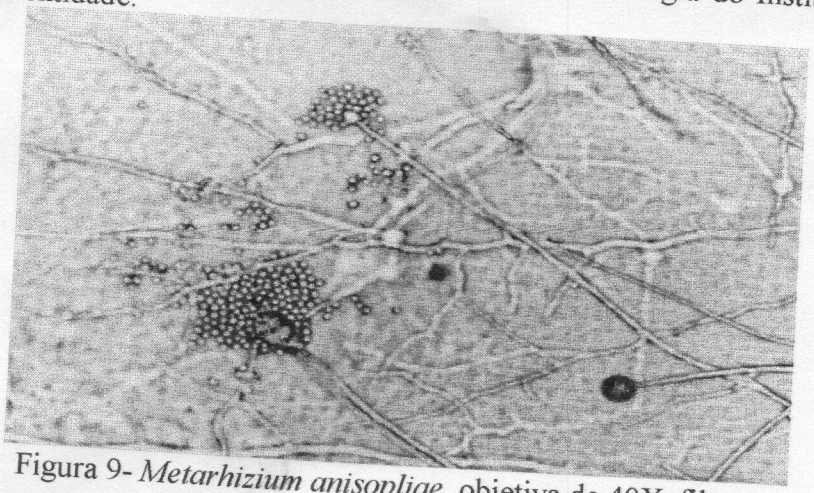


Figura 9- *Metarhizium anisopliae*, objetiva de 40X, filtro azul.

Na Figura 10, podemos observar os conídeos assexuais, que são propágulos de Deuteromycotina. É importante ressaltar que, para o crescimento do fungo *M. anisopliae* é necessário a presença de oxigênio, o que faz seu crescimento ocorrer somente na interface lâmina/ lamínula.

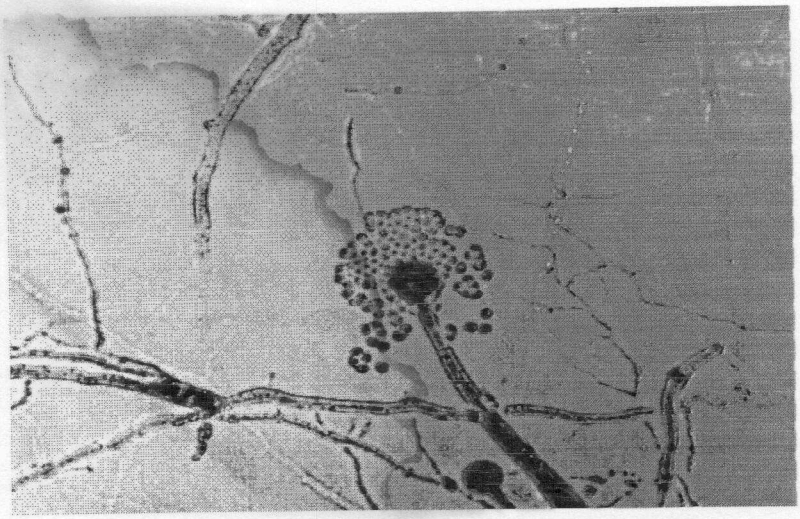


Figura 10- Metarhizium anisopliae, objetiva de 40X, filtro verde.

Na Figura 11, é possível visualizar as hifas com vários núcleos contidos na mesma massa citoplasmática sem septos transversais.

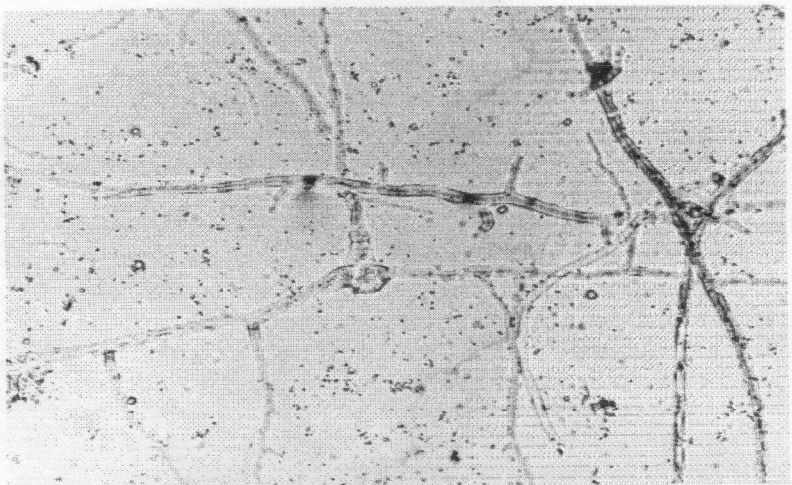


Figura 11- Hifas de *Metarhizium anisopliae,* observada em objetiva de 40X, filtro azul.

5- Conclusões

- De acordo com os testes realizados, o fungo *Metarhizium anisopliae* mostra-se propício a desenvolver-se em baixos valores de pH, de 6,2 a 4.3, notado a partir da diminuição deste ao longo das fermentações.
- Observa-se uma grande sensibilidade a contaminações, e quando isto ocorre, é de fácil visualização, pois o meio se modifica rapidamente. Por este motivo o cultivo deste microrganismo requer grandes cuidados.
- Durante o decorrer dos ensaios foi possível verificar que não é necessário altas concentrações de substrato, pois os melhores resultados foram obtidos com uma concentração de 30 g/L.É importante ressaltar ainda que, o período de fermentação é lento.

5.1 – Propostas para Futuros Trabalhos no Cultivo do *M. anisopliae*

- Estudar a influência do pH nas fermentações;
- Estudar a influência da temperatura nas fermentações;
- Estudar a influência da vazão de ar no mini fermentador;
- Testar novos substratos;
- Variar a rotação do mini fermentador.

6.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-AIDROOS, K. & A. M. SEIFERT. 1980. Polysacharide and protein degradation, germination and virulence against mosquitoes in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. J. Invertebr. Pathol. 36: 29-34.

ALVES, S. B., R. Machado Neto, N. Macedo & L. C. Almeida. 1983. Widespread occurrence of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Standard A) on *Mahanarva posticata*(Stal) in brazil. Entomol. Newsletter 15:6.

ALVES,S. B., L. E. M. Padua, E. M. W. M. Azevedo & L. C. Almeida. 1985. Controle da broca- da- cana- de- açúcar pelo uso de *Beauveria bassiana*. Pesq. Agrop. Bras. 20: 403-406.

ALVES, S. B., J. L. Stimac, R. M. Pereira & S. A. Viera. 1995. Delayed germination of *Beauveria bassiana* conidia after prolonged storage at low temperatures, p. 2. In Annual Meeting Society for Invetebrate Pathology, 28, New York, 75.

BALFOUR-BOOWNE, F.L.1960.The green muscucardine disease of insects, with special reference to an epidemic in swarm of locusts in Eritrea . Proceeding of Royal Entomological Society of London, Ser. A. 35: 65-74.

BOUCIAS, D. G. & J. C. PENDLAND. 1984. Nutritional requirements for conidial germination of several hosts rang pathotypes of the entomopathogenic fungus *Nomuraea riveyi*. J. Invertebr Pathol. 43: 288-292.

BOUCIAS, D. G., J. C. PENDLAND & J. P. LATGÉ. 1988. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host cuticle. Appl. Environm. Entomol. 54: 1795-1805.

CADATAL, T. D. & B. D. GABRIEL. 1970.Effect of chemical pesticides on the development of fungi pathogenic to some rice insects. The Phillip Entomol. 1: 379-395.

CONTI, E., C. L. Messias, H. M. L. Souza & J. L. Azevedo. 1980. Electrophoretic variation in esterases and phosphatoses in eleven wild- type strains of *Metarhizium anisopliae*.Experientia 36: 293-294.

FERREIRA, F. B. 2000. Contribuição ao Estudo da Produção de Enzima Coagulante pelo Cultivo de *Mucor miehei* em Meios a Base de Sacarose, Glicose e Caldo de Cana de Açúcar. Monografia de defesa de mestrado.

HERLICH, P. R. & HERLICH, A. H. (1975), População Recursos Ambiente, trad. J.G.Tundisi, EDUSP, São Paulo.

HERREIRA , T. & ULLOA, M. (1998), El Reino de los Hongos, Ed. UNAMA, México.

LECUONA, R. E. 1986. Controle microbiano de *diatraea saccharalis*(Fabr., 1794) (Lep.: Pyralidae) com *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *B. brongniartii*(Sacc.) Petch e vírus da granulose, simulação dos efeitos de sua aplicação. Dissertação de mestrado, ESALQ/USP, Piracicaba, 170 p.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31:426-428, 1959

PARIS, S. & P. Ferron. 1979. Study of the virulence of some mutants of *Beauveria bassiana* (Syn *B. tenella*). J. Invertebr. Pathol. 34: 133-145.

PATRICK, M.S. ADLARD, M. W. KESHAVARZ, T. 1993. Production of an Indolizidine Alkaloid, Swainsomine by the Filamentous fungus, *M. anisopliae*. Biothecnology Letters 15: 997 – 1000.

PENDLAND, J. C. 1982. Resistant strutures in the entomogenous hyphomycete *Nomuraea rileyr* an ultrastructural study. Can. J. Bot. 60: 1569-1576.

RATAULT, C. & A. Vey. 1977. Production d'esterases et de *N. acetyle* glucosaminidade dans le tegument du coleóptero *Oryctes rhinoceros* par le champignon entomophatogene *Metarhizium anisopliae*. Entomophaga 22: 289-294.

ROBERTS, D. W. 1981. Toxins of entomopathogenic fingi, p. 441-464. In H. D. Burges (ed.), Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. London, Academic Press, 861 p.

ROBINSON, R. K. 1966. Studies on penetration of insect in tegument byn fungi. Pest. Art. New Summ., Sect. B. 12: 131-142.

SIEBERNEICHER, S. R., S. B. VINSON & C. M. KENERLEY. 1992. Infection of the red imported fire ant by *Beauveria baissana* Through various routes of exposure. J. Invertebr. Pathol. 59: 280-285.

SIGMA, 1999. Biochemicals and Reagents for Life Science Research. St Louis, Sigma – Aldrich Co p.2880.

SMITH, R. J., S. PEKRUL & E. A. GRULA. 1981. Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm (*Heliothis zea*). J. Invertebr. Pathol. 38: 335-344.

SOSA- GÓMEZ, D. R. 1990. Caracterização de isolados de *B. bassiana*. Tese de doutorado, ESALQ/ USP, Piracicabaa, 98 p.

ST. LEGER, R. J., M. GOETTEL, D. W. ROBERTS & R. C. STAPLES. 1991. Prepenetration events during infection of host cuticle by Metarhizium Anisopliae. J. Invertebr. Pathol. 58: 168-179.

ST. LEGER, R. J., P. K. Durrands, A. K. Charnley. 1988. Rolle of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca Sexta*. J. Invertebr. Pathol. 60: 89-101.

VIÈGAS, A. P. 1939. *Empusa dydercyn*. sp., um novo parasita de *Dysdercus*. Jornal de Agronomia 2: 229-258.

WRAIGHT, S. P., T. M. Butt, S. Galaini- Wraigth, L. L. Allee, R. S. Soper & D. W. Roberts. 1990. Germination and infection processes of the entomophthoralean fungus *Erynia radicans* on the potato leafhopper, *Empoasca fabae*. J. Invertebr. Pathol. 56: 157-174.