

PRODUÇÃO DE ESPOROS DO FUNGO *Metarhizium anisopliae* ICB425 POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO COM USO DE RESÍDUOS COMO SUBSTRATO.

Lucas Portilho da Cunha E-mail: lucasportilhodacunha@gmail.com

Renata Laurito Garcia E-mail: renatalgarcia@hotmail.com

Isabela Valente Vicente E-mail: isav_vicente@hotmail.com

João Cláudio Thoméo E-mail: thomeo1201@ibilce.unesp.br

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - IBILCE, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos

Resumo: Este trabalho tem como objetivo produzir esporos do fungo *Metarhizium anisopliae* utilizando a técnica de fermentação em estado sólido com quirera de arroz, farelo de arroz e bagaço de cana – de – açúcar. Para alcançar o objetivo deste trabalho realizou – se fermentações em estado sólido em embalagens de polipropileno 10x20 cm utilizando o fungo *Metarhizium anisopliae* ICB 425 cultivado no período de dez dias. Foram utilizados diversos substratos como: arroz tipo 1, quirera de arroz e uma mistura de farelo de arroz com bagaço de cana-de-açúcar em diferentes proporções. Em todos os testes houve esporulação do fungo, porém os melhores resultados encontrados, quando comparados as concentrações obtidas em arroz tipo 1 foi utilizando quirera de arroz, seguido de mistura de bagaço de cana - de – açúcar com farelo de arroz (5/5).

Palavras-chave: *Metarhizium*, substrato, esporos.

1. Introdução

Nos últimos anos, a permuta dos inseticidas químicos por bioinseticidas, tem se tornado cada vez mais realidade nas lavouras. Vários fatores têm motivado essa permuta, o principal deles é a resistência aos produtos químicos que os insetos têm adquirido ao longo do tempo (ALMEIDA E BATISTA FILHO, 2001; FRAZZON et al., 2000; LACEY et al. 2015).

Segundo Alves et. al (2008) fungos entomopatogênicos podem ser utilizados para controle de diversas pragas, como: gafanhotos, moscas brancas, moscas, lagartas e pulgões. No Brasil a utilização de bioinseticidas, já acontece há mais de cinquenta anos. No início, as aplicações do fungo *Metarhizium anisopliae* eram para controle da cigarrinha da folha da cana-de-açúcar, e até os dias atuais o controle desta praga é a principal motivação da aplicação do fungo *Metarhizium anisopliae*, a explicação para este fato é a proibição das queimadas. Tal proibição favorece o desenvolvimento e aumento de folhas nas plantações de cana-de-açúcar, conseqüentemente há maior manifestação da praga (LOUREIRO et al., 2012; OTTATI-DE-LIMA, 2007).

Existem diversos estudos que visam encontrar hospedeiros para o fungo *Metarhizium anisopliae*, com a pretensão de diminuir exponencialmente a quantia de inseticidas químicos na natureza, por exemplo, no combate ao carrapato *Boophilus microplus* que é encontrado em bovinos, carrapato *Ixodes ricinus* encontrado em cães (DÍAZ et al., 2007; FRAZZON et al., 2000; WASSERMANN et. al 2016), controle de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) hospedeiro de aves e (ALVES et al. 2004; ARRUDA, 2005; POLAR et al. 2005); contra moscas (VAZQUEZ et al. 2015).

Segundo Schmidt et. al (2007), é necessária uma concentração de 2×10^{13} /ha para obter 88,4% de letalidade das pragas, ou seja, é necessário uma aplicação inundativa, o que requer significativa quantidade de esporos, para aplicação efetiva contra as pragas em lavouras.

A produção industrial de esporos do fungo é artesanal e desprovida de tecnologia, resultando em um processo suscetível a contaminações e perda de material. Na maioria das indústrias, a produção é realizada com embalagens plásticas, o substrato utilizado é o arroz tipo 1, atualmente este é o processo utilizado na produção da indústria Oligos Biotecnologia, de São José do Rio Preto/SP (CUNHA et al. 2019).

A técnica utilizada pela maioria das biofábricas para cultivo do fungo *Metarhizium anisopliae*, é a fermentação em estado sólido (FES), que consiste no crescimento de microrganismos, sobre e entre uma matriz porosa umidificada, lembrando que essa umidificação não pode exceder os limites de retenção de água do substrato e também não pode exceder os limites ótimos de cultivo do fungo (DEL BIANCHI et al., 2001; GERVAIS; MOLIN, 2003).

A FES tal como todas as técnicas, possui suas vantagens e desvantagens, dentre as vantagens, podemos destacar menor quantidade de água utilizada durante o período de cultivo, gastos mínimos com energia e riscos de contaminações menores, quando comparado à técnica de fermentação líquida, como desvantagens podemos citar as dificuldades de monitoramento, dificuldades no controle de diversas variáveis, como: geração de calor metabólico, dificuldade na mistura do meio de cultivo e períodos mais longos de fermentação (COSTA, 2012; FARINAS et. al, 2011; RODRIGUES-ZÚNIGA et al. 2011).

Para utilizar a técnica de fermentação em estado sólido, a escolha do substrato é de suma importância, pois a mesma fornece todos grande ou parte dos nutrientes necessários para o desenvolvimento dos fungos. A porosidade que esse material possui é muito importante, pois materiais com granulometria pequena podem favorecer a compactação do meio de cultivo, dificultando a aeração durante o período de cultivo do fungo, que é variável, de acordo com o fungo utilizado (PANDEY, 2003).

Na fermentação em estado sólido, geralmente utiliza – se resíduos agroindustriais, como: bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de laranja, quirera de arroz, farelo de arroz, farelo de trigo, dentre outros (SANTOS, 2007). Atualmente, o substrato utilizado para produção do fungo *Metarhizium anisopliae* é o arroz tipo 1, elevando os custos o processo, ressaltando que o arroz não é um resíduo, ou um cereal de baixo custo, o que diferencia de várias fermentações que fazem uso de resíduos ou de materiais de baixo custo para cultivo de fungos filamentosos como o fungo *Metarhizium anisopliae* (CUNHA et al. 2019).

Com o objetivo de reduzir os custos de produção do fungo *Metarhizium anisopliae*, e também encontrar um substituto para o arroz tipo 1, esse trabalho objetiva produzir esporos do fungo *Metarhizium anisopliae*, em quirera de arroz, farelo de arroz e bagaço de cana-de-açúcar com farelo de arroz.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

Foi utilizada a linhagem do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* ICB 425, fornecida pelo Instituto Biológico de São Paulo. No início dos experimentos, realizou-se a estocagem do fungo, em tubos de ensaios com meio de batata-dextrose-ágar (BDA) (Acumedia, EUA). Com o fungo já desenvolvido, adicionou - se óleo mineral, para que se formasse uma camada protetora da colônia. Os tubos de ensaio foram mantidos em câmaras frias, com temperaturas controladas à 4°C, e utilizados nas repicagens para

todos os ensaios realizados no presente trabalho.

Para a inoculação do substrato, utilizou - se repicagem em frascos de Erlenmeyer inclinados, contendo 50 mL de meio de cultivo BDA, com auxílio de alça de platina. Os frascos foram armazenados em câmara DBO (TE – 371, Tecnal, Brasil) a 28 °C por 15 dias.

O inoculo foi preparado adicionando-se solução Tween 80 a 0,1 % (Synth, Brasil) a superfície da colônia contida nos frascos de Erlenmeyer, raspando a superfície com alça de platina, para facilitar o desprendimento dos esporos. Foi fixada a concentração de 10^7 esporos/g seca de substrato em todos os ensaios, a contagem de esporos ocorreu em Câmara de Neubauer, com ajuda de microscopia óptica com lentes de 40x de aumento.

2.2 Cultivo em embalagens de polipropileno.

Os ensaios de cultivo do fungo foram realizados em embalagens plásticas contendo 10g de substrato. Utilizou - se embalagens plásticas com dimensões de 10x20 cm e os substratos utilizados são descritos na Tabela 2.1. Em todas as embalagens foram acoplados bocais de PVC, nos quais foram acoplados tampões de algodão envoltos por gaze, para garantir as trocas de gases e assegurar que não haja contaminação. Para facilitar a aeração e garantir que não ocorra a aglomeração do substrato, adicionou - se no interior das embalagens arames em forma espiral.

Tabela 2. 1 - Composição dos substratos

Teste	Substrato	Proporção (g)
1	Arroz tipo 1*	10
2	Quirera de arroz*	10
3	Farelo de arroz*	10
4	Bagaço de cana-de-açúcar e arroz tipo 1	1:9
5	Bagaço de cana-de-açúcar e arroz tipo 1	2:8
6	Bagaço de cana-de-açúcar e arroz tipo 1	3:7
7	Bagaço de cana-de-açúcar e arroz tipo 1	4:6
8	Bagaço de cana-de-açúcar e arroz tipo 1	5:5
9	Bagaço de cana-de-açúcar e quirera de arroz	1:9
10	Bagaço de cana-de-açúcar e quirera de arroz	2:8
11	Bagaço de cana-de-açúcar e quirera de arroz	3:7
12	Bagaço de cana-de-açúcar e quirera de arroz	4:6
13	Bagaço de cana-de-açúcar e quirera de arroz	5:5
14	Bagaço de cana-de-açúcar e farelo de arroz	9:1
15	Bagaço de cana-de-açúcar e farelo de arroz	8:2
16	Bagaço de cana-de-açúcar e farelo de arroz	7:3
17	Bagaço de cana-de-açúcar e farelo de arroz	6:4
18	Bagaço de cana-de-açúcar e farelo de arroz	5:5

*amostra controle

2.3 Condição de cultivo

O fungo foi cultivado a 28°C (DORTA e ARCAS, 1998; POLAR et. al, 2005), por um período de 10 dias, ou seja, 240 horas no total. A umidade do substrato foi de 48% em base úmida, com adição de água destilada, antes do processo de esterilização em autoclave a 121°C durante 30 minutos (Lopes, 2016). Para todos os testes utilizou-se BOD (TE – 371, Tecnal, Brasil) na ausência de luz.

2.4 Extração de esporos

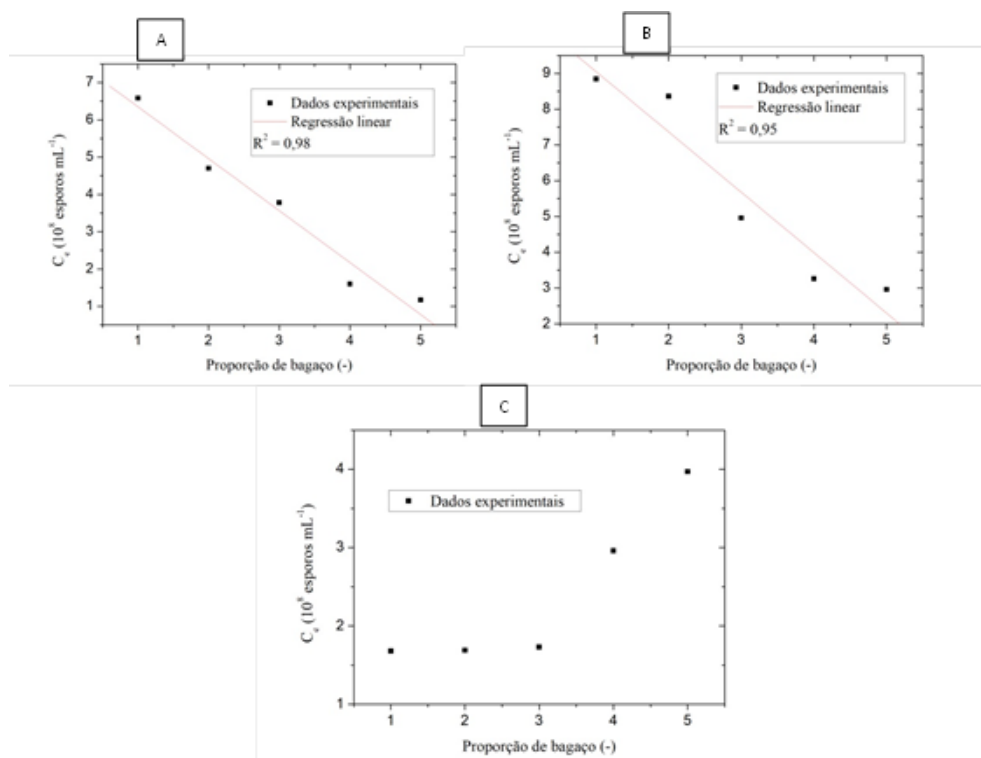
Para a extração dos esporos, foi utilizada solução Tween 80 a 0,1%, para cada 1 g de substrato seco 5 mL da solução. Após a adição da solução Tween nas embalagens, as mesmas foram dispostas em um banho metabólico com agitação recíprocante (Marconi, Dubnoff, BRA) e permaneceram em agitação de 120 b.p.m durante 50 minutos. Ao término do período de agitação, realizou-se a contagem de esporos em câmara de Neubauer.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 3.1 são dispostos os resultados de C_e (concentração de esporos) ao fim do cultivo do fungo em arroz tipo 1, quirera e farelo e em mistura destes substratos com bagaço de cana-de-açúcar. Nestes testes foi fixada a quantidade de 10 g de substrato variando a proporção entre os substratos utilizados como descreve a Tabela 3.1 e também como pode ser visto nas Figuras 3.1a e 3.1b, as quais apresentam as curvas de regressão linear da (C_e) nas diferentes proporções de bagaço com altos coeficientes de regressão (R^2), ou seja, a estrutura afeta pouco a esporulação do fungo, porém a quantidade de arroz e quirera no meio afeta diretamente a quantidade de esporos produzido. Nos testes com farelo de arroz é possível observar que com o aumento da concentração de bagaço na mistura, conseqüentemente há aumento na C_e .

Na Tabela 3.1 também é possível observar que quando foram utilizadas misturas de farelo de arroz e bagaço houve aumento da C_e com o aumento da concentração de bagaço, como mostra a Figura 3.1c. Essa elevação provavelmente ocorreu em virtude do aumento da porosidade do leito, pois quando foi realizado o cultivo apenas com farelo, houve a formação de grandes aglomerados, diminuindo a área disponível para o crescimento do fungo. Assim, quando o bagaço foi adicionado junto ao farelo, a estrutura do leito foi melhorada e ocorreu menor ou quase nenhuma aglomeração do meio de cultivo, aumentando a área superficial e melhorando a aeração do sistema.

Figura 3.1 - Curvas de regressão linear da concentração de esporos (C_e) nas diferentes proporções de bagaço. a) bagaço com arroz; b) bagaço com quirera; c) bagaço com farelo.



Com os dados da Tabela 3.1 foi possível observar os testes de cultivo com quirera de arroz, onde o fungo se desenvolveu bem, porém foi nítida a formação de diversos aglomerados, resultando em crescimento e esporulação heterogêneos. Deste modo, quando foi adicionada pequena quantidade de bagaço à quirera, a C_e aumentou, como demonstra os dados disponíveis na Tabela 3.1. Visivelmente os testes em que houve a adição de pouco bagaço junto à quirera não se observou aglomerados de quirera de arroz durante todo o período de cultivo, favorecendo a esporulação e assim reduzindo os custos de produção de esporos do fungo *M. anisopliae* ICB 425.

Comparando-se a C_e produzidos com arroz e quirera sem bagaço, é possível observar uma redução de 5% quando a quirera foi utilizada, embora não haja diferença estatística entre as médias pelo teste de Tukey a 95% de intervalo de confiança. No entanto, quando foram utilizadas misturas de quirera e bagaço com baixas proporções de bagaço (testes 9 e 10 na Tabela 3.1), as concentrações de esporos obtidas são praticamente iguais às de arroz, explicitando que a melhora nas características estruturais do meio favorece a exposição de maiores áreas de quirera ao ataque fúngico. Em proporções maiores de bagaço/quirera, as concentrações de esporos diminuíram, devido à diminuição da quantidade de substrato com o aumento de material inerte. Os desvios padrão que são dispostos na Tabela 5.2 indicam confiança na repetibilidade dos testes realizados.

No arroz, o desenvolvimento do fungo já é bem conhecido e descrito por Agale; Gopalakrishnan; Ambhure, (2018); Méndez-González et al., (2018); Freitas et al., (2014); Ottati-de-lima et al., (2010); Soundarapandian; Chandra, (2007). Santos, (2017), demonstra em seu trabalho que o uso de material inerte como bagaço de cana – de – açúcar e esponja vegetal junto ao arroz tipo 1, favorece a esporulação do fungo, no qual se obteve resultados com concentração de 10^9 esporos/gss de arroz. Arzumanov;

Jenkins; Roussos, (2005), realizaram o cultivo do fungo *M. anisopliae* em dois substratos: arroz e mistura de 50% (p / p) de arroz moído / bagaço de cana-de-açúcar, onde foi obtido Ce em 10^9 esporos/gss de arroz. Van breukelen et al., (2011), demonstram em seu trabalho que a utilização de cânhamo (Hemparade, HempFlax bv, Holanda) como material inerte impregnado com nutrientes, contendo glicose, extrato de levedura e peptona bacteriológica em proporções maciças de 8: 1: 1, o que favoreceu a esporulação do fungo quando comparado aos outros substratos que foram utilizados para cultivo do fungo como: grão de trigo, farelo de trigo e farelo de arroz. Com os dados da Tabela 3.1 também foi possível observar que pequenas proporções de bagaço de cana-de-açúcar não demonstraram diminuição drástica na produção de esporos, ou seja, para um aumento de escala expressivo, a utilização da proporção 9:1 seria interessante.

Tabela 3.1 - Resultados das concentrações de esporos ao fim do cultivo do fungo *M. anisopliae* ICB 425 em embalagens plásticas com diversos tipos de substrato.

Teste	Proporção (g)	Substrato	Ce (10^8 esporos/mL)	DP
1	10	Arroz tipo 1	8,03 _A	0,07
2	10	Quirera de arroz	7,61 _{AB}	0,14
3	10	Farelo de arroz	3,71 _{DE}	0,15
4	1:9	Bagaço e arroz	6,58 _B	0,02
5	2:8	Bagaço e arroz	4,70 _{CD}	0,14
6	3:7	Bagaço e arroz	3,78 _{CDE}	0,59
7	4:6	Bagaço e arroz	1,60 _G	0,22
8	5:5	Bagaço e arroz	1,17 _G	0,38
9	1:9	Bagaço e quirera de arroz	8,84 _A	0,50
10	2:8	Bagaço e quirera de arroz	8,36 _A	0,28
11	3:7	Bagaço e quirera de arroz	4,96 _C	0,22
12	4:6	Bagaço e quirera de arroz	3,26 _E	0,08
13	5:5	Bagaço e quirera de arroz	2,96 _{EF}	0,22
14	9:1	Bagaço e farelo de arroz	1,68 _G	0,56
15	8:2	Bagaço e farelo de arroz	1,69 _G	0,21
16	7:3	Bagaço e farelo de arroz	1,73 _{FG}	0,41
17	6:4	Bagaço e farelo de arroz	2,96 _{EF}	0,33
18	5:5	Bagaço e farelo de arroz	3,97 _C	0,09

(*) Letras diferentes nas linhas indicam que há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância

Existem diversas pesquisas que buscam encontrar um substituto para o arroz tipo 1, porém ainda não foi encontrado algum substrato que seja completo como o arroz tipo 1 que é considerado ideal para cultivo do fungo, pois possui grande área superficial quando comparado a alguns substratos e sua estrutura física pouco se altera ao longo do cultivo (DORTA; ARCAS, 1998). Kruger et al., (2014) e Barra-Bucarei et al. (2016) cultivaram o fungo em arroz parboilizado e obtiveram maiores concentrações de esporos quando comparado às concentrações obtidas em arroz tipo 1; porém, como o valor de arroz parboilizado é maior, é necessária uma avaliação econômica criteriosa para estabelecer a viabilidade de utilizar parboilizado ao invés do tipo 1.

Ibrahim et al., (2015) realizaram o cultivo em arroz parboilizado, trigo e burgul, um tipo de trigo integral que passou por cozimento, secagem e trituração. Os autores obtiveram as maiores concentrações utilizando burgul, seguido do arroz parboilizado, porém em virtude das etapas de preparação necessárias à obtenção de burgul, o uso de arroz parboilizado deve ser competitivo.

4. CONCLUSÃO

Com este trabalho foi possível concluir que dentre os testes realizados em embalagens plásticas com diferentes substratos e proporções, os melhores resultados foram com arroz e quirera. Também se concluiu que o uso de bagaço em pequenas proporções junto ao arroz e quirera pode favorecer a esporulação do fungo evitando compactação e formação de aglomerados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGALE, S. V; GOPALAKRISHNAN, S.; AMBHURE, K. G. Mass Production of Entomopathogenic Fungi (*Metarhizium anisopliae*) using Different Grains as a Substrate. v. 7, n. 01, p. 2227–2232, 2018.

ALMEIDA, J.E.M; FILHO, A.B. Banco de Microrganismos entomopatogênicos pesquisa. Biotecnologia ciência & desenvolvimento. Nº 20, 2001.

ALVES, L. F.A. ALVES, V. S. BRESSAN, D. F. NEVES, P. M.O.J. ALVES, S. B. “Ocorrência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em Adultos de Cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) em Aviários Comerciais em Cascavel, PR”. *Neotropical Entomology* 33(6):793-795. 2004.

ALVES, S.B.; LOPES, R.B. Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios. Piracicaba: FEALQ,. p.414 2008.

ARRUDA, W. “Caracterização molecular e morfofisiológica de diferentes isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e análise morfológica do processo de infecção em *Boophilus microplus*. 2005. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

ARZUMANOV, T.; JENKINS, N.; ROUSSOS, S. Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 3–4, p. 1037–1042, 2005.

BARRA-BUCAREI, L.; VERGARA, P.; CORTES, A. Conditions to optimize mass production of *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin 1883 in different substrates.

Chilean journal of agricultural research, v. 76, n. 4, p. 448–454, 2016.

BREUKELLEN, V. F; HAEMERS, S; WIJFFELS, R.H; RINZEMA, A. ” Bioreactor and substrate selection for solid-state cultivation of the malaria mosquito control agent *Metarhizium anisopliae*”. *Process Biochemistry*. Pag. 751–757. 201.

COSTA, P, N. “OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE TANASE POR *Aspergillus* sp. Em fermentação em estado sólido (FES) 2012. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade federal de lavras, 2012.

CUNHA, L. P. CASCIATORI, F.P; LOPES, I.Ç; THOMÉO, J.C. Production of conidia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* ICB 425 in a tray bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2019.

DEL BIANCHI, V. L; MORAES, I. O; CAPALBO, D. M.F. “Fermentação em estado sólido”. SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial. Engenharia Bioquímica*. São Paulo. Ed. Edgard Blücher. Cap 13. Vol.2, 2001.

DIAZ, M. A. A; GARCIA, L; VELASCO, E. G; GUTIERREZ, R. L; SAHAGÚN, C. A. A; VIVAS, R. J. R; SÁNCHEZ, H. F. “ Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics”. *Veterinary Parasitology*. 2007

DORTAS, B; ARCAS, J. “Sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-state fermentation with forced aeration”. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 23, Pag. 501–505.1998.

FARINAS, C. S.”Developments in solid-state fermentation for the production of biomassdegrading enzymes for the bioenergy sector”. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Ver. Vol. 52, Pag 179–188, 2015.

FRAZZON, A. P. G; VAZ JUNIOR, I. S; MASUDA, A; SCHRANK, A; VAINSTEIN, M. H. “In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*”. *Veterinary Parasitology*, vol. 94, pag 117–125, 2000.

FREITAS, A. F. et al. Rendimento de conídios e germinação de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch .) Sorok . (Ascomycota : Clavicipitaceae) cultivados em arroz. p. 75–78, 2014.

GERVAIS, P; MOLIN, P. “The role of water in solid-state fermentation”.*Biochemical Engineering Journal*, Vol. 13, Pag. 85–101, 2003.

KRUGER, R. D. et al. Solid Substrate Production and Formulation of an Isolate of *Metarhizium anisopliae* for Biological Control of Stem Bug *Tibraca limbativentris*. *World Applied Sciences Journal*, v. 32, n. 7, p. 1242–1251, 2014.

LACEY, L. A; GRZYWACZ, D; SHAPIRO-LLAN, D. I; FRUTOS, R; BROWNBRIDGE, M; GOETTEL, M.S; “Insect pathogens as biological control agents: Back to the future”. *Journal of invertebrate pathology*, vol. 132, pag. 1–41, 2015.

LOPES, I. C. “Produção de conídios do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em diferentes condições de cultivo e em biorreator de bandeja”. *Qualificação (Mestrado em Microbiologia) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto*, 2015.

LOUREIRO, E.S; FILHO, A.B; ALMEIDA, J.E.M; MENDES, J.M; PESSOA, L.G.A.

“Eficiência de isolados de *metarhizium anisopliae* (metsch.) Sorok. No controle da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar, *mahanarva fimbriolata* (stal, 1854) (hemiptera: cercopidae), em condições de campo”. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.79, n.1, p.47-53, 2012.

MÉNDEZ-GONZÁLEZ, F. et al. Chapter 7 – Bioreactors for the Production of Biological Control Agents Produced by Solid-State Fermentation. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, p. 109–121, 2018.

OTTATI-DE-LIMA, E.L. “Produção de *metarhizium anisopliae* (metsch.) sorok. e *beauveria bassiana* (bals.) vuill. em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre estruturas infectivas desses entomopatógenos. Tese (Doutorado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP – Câmpus de Botucatu, 2007.

PANDEY, A. “Solid state fermentation. Biochemical”. Engineering Journal, v.13, n.2/3, p.81-84. 2003.

POLAR, P; MURO, M.A; KAIRO, M.T.K; MOORE, D; PEGRAM, R; JOHN, S-A; ROACH-BENN, C. “Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks”. Veterinary parasitology, Vol. 134, Pag. 159–167, 2005.

RODRIGUES-ZÚÑIGA, U. F; FARINAS, C. S; NETO, V. B; COURI, S; CRESTANA, S. “Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido”. Pesq. Agropec. Bras. V.46, P.912-919. 2011.

SANTOS, V. et al. Identification of double-stranded RNA viruses in Brazilian strains of *Metarhizium anisopliae* and their effects on fungal biology and virulence. Plant Gene, v. 11, p. 49–58, 2017.

SANTOS, S.F.M. Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Tecnologia. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. 2007.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia Industrial. Engenharia Bioquímica. São Paulo. Ed. Edgard Blücher v.2, 2001.

SOUNDARAPANDIAN, P.; CHANDRA, R. Mass Production of Endomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota; Hyphomycetes) in the Laboratory Research Journal of Microbiology, 2007.

VAZQUEZ, C. C; MÁRQUEZ, J. C; GUTIÉRREZ, R. L; MENDOZA, I. V; PARRA, M. R. “Efficacy of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* in the control of infestation by stable flies *Stomoxys calcitrans* (L.), under natural infestation conditions”. Veterinary Parasitology Vol. 212, 350–355. 2015.

WASSERMANN, M; SELZER, P; STEIDLE, J. L. M; MACKENSTEDT, U. “Biological control of *Ixodes ricinus* larvae and nymphs with *Metarhizium anisopliae* blastospores. Ticks and Tick-borne Diseases vol.7 p.768–771. 2016.