



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

CAROLINE TARGINO ALVES DA SILVA

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E ESPECIFICIDADE DE FUNGOS
FILAMENTOSOS ENTOMOPATOGÊNICOS SOBRE A LAGARTA DA
MAÇÃ DO ALGODOEIRO *HELIOTHIS VIRESCENS* (FABRICIUS,
1777) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

JOÃO PESSOA

2018

Caroline Targino Alves da Silva

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E ESPECIFICIDADE DE FUNGOS
FILAMENTOSOS ENTOMOPATOGÊNICOS SOBRE A LAGARTA DA
MAÇÃ DO ALGODOEIRO *HELIOTHIS VIRESCENS* (FABRICIUS,
1777) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado à Disciplina de Trabalho de Conclusão de
Curso, do Curso Superior Bacharelado em
Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba –
UFPB, como requisito para obtenção do Título de
Biotecnologista.

Orientadora: Prof^ª Dr.^a Adna Cristina Barbosa de
Sousa

JOÃO PESSOA/PB

2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586a Silva, Caroline Targino Alves da.

Atividade proteolítica e especificidade de fungos filamentosos entomopatogênicos sobre a lagarta da maçã do algodoeiro *heliiothis virescens* (Fabricius, 1777) (lepidóptera : noctuidae) / Caroline Targino Alves da Silva. - João Pessoa, 2018.

59 f. : il.

Orientação: Adna Cristina Barbosa de Sousa.
Monografia (Graduação) - UFPB/CBiotec.

1. Bioinseticida. 2. Proteases. 3. Controle biológico.
4. Fungos entomopatogênicos. I. Sousa, Adna Cristina Barbosa de. II. Título.

UFPB/BC

Caroline Targino Alves da Silva

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E ESPECIFICIDADE DE FUNGOS
FILAMENTOSOS ENTOMOPATOGÊNICOS SOBRE A LAGARTA DA MAÇÃ DO
ALGODOEIRO *HELIOTHIS VIRESCENS* (FABRICIUS, 1777) (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) submetido ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Adna Cristina Barbosa de Sousa (UFPB – CBIOTEC)
(Orientadora)

Prof^ª. Dr^ª. Andréa Farias de Almeida (UFPB – CBIOTEC)
(Examinadora)

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes (UFPB – CBIOTEC)
(Examinador)

“The scientist does not study nature because it is useful to do so. He studies it because he takes pleasure in it, and he takes pleasure in it because it is beautiful. If nature were not beautiful it would not be worth knowing, and life would not be worth living.”

Henri Poincare (1854 – 1912)

Dedico este trabalho à minha mãe, meu primeiro exemplo de amor e perseverança, a pessoa que me ensinou a importância de buscar os meus sonhos por mais difíceis que esses pudessem parecer.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Adna Cristina Barbosa de Sousa, por ser um exemplo de professora e de ser humano, por confiar e acreditar no meu potencial quando nem eu acreditava, por toda dedicação, compromisso e por sempre me incentivar a voar cada vez mais alto.

Aos professores do Centro de Biotecnologia da UFPB, por compartilharem seu conhecimento e experiência, pela paciência e pela amizade, por toda ajuda e apoio durante a graduação, contribuindo para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

Aos membros da banca avaliadora, os professores Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes e Dr^a. Andréa Farias de Almeida por aceitarem participar da avaliação deste trabalho, contribuindo para o enriquecimento do mesmo.

Ao Professor Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes por ter cedido, gentilmente, o isolado de *Paecilomyces* sp. TP08, enriquecendo ainda mais o meu trabalho.

À Alexandre Martins Filho, pela ajuda indispensável na estatística, colaborando diretamente para enriquecer o presente trabalho.

À minha mãe, Kátia Cilene Alves da Silva, por todo amor e compreensão, por me mostrar a importância de seguir os meus sonhos, por ser uma educadora excepcional e por ser o exemplo do que eu quero ser “quando crescer”. Obrigada por sacrificar-se por mim, obrigada por ser a minha mãe, o meu pai, a minha família. Obrigada por me ensinar a ser um bom ser humano antes de ser uma boa profissional. Obrigada por ser um exemplo contínuo de perseverança para conseguir fazer o que gosta, obrigada por me ensinar a escolher uma profissão por amor e não por dinheiro, obrigada por sempre apoiar as minhas escolhas.

Aos meus amigos de longa data, especialmente Rafael Goulart e Andrwey Viana, por todos os anos de amizade, amor, carinho e apoio. Toda minha gratidão por estarem comigo em todos os momentos, obrigada por serem a extensão da minha família.

Aos meus amigos Viviane Lima e Gabriel Brandão, pois apesar da distância, sei que tenho o amor e o apoio de vocês, obrigada por sempre acreditarem em mim.

Aos amigos queridos que ganhei nesse curso, especialmente Gabriel Nascimento, Débora Lacerda, Thaynara Viegas (Pedagoga com alma de Biotecnologista), André Tork, Amanda Freire, Aline Dantas, Ray Arruda, e Tarcísio Bonifácio. Obrigada pelo amor e pela cumplicidade. Espero dividir momentos especiais com vocês por muitos e muitos anos.

Aos queridíssimos amigos da sala 10, Fabrine Hilário, Alex Rique, Karolyne Estrela, Lucas Alecrim, Melina Lins, Liana Coliselli e Camilla Farias, obrigada por compartilhar as risadas e as crises de desespero durante a Graduação.

Aos parceiros do LAGEMOL e do LEBp, em especial a Bianca Oliveira, Cibele Queiroz, Hércules Medeiros, Débora Lacerda, Paloma Silva, Nathalia Souza, Juliana Lima, Eveline Martins e Brendo Amaral, por todo companheirismo durante os experimentos, pelas risadas, pelo apoio e ajuda de sempre.

À todos os amigos que fiz durante a Graduação no CBIOTEC, obrigada pelos momentos de risadas e de desespero, pelos momentos de descontração, pelas ideias compartilhadas, pelos momentos maravilhosos dentro e fora da Universidade, pelo apoio psicológico durante essa etapa. Agradeço por deixarem um pouquinho de cada um de vocês em mim, me ensinando a ser uma pessoa melhor e mais tolerante.

Aos meus amigos do intercâmbio, em especial Vinnycius Almeida, Gleise Souza, e José Lourenço, por compartilharem 1 ano e meio de muito aprendizado, obrigada por “pegarem na minha mão” durante os primeiros experimentos, pelos momentos divididos nos laboratórios de domingo a domingo, pelo apoio e confiança de sempre, e pelos momentos de descontração.

Aos professores de Rochester Institute of Technology, por contribuírem para a minha formação profissional e pessoal de uma maneira indescritível, em especial às professoras Alison Healy e Dr^a Mary-Anne Courtney.

À Universidade Federal da Paraíba, pela oportunidade da formação acadêmica.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 01: Ciclo de infecção do fungo entomopatogênico <i>Beauveria bassiana</i> em um invertebrado (adaptado de MASCARIN e JAROSKI, 2016).....	21
Figura 02: Lagarta <i>Heliothis virescens</i> (estágio L3).....	24
Figura 03: Ciclo de vida da <i>Heliothis virescens</i> . (A) adulto; (B) ovo; (C) lagarta; (D) pupa (adaptado de LINS, 2014).....	26
Figura 04: Aspecto das colônias dos diferentes isolados fúngicos em meio de cultura ágar-Sabourad-dextrose (A1, B1 e C1) e formação do halo de degradação em meio de cultura ágar-leite (A2, B2 e C2). (A) <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> ; (B) <i>Beauveria bassiana</i> ; (C) <i>Beauveria brongniartii</i>	34
Figura 05: Micrografias dos fungos filamentosos. A – <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> (A1 – Apressório e A2 – Conídios; B – <i>Beauveria bassiana</i> (B1 – Conidioforo e B2 – Conídios); C – <i>Beauveria brongniartii</i> (C1 – Conidioforo e C2 – Conídios).....	35
Figura 06: Micrografias dos fungos filamentosos. A – <i>Paecilomyces</i> sp. TP08 (A1 – Conidioforo e A2 – Conídios; B – <i>Penicillium</i> sp. (B1 – Conidioforo e B2 – Conídios); C – <i>Aspergillus</i> sp. (C1 – Conidioforo e C2 – Conídios).....	37
Figura 07: Aspecto das colônias dos diferentes isolados fúngicos em meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose (A1, B1 e C1) e formação do halo de degradação em meio de cultura ágar-leite (A2 e B2) exceto C2 que não formou o halo. (A) <i>Penicillium</i> sp.; (B) <i>Aspergillus</i> sp.; (C) <i>Paecilomyces</i> sp.....	38
Figura 08: Extrusão de fungos entomopatogênicos em cadáveres das lagartas <i>Heliothis virescens</i> . (A) <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> (B) <i>Penicillium</i> sp. (C) <i>Beauveria brongniartii</i> (D) <i>Beauveria bassiana</i> (E) <i>Aspergillus</i> sp.....	40

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
Tabela 1: Origem dos isolados de fungos filamentosos com ação entomopatogênica.....	28
Tabela 2: Composição da dieta artificial de Greene (adaptado de BUSATO et al., 2006).....	31
Tabela 3: Índice enzimático (IE) e atividade enzimática (Pz) de 06 isolados de fungos filamentosos entomopatogênicos.....	32
Tabela 4: Eficácia de fungos entomopatogênicos sobre a lagarta <i>Heliothis virescens</i> em condições de laboratório na concentração de 10^8 conídios/mL ⁻¹ . Período de incubação - 10 dias (T = 25 ± 2 °C e umidade relativa 70 ± 10 %) (n=30 para cada isolado fúngico).....	41
Tabela 5: Viabilidade de conídios e Tl ₅₀ (dias) para a lagarta <i>Heliothis virescens</i> tratadas com fungos entomopatogênicos. Concentração de 10^8 conídios/mL ⁻¹ . Período de incubação - 10 dias (T = 25 ± 2 °C e umidade relativa 70 ± 10 %) (n=30 para cada isolado fúngico).....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IE: Índice enzimático

Pz: Atividade enzimática

TL₅₀: Tempo Letal

ANOVA: Análise de variância

Observação: as abreviaturas, siglas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo geral.....	13
2.2. Objetivos específicos.....	13
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
3.1. Fungos filamentosos entomopatogênicos	14
3.2. Mecanismos biológicos da ação dos fungos filamentosos sobre os insetos.....	18
3.3. Enzimas proteolíticas e sua relação com a patogenicidade de fungos filamentosos entomopatogênicos.....	21
3.4. Praga da maçã do algodoeiro – A lagarta da maçã <i>Heliothis virescens</i> (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae)	22
3.5. Importância do controle biológico	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. Isolamento e identificação.....	28
4.2. Origem das lagartas.....	28
4.3. Meio de cultura e manutenção da cultura fúngica.....	28
4.4. Crescimento radial.....	29
4.5. Meio de cultura para caracterização da atividade proteolítica.....	29
4.6. Atividade proteolítica.....	29
4.7. Determinação da atividade proteolítica e do índice enzimático.....	29
4.8. Preparo das soluções de conídios.....	30
4.9. Avaliação da eficiência e especificidade dos isolados fúngicos sobre a lagarta da maçã (bioensaio).....	30
4.10. Técnica da fita adesiva para visualização dos conídios.....	30
4.11. Cultura em lamínula para visualização das estruturas vegetativas e reprodutivas.....	30
4.12. Análises estatísticas.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1. Avaliação do índice e da atividade enzimática dos isolados fúngicos.....	32
5.2. Avaliação da capacidade e eficiência bioinseticida dos isolados fúngicos.....	39
6. CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	46

SILVA, Caroline Targino Alves da. Atividade proteolítica e especificidade de fungos filamentosos entomopatogênicos sobre a lagarta da maçã do algodoeiro *Heliothis virescens* (Fabricius, 1777) (Lepidoptera: Noctuidae). Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

RESUMO

O setor agrícola brasileiro é responsável pela maior parte dos ganhos econômicos no nosso país. Dentre as culturas mais significantes destaca-se o algodão, a fibra têxtil mais importante utilizada nas indústrias de fiação e confecção, além de ser utilizado para extração de óleos e proteínas utilizados na alimentação. Apesar do potencial, o aumento no número de pragas nos cultivos do algodoeiro tem ocasionado perdas econômicas significativas. Dentre as pragas que acometem o algodoeiro, destaca-se a lagarta-da-maçã, *Heliothis virescens*, que pode atacar até 15 estruturas vegetais causando danos irreversíveis e grandes perdas na produção. O controle dessa praga acontece principalmente pela utilização de inseticidas químicos, que dentre diversas consequências, pode levar ao desenvolvimento de resistência. Visando buscar uma alternativa mais eficaz, barata e que cause o menor impacto ambiental para o controle dessa praga, o objetivo desse trabalho foi avaliar a especificidade e o potencial bioinseticida de fungos filamentosos entomopatogênicos sobre a lagarta-da-maçã do algodoeiro. Como uma forma de selecionar as melhores linhagens fúngicas entomopatogênicas, foi realizado um ensaio *in vitro* para avaliar a atividade proteolítica a partir da formação de halo de degradação da caseína em meio de cultura ágar-leite. Dos 06 isolados avaliados, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Aspergillus* sp., e *Penicillium* sp. apresentaram atividade proteolítica positiva, e apenas o isolado *Paecilomyces* sp. TP08 apresentou atividade proteolítica negativa sendo excluído do bioensaio. Para analisar a especificidade dos 05 isolados fúngicos sobre a lagarta *H. virescens* foi realizado um bioensaio com três repetições durante 10 dias, numa concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios/mL⁻¹. Ao final do experimento, observamos que os 05 isolados foram patogênicos às lagartas de *H. virescens* e causaram um efeito letal na concentração testada. *Aspergillus* sp. se destacou por apresentar a maior taxa de mortalidade média ($100,0 \pm 4,98$ %) e o menor TL₅₀ (2,53 dias), seguido de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (mortalidade média de $97,6 \pm 13,60$ e TL₅₀ de 5,99) para a concentração de conídios testada. Os resultados do bioensaio descrito nesse trabalho permitiu a descoberta de isolados fúngicos com grande potencial para serem utilizados no controle biológico da lagarta-da-maçã, diminuindo os danos causados por essa praga nas plantações e sugerindo uma nova forma de controle mais sustentável e eficaz.

Palavras-chave: Bioinseticida. Proteases. Controle biológico. Fungos entomopatogênicos.

SILVA, Caroline Targino Alves da. Proteolytic activity and specificity of entomopathogenic filamentous fungi on the apple caterpillar *Heliothis virescens* (Fabricius, 1777) (Lepidoptera: Noctuidae). Course Completion Work (Biotechnology) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

ABSTRACT

The Brazilian agricultural sector accounts for most of the economic gains in our country. Among the most significant crops is cotton, the most important textile fiber used in the spinning and confection industries, as well as being used for the extraction of oils and proteins used in food. Despite the potential, the increase in the number of pests in cotton crops has caused significant economic losses. Among the pests affecting the cotton plant, the apple caterpillar, *Heliothis virescens*, can attack up to 15 plant structures causing irreversible damage and large losses in production. The control of this pest happens mainly by the use of chemical insecticides, that among several consequences, can lead to the development of resistance. The objective of this work was to evaluate the specificity and potential bioinsecticida of entomopathogenic filamentous fungi on the apple caterpillar of the cotton plant, in order to find a more efficient, cheap and less environmental alternative to control this pest. As a way to select the best entomopathogenic fungal strains, an in vitro assay was performed to evaluate the proteolytic activity from the halo formation of casein degradation in agar-milk culture medium. Of the 06 isolates evaluated, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Aspergillus* sp., and *Penicillium* sp. presented positive proteolytic activity, and only the isolate *Paecilomyces* sp. TP08 presented negative proteolytic activity being excluded from the bioassay. To analyze the specificity of the fungal isolates on the *H. virescens* caterpillar, a bioassay was performed with three replicates for 10 days at a concentration of 1.0×10^8 conidia/mL⁻¹. At the end of the experiment, we observed that the 05 isolates were pathogenic to *H. virescens* caterpillars and caused a lethal effect at the concentration tested. *Aspergillus* sp. (100.0 ± 4.98 %) and the lowest TL₅₀ (2.53 days), followed by *M. anisopliae* var. *anisopliae* (mean mortality of 97.6 ± 13.60 and LT₅₀ of 5.99) for the conidia concentration tested. The results of the bioassay described in this study allowed the discovery of fungal isolates with great potential to be used in the biological control of the apple caterpillar, reducing the damage caused by this pest in the plantations and suggesting a new form of control more sustainable and effective.

Key words: Bioinsecticide. Proteases. Biological control. Entomopathogenic fungi.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o setor agrícola é responsável por grande parte dos ganhos econômicos do país, apresentando uma participação significativa e crescente na economia brasileira. Com o intuito de suprir a alta demanda de alimentos, a produção agrícola brasileira tem apresentado um crescimento contínuo nos últimos anos (SILVA; BRITO, 2015) devido ao uso de mão-de-obra acessível, grande espaço territorial, produtores rurais experientes, detenção de conhecimento e tecnologias relacionadas ao processo de produção (CONCEIÇÃO et al., 2014).

Dentre as culturas cultivadas no Brasil, aproximadamente 1.071 hectares são de algodão, cultivado principalmente nas regiões Centro-Oeste e Nordeste do Brasil (PEREIRA et al., 2016). O algodão é a fibra têxtil mais importante, e também fornece proteína e óleo que podem ser utilizados na alimentação animal e humana. Essa cultura é de grande importância no cenário econômico do país por gerar emprego e renda devido ao alto número de mão-de-obra necessária na produção (LUNARDON, 2007). Além disso, o Brasil ocupa a terceira posição no *ranking* mundial de exportação de algodão, exportando para países como Vietnã, Coréia do Sul e Indonésia. De janeiro a agosto de 2015, aproximadamente 313 milhões de toneladas de algodão foram exportadas, gerando um faturamento de cerca de U\$480 milhões (CANAL DO PRODUTOR, 2015).

Apesar desse potencial, com a exploração agrícola cada vez mais intensa, o Brasil enfrenta problemas para manutenção do crescimento nesse setor devido ao aumento no número de pragas (SILVA; BRITO, 2015). O controle dessas pragas nem sempre são eficientes, pois por utilizarem do controle químico (inseticidas), podem levar ao desenvolvimento de resistência e redução da população de inimigos naturais (PAPA, 2006).

O algodoeiro pode hospedar até 600 espécies de herbívoros, onde, aproximadamente 32 dessas espécies podem ocasionar grandes prejuízos na produção (TORRES, 2008). Dentre essas pragas que acometem o algodoeiro, destacamos *Heliothis virescens* (Fabricius, 1777) (Lepidoptera: Noctuidae), popularmente conhecida como a lagarta da maçã. É considerada uma das mais severas por atacar mais de 15 estruturas vegetais, possibilitar a penetração de micro-organismos e causar danos irreversíveis levando a grandes perdas na produção (PAPA, 2003).

Geralmente, o monitoramento e controle dessa praga ocorrem através do uso de inseticidas químicos (controle químico) e plantas geneticamente modificadas como o algodoeiro *Bt* (controle genético), porém não há diferença quanto à ocorrência de lagartas *H.*

virescens em plantas de algodoeiro *Bt* e não *Bt*. Devido a isto, é necessário desenvolver uma forma de controle mais eficaz, que não cause resistência dos insetos-praga ou leve a danos ambientais.

Uma alternativa que tem se destacado no controle de pragas em diversas culturas é o controle biológico. Dentre os micro-organismos com esse potencial, destacamos os fungos filamentosos com atividade entomopatogênica. Esse grupo de fungos podem penetrar no hospedeiro através da cutícula e produzir toxinas que levam a morte dos insetos-praga (ERLACHER et al., 2006). Entre os fungos entomopatogênicos, destacamos os gêneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Aspergillus* e *Penicillium*, os quais apresentam ação comprovada no controle biológico de vários insetos-praga na agropecuária. Devido ao potencial desses fungos no controle biológico, nosso objetivo foi avaliar a especificidade e o potencial bioinseticida de fungos filamentosos entomopatogênicos (*Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Paecilomyces* sp.) na lagarta da maçã do algodoeiro *H. virescens*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a especificidade e o potencial bioinseticida de fungos filamentosos entomopatogênicos na lagarta da maçã do algodoeiro, *Heliothis virescens*.

2.2 Objetivos Específicos

- ❖ Avaliar o tempo de crescimento e a esporulação (conidiogênese) de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Paecilomyces* sp. no meio de cultura ágar-leite;
- ❖ Avaliar a atividade proteolítica *in vitro*, a partir da formação do halo de degradação da caseína do leite Molico Nestlé®;
- ❖ Selecionar os melhores isolados fúngicos, a partir da atividade proteolítica, para avaliar a capacidade bioinseticida na lagarta da maçã;
- ❖ Analisar a eficiência bioinseticida e especificidade dos diferentes isolados fúngicos sobre a lagarta da maçã;
- ❖ Determinar *in vitro* o tempo letal mínimo a partir da concentração de conídios testada.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Fungos filamentosos entomopatogênicos

Os fungos, amplamente distribuídos em todos os *habitats* e ecossistemas, são micro-organismos que participam da decomposição primária em todos os ecossistemas terrestres e desempenham um importante papel ecológico no ciclo do carbono e reciclo de nutrientes; são essenciais para sobrevivência de muitos grupos de organismos com os quais estão associados (mutualismo); muitos são patógenos de plantas, humanos e animais; são potencialmente importantes para a agropecuária (controle biológico) e demonstram potencial para produção biológica e biotecnológica (ABREU et al., 2015). Esses fungos podem ser nutricionalmente classificados como saprófitos que colonizam a rizosfera e a filosfera, saprófitos endofíticos, hemibiotróficos, necrotróficos de plantas, entomopatogênicos ou micoparasitários e alguns deles podem adotar mais de uma forma nutricional (KHAN et al., 2012).

Os fungos entomopatogênicos são amplamente distribuídos na natureza e correspondem as espécies de fungos capazes de parasitar insetos e artrópodes (SHAH; PELL, 2003). Esses micro-organismos são inimigos naturais de diversas espécies como ácaros, afídeos, moscas, besouros, lagartas, gafanhotos, e outros insetos, sendo capazes de parasitá-los e ocasionar epizootias, incapacitando-os ou ainda levando a sua morte. Os fungos entomopatogênicos são então considerados patógenos que se diferem de outros grupos principalmente pela sua capacidade de infectar os diversos estágios de desenvolvimento dos hospedeiros, e por conseguir adentrá-los e causar a infecção através do tegumento (contato), diferente de muitos parasitas que precisam adentrar o interior do hospedeiro (ingestão) para parasitá-los (ALVES, 1998; ALVES et al., 2008; KHAN et al., 2012).

Os fungos foram descritos como os primeiros micro-organismos empregados no controle biológico de pragas, onde mais de 700 espécies de cerca de 90 gêneros, são patogênicos aos insetos, sendo a sua maioria pertencentes aos filos Ascomycota e Zygomycota (KHAN et al., 2012). Na divisão Zygomycota, estão inseridas as espécies entomopatogênicas da ordem Entomophthorales e na divisão Ascomycota as espécies patogênicas da ordem Hypocreales, gêneros *Metarhizium* e *Beauveria* (ROY et al., 2006). A utilização desses entomopatógenos no controle de pragas representa uma alternativa sustentável ao uso indiscriminado de inseticidas químicos. Dentre os fungos com atividade entomopatogênica destacamos: *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Paecilomyces* sp., *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.

B. bassiana (Bals) Vuillemin foi primeiramente descrito como patógeno do bicho-de-seda (*Bombyx mori* L.) em 1834 por Agostino Bassi (GLARE; MILNER, 1991). Essa espécie é bastante estudada atualmente, pois infecta várias espécies de insetos e outros artrópodes (ALVES, 1998). Por ser um dos primeiros fungos entomopatogênicos estudados, a larga experiência com *B. bassiana* possibilitou aos pesquisadores maior compreensão sobre o controle biológico utilizando outras espécies de fungos, o que contribuiu com grandes avanços nesse setor (FENG et al., 1994).

O ciclo sexual da *B. bassiana* não é totalmente conhecido, apesar disso, estudos demonstram que os insetos são infectados por conídios (propágulos assexuados) que se ligam à cutícula do hospedeiro, penetrando-a e levando ao desenvolvimento dos tubos germinativos que invadem a hemocele. Uma infecção bem-sucedida por *B. bassiana* é dependente principalmente da atividade de diversas enzimas para a degradação de proteínas, quitina e lipídios no tegumento do inseto. Ao invadir a hemocele, o fungo prolifera e coloniza todo o inseto. Os insetos hospedeiros são mortos devido ao esgotamento dos nutrientes na hemolinfa ou devido à toxemia causada por metabólitos tóxicos produzidos pelo fungo. Em condições ambientais favoráveis, principalmente na presença de umidade, o fungo emerge e produz uma camada de conídios aéreos na superfície dos cadáveres (ROBERTS, 1981; FERRON et al., 1991; KHACHATOURIANS, 1991 apud FENG, 1994).

B. brongniartii (Sacc.) Petch foi identificada inicialmente colonizando *Melolontha melolontha*, inseto pertencente a família Melonthidae que pode alimentar-se de folhas de árvores florestais e causar perda econômica significativa (EGERT et al., 2005). *B. brongniartii* é menos comum que *B. bassiana*, mas também apresenta distribuição mundial em diferentes *habitats*, como solos de diferentes regiões e insetos (ZIMMERMANN, 2007). O fungo apresenta especificidade a várias espécies de diversas famílias, como Coleoptera (Cerambycidae, Curculionidae, Ipidae, Lucanidae, Nitidulidae), Lepidoptera (Pyralidae), Homoptera (Cicadidae), Hymenoptera (Vespidae), Phasmatodea e Orthoptera (VESTERGAARD, 2002).

As espécies *B. bassiana* e *B. brongniartii* produzem metabólitos tóxicos aos insetos que contribuem com a sua patogenicidade *in vitro* e *in vivo* (ZIMMERMANN, 2007). A maioria dessas moléculas são metabólitos secundários de baixo peso molecular em sua grande maioria peptídeos cíclicos, como beauvericina e bassianolida, e os pigmentos bassianina e tenelina. Além dessas moléculas, uma proteína hidrofílica tóxica semelhante à quitosanase também foi identificada como metabólito produzido por *Beauveria ssp* (FUGUET; VEY, 2004). O principal metabólito produzido por *B. brongniartii* é a oosporina, enquanto o

metabolito secundário ciclosporina A é produzido principalmente por *B. bassiana*. O conhecimento acerca dos metabólitos produzidos pelos fungos entomopatogênicos é de extrema importância para elucidar o modo de ação que a espécie desempenha no hospedeiro, para procurar novos produtos químicos para uso no controle de pragas, avaliar a segurança de fungos específicos propostos para uso no controle de pragas e ainda conduzir estudos químicos básicos sobre produtos naturais (ROBERTS, 1981).

M. anisopliae (Metsch.) Sorokin é bastante conhecido por parasitar vários insetos e por apresentar a possibilidade de produção em massa e o uso de diversas técnicas de aplicação (ALVES, 1998; KASSA et al., 2008). *M. anisopliae* também produz metabólitos secundários e toxinas, como beauvericinas, oosporeina, bassianolides, tenellina, bassiacridina, destruxinas, ácido oxálico, entre outros. Entretanto, a função específica desses metabólitos durante o processo de infecção do hospedeiro ainda não foi elucidada (VEY et al., 2001). Em 2009, Coutinho demonstrou que *M. anisopliae* infecta e causa mortalidade de aproximadamente 10 % das larvas de *Deatrea Saccharalis*, enquanto Zappelinni et al. (2010) demonstraram que as linhagens *M. anisopliae* IBCB 384 e *M. anisopliae* IBCB 425 causaram mortalidade de 96 % e 82 % em larvas de *D. saccharalis*, respectivamente. No Brasil, anualmente, mais de 20 % dos 9 milhões de hectares de cana-de-açúcar são tratados com *M. anisopliae* para controlar os cercopídeos *Mahanarva fimbriolata* e *M. spectabilis*, popularmente conhecidas como cigarrinhas (PARRA, 2014; VAN LENTEREN et al., 2017).

Paecilomyces sp. é um gênero reconhecido por parasitar nematoides e por causar epizootias em insetos como ácaros, moscas de frutas e percevejos (JIJI et al., 2006; FIELDER; SOSNOWSKA, 2007; RAMBADAN et al., 2011, apud AMALA et al., 2012). *Paecilomyces* sp. apresenta muitas espécies termófilas, sendo os estados perfeitos (fase sexuada) classificados no gênero Ascomicetos, enquanto o grupo *Isarioidea* contém mesófilos, incluindo várias espécies entomopatogênicas ou nematófagas bastante estudadas como *P. fumosoroseus*, *P. farinosus*, *P. lilacinus*, *P. amoeneroseus*, *P. tenuipes* e *P. javanicus* (INGLIS; TIGANO, 2005).

P. fumosoroseus é patogênica a diversos insetos como a mosca-branca (*Bemisia tabaci*; Hemiptera, Aleyrodidae), traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella* L.; Lepidoptera: Plutellidae) e a mosca-branca da folha prateada (*Bemisia argentifolii*; Hemiptera, Aleyrodidae) (IBRAHIM; LOW, 1993; WRAIGHT et al., 1998). Atualmente, já existe um bioinseticida de interesse comercial significativo para o controle de moscas brancas, produzido utilizando *P. fumosoroseus* (LACEY et al., 2001).

Paecilomyces sp. também foi descrito como produtor de 13 metabólitos secundários, como as paeciloxocinas A (C₂₁H₂₄O₆) e B (C₂₃H₂₆O₇). As paeciloxocinas A exibiram atividade citotóxica em ensaios *in vitro*, enquanto as paeciloxocinas B demonstraram atividade antimicrobiana (WEN et al., 2010).

Outro gênero com ação entomopatogênica é o *Aspergillus* sp, da ordem Ascomycota. Espécies desse gênero podem apresentar uma condição conhecida como pleomorfismo devido a sua capacidade de produzir esporos mitóticos (assexuais) ou meióticos (sexuais) (REYNOLDS, 1994). Aproximadamente um terço das espécies de *Aspergillus* conhecidas apresentam estágio sexual, e em sua maioria são homotáticos, ou seja, podem produzir tanto esporos meióticos quanto esporos mitóticos (GEISER, 2008). O gênero *Aspergillus* é um dos mais importantes para a Biotecnologia, pois algumas espécies já são utilizadas no setor industrial a partir da fermentação para produção de enzimas, compostos farmacêuticos e ácidos orgânicos, contribuindo significativamente na economia. Uma espécie que merece destaque nessa vertente é o *A. niger*, que começou a ser explorado na indústria em 1919 para produção de ácido cítrico através de técnicas de fermentação. Devido a sua habilidade de produzir enzimas extracelulares, ácido cítrico, ácidos fumárico e glucônico, *A. niger* continua sendo bastante estudado e representa um dos micro-organismos mais importantes para a Biotecnologia (SCHUSTER et al., 2002).

Outras espécies de *Aspergillus* como o *A. parasiticus* e o *A. flavus* primeiramente descritas como espécies entomopatogênicas que atacam cochonilhas da cana-de-açúcar (*Pseudococcus calceolariae* e *Saccharicoccus sacchari*) são caracterizadas por apresentarem propriedades inseticidas contra várias espécies de insetos e ácaros e pela capacidade de produção de aflotoxinas conhecidas por desencadear intoxicações crônicas e cutâneas em mamíferos e efeitos carcinogênicos em diversos organismos (DRUMMOND; PINNOCK, 1990). *A. flavus* foi utilizado no controle biológico da *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) e garantiu uma mortalidade 100 % das moscas em todos os bioensaios na concentração 10⁸ conídios/mL⁻¹ (NUNES et al., 2002).

A. clavatus (Eurotiales: Trichocomaceae) isolado de um gafanhoto (*Oedaleus senegalensis*) também demonstrou potencial para uso no controle biológico. Estudos demonstraram que o *A. clavatus* foi patogênico contra larvas dos mosquitos *Aedes aegypti* L., *Anopheles gambiae* s.l. Giles e *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) (SEYE et al., 2009). Já o *A. oryzae*, muito utilizado na fermentação de alimentos orientais, também foi caracterizado como entomopatogênico por parasitar gafanhotos da espécie *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae) (ZHANG et al., 2015). Outros estudos demonstraram a capacidade de

Aspergillus sp. em controlar populações de *Creontiades dilutus*, um inseto herbívoro endêmico da Austrália que ataca o algodoeiro transgênico em culturas comerciais de algodão transgênico (MENSAH; AUSTIN, 2012). Estudos recentes demonstraram que o *A. giganteus* foi eficaz no controle biológico do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, causando pelo menos 50 % de mortalidade em experimentos *in vitro* (COSTA et al., 2003).

Penicillium sp., apresentam as fases anamorfas (ciclo assexual) e teleomorfas (ciclo sexual). Algumas espécies desse gênero já foram descritas como entomopatogênicas, como *P. corylophilum*, *P. fellutanum*, *P. implicantum*, *P. janthinellum*, *P. viridicatum* e *P. waksmanii* que demonstraram capacidade de parasitar e causar mortalidade em larvas de *Ae. fluviatilis*, *A. aquasalis* e *C. quinquefasciatus* (COSTA et al., 1998). Além disso, outro estudo demonstrou que uma linhagem de *Penicillium* sp. apresentou atividade ovicida significativa contra *Ae. aegypti* em experimentos *in vitro* (LUZ et al., 2007). *P. citrinum* foi capaz de causar mortalidade em larvas de *C. quinquefasciatus in vitro*, e reduziu a sobrevivência dessas larvas em um teste de campo (MAKETON et al., 2013).

3.2 Mecanismos biológicos da ação dos fungos entomopatogênicos sobre os insetos

Os fungos entomopatogênicos são capazes de penetrar a cutícula do inseto hospedeiro, ou seja, não precisam ser ingeridos para desempenhar sua função patogênica, o que lhes confere uma vantagem em comparação com outros entomopatógenos, como nematoides e bactérias. O mecanismo que o fungo desempenha no processo de infecção do hospedeiro pode variar dependendo da espécie do fungo e do próprio hospedeiro, sendo a interação entre estes influenciada por diversos fatores ambientais como umidade, temperatura, radiação e luz, condições nutricionais e pela susceptibilidade do hospedeiro em questão (RUSTIGUEL et al., 2017). De modo geral, o ciclo apresenta as fases de adesão, germinação, formação dos apressórios, formação das estruturas de penetração, penetração, colonização e reprodução do fungo (ALVES et al., 1998) (Figura 1).

A adesão ocorre basicamente em três etapas: primeiramente é observado a adsorção dos conídios na superfície da cutícula do inseto, posteriormente ocorre a adesão dos propágulos pré-germinativos na epicutícula e por fim ocorre a germinação e o desenvolvimento do fungo na superfície do inseto até o desenvolvimento do apressório para iniciar o estágio de penetração (FARGUES, 1984). O processo de adesão é uma fase complexa que ocorre após o contato fungo-hospedeiro e funciona como uma preparação para a penetração. Os mecanismos envolvidos nessa fase ainda não foram totalmente elucidados,

em alguns fungos pode ser um processo simples enquanto em outros ocorrem interações moleculares complexas entre o entomopatógeno e a superfície do hospedeiro que servirá de alimento para o fungo. Nesse processo, existem forças eletrostáticas atuantes que varia dependendo da espécie do fungo, além de ser relacionado com a camada de microbastonetes geralmente de composição lipoproteica. Esse processo é dependente da constituição enzimática na superfície dos conídios não-germinados (sendo as principais enzimas esterases e proteases) e alteram a superfície do tegumento do inseto hospedeiro favorecendo a nutrição do fungo e posteriormente sua germinação (ALVES, 1998).

A expressão de enzimas hidrolíticas como as proteases, quitinases e lipases associada a outros fatores, como condições favoráveis de temperatura, pH, umidade, oxigênio e nutrição, promovem a germinação e o crescimento do fungo através da superfície do hospedeiro seguida da penetração das camadas cuticulares. O fungo então germina sobre o inseto e produz um tubo germinativo. A germinação também pode ser favorecida pela presença de nutrientes como esterol, aminoácidos, hexoses entre outros, e afetada pelas substâncias químicas existentes na superfície do inseto hospedeiro (ácidos graxos, fenóis, lipídeos ou ainda a microflora saprofítica na sua superfície) (ZHENG et al., 2011; XIAO et al., 2012).

Na extremidade do tubo germinativo formado no processo de germinação, ocorrem alterações morfológicas como a dilatação das hifas formando uma estrutura chamada de apressório. Essa estrutura exerce uma pressão para o interior do inseto, iniciando a penetração do fungo na cutícula do inseto. Essa estrutura é conhecida como grampo de penetração (ALVES, 1998; DÍAZ et al., 2006; MARANHÃO, 2008).

Na penetração estão envolvidos processos físicos e químicos que vão culminar no aumento do metabolismo do tubo germinativo e na penetração mecânica do fungo. O principal processo físico é o rompimento das áreas membranosas ou esclerosadas a partir da hifa terminal, enquanto o processo químico envolve a produção de enzimas (proteases, lipases e quitinases) que facilitam esse processo. Os locais de penetração do hospedeiro podem ser o aparelho bucal, ânus, espiráculos (local do sistema respiratório onde o ar entra no organismo do inseto), sifão respiratório (capta o oxigênio na superfície da água ou em plantas submersas), tarsos (região articulada na perna dos insetos), mas a porta de entrada mais comum localiza-se nas membranas intersegmentais do abdome. A penetração oral também pode ocorrer dependendo da espécie do fungo e do hospedeiro (ex.: pernilongos) (ALVES, 1998).

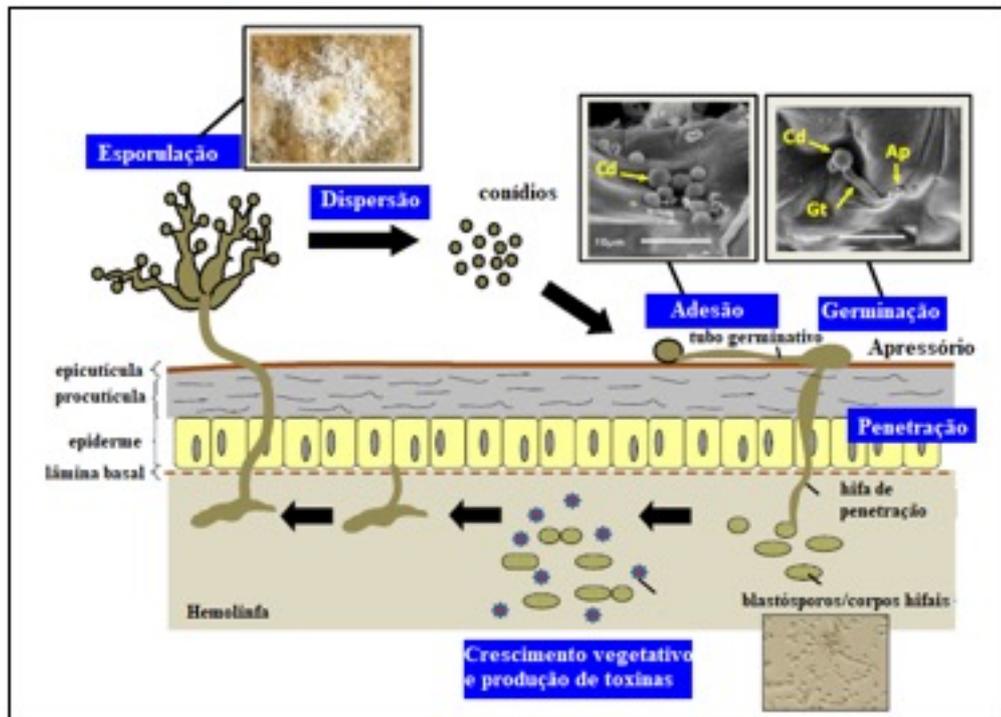
Depois da penetração, se inicia o processo de colonização do inseto hospedeiro. A hifa engrossa e se ramifica no tegumento e depois na hemocele produzindo novos conídios e outros corpos hifais, estruturas que podem ser unicelulares ou multicelulares que perderam a parede celular mas possuem uma capa fibrilar delgada na membrana plasmática sendo então responsáveis pela nutrição do fungo entomopatígeno através da degradação das fontes de carbono presentes na hemolinfa do inseto hospedeiro (MARANHÃO, 2008; RAMÍREZ et al., 2014; VERÍSSIMO, 2015). Apesar de iniciar na hemocele, a colonização continua no resto do corpo do hospedeiro (sistema nervoso, digestivo túbulos e corpos gordurosos) podendo colonizar todos os órgãos do inseto (MARTÍNEZ, 2014). Durante esse processo, os fungos podem secretar toxinas que podem afetar a fisiologia do hospedeiro. Por outro lado, o hospedeiro pode desencadear na hemocele reações humorais e celulares de defesa contra a presença do fungo, como encapsulação e nodulação. O tempo dessa fase pode variar dependendo do inseto, do fungo e das condições ambientais. Alguns fungos podem matar o hospedeiro apenas pelo consumo dos seus nutrientes, pois não secretam toxinas, esses fungos então se desenvolvem e se disseminam dentro do hospedeiro (ALVES, 1998; RAMÍREZ et al., 2014). Após o processo de colonização, ocorre a reprodução e propagação do entomopatígeno.

Durante a infecção do hospedeiro, os fungos produzem diversos compostos como enzimas (ex.: proteases, quitinases e lipases) e toxinas que desempenham funções primordiais no processo de infecção, pois podem estar relacionadas às proteínas da superfície que medeiam a fixação dos conídios na cutícula do hospedeiro e podem auxiliar no processo de degradação da cutícula, na formação do apressório e interferir nos sistemas fisiológico e neurológico do hospedeiro reduzindo sua resposta imune (AMIRI-BESHELI et al., 2000; QUESADA-MORAGA; VEY 2004; XU et al., 2008; XU et al., 2009; ORTIZ-URQUIZA et al., 2013, apud RUSTIGUEL et al., 2017).

Dentre os sintomas iniciais da infecção destacam-se o aparecimento de manchas escuras no tegumento, o inseto diminui ou cessa a alimentação tornando-se mais fraco e podendo demonstrar paralisia, desorientação e perda de coordenação dos movimentos. O tegumento pode então sofrer uma alteração de cor dependendo do fungo que o infectou, os insetos tornam-se mumificados e posteriormente pode assumir uma coloração esbranquiçada no caso de *B. bassiana* ou verde oliva no caso de *M. anisopliae*, resultante do crescimento do micélio (ALVES, 1998; PASTOR, 2013). Após a morte dos insetos, as hifas começam a emergir dos cadáveres que ficam recobertos com uma massa micelial. Quando as condições ambientais não são favoráveis, o fungo permanece no interior do inseto, sobrevivendo por um

tempo até o momento em que as condições externas se tornem adequadas. A massa micelial contém os conidióforos, os quais originam novos conídios em um fenômeno conhecido como conidiogênese (SÁNCHEZ et al., 2001; SCHAPOVALOFF et al., 2015; AGALI et al., 2017).

Figura 1 – Ciclo de infecção do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* em um invertebrado (adaptado de MASCARIN; JARONSKI (2016)).



Fonte: Adaptado de MASCARIN e JARONSKI (2016).

3.3 Enzimas proteolíticas e sua relação com a patogenicidade de fungos filamentosos entomopatogênicos

O mecanismo principal de infecção dos fungos entomopatogênicos aos seus diversos hospedeiros envolve diversas enzimas hidrolíticas que auxiliam os fungos a adentrar o hospedeiro, sobrecarregando-o em um processo degradativo que faz com que as hifas possam penetrar através da cutícula do inseto-hospedeiro parasitando-o, além de obter nutrientes para seu crescimento e reprodução. Dentre essas enzimas, as proteases representam a principal classe enzimática no processo de infecção. Sua importância é destacada pela diversidade de

genes encontrados nos genomas desses organismos (ORTIZ-URQUIZA; KEYHANI, 2013). A cutícula do inseto é composta majoritariamente por microfibras cristalinas de quitina em uma matriz proteica, sendo as enzimas proteolíticas, como as proteases, as primeiras enzimas produzidas no processo de infecção (PEDRINI et al., 2007). Essa ação foi demonstrada em estudos realizados na década de 1980 onde foi observado que as proteases atacam a cutícula do inseto-hospedeiro antes das enzimas quitinolíticas como quitinases e N-acetilglucosaminidases, já que as proteínas recobrem e protegem as microfibras de quitina (SMITH et al., 1981; FUKAMIZO; KRAMER, 1985).

Além da importância na degradação da cutícula dos insetos, as proteases são fundamentais para o crescimento saprófito do fungo. Podem atuar como fator de virulência e ainda ativar oxidases como a prophenol oxidase na hemolinfa do inseto hospedeiro, contribuindo fortemente no processo de infecção (KHAN et al., 2012).

Três proteases principais foram isoladas, purificadas e caracterizadas a partir do fungo *M. anisopliae*: Pr1, Pr2 e Pr4 (ST LEGER et al., 1987; COLE et al., 1993 apud SAMUELS e PATERSON, 1995). Pr1 demonstrou atuar como uma protease não-específica, hidrolisando diversos substratos como soro bovino, elastina, caseína, colágeno, e a cutícula dos insetos-hospedeiros. Pr2 é uma protease que ocorre aparentemente como 3 isoenzimas, sendo que apenas uma foi caracterizada, e demonstrou a habilidade em degradar caseína e albumina. A Pr4 por sua vez, foi classificada como uma protease que degrada cisteína (ST LEGER et al., 1987).

3.4 Praga da maçã do algodoeiro - A lagarta da maçã *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae)

A cultura do algodoeiro é uma das mais importantes, do ponto de vista econômico, no Brasil. Aproximadamente 1.071 hectares de área cultivada são de algodão. A maior concentração da cotonicultura localiza-se na região Centro-Oeste (Mato Grosso) e desde as safras dos anos 1998 e 1999 é considerada a região maior produtora do Brasil. Seguindo dessa região, o Nordeste ocupa o segundo lugar em produção, sendo a Bahia o maior estado produtor. O Mato Grosso e a Bahia são responsáveis por aproximadamente 85 % da área plantada de algodão (FACUAL, 1999; CONAB, 2015).

Apesar do maior centro de produção ser localizado na região do cerrado, a região semiárida também apresenta condições ambientais favoráveis para a produção do algodão, aumentando a geração de empregos e a fonte de renda da população local, e, portanto,

contribuindo para a maior produção dessa matéria-prima (BELTRÃO et al., 2009). Apesar da maior parte da cultura do algodão localizar-se no Mato Grosso e na Bahia, a produção de produtos industrializados a partir do algodão concentra-se nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Ceará, nas indústrias de tecelagem e fiação. Existem três grandes vertentes quanto ao segmento do algodão: a cotonicultura em si, que representa a utilização do algodão em pluma, o segmento da fiação ao tecido (onde enquadra-se a indústria têxtil), e o setor de confecção que contribui significativamente com a estabilização da economia (TURRA, 2004 apud BERTOLLETI; CAMILO, 2007).

Em todas as regiões onde prevalece a cotonicultura, em especial no Cerrado brasileiro, ocorre inúmeras pragas durante o ciclo de produção do algodão, que podem acarretar prejuízos. O algodoeiro é uma das culturas mais susceptíveis ao ataque de pragas, sendo mais de vinte conhecidas (GALLO et al., 1988), o que faz com que seu manejo necessite de cuidados acima dos padrões para garantir o sucesso no cultivo. Para o controle dessas pragas, faz-se necessário a utilização de um controle químico, geralmente de alto custo e que acaba gerando um aumento no custo final do algodão, afetando a produção e a comercialização do mesmo, e tornando-o menos competitivo no mercado mundial (PERES et al., 2012).

Dentre as pragas que afetam o algodoeiro destaca-se a lagarta-da-maçã, *H. virescens* (Figura 2). Essa praga é amplamente distribuída no continente americano, podendo utilizar como hospedeiras várias famílias de plantas, com destaque o algodoeiro e outras culturas economicamente significativas como tomate, tabaco, soja, girassol, trigo, abóbora, pimentão, berinjela, milho, ervilha, feijão e cana-de-açúcar (YÉPEZ et al., 1990; McCAFERRY, 1998; SAZAKI, 2004; BLANCO et al., 2006). A lagarta *H. virescens* pode consumir seis estruturas frutíferas, principalmente maçãs, botões florais, folhas e flores, mas também podem atacar vagens e grãos. Essa praga faz buracos na planta adentrando os botões florais, destruindo e ocasionando sua queda (PAPA, 2003; DOMINGUES, 2011). Para cada 5 % de infestação, estima-se uma destruição de 25 % das maçãs, causando danos irreversíveis e um elevado prejuízo dependendo do estágio do algodoeiro quando ocorre a infestação pela praga (GARCIA, 1971; SANTOS, 1977). Além de alimentarem-se das estruturas reprodutivas da planta hospedeira, a infestação por *H. virescens* pode propiciar um aumento na penetração de micro-organismos, aumentando ainda mais as perdas causadas por esta (SCHECK; GOULD, 1995). Além do prejuízo provocado por sua infestação, *H. virescens* é de difícil controle e tem habilidade de desenvolver resistência aos defensivos agrícolas (SAZAKI, 2004).

Figura 2 – Lagarta *Heliothis virescens* (estágio L3).



Fonte: Autor, 2018.

Atualmente, as estratégias de controle da *H. virescens* envolvem a utilização de inimigos naturais como os percevejos *Orius* sp., *Geocoris* sp., e *Tropiconabis* sp., em locais de baixa infestação da praga para manter as populações de *H. virescens* abaixo dos níveis que causam danos econômicos. Além disso, também são utilizadas medidas de controle cultural como a prática da semeadura concentrada das áreas vizinhas de algodão em até 30 dias, contribuindo para a diminuição da migração das mariposas. O controle químico, entretanto, é o mais utilizado. Para evitar danos ambientais mais graves e o desenvolvimento de populações resistentes, são mais indicados inseticidas fisiológicos ou biológicos nos casos de infestação na fase inicial (MIRANDA, 2010).

Nos casos onde os níveis de infestação podem levar a perdas econômicas, entretanto, essa abordagem pode levar a seleção por resistência. Atualmente, com o avanço da biotecnologia, têm sido utilizadas plantas geneticamente modificadas (controle genético), principalmente o algodoeiro *Bt*, que contém um gene de uma bactéria encontrada no solo, *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Bt*) que confere resistência a algumas espécies de pragas (SHARMA; ORTIZ, 2000; PAPA, 2003, SAZAKI, 2004). Apesar de apresentar resistência a algumas pragas, alguns estudos indicam que não há diferença quanto a ocorrência de lagartas

H. virescens em plantas de algodoeiro *Bt* e não *Bt* (BLANCO et al., 2007; PERES et al., 2012). Além disso, por apresentar diversas espécies de inimigos naturais, como vespinhas e trichogramma, o algodoeiro também pode contar com o controle biológico natural das pragas (JÚNIOR et al., 2006).

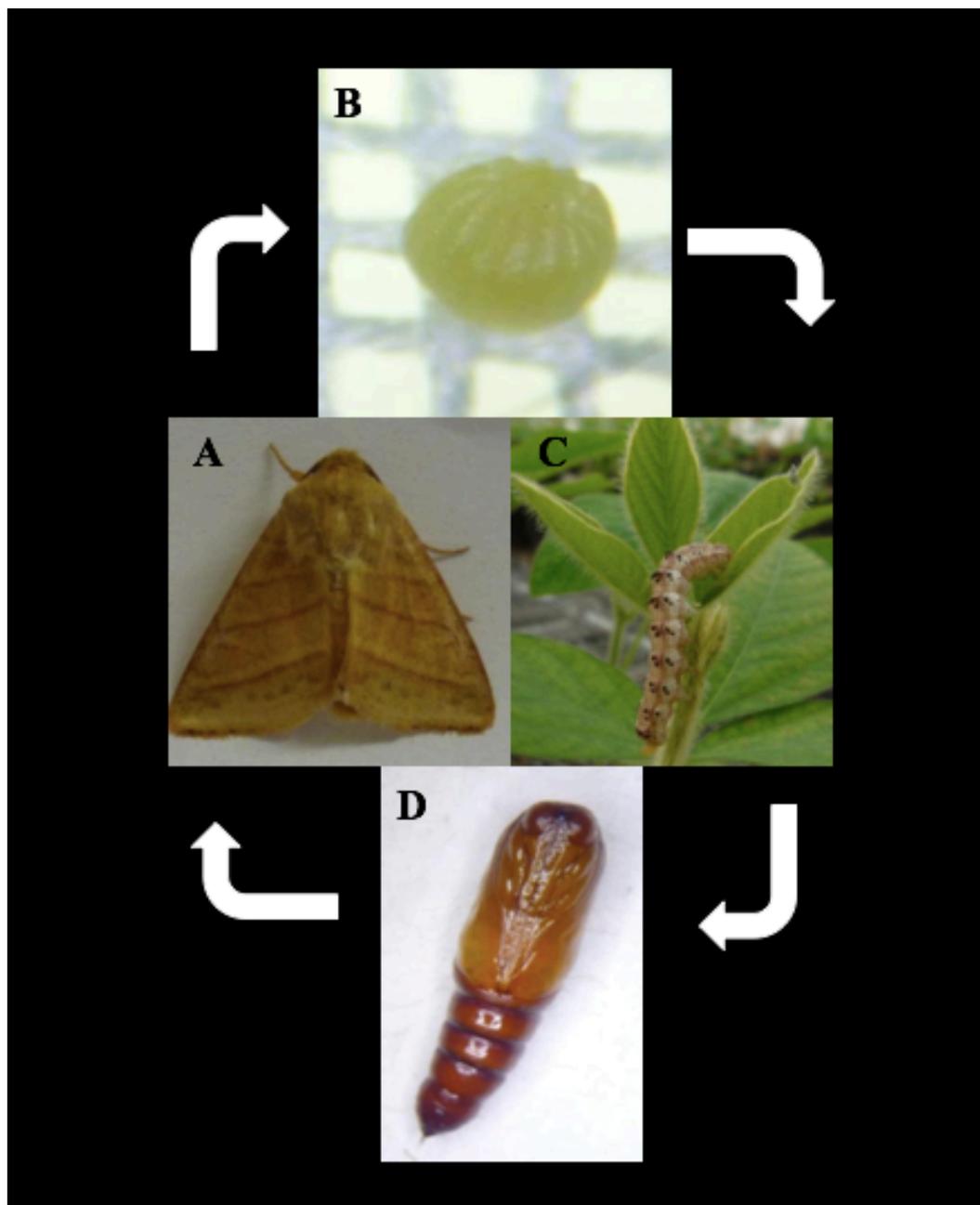
Quanto aos aspectos biológicos da *H. virescens*, seus ovos são de forma esférica, com a base achatada e branco-amarelados. O ciclo de vida da *H. virescens* (Figura 3) inicia-se com a deposição dos ovos em botões florais, flores e frutos, levando de 3 a 5 dias para eclodirem. Quando próximos de eclodirem, em cerca de três dias, alteram sua cor para cinza. São depositados entre 300 a 600 ovos por vez sobre as brácteas, folhas novas e brácteas de botões florais (SANTOS, 2001; RODRIGUES FILHO, 2001; MOREIRA et al., 2009). As lagartas dessa espécie geralmente desenvolvem-se entre 5 a 6 instares larvais (fases L1 a L6) e possuem diferentes colorações. Nessas fases ocorrem alterações morfológicas como por exemplo o aumento da largura da cabeça das larvas que eclodem com 0,26 mm e crescem atingindo 2,87 mm na fase L6. O comprimento das lagartas também pode variar entre 1,4 mm no primeiro instar (L1) e 36 mm no quinto instar (L5) (FYE; McADA, 1972).

Quando recém-eclodidas são verdes, depois de um período tornam-se verde-claro, creme, marrom cinza ou rosa, sendo variável de acordo com condições ambientais, tais como temperatura e tempo de vida ou ainda a exposição a produtos químicos. Possui tubérculos escuros e com pelos e placa dentada na face interna, apresenta pontuações salientes e escuras no corpo e quatro pares de falsas pernas. Seu período de crescimento pode variar dependendo da temperatura, sendo em geral cerca de 26 dias, atingindo entre 20mm e 25mm de comprimento (SANTOS, 2001; ANDRADE, 2007). A pupa da *H. virescens* (período entre a fase de larva e a fase adulta) é uma fase que dura de 10 a 18 dias, apresentando coloração vermelha, e tornando-se marrom escura quando esta próxima da fase adulta. A fase de pupa inicia-se após a lagarta se desenvolver e descer da planta, ocorrendo no solo. Na fase adulta torna-se uma mariposa com asas dianteiras verdes, e três linhas transversais vermelhas. Seu período de vida é de cerca de 15 dias, em uma temperatura de 30 °C, podendo deslocar-se para outras regiões dependendo das condições locais (MOREIRA et al., 2009; DOMINGUES, 2011). O seu ciclo de vida ocorre geralmente nos meses mais quentes. As fases larval, pupal e adulta maturam-se mais rapidamente em temperaturas mais elevadas, ocasionando também uma maior velocidade de senescência. Em regiões mais frias, a *H. virescens* apresenta um ciclo de vida mais lento (FYE; McADA, 1972).

Devido a sua alta capacidade de destruição, essa praga causa prejuízos econômicos consideráveis. Um estudo realizado em 1961 por Sauer, demonstrou que uma única lagarta de

H. virescens pode devastar até 24 estruturas reprodutivas do vegetal (SAUER, 1961 apud SAZAKI et al., 2004). *H. virescens* apresenta uma elevada capacidade de reprodução, podendo alcançar 3 gerações e um só ciclo, além de possuir movimentos migratórios para regiões favoráveis para sua propagação aumentando sua taxa populacional (DOMINGUES, 2011).

Figura 3 – Ciclo de vida da *Heliothis virescens*. (A) adulto; (B) ovo; (C) lagarta; (D) pupa (crédito: Caroline Targino adaptado de LINS, 2014).



Fonte: Adaptado de LINS, 2014.

3.5 Importância do controle biológico

Uma diversidade de fitopatógenos podem causar doenças em culturas importantes, sendo responsáveis por perdas inestimáveis. Dentre as diversas causas que resultam na diminuição da produtividade das culturas, as pragas são as mais significativas por ocasionar perdas econômicas estimadas em 40 bilhões de dólares em todo o mundo (ROBERTS et al., 2006; RAHMAN et al., 2018).

De forma geral, o controle de pragas é realizado com inseticidas, os quais nem sempre são eficientes, além de reduzirem a população de inimigos naturais (PAPA, 2006). Por outro lado, o controle é essencial para garantir a produtividade de alimentos, fibras e materiais. Dentre as alternativas para o controle de pragas, o controle biológico pode ser a melhor opção no desenvolvimento de técnicas e produtos de baixo custo, sustentáveis e que causem o mínimo de danos para a plantação e para os consumidores (RAHMAN et al., 2018).

O controle biológico clássico teve início no final do século XIX na Califórnia, Estados Unidos, através da utilização de *Cryptochaetum iceryae* e *Rodolia cardinalis* para controlar a praga *Icerya purchasi*, popularmente conhecida como cochonilha australiana ou pulgão branco, um inseto-praga que ataca principalmente frutas cítricas. Desde então, mais de 5.000 programas de controle biológico através da introdução de inimigos naturais de pragas já foram registrados, utilizados cerca de 400 espécies de artrópodes conhecidas (GREATHEAD, 1992; HILL; GREATHEAD, 2000).

O principal princípio do controle biológico baseia-se na redução da dependência da utilização de agroquímicos e dos riscos para o meio ambiente e para a saúde humana (COOK; BAKER, 1983). O controle biológico utilizando entomopatógenos pode ser definido como a utilização de bactérias, fungos, vírus, nematoides e protozoários no controle de insetos-praga (ALVES, 1998). Esse processo pode incluir diversas interações como por exemplo a supressão do inseto-praga utilizando outros organismos ou aplicando micro-organismos antagonistas ou patogênicos a este (RAHMAN et al., 2018). Além disso, é importante ressaltar que a utilização de programas de controle biológico diminuiu consideravelmente as perdas nas culturas por ataques de insetos-praga, conservando os recursos naturais por utilizar práticas ecologicamente corretas e seguras, sendo considerado uma estratégia fundamental do manejo integrado de pragas (KOGAN, 1998).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolamento e identificação

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética Molecular e Biotecnologia Vegetal do Centro de Biotecnologia – CBIOTEC – UFPB (Universidade Federal da Paraíba). Foram utilizados seis isolados fúngicos descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Origem dos isolados de fungos filamentosos com ação entomopatogênica.

Espécie fúngica	Substrato de isolamento/Origem
*• <i>Beauveria bassiana</i> – Acesso URM 2915	<i>Nezara viridula</i> /▪CENARGEM/PR – 1987
*• <i>Beauveria brongniartii</i> – Acesso URM 6504	Solo de sistema agroflorestal/ Abreu e Lima/PE – 2011
*• <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> – Acesso URM 4920	<i>Mahanarva posticata</i> /Usina Serra Grande/Maceió/AL – 2005
<i>Paecilomyces</i> sp. TP08	Óleo diesel/Posto de gasolina/João Pessoa/ Paraíba – 2014
<i>Aspergillus</i> sp.	Formiga cortadeira/Reserva florestal da Universidade Federal da Paraíba, <i>Campus</i> I, João Pessoa/PB – 2017
<i>Penicillium</i> sp.	Peças anatômicas/Complexo Laboratorial do Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal da Paraíba, <i>Campus</i> I, João Pessoa/PB – 2016

* Linhagem utilizada no controle biológico da cigarrinha da cana-de-açúcar no Norte, Nordeste e Sudeste. •Linhagens cedidas pela Micoteca URM do Departamento de Micologia/ Universidade Federal de Pernambuco/UFPE. ▪Centro Nacional Agropecuário de Recursos Genéticos. Fonte: Autor.

4.2 Origem das lagartas

As lagartas adultas foram adquiridas através da Empresa Pragmas.com (<http://www.pragmas.com.vc>).

4.3 Meio de cultura e manutenção da cultura fúngica

Foi utilizado o meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose contendo 10 g de peptona de carne, 40 g dextrose, 15 g de ágar e 1000mL de água destilada, e o pH mantido em torno de

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.

4.4 Crescimento radial

Fragmentos da cultura fúngica foram colocados no centro da placa de Petri contendo o meio de cultura específico. Em seguida, as placas foram mantidas em temperatura ambiente. As observações foram feitas durante 12 dias para caracterização do aspecto macroscópico da colônia.

4.5 Meio de cultura para caracterização da atividade proteolítica

Foi utilizado o meio-ágar-leite preparado com 50 g de leite Molico desnatado Nestlé®, 15 g de ágar, 1000mL de água destilada e pH 6,8. O meio foi autoclavado durante 15 minutos a 120°C e em seguida, distribuído em placa de Petri.

4.6 Atividade Proteolítica

O inóculo do fungo foi colocado no centro da placa de Petri sobre o meio de cultura ágar-leite. Foi avaliada no período de 12 dias, a capacidade de degradação da caseína do leite em pó, única fonte de nitrogênio adicionada ao meio, para medir a atividade proteolítica de todos os isolados fúngicos. A degradação foi avaliada macroscopicamente pela formação do halo transparente ao redor da colônia.

4.7 Determinação da atividade proteolítica e do índice enzimático

Para determinação do índice enzimático (IE), foi utilizada a metodologia descrita por Hankin e Anagnostakis (1975), em que a atividade da espécie avaliada decorre da razão entre o diâmetro da colônia ($\varnothing c$) e o diâmetro da colônia, acrescido da zona de precipitação do halo ($\varnothing h$).

$$IE = \frac{\text{Diâmetro da colônia } (\varnothing c)}{\text{Diâmetro da colônia + Zona de precipitação do halo } (\varnothing h)}$$

A partir do IE, a atividade enzimática (Pz) pode ser classificada como:

A) negativa (IE = 1, Pz = classe 1);

- B) positiva ($0,64 = IE < 1$, Pz = classe 2);
- C) fortemente positiva ($IE < 0,64$, Pz = classe 3).

4.8 Preparo da solução de conídios

Aspergillus sp., *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *Penicillium* sp., foram inoculados em meio de cultura Ágar-Sabouraud-Dextrose 2 %. As placas foram mantidas à temperatura de 25 ± 2 °C, por um período de 10 a 15 dias para crescimento e conidiogênese. Após esse período, os conídios foram coletados, raspando-se a superfície da colônia para a realização dos bioensaios. Para o preparo das suspensões de conídios, utilizou-se água destilada autoclavada e Tween 80 0,01 % (v/v). Em seguida, foi estimada a concentração de conídios em câmara de Neubauer e as suspensões foram padronizadas em $1,0 \times 10^8$ conídios/mL⁻¹ para cada isolado fúngico.

4.9 Avaliação da eficiência e especificidade dos isolados fúngicos sobre a lagarta da maçã (bioensaio)

A metodologia foi adaptada a partir do trabalho de Santos et al. (2007). Para cada espécie de fungo, foi realizado um experimento com 30 lagartas, correspondendo a três repetições de 10 lagartas para cada tratamento (T1 = suspensão de $1,0 \times 10^8$ conídios.mL⁻¹ + Tween 80 e T2 Grupo controle = água destilada autoclavada + Tween 80). As lagartas foram transferidas individualmente para placas de Petri contendo papel de filtro com 1 mL da suspensão de conídios mais a dieta de Greene, cuja composição está demonstrada na Tabela 2 (BUSATO et al., 2006). As placas foram mantidas à temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa de 70 ± 10 %, sendo avaliadas a cada 24 horas durante 10 dias, para observação da extrusão do fungo e confirmação da morte pelo patógeno.

4.10 Técnica da fita adesiva para a visualização dos conídios

Sobre a colônia do fungo cultivado em meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose pressionou-se um pedaço de fita adesiva transparente (Durex) para capturar as estruturas. Em seguida a fita foi pressionada em uma lâmina contendo uma gota de corante azul de lactofenol e posteriormente analisada ao microscópio óptico (ARANGO; CASTAÑEDA, 1995).

4.11 Cultura em lamínula para visualização das estruturas vegetativas e reprodutivas

Em uma placa de Petri contendo meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose foi inoculado pequenos fragmentos do fungo. Em seguida foi colocado uma lamínula limpa e

previamente flambada sobre o fragmento fúngico. As placas foram deixadas à temperatura ambiente e as estruturas foram observadas diariamente a cada 24 h durante 5 dias. As estruturas foram coradas com uma gota de lactofenol azul de algodão e em seguida observadas ao microscópio.

Tabela 2 – Composição da dieta artificial de Greene (adaptado de BUSATO et al., 2006).

Dieta de Greene	
Constituinte	Quantidade
Feijão branco	102,90 g
Germe-de-trigo	82,30 g
Farelo de soja	41,20 g
Leite em pó	30,90 g
Levedura de cerveja	51,40 g
Ácido ascórbico	4,90 g
Ácido sórbico	2,50 g
Nipagin	4,10 g
Solução vitamínica	8,20 mL
Tetraciclina	0,10 g
Formoldeído (40 %)	4,90 mL
Agar	18,90 g
Água	1400,00 mL

Fonte: Adaptado de BUSATO et al., 2006.

4.12 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. A análise estatística dos dados foi realizada pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, conforme análise de variância (ANOVA) utilizando o Proc ANOVA do SAS (SAS Institute, 1999-2001). As médias dos tempos letais (TL₅₀) foram determinadas por meio do Proc Probit (SAS Institute, 1999-2001).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do índice e da atividade enzimática dos isolados fúngicos

Os resultados obtidos a partir da avaliação da capacidade de produção de enzimas proteolíticas extracelulares dos 06 isolados fúngicos estão sumarizados na Tabela 3. O IE é um dos parâmetros semi-quantitativos mais usados para se avaliar a produção de enzimas pelos micro-organismos em meio sólido. Os micro-organismos considerados produtores de enzimas possuem uma correlação direta entre o diâmetro do halo de degradação e a habilidade degradativa (LIN et al., 1991; ARCHER; WOOD, 1995).

Tabela 3 – Índice enzimático (IE) e atividade enzimática (Pz) de 06 isolados de fungos filamentosos entomopatogênicos.

Espécie fúngica	IE	Pz
<i>Beauveria bassiana</i>	0,92	positiva
<i>Beauveria brongniartii</i>	0,90	positiva
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	0,98	positiva
<i>Paecilomyces</i> sp. TP08	0	negativa
<i>Aspergillus</i> sp.	0,94	positiva
<i>Penicillium</i> sp.	0,97	positiva

Fonte: Autor, 2018.

Os fungos foram cultivados em meio contendo uma única fonte de nitrogênio, a caseína do leite. A caseína presente no leite Molico em pó é uma macromolécula composta por aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas, incapaz de penetrar na membrana celular dos micro-organismos. Para que a caseína seja utilizada pelos fungos, precisa ser degradada em peptonas, polipeptídios, dipeptídeos e aminoácidos. Este processo é possível porque os fungos produzem enzimas proteolíticas (proteases) que catalisam a hidrólise da caseína em aminoácidos, os quais são depois assimilados e catabolizados pelas células (GEISSELER; HORWATH, 2008).

Os isolados fúngicos (*Aspergillus* sp., *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *B. bassiana*, *B. brongniartii* e *Penicillium* sp.) com exceção do *Paecilomyces* sp., demonstraram potenciais produtores de enzimas proteolíticas no meio de cultura ágar-leite, porque apresentaram um IE alto e uma Pz positiva (classe 2), mostrando que esses isolados secretam a enzima avaliada.

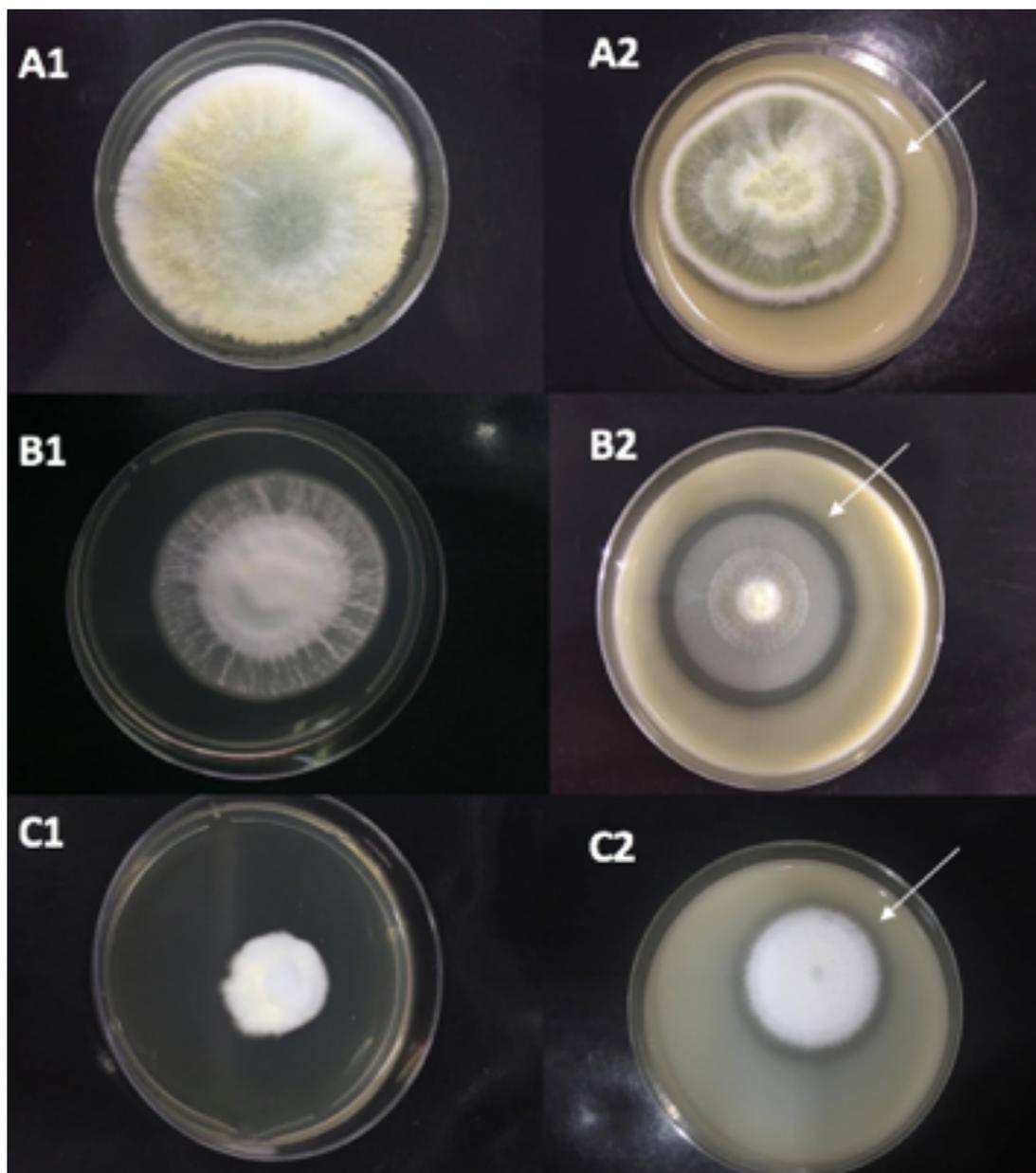
Dentre os fungos filamentosos analisados, *M. anisopliae* var. *anisopliae* apresentou IE de 0,98 e Pz positiva. Foi observado um crescimento radial lento no meio de cultura ágar-leite quando comparado com seu crescimento em meio de cultivo para manutenção (Ágar-Sabouraud-dextrose). Foi observado um halo de 0,1 centímetros (Figura 4 – A1 e A2). O resultado positivo para atividade proteolítica já era esperado, pois vários estudos têm apontado *M. anisopliae* como potencial agente no controle biológico de alguns insetos-praga: besouro do grão do trigo (*Anisoplia austriaca*) e curcúleo da beterraba (*Cleonus punctiventris*), já que as proteases estão envolvidas no processo de infecção do fungo em seus diferentes hospedeiros (DIMBI et al., 2004).

No Brasil, *M. anisopliae* é utilizado no controle biológico de percevejos das pastagens, gênero *Deois*, da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, da cigarrinha da cana-de-açúcar, *Mahanarva posticata* e carrapatos que causam impacto na pecuária (ALVES, 1998; PEREIRA et al., 2008; VERÍSSIMO, 2015). A facilidade de adentrar no hospedeiro devido à alta produção de proteases e outras enzimas faz do *M. anisopliae* um fungo filamentoso com ótima atividade entomopatogênica. *M. anisopliae* var. *anisopliae* possui conídios simples, curtos, de tamanho que pode variar entre 6 à 8 µm de comprimento, ovalados a cilíndricos e truncados nas extremidades. Os conidióforos formam uma cadeia de conídios basipetala que se desenvolvem aderidas umas às outras e densas. Os apressórios dessa espécie podem apresentar forma e tamanho variável, com diâmetro entre 5 à 15 µm e formas globulares ou ovoides (TULLOCH, 1976; ALVES, 1998) (Figura 5 – A1 e A2).

B. bassiana teve seu crescimento relativamente rápido nos dois meios de cultura utilizados. Apresentou uma coloração branca e textura felpuda característica da espécie e uma boa capacidade de esporulação, macroscopicamente. Microscopicamente, o fungo formou conidióforos formando densos cachos com conídios uninucleados (Figura 5 – B1 e B2). Formou um halo de 0,4 centímetros no meio de cultura ágar-leite (Figura 4 – B). Apresentou Pz positiva e IE de 0,92. Essa espécie é bastante explorada no controle biológico de vários insetos-praga na agropecuária (STÜMER et al., 2004).

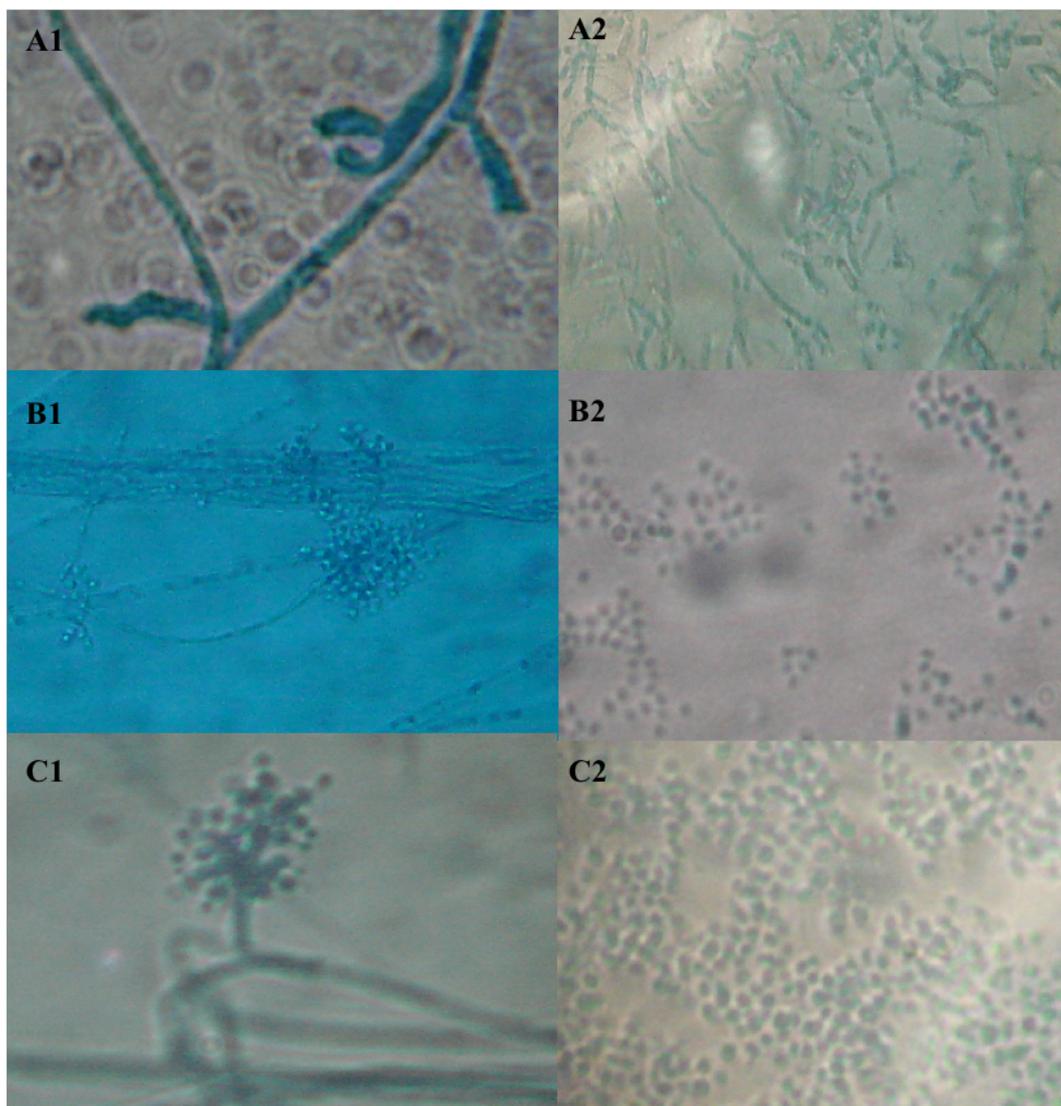
B. brongniartii apresentou também uma atividade proteolítica alta, formando um halo de degradação de 0,4 centímetros (Figura 4 – C1 e C2). Apresentou Pz positiva e IE de 0,90. Apresentou um crescimento rápido e boa capacidade de esporulação, macroscopicamente, além de demonstrar microscopicamente a formação de conídios elipsóides e conidióforos escassos que podem raramente apresentarem-se na forma de cachos (ALVES, 1998) (Figura 5 – C1 e C2). Essa espécie é utilizada no controle biológico parasitando vários insetos-praga (ALMEIDA, 2005; ERLACHER, 2006).

Figura 4 – Aspecto das colônias dos diferentes isolados fúngicos em meio de cultura ágar-Sabourad-dextrose (A1, B1 e C1) e formação do halo de degradação em meio de cultura ágar-leite (A2, B2 e C2). (A) *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*; (B) *Beauveria bassiana*; (C) *Beauveria brongniartii*.



Fonte: Autor, 2017.

Figura 5 – Micrografias dos fungos filamentosos. A – *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (A1 – Apressório e A2 – Conídios; B – *Beauveria bassiana* (B1 – Conidioforo e B2 – Conídios); C – *Beauveria brongniartii* (C1 – Conidioforo e C2 – Conídios).



Fonte: Autor, 2018.

Aspergillus sp. secretam grandes quantidades de enzimas (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2006). Esse gênero é capaz de obter níveis de atividades enzimáticas superiores aos fungos que são geralmente classificados como os melhores produtores de proteases (CARVALHO, 2012). Devido a isso, é um gênero bastante explorado na indústria para diversas finalidades. Dentre as enzimas secretadas pelas espécies, destacam-se as proteases. As espécies de *Aspergillus* sp. geralmente apresentam conidióforo asseptado, conectado a uma hifa vegetativa. O conidióforo estende-se até a vesícula, onde as células conidiogênicas são formadas, originando conídios globosos, hialinos, unicelulares e que se

apresentam dispostos em cadeias (ABARCA, 2000; XAVIER et al., 2008; SILVA, 2009; COSTA et al., 2014; REIS; ROCHA, 2014) (Figura 6 – C1 e C2).

O isolado de *Aspergillus* sp. avaliado neste estudo, formou um halo de degradação de 0,4 centímetros (Figura 7 – B2). Apresentou Pz positiva e IE de 0,94. Nossos resultados coincidem com os de Cuzzi (2011). O autor avaliou o isolado D2-NC (*Aspergillus* sp.), quanto a atividade proteolítica (0,85) e a Pz foi classificada como positiva (classe 2).

As espécies de *Penicillium* possuem potencial para a produção de proteases e outras enzimas de interesse biotecnológico, característica muito visada no ramo da biotecnologia e da indústria atualmente (IKRAM; MUKHTAR, 2007). Os conidióforos desse gênero são ramificados e apresentam células conidiogênicas nas extremidades, originando conídios unicelulares, cuja forma pode ser esférica, elíptica ou oval (KIMATI et al., 1997) (Figura 6 – B1 e B2).

No nosso estudo utilizamos um isolado de *Penicillium* sp. A colônia formou um halo de degradação de 0,1 centímetros (Figura 7 – A1 e A2). Apresentou IE de 0,97 e Pz positiva. Nossos resultados obtidos para as espécies *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. corroboram com os de Bajpai e Patil (1997) e Pinto (2003), que destacam a capacidade desses dois gêneros fúngicos em produzir enzimas extracelulares, sobre diversos substratos. Dentre as enzimas produzidas por ambos os gêneros, destacam-se as proteases. Esses resultados também coincidem com os de Lima (2003), que relatam muitas espécies do gênero *Penicillium* como notáveis produtoras de proteases e amilases, com grande potencial de aplicação em distintas áreas.

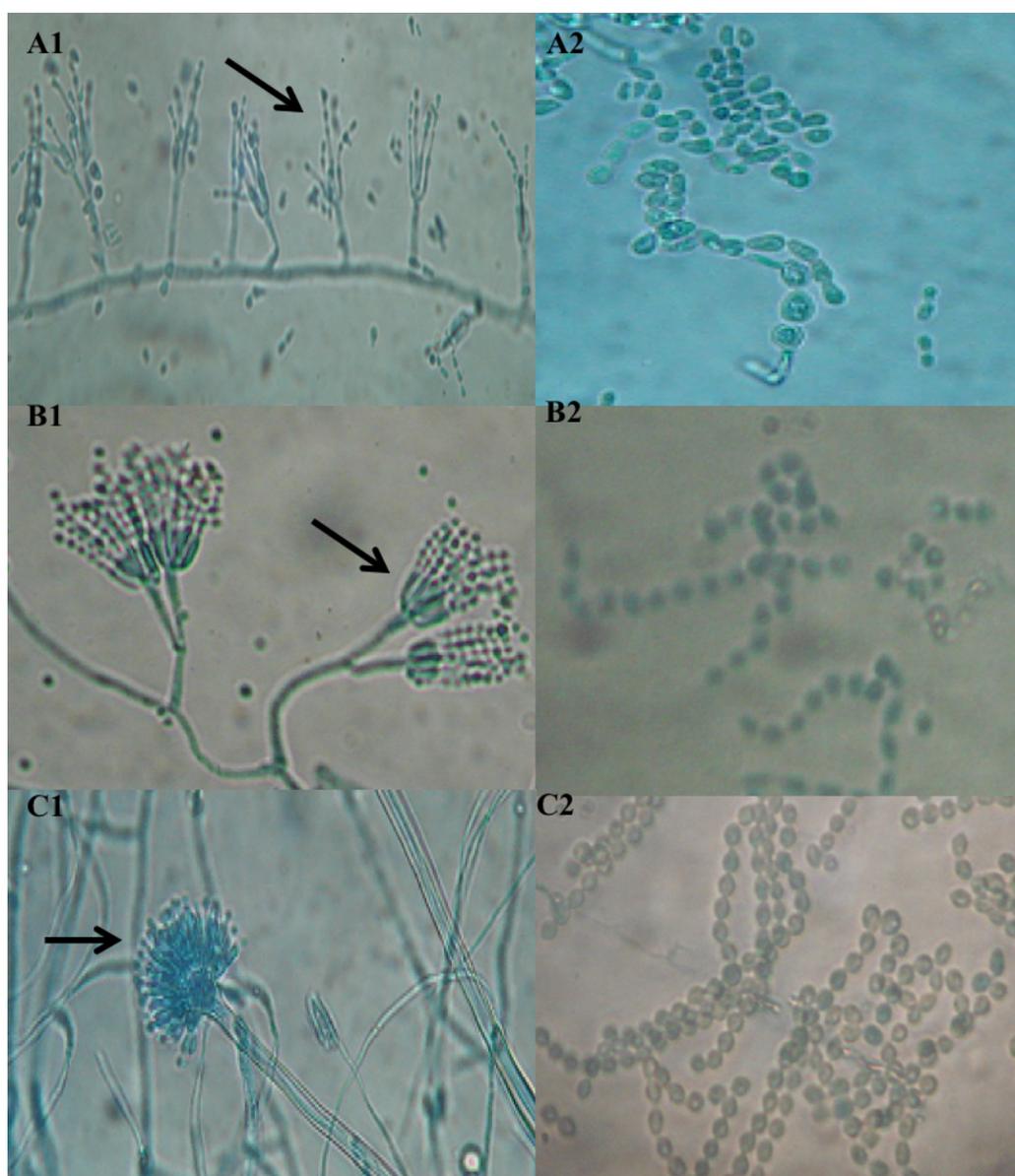
O isolado *Paecilomyces* sp. TP08 apresentou crescimento radial muito lento, tanto no meio de manutenção (ágar- Sabouraud-dextrose) quanto no meio ágar-leite, e não formou um halo de degradação evidenciando Pz negativa (Figura 7 – C1 e C2). A colônia apresentou as características típicas da espécie, um aspecto cotonoso de cor marrom-acinzentada. Os conidióforos de *Paecilomyces* sp. podem ser simples ou verticilados, com longas fiálides, onde originam-se os conídios formando cadeias longas que podem ser hialinos ou pigmentados, elípticos a fusiformes (LOPES, 2007; FAIA, 2011) (Figura 6 – A1 e A2).

Paecilomyces sp. TP08 foi isolado de óleo diesel e mantido neste substrato inicialmente em condições laboratoriais. Foi constatado que houve uma boa adaptação, crescimento e degradabilidade do fungo no óleo diesel (GUEDES et al., 2018). Devido a essa adaptabilidade desenvolvida pelo fungo, pode justificar o baixo desempenho do *Paecilomyces* sp. TP08 no meio de manutenção e no meio ágar-leite. Dessa forma, há necessidade de mais

pesquisas com outros substratos mais adaptáveis ao metabolismo do fungo, os quais permitam medir a atividade enzimática de *Paecilomyces* sp. TP08.

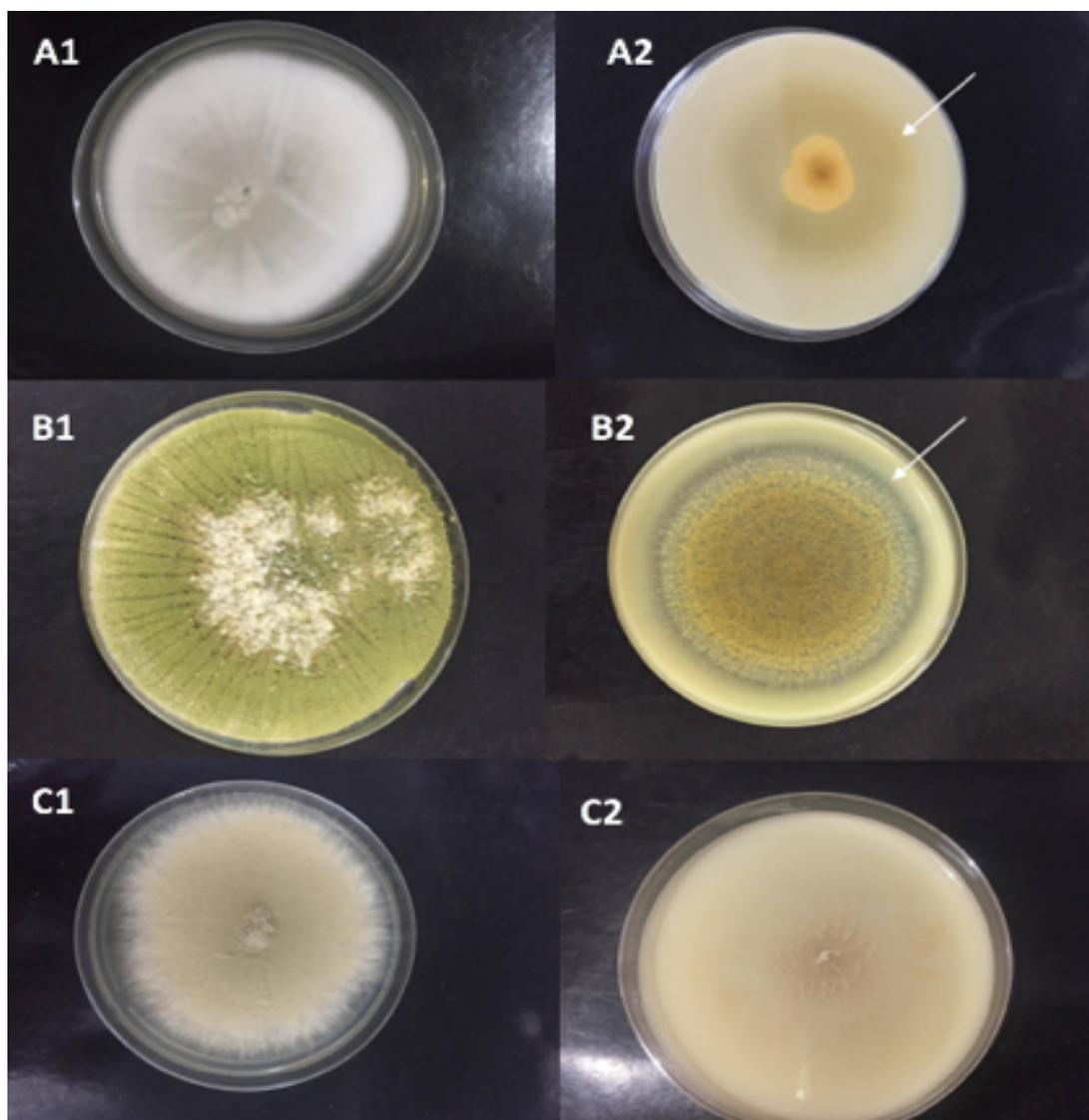
O gênero *Paecilomyces* é atualmente explorado no controle biológico, devido a sua atividade parasitária. Foi encontrado em ovos de nematoides em 1966 e mais tarde descoberto parasitando ovos de *Meloidogyne incógnita* (Nematóide-das-galhas) no Peru (FIEDLER; SOSNOWSKA, 2007; MARTI et al., 2006).

Figura 6 – Micrografias dos fungos filamentosos. A – *Paecilomyces* sp. TP08 (A1 – Conidioforo e A2 – Conídios); B – *Penicillium* sp. (B1 – Conidioforo e B2 – Conídios); C – *Aspergillus* sp. (C1 – Conidioforo e C2 – Conídios).



Fonte: Autor, 2018.

Figura 7 – Aspecto das colônias dos diferentes isolados fúngicos em meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose (A1, B1 e C1) e formação do halo de degradação em meio de cultura ágar-leite (A2 e B2) exceto C2 que não formou o halo. (A) *Penicillium* sp.; (B) *Aspergillus* sp.; (C) *Paecilomyces* sp. TP08.



Fonte: Autor, 2017.

A atividade proteolítica, avaliada em meio de cultura sólido, torna o processo de seleção de linhagens para uso no controle biológico, bastante simples. Nossos resultados sugerem que *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. tem potencial para uso no controle biológico de insetos-praga. Em estudos realizados por Smith et al. (2000), não foi observada nenhuma correlação entre produção de exoenzimas e virulência. Porém a espécie mais virulenta foi *B. bassiana* e que apresentou índice de atividade proteolítica mais elevado.

Exoenzimas, lipases, proteases, amilases e quitinases são produzidas pelos fungos entomopatogênicos *in vitro*, o que facilita o estudo e a avaliação da correlação entre estas proteínas e outras características envolvidas na virulência. A atividade proteolítica é bastante discutida e sua eficiência na degradação de cutícula pode está ligada aos inibidores de proteases na hemolinfa das larvas dos insetos em geral (JOSHI et al., 1997; TIAGO; SILVA, 2007). ST LEGER et al. (1992) demonstrou que a protease é a enzima mais efetiva na degradação estrutural das proteínas ligadas a cutícula dos insetos.

5.2 Avaliação da especificidade e eficiência bioinseticida dos isolados fúngicos

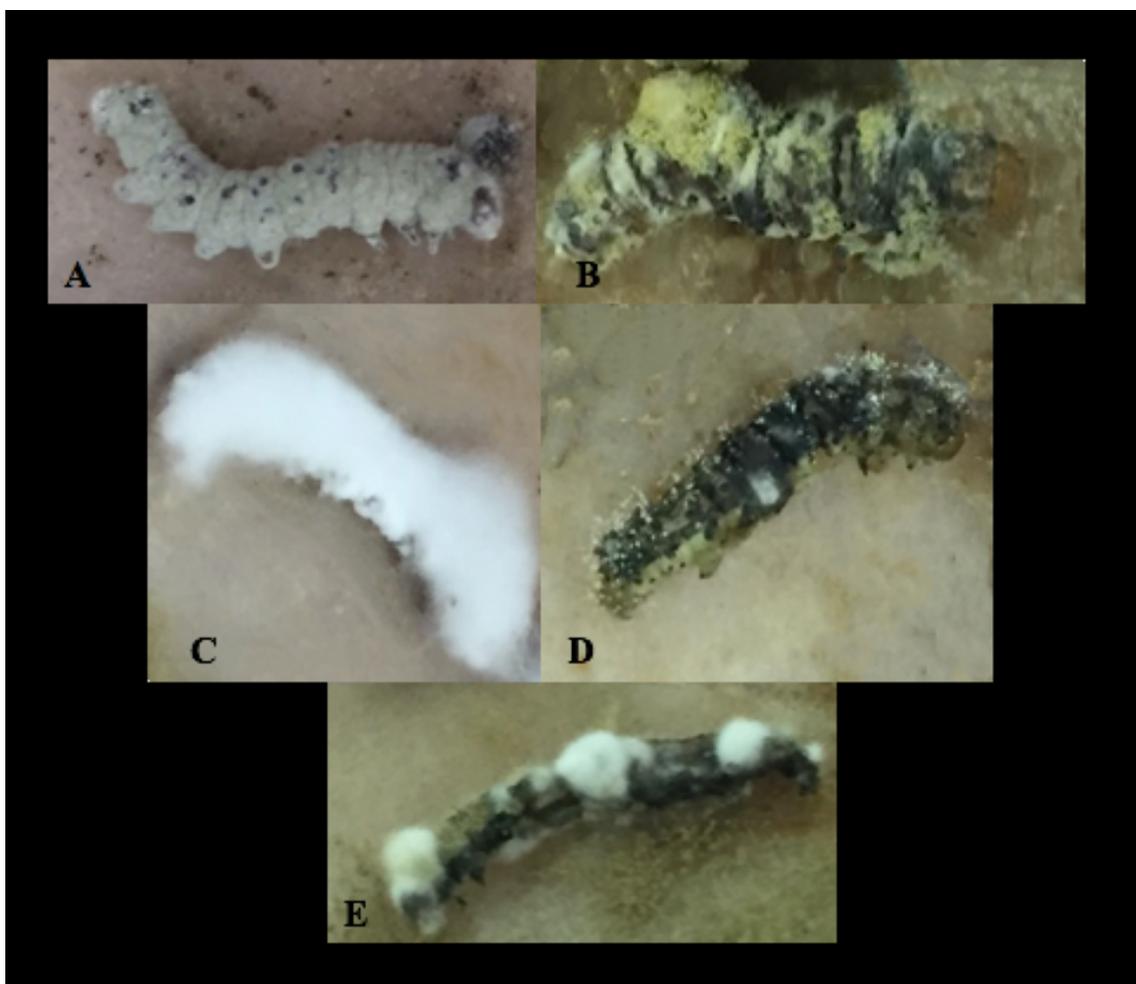
Nesse estudo, selecionamos 05 isolados fúngicos com base nos resultados de atividade proteolítica obtidos previamente (Tabela 3). Dentre os 06 isolados testados quanto a produção de enzimas proteolíticas no início do estudo, apenas *Paecilomyces* sp. TP08 apresentou atividade proteolítica negativa e, portanto, foi descartado dos ensaios de controle biológico.

No início dos bioensaios, as lagartas de *H. virescens* (fases L3 – L5) apresentaram comportamento agitado, deslocando-se rapidamente em várias direções. Ao decorrer do experimento, as mesmas deslocavam-se cada vez mais lentamente, apresentando um comportamento letárgico. Além disso, durante os 10 dias de bioensaio, as lagartas também demonstraram visualmente uma diminuição gradativa no consumo da dieta de Greene.

A partir do bioensaio observou-se que os isolados de *Aspergillus* sp., *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *Penicillium* sp., foram patogênicos às lagartas *H. virescens* confirmando a especificidade desses isolados fúngicos na concentração de conídios utilizada ($1,0 \times 10^8$ conídios/mL⁻¹). A confirmação da mortalidade pelos fungos ocorreu através da observação da extrusão dos patógenos sobre a cutícula das lagartas (LOUREIRO; MONTEIRO, 2005) (Figura 8).

Nos grupos controle, não foi observada a extrusão dos entomopatógenos, nem seu crescimento sobre os cadáveres das lagartas, visto que não foram utilizados conídios nesse grupo. A mortalidade observada pode ter sido resultado do isolamento social das lagartas, senescência ou ainda pelo estresse causado durante o bioensaio, e não pela infecção dos fungos como ocorreu nos grupos experimentais.

Figura 8 – Extrusão de fungos entomopatogênicos em cadáveres de lagartas de *Heliothis virescens*. (A) *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (B) *Penicillium* sp. (C) *Beauveria brongniartii* (D) *Beauveria bassiana* (E) *Aspergillus* sp.



Fonte: Autor, 2018.

Na concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios/mL⁻¹, todos os isolados foram eficientes promovendo uma taxa de mortalidade acima de 79 % sobre as lagartas *H. virescens*. *Aspergillus* sp. apresentou a maior eficácia dentre os isolados fúngicos avaliados, apresentando eficiência de $100 \pm 4,98$ % em relação a patogenicidade sobre *H. virescens*, ocasionando a mortalidade de 100 % da população durante o bioensaio. Seguido do *M. anisopliae* var. *anisopliae* ($97,6 \pm 13,60$ %), *B. brongniartii* ($88,9 \pm 3,50$ %), *Penicillium* sp. ($87,02 \pm 11,90$ %), e por último *B. bassiana* ($79,3 \pm 10,02$ %) no período de incubação de 10 dias, como demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4 – Eficácia de fungos entomopatogênicos sobre a lagarta *Heliothis virescens* em condições de laboratório na concentração de 10^8 conídios/mL⁻¹. Período de incubação - 10 dias (T = 25 ± 2 °C e umidade relativa 70 ± 10 %) (n=30 para cada isolado fúngico).

Fungos Entomopatogênicos	Taxa de mortalidade (%) (\pm EP) ³
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	97,6 \pm 13,60
<i>Beauveria bassiana</i>	79,3 \pm 10,02
<i>Beauveria brongniartii</i>	88,9 \pm 3,50
<i>Aspergillus</i> sp.	100,0 \pm 4,98
<i>Penicillium</i> sp.	87,02 \pm 11,90
Controle	1,32 \pm 0,10
CV%	10,1

Fonte: Autor, 2018.

Várias espécies de *Aspergillus* sp. tem sido demonstradas como potenciais patógenos para diversas pragas. Em um estudo *in vitro* utilizando *A. flavus* para o controle de adultos de *Musca domestica* verificou-se a mortalidade de 100 % dos insetos em apenas 3 dias de avaliação (NUNES et al., 2002). Outra espécie recém descoberta desse gênero, *A. oryzae*, demonstrou-se eficaz no controle do gafanhoto *Locusta migratoria*, ocasionando infecção desses insetos no 6º dia após a inoculação dos conídios e mortalidade dos indivíduos por depleção nutricional e alterações nas funções fisiológicas do inseto ocasionada por possíveis toxinas produzidas pelo fungo (ZHANG et al., 2015). *Aspergillus* sp. (BC 639) também foi eficaz no controle de *Creontiades dilutus* (mírideo verde) em culturas transgênicas de algodão *Bt* sendo capaz de controlar as infestações por essa praga, mantendo um número benéfico de insetos, que não é capaz de causar prejuízos para a plantação (MENSAH; AUSTIN, 2012).

M. anisopliae que mostrou especificidade nas lagartas *H. virescens* nesse estudo, também já foi descrito como patógeno de um grande número de insetos. O isolado CG34 apresentou atividade entomopatogênica sobre larvas L3 de *Muscina stabulans* (moscas sinantrópicas conhecidas como “falsa mosca dos estábulos”) ocasionando mortalidade das larvas e reduzindo viabilidade das pupas (ZIMMER et al., 2010). *M. anisopliae* também se demonstrou eficaz no controle de formigas *Atta cephalotes* (L.) ocasionando 100 % de mortalidade nos formigueiros tratados com esse isolado fúngico (LOPEZ; ORDUZ, 2003). Para o controle da cigarrinha-das-raízes (*Mahanarva fimbriolata*), praga da cana-de-açúcar,

M. anisopliae também se destacou como um potencial agente de controle biológico, reduzindo a população da praga em até 91,2 % (DINARDO – MIRANDA et al., 2004).

Penicillium sp. também é um gênero que vem sendo estudado como entomopatógeno de diversas espécies. *P. Corylophilum* e *P. janthinellum* demonstraram especificidade aos mosquitos *Aedes fluviatilis*, *Anopheles aquasalis* e *Culex quinquefasciatus*, confirmando seu potencial no controle biológico desses vetores (COSTA et al., 1998). Em experimentos *in vitro*, outra espécie desse gênero, *P. citrinum*, também foi eficaz no controle de *Culex quinquefasciatus*, ocasionando 100 % de mortalidade em larvas na fase L3 (MAKETON et al., 2013).

Os valores de TL₅₀ para os cinco isolados testados encontram-se na Tabela 5, onde se pode constatar também a viabilidade dos conídios, que variaram de 85 a 99 %. A menor viabilidade foi observada para *Penicillium* sp. o qual apresentou um valor de TL₅₀ de 6,82 dias. A viabilidade dos conídios está diretamente relacionada com eficácia/especificidade sobre *H. virescens*, já que o TL₅₀ foi considerado de satisfatório a alto para os isolados fúngicos avaliados. De acordo com ALVES (1998) a baixa viabilidade de conídios reflete a perda de virulência do isolado ou a presença de condições desfavoráveis para o início do processo germinativo dos conídios. Como foi realizado um experimento com três repetições numa única condição (T = 25 ± 2 °C, umidade relativa 70 ± 10 % e tempo de avaliação 10 dias) não foi possível determinar se essas condições poderiam influenciar no valor da viabilidade dos conídios.

Apesar de *B. bassiana* apresentar a menor taxa de mortalidade dentre os isolados fúngicos analisados nesse estudo, essa espécie foi eficiente em relação ao tempo letal 50 (TL₅₀). *B. bassiana* ocasionou a infecção e morte de 50 % da população em apenas 3 dias, o melhor resultado depois de *Aspergillus* sp. que levou a morte de 50 % da população em aproximadamente 2 dias (Tabela 5). Esse resultado demonstra que nem sempre o entomopatógeno mais eficiente garante uma mortalidade total da população. *B. bassiana* ocasionou a morte de aproximadamente 79,3 % das lagartas de *H. virescens*, a menor taxa de mortalidade entre os isolados fúngicos analisados, mas em compensação apresentou uma alta especificidade em relação a lagarta, levando a morte de 50 % dos insetos em um curto período de tempo.

Tabela 5 – Viabilidade de conídios e TL_{50} (dias) para a lagarta *Heliothis virescens* tratadas com fungos entomopatogênicos. Concentração de 10^8 conídios/mL⁻¹. Período de incubação - 10 dias (T = 25 ± 2 °C e umidade relativa 70 ± 10 %) (n=30 para cada isolado fúngico).

Tratamentos	Viabilidade (%)	TL_{50} (dias)	Equação ¹	t ²
1) <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	91	5,99	Y= 0,1782 + 2,8522 log X	2,85
2) <i>Beauveria bassiana</i>	90	3,00	Y=2,9145 + 1,3001 log X	5,01
3) <i>Beauveria brongniartii</i>	95	3,61	Y=2,1907 + 1,1321 log X	3,09
4) <i>Aspergillus</i> sp.	99	2,53	Y=1,6001 + 5,1725 log X	2,83
5) <i>Penicillium</i> sp.	85	6,82	Y=1,2374 + 2,2291 log X	6,75
6) Controle	0	0	ns ³	0

¹Valores das equações obtidas pela análise de probit, onde Y = probit e X = concentração. ²O valor de t é crucial para a determinação do coeficiente angular, sendo os valores inferiores a 1,96 indicam que não há significância da regressão. ³Não significativo. Fonte: Autor, 2018.

Vários estudos já demonstraram as espécies de *Beauveria* como entomopatogênicas para diversas pragas. *B. brongniartii* é o principal patógeno do besouro *Melontha melolontha* L. e já foi utilizado no controle dessa praga em pomares e pastagens na Europa, o que foi o gatilho para o desenvolvimento de um produto comercial que já está disponível na Suíça desde 1991 (*Beauveria*-Schweizer, E. Schweizer Seeds, Suíça) (KELLER, 1992; KELLER et al., 1997). *B. bassiana* também já foi utilizado para o controle de *Tetranychus urticae*, a principal espécie de ácaro-praga, pertencente a mesma família do ácaro-vermelho-do-cafeeiro. Um produto comercial (Naturalis[®]) desenvolvido a partir de uma linhagem de *B. bassiana* já está disponível no mercado e foi utilizado para o controle de *T. urticae* no cultivo de rosas em casas de vegetação, promovendo taxas de mortalidade superiores a 80 % (CHANDLER et al., 2000).

A variação na virulência dos isolados observadas no bioensaio utilizando as lagartas *H. virescens* pode ser explicada pela variabilidade genética dos fungos entomopatogênicos, o que ocasiona em diferenças na produção de enzimas que interferem na adesão e penetração da cutícula do hospedeiro, e ainda na produção de toxinas, na capacidade de colonização e na especificidade de cada isolado fúngico (PACOLA-MEIRELLES; AZEVEDO, 1990; KLEESPIES; ZIMMERMANN, 1998 apud LOUREIRO et al., 2005). Essas diferenças entre os fungos entomopatogênicos reforçam a necessidade da utilização de critérios para seleção dos melhores isolados potenciais para utilização no controle biológico. Estudos indicam que a atividade de proteases auxilia os fungos entomopatogênicos no mecanismo de infecção do

hospedeiro, através da hidrólise da cutícula facilitando os processos de adesão e penetração do fungo através do exoesqueleto do inseto (BIDOCHKA; KHACHATOURIANS, 1987).

Os fungos entomopatogênicos podem contar com diversos mecanismos de ação já descritos nesse trabalho e, portanto, apresentam baixa probabilidade de os hospedeiros desenvolverem resistência (DELGADO; MURCIA-ORDOÑEZ, 2011).

A seleção da melhor linhagem fúngica entomopatogênica deve levar em conta as características do fungo e as características do inseto-praga estudado. Dentre as características do entomopatógeno que devem ser consideradas destacam-se a capacidade de reprodução, patogenicidade e virulência, crescimento dos micélios, velocidade de germinação, espectro de hospedeiros, produção de conídios, capacidade de reprodução e resistência às condições ambientais (MOINO JR.; ALVES, 1997; ALVES, 1998; RAMOS et al., 2004; LOUREIRO et al., 2005b; SANTORO et al., 2007; LA et al., 2013).

H. virescens é um inseto-praga que causa grandes danos econômicos e apresenta a capacidade de desenvolver resistência rapidamente à inseticidas químicos, que atualmente é a forma de controle mais utilizada contra a lagarta-da-maçã. Além dessa problemática, o controle genético de pragas do algodoeiro já utilizado através do algodoeiro *Bt*, não é eficiente contra *H. virescens*, fazendo necessário mais estudos que busquem outras alternativas para o controle dessa praga. Entretanto, ainda existem poucos estudos envolvendo o controle de *H. virescens* relatados. Um estudo envolvendo *Trichogramma* spp. demonstrou sua capacidade em parasitar 23,4 % dos ovos de *H. virescens* (ANDRADE et al., 2009). No presente estudo, todas as linhagens fúngicas foram capazes de causar mortalidade mínima *in vitro* de 79 % da população da praga em um período de 10 dias, resultado inédito na literatura.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nas condições estabelecidas e avaliadas neste estudo, conclui-se que:

- O meio ágar-leite mostrou-se ser um substrato potencial para caracterizar os isolados quanto à produção de enzimas proteolíticas;
- Os isolados de *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. exibiram uma atividade proteolítica positiva;
- Os isolados de *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. apresentaram especificidade e efeito letal às lagartas de *H. virescens* (fases L3-L5) na concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios/mL⁻¹;
- Entre os isolados, *Aspergillus* sp. apresentou a maior taxa de mortalidade média ($100,0 \pm 4,98$ %) e o menor TL₅₀ (2,53 dias) na concentração de conídios testada.

Nossos resultados são preliminares, fazem-se necessários ensaios no campo, em condições naturais, para avaliar a disseminação do patógeno através da dispersão de insetos contaminados e a capacidade de permanência do fungo sobre hospedeiros naturais no ambiente.

REFERÊNCIAS

- ABARCA, M. L. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 17, p. 79-84, 2000.
- ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. *Revista Uningá Review*, v. 2, n. 1, p. 55-59, 2015.
- AGALI, A. E. A. E.; MOHAMMED, E. A. E. R.; HASSAN, A. E. W. Effect of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* and *Beauveria bassiana* on survival of *Anopheles arabiensis* Patton and *Culex quinquefasciatus* mosquito larvae. *Sudan Journal of Science*, v. 9, n. 2, p. 26-41, 2017.
- ALMEIRA, J. C. Patogenicidade e viabilidade de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* ao *Anthonomus grandis* (BOHEMAN) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE). 2005. Tese - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- ALVES S. B. Controle microbiano de insetos. 2. ed. Piracicaba: FEALQ: 1998.
- ALVES, S. B.; ALMEIDA, J. E. M.; MOINO JR, A.; ALVES, L. F. A. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S.B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. Piracicaba: Fealq, 1998.
- AMALA, U; JIJI, T.; NASEEMA, A. Mass multiplication of entomopathogenic fungus, *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson with solid substrates. *JBipest.*, v. 5, p. 168-170, 2012.
- ANDRADE, G. S. Desempenho de espécies de trichogramma west. (hym: trichogrammatidae) para o controle de *Heliothis virescens* (fabr.) (lep.: noctuidae) em algodoeiro. 59p. Dissertação (Mestre em Entomologia Agrícola). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco. 2007.
- ARANGO M.; CASTAÑEDA E. Micosis Humanas Procedimentos Diagnósticos. Exámenes directos, 1995.
- ARCHER, D. B.; WOOD, D. A. Fungal exoenzymes. Em: GROW, N. A. R.; GADD, G. M. (Eds.). *The growing fungus*. London: Chapman & Hall, p. 137-162, 1995.
- BAJPAI, B.; PATIL, S. Induction of tannin acyl hidrolases (EC 3.1.1.20) activity in some members of fungi imperfecti. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 20, p. 612-614, 1997.
- BELTRÃO, N. E. de M.; SILVA, C. A. D.; SUINAGA, F. A.; ARRIEL, N. H. C.; RAMALHO, F. S. Algodão agroecológico: opção de agronegócio para o Semi-árido do Brasil. Campina Grande: Embrapa Algodão, 38p., 2009.
- BELTRÃO, P.; TRINIDAD, J. C.; FIEDLER, D.; ROQUEV, A.; LIM, W. A.; SHOKAT, K. M.; BURLINGAME, A. L.; KROGAN, N, J. Evolution of phosphoregulation: comparison of phosphorylation patterns across yeast species. *PLoS. Biol.*, v. 7, 2009.
- BERTOLLETI, A. A.; CAMILO, E. Estudo do algodão no estado do Paraná e sua cadeia produtiva têxtil. *Caderno de Administração*, v. 15, n. 1, p. 40-50, 2007.
- BIDOCHKA, M. J.; KHACHATOURIANS, G. G. Purification and Properties of an Extracellular Protease Produced by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 53, n. 7, p. 1679-1684, 1987.

BLANCO, C. A.; SUMERFORD, D.; LÓPEZ JUNIOR, J. D.; HERNÁNDEZ, G. Mating incidence of feral *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) males confined with laboratory-reared females. *Journal of Cotton Science*, v. 10, n. 2, p. 105-113, 2006.

BLANCO, C.; VARGAS, A. T.; LOPEZ, J.; KAUFMANN, J. Densities of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: noctuidae) in three plant hosts. *Florida Entomologist*, v. 90, n. 4, p. 742-751, 2007.

BUSATO, R. G.; GARCIA, S. M.; LOECK, E. A.; ZART, M.; NUNES, M. A.; ODERLEI, B.; SILVA, A. F. Adequação de uma dieta artificial para os biótipos "milho" e "arroz" de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Instituto Agrônômico de Campinas Bragantia*, v. 65, n. 2, p. 317-323, 2006.

CANAL DO PRODUTOR. Cereais, Fibras e Oleaginosas – Terceiro maior exportador e quinto produtor mundial de algodão, Brasil procura maior crescimento na produção. Brasília, Distrito Federal. 2015.

CARVALHO, T.; FILHO, G. A.; PACHECO, V. S. C.; FERREIRA, A. N.; ROCHA, T. J. O.; FRANCO, M. Produção de enzimas hidrolíticas por fermentação em estado sólido da palma doce (*Nopalea coccinellifera*) utilizando modelos estatísticos significativos. *Revista de Estudos Ambientais*, v. 14, p. 48-57, 2012.

CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; PELL, J. K.; BALL, B. V.; SHAW, K.; SUNDERLAND, K. D. Fungal biocontrol of Acari. *Biocontrol Science and Technology*, Abingdon, v. 10, p. 357-384, 2000.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: grãos. Safra 2014/2015 - décimo segundo levantamento. Brasília-DF. 2015.

CONCEIÇÃO, J. C. P. R.; ZUCHI, P. H. Agricultura: Evolução e importância para a balança comercial Brasileira, Texto para Discussão, Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), 2014.

COOK, R. J.; BAKER, K.F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. *American Phytopathological Society*, 1983.

COSTA, F. D.; VERZELETTI, F. B.; WAGNER, R. Isolamento e identificação das aflatoxinas B1 e B2 de *Aspergillus parasiticus* em alimentos. *Cadernos da Escola de Saúde*, v. 11, p. 65-78, 2014.

COSTA, G. L.; MORAES, A. M. L.; GALVÃO, C. Entomopathogenic effect of *Aspergillus giganteus* and *Penicillium corylophilum* on two triatomine vectors of Chagas disease. *J. Basic Microbiol.*, v. 43, p. 3 – 7, 2003.

COSTA, G. L.; MORAES, A. M. L.; OLIVEIRA, P. C. Pathogenic action of *Penicillium* species on mosquito vectors of human tropical diseases. *J. Basic Microbiol.*, v. 38, p. 337 – 341, 1998.

COUTINHO, H. L. C. 2009. Diversidade microbiana e agricultura sustentável. *BDT-BaseTropical*, 2009.

CUZZI, C.; LINK, S.; VILANI, A.; ONOFRE, S. B. Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis dracunculifolia* (asteraceae). *Global Science and Technology*, v. 4, n. 2, p. 47-57, 2011.

- DELGADO, P. A. M.; MURCIA-ORDOÑEZ, B. Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambi-Agua*, v. 6, n. 2, p. 77-90, 2011.
- DÍAZ, M. P.; MACÍAS, A. F.; NAVARRO, S. R.; TORRE, M. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, v. 31, n. 12, p. 856-860, 2006.
- DIMBI, S.; MANIANIA, N. K.; LUX, A. S.; MUEKE, J. M. Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. *Biocontrol*, v. 49, p. 83-94, 2004.
- DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; FERREIRA, J. M. G.; JÚNIOR, C. A. G.; COELHO, A. L.; GIL, M. A. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar. *Neotrop. Entomol.*, Londrina, v. 33, n. 6, p. 743-749, 2004.
- DOMINGUES, F. A. Variabilidade genética em populações de *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil inferida por marcadores microsatélites. 85p. Dissertação (Mestre em Ciências). - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, São Paulo. 2011.
- DRUMMOND, J.; PINNOCK, D. E. Aflatoxin Production by Entomopathogenic Isolates of *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1990.
- EGERT, M.; STINGL, U.; BRUNN, L. D.; POMMERENKE, B.; BRUNE, A.; FRIEDRICH, B. Structure and Topology of Microbial Communities in the Major Gut Compartments of *Melolontha melolontha* Larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *Applied And Environmental Microbiology*, v. 71, n. 8, p. 4556-4566, American Society for Microbiology. 2005.
- ERLACHER A.; SOUSA, F.; SCHROEDER, M.; JUS, S.; KOKOL, V.; CAVACO-PAULO, A.; GUEBITZ, G. M. A new cuticle scale hydrolysing protease from *Beauveria brongniartii*. *Biotechnol. Lett.*, v. 28, p. 703-710, 2006.
- ERLACHER, A.; SOUSA, F.; SCHROEDER, M.; JUS, S.; KOKOL, V.; CAVACO-PAULO, A.; GUEBITZ, G.M. A new cuticle scale hydrolysing protease from *Beauveria brongniartii*. *Biotechnol Lett*, v. 28, n. 1, p. 703-710, 2006.
- FAIA, A. M. Isolamento e identificação de fungos filamentosos e leveduras em alguns pontos de uma rede de distribuição de água. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia) - Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2011.
- FARGUES, J. Adhesion of the fungal spore to the insect cuticle in relation to pathogenicity. In: Roberts, D.W., Aist, J.R. (Eds.), *Infection Processes of Fungi*. The Rockefeller Foundation, New York, p. 90-110, 1984.
- FENG, M. G.; POPRAWSKI, T. J.; KHACHATOURIANS, G. G. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Science and Technology*, v. 4, n. 1, p. 3-34, 1994.
- FIEDLER, Z.; SOSNOWSKA, D. Nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson is also a biological agent for control of greenhouse insects and mite pests. *BioControl*, v. 52, p. 547-558, 2007.
- FUGUET, R.; VEY, A. Comparative analysis of the production of insecticidal and melanizing macromolecules by strains of *Beauveria spp.*: in vivo studies. *J Invertebr Pathol.*, v. 85, p.

152-167, 2004.

FUKAMIZO, T.; KRAMER K. J. Mechanism of chitin hydrolysis by the binary chitinase system in insect molting fluid. *Insect Biochem.*, v. 15, p. 141-145, 1985.

FYE, R. E.; McADA, W. C. Laboratory studies on the development, longevity, and fecundity of six lepidopterous pests of cotton in Arizona. U.S. Department of Agriculture Technical Bulletin, v. 1454. 73 p., 1972.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E., PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.N. Manual de entomologia agrícola, 649 p., 2. ed. São Paulo: Ceres, 1988.

GARCIA, R.F.A. Evaluacion de las perdidas em rendimiento ocasionados por el dano de *Heliothis* spp. em el algodono. Colômbia: UNC., Tese, 1971.

GEISER, D. M. Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics. *Med Mycol.*, v. 47, 2008.

GEISSELER, D.; HORWATH, W. R. Regulation of extracellular protease activity in soil in response to different sources and concentrations of nitrogen and carbon. *Soil. Biol. Biochem.*, v. 40, p. 3040-3048, 2008.

GLARE, T.R.; MILNER, R.J. Ecology of entomopathogenic fungi. *Handbook of Applied Mycology*, v. 2, New York, p. 547-611, 1991.

GREATHEAD, D. J.; GREATHEAD, A. H. Biological control of insect pests by insect parasitoids and predators: the BIOCAT database. *Biocontrol News Inf.*, 1992.

GUEDES, T. P.; BONIFÁCIO, T. T. C.; DOURADO, R.; CAVALCANTI, T. G.; DIAS, D. S. B.; SOUSA, A. C. B.; VASCONCELOS, U. Identification of Ascomycetes Recovered From Petrol Stations in the Metropolitan Region of João Pessoa-PB, Brazil. *Journal of Engineering Research and Application*, v. 8, n. 4, p.50-55, 2018.

HANKIN, L. ANAGNOSTAKIS, S. G. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycology*, v. 67, p. 597-607, 1975.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G.; BERGMANN, C. W.; LOERA-CORRAL, O.; ROJO-DOMÍNGUEZ, A.; HUERTA-OCHOA, S.; REGALADO-GONZÁLEZ, C.; PRADO-BARRAGÁN, L. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 2001-2006, 2011.

HILL, G.; GREATHEAD, D. J. Economic evaluations in classical biological control. In *The Economics of Biological Invasions*, p. 208–33. Cheltenham, UK., 2000.

IBRAHIM, Y. B.; LOW, W. Potential of mass production and field efficacy of isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* Bals. (Vuillemin) and *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown on *Plutella xylostella* (Linnaeus). *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 39, p. 222-232, 1993.

IKRAM-UL-HAQ, MUKHTAR, H. Biosynthesis of acid proteases by *Penicillium griseoroseum* IH-02 in solid-state fermentation. *Pak. J. Bot.*, v. 39: p. 2717-2724, 2007.

INGLIS, P. W.; TIGANO, M.S. Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces spp.* (Ascomycota) isolates using rDNA-ITS Sequences. *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, p. 132-136, 2006.

JOSHI, L.; ST LEGER, R. J.; ROBERTS, D. W. Isolation of a cDNA encoding a novel subtilisin-like protease from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* using differential display-RT-PCR. *Gene*, v. 197, p. 1-8, 1997.

JÚNIOR, W. S. E.; JÚNIOR, J. S. Z.; ZANUNCIO, J. C. Controle biológico de artrópodes pragas do algodoeiro com predadores e parasitoides. *Rev. ol. fibros., Campina Grande*, v. 10, n. 3, p. 1147 – 1165, 2006.

KASSA, A.; BROWNBRIDGE, M.; PARKER, B. L.; SKINNER, M.; GOULI, V.; GOULI, S.; GUO, M.; LEE, F.; HATA, T. Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Mycol. Res.*, v. 112, p. 583–591, 2008.

KELLER, S. The *Beauveria Melolontha* project: experiences with regard to locust and grasshopper control. In: Lomer, C.S., Prior, C. (Eds.), *Biological Control of Locusts and Grasshoppers*. CAB International, Wallingford, p. 279–286, 1992.

KELLER, S.; SCHWEIZER, C.; KELLER, E.; BRENNER, H. Control of white grubs (*Melolontha melolontha* L.) by treating adults with the fungus *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci. Technol.*, v. 7, p. 105–116, 1997.

KHAN, S.; GUO, L.; MAIMAITI, Y.; MIJIT, M.; QIU, D. Entomopathogenic Fungi as Microbial Biocontrol Agent. *Molecular Plant Breeding*, v. 3, n. 7, 2012.

KIMATI, H.; AMORIM, A.; BERGAMIM FILHO, L. E. A.; CAMARGO, J. A. M. *Manual de Fitopatologia*. Editora Agronômica Ceres, 2 ed. São Paulo, 1997.

KOGAN, M. Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 43, p. 243–70, 1998.

LA, M. T. D.; CORTEZ, H.; ORTIZ, C. F.; CAPPELLO, S.; CRUZ, A. D. L. Caracterización de aislamientos nativos de *Metarhizium anisopliae* y su patogenicidad hacia *Aeneolamia postica*, en Tabasco, México. *Revista Colombiana de Entomología*, v. 39, n. 1, p. 40-46, 2013.

LACEY, L. A.; FRUTOS, R.; KAYA, H. K.; VAIL, P. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? *Biol Control.*, v. 21, p. 230-248, 2001.

LECUONA, R. E.; RODRIGUEZ, J.; ROSSA, F. R. L. Effect of Constant and Cyclical Temperatures on the Mortality of *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae) Treated with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hyphomycetes). *Neotropical Entomology*, v. 34, n. 4, p. 675-679, 2005.

LIMA, V. M. G. Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. *Food Technology and Biotechnology*, v. 41, p. 105-110, 2003.

LIN, J. E.; CHANG, D. C. N.; SHEN, G. J. Correlations among several screening methods used for identifying wood-decay fungi that can degrade toxic chemicals. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 5, p. 275-280, 1991.

LINS, L. C. P. Estudos para o manejo da lagarta-das-maçãs *Heliothis virescens* (Fabricius,

1777) (Lepidoptera: Noctuidae) em algodão (*Gossypium hirsutum* L.) e soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Jataí, 64 p., 2004.

LOPES, R. S. Patogenicidade de *Paecilomyces farinosus* sobre *Coptotermes gestroi* e parâmetros biológicos. Dissertação (Pós-graduação em Biologia de fungos) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2007.

LOPEZ, E.; ORDUZ, S. *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. *Biological Control*, v. 27, p. 194-200, 2003.

LOUREIRO, E. S.; FILHO, A. B.; ALMEIDA, J. E. M.; PESSOA, L. G. A. Produção de isolados de *Metarhizium anisopliae*, selecionados para o controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854). *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 72, n. 4, p. 469-472, 2005b.

LOUREIRO, E. S.; MONTEIRO, A. C. Patogenicidade de isolados de três fungos entomopatogênicos a soldados de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae). *Revista Árvore*, Viçosa, Minas Gerais, v. 29, n. 4, p. 553-561, 2005.

LUNARDON, M. T. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. Análise da conjuntura agropecuária safra 2007/08 – Algodão. Paraná: Departamento de Economia Rural, p. 14, 2007.

LUZ, C.; TAI, M. H. H.; SANTOS, A. H.; ROCHA, L.F.N.; ALBERNAZ, D.A.S.; SILVA, H.H.G. Ovicidal Activity of Entomopathogenic Hyphomycetes on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Under Laboratory Conditions. *J. Med Entomol.*, p. 799-804, 2007.

MAKETON, M; AMNUAYKANJANASIN, A.; KAYSORNGUP, A. A rapid knockdown effect of *Penicillium citrinum* for control of the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 30, n. 2, p. 727-736, 2013.

MANUAL DO COTONICULTOR. FACUAL. Cuiabá, 1999.

MARANHÃO, E. A. A.; MARANHÃO, E. H. A. Hongos entomopatógenos: importante herramienta para el control de “moscas blancas” (Homoptera: Aleyrodidae). *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica*, v. 5/6, p. 209-242, 2008.

MARTI, G. A.; LASTRA, C. C.; PELIZZA, A. S.; GARCIA, J. J. Isolation of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson (Ascomycota: Hypocreales) from the Chagas disease vector, *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera: Reduviidae) in an endemic area in Argentina. *Mycopathologia*, v. 162, p. 369-72, 2006.

MARTÍNEZ, M. J. G. Evaluación de la patogenicidad y esporulación del hongo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin cepa Metagreen en concentración de 10^{10} c/mL sobre adulto de Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*) en el Laboratorio de Hongos Entomopatógenos del Campus Agropecuario de UNAN-León 2011-2012. Tesis -Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León, Nicaragua, 2014.

MASCARIN, G. M.; JARONSKI, S. T. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 32, 2016.

McCAFERRY, A. R. Resistance to insecticides in heliothine lepidoptera: a global view. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, v. 353, n. 1376, p. 1735-1750, 1998.

- MENSAG, R. K.; AUSTIN, L. Microbial control of cotton pests. Part I: Use of the naturally occurring entomopathogenic fungus *Aspergillus* sp. (BC 639) in the management of *Creontiades dilutus* (Stal) (Hemiptera: Miridae) and beneficial insects on transgenic cotton crops. *Biocontrol Science and Technology*, v. 22:5, p. 567-582, 2012.
- MENSAH, R. K.; AUSTIN, L. Microbial control of cotton pests. Part I: Use of the naturally occurring entomopathogenic fungus *Aspergillus* sp. (BC 639) in the management of *Creontiades dilutus* (Stal) (Hemiptera: Miridae) and beneficial insects on transgenic cotton crops, *Biocontrol Science and Technology*, 22:5, 567-582, 2012.
- MIRANDA, J. E. Manejo integrado de pragas do algodoeiro no cerrado brasileiros. Circular Técnica EMBRAPA, v. 131, 2010.
- MOINO JR., A.; ALVES, S. B. Determinação de Concentrações de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Para o Controle de Insetos-Pragas de Grãos Armazenados. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v. 26, n. 1, p. 15-20, 1997.
- MOREIRA, M. D.; ALMEIDA, R. P. Biologia de *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) em Dietas Artificial e Natural. Publicação em Resumo, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, ed. 6, 2009, Laboratório Embrapa Algodão.
- NUNES, M. S.; COSTA, G. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; SOUZA, E. J. Avaliação in vitro dos fungos *Aspergillus flavus* e *Penicillium corylophilum* em adultos de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Parasitol Latinoam.*, v. 57, p. 9-14, 2002.
- ORTIZ-URQUIZA, A.; KEYHANI, N. O. Action on the Surface: Entomopathogenic Fungi versus the Insect Cuticle. *Insects*, v. 4, p. 357-374, 2013.
- PAPA, G. Pragas e seu controle. In: MORESCO, E. (Org.). Algodão: pesquisas e resultados para o campo. Cuiabá-MT: FACUAL, p. 206-239, 2006.
- PAPA, G. Pragas e seu controle. In: MORESCO, E. (Org.). Algodão: pesquisas e resultados para o campo. Cuiabá-MT: FACUAL, p. 206-239, 2006.
- PAPA, G.; CELOTO, F. J.; ROTUNDO, M.; MOSCA, H. R. Atividade de Cartap e Clothianidin sobre ovos de *Heliothis virescens*, (Fabr., 1781) (Lepidoptera: Noctuidae). IV Congresso Brasileiro de Algodão. 2003.
- PARRA, J. R. P. Biological Control in Brazil: An overview. *Sci. Agric.*, v. 71, p. 345–355, 2014.
- PASTOR, A. R. El control de los insectos carpófagos del castaño (*Castanea sativa*) en Andalucía mediante captura masiva con feromona sexual y evaluación de la actividad insecticida de hongos entomopatógenos. Tese (Doutorado) - Universidad de Córdoba, Córdoba, 2013.
- PEDRINI, N.; CRESPO, R.; JUÁREZ, M. P. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, p. 124–137, 2007.
- PEREIRA, A. C.; MARTINS, G. L. M.; TOMQUELSKI, G. V. Ocorrência de lagartas em função do manejo de inseticidas e utilização de cultivares de algodoeiro. *Revista de Agricultura Neotropical, Cassilândia-MS*, v. 3, n. 2, p. 62-67, 2016.

- PEREIRA, M. F. A.; BENEDETTI, R. A. L.; ALMEIDA, J. E. M. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin no controle de *Deois flavopicta* (Stal. 1854), em pastagem de capim (*Brachiaria decumbens*). Arquivos do Instituto Biológico, v. 75, p. 465-469, 2008.
- PERES, A. J. A.; TOMQUELSKI, G. V.; PAPA, G.; VILELA, R.; LUÍS, G.; MARTIS, M. Ocorrência de pragas em algodoeiro geneticamente modificado (*Bt*) e convencional. Revista Brasileira de Ciências Agrárias, v. 7, p. 810-813, 2012.
- PINTO, G. A. S. Produção de tanase por *Aspergillus niger*. Tese. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003.
- RAHMAN, S. F. S. A.; SINGH, E.; PIETERSE, C. M. J.; SCHENK, P. M. Emerging Microbial Biocontrol Strategies for Plant Pathogens. Plant Science, v. 267, p. 102-111, 2018.
- RAMÍREZ, H. G.; GRANJA, A. Z.; AGUILA, E. T. D.; CANTORAL, M. T. Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos. Peru: Servicio Nacional de Sanidad Agraria, 2014.
- RAMOS, E. Q.; ALVES, S. B.; DEMÉTRIO, C. G. B.; COSTA, S. C. Seleção de fungos entomopatogênicos para o controle de *Bemisia tabaci* biótipo B. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología, n. 73, p. 21-28, 2004.
- REIS, M. F.; ROCHA, C. L. M. S. C. Análise citológica do efeito dos extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatoroseus* sobre os ciclos de desenvolvimento de *Aspergillus (=Emericella) nidulans*. SaBios: Rev. Saúde e Biol., v. 9, n. 1, p. 100-107, 2014.
- REYNOLDS, D. R. Implications of the holomorph concept for ascomycete systematics. In: Hawksworth DL (ed.). Ascomycete Systematics: Problems and perspectives in the Nineties. New York: Plenum Press., v. 13, 1994.
- ROBERTS, D. W. 1981. Toxins of entomopathogenic fungi. In: Burges HD, editor. Microbial control of pests and plant diseases. London: Academic Press. p 441 464, 1981.
- ROBERTS, M. J.; SCHIMMELPFENNIG, D. E.; ASHLEY, E.; LIVINGSTON, M. J.; ASH, M. S.; VASAVADA, U. The value of plant disease early-warning systems: a case study of USDA's soybean rust coordinated framework. United States Department of Agriculture, Economic Research Service, 2006.
- RODRIGUES FILHO, I.L. Comparação de dietas artificiais para *Heliothis virescens* (Fabr., 1781) (Lepidoptera – Noctuidae) através de estudos biométricos e nutricionais. 104 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- ROY, H. E.; STEINKRAUS D.C.; EILENBERG, J.; HAJEK, A. E.; PELL, J.K. Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts, Annu. Rev. Entomol., v. 51, p. 331-357, 2006.
- RUSTIGUEL, C. B.; FERNÁNDEZ-BRAVO, M.; GUIMARÃES, L. H. S.; QUESADA-MORAGA, E. Different strategies to kill the host presented by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. Can J Microbiol., p. 191-200, 2017.
- SAMUELS, R. I.; PATERSON, I. C. Cuticle degrading proteases from insect moulting fluid and culture filtrates of entomopathogenic fungi. Comp. Biochem. Physiol., v. 110, n. 4, p. 661-669, 1995.

- SÁNCHEZ, S. E. M.; FREITAS, A. L.; ROBERTS, D. W. Detección de hongos Entomophthorales patógenos a insectos fitófagos, al sur de Bahia, Brasil. *Entomotropica*, v. 16, n. 3, p. 203-206, 2001.
- SANTORO, P. H.; NEVES, P. M. O. J.; ALEXANDRE, T. M.; ALVES, L. F. A. Interferência da metodologia nos resultados de bioensaios de seleção de fungos entomopatogênicos para o controle de insetos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 42, n. 4, p. 483-489, 2007.
- SANTOS, A. V.; OLIVEIRA, B. L.; SAMUELS, R. I. Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sub-lethal doses of imidacloprid: perspectives for the control of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* rubropilosa Forel (Hymenoptera: Formicidae). *Mycopathologia*, v. 163, p. 233-240, 200.
- SANTOS, W.J. Efeito da simulação dos danos da lagarta da maçã *Heliothis virescens* (Fabricius, 1781) (lep.; noctuidae), na produção do algodoeiro. Piracicaba: ESALQ/USP, 64p. Dissertação de Mestrado, 1977.
- SANTOS, W.J. Identificação, biologia, amostragem e controle de pragas do algodoeiro. In: Algodão: tecnologia de produção. Dourados: Embrapa Agropecuário Oeste, p. 189-190, 2001.
- SAS INSTITUTE, 1999-2001. SAS user's guide: Statistics, versão 8.2, ed. 6. SAS Institute, Cary, NC.
- SAZAKI, C. S. S.; NAKANO, O.; KAMIMURA, C.; MARINHO, J. A. A.; CABRA, S. B. Controle da lagarta-das-maçãs, *Heliothis virescens* (lepidoptera: noctuidae), com o inseticida talisman 200 na cultura do algodão. Publicação em Anais, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, ed. 5, p. 5, 2004.
- SCHAPOVALOFF, M. E.; ALVES, L. F. A.; URRUTIA, M. I.; LASTRA, C. C. L. Ocorrência natural de hongos entomopatogênicos en suelos cultivados con yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) en Misiones, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, v. 47, n. 2, p. 138-142, 2015.
- SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J.; VAN DIJCK, P. On the safety of *Aspergillus niger* - a review. *Applied Microbiology And Biotechnology*, v. 59, p. 426-435, 2002.
- SEYE, F.; FAYE, O.; NDIAYE, M.; NJIE, E., AFOUTOU, J. M. Pathogenicity of the fungus, *Aspergillus clavatus*, isolated from the locust, *Oedaleus senegalensis*, against larvae of the mosquitoes *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Insect Science*, v. 9, p. 7, 2009.
- SHAH, P. A.; PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 61, p. 413-423, 2003.
- SHARMA, H. C.; ORTIZ, R. Transgenics, pest management, and the environment. *Current Science*, v.79, n. 34, p. 421-437, 2000.
- SHECK, A.L.; GOULD, F. Genetic analysis of differences in oviposition preferences of *Heliothis virescens* and *Heliothis subflexa* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology*. College Park, v. 24, n. 2, p. 341-347, 1995.

- SILVA, A. B.; BRITO, J. M. Controle biológico de insetos-pragas e suas perspectivas para o futuro. *Revista Agropecuária Técnica*, v. 36, p. 248-258, 2015.
- SILVA, D. M. Identificação de espécies de *Aspergillus* seção Nigri por taxonomia polifásica e descrição de duas novas espécies do gênero. Dissertação (Pós-graduação em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2009.
- SMITH R. J.; PERKRUL S.; GRULA, E. A. Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm (*Heliothis zea*). *J. Invertebr. Pathol.*, v. 38, p. 335-344, 1981.
- SMITH, K. E.; WALL, R.; FRENCH, N. P. The use of entomopathogenic fungi for the control of parasitic mites, *Psoroptes* spp. *Veterinary Parasitology*, v. 92, p. 97-105, 2000.
- ST LEGER, R. J.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 253, p. 221-232, 1987.
- ST LEGER, R. J.; FRANK, D. C.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. Molecular cloning and regulatory analysis the cuticle-degrading-protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal de Chemical*, v. 204, p. 991-1001, 1992.
- STÜMER, A. T.; ITO, E. T.; PEREIRA, G. V.; MIYAGUI, D. T. Estabilidade de proteases produzidas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. *UNOPAR Cient. Ciênc. Biol.*, v. 5, p. 85-88, 2004.
- TIAGO, P. V.; SILVA, R. J. Atividade proteolítica de isolados de *Metarhizium anisopliae* sobre substratos cuticulares e não cuticulares. *Ciência Rural*, v. 37, p. 26-30, 2007.
- TORRES, J. B. Controle de pragas do algodoeiro: Expectativas de mudanças. *Ciência Agrícola*, v. 8, p. 37-49, 2008.
- TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. *Transactions of the British Mycological Society*, v. 66, p. 407-411, 1976.
- VAN LENTEREN, J. C.; BOLCKMANS, K.; KÖHL, J.; RAVENSBERG, W. K.; URBANEJA, A. Biological control using invertebrates and microorganisms: Plenty of new opportunities. *BioControl.*, 2017.
- VERÍSSIMO, C. J. Controle de carrapatos nas pastagens. 2. ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto de Zootecnia, 2015.
- VERÍSSIMO, C. J. Controle de carrapatos nas pastagens. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, p. 102-126, 2015
- VESTERGAARD, S.; NIELSEN, C.; HARDING, S.; EILENBERG, J. First field trials to control *Melolontha melolontha* with *Beauveria brongniartii*. *Christmas trees in Denmark Bulletin*, v. 25, p. 51-58, 2002.
- VEY, A.; HOAGLAND, R.; BUTT, T. M. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. CABI, Wallingford, UK, p. 311-346, 2001.

WEN, L.; CHEN, G.; SHE, Z.; YAN, C.; CAI, J.; MUA, L. Two new paeciloxocins from a mangrove endophytic fungus *Paecilomyces* sp. Russian Chemical Bulletin, International Edition, v. 59, n. 8, p. 1656—1659, 2010.

WRAIGHT, S. P.; CARRUTHERS, R. I.; BRADLEY, C. A.; JARONSKI, S. T.; LACEY, L. A.; WOOD, P.; GALAINI- WRAIGHT, S. Pathogenicity of the Entomopathogenic Fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the Silverleaf Whitefly, *Bemisia argentifolii*. Journal of Invertebrate Pathology, v. 71, p. 217–226, 1998.

XAVIER, M. O.; MADRID, I. M.; CLEFF, M. B.; CABANA, A. L.; FILHO, R. P. S.; MEIRELES, M. C. A. Contaminação do ar por *Aspergillus* em ambiente de reabilitação de animais marinhos. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 45, n. 3, p. 174-179, 2008.

XIAO, G.; YING, S. H.; ZHENG, P.; WANG, Z. L.; ZHANG, S.; XIE, X. Q.; SHANG, Y.; ST LEGER, R. J.; ZHAO, G. P.; WANG, C. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. Sci. Rep, v. 2, p. 483,2012.

YÉPEZ, F. F.; CLAVIJO, J.; ROMERO, I. Especies del complejo *Heliothis virescens* (Fabricius, 1977) (Lepidoptera: Noctuidae) y sus plantas hospederas en Venezuela. Revista de la Facultad de Agronomía (Maracay), v. 16, n. 1, p. 169-175, 1990.

ZAPPELINI, L. O.; ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A.; GIOMETTI, F. H. C. Seleção de isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. visando o controle da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr 1794). Arq Inst Biol., v. 77, p. 75-82, 2010.

ZHANG, P.; YOU, Y.; SONG, Y.; WANG, Y.; ZHANG, L. First record of *Aspergillus oryzae* (Eurotiales: Trichocomaceae) as an entomopathogenic fungus of the locust, *Locusta migratoria* (Orthoptera Acrididae). Biocontrol Science And Technology, [s.l.], v. 25, n. 11, 2015.

ZHENG, P.; XIA, Y. L.; XIAO, G. H.; XIONG, C. H.; HU, X.; ZHANG, S. W.; ZHENG, H. J.; HUANG, Y.; ZHOU, Y.; WANG, S. Y. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional chinese medicine. Genome Biol., 2011.

ZIMMER, C. R.; CÁRCAMO, M. C.; RIBEIRO, P. B.; NASCIMENTO, J. S. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre desenvolvimento do díptero *Muscina stabulans* em laboratório. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v. 62, n. 5, p. 1142-1147, 2010.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. Biocontrol Sci. Technol., v. 17, p. 553-596,2007.