

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**  
**Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Campus de São José do Rio Preto**

**ANA LAURA MARANHA MARINI**

**APLICAÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 JUNTO AO SUBSTRATO  
CULTIVADO PARA O CONTROLE DE PRAGAS**

São José do Rio Preto

2025



**ANA LAURA MARANHA MARINI**

**APLICAÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 JUNTO AO SUBSTRATO  
CULTIVADO PARA O CONTROLE DE PRAGAS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador(a): Prof. Dr. João Cláudio Thoméo

São José do Rio Preto

2025

M339a Marini, Ana Laura Maranhã  
Aplicação de *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 junto ao substrato cultivado para o controle de pragas / Ana Laura Maranhã Marini. -- São José do Rio Preto, 2025  
47 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: João Cláudio Thoméo

1. Controle biológico. 2. bioinseticida. 3. fungo entomopatogênico. 4. cultivo em estado sólido. I. Título.

## **IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA**

O trabalho em questão buscou contribuir no cenário do mercado de bioinsumos, com a avaliação de um novo método de aplicação do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*, um dos agentes microbiológicos mais utilizados na formulação de bioinseticidas atualmente. A estratégia de aplicação proposta busca a superação de intercorrências na etapa de aplicação no campo, como o entupimento de bicos aspersores e a baixa eficiência no controle de artrópodes-praga associados ao solo. Adicionalmente, a pesquisa reforça o potencial da utilização de resíduos agroindustriais como substrato para o cultivo em estado sólido do fungo *M. anisopliae*, o que contribui para a diminuição do custo de produção e a valorização de materiais que seriam descartados. Ademais, os dados obtidos evidenciam novos aspectos a serem considerados e avaliados em pesquisas futuras para a melhoria de aspectos que ainda são considerados fatores limitantes para a maior adoção dos bioinsumos.

## **POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH**

This study evaluates a new application method for the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to contribute to the bio-input market. As one of the most widely used microbiological agents in current bioinsecticide formulations, the proposed strategy aims to overcome field-level issues, such as nozzle clogging and low efficiency in controlling soil-dwelling arthropod pests. Additionally, the research reinforces the potential of using agro-industrial residues as a substrate for the solid-state cultivation of *M. anisopliae*, reducing production costs and adding value to materials otherwise destined for disposal. Furthermore, the data highlight new aspects for future research to address factors that still limit the wider adoption of bio-inputs.

**ANA LAURA MARANHA MARINI**

**APLICAÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 JUNTO AO SUBSTRATO  
CULTIVADO PARA O CONTROLE DE PRAGAS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Data da defesa: 29/10/2025

Banca Examinadora:

Prof. Dr. João Cláudio Thoméo  
UNESP - Campus de São José do Rio Preto

---

Dr<sup>a</sup>. Marina Aiello Padilla  
Solatus Bioinsumos

---

Pós-doc. Daiane Bortolote Ferreira  
EMBRAPA Instrumentação

*À minha família e a todos que fizeram  
parte da minha trajetória.  
Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, **Professor Dr. João Cláudio Thoméo**, pelo apoio ao longo de toda a realização deste trabalho. Registro também minha gratidão aos colegas de laboratório, em especial à **Ma. Ana Paula da Silva Messias**, pelo tempo e atenção

Aos meus pais, **Adriana e Adérmis** por todo o incentivo e apoio durante toda a minha vida e trajetória acadêmica.

A todos que conheci durante a graduação, em especial à minha amiga **Marina** e ao meu namorado **Vitor**, pelo apoio, companheirismo e por todos os momentos que tornaram a minha experiência na universidade mais leve, e que fizeram esses seis anos morando em São José do Rio Preto serem inesquecíveis.

Agradeço ao professor **Dr. Nelson Sabino Bittencourt Júnior**, pela generosa doação da resina histológica e demais materiais. Ao professor **Dr. Sebastião Roberto Taboga** e ao seu orientando **Gervásio Evangelista Brito Filho**, do Laboratório de Microscopia e Microanálise do Departamento de Zoologia e Botânica do IBILCE, pelo empenho e solicitude em auxiliar nas etapas de preparação e observação das lâminas e pela disponibilização dos equipamentos necessários para tal.

Aos integrantes do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada (LBMA), em especial à **Ma. Lara Maria Bianchetti**, e aos pesquisadores do Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos (LAQ), em especial ao **Me. Paulo de Tarso da Costa**, manifesto minha sincera gratidão pela parceria, colaboração e apoio prestados ao longo da minha trajetória acadêmica.

Agradeço também ao Prof. **Dr. Tariq Butt**, da Universidade de Swansea, e ao **Dr. Gabriel Moura Mascarin**, da Embrapa Meio Ambiente, pela disponibilidade e pelo auxílio decisivo no redirecionamento da minha pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, deixo meu sincero agradecimento.

*“Como sou pouco e sei pouco, faço o pouco  
que me cabe me dando por inteiro”  
- Amadeu Thiago de Mello*

## RESUMO

Atualmente, a produção em massa de conídios de fungos entomopatogênicos utiliza grãos de arroz, substrato eficiente porém de alto custo. Como alternativa, os resíduos agroindustriais são considerados como meios de cultivo alternativos, pois são produzidos em grandes quantidades e frequentemente descartados inadequadamente. Contudo, as partículas de diferentes tamanhos que compõem estes resíduos podem ocasionar a obstrução dos equipamentos utilizados na aplicação no campo, restringindo sua utilização em escala comercial. Diante desse contexto, o presente estudo avaliou o uso de farelo de trigo associado ao bagaço de cana (farelo:BC 7:3) para a produção em estado sólido de *Metarhizium anisopliae* IBCB 425, bem como a viabilidade da aplicação direta do microrganismo ao solo sem a etapa de extração de esporos e posterior aplicação por aspersão. Para tanto, foram realizados cultivos em embalagens de polipropileno, bem como ensaios de vigor e patogenicidade dos esporos produzidos em diferentes concentrações ( $10^7$ ,  $10^8$  e  $10^9$  conídios/gss), as quais foram obtidas por meio de diluições sólidas em farelo de trigo autoclavado. Após 15 dias de cultivo, constatou-se que a concentração média de esporos produzidos no farelo de trigo:BC ( $4,47 \times 10^9$  conídios/gss) foi maior quando comparada ao rendimento em arroz:BC ( $3,14 \times 10^9$  conídios/gss). Entretanto, o vigor dos esporos produzidos no meio alternativo foi significativamente inferior (66,38%) ao observado no arroz (93,83%). Nos ensaios de patogenicidade, observou-se que a concentração de conídios constituíram fatores determinantes para a mortalidade das larvas, enquanto o tipo de substrato empregado no cultivo do fungo não exerceu efeito estatisticamente significativo. A concentração de conídios obtidos no substrato alternativo, combinada à letalidade equivalente à observada em esporos produzidos no substrato controle, reafirma seu potencial como meio de cultivo viável para a produção em estado sólido de *Metarhizium anisopliae*. Contudo, a consolidação da estratégia de aplicação proposta requer estudos adicionais conduzidos em condições não estéreis, considerando a complexidade físico-química e microbiológica dos ambientes edáficos e seus impactos sobre a colonização, persistência e eficácia do agente entomopatogênico.

**Palavras-chave:** controle biológico; bioinseticida; fungo entomopatogênico; cultivo em estado sólido.

## ABSTRACT

Mass production of conidia from entomopathogenic fungi commonly employs rice grains as a substrate due to their favorable nutritional composition and physical structure. However, rice is widely used as a staple food and presents a high cost, which increases the final product price. Agro-industrial residues have been proposed as an alternative, given their large-scale availability and frequent inadequate disposal. Nevertheless, the heterogeneous particle size of these materials can cause equipment clogging during field application, limiting their commercial scalability. In this context, the present study aimed to evaluate the use of wheat bran combined with sugarcane bagasse (7:3) for the solid-state fermentation of *Metarhizium anisopliae* IBCB 425, as well as the feasibility of directly applying the colonized substrate to the soil, eliminating the need for conidial extraction and subsequent spray application. Solid-state cultures were performed in polypropylene bags, followed by conidial vigor tests and pathogenicity assays using conidia at different concentrations ( $10^7$ ,  $10^8$ , and  $10^9$  conidia per gram of dry substrate), which were obtained through solid dilutions prepared with autoclaved wheat bran. After 15 days of cultivation, the mean conidial concentration obtained in wheat bran:BC ( $4.47 \times 10^9$  conidia/gss) was higher than that produced in rice:BC ( $3.14 \times 10^9$  conidia/gds). Nevertheless, conidia produced on the alternative substrate exhibited significantly lower vigor (66.38%) compared with those from the rice substrate (93.83%). Pathogenicity assays revealed that conidial concentration were key determinants of larval mortality, whereas the cultivation substrate had no statistically significant effect. The high conidial yield obtained in the alternative substrate, combined with mortality rates comparable to those produced on the control substrate, reinforces its potential as a viable medium for the solid-state cultivation of *Metarhizium anisopliae*. However, the practical implementation of the proposed application method requires further studies under non-sterile conditions, considering the physicochemical and microbiological complexity of soil environments and their influence on fungal colonization, persistence, and entomopathogenic efficacy.

**Keywords:** biological control; bioinsecticide; entomopathogenic fungi; solid-state cultivation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Visão geral do ciclo básico de infecção de fungos entomopatogênicos	16
Figura 2 – Conídios germinados de <i>Entomophaga maimaiga</i>	17
Figura 3 – Hemíptero infectado por fungo entomopatogênico	18
Figura 4 – Espécies sequenciadas do gênero <i>Metarhizium</i> e fungos relacionados	24
Figura 5 – Método de reativação do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> utilizando larva de <i>Tenebrio molitor</i>	26
Figura 6 – Cultivos em estado sólido em embalagens de polipropileno	27
Figura 7 – Substratos utilizados no cultivo em estado sólido	28
Figura 8 – Taxa de mortalidade média em diferentes substratos e concentrações	32
Figura 9 – Conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> obtidos em diferentes substratos corados com lactofenol azul de algodão em aumento 100× e suas respectivas origens.	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre os principais métodos de cultivo de fungos entomopatogênicos	19
Tabela 2 – Composição nutricional de resíduos agroindustriais comuns	21
Tabela 3 – Produção de conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> IBCB 425 em diferentes substratos após 15 dias de cultivo a 27°C.	31
Tabela 4 – Vigor de conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> produzidos em diferentes substratos.	32
Tabela 5 – Comparação por ANOVA Two-Way entre tratamentos na mortalidade final de larvas expostas a conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i>	33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>BC</b>	Bagaço de Cana
<b>BDA</b>	Batata Dextrose Ágar
<b>b.u.</b>	Base Úmida
<b>CB</b>	Controle Biológico
<b>CES</b>	Cultivo em Estado Sólido
<b>CV</b>	Coeficiente de Variação
<b>DOB</b>	Demanda Bioquímica de Oxigênio
<b>DP</b>	Desvio Padrão
<b>Embrapa</b>	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<b>FT</b>	Farelo de Trigo
<b>gss</b>	Gramas de substrato seco
<b>MA</b>	<i>Metarhizium anisopliae</i>
<b>MIP</b>	Manejo Integrado de Pragas
<b>p/p</b>	Peso por peso
<b>PVC</b>	Policloreto de vinila
<b>TCA</b>	Ciclo do Ácido Tricarboxílico
<b>v/v</b>	Volume por volume

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
3.1 Fungos entomopatogênicos.....	16
3.2 Métodos de cultivo de fungos entomopatogênicos.....	18
3.3 Substrato para cultivo de fungos.....	20
3.3.1 Resíduos agroindustriais como substrato para cultivo em estado sólido.....	20
3.4 Formulações de micopesticidas.....	22
3.5 <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	24
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
4.1 Microrganismo.....	26
4.2 Cultivo em embalagens de polipropileno.....	27
4.3 Ensaio de vigor dos conídios.....	29
4.4 Ensaio de patogenicidade em diferentes concentrações.....	29
4.5 Observação em microscopia de luz.....	30
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
5.1 Concentração de conídios obtidos.....	31
5.2 Taxa de vigor dos conídios.....	31
5.3 Ensaio de patogenicidade diferentes concentrações.....	32
5.4 Observação em microscopia de luz.....	33
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>39</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O uso exacerbado de agroquímicos como estratégia para controle de pragas nos sistemas de cultivo intensivos tem gerado uma série de impactos negativos, incluindo riscos à saúde humana (Ashrafi *et al.*, 2024), perda de biodiversidade (Steiner *et al.*, 2024), contaminação do solo e dos recursos hídricos (Yadav *et al.*, 2015), além do ressurgimento de doenças e do aumento de populações de pragas resistentes (Orgiazzi *et al.*, 2016).

O próprio nicho ecológico dos organismos-praga, contudo, pode restringir a ação dos defensivos químicos. Muitas espécies possuem modos de vida ou fases do desenvolvimento essencialmente subterrâneos, o que limita a exposição aos agroquímicos aplicados na superfície, levando a aplicações ineficientes e economicamente desfavoráveis (Sales *et al.*, 2021). Nesse cenário, a agricultura contemporânea enfrenta o desafio de conciliar o aumento da produtividade com a sustentabilidade ambiental, exigindo o desenvolvimento de alternativas eficazes e menos impactantes ao uso intensivo de agrotóxicos.

O Manejo Integrado de Pragas (MIP) surgiu como uma alternativa que propõe o uso combinado e racional de diferentes estratégias de controle, priorizando métodos que reduzam a interferência nos ecossistemas e promovam mecanismos naturais de regulação populacional (Deguine *et al.*, 2021). Dentre as abordagens que compõem o MIP, o Controle Biológico (CB) destaca-se, baseada na utilização de inimigos naturais, como parasitoides, predadores, patógenos ou antagonistas, para reduzir populações de pragas (Van Driesche e Bellows Jr., 2012). Essa abordagem apresenta vantagens significativas, como a especificidade de ação e a preservação de organismos não alvo, além de contribuir para a manutenção da biodiversidade (Lacey *et al.*, 2015).

A adoção de bioinsumos para controle de pragas vem crescendo globalmente, com um mercado que apresenta uma taxa de expansão anual estimada entre 15% e 20%, movimentando mais de US\$1 bilhão ao ano (MAPA, 2024; Andreatta *et al.*, 2025). No Brasil, o número de registros de produtos biológicos para controle de pragas já supera o de agroquímicos, consolidando o país como líder mundial no uso desses insumos (Alisson, 2024; Vermelho *et al.*, 2025).

Dentre os agentes biológicos empregados, os fungos entomopatogênicos, especialmente *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, destacam-se pelo amplo espectro de hospedeiros, pela viabilidade de produção em larga escala, menor custo em comparação aos inseticidas químicos e a capacidade de persistência no solo, o que os torna capazes de estabelecerem ciclos sucessivos de infecção (Alves e Faria, 2010; Sharma e Sharma, 2021; Faria *et al.*, 2022).

Entretanto, a eficiência de produtos à base de microrganismos ainda enfrenta desafios práticos, como a sensibilidade a fatores abióticos, a ação mais lenta em comparação a inseticidas químicos (Shah *et al.*, 2022) e dificuldades associadas ao tipo de formulação e à aplicação, devido à obstrução de filtros e bicos de pulverização, causada pela presença de biofilmes, partículas e formação de sobrenadantes nos produtos (Sharma e Sharma, 2021; Schaffer e Dionello, 2023). Desta forma, o desenvolvimento de formulações deve contemplar não apenas a viabilidade biológica do agente de controle, mas também aspectos como o desempenho sob condições reais de aplicação (Mawcha *et al.*, 2025).

Para a produção em larga escala de fungos entomopatogênicos, o cultivo em estado sólido (CES) é o mais utilizado, geralmente tendo o arroz como principal substrato (Alves e Faria, 2010). Contudo, o alto custo do grão e uso na alimentação humana incentivam a busca por substratos alternativos. Os resíduos agroindustriais surgem como alternativa promissora, por conterem nutrientes e açúcares fermentáveis, podem agregar valor a um passivo ambiental expressivo no setor agroindustrial (Fernandes, 2007; Silva, 2009; Vicente, 2021).

Shah e colaboradores (2022) propuseram a aplicação de grânulos formulados a partir de conídios de *Metarhizium anisopliae* (cepa QS155) incorporados em uma matriz de alginato de sódio, associada a aditivos nutritivos. Esses grânulos foram aplicados ao solo visando o controle de larvas de tenébrio (*Tenebrio molitor*), apresentando resultados promissores quanto à viabilidade fúngica e à eficácia entomopatogênica.

Os aditivos nutritivos incorporados à matriz granular podem reduzir o período em que o fungo permanece latente (fase *lag*) em seu ciclo de crescimento (Madigan *et al.*, 2016), uma vez que estes fornecem base nutricional para a germinação dos propágulos após aplicação no ambiente sem que estes dependam exclusivamente dos nutrientes naturalmente disponíveis no ambiente edáfico para germinar (Shah *et al.*, 2022). Desta forma, formulações que ofereçam um suporte nutricional após aplicação do bioinsumo em campo podem representar uma abordagem promissora para estudos futuros.

Diante das limitações enfrentadas no desenvolvimento de formulações e aplicações de bioinsumos e dos resultados apresentados pelo estudo conduzido por Shah e colaboradores (2022), o presente trabalho teve como propósito avaliar a viabilidade da aplicação direta do farelo de trigo colonizado por *Metarhizium anisopliae* cepa IBCB 425 ao substrato e sua eficácia como método de controle de pragas agrícolas associadas ao substrato. Tal metodologia elimina as etapas de extração de esporos após o período de incubação, que costumam reduzir o poder germinativo dos esporos e aumentar o custo do produto (Faria *et al.*, 2022), e pode oferecer uma alternativa à aplicação convencional por aspersão.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Produzir *Metarhizium anisopliae* por cultivo em estado sólido (CES) em substrato de farelo de trigo e bagaço de cana (7:3) e avaliar a eficiência da aplicação direta do meio cultivado para o controle de pragas.

### 2.2 Objetivos específicos

- Cultivar *M. anisopliae* em estado sólido composto por farelo de trigo e bagaço de cana, na proporção de 7:3;
- Avaliar o vigor dos esporos cultivados em substrato alternativo;
- Avaliar a patogenicidade do fungo em larvas de *Tenebrio molitor*;
- Avaliar a viabilidade da aplicação do meio cultivado diretamente ao substrato;
- Comparar a qualidade e vigor dos esporos cultivados em arroz e em substrato alternativo.

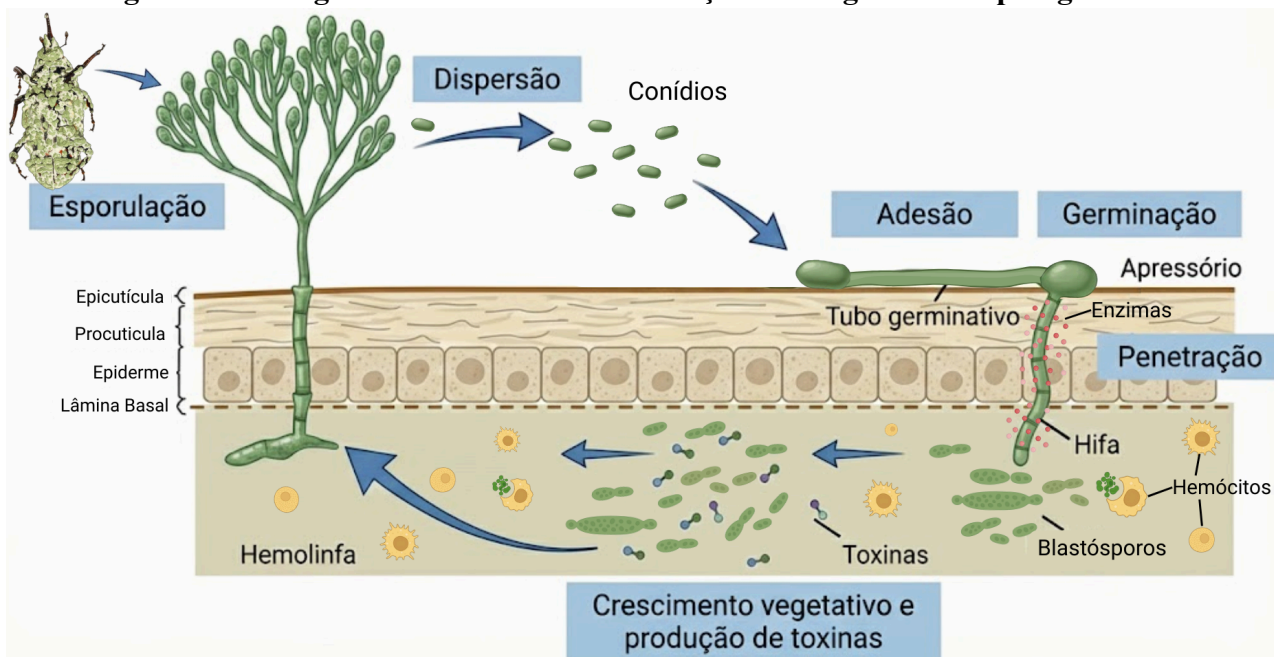
### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Fungos entomopatogênicos

Fungos entomopatogênicos (EPF), como *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium* spp., *Purpureocillium lilacinum* e *Metarhizium* spp., são constituintes naturais da microbiota do solo (Scheepmaker e Butt, 2010; Mantzoukas e Eliopoulos, 2020; Steiner *et al.*, 2024) e desempenham um importante papel no equilíbrio da biodiversidade ao controlar as populações de artrópodes e estabelecerem interações benéficas com plantas, podendo atuar como colonizadores da rizosfera, endófitos, antagonistas de microrganismos fitopatogênicos e promotores do crescimento vegetal (Butt *et al.*, 2016; Brunner-Mendoza *et al.*, 2019; Sharma e Sharma, 2021).

O ciclo de infecção generalizado dos fungos entomopatogênicos (EPF) (Figura 1) inicia-se pela dispersão dos conídios aéreos no ambiente, transportados principalmente pelo vento. Ao entrarem em contato com um artrópode suscetível, esses conídios aderem ao exoesqueleto em razão de forças eletrostáticas (Butt *et al.*, 2016).

**Figura 1- Visão geral do ciclo básico de infecção de fungos entomopatogênicos.**

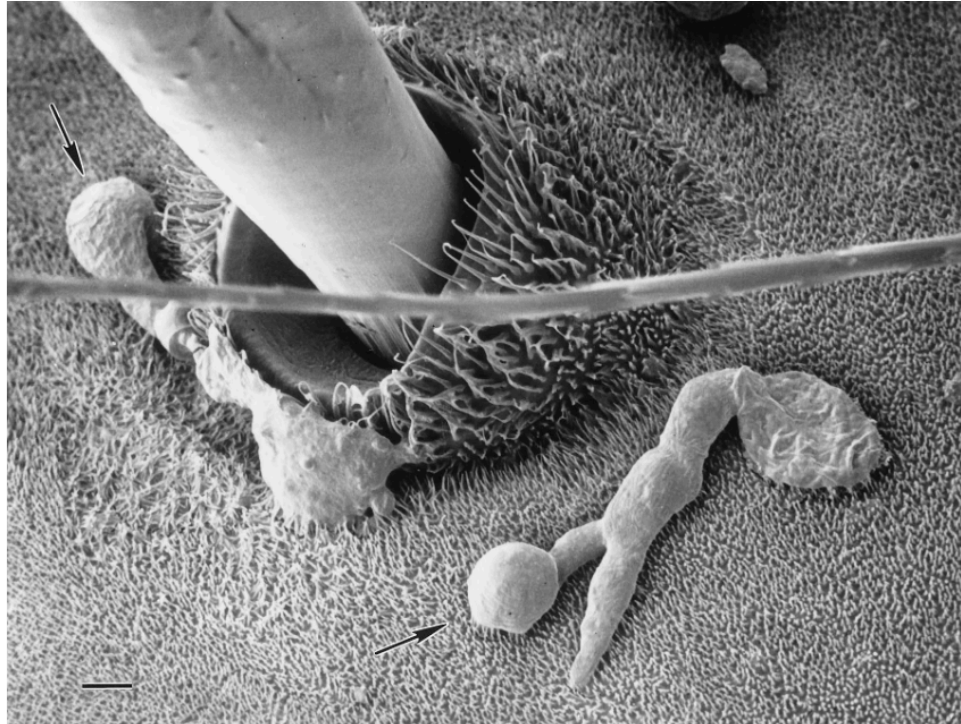


Fonte: Elaborado pela autora com dados de Mascarin e Jaronksi (2016) e Butt *et al.* (2016)

Após estímulos químicos por substâncias epicuticulares (Jaronksi, 2010), os esporos iniciam o processo de germinação e formam uma estrutura especializada, denominado apressório ou peg de penetração (Figura 2). Esta estrutura auxilia na penetração das camadas do exoesqueleto do hospedeiro por meio da combinação entre pressão mecânica e secreção de enzimas. Enzimas lipolíticas atuam inicialmente sobre a epicutícula, seguidas pela ação de proteases e quitinases, que degradam os polímeros presentes nas demais camadas cuticulares

(Beys-da-Silva *et al.*, 2020). Além de facilitar a penetração, as enzimas secretadas também liberam nutrientes assimiláveis, fornecendo energia ao fungo durante o processo infeccioso (Brunner-Mendoza *et al.*, 2019; Mantzoukas e Eliopoulos, 2020).

**Figura 2- Conídios germinados de *Entomophaga maimaiga* que produziram tubos germinativos, na extremidade dos quais formaram-se apressórios (setas) próximos à base de uma cerda secundária na cutícula de *Lymantria dispar*. (Barra: 10 mm.).**



Fonte: Hajek (2000)

Uma vez na hemolinfa, o fungo passa a produzir blastosporos, coloniza os tecidos internos e secreta metabólitos secundários, como as destruxinas, ácidos cítrico e oxálico, que inibem a atividade de hemócitos, causam a disfunção muscular e dos túbulos de Malpighi, além da supressão dos mecanismos de defesa imunológica do inseto (Beys-da-Silva *et al.*, 2020; Mantzoukas e Eliopoulos, 2020; Sheng *et al.*, 2022).

Entre os sintomas característicos da infecção fúngica em artrópodes destacam-se a redução da taxa reprodutiva (Angelo *et al.*, 2012), movimentos descoordenados e paralisia, culminando na morte do artrópode hospedeiro. Após o óbito, as hifas completam a invasão dos tecidos internos e, ao esgotar os nutrientes disponíveis, emergem através do tegumento (Beys-da-Silva *et al.*, 2020). Em condições ambientais favoráveis, ocorre a esporulação na superfície do cadáver (Figura 3), com a formação de conídios que são posteriormente dispersos pelo vento, promovendo a infecção de novos hospedeiros suscetíveis (Mascarin e Jaronski, 2016).

**Figura 3 - Hemíptero infectado por fungo entomopatogênico.**



Fonte: Hesemans (2025).

### **3.2 Métodos de cultivo de fungos entomopatogênicos**

Atualmente, a produção de fungos é realizada principalmente por dois métodos: o cultivo em estado sólido (CES) e o cultivo submerso (CSm) (Oliveira *et al.*, 2012). Esses métodos são frequentemente abordados na literatura de forma equivocada como fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FSm), respectivamente (Tabela 1).

O cultivo em estado sólido (CES) caracteriza-se pelo crescimento microbiano sobre um material sólido, geralmente grãos com capacidade de retenção de umidade, onde há pouca ou nenhuma presença de água livre, podendo esse material fornecer, ou não, nutrientes solúveis ao microrganismo (Fernandes, 2007; Silva, 2009). O principal propágulo fúngico obtido ao final do cultivo em estado sólido são os conídios aéreos, que representam a principal forma infectiva dos fungos entomopatogênicos em condições naturais (Jaronski, 2023). No contexto industrial, o cultivo em estado sólido tem como substrato preferencial o arroz, cuja composição nutricional e estrutura física favorecem tanto o desenvolvimento do micélio quanto a esporulação (Alves e Faria, 2010).

Já no cultivo submerso (CSm), o crescimento microbiano ocorre em um meio líquido contendo nutrientes solúveis, podendo ser conduzido em condições estáticas ou com aeração, além do controle de variáveis como temperatura e pH (Mascarin *et al.*, 2024). Esse método permite maior controle sobre os fatores nutricionais e ambientais, resultando em tempos de cultivo mais curtos, menor consumo de energia e mão de obra reduzida, além da produção de propágulos fúngicos como conídios submersos, blastosporos, micélio e suas estruturas

derivadas (microescleródios e clamidósporos) (Jaronski, 2023). Além disso, sob condições particulares de fermentação líquida, espécies de *Metarhizium* e *Beauveria* são capazes de formar conídios de microciclo, estruturas geradas na extremidade de hifas e consideradas uma modalidade distinta dos conídios verdadeiros (Zhang *et al.*, 2009 *apud* Jaronski, 2023).

Outro método empregado é o cultivo bifásico, que combina de forma sequencial as etapas de cultivo líquido e sólido. Nesse sistema, a primeira fase envolve a obtenção de micélio e blastosporos em meio líquido, geralmente realizada em frascos agitados ou biorreatores, gerando propágulos que servirão de inóculo para a etapa seguinte. Na segunda fase, o inóculo é adicionado a um meio sólido, onde ocorre a esporulação. A fermentação bifásica tem sido utilizada como alternativa para aprimorar processos produtivos, uma vez que reduz o tempo de incubação e permite maior rendimento de conídios (Fargus *et al.*, 2001 *apud* Roshandel *et al.*, 2016).

**Tabela 1 - Comparação entre os principais métodos de cultivo de fungos entomopatogênicos**

<b>Cultivo</b>	<b>Propágulos obtidos</b>	<b>Principais vantagens</b>	<b>Principais desvantagens</b>
Cultivo em estado sólido (CES)	Conídios aéreos	Alta produtividade de conídios, estabilidade durante armazenamento	Controle mais difícil de variáveis, maior tempo de cultivo
Cultivo submerso (CSm)	Blastosporos, conídios submersos, micélio e estruturas derivadas	Controle preciso de parâmetros, produção rápida e fácil escalonamento	Propágulos geralmente menos estáveis à dessecação, menor vida de prateleira
Cultivo bifásico	Biomassa micelial (CSm) seguida de conidiação (CES)	Produção rápida de biomassa e alta taxa de esporulação	Operacionalmente mais complexo

Fonte: Elaborado pela autora com dados de Jaronski e Jackson (2012), Roshandel *et al.* (2016), Jaronski (2023) e Mascarin *et al.* (2024).

Após o cultivo, os propágulos fúngicos obtidos são incorporados a diferentes formulações a depender do objetivo final. Desta forma, os bioinsumos podem ser aplicadas como pulverizações foliares, tratamento do material de plantio (tratamento de sementes, tratamento de raízes de mudas), tratamentos pós-poda, irrigação do solo por aspersão ou gotejamento, tratamento em sulcos, entre outros. (Oancea *et al.*, 2017; Mawcha *et al.*, 2025).

### 3.3 Substrato para cultivo de fungos

Como organismos heterotróficos, os fungos dependem da assimilação de compostos orgânicos presentes no substrato para a obtenção de energia e síntese de biomoléculas (Nelson e Cox, 2014; Madigan *et al.*, 2016). Para sustentar o crescimento micelial, esporulação e síntese de metabólitos, o substrato de cultivo deve assegurar o suprimento de fontes de carbono assimiláveis, nitrogênio orgânico ou inorgânico, minerais e condições adequadas de umidade, pH, temperatura e oxigenação (Abiy e Tesfaye, 2019; Mascarin *et al.*, 2024). As exigências nutricionais variam de acordo com as espécies e até mesmo entre diferentes cepas (Wu *et al.*, 2010). Desta forma, a escolha do substrato exige ajustes finos na composição nutricional para o cultivo a depender do microrganismo empregado do produto final desejado (Pandey *et al.*, 2018).

#### 3.3.1 Resíduos agroindustriais como substrato para cultivo em estado sólido

Os resíduos agroindustriais são subprodutos gerados durante diferentes etapas do processamento de matérias-primas de origem vegetal, como por exemplo cascas, polpas e bagaços de frutas e hortaliças, frações externas de cereais (como farelos e gérmenes), além de vagens, talos e tortas resultantes de processos de extração de óleos (Abiy e Tesfaye, 2019; Šelo *et al.*, 2021). A composição química desses materiais é variada (Tabela 2), englobando polissacarídeos estruturais e de reserva, proteínas, fibras, ácidos graxos, lipídios, compostos fenólicos, entre outros (Kumar *et al.*, 2017).

Os polissacarídeos são biopolímeros constituídos por monossacarídeos ligados covalentemente por ligações glicosídicas e representam a fração mais abundante de carbono presente na biomassa vegetal. Eles podem ser classificados em polissacarídeos estruturais da parede celular, como a celulose e as hemiceluloses, e polissacarídeos de reserva energética, como o amido (Wang *et al.*, 2020). A lignina, embora frequentemente mencionada em conjunto, trata-se de um polímero fenólico (Ren *et al.*, 2024).

Mitchell e colaboradores (2002) classificam os resíduos agroindustriais em três categorias principais: os amiláceos, nos quais o amido é o polissacarídeo que constitui a principal fonte de carbono; os lignocelulósicos, caracterizados pela predominância de celulose e lignina; e os substratos formados majoritariamente por açúcares solúveis. A maior parte dos resíduos agroindustriais se enquadra no grupo das biomassas lignocelulósicas (Šelo *et al.*, 2021).

**Tabela 2 - Composição nutricional de resíduos agroindustriais comuns**

Material	Lignina (% bs)	Celulose (% bs)	Hemicelulose (% bs)	Proteína (% bs)	Cinzas (% bs)
Resíduo de cervejaria	4 - 27,8	13,14 - 16,8	28,4 - 39	23,4 - 27,4	3 - 5
Bagaço de uva	11,6 - 41,3	9,2 - 14,5	4 - 10,3	7 - 23,5	4,7 - 9,5
Resíduos da extração de azeite	13,3 - 15,8	24,8 - 33,8	13 - 16,3	6,7- 7,2	2,5 - 8,9
Farelo de arroz	~ 24,8	~ 34	~ 28,2	5,8 - 8,3	ND
Bagaço de cana-de-açúcar	18,9 - 26,1	36,9 - 45,7	25,60 - 29,58	~ 2,18	~ 2,84
Farelo de trigo	3 - 5	9 - 12	~ 38,9	9,6 - 18,7	0,04 - 8,1
Palha de cevada	9,6 - 13,8	33,8 - 46,8	21,9 - 30	~ 4 <sup>a</sup>	4,1 - 23,6
Casca de soja	7,8 - 10,1 <sup>b</sup>	30,1 - 37 <sup>b</sup>	~34,65 <sup>c</sup>	9,74 <sup>c</sup> - 12,6 <sup>a</sup>	~ 4,06 <sup>c</sup>
Palha de aveia	4,1 - 23,6	31,7 - 39,4	23,3 - 28,2	~ 4 <sup>a</sup>	~ 19,8
Palha de arroz	8,3 - 9,9	19,6 - 36,2	19 - 50,4	4,8-5,6 <sup>a</sup>	~ 14,8
Palha de centeio	19 - 30,8	37,4 - 37,6	~ 30,5	~ 4 <sup>a</sup>	~ 29,4
Colmos de soja	~ 19,8	~ 34,5	~ 24,8	ND	13,4 - 17,5
Palha de trigo	8,9 - 22,1	32,9 - 49,8	23,7 - 25	~ 9 <sup>a</sup>	8,9 - 22,1

% bs — porcentagem na base seca; ND — não determinado;

<sup>a</sup> Valor obtido em Da Silva *et al.* (2021).

<sup>b</sup> Valor obtido em França (2019).

<sup>c</sup> Valor obtido em Martins *et al.* (2015).

Fonte: Adaptado de Šelo *et al.*, 2021.

Embora estes subprodutos tenham composições nutricionais que ainda podem ser aproveitadas, grande parte deles é tradicionalmente tratada como resíduo de baixo valor econômico. Em setores como a vinificação e o processamento de grãos, a biomassa residual pode corresponder a cerca de 30% da matéria-prima utilizada (Teixeira *et al.*, 2014; Călinoiu, *et al.*, 2019), o que evidencia a expressiva quantidade de resíduos gerada. Quando descartados sem critério, esses resíduos podem implicar em riscos ambientais, o que ressalta a necessidade de estratégias de valorização e reaproveitamento destes materiais.

Diante de sua rica composição nutricional, a utilização desses resíduos provenientes das indústrias alimentícia e agrícola constitui uma alternativa amplamente estudada e aplicada em biotecnologia (Aita *et al.*, 2019; Šelo *et al.*, 2021; Mattedi *et al.*, 2023), sobretudo por seu baixo custo, fácil disponibilidade e potencial para substituir substratos convencionais em diferentes processos microbiológicos (Vicente, 2021; Chilakamarry *et al.*, 2022).

Nesse contexto, o cultivo em estado sólido (CES) tem sido apontada como uma das abordagens mais promissoras para a conversão e valorização desses materiais. Diversos estudos demonstram a viabilidade da utilização desses subprodutos como substrato desde a produção de bioenergia até o desenvolvimento de insumos para as indústrias química, agrícola, alimentícia e farmacêutica (Šelo *et al.*, 2021; Chilakamarry *et al.*, 2022).

Dentre os principais produtos obtidos de fermentações em estado sólido utilizando subprodutos agroindustriais como substrato estão os próprios microrganismos (bactérias, fungos filamentosos e leveduras) que podem ser utilizados, por exemplo como agentes de biocontrole e biorremediação, e os metabólitos produzidos por eles (Šelo *et al.*, 2021). Esses metabólitos podem incluir enzimas (como amilases, celulasas, lipases e proteases), antibióticos e ácidos orgânicos (Chilakamarry *et al.*, 2022).

### **3.4 Formulações de micopesticidas**

A eficácia de um agente de controle microbiológico está intrinsecamente ligada à sua formulação (Mishra e Arora, 2016; Jaronski e Mascarin, 2023). Esta é definida como o processo de incorporação do ingrediente ativo (propágulos fúngicos, como conídios, blastósporos ou microescleródios) em uma matriz de carreadores e adjuvantes, visando sua preservação, manipulação, aplicação e performance biológica do produto final (Bejarano e Puopolo, 2021; Khan *et al.*, 2023; Jaronski e Mascarin, 2023).

Segundo Mishra e Arora (2016), o panorama atual do mercado divide essas formulações em duas categorias principais: sólidas e líquidas. No âmbito das formulações sólidas, destacam-se os grânulos, o pó molhável (WP: *wettable powder*), os microgrânulos e

os pós secos (DP: *dustable powders*). No grupo das formulações líquidas, encontram-se as suspensões concentradas em água, as dispersões em óleos e as emulsões, que consistem em combinações de fases aquosas e oleosas.

Jaronski e Mascarin (2023) afirmam que o desenvolvimento de formulações para micopesticidas devem atender a uma série de requisitos críticos para assegurar sua eficácia e viabilidade prática. Um imperativo fundamental é a manutenção da viabilidade dos propágulos em estado de dormência metabólica durante o período de armazenamento, idealmente em temperaturas ambientes, dispensando a necessidade de cadeias de refrigeração, o que representa um grande avanço logístico e comercial. Tradicionalmente, as formulações de bioprodutos consistem em 3 elementos: ingrediente ativo, adjuvantes e carreadores (Khan *et al.*, 2023). Os adjuvantes e carreadores escolhidos para compor a formulação devem potencializar ou ao menos não afetar negativamente o desempenho do fungo nos processos de germinação e infecção (Bejarano e Puopolo, 2021; Jaronski, 2023).

Para aplicação via pulverização, é essencial que os propágulos possam ser facilmente suspensos no veículo de aplicação, seja aquoso ou oleoso, prevenindo a sedimentação e obstrução dos bicos de pulverização. Adicionalmente, a formulação deve conferir proteção aos propágulos contra estresses abióticos pós-aplicação, assegurando sua persistência e infectividade na área tratada, como o solo e partes da planta, especialmente frente à exposição à radiação ultravioleta (UV-A e UV-B), à dessecação, chuvas e ventos (Mishra e Arora, 2016; Jaronski e Mascarin, 2023). A elaboração de formulações para aplicação no solo apresenta uma dificuldade considerável, devido à heterogeneidade dos solos e dos ambientes resultantes, que são imprevisíveis e, frequentemente, hostis para os organismos introduzidos (Paau, 1998 *apud* Legget *et al.*, 2011).

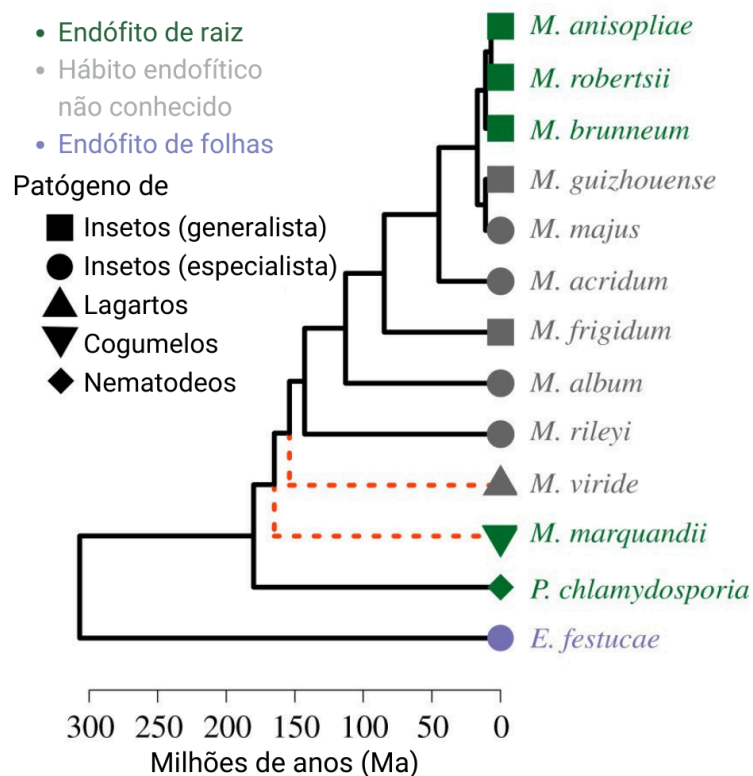
A escolha da formulação não segue um protocolo universal, mas deve ser orientada por uma análise criteriosa das condições específicas de cada cenário de aplicação (Leggett, *et al.*, 2011; Mishra e Arora, 2016; Deguine *et al.*, 2021; Jaronski e Mascarin, 2023). Fatores como a morfologia e fenologia da cultura-alvo, a parte da planta onde a praga se aloja, as condições edafoclimáticas predominantes e, crucialmente, a biologia e o comportamento do inseto-alvo são parâmetros decisivos para a escolha da formulação mais adequada. Felizmente, o arcabouço tecnológico atual oferece um portfólio diversificado de formulações, permitindo aos pesquisadores e técnicos selecionar a que melhor se alinha com as necessidades particulares de cada sistema praga-cultura-ambiente, visando maximizar a eficiência do controle microbiano.

### 3.5 *Metarhizium anisopliae*

O gênero *Metarhizium* (Hypocreales: Clavicipitaceae) tem como espécies representantes fungos mesofílicos com distribuição cosmopolita, isolados de diferentes solos e insetos contaminados em todos os continentes, com exceção da antártica (Kepler *et al.*, 2014). A primeira espécie do gênero foi isolada por volta de 1870 por Metschnikoff na Ucrânia (Roberts e St. Leger, 2004). As espécies são encontradas em temperaturas entre 10°C e 40°C, com temperatura de crescimento ótima entre 25°C a 30°C (St. Leger e Wang, 2020).

Os representantes do gênero são conhecidos por habitarem a rizosfera, e exibem modos de vida saprófitos, endofíticos, antagonistas de fungos fitopatogênicos e patógenos de artrópodes-praga (Figura 4). Desta forma, o transcriptoma é modulado para atender às necessidades imediatas do fungo diante da disponibilidade de diferentes fontes de nutrientes em cada cenário (Rohlf e Churchill, 2011; Stone e Bidochka, 2020; St. Leger e Wang, 2020).

**Figura 4 - Espécies sequenciadas do gênero *Metarhizium* e fungos relacionados (linhas sólidas). Em linhas vermelhas tracejadas, estão duas espécies não sequenciadas (*Metarhizium marquandii* e *Metarhizium viride*) que foram posicionadas na árvore com base em uma filogenia multigênica. Os nomes das espécies são codificados por cores para indicar os modos nutricionais.**



Fonte: Adaptado de St. Leger e Wang (2020)

O fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin é um deuteromiceto filamentoso pertencente à família Clavicipitaceae e foi o primeiro agente fúngico conhecido produzido em larga escala e introduzido com sucesso para controlar pragas de insetos (Krassiltschik, 1888; Steinhaus, 1975 *apud* Roberts e St. Leger, 2004), sendo descrito como patógeno de insetos na literatura já em 1879 e originalmente nomeado *Entomophthora anisopliae* (Metschnikoff 1879 *apud* St. Leger e Wang, 2020). Até os dias atuais, o fungo é amplamente utilizado como agente entomopatogênico de insetos-praga e infecções por *M. anisopliae* já foram relatadas em uma ampla diversidade de hospedeiros, incluindo aracnídeos e insetos, dentre eles pragas agrícolas e vetores de doenças de importância para a saúde humana (Peng *et al.*, 2022).

No âmbito da saúde pública, destaca-se sua eficácia contra vetores como o carrapato-estrela (*Amblyomma cajennense*) (Reis *et al.*, 2001) e mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* (Santos *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2023). No setor agrícola, o uso de *Metarhizium anisopliae* no Brasil para o controle das cigarrinhas da cana-de-açúcar (*Mahanarva fimbriolata*) constitui um dos maiores programas de controle biológico do mundo e é considerado um dos mais bem sucedidos, com uma adoção consolidada que abrange anualmente entre 2 e 3 milhões de hectares tratados (Iwanicki *et al.*, 2019; Parra e Coelho, 2019).

Em março de 2024, haviam registros de 295 bioinseticidas, sendo 96 deles à base de *Metarhizium anisopliae*. Em 2025, impulsionado por um recorde de 162 novos registros de bioinsumos em um único ano, o país ultrapassou a marca de 111 produtos comerciais à base de *M. anisopliae*, consolidando-o como o segundo microrganismo mais utilizado da categoria, superado apenas pelo fungo *Beauveria bassiana* (MAPA, 2026).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa foi desenvolvida no Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos (DETA) do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de São José do Rio Preto.

### 4.1 Microrganismo

Para os testes laboratoriais, utilizou-se o fungo *Metarhizium anisopliae*, cepa IBCB 425, cedida gentilmente pelo Instituto Biológico de São Paulo. Os esporos da cultura original foram criopreservados em tubos eppendorf a  $-80^{\circ}\text{C}$ , utilizando glicerol como agente crioprotetor. Para a utilização, a cultura original foi descongelada e repicada a partir de um único tubo para a multiplicação do fungo e realização de experimentos.

O inóculo primário foi estabelecido por meio da transferência dos conídios criopreservados para frascos Erlenmeyer de 50 ml inclinados contendo o meio de cultivo ágar batata dextrose (BDA) e posteriormente colocados em câmaras BOD a  $27^{\circ}\text{C}$  por 15 dias (Vicente, 2021). Decorrido esse período, a suspensão conidial foi preparada adicionando polissorbato 80 (Tween 80) diluído a 0,1% (v/v) em água deionizada aos frascos, e a concentração ajustada para  $10^7$  conídios por grama de substrato seco (gss), por meio de diluição seriada e quantificados em câmara de Neubauer sob microscopia óptica (40x).

Após sucessivas repicagens do isolado, se faz necessário realizar o processo de reativação (Figura 5), uma vez que fungos filamentosos tendem a ter sua viabilidade e virulência reduzida quando cultivados em meios de cultura artificiais por muitas gerações seguidas (Alves e Faria, 2010; Faria *et al.*, 2022). O processo de reativação foi realizado a cada 3 gerações, transferindo o fungo em meio de cultura BDA contendo larvas de tenébrio aderidas à superfície e incubado por 15 dias em câmaras BOD a  $27^{\circ}\text{C}$ .

**Figura 5 - Método de reativação do fungo *Metarhizium anisopliae* utilizando larva de *Tenebrio molitor***



Fonte: Autoria Própria (2025)

#### 4.2 Cultivo em embalagens de polipropileno

Para os cultivos em estado sólido (CES), foram utilizadas embalagens plásticas de polipropileno nas dimensões de 20x15cm, nas quais foram fixados bocais de PVC nas aberturas com o auxílio de fita crepe, garantindo a vedação adequada e certificando-se de que os tubos estivessem firmemente presos, sem escape de ar nas junções. Esses bocais possibilitam o encaixe de tampões de algodão recobertos por gaze, que funcionam como filtros que favorecem a aeração do sistema e mantêm a integridade do material cultivado ao evitar a entrada de contaminantes microbiológicos (Figura 6).

**Figura 6 - Cultivos em estado sólido em embalagens de polipropileno**



Fonte: Autoria própria (2024)

Conforme anteriormente mencionado, o cultivo foi realizado em dois tipos de substrato: o controle, composto de arroz e bagaço de cana (BC) na proporção de 9:1 (p/p), e o substrato alternativo, constituído de farelo de trigo (FT) e BC na proporção de 7:3. Cada cultivo foi realizado em triplicata na quantidade de 50g (ativo:suporte) em cada uma das embalagens.

Neste experimento, o farelo de trigo foi designado como substrato alternativo, enquanto o arroz foi utilizado como parâmetro de controle. O bagaço de cana-de-açúcar, por sua vez, foi empregado como um material suporte para evitar a aglomeração do meio cultivado e promover a troca gasosa, assim como descrito por Cunha e colaboradores (2020).

**Figura 7 - Substratos utilizados no cultivo em estado sólido**



Fonte: Autoria própria (2024)

O arroz e o farelo de trigo foram adquiridos em estabelecimentos comerciais locais e utilizados sem qualquer tratamento prévio. Já o bagaço de cana-de-açúcar, um resíduo geralmente proveniente de atividade sucro-alcooleira, foi obtido na Usina Vale, localizada em Onda Verde-SP. O bagaço foi inicialmente submetido à secagem em estufa de convecção forçada a 60°C até que atingisse peso constante. Posteriormente, o material seco foi processado por tamização sequencial, utilizando peneiras com aberturas de 3 mm, 2 mm e 1 mm, respectivamente. Para garantir uma maior uniformidade do substrato, foi selecionada apenas a fração retida entre as peneiras de 2 mm e 1 mm. A fim de preservar a integridade física e biológica dos materiais até o momento da utilização, todos foram acondicionados em sacos plásticos de alta densidade fechados e mantidos sob congelamento a -16 °C.

A umidade inicial de cada substrato foi medida separadamente por meio de uma balança de determinação de umidade por infravermelho (modelo MB 45, Ohaus, Estados Unidos), permitindo o ajuste posterior à umidade desejada. Conforme os métodos definidos por Cunha (2020), Vicente (2021) e Messias (2024), a umidade inicial foi ajustada para 48% (base úmida) no substrato controle (arroz e BC) e 70% (b.u.) no substrato alternativo (farelo de trigo e bagaço de cana) utilizando água destilada .

Após terem suas respectivas umidades ajustadas, os bocais das embalagens foram envoltos em papel alumínio, autoclavados (1 atm; 15 minutos a 121°C). Após o resfriamento das embalagens, estas foram inoculadas com 5 mL de suspensão de Tween 80 a 0,1% (v/v) contendo esporos de *Metarhizium anisopliae* na concentração de 10<sup>8</sup> esporos/mL, quantificados previamente em câmara de Neubauer. O fungo foi então cultivado por 15 dias em câmara de incubação tipo DBO, a 27°C com umidade relativa do ar de aproximadamente 50% aferida por termo-higrômetro digital MTH-1362W (Minipa, 2010).

### 4.3 Ensaio de vigor dos conídios

Para avaliar o vigor dos esporos produzidos no substrato alternativo (mistura de farelo de trigo e bagaço de cana), adotou-se o protocolo estabelecido por Faria e colaboradores (2022). Como controle, utilizaram-se esporos cultivados em arroz, com todos os cultivos realizados em triplicata. Após 15 dias de incubação, a biomassa foi retirada das embalagens de polipropileno e transferida para assadeiras de alumínio e submetida à secagem em incubadora DBO a 27°C por 5 dias a uma umidade relativa do ar de aproximadamente 50%.

Posteriormente à secagem, três amostras de 1 g de cada meio de cultivo foram acondicionadas em recipientes previamente higienizados e identificados, adicionando-se 10 mL de solução de Tween 80 a 0,1% (v/v). As suspensões foram submetidas à agitação recíproca a 120 b.p.m por 40 minutos em banho metabólico tipo Dubnoff (Marconi, Piracicaba, Brasil), visando à homogeneização da suspensão conidial. Alíquotas foram coletadas para contagem em câmara de Neubauer sob microscópio óptico e após a quantificação, as suspensões foram ajustadas para a concentração de  $10^5$  conídios/mL por microdiluição seriada utilizando Tween 80 a 0,1% (v/v) como diluente (Faria *et al.*, 2022).

Em continuidade ao protocolo experimental, foram realizadas inoculações em placas de Petri (60x15mm) contendo uma fina camada de meio de cultura BDA. Cada placa recebeu três alíquotas de 200µL da suspensão conidial, distribuídas de maneira equidistante sobre a superfície do meio de cultura. As amostras foram incubadas em câmara BOD a 27°C, sob ausência de luz, por um período de 18 horas.

Decorrido o período de incubação, as placas foram coradas com lactofenol azul de algodão e analisadas em microscópio óptico com aumento de 40x. Para cada placa, três lamínulas foram dispostas aleatoriamente, sendo contabilizados 100 conídios por lamínula, totalizando 300 conídios avaliados por unidade experimental. A determinação do vigor conidial se baseou na presença de tubos germinativos com comprimento superior ao diâmetro do conídio original. Conídios que apresentaram ausência de germinação ou tubos germinativos de dimensão inferior ao diâmetro do conídio foram considerados não vigorosos (Dantigny, 2006; Faria *et al.*, 2022).

### 4.4 Ensaio de patogenicidade em diferentes concentrações

A patogenicidade dos esporos cultivados foi avaliada em três concentrações distintas, com o objetivo de determinar a influência da concentração empregada e do substrato de cultivo sobre a mortalidade larval. Após 15 dias do cultivo em embalagens de polipropileno e esporulação do fungo (item 4.2), as embalagens foram abertas e dispostas em assadeiras. Em

seguida, a biomassa foi submetida à secagem por aproximadamente cinco dias em BOD, a 27 °C e 50% de umidade relativa, até atingir cerca de 7% de umidade

Para estabelecer a relação dose-resposta, foram testadas três concentrações ( $10^7$ ,  $10^8$  e  $10^9$  conídios/gss) para cada substrato cultivado. As concentrações inferiores a  $10^9$  conídios/gss foram obtidas através de diluições sólidas seriadas em farelo de trigo autoclavado, partindo da quantificação inicial de esporos do meio micotizado em câmara de Neubauer seguindo o protocolo de contagem descrito no item 4.3. O protocolo de diluição consistiu na adição de 1g da biomassa micotizada em 9g de farelo de trigo autoclavado, seguido de homogeneização manual vigorosa com o auxílio de uma espátula autoclavada até se obter uma distribuição visualmente uniforme do substrato, repetindo-se o processo de maneira sequencial até a obtenção das demais concentrações desejadas.

Larvas de besouros da espécie *Tenebrio Molitor* (Tenebrionidae), foram utilizadas como inseto modelo nos bioensaios de patogenicidade, devido à sua susceptibilidade ao fungo estudado e à facilidade de obtenção de grandes quantidades de indivíduos em comércio local. No período entre o dia da compra até a utilização das larvas para os ensaios, os tenébrios foram mantidos em escuridão constante sob dieta artificial constituída por farelo de trigo autoclavado. As larvas utilizadas nos experimentos foram triadas, sendo selecionadas aquelas com tamanho corporal compreendido entre 1,0 e 1,5 cm.

Para cada tratamento, 20 larvas foram submetidas em contato direto com o substrato micotizado, sendo todos os ensaios, incluindo o controle, conduzidos em triplicata. As unidades experimentais foram mantidas a 27 °C em incubadora BOD com 50% de umidade relativa, e a sobrevivência larval foi monitorada diariamente por um período de 15 dias, iniciando-se a contagem no quinto dia pós-inoculação.

#### **4.5 Observação em microscopia de luz**

Afim de identificar possíveis diferenças morfológicas entre os esporos produzidos nos diferentes meios de cultura, os conídios foram visualizados em microscópio óptico de luz Olympus BX50 (Olympus Corporation, Center Valley, PA, USA), com a utilização do software Olympus cellSens Standard 1.18 (Olympus Corporation, Center Valley, PA, USA). para a captura das imagens. Lâminas de esporos retirados de cadáveres de larvas de tenébrio e produzidos por cultivo em estado sólido por 15 dias nos dois meios descritos no item 5.1, foram preparadas utilizando 200µL de suspensão de esporos diluídas em tween 80 (0,1%) e coradas com o corante lactofenol (azul de algodão).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Concentração de conídios obtidos

Para avaliar o potencial do meio alternativo composto por farelo de trigo e bagaço de cana (7:3, p/p) a 70% de umidade inicial na produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* IBCB 425, comparou-se a concentração de conídios produzidos com aquela obtida no meio constituído por arroz e bagaço de cana (9:1, p/p) a 48% de umidade.

Nos cultivos realizados no presente trabalho, foi observado que ambos os meios de cultivo testados foram capazes de produzir conídios em concentrações da ordem de  $10^9$  esporos por grama de substrato seco (gss). O meio controle à base de arroz e bagaço de cana (9:1, p/p) apresentou média de  $3,14 \times 10^9$  esporos/gss, enquanto o meio alternativo de farelo de trigo e bagaço de cana (7:3, p/p) teve média de  $4,47 \times 10^9$  esporos/gss (Tabela 3). A análise de variância (ANOVA) indicou diferença significativa entre os tratamentos ( $F=14,62$ ;  $p<0,001$ ), resultado confirmado pelo teste de Tukey, que evidenciou maior produção no meio alternativo e os coeficientes de variação indicaram variabilidade moderada entre repetições.

**Tabela 3 - Produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 em diferentes substratos após 15 dias de cultivo a 27°C.**

Cultivo	Média Ce $10^9$ (conídios/gss)	DP $10^9$	CV (%)
Arroz:BC (9:1)	3,14 <sup>a</sup>	0,74	23,5
Farelo:BC (7:3)	4,47 <sup>b</sup>	1,08	24,1

Ce: concentrações de conídios por grama de substrato seco (gss); BC = bagaço de cana; DP = desvio padrão; CV (%) = coeficiente de variação ( $CV = DP/média \times 100$ ). Letras diferentes nas colunas indicam que há diferença estatística entre as médias pelo teste de Tukey ao nível de confiança de 95%.

### 5.2 Taxa de vigor dos conídios

O vigor dos conídios foi avaliado após 18 horas de incubação a 27°C em ausência de luz. O substrato controle (arroz + bagaço de cana) promoveu maior média de porcentagem de germinação (93,83%), enquanto o substrato alternativo (farelo + bagaço de cana) resultou em vigor de 66,38% (Tabela 4). O teste ANOVA detectou efeito significativo do substrato sobre o vigor dos esporos produzidos ( $F= 32,21$ ;  $p<0,001$ ), com diferença confirmada pelo teste de

Tukey a 5% de probabilidade. A maior variabilidade foi observada no substrato alternativo (CV = 17,29%) em comparação ao controle (CV = 3,12%).

**Tabela 4 - Vigor de conídios de *Metarhizium anisopliae* produzidos em diferentes substratos.**

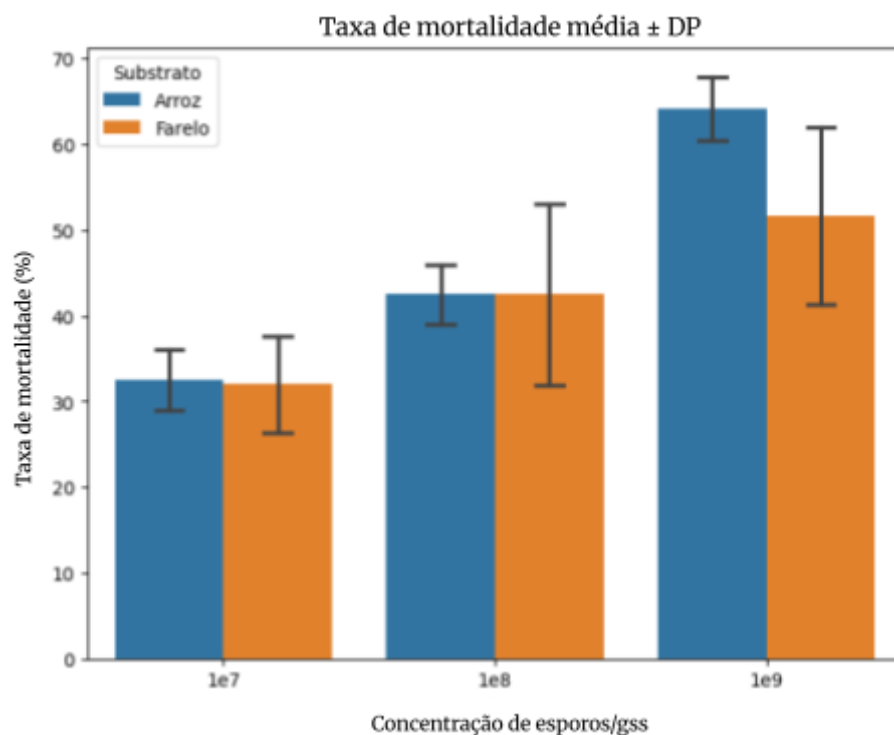
Cultivo	Média de vigor dos esporos (%)	DP	CV (%)
Arroz:BC (9:1)	93,83 <sup>a</sup>	2,93	3,12
Farelo:BC (7:3)	66,38 <sup>b</sup>	11,38	17,29

Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 5.3 Ensaio de patogenicidade diferentes concentrações

A análise da mortalidade final média de larvas submetidas aos diferentes substratos e concentrações de conídios de *Metarhizium anisopliae* demonstrou um aumento progressivo da taxa de mortalidade em função da concentração de esporos (Figura 8). As médias variaram de aproximadamente 32% a 65% para o substrato à base de arroz e de 31% a 52% para o substrato composto por farelo de trigo.

**Figura 8 -Taxa de mortalidade média em diferentes substratos e concentrações**



Fonte: Autoria Própria (2025)

Os dados das mortalidades finais médias nos ensaios realizados demonstraram uma clara relação dose-resposta, independentemente do substrato utilizado para o cultivo do fungo (Tabela 5).

**Tabela 5- Comparação por ANOVA Two-Way entre tratamentos na mortalidade final de larvas expostas a conídios de *Metarhizium anisopliae***

Fonte de variação	F	Valor de <i>p</i>
Substrato	3,77	0,073
Concentração	30,07	<0,001
Substrato:Concentração	2,06	0,164

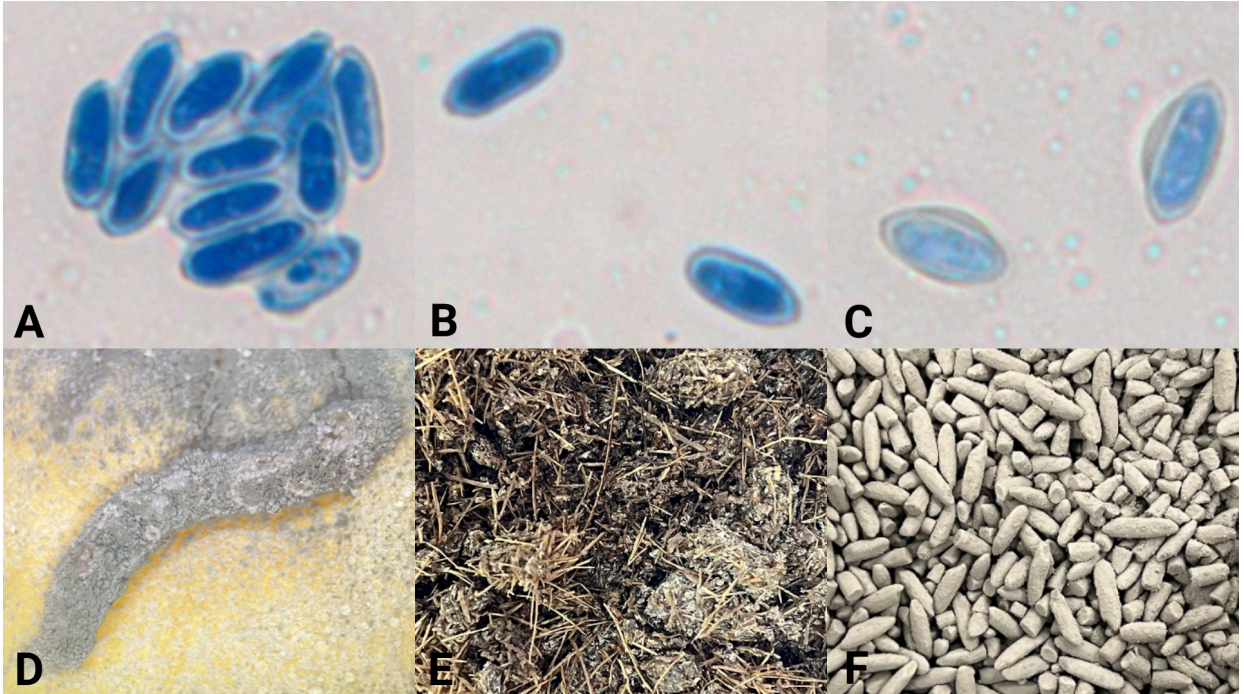
Fonte: Autoria Própria (2025)

#### 5.4 Observação em microscopia de luz

Para identificação de possíveis diferenças morfológicas nos conídios de *Metarhizium anisopliae* cultivados em diferentes substratos, esporos obtidos de três fontes de produção distintas foram submetidos à observação em microscopia de luz: esporos retirados da superfície de cadáveres de larvas de *Tenebrio molitor* infectadas, provenientes de cultivo em meio composto por arroz e bagaço de cana (9:1), e cultivo em meio composto por farelo de trigo e bagaço de cana (7:3).

Nas observações microscópicas, foram identificadas diferenças na coloração dos esporos produzidos nos distintos substratos. Os esporos obtidos a partir do arroz apresentaram coloração mais fraca ao lactofenol azul de algodão, com aspecto mais hialino. Em contraste, os esporos provenientes da infecção em larvas de *Tenebrio molitor* e do cultivo em farelo de trigo associado a bagaço de cana exibiram forte afinidade pelo corante, apresentando intensa coloração azul em toda a superfície da célula. Essas diferenças foram consistentes em todas as amostras analisadas, permitindo distinguir visualmente os esporos produzidos em arroz daqueles obtidos nos demais substratos (Figura 9).

**Figura 9 - Conídios de *Metarhizium anisopliae* obtidos em diferentes substratos corados com lactofenol azul de algodão em aumento 100× e suas respectivas origens. (A) Esporos recuperados de larvas de *T. molitor* infectadas (D); (B) Esporos obtidos por CES em farelo de trigo e bagaço de cana (E); (C) Esporos cultivados em arroz (F).**



Fonte: Autoria própria (2025)

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstram que ambos os substratos testados, o meio alternativo (farelo de trigo e bagaço de cana, 7:3 p/p) e o substrato controle (arroz e bagaço de cana, 9:1 p/p) apresentaram capacidade de produção de conídios na ordem de  $10^9$  esporos por grama de substrato seco (gss). Contudo, observou-se que o substrato alternativo obteve produtividade significativamente superior ( $4,47 \times 10^9$  esporos/gss) em comparação ao controle ( $3,14 \times 10^9$  esporos/gss). Tais resultados estão alinhados com estudos prévios, como os de Messias (2023) e Vicente (2021), que registraram concentrações médias de  $3,36 \times 10^9$  esporos/gss e  $2,2 \times 10^9$  esporos/g de substrato ativo, respectivamente. Ambos os trabalhos utilizaram farelo de trigo e bagaço de cana nas mesmas proporções e condições de umidade empregadas no presente estudo, além de terem avaliado a mesma cepa de *Metarhizium anisopliae* IBCB 425.

Em contraste, outros autores, como Ibrahim *et al.* (2015) e Roshandel *et al.* (2023), relataram produtividades consideravelmente menores quando utilizaram trigo ou farelo de trigo como substrato, obtendo  $4,9 \times 10^8$  conídios/mL<sup>-1</sup> e  $4 \times 10^6$  conídios/g, respectivamente. Esses valores são substancialmente inferiores aos registrados pelos mesmos autores em meios à base de arroz, nos quais foram alcançadas concentrações de  $1,3 \times 10^9$  conídios/mL<sup>-1</sup> e  $3,8 \times 10^7$  conídios/g, respectivamente.

Tais diferenças podem estar associadas ao uso de trigo e farelo de trigo como únicos componentes do meio, sem a adoção de um suporte físico, como o bagaço de cana, empregado no presente estudo. Isso pode ter limitado a oxigenação e a transferência de calor durante o período de cultivo do microrganismo. Soma-se a isso o uso de cepas distintas da avaliada neste trabalho, uma vez que a quantidade de conídios produzidos é dependente da cepa utilizada (Mascarin *et al.*, 2015; Jaronski, 2023). Dessa forma, os valores reportados para um isolado não podem ser diretamente extrapolados para outros isolados da mesma espécie. Por fim, a ausência de informações sobre a umidade do substrato nos estudos citados limita comparações mais abrangentes entre os resultados.

Apesar da maior produtividade, os conídios produzidos no substrato composto por farelo de trigo e BC exibiram vigor germinativo inferior e maior sensibilidade aos processos de secagem quando comparados aos produzidos em arroz. Esta diferença pode ser atribuída às características nutricionais e físico-químicas distintas dos substratos (item 3.2.1), além das porcentagens de umidade adotadas nos cultivos. Resultados semelhantes foram reportados por Ibrahim e colaboradores (2015), que observaram germinação média de 70,2% de conídios de *Metarhizium anisopliae* cultivados em grãos de trigo. Em contraste, os conídios produzidos

em grãos de arroz mantiveram valores de vigor médio próximos a 89,5%, indicando maior tolerância às etapas de secagem que precedem os ensaios de vigor de esporos. Estudos prévios realizados com *Metarhizium anisopliae* demonstraram que fatores nutricionais durante a conidiogênese influenciam decisivamente a morfologia, fisiologia e composição química dos conídios (Rangel *et al.*, 2004; Shah; Wang e Butt, 2005; Rangel, Anderson e Roberts, 2006).

Os dados obtidos no presente estudo reforçam observações anteriores a respeito de “*trade-off*” fisiológico da relação entre rendimento, vigor germinativo e resistência às condições de estresse em fungos entomopatogênicos (Rangel, Anderson e Roberts, 2006). Enquanto os conídios produzidos em arroz apresentaram maior vigor, aqueles obtidos em meio composto por farelo de trigo e bagaço de cana revelaram maior rendimento por grama de substrato seco (gss), embora acompanhada por uma taxa de germinação significativamente menor ( $p < 0,001$ ).

Rangel, Anderson e Roberts (2006) demonstraram que o uso de fontes de carbono não convencionais (polissacarídeos de difícil assimilação) podem induzir a formação de conídios mais resistentes à radiação UV-B, ainda que com menor produtividade e germinação reduzida. Tal adaptação é frequentemente associada ao acúmulo de solutos, como trealose e polióis como o glicerol, eritritol e manitol (Ortiz-Urquiza e Keyhani, 2015), que contribuem para a integridade celular sob estresse, mas podem retardar o início da germinação (Ibrahim *et al.*, 2015; Rangel *et al.*, 2015). Isso pode ser explicado devido a uma possível limitação metabólica imposta pela necessidade de ativar vias de degradação mais complexas ou menos eficientes para transformar as fontes de carbono complexas (como celulose, hemicelulose) em intermediários do metabolismo. Embora os resultados obtidos no presente estudo sugiram um comportamento análogo, a resistência à radiação UV não foi avaliada, permanecendo como uma hipótese a ser considerada em estudos futuros.

No trabalho em questão, observou-se que os conídios cultivados apresentaram diferenças na coloração quando corados com Azul de Algodão (Item 5.4), o que pode indicar variações na composição e organização da parede celular (Ibrahim *et al.*, 2002). Os esporos produzidos em arroz apresentaram coloração mais fraca e aspecto hialino, o que sugere uma menor afinidade pelo corante utilizado. Em contraste, os conídios provenientes de substrato composto por farelo de trigo e bagaço de cana exibiram uma coloração mais intensa, indicando maior interação do corante com constituintes da parede celular. Estes resultados são consistentes com relatos Ibrahim *et al.* (2002), que observaram que a composição da parede celular dos conídios variou conforme o substrato utilizado, influenciando a hidrofobicidade dos esporos. A alta densidade de compostos, como  $\beta$ -glucanos, em paredes de conídios

cultivados em meios complexos foi evidenciada devido à intensa fluorescência desses conídios ao utilizar o corante calcofluor.

A nível molecular, Su et al. (2022) demonstraram que cascatas metabólicas distintas em *Metarhizium acridum* são acionadas conforme as condições de cultivo. O silenciamento do fator de transcrição *Mavib-1* desencadeia alterações na expressão de genes vinculados ao metabolismo de carboidratos e à biossíntese da parede celular dos esporos. Tais evidências sugerem que mecanismos análogos possam ocorrer em *M. anisopliae* por meio de genes homólogos. Assim, os diferentes meios de cultura avaliados no presente estudo poderiam modular a atividade regulatória e, conseqüentemente, a expressão gênica envolvida na síntese da parede celular dos conídios. Embora o foco desta pesquisa não tenha sido a análise de respostas regulatórias, essa modulação genética permanece como uma hipótese central para explicar as variações observadas.

Nos ensaios de patogenicidade conduzidos sob diferentes concentrações de conídios por grama de substrato seco ( $10^7$ ,  $10^8$  e  $10^9$ ), os dados de mortalidade acumulada após os 15 dias de experimento evidenciaram um padrão na relação dose-resposta para ambos os substratos avaliados, onde a concentração de inóculo exerceu efeito altamente significativo sobre a mortalidade das larvas ( $p < 0,001$ ). De acordo com Butt et al. (2016), a letalidade de fungos entomopatogênicos está diretamente relacionada à concentração de propágulos fúngicos empregada, uma vez que aumenta a probabilidade de uma infecção bem-sucedida com o número de conídios capazes de aderir ao corpo do inseto alvo. No presente estudo, essa dinâmica ficou evidente nos ensaios de concentração.

Apesar dos efeitos significativos atribuídos à concentração de esporos, o tipo de substrato utilizado para o cultivo do fungo não apresentou influência estatisticamente significativa sobre a mortalidade larval em nenhum dos experimentos conduzidos. De forma integrada, os resultados apresentados indicam que a eficácia do controle biológico mediante a aplicação direta de substratos colonizados por agentes microbianos ao solo não depende apenas das propriedades nutricionais do meio de cultivo, mas também dos fatores bióticos e abióticos do ambiente de aplicação. Embora pesquisas anteriores tenham abordado o uso de grãos micotizados, como milho, sorgo e arroz (Skinner et al., 2012; Kim et al., 2014; Zhang et al., 2019), faz-se necessário o desenvolvimento de estudos mais robustos que avaliem o desempenho desses sistemas sob condições não estéreis, capazes de refletir a complexidade físico-química e biológica dos solos agrícolas e suas implicações sobre a persistência e eficiência do agente entomopatogênico.

## 7 CONCLUSÃO

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de um método de aplicação alternativo à pulverização do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425, baseado na incorporação da biomassa integral produzida em farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar, sem a etapa de extração de esporos. Adicionalmente, buscou-se comparar a produtividade de conídios deste substrato com o tradicional método utilizando grãos de arroz.

Os resultados demonstram que o substrato apresentou concentração de esporos superior à do arroz. Contudo, os propágulos produzidos exibiram vigor significativamente inferior e maior sensibilidade à secagem, o que indica a necessidade de novos estudos visando a otimização das etapas do processo de *downstream*. Quanto à aplicação direta da biomassa, observou-se contaminação frequente por fungos potencialmente nocivos, mesmo em condições controladas. Este fato sugere que a introdução do substrato nutritivo no solo pode servir como fonte de nutrientes para microrganismos saprófitos oportunistas, desequilibrando a microbiota e elevando o risco de contaminação por micotoxinas.

Considerando que os experimentos foram conduzidos em substrato estéril, reconhece-se que as condições empregadas não reproduzem integralmente a complexidade físico-química e biológica dos ambientes agrícolas. Assim, a aplicabilidade do método em condições de campo permanece uma questão em aberto. A microbiota nativa do solo pode exercer efeitos competitivos, antagônicos ou sinérgicos distintos daqueles observados em ambiente controlado, influenciando tanto o estabelecimento do fungo quanto a persistência e virulência dos conídios.

A alta concentração de esporos obtida no substrato alternativo e a letalidade equivalente à do substrato controle o mantêm como uma alternativa promissora como substrato para a produção de *Metarhizium anisopliae* em estado sólido. Contudo, a adoção prática dessa formulação depende da superação das limitações observadas quanto à estabilidade pós-processamento, aspectos críticos para a manutenção da viabilidade e do desempenho biológico durante o armazenamento e a aplicação.

Portanto, destaca-se a necessidade de estudos complementares que avaliem a performance dessa proposta de aplicação sob condições edáficas reais, em solos não estéreis e sujeitos à variação natural de umidade, temperatura e microbiota. Tais investigações são fundamentais para compreender as implicações ecológicas da aplicação direta de biomassa micotizada de *M. anisopliae* ao solo, juntamente com o substrato de cultivo, e para validar o potencial de substratos alternativos em estratégias de controle biológico em larga escala.

## REFERÊNCIAS

- ABIY, T.; TESFAYE, A. Evaluation and optimization of agro-industrial wastes for conidial production of *Metarhizium anisopliae* isolates under solid state fermentation. **Momona Ethiopian Journal of Science**, v. 11, n. 2, p. 209-228, 2019.
- AITA, B. C. *et al.* Production of cell-wall degrading enzymes by solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 3, 2019.
- ALISSON, E. Registro de produtos para controle biológico de pragas ultrapassa o de agroquímicos no Brasil. **Agência FAPESP**: São Paulo, 2024.
- ALSVED, M. *et al.* Natural sources and experimental generation of bioaerosols: challenges and perspectives. **Aerosol Science and Technology**, v. 54, n. 5, p. 547-571, 2020.
- ALVES, R. T.; FARIA, M. Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos. **Planaltina (DF): Embrapa Cerrados**, p. 26-31, 2010.
- ANDREATA, M. F. *et al.* The current increase and future perspectives of the microbial pesticides market in agriculture: the Brazilian example. **Frontiers in Microbiology**, v. 16, 2025.
- ASHRAFI, M. R. *et al.* Correlation of 2, 4-DDT with CDH1 Gene Promoter Methylation in Gastric Cancer. **Journal of Kerman University of Medical Sciences**, v. 31, n. 1, p. 1-7, 2024.
- AYALA-ZERMEÑO, M. A. *et al.* Viability, purity, and genetic stability of entomopathogenic fungi species using different preservation methods. **Fungal biology**, v. 121, n. 11, p. 920-928, 2017.
- BABU, C. R. *et al.* Wheat bran-composition and nutritional quality: a review. **Adv. Biotechnol. Microbiol**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2018.
- BEJARANO, A.; PUOPOLO, G. Bioformulation of microbial biocontrol agents for a sustainable agriculture. In: **How research can stimulate the development of commercial biological control against plant diseases**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 275-293
- BEYS-DA-SILVA, W. *et al.* Updating the application of *Metarhizium anisopliae* to control cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 208, 2020.
- BIRNBAUM, N. *et al.* Not only a formulation: The effects of Pickering emulsion on the entomopathogenic action of *Metarhizium brunneum*. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 7, p. 499, 2021
- BRUNNER-MENDOZA, C. *et al.* A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico. **Biocontrol Science and Technology**, v. 29, n. 1, p. 83-102, 2019.

BUTT, T. M. *et al.* Entomopathogenic fungi: new insights into host–pathogen interactions. **Advances in genetics**, v. 94, p. 307-364, 2016.

CASCIATORI, F. P. *et al.* Hygroscopic properties of solid agro-industrial by-products used in solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 114-123, 2015.

CHILAKAMARRY, C. R. *et al.* Advances in solid-state fermentation for bioconversion of agricultural wastes to value-added products: Opportunities and challenges. **Bioresource technology**, v. 343, 2022.

CUNHA, L. P. **Produção de esporos do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 utilizando biorreator de leito empacotado.** 2020. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2020.

DANTIGNY, P. *et al.* Standardisation of methods for assessing mould germination: a workshop report. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, n. 2, p. 286-291, 2006.

DA SILVA, E. I. C. **Formulação e fabricação de rações para ruminantes.** Belo Jardim, 2021.

DEGUINE, J.P. *et al.* Integrated pest management: good intentions, hard realities. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 41, n. 3, p. 38, 2021.

DIVATE, R. D. *et al.* Using wheat bran and soybean meal as solid state fermentation substances for the production of *Xylaria nigripes* with bioactivities. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 70, p. 127-133, 2017.

FARIA, M. R. *et al.* Controle de qualidade de produtos comerciais à base de fungos para o manejo de invertebrados (insetos, ácaros, nematoides) em sistemas agropecuários. **Brasília (DF): Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2022.**

FARIA, M.; HAJEK, A. E.; WRAIGHT, S. P. Imbibitional damage in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium acridum*, and *Metarhizium anisopliae*. **Biological Control**, v. 51, n. 3, p. 346-354, 2009.

FERNANDES, M. L. M. Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise. **Curitiba: Curso de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, 2007.**

FRANÇA, R. S. S. *et al.* **Obtenção de carvão a partir de casca de soja e aplicação na adsorção de herbicidas.** 2019. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 85-101, 2003.

GOMES, S. A. *et al.* The potential of *Metarhizium anisopliae* blastospores to control *Aedes aegypti* larvae in the field. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 7, p. 759, 2023.

HAJEK, A. E. Pathology and epizootiology of *Entomophaga maimaiga* infections in forest Lepidoptera. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 63, n. 4, p. 814-835, 2000.

HALLSWORTH, J. E.; MAGAN, N. Effect of carbohydrate type and concentration on polyhydroxy alcohol and trehalose content of conidia of three entomopathogenic fungi. **Microbiology**, v. 140, n. 10, p. 2705-2713, 1994.

HESEMANS, L. [Hemíptero infectado por *Metarhizium* sp.] (título atribuído) [fotografia]. Disponível em: <https://www.instagram.com/p/DL-WoTciKuM/>. Acesso em: 12 ago. 2025.

IBRAHIM, L. *et al.* Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, v. 106, n. 6, p. 705-715, 2002.

JARONSKI, S. T. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. **BioControl**, v. 55, p. 159-185, 2010.

JARONSKI, S. T. Mass production of entomopathogenic fungi - state of the art. **Mass production of beneficial organisms**, p. 317-357, 2023.

KERGUNTEUIL, A. *et al.* Biological control beneath the feet: a review of crop protection against insect root herbivores. **Insects**, v. 7, n. 4, p. 70, 2016

KEPLER, R. M. *et al.* Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. **Mycologia**, v. 106, n. 4, p. 811-829, 2014

KHAN, A. *et al.* Microbial bioformulation: a microbial assisted biostimulating fertilization technique for sustainable agriculture. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 2023.

KUMAR, K. *et al.* Food waste: A potential bioresource for extraction of nutraceuticals and bioactive compounds. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4, n. 1, p. 18, 2017.

LACEY, L. A. *et al.* Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of invertebrate pathology**, v. 132, p. 1-41, 2015

LEGGETT, M. *et al.* Formulation of microbial biocontrol agents—an industrial perspective. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 33, n. 2, p. 101-107, 2011.

LIU, Y.; WANG, L.; CHEN, H. Two-steps gas double-dynamic solid-state fermentation enhances growth and spore production of *Coniothyrium minitans*. **Bioresource Technology**, v. 262, p. 235-241, 2018.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock-14ª Edição**. Artmed Editora, 2016.

MANTZOUKAS, S.; ELIOPOULOS, P. A. Endophytic entomopathogenic fungi: A valuable biological control tool against plant pests. **Applied Sciences**, v. 10, n. 1, p. 360, 2020.

MAPA— **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários - AGROFIT. Consulta pública. Disponível em:

[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em: janeiro de 2026.

MAPA – **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Líder global na utilização de bioinsumos, Brasil apresenta panorama regulatório de registros biológicos na ABIM. Secretaria de Política Agrícola. – MAPA, Brasília, 22 out. 2024.

MARTINS, E. S. *et al.* Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 9, p. 949-954, 2002.

MARTINS, M. F.. Extração e caracterização da celulose e síntese de carboximetilcelulose a partir da casca de soja. 2016.

MASCARIN, G. M. *et al.* Advances in submerged liquid fermentation and formulation of entomopathogenic fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 108, n. 1, p. 451, 2024.

MASCARIN, G. M. *et al.* Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 127, p. 11-20, 2015.

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, p. 1-26, 2016.

MATTEDI, A. *et al.* Solid-state fermentation: Applications and future perspectives for biostimulant and biopesticides production. **Microorganisms**, v. 11, n. 6, 2023.

MAWCHA, K.T. *et al.* Recent advances in biopesticide research and development with a focus on microbials. **F1000Research**, v. 13, p. 1071, 2025.

MESSIAS, A. P. S. **Produção de esporos do fungo *Metarhizium anisopliae* em farelo de trigo empregando biorreator de coluna empacotada**. 2024. Dissertação (Mestrado em Alimentos, Nutrição e Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2024.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Overview of solid state bioprocessing. **Biotechnology Annual Review**, v. 8, p. 183–225, 2002.

MOSLIM, R. *et al.* Mass production of *Metarhizium anisopliae* using solid-state fermentation and wet harvesting methods. In: **proceedings of the PIPOC 2005 international palm oil congress (agriculture, biotechnology and sustainability)**. Kuala Lumpur, Malaysia: **Malaysian Palm Oil Board**. 2005. p. 928-943.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

OANCEA, F. *et al.* Formulation of the multi-functional *Trichoderma* strains. **Trichoderma spp. Applications in Agriculture and Horticulture**, p. 384-414, 2017.

ORGIAZZI, A.; BARDGETT, R. D.; BARRIOS, E. **Global soil biodiversity atlas**. 2016.

ORTIZ-URQUIZA, A.; KEYHANI, N. O. Stress response signaling and virulence: insights from entomopathogenic fungi. **Current Genetics**, v. 61, n. 3, p. 239-249, 2015.

PARRA, J. R. P.; COELHO, A. Applied biological control in Brazil: from laboratory assays to field application. **Journal of Insect Science**, v. 19, n. 2, p. 5, 2019.

PENG, G. *et al.* Long-term field evaluation and large-scale application of a *Metarhizium anisopliae* strain for controlling major rice pests. **Journal of Pest Science**, v. 94, n. 3, p. 969-980, 2021.

PENG, Z.Y. *et al.* An update of a green pesticide: *Metarhizium anisopliae*. **All Life**, v. 15, n. 1, p. 1141-1159, 2022.

RANGEL, D. EN; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources yields conidia with increased UV-B tolerance. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 93, n. 2, p. 127-134, 2006.

RANGEL, D. EN *et al.* Stress tolerance and virulence of insect-pathogenic fungi are determined by environmental conditions during conidial formation. **Current genetics**, v. 61, n. 3, p. 383-404, 2015.

RANGEL, D. EN *et al.* Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 87, n. 2-3, p. 77-83, 2004.

REIS, R. C. S. *et al.* Ação in vitro dos fungos *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok sobre ninfas e adultos de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787)(Acari: Ixodidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p. 544-547, 2001.

REN, F. *et al.* Fungal systems for lignocellulose deconstruction: From enzymatic mechanisms to hydrolysis optimization. **Gcb Bioenergy**, v. 16, n. 5, 2024.

ROBERTS, D. W.; ST LEGER, R. J. *Metarhizium spp.*, cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. **Advances in applied microbiology**, v. 54, n. 1, p. 1-70, 2004.

ROHLFS, M.; CHURCHILL, A. CL. Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 1, p. 23-34, 2011.

ROSHANDEL, S. *et al.* The effects of natural substrates on the sporulation and viability of conidia and blastospores of *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol in Plant Protection**, v. 4, n. 1, p. 94-104, 2016.

SANTOS, A. H. *et al.* Dependence of *Metarhizium anisopliae* on high humidity for ovicidal activity on *Aedes aegypti*. **Biological Control**, v. 50, n. 1, p. 37–42, 2009.

SCHAFFER, N.; DIONELLO, R.G. **Utilização De Fungos Entomopatogênicos No Controle De Pragas De Grãos Armazenados: Uma Revisão**. Monografia (Pós-Graduação Lato Sensu em Fitossanidade, Setor de Ciências Agrárias) - Universidade Federal Do Paraná, Curitiba, 2023.

SCHEEPMAKER, J. W. A.; BUTT, T. M. Natural and released inoculum levels of entomopathogenic fungal biocontrol agents in soil in relation to risk assessment and in accordance with EU regulations. **Biocontrol Science and Technology**, v. 20, n. 5, p. 503-552, 2010.

ŠELO, G. *et al.* A comprehensive review on valorization of agro-food industrial residues by solid-state fermentation. **Foods**, v. 10, n. 5, p. 927, 2021.

SILVA, G.A.B. *et al.* Produção e caracterização de protease obtida por *Gliocladium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 3, n. 1, 2009.

SHAH, S.; ASH, G. J.; WILSON, B. A.L. Resporulation of *Metarhizium anisopliae* granules on soil and mortality of *Tenebrio molitor*: Implications for wireworm management in sweetpotato. **Annals of Applied Biology**, v. 182, n. 1, p. 65-76, 2022.

SHAH, F.A.; WANG, C.S.; BUTT, T.M. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, n. 2, p. 259-266, 2005.

SHARMA, R; SHARMA, P. Fungal entomopathogens: a systematic review. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, p. 1-13, 2021.

SHENG, H; MCNAMARA, P. J.; LEGER, R. J. St. *Metarhizium*: an opportunistic middleman for multitrophic lifestyles. **Current Opinion in Microbiology**, v. 69, 2022.

SINGH, S. A.; *et al.* Exopolygalacturonate lyase from a thermophilic *Bacillus sp.* **Enzyme and microbial technology**, v. 25, n. 3-5, p. 420-425, 1999.

SKINNER, M. *et al.* Management of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) with granular formulations of entomopathogenic fungi. **Biological Control**, v. 63, n. 3, p. 246–252, 2012.

STEINER, M. *et al.* Effects of pesticides on soil bacterial, fungal and protist communities, soil functions and grape quality in vineyards. **Ecological Solutions and Evidence**, v. 5, n. 2, 2024.

ST. LEGER, R. J.; WANG, J. B. *Metarhizium*: jack of all trades, master of many. **Open Biology**, v. 10, n. 12, p. 200307, 2020.

STONE, L. BL; BIDOCHKA, M. J. The multifunctional lifestyles of *Metarhizium*: Evolution and applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 104, n. 23, p. 9935-9945, 2020.

USDA — United States Department of Agriculture. *FoodData Central: Rice, white, polished, raw* [recurso online].

VAN DRIESCHE, R; BELLOWS JR, T. S. **Biological control**. Springer Science & Business Media, 2012.

VERMELHO, A. B. *et al.* Microbial bioinputs in Brazilian agriculture. **Journal of Integrative Agriculture**, 2025.

VICENTE, I. V. **Produção de esporos de *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 em resíduos agroindustriais por cultivo em estado sólido**. Dissertação (Mestrado em Alimentos, Nutrição e Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (Ibilce), São José do Rio Preto, 2021.

YADAV, I. C. *et al.* Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: A comprehensive review of India. **Science of the Total Environment**, v. 511, p. 123-137, 2015.

WANG, B.T. *et al.* Studies of cellulose and starch utilization and the regulatory mechanisms of related enzymes in fungi. **Polymers**, v. 12, n. 3, p. 530, 2020.

WINSTON, P. W.; BATES, D. H. Saturated solutions for the control of humidity in biological research. **Ecology**, v. 41, n. 1, p. 232-237, 1960.

ZHANG, X. *et al.* Laboratory and greenhouse evaluation of a granular formulation of *Beauveria bassiana* for control of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. **Insects**, v. 10, n. 2, p. 58, 2019.