



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José do Rio Preto

Isabella de Cenço Lopes

Produção de conídios do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em diferentes condições de cultivo e em biorreator de bandeja

São José do Rio Preto  
2016

Isabella de Cenço Lopes

Produção de conídios do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em diferentes condições de cultivo e em biorreator de bandeja

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. João Cláudio Thoméo

São José do Rio Preto  
2016

Lopes, Isabella de Cenço  
Produção de conídios do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em diferentes condições de cultivo e em biorreator de bandeja / Isabella de Cenço Lopes. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2016. 58 f.: il.

Orientador: João Cláudio Thoméo  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Fungos – Culturas e meios de cultura. 3. *Metarhizium anisopliae*. 4. Fermentação em Estado Sólido. 5. Arroz - Microbiologia. I. Thoméo, Prof. Dr. João Cláudio. II. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 576.8

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
UNESP – Campus de São José do Rio Preto

Isabella de Cenço Lopes

Produção de conídios do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em diferentes condições de cultivo e em biorreator de bandeja

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. João Cláudio Thoméo  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientador

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marcia Maria de Souza Moretti  
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto  
UNESP – Assis

São José do Rio Preto  
31 de maio de 2016

*A Deus, primeiramente;  
Ao meu amado esposo, Ricardo, por estar sempre ao meu lado;  
Aos meus pais, Jesus e Elisabete, pelo apoio;  
Aos meus amigos incentivadores;  
Dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por seu amparo e proteção através de Sua presença constante em minha vida, sempre iluminando meus passos.

Ao Prof. Dr. João Cláudio Thoméo, orientador desta dissertação, pelo excelente professor que é, sendo de grande importância em minha formação profissional.

A minha co-orientadora Fernanda Perpétua Casciotori pelo seu apoio e dedicação em cada passo do meu aprendizado e crescimento para alcançar meu título de Mestre.

Ao meu esposo Ricardo, pela compreensão, incentivo, força e paciência em todas as etapas desta formação.

Aos meus pais Jesus e Elisabete, por me motivarem a continuar minha trajetória acadêmica.

À casa espírita 24 de Junho que sempre me acolheu e me fortaleceu durante todo o percurso desta jornada de aprendizado e crescimento.

À administração municipal da Prefeitura de Nova Granada que me permitiram a realização desta especialização.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, por proporcionarem oportunidade ao desenvolvimento e conclusão desta pesquisa.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi de aumentar a produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* através de alterações do substrato e das condições de cultivo e produzi-lo em biorreator de bandeja. Os substratos testados foram arroz tipo 1, quirera de arroz e farelo de arroz, sendo o cultivo realizado em embalagens plásticas contendo 10 g de substrato seco. Inicialmente, foi empregado arroz tipo 1 como substrato, variando-se as formas de umidificação no seu preparo, sendo o cultivo realizado em embalagens plásticas contendo 10g de substrato seco. Determinada a condição adequada de umidificação, os substratos arroz tipo 1 e quirera de arroz foram submetidos a diferentes condições de fotoperíodo: escuro contínuo, claro contínuo e escuro e claro alternados. O farelo de arroz foi adicionado a bagaço de cana-de-açúcar de modo a estruturar fisicamente o meio de cultivo. Os melhores resultados foram obtidos com arroz e quirera de arroz. A primeira alternativa de ampliação de escala foi realizada em embalagens plásticas, utilizando arroz tipo 1 e quirera com 500g de substrato seco. A etapa seguinte da ampliação de escala foi em um biorreator de bandeja com aeração realizada sobre a camada de substrato, sendo os testes realizados com arroz tipo 1, e duas espessuras de camada partículas, 2 e 4 cm. Em todos os ensaios, a resposta observada foi a concentração final de conídios. Foi testada ainda a virulência dos conídios produzidos em relação a lagartas de *Diatraea flavipennella* nas diferentes condições de produção. De acordo com os resultados apresentados, o farelo de arroz não é uma boa opção de substrato devido a sua pouca praticidade de manipulação e a quirera apresentou resultados satisfatórios nos ensaios, podendo ser considerada uma opção viável para utilização industrial devido ao seu baixo custo. O biorreator de bandeja elaborado apresentou bons resultados de produção de conídios em relação a produção em embalagem plástica de maior capacidade com o substrato arroz tipo 1, a qual, no entanto, apresentou produção de esporos inferior à da embalagem de menor capacidade. Os testes de virulência comprovaram a eficiência dos conídios em todos os ensaios com pequenas variações no tempo de mortalidade.

**Palavras-chaves:** 1. Microbiologia. 2. Fungos – Culturas e meios de cultura. 3. *Metarhizium anisopliae*. 4. Fermentação em Estado Sólido. 5. Arroz - Microbiologia.

## ABSTRACT

The work targeted the increase of the production of spores of *Metarhizium anisopliae* through modifications of the substrate and of the cultivation conditions, and produce such spores in a tray bioreactor. Type 1 rice, broken rice and rice bran were tested as substrate, which were cultivated in plastic bags containing 10 g of dry substrate. Alternatives of humidification were tested with type 1 rice. For the best alternative of humidification, type 1 rice and broken rice were submitted to alternatives of different exposures to light, provided by a fluorescent lamp: continuous dark, continuous light, alternation between dark and light. To the bran was added sugar cane bagasse in order to provide physical structure to the culture medium. The best results were obtained with rice and broken rice and the illumination regime does not influence on the spore production. The first attempt of scaling-up the spore production was the use of plastic bags containing 500 g of dry substrate, either rice or broken rice. The next scaling-up step was in a tray bioreactor aerated flowing air parallel to the top of the cultivation medium, using type 1 rice as substrate in two different thickness of medium, 2 and 4 cm. In every experiments, the response variable was the conidia concentration. The virulence against *Diatraea flavipennella* caterpillars was also tested for spores produced in the different experimental conditions. The results showed that rice bran is not an efficient alternative due to its difficult manipulation, while broken rice produce conidia concentration similar to type 1 rice and can be considered a cheap alternative for industrial production of spores. The tray bioreactor presented similar results to the large capacity plastic bags, which presented lower conidia concentrations than the small capacity container. The virulence experiments showed high efficiency of the conidia in all tested samples, with little variation in the time of lethality.

**Keywords:** 1. Microbiology. 2. Fungi - Cultures and culture media. 3. *Metarhizium anisopliae*. 4. Fermentation in solid state. 5. Rice - Microbiology.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>   | 09 |
| <b>OBJETIVOS</b>   | 11 |
| <b>2. REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA</b>  | 12 |
| 2.1 Produção de bioinseticida no Brasil  | 12 |
| 2.2 Cenário da cana e suas pragas  | 13 |
| 2.3 Classificação e descrição do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i>                       | 15 |
| 2.4 Fatores que afetam o desenvolvimento de <i>Metarhizium anisopliae</i>                  | 17 |
| 2.5 Produção Industrial de <i>Metarhizium anisopliae</i>                                   | 19 |
| 2.6 Fermentação em estado sólido   | 22 |
| 2.7 Biorreatores da FES  | 23 |
| 2.8 Ampliação de Escala de Biorreatores de FES   | 24 |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>  | 26 |
| 3.1 Microrganismo  | 26 |
| 3.2 Testes Microbiológicos em embalagens plásticas   | 26 |
| 3.2.1 Produção de <i>M. anisopliae</i> em diferentes umidades no arroz tipo 1              | 27 |
| 3.2.2 Efeito do tempo de cultivo e fotoperíodo sobre a produção de esporos em arroz tipo 1 | 28 |
| 3.2.3 Influência da granulometria do substrato   | 29 |
| 3.3 Ensaio de ampliação de escala em embalagens de polipropileno                           | 30 |
| 3.4 Teste de virulência  | 31 |
| 3.5 Ensaio de ampliação de escala em biorreator de bandeja                                 | 32 |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>   | 35 |
| 4.1 Produção de <i>M. anisopliae</i> em diferentes umidades                                | 35 |
| 4.2 Influência do tempo de cultivo sobre a produção de conídios                            | 36 |
| 4.3 Efeito do fotoperíodo e da granulometria do substrato                                  | 37 |
| 4.4 Ampliação de escala em embalagens de polipropileno de maior dimensão                   | 40 |
| 4.5 Teste de virulência  | 42 |
| 4.6 Ensaio em Biorreator de Bandeja  | 46 |
| <b>5. CONCLUSÕES</b>   | 48 |
| <b>6. BIBLIOGRAFIAS CITADAS</b>  | 49 |

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo o Instituto Biológico (2015), o controle microbiano representa um ramo do controle biológico que trata da utilização racional de bactérias, fungos, vírus e nematoides para o controle de insetos pragas. Apesar do uso desses organismos representar apenas 1% do mercado total de produtos para proteção de plantas, nos últimos anos um número significativo de pesquisas promoveu o aumento da quantidade de produtos disponíveis e ampliou as perspectivas para o mercado.

A tecnologia desenvolvida no Brasil permitiu que grandes culturas, como a de cana-de-açúcar e de soja, concentrassem os maiores programas mundiais utilizando patógenos de insetos. Esses programas são responsáveis pelo tratamento biológico de aproximadamente 2,5 milhões de hectares de cana e soja por ano, segundo o Instituto Biológico (2015).

O interesse comercial no desenvolvimento de produtos para controle microbiano de insetos teve início em torno de 1950, quando se constatou a possibilidade de manipular microrganismos para causar doenças em insetos pragas sem provocar danos às espécies benéficas.

Os bioinseticidas são vistos hoje como um componente efetivo e de valor nos sistemas de manejo integrado. No Brasil, a produção comercial de bioinseticidas vem crescendo anualmente gerando emprego, renda e impulsionando um segmento estratégico para agregação de valor aos produtos do agronegócio.

No atual cenário do agronegócio brasileiro, o crescimento da agricultura orgânica, aliado às exigências de alimentos isentos de agrotóxicos por parte do mercado consumidor, vêm propulsionando o avanço e desenvolvimento de produtos biológicos para controle de pragas agrícolas.

Entre os agentes de biocontrole mais utilizados no mundo, os fungos entomopatogênicos exercem um importante papel em programas de manejo integrado de pragas. Esses fungos são encontrados naturalmente infectando e causando doenças em níveis epizooticos (grande número de insetos infectados) em populações de artrópodes. O controle biológico vem atraindo mais adeptos por ser uma opção não poluente, favorável ao equilíbrio biológico, ser duradouro e por aproveitar o potencial biótico do agroecossistema, não ser tóxico para os homens e animais, exceto ao seu patógeno, poder ser aplicado com máquinas convencionais com pequenas adaptações e, principalmente, ter boa relação custo/benefício.

*Metarhizium anisopliae* é o fungo mais estudado e produzido em escala comercial no Brasil e seu uso já atingiu mais de um milhão de hectares tratados, segundo o Instituto

Biológico (2015). Entre as principais vantagens da utilização do *Metarhizium anisopliae* no controle biológico de insetos pragas, está a facilidade de produção das suas unidades infectivas em escala comercial, facilidade de aplicação em condições de campo, o baixo custo decorrido de sua utilização e, principalmente, o reduzido impacto ambiental.

Uma das aplicações mais difundidas deste fungo é no controle da cigarrinha (*Mahanarva posticata*) da cana-de-açúcar. Vários trabalhos continuam sendo conduzidos em condições de laboratório e campo com este fungo, principalmente em virtude da sua ampla variabilidade genética, grande variedade de hospedeiros e facilidade de produção usando substratos artificiais. Para que a produção deste microrganismo seja ampliada em escala comercial, torna-se importante desenvolver métodos eficientes de produção.

No Brasil, este fungo é produzido basicamente por um processo conhecido como fermentação em estado sólido. Neste caso, objetiva-se produzir os propágulos infectivos do fungo, denominado conídios, mediante o uso de substratos sólidos à base de cereais, em geral arroz tipo 1, os quais fornecem condições nutricionais e físicas necessárias ao crescimento do microrganismo, sem a necessidade de aditivos. O conhecimento desse processo de produção do fungo *M. anisopliae* se torna útil e importante para aqueles envolvidos na área de controle biológico via microrganismo.

No entanto, as técnicas de produção industrial ainda são artesanais e sujeitas a altos índices de contaminação e baixa eficiência. Deste modo a produção deste fungo em biorreatores torna-se necessária para que a escala de produção seja ampliada e os custos de produção sejam diminuídos, ampliando a possibilidade de aplicação desta técnica.

Neste contexto, o presente trabalho analisou a produção de conídios do fungo *Metarhizium anisopliae* em diferentes condições de cultivo na tentativa de se obter uma metodologia mais viável para a produção do mesmo em escala ampliada e em biorreator de bandeja desenvolvido para estas análises.

## OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho foi aumentar a produção de conídios do fungo *Metarhizium anisopliae* através de alterações de técnica de cultivo e do substrato, e aumentar a escala de produção em um biorreator de bandeja.

Os objetivos específicos foram:

- a) Avaliar o potencial de diferentes substratos em diferentes granulometrias para incrementar a produção de conídios;
- b) Avaliar a influência da umidade do substrato e da incidência de luz sobre a produção dos conídios;
- c) Aumentar a escala de produção em embalagens plásticas de grande capacidade, como atualmente realizado em biofábricas;
- d) Avaliar a virulência do fungo através de testes em broca de cana-de-açúcar (*Diatrea sacchralis*) com os conídios produzidos em diferentes condições físicas e nutricionais;
- e) Cultivar o fungo em biorreatores de bandeja e avaliar sua operacionalidade para a produção em larga escala.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Produção de bioinseticida no Brasil

De acordo com Mattsson (2008) e Reffstrup et al. (2010), a população humana, constantemente exposta a vários defensivos químicos por uma exposição ambiental direta ou indireta como pela ingestão de alimentos contaminados, tem aumentado os riscos de doenças como o câncer.

Uma das possibilidades existentes para a redução dos agroquímicos, segundo Gallo et al. (2002), seria a substituição gradativa pelo controle biológico de pragas, que pode ser entendido como a regulação da população de insetos pelo uso de inimigos naturais, através do Manejo Integrado de Pragas (MIP), de acordo com Oliveira et al. (2006).

Os fungos foram os primeiros patógenos de insetos utilizados neste controle biológico via microrganismos, segundo Alves (1998) e destes, mais de 150 produtos para o controle biológico de insetos pragas feitos a partir de fungos entomopatogênicos já foram comercializados, segundo relatos de Faria e Wraight (2007).

O método para utilização desses produtos, de acordo com Lazzarini (2005), inclui a necessidade de mudanças nas estratégias de manejo de pragas, visto que no controle biológico o efeito é mais lento do que no químico, onde o último é usado no combate imediato em situações, onde a população da praga está alastrada pela cultura, sendo necessária uma resposta rápida; já no controle biológico, procura-se manter os insetos-praga em baixo número, exigindo monitoramento e ações antecipadas, possibilitando o controle efetivo, mas sem efeitos nocivos.

No caso do controle químico, que continua sendo o mais empregado, quando utilizado em conjunto com o controle biológico, leva-se em consideração o conhecimento da seletividade dos produtos aos inimigos naturais, além de conhecer a bioecologia das pragas e dos inimigos naturais, para que se faça a aplicação dos produtos em épocas mais favoráveis ao controle das pragas, de acordo com Nava et al. (2009).

Segundo levantamento de Pinto et al. (2006), existem programas de controle biológico de pragas agrícolas no Brasil bem sucedidos como é o caso da broca-da-cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*) por intermédio da criação em larga escala em laboratório e liberação no campo da vespinha *Cotesia flavipes*, sendo responsável por cerca de 70 a 80% do parasitismo das lagartas e das cigarrinhas *Mahanarva fimbriolata* e *Mahanarva posticata* pela aplicação do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*.

No Brasil, *M. anisopliae* já foi utilizado no controle biológico de percevejos das pastagens, gênero Deois (PEREIRA et al., 2008), da cigarrinha da cana-de-açúcar, *Mahanarva posticata* (ALVES, 1998), da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (OLIVEIRA et al., 2008) e carrapatos de impacto na pecuária, como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (BEYS DA SILVA et al., 2010).

De acordo com Tonus (1999), a eficácia do *M. anisopliae* no controle biológico depende da aplicação e da quantidade aplicada. O ideal é que seja aplicado à tarde, quando há menor incidência de raios ultravioleta e, preferencialmente, logo após as chuvas. O mínimo recomendado é de dois quilos por hectare, podendo ser aplicado até 5 kg ou mais de substrato cultivado.

De acordo com os trabalhos de Almeida e Batista Filho (2006), as estruturas mais produzidas e comercializadas de *M. anisopliae* são os conídios, produzidos na superfície de meio de cultura sólido, dentro de diferentes recipientes conforme o objetivo e a escala de produção, sendo o arroz o substrato mais utilizado para a produção conidial.

Nos estudos de Arthur et al. (2003), testou-se a compatibilidade química com inseticida fenitrothion contra gafanhotos e verifica-se que o produto químico causou redução imediata na população de insetos, enquanto que *M. anisopliae* var. *acridum* persistiu no ambiente promovendo o controle dos insetos por um período maior.

Segundo Alves et al. (2002), para que a utilização de *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre insetos apresente bons resultados, depende da produção, formulação, potencial de inóculo, método de interação e condições ambientais adequados.

Leite et al. (2003) observaram que a tendência na utilização de controle biológico se intensificou com o apoio do Instituto Biológico, o qual prestou consultoria na instalação de biofábricas do fungo *M. anisopliae* para o controle biológico da cigarrinha da cana-de-açúcar.

## 2.2 Cenário da cana e suas pragas

A área cultivada com cana-de-açúcar no Brasil é de oito milhões de hectares e, na safra 2014/2015, a indústria canavieira beneficiou 571,34 milhões de toneladas de cana para a produção de açúcar e etanol (CONAB, 2014).

Uma das principais pragas é a *Diatraea saccharalis Fabricius* (Lepidoptera: Crambidae), segundo Dinardo-Miranda et al. (2012), que causam prejuízos com sua fase imatura a qual abre galerias nos caules da planta e se reproduzem muito rápido, resultando em perdas na produção de açúcar e álcool. O controle de *D. saccharalis* por inseticidas químicos

não é muito eficiente, pois sua lagarta fica dentro dos colmos onde o inseticida não alcança, segundo (PINTO, 2009), desta forma tem-se aumentado o interesse pelo controle desta praga com o uso de parasitoides, predadores e entomopatógenos, sendo o mais eficiente, neste caso, a *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae), de acordo com Silva et al. (2012). Para Alves et al. (2008), a broca *D. saccharalis* é suscetível naturalmente aos fungos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., os quais infectam cerca de 10% das lagartas no nordeste do Brasil. Estudos com isolados destes fungos demonstram patogenicidade a ovos e larvas de diversos artrópodes (SILVA et al., 2003; FERREIRA et al., 2005; ZAPPELINI et al., 2010).

A aplicação de *Beauveria bassiana* contra *D. saccharalis* causa mortalidade média de 89% para a concentração de  $5 \times 10^8$  conídios.mL<sup>-1</sup>, de acordo com Wenzel et al. (2006).

No trabalho de Oliveira et al. (2008), o uso de suspensões fúngicas de *B. bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, em doses com baixa letalidade, comprometeu as características de longevidade, fecundidade e viabilidade de ovos de *D. saccharalis*.

Outra praga que vem prejudicando a cana consideravelmente, constatada nos trabalhos de Balbo Júnior e Mossim (1999) e Dinardo Miranda et al (1999) é a *Mahanarva fimbriolata*, devido a mudança na colheita da cana manual para mecanizada. Anteriormente a *M. fimbriolata* era controlada por ações físicas, como a despalha da cana, o fogo antes da colheita que destruía os ovos em diapausa. Esse aumento populacional vem ocorrendo, principalmente no estado de São Paulo com a proibição da queima.

*M. fimbriolata* é bem adaptada a locais de temperatura elevada, alta umidade, aliados pela abundante cobertura vegetal deixada no solo pela colheita da cana mecanizada, sendo o fator climático o principal condicionante da dinâmica populacional, modificando diretamente a duração do ciclo de vida e o potencial reprodutivo das fêmeas e, indiretamente, a população de seus inimigos naturais (BOTELHO et al., 1977, MENDES et al., 1977; BARBOSA et al., 1979).

O dano causado pela *M. fimbriolata* é chamado de “queima da cana-de-açúcar”, ocasionada pela alimentação do adulto, devido as toxinas injetadas na alimentação que ocasionam a redução no tamanho e espessura dos entrenós, que ficam com pequenas manchas amarelas, até reduzir sua capacidade de fotossíntese e interferir na quantidade de sacarose no colmo. A perfuração pelo estilete infectado contamina a seiva por microrganismos, causando deterioração dos tecidos de crescimento do colmo, podendo levar a sua morte, de acordo com relatos de Guagliumi (1972-73) e El-Kadi (1977).

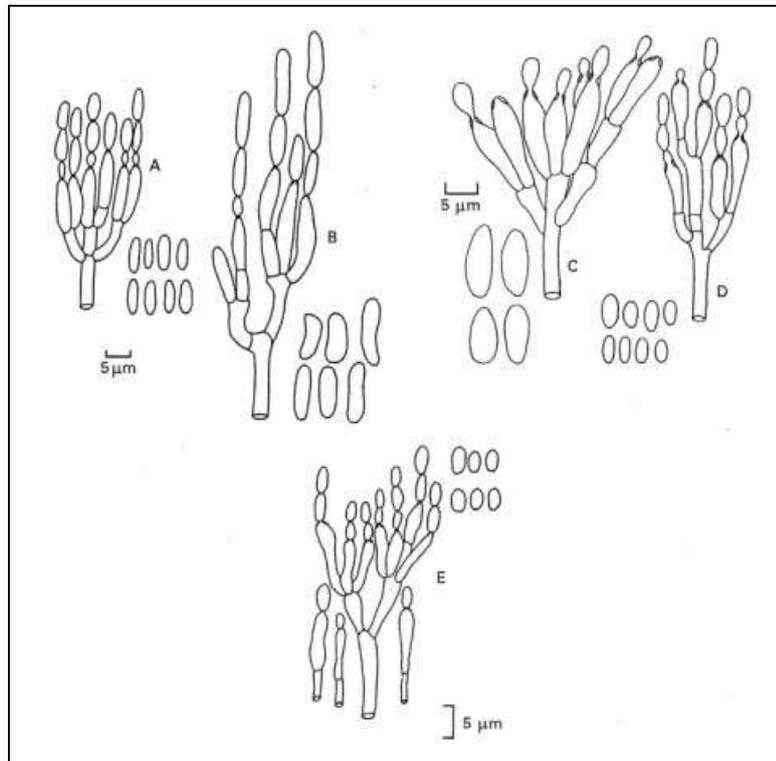
Existem alguns produtos químicos de ação sistêmica eficientes no combate, mas que devem ser usados na época certa, sendo sua desvantagem a ocorrência de surtos de pragas secundárias, ressurgência e aparecimento de novas pragas, segundo Gallo et al. (2002), além de causar desequilíbrio biológico no ecossistema da cultura.

### 2.3 Classificação e descrição do fungo *Metarhizium anisopliae*

Durante muito tempo o *Metarhizium anisopliae* foi classificado como Deuteromiceto, e pertencente à classe Hiphomycetes, ordem Moniliales, família Moniliaceae de acordo com Driver et al. (2000). Entretanto, utilizando-se de análises de sequências da região de ITS do rDNA, Liu et al. (2001) identificaram o fungo *M. anisopliae* como sendo a forma anamorfa de *Cordyceps brittlebankisoides*, classificando-o assim, como Ascomiceto. Pelo menos duas espécies são reconhecidas formalmente, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium flavoviride*, sendo que *M. anisopliae* a mais comum, e é patógeno de maior número de espécies de insetos. Segundo Alves (1998), a espécie *Metarhizium flavoviride* ocorre principalmente sobre ortópteros, homópteros e coleópteros, e o *M. anisopliae* infecte mais de 300 espécies de insetos, dentre eles a cigarrinhas da cana-de-açúcar e das pastagens, além de percevejos e gafanhotos.

De acordo com Alves (1998), o *M. anisopliae* possui duas variedades, *minor* e *majus* com a diferença de tamanho dos conídios, conforme pode ser visto na Figura 2.1, onde os conídios curtos, medindo de 3 a 9  $\mu\text{m}$ , são da variedade *minor*, enquanto que conídios mais longos, medindo de 9,1 a 18  $\mu\text{m}$ , são da variedade *majus* (*M. anisopliae* var *majus*). A coloração dos conidióforos, onde se forma os conídios da espécie *M. anisopliae* pode ser branca, esverdeada, marrom ou castanho-claro.

Figura 2.1: Estrutura dos conídios de *M. anisopliae* – (A) *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*; (B) *M. anisopliae* var. *majus*; (C) *M. flavoviride* var. *flavoviride*; (D) *M. flavoviride* var. *minus*; (E) *M. album* (extraído de ALVES, 1998).



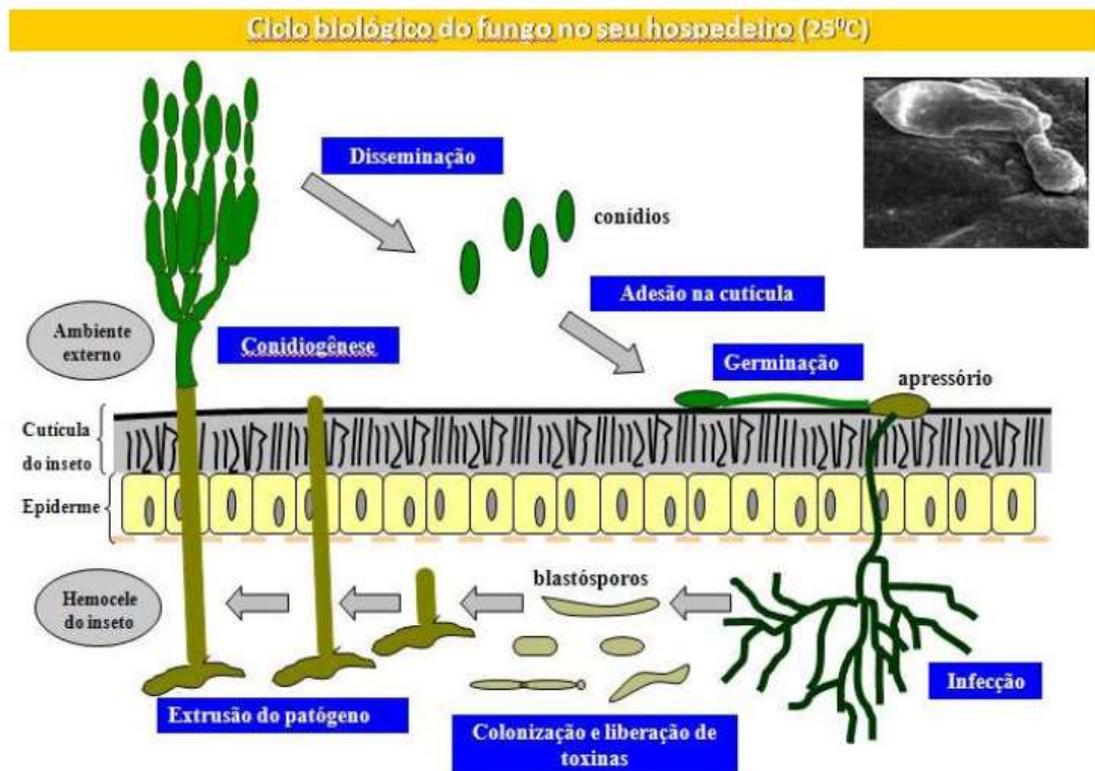
Segundo Wang et al (2002), morfologicamente *M. anisopliae* apresenta-se como um fungo filamentosso, com um corpo de frutificação semelhante a um esporodóquio agregado a hifas intimamente entrelaçadas, contendo uma massa compacta de conidióforos característicos, simples ou ramificados, resultando em células esporogênicas denominadas firíades, das quais se originaram os fialospóros.

De acordo com Alves (1998), os conídios são uninucleados, coloridos, formando-se sobre conidióforos simples que, formam uma massa sobre o inseto infectado, sendo a doença chamada de muscardine verde, de acordo com Wang et al (2002), pois no final da formação das estruturas fúngicas, as carcaças apresentam tons de verde que variam do claro ao escuro, acinzentado ou ainda esbranquiçado.

Alves (1998) relata que os sintomas causados pela patogenicidade no inseto infectado são a inquietação, perda da sensibilidade, descoordenação dos movimentos e paralisia, devido aos metabólitos secundários produzidos que afetam os canais de resposta muscular e na estrutura da membrana celular, assim, as toxinas liberadas levam o inseto à morte, período que varia de 5 a 12 dias, dependendo das condições ambientais (temperatura, luz, umidade e radiação ultravioleta), condições nutricionais e susceptibilidade do inseto.

St Leger et al. (1991) relatam que a ocorrência da patogenicidade depende da ocorrência de processos bioquímicos e mecânicos sincronizados. De acordo com estudos, inicialmente o conídio adere e germina sobre a cutícula do inseto, fazendo então a penetração, em seguida, ocorre a degradação enzimática e pressão mecânica, onde enzimas hidrolíticas como quitinases, proteases e lipases são produzidas, fazendo com que as hifas atravessem a cutícula do hospedeiro e, por fim, ocorre o aparecimento das estruturas fúngicas, com a produção de conídios sobre a carcaça do inseto. Esta sequência de eventos pode ser vista na Figura 2.2.

Figura 2.2: Esquema ilustrativo representando o processo de infecção do *M. anisopliae* (extraído de SILVA, 2012)



#### 2.4 Fatores que afetam o desenvolvimento de *Metarhizium anisopliae*

Os entomopatógenos, ao serem aplicados no campo, estão sujeitos a uma série de fatores bióticos e abióticos que podem ter influência na sua sobrevivência, propagação e infecção no hospedeiro, de acordo com Franco (2005). Os fatores bióticos são aqueles que estão relacionados aos patógenos e aos hospedeiros, sendo que abióticos relacionados ao ambiente. Nos fungos, os fatores ambientais podem interferir em sua germinação, esporulação,

crescimento e patogenicidade. Luz, pH, salinidade, radiações, umidade, nutrição e temperatura destacam-se como fatores abióticos que influenciam genética e fisiologicamente os fungos (ALVES, 1998). A temperatura é de vital importância aos fungos, pois pode afetar seu metabolismo, germinação, produção de enzimas e toxinas e reprodução. Por isso, temperaturas ideais durante o ciclo de vida dos fungos são importantes para o crescimento vegetativo e germinação de esporos. A umidade relativa necessária ao processo de germinação em fungos deve ter valores acima de 95% e tem-se verificado para *M. anisopliae*, que as epizootias em campo estão sempre correlacionadas à alta umidade relativa, de 70% a 100%. A faixa ideal de temperatura para o desenvolvimento de *M. anisopliae* está entre 24 e 30 °C.

A radiação luminosa pode ser estimulante ou prejudicial sobre a germinação dos conídios, indução de estruturas reprodutivas (TEIXEIRA et al., 2001) e nos estágios iniciais do crescimento do tubo germinativo dos fungos (ALVES, 1998). De acordo com Nicholson et al., (2000), a radiação solar ultravioleta (UV) pode inativar o conídio e provocar mutações e danos letais ao DNA. Segundo Braga et al. (2001a), a radiação UV reduz a eficiência do fungo no campo, principalmente a radiação UV-B, que tem efeito prejudicial aos propágulos de fungos.

A exposição à radiação UV pode ocorrer durante uma parte ou até mesmo durante toda a vida dos microrganismos, segundo Francisco (2004), fator este que, em algumas espécies desenvolveu mecanismos de proteção ao UV, embora os fungos geralmente não apresentem proteção contra os efeitos desta radiação.

De acordo com alguns estudos de Ignoffo e Garcia (1992) e Braga et al. (2002), a pigmentação dos conídios pode influenciar na resistência à radiação UV, principalmente na espécie *Metarhizium*. Braga et al. (2006) verificaram que mutantes com coloração branca, violeta e amarela são mais sensíveis à radiação UV que os de pigmentação verde. Segundo Franco (2005), existe uma forte relação entre a pigmentação dos esporos e a sensibilidade dos mesmos à radiação UV, ou seja, quanto maior a pigmentação, maior a resistência à exposição a esta.

Na tentativa de minimizar os efeitos nocivos das radiações e conseqüentemente aumentar a persistência do fungo no campo, segundo Braga et al. (2001a), alguns métodos paliativos vêm sendo utilizados, tais como aplicação noturna ou em dias nublados, adição de fotoprotetores e seleção de raças mais tolerantes.

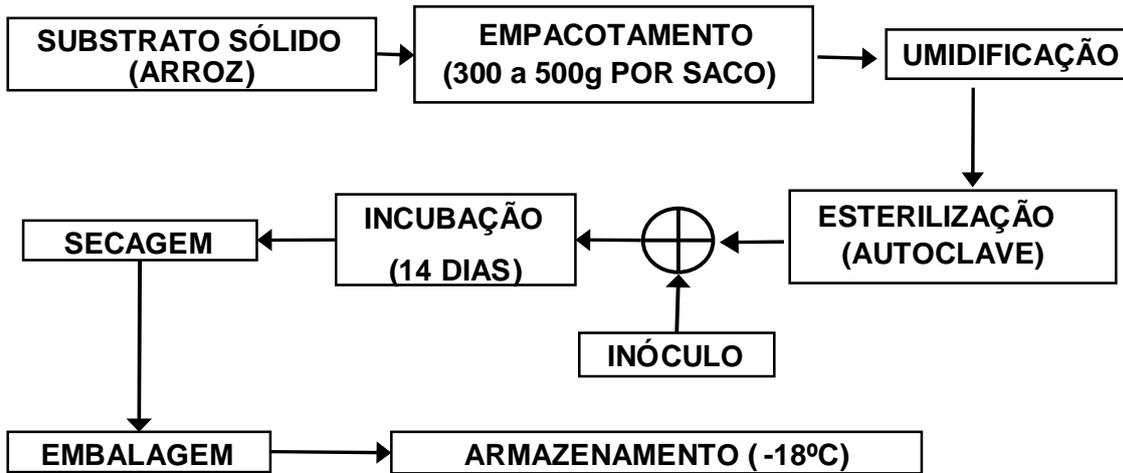
## 2.5 Produção Industrial de *Metarhizium anisopliae*

Para que possam ser utilizados no controle microbiano de insetos como inseticidas biológicos, é necessário que os fungos entomopatogênicos sejam produzidos em quantidades suficientes para as chamadas introduções inundativas (aplicações em grandes quantidades), de modo a agir independentemente da densidade populacional da praga.

Segundo Pereira e Alves (1998), apesar da importância, grande parte da produção comercial de fungos utiliza técnica artesanal ou semi-artesanal, devido a utilização de mão-de-obra elevada, baixo índice de automatização do processo, utilização de equipamentos adaptados de outras aplicações e utilização de meios de cultura oriundos de matéria prima bruta ou com pouco processamento.

A produção industrial de *Metarhizium anisopliae* é comumente realizada por fermentação em estado sólido (FES), utilizando-se arroz tipo 1 como substrato, com incubação em salas climatizadas com temperatura de 28° C. Essa prática exige a repetição de procedimentos delicados, como esterilização do substrato, inoculação e incubação do fungo em sacos plásticos. Tecnicamente, é um processo simples, realizado de forma manual. Entretanto, é pouco eficiente, apresenta alto índice de contaminação e ausência de controle de processo. A Figura 2.3 mostra o esquema da produção desse fungo empregado pela empresa Oligos Biotec, de São José do Rio Preto-SP, em 2014, representativo da maioria dos processos das demais biofábricas do Estado.

Figura 2.3 – Diagrama esquemático da produção industrial de *M. anisopliae*.



Todas as etapas do processo são realizadas manualmente, em batelada. Primeiramente, o arroz é embalado em embalagens de polipropileno e umidificado e, posteriormente é levado à esterilização em autoclave. A seguir, os sacos com arroz são levados a um túnel de refrigeração, para resfriamento do substrato, e em seguida o fungo é inoculado manualmente, em câmara de fluxo laminar disposta em uma sala com ar estéril. De um modo geral, são empregados de 300 a 500 g de substrato em cada embalagem plástica. A incubação é realizada em salas de germinação, com temperatura controlada, onde as embalagens com arroz são dispostas em prateleiras de ferro. As lâmpadas fluorescentes ficam continuamente ligadas e são postadas no teto e paredes da sala, de modo que há grande variabilidade na intensidade luminosa recebida pelos pacotes com arroz inoculado. Terminada a incubação, os sacos com o fungo são levados a salas de secagem, onde são abertos e o processo de secagem ocorre naturalmente. A duração desta etapa depende da umidade do ar ambiente, sendo sempre superior a 24 horas. Após a secagem, o arroz com o fungo é transferido manualmente a embalagens de polipropileno com capacidade de aproximadamente 5,0 kg. Este material é armazenado em câmaras de congelamento, com temperatura em torno de -18 °C. A Figura 2.4 a, b, c, d demonstram como é realizado o processo de produção do *M. anisopliae* em uma biofábrica.

Figura 2.4: (a) processo de esterilização do substrato; (b) incubação do substrato inoculado com o fungo *M. anisopliae* em prateleiras em câmaras climatizadas e iluminadas; (c) secagem do substrato cultivado após 14 dias; (d) empacotamento do substrato cultivado para ser comercializado (imagens extraídas do Google).



Por esses motivos, no processo atualmente empregado, há grande dificuldade de produção em grande escala. O aumento da produção deste fungo torna-se necessário devido à ampliação das áreas de plantio de cana-de-açúcar para atender ao crescente mercado de álcool

combustível, e à diminuição das queimadas. Portanto, o desenvolvimento de um equipamento que permita maior produção de *M. anisopliae* é necessário.

## 2.6 Fermentação em estado sólido

De acordo com Casciatori et al. (2015), fermentação em estado sólido é um processo de cultivo que ocorre em um meio poroso, onde o conteúdo de água não deve exceder a capacidade de retenção do meio.

Dalsenter et al. (2005) propõe que a FES deve reproduzir um ambiente adequado para o crescimento fúngico, principalmente ao filamentoso que produz enzimas extracelulares em altas concentrações para hidrolisar os nutrientes da fase sólida.

Casciatori et al. (2015) relatam que através da utilização da FES em bioprocessos tem-se obtido vários tipos de produtos como enzimas, ácidos, polissacarídeos, fungos, bactérias aplicados em indústrias de alimentos, farmacêuticas, cosméticos e pigmentos.

As vantagens da FES sobre a Fermentação Submersa são elevado rendimento em produto, tecnologia simples, baixo custo de produção, baixo gasto energético, maior quantidade de produtos produzidos e maior transferência de oxigênio o que favorece processos aeróbios. Como maior desvantagem apresenta-se a dificuldade de ampliação da escala de produção, principalmente no controle dos biorreatores, devido aos problemas em se controlar a temperatura, à não homogeneidade do meio, tempo de cultivo mais longo e a restrição a microrganismos adaptados a baixa disponibilidade de água (MITCHELL e LONSANE, 1992; RAIMBAULT, 1998).

De acordo com Schmidell et al. (2001), os fungos filamentosos são adaptados a ambientes com baixa concentração de água, desta forma são comumente utilizados em pesquisas como culturas de *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus*, para enriquecimento proteico visando alimentação animal e produção de enzimas de aplicações industriais, além de outros microrganismos para a produção de bioinseticidas e de álcool.

No desenvolvimento do fungo, a umidade do meio é um fator importante, pois ela atua no transporte de nutrientes e metabólitos em forma dissolvida, além de manter o volume celular ao ligar-se com moléculas de polióis, açúcares e enzimas (CROWE et al., 1982).

A quantidade de água adequada para a fermentação de um substrato varia de acordo com a composição do mesmo. A título de exemplo, os amiláceos (arroz, trigo, centeio, cevada, milho e mandioca) fermentam entre 25 e 60% de umidade inicial e os celulósicos (palhas,

cascas, bagaço, farelos e outros) entre 60 a 80%, sem o aparecimento de água livre (SOCCOL 1992; CASCIATORI, 2015).

A FES se adapta a vários tipos de organismos como fungos, leveduras ou bactérias, devendo ser realizado um estudo prévio para se determinar a linhagem, o meio de cultura e condições ambientais como a temperatura, umidade e disponibilidade de oxigênio a serem empregados na FES, segundo Schmidell et al. (2001).

Na FES, a fase sólida é fonte de nutrientes, carbono, nitrogênio, além de servir como suporte para o crescimento dos microrganismos, devendo o substrato não apresentar aglomeração das partículas individuais e o ar circula entre os espaços vazios a uma pressão relativamente baixa, garantindo o desenvolvimento do microrganismo e a homogeneidade térmica (COELHO, 2007). O meio deve, ainda, ser poroso e ter tamanho e formato adequado para garantir o acesso do microrganismo (SCHMIDELL et al., 2001). Desta forma, normalmente os materiais utilizados são fragmentados e de natureza granular ou fibrosa o que permite a retenção de água por higroscopia e capilaridade (CASCIATORI, 2015).

Vários tipos de substratos são utilizados na FES, como resíduos agroindustriais, os quais permitem que os fungos filamentosos penetrem neste substrato pela presença de turgescência na ponta do micélio (RAMACHANDRAN, 2004).

## **2.7 Biorreatores de FES**

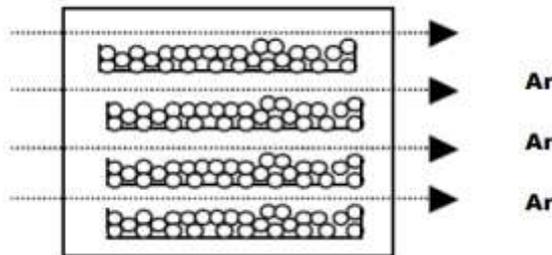
Na FES são utilizados biorreatores de bandeja, leito empacotado, leito fluidizado, parafuso e tambor rotativo e, para uma escolha adequada, deve-se levar em consideração os objetivos da fermentação, custos envolvidos no processo, facilidade de carga, descarga, limpeza e manutenção do equipamento, possibilidade de monitoramento e controle de parâmetros do processo, características do microrganismo empregado e a necessidade de um sistema estéril. O biorreator deve ser de material inócuo, resistente a corrosão e não tóxico para o organismo, além de permitir aeração eficiente e manter a uniformidade e integridade do substrato (RAGHAVARAO et al., 2003).

A interação biorreator-microrganismo deve ser tal que haja crescimento microbiano adequado e síntese dos metabólitos de interesse nas concentrações desejadas. A título de exemplo, pode-se dizer que os biorreatores de tambor rotativo permitem bom contato entre as fases sólida e fluida, mas que pode ser prejudicial por romper o micélio, comprometendo o crescimento fúngico e sua produtividade. Os de leito fixo não oferecem homogeneidade

térmica e há a probabilidade de ocorrência de regiões com baixa aeração, interferindo na velocidade e seletividade das reações (ASHLEY et al., 1999).

De acordo com Mitchell et. al. (2000), o biorreator de bandeja possui leito estático com aeração forçada no qual o substrato inoculado é acomodado em bandejas que podem ser de madeira, plástico ou aço inox, como mostra a Figura 2.5, disposta em câmaras com o ar escoando paralelamente à superfície do leito. É um processo simples, mas com a desvantagem de alto custo operacional, por ocupar uma grande área, e necessitar de elevada mão-de-obra para prepara e manusear as bandejas.

Figura 2.5: Diagrama esquemático do biorreator tipo bandeja, (extraída de MITCHELL et al., 2000)



Deve-se ainda observar que o biorreator de bandeja deve ser mantido em câmara com temperatura controlada para possibilitar a estabilidade térmica do sistema, uma vez que as baixas taxas de aeração e baixa condutividade térmica do meio tornam difícil a dissipação do calor (MITCHELL et al., 2000).

## 2.8 Ampliação de Escala de Biorreatores de FES

Segundo Laurentino (2007), a maioria dos trabalhos de FES se iniciam em escala laboratorial, onde se pode controlar as condições operacionais, como a composição e umidade inicial do substrato, temperatura, de modo a otimizar as condições de cultivo. Mas ao se transferir esse processo para biorreatores em escala comercial as condições ideais são difíceis de serem mantidas. Isso ocorre devido a atividade microbiana que gera calor e a variação da umidade, decorrente da interação entre a matriz porosa e o ar percolante, resultando numa baixa produtividade do reator. De acordo com Zhao et al. (2008), a ampliação de escala em FES torna-se um desafio, devido as mudanças drásticas de aeração, umidade e temperatura, sendo a transferência de calor o principal fator limitante, devido à baixa condutividade

térmica dos materiais orgânicos e as baixas vazões de ar, dificultando a remoção do calor metabólico.

De acordo com Mitchell et al. (2000), a dificuldade de controle da temperatura em FES de leito fixo pode provocar o superaquecimento do meio com a queda da produtividade e até mesmo a morte do microrganismo e danificar o produto formado no leito. Segundo Ghildyal et al. (1994), durante os momentos de alta atividade metabólica do microrganismo, a temperatura pode atingir 10° C acima do valor ideal de crescimento. Desta forma, a ampliação de escala deve ser baseada na interação entre microrganismo-substrato-produto.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios deste trabalho foram realizados no Laboratório de Engenharia de Processos e Biorreatores do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, com auxílio do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, ambos do IBILCE/UNESP.

#### 3.1. Microrganismo

Empregou-se a linhagem ICB 421 do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*, fornecida pelo Instituto Biológico de São Paulo. Antes do início dos experimentos, fez-se um estoque da linhagem, em tubo de ensaio contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA). No tubo, após o desenvolvimento do fungo, adicionou-se óleo mineral para formar uma camada protetora à colônia. O estoque foi mantido em freezer doméstico e utilizado para repicagem em todos os ensaios. A repicagem foi feita por picadas na superfície do meio de cultura BDA, utilizando-se uma alça de platina.

Para utilização nos experimentos, foram efetuadas repicagens em Erlenmeyer inclinados contendo 50 mL de BDA e incubados em câmara DBO a 28 °C por 15 dias para desenvolvimento do fungo e sua esporulação.

Nos experimentos realizados com arroz tipo 1, do fabricante Rosalito, quirera e farelo de arroz, o inóculo foi preparado adicionando-se solução de Tween 80 a 0,1%. A superfície da colônia foi raspada com a ajuda da alça de platina e recolhida a um frasco e a suspensão de esporos foi utilizada como inóculo.

#### 3.2. Testes microbiológicos em embalagens plásticas

Os ensaios fermentativos foram realizados em embalagens de polipropileno de 12 cm x 20 cm acopladas a bocais de PVC de 3,6 cm de diâmetro, os quais foram preenchidos com tampões de algodão envoltos por gaze, a fim de garantir a troca de gases e assegurar que não houvesse contaminação por outros microrganismos. Dentro de cada embalagem foi colocado um arame na forma de espiral para facilitar a aeração, evitar a aglomeração do substrato e para não colapsar na autoclavagem. Uma embalagem empregada na fermentação pode ser vista na Figura 3.1.

Figura 3.1: Embalagem de polipropileno pronta para a fermentação.



A temperatura de cultivo foi fixada em 28 °C, definida por Pinto (2009) como ótima para o cultivo deste fungo. A granulometria do substrato foi variada empregando-se arroz tipo 1, quirera de arroz e farelo de arroz, e a umidade do substrato foi estabelecida adicionando-se água ao substrato seco.

Em cada embalagem plástica foram colocados 10 g de substrato seco, nos quais foi inoculada a suspensão fúngica, na proporção de  $1 \times 10^8$  esporos/mL, em cada embalagem.

Ao final do processo, a extração dos conídios foi feita empregando-se solução Tween 80 a 0,1%. Em cada embalagem foi adicionado 50 mL de solução Tween 80, manipulando-se as embalagens manualmente para o desprendimento dos conídios. A contagem dos conídios foi feita em Câmara de Neubauer em microscopia óptica com lentes de 40x de aumento.

### ***3.2.1 Produção de *M. anisopliae* em diferentes umidades em arroz tipo 1***

Os testes foram realizados em embalagens de polipropileno previamente descritas, sendo que para cada tratamento foram realizadas 3 repetições independentes.

Foram estabelecidos quatro tratamentos para avaliar a melhor alternativa de umidificação do substrato:

1. Substrato coberto com água destilada por 10 minutos, seguido por esgotamento em peneira e posterior autoclavagem;
2. Substrato coberto com água destilada por 20 minutos, seguido por esgotamento em peneira e posterior autoclavagem;
3. Adição de 7 mL de água destilada ao substrato antes da autoclavagem;
4. Adição de 7 mL de água destilada ao substrato após a autoclavagem;

Antes e após cada tratamento, a umidade dos grãos foi determinada em um analisador de umidade MB 45 (Ohaus, Parispany, EUA), que se baseia na secagem dos grãos por radiação infravermelha produzida por elemento halógeno.

Após a autoclavagem, todas as amostras receberam 0,5 mL de suspensão de inóculo e foram armazenadas em câmara DBO a 28 °C por dez dias ao abrigo da luz.

Após o período de incubação, as amostras receberam 50 mL de solução Tween 80 para obtenção da suspensão de conídios.

### ***3.2.2 Efeito do tempo de cultivo e fotoperíodo sobre a produção de esporos em arroz tipo 1***

Nestes ensaios, foram adicionados 7 mL de água destilada antes de autoclavar as amostras de 10 g de arroz tipo 1, seguindo-se da adição de 0,5 mL de suspensão de inóculo e armazenamento em câmara DBO a 28 °C, sendo retiradas amostras a partir do primeiro dia de incubação, seguindo-se de extração dos conídios com solução de Tween 80. As amostras que foram condicionadas a fotoperíodo de exposição à luz, foram armazenadas em DBO a 28 °C com fonte de luz uma lâmpada fluorescente, tipo luz do dia, de 800 Lúmens, posicionada verticalmente na porta da câmara para garantir iluminação em todas as prateleiras.

As amostras para análise do efeito do fotoperíodo foram divididas nos seguintes tratamentos:

1. 10 dias de exposição à luz contínua;
2. 10 dias de cultivo ao abrigo da luz;
3. 5 dias de cultivo no escuro seguidos de 5 dias de exposição à luz contínua;
4. 5 dias de exposição à luz contínua seguidos de 5 dias de cultivo sem luz;
5. 10 dias de cultivo no escuro seguidos de 5 dias de exposição à luz contínua;
6. 10 dias de exposição à luz contínua seguidos de 5 dias de cultivo sem luz.

A Tabela 3.1 resume os regimes de fotoperíodo empregados e a denominação a eles atribuída.

**Tabela 3.1:** Efeito do cultivo do *M. anisopliae* em diferentes fotoperíodos para produção de conídios

| <i>TRATAMENTO</i> | <i>Total de tempo(dias)</i> | <i>Período sem iluminação (dias)</i> | <i>Período com iluminação (dias)</i> | <i>Porcentagem de iluminação</i> |
|-------------------|-----------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| 1- 10E            | 10                          | 0                                    | 10                                   | 0                                |
| 2- 10C            | 10                          | 10                                   | 0                                    | 100                              |
| 3- 5E_5C          | 10                          | 5                                    | 5                                    | 50                               |
| 4- 5C_5E          | 10                          | 5                                    | 5                                    | 50                               |
| 5- 10E_5C         | 15                          | 10                                   | 5                                    | 33,33                            |
| 6- 10C_5E         | 15                          | 10                                   | 5                                    | 66,66                            |

Nos ensaios de fotoperíodo, prepararam-se três repetições independentes para cada tratamento, com três réplicas para cada repetição.

### 3.2.3 *Influência da granulometria do substrato*

Nesse ensaio, comparou-se a produção de conídios em três granulometrias do substrato. Para cada ensaio utilizou-se 10 g de substrato ao qual adicionou-se 7 mL de água destilada antes de autoclavar para as seguintes granulometrias: arroz do tipo 1, quirera de arroz e farelo de arroz. A este último, foi adicionado bagaço de cana-de-açúcar, de modo a estruturar o meio de cultivo. Utilizaram-se 0,5 mL de suspensão de inóculo na concentração de  $10^8$  conídios/mL para cada 10 g de substrato cru. A incubação foi realizada em câmara DBO a 28 °C, utilizando-se as composições apresentadas na Tabela 3.2. Para cada tratamento foram realizadas três repetições independentes, com três réplicas para cada repetição.

**Tabela 3.2:** Composição dos substratos

| <i>Substrato</i> | <i>Composição dos substratos</i>   |
|------------------|--|
| 1                | 10 g de arroz tipo 1 cru + 7 mL de água                                  |
| 2                | 10 g de quirera de arroz cru + 7 mL de água                              |
| 3                | 10 g de farelo de arroz + 7 mL de água                                   |
| 4                | 10 g de farelo de arroz + 7 mL de água + 1 g de bagaço de cana-de-açúcar |
| 5                | 10 g de farelo de arroz + 7 mL de água + 2 g de bagaço de cana-de-açúcar |
| 6                | 10 g de farelo de arroz + 7 mL de água + 3 g de bagaço de cana-de-açúcar |

### 3.3. Ensaios de ampliação de escala em embalagens de polipropileno

Como o processo de produção industrial de esporos de *M. anisopliae* normalmente é realizado em embalagens de polipropileno de 30 cm x 40 cm, alojadas em prateleiras em salas climatizadas (OLIGOS BIOTEC, 2014), buscou-se reproduzir este procedimento em laboratório. Para tanto, às embalagens foram acoplados bocais de PVC de 8 cm de diâmetro, os quais foram preenchidos com tampão de algodão envolto por gaze, a fim de garantir a troca de gases e assegurar que não houvesse contaminação por outros microrganismos. Dentro de cada saco fermentador, foram colocados dois arames na forma de espiral para facilitar a aeração e evitar a aglomeração do substrato, conforme pode ser visto na Figura 3.2.

Nestes ensaios foram empregados como substrato arroz tipo 1 e quirera de arroz, com massa de 0,5 kg, ao qual foram adicionados 350 mL de água destilada antes de autoclavar. Após autoclavagem e resfriamento, o substrato recebeu 25 mL de solução inoculo com  $10^8$  conídios/mL.

Durante o período de fermentação foram acompanhadas as medidas de temperatura do ar dentro da embalagem plástica através de acoplagem de termopar em meio ao substrato. O sensor foi conectado a um sistema de aquisição de dados COMPAQ-DAQ (NATIONAL INSTRUMENTS, AUSTIN, EUA), o qual foi conectado a um computador e gerenciado por uma rotina do software Labview 8.5 (NATIONAL INSTRUMENTS).

Figura 3.2: Embalagens de polipropileno de maior dimensão



As embalagens ficaram acondicionadas em câmara DBO a 28 °C por 10 dias ao abrigo da luz ou com exposição contínua à luz, sendo empregados dois tipos de tratamento, um em repouso por todo o período de fermentação e outro com a manipulação diária da embalagem a partir do 5º dia de fermentação.

Após este período, o material fermentado foi transferido para um recipiente maior, onde adicionaram-se 2,5 L de solução Tween 80 à 0,1%, sendo realizado a homogeneização manual para o desprendimento dos conídios. Desta suspensão foi retirada uma amostra para contagem dos conídios.

### **3.4. Testes de virulência**

Neste ensaio, foram seguidas as orientações do Instituto Biológico, utilizando-se lagartas de broca de cana-de-açúcar (*D. flavipennella*) no 2º instar, provenientes dos laboratórios das biofábricas Oligos Biotec (São José do Rio Preto-SP) e Agrobio (Novo Horizonte-SP), as quais foram mantidas em condições de cultivo controladas ( $27\pm 2$  °C;  $70\pm 10\%$  de umidade relativa e fotofase de 12 horas), sob dieta artificial, constituída basicamente de farelo de soja, germe de trigo, açúcar, sais de Wesson, ácido ascórbico, solução vitamínica e anticontaminantes. (LOUREIRO & MONTEIRO, 2005)

Esporos de *M. anisopliae* foram retirados com solução Tween 80 a 0,1% das embalagens plásticas, nas quais o fungo foi cultivado sob diferentes condições, conforme se descreve a seguir. A quantidade de conídios foi determinada em Câmara de Neubauer e ajustadas a concentrações de  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  conídios/mL. As suspensões de esporos foram empregadas para borrifar as lagartas com um borrifador doméstico. Os esporos foram provenientes de cultivos realizados em arroz tipo 1 sob condições variadas de luminosidade, conforme Tabela 3.3.

**Tabela 3.3:** Tempo e fotoperíodo de cultivo de conídios de *M. anisopliae* utilizado no teste de virulência da broca de cana-de-açúcar (*D. flavipennella*)

| <i>Tratamento</i> | <i>Fotoperíodo</i>            |
|-------------------|-------------------------------|
| 1                 | 7 dias no escuro              |
| 2                 | 8 dias no escuro              |
| 3                 | 9 dias no escuro              |
| 4                 | 10 dias no escuro             |
| 5                 | 10 dias no claro              |
| 6                 | 5 dias escuro + 5 dias claro  |
| 7                 | 5 dias claro + 5 dias escuro  |
| 8                 | 15 dias escuro                |
| 9                 | 15 dias claro                 |
| 10                | 10 dias escuro + 5 dias claro |
| 11                | 10 dias claro + 5 dias escuro |

Para cada tratamento, utilizaram-se três repetições com quinze lagartas cada, totalizando 45 lagartas por tratamento.

Os tratamentos foram acondicionados em câmara DBO à 26° C, por um período de 15 dias, sendo acompanhado diariamente o número de lagartas mortas para cada tratamento.

Para avaliar se toda a suspensão de esporos aspergida sobre as lagartas atingiram o alvo, foi realizado um teste no qual foi utilizado papel filtro, o borrifador, solução Tween 80 a 0,1%, solução de esporos na concentração de 10<sup>8</sup> esporos/mL e trinta lagartas distribuídas em três repetições. Os papéis de filtro foram pesados em balança analítica primeiramente, sendo novamente pesado com as cinco lagartas e a solução empregada e após a retirada das lagartas.

### 3.5 Ensaios de ampliação de escala em biorreator de bandeja

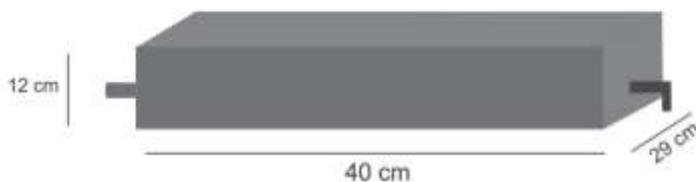
Um biorreator de bandeja foi projetado e construído para o processo de crescimento do fungo *Metarhizium anisopliae* ICB 421 em meio sólido. A bandeja desenvolvida foi de alumínio e possui dimensões de 40 cm de comprimento, 29 cm de largura e 12 cm de altura, o esquema do biorreator pode ser visto na Figura 3.3. Com uma entrada e uma saída de ar, tampa superior e gaveta externa, permite o monitoramento de temperatura dentro do

biorreator e na entrada e saída de ar. No interior do biorreator contém uma placa de alumínio com furos de 0,05 cm cada e com espaçamento entre eles de 0,5 cm, onde é anexado os termopares para monitorar temperaturas, essa placa é utilizada para orientação do meio geométrico do meio de cultivo e do meio geométrico do *headspace*, a placa é móvel, possibilitando medir temperaturas em diferentes posições, porém, no presente trabalho a placa foi posicionada no centro geométrico da bandeja.

O sistema de suporte do biorreator de bandeja possui conexões acopladas para entrada e saída de ar. O ar neste sistema foi fornecido por um compressor: antes de entrar no biorreator, o ar passa por um filtro cerâmico e em seguida atravessa um filtro com algodão para retirada de impurezas e contaminação. A vazão do fluido é medida com rotâmetro (*Dwyer Instruments, MMA-22, USA*). O ar percola uma coluna de umidificação, recheada de esferas de vidro e preenchida com água destilada estéril e em seguida passa por um filtro de membrana microbiológico com (*Midisart® 2000 In-Line Air Filter*) após o que é conduzido ao interior da bandeja do biorreator, onde passa através do *headspace*, escoando paralelamente à superfície do leito de arroz. O biorreator e a coluna de umidificação do ar são colocados em câmara DBO durante a fermentação.

Para monitoramento da temperatura no leito, foram utilizados quatro termopares do tipo T localizados na entrada e na saída de ar, no centro geométrico do substrato e no *headspace*. Os termopares foram conectados a um sistema de aquisição de dados COMPAQ-DAQ (*NATIONAL INSTRUMENTS*), gerenciado por uma rotina elaborada em ambiente LabView (*NATIONAL INSTRUMENTS*).

Figura 3.3: Esquema do Biorreator de bandeja (CUNHA, 2016)



Os substratos foram preparados em embalagens plásticas, sendo que em cada embalagem foram adicionados 500 g de substrato, acrescidos de 350 mL de água destilada para umidificação. Em seguida, as embalagens com o substrato e a água foram lacradas e submetidas à esterilização em autoclave por 35 minutos a 121 °C. Após a esterilização, o material foi submetido ao resfriamento até temperatura ambiente. No momento da inoculação,

as embalagens foram abertas em câmara de fluxo laminar para adição de 25 mL de solução inoculante com concentração de  $10^8$  esporos/mL. Com adição da solução inoculante o meio ficou com 58% de umidade em base úmida. Realizada a homogeneização do inóculo no substrato dentro das embalagens plásticas, o material foi distribuído para a bandeja, formando uma camada uniforme. A bandeja fora previamente esterilizada por imersão em água clorada (70 litros de água com 1 litro de cloro) por, no mínimo, 24 horas antes do início do processo.

Com o substrato na bandeja devidamente tampada, a mesma fora encaixada em sua gaveta externa e transferida para a câmara DBO a 28°C por 10 dias. As espessuras de meio de cultivo com arroz tipo 1 utilizadas para fermentação foram de 2 e 4 cm, correspondendo a 1 e 2 kg, respectivamente. Ao término da fermentação, foram preparados 5 L de solução Tween 80 para cada 1 kg de substrato. Essa solução foi adicionada ao substrato, seguindo-se de homogeneização manual para o desprendimento dos esporos. Desta suspensão, foram retiradas amostras para contagem dos esporos com auxílio de câmara de Neubauer.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Produção de *M. anisopliae* em diferentes procedimentos de umidificação

Nestes ensaios para determinação do procedimento adequado de umidificação do meio de cultivo do *M. anisopliae*, foram avaliadas quatro situações de preparo do substrato, sendo determinada a umidade do arroz tipo 1 após o tratamento inicial e a avaliação da produção de conídios. A Tabela 4.1 sistematiza os resultados obtidos. Pode-se notar que a produção de conídios está relacionada à umidade do substrato após o processo de autoclavagem, sendo verificada maior produção no tratamento em que se adicionou água destilada antes do processo de autoclavagem (Tratamento 4), não havendo período de imersão prévia do substrato, nem retirada da água excedente.

**Tabela 4.1:** Efeito do método de preparo do substrato sobre a umidade final do arroz tipo I e sobre a produção de conídios.

| <i>Tratamento do substrato</i>                                       | <i>Quantidade de conídios x 10<sup>8</sup>/mL</i> |                             |                    |               |
|--|---|-----------------------------|--------------------|---------------|
|  | <i>Umidade do arroz</i>                           |                             | <i>Fotoperíodo</i> |               |
|  | <b>Antes de autoclavar</b>                        | <b>Depois de autoclavar</b> | <b>Claro</b>       | <b>Escuro</b> |
| 1. Imersão por 10min   | 22,67%  | 23,94%                      | 0,2835 ± 0,04      | 0,1775 ± 0,02 |
| 2. Imersão por 20min   | 28,67%  | 37,51%                      | 0,1355 ± 0,07      | 0,4625 ± 0,05 |
| 3. 10g de substrato cru +7 ml de água destilada antes de autoclavar  | 47,1%*  | 61,70%                      | 1,2 ± 0,24         | 1,45 ± 0,32   |
| 4. 10g de substrato cru +7 ml de água destilada depois de autoclavar | 6,61%   | 7,41%                       | 0,095 ± 0,03       | 0,1195 ± 0,2  |

\*Essa umidade corresponde a umidade do arroz acrescido da umidade da água adicionada

Provavelmente, a adição de água ao arroz antes da autoclavagem resultou em melhora da textura do substrato, uma vez que a água intersticial age como um meio de transporte de calor mais eficiente do que o ar, de modo que a etapa térmica de autoclavagem tornou os grãos mais propícios ao ataque dos fungos. O mesmo não ocorreu quando os grãos foram imersos previamente em água, pois, aparentemente, a água não teve tempo suficiente para

entumecer os grãos e, como o excesso de água foi removido do arroz, somente uma película permaneceu aderida à sua superfície, não sendo esta água residual tão eficiente para a troca de calor do que a água líquida nos poros observada no Tratamento 3.

De acordo com Jenkins et al. (1998) a cada combinação de substrato com um isolado, deve-se testar o teor ótimo de umidade para o crescimento e produção de conídios do fungos selecionado, visto que a umidade é um fator determinante na produção de conídios, embora a determinação deste parâmetro possa ser complexa.

No entanto, não apenas a umidade parece ser um fator determinante, mas também a forma de preparo do substrato, uma vez que o processo de amolecimento do arroz através do Tratamento 3 provavelmente fez com que o amido se gelatinizasse, tornando o grão de arroz suscetível ao ataque das enzimas do fungo. No entanto, há que se encontrar o limite máximo de água a ser adicionado ao meio de cultivo, de modo a não bloquear os poros intersticiais, o que dificultaria as trocas gasosas, comprometendo o metabolismo microbiano.

Desta forma, os demais ensaios adotaram o procedimento do Tratamento 4 no preparo do substrato.

#### 4.2 Influência do tempo de cultivo sobre a produção de conídios

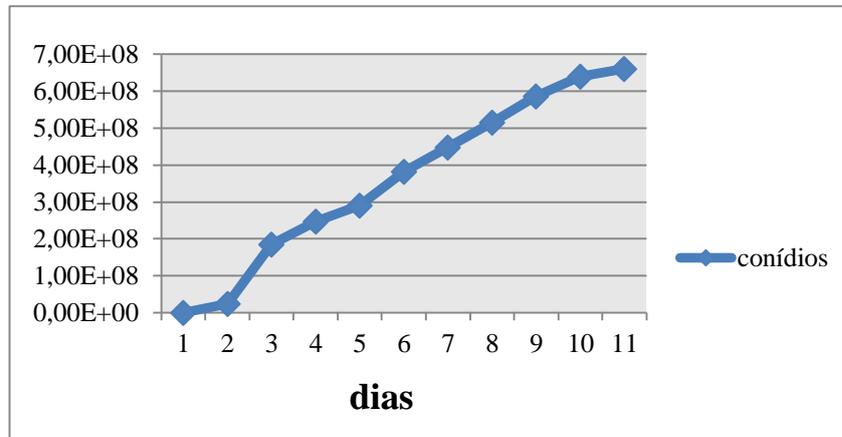
Na Tabela 4.2 e na Figura 4.1 são apresentados os resultados da produção de conídios em função do tempo de cultivo do fungo. Nesta tabela, a coluna Aumento de Produção indica o acréscimo de produção de conídios de um determinado dia em relação ao dia imediatamente anterior.

**Tabela 4.2:** Quantidade de conídios produzidos em função do tempo de cultivo para experimentos realizados no escuro

| <i>Dia</i> | <i>Quantidade de conídio x 10<sup>8</sup>/mL</i> | <i>Aumento de produção(%)*</i> |
|------------|--|--------------------------------|
| 1°         | 0 ± 0  |                                |
| 2°         | 0,25 ± 0,25                                      |                                |
| 3°         | 1,85 ± 0,25                                      | 640,0                          |
| 4°         | 2,48 ± 0,32                                      | 34,0                           |
| 5°         | 2,9 ± 0,18                                       | 16,94                          |
| 6°         | 3,82 ± 0,38                                      | 31,73                          |
| 7°         | 4,48 ± 0,6                                       | 17,28                          |
| 8°         | 5,16 ± 0,8                                       | 15,18                          |
| 9°         | 5,86 ± 0,9                                       | 13,57                          |
| 10°        | 6,4 ± 0,64                                       | 9,22                           |
| 11°        | 6,6 ± 0,72                                       | 3,13                           |

\*(%): Aumento em porcentagem relacionado ao dia anterior

Figura 4.1: Produção de conídios sob condições de ausência de luz contínua em função dos dias de cultivo



De acordo com os dados da Tabela 4.2 e da Figura 4.1 é possível visualizar tendência de estabilização na produção de conídios a partir do nono dia de fermentação a partir do qual o ritmo de crescimento se torna menos intenso. Sugere-se uma melhor avaliação em ambiente industrial de se estender o período de cultivo de 9 para 10 dias, quando se observa um crescimento de 9,22% na quantidade de conídios produzidos, depende dos custos diários envolvidos na manutenção das condições de cultivo, os quais se limitam basicamente aos de refrigeração do ambiente e de testes em ambiente industrial. Também devem ser consideradas as limitações da capacidade de produção da empresa e a demanda pelo produto. Outro aspecto a nortear a decisão sobre o tempo de cultivo é a virulência do microrganismo, como se verá mais detalhadamente no item 4.5 desta dissertação.

### 4.3 Efeito do fotoperíodo e da composição do substrato

Na Tabela 4.3 é apresentado os resultados da produção de conídios para os quatro fotoperíodos e duas granulometrias empregadas.

**Tabela 4.3:** Influência do fotoperíodo sobre a produção de esporos para diferentes cultivos nos substratos arroz tipo 1 e quirera em 28° C.

| <i>Tratamento</i> | <i>Substrato</i> | <i>Fotoperíodo</i>            | <i>Média</i><br><i>(10<sup>8</sup>/mL)</i> | <i>DP</i><br><i>(10<sup>8</sup>/mL)</i> |
|-------------------|------------------|-------------------------------|--|---|
| 1                 | Arroz            | 10 dias no escuro             | 5,72 <sup>ab</sup>                         | 0,80                                    |
| 2                 |                  | 10 dias no claro              | 6,84 <sup>ab</sup>                         | 0,74                                    |
| 3                 |                  | 5 dias escuro + 5 dias claro  | 5,90 <sup>ab</sup>                         | 4,06                                    |
| 4                 |                  | 5 dias claro + 5 dias escuro  | 3,00 <sup>b</sup>                          | 2,06                                    |
| 5                 |                  | 15 dias escuro                | 6,99 <sup>a</sup>                          | 0,15                                    |
| 6                 |                  | 15 dias claro                 | 7,14 <sup>a</sup>                          | 0,17                                    |
| 7                 |                  | 10 dias escuro + 5 dias claro | 6,39 <sup>ab</sup>                         | 0,72                                    |
| 8                 |                  | 10 dias claro + 5 dias escuro | 6,51 <sup>ab</sup>                         | 0,34                                    |
| 9                 | Quirera          | 10 dias no escuro             | 6,65 <sup>a</sup>                          | 1,04                                    |
| 10                |                  | 10 dias no claro              | 7,71 <sup>a</sup>                          | 0,7                                     |
| 11                |                  | 5 dias escuro + 5 dias claro  | 4,52 <sup>b</sup>                          | 0,7                                     |
| 12                |                  | 5 dias claro + 5 dias escuro  | 6,41 <sup>ab</sup>                         | 0,86                                    |
| 13                |                  | 10 dias escuro + 5 dias claro | 7,84 <sup>a</sup>                          | 0,68                                    |
| 14                |                  | 10 dias claro + 5 dias escuro | 8,32 <sup>a</sup>                          | 0,2                                     |

(\*) As letras indicam que há diferença estatística entre as médias pelo teste de Tuckey a 85% de índice de significância.

Observa-se na Tabela 4.3 que o uso da quirera resultou em maior produção de esporos, o que certamente está relacionado ao aumento da área superficial do substrato, uma vez que o diâmetro das partículas da quirera são menores que a das do arroz tipo 1.

O preparo e manipulação dos dois tipos de substratos não apresentaram nenhuma diferença ou dificuldade específica, mas deve-se levar em consideração o preço de mercado de cada tipo de substrato, uma vez que o arroz tipo 1 possui um preço de mercado superior, cerca de três vezes acima da quirera de arroz (CORRETORA MERCADO, 2015).

Quanto ao efeito do fotoperíodo, na Tabela 4.3 observa-se que não há diferença estatística entre as médias para o arroz tipo 1 e que para a quirera, os tratamentos com alternância de períodos claro-escuro são menos favoráveis à produção de conídios. Para arroz tipo 1 também foram realizados ensaios com 15 dias de cultivo uma vez que este é o tempo naturalmente empregado nas biofábricas. Embora seja possível observar-se aumento na

média das concentrações de esporos produzidas em relação aos produzidos com 10 dias de cultivo, não há diferença estatística entre ambas as médias, seja para o tratamento claro ou para escuro. Assim, sugere-se aos produtores industriais de esporos a realizar testes em ambiente industrial para melhor avaliar os resultados alcançados em laboratório na tentativa de empregar a produção em 10 dias na ausência de luz.

Ensaio realizado por Roveda Jr. (2008), medindo o diâmetro de crescimento das colônias em placas de Petri em meio de cultura BDA, utilizando os mesmos fotoperíodos desta dissertação, mostraram que a luz afeta negativamente o crescimento radial de algumas colônias nos tratamentos 10E\_5C e 10C\_5E, assim como no tratamento Claro. Roveda Jr. (2008) verificou o efeito deletério da luz em uma pequena parcela das colônias avaliadas nos tratamentos 10E\_5C e 10C\_5E, representando 16,7% do total de colônias, enquanto que para o tratamento Claro, dois terços das colônias tiveram o crescimento interrompido.

A fonte de luz utilizada nos ensaios desta dissertação foi lâmpada fluorescente de 800 Lúmens, a qual não provoca ressecamento dos substratos, pois não gera quantidades elevadas de calor que possam provocar gradientes térmicos significativos no interior da câmara DBO. O que pôde ser visualizado foi um aumento na superfície esverdeada o que indica um aumento no metabolismo fúngico, o qual provoca uma aceleração na absorção de água para desenvolver os conídios. Neste processo ocorre a produção de melanina, pigmentação importante na proteção das estruturas fúngicas, principalmente no período de esporulação.

Matos (1983) observou que a luz contínua aumenta a esporulação de *M. anisopliae*, enquanto que a sua ausência incentiva o desenvolvimento micelial e a luz alternada produz efeitos intermediário aos outros dois tratamentos. Outros estudos demonstraram a necessidade de uma iluminação ao longo de 144 horas para se obter uma esporulação abundante (MATTA E OLIVEIRA, 1978; MATOS, 1983).

Os ensaios com o farelo de arroz foram conduzidos apenas no fotoperíodo escuro, sendo os resultados apresentados na Tabela 4.4. Considerando-se que o preço de mercado do farelo é praticamente o mesmo da quirera e que há uma etapa adicional de mistura do farelo ao bagaço, não parece ser interessante o uso deste substrato, uma vez que a quantidade de conídios produzida é praticamente igual à do arroz tipo 1 nas mesmas condições. A adição de bagaço de cana-de-açúcar ao farelo não resultou em aumento na produção de conídios, o que poderia ser esperado devido ao aumento da porosidade do meio, melhorando as condições de aeração.

**Tabela 4.4:** Produção de conídios no substrato farelo de arroz

| <i>Composição do substrato</i> | <i>Quantidade de conídio x 10<sup>8</sup>/mL</i> |
|--------------------------------|--|
| 10 g                           | 6,08 ± 0,69                                      |
| 10 g + 1 g de bagaço           | 6,00 ± 2,50                                      |
| 10 g + 2 g de bagaço           | 3,88 ± 1,70                                      |
| 10 g + 3 g de bagaço           | 2,80 ± 0,56                                      |

#### 4.4 Ampliação de escala em embalagens de polipropileno de maior dimensão

A Tabela 4.5 apresenta os resultados da concentração de conídios em arroz tipo 1 produzidos em ausência de luz, para condições de repouso durante os dez dias de cultivo e de manipulação do meio a partir do quinto dias de fermentação. Embora haja diferenças expressivas nas médias para os tratamentos empregados, a dispersão dos resultados é grande, de modo que não há diferença significativa entre as médias. Em geral, os resultados são inferiores para o material manipulado, o que em termos de produção industrial é um resultado positivo, pois evita a necessidade de se manipular o material diariamente.

Comparando-se os resultados entre as embalagens de pequena capacidade, 10 g, com os de maior capacidade, 500 g, nota-se que as médias das concentrações de conídios para arroz tipo 1 não diferem estatisticamente, enquanto que as médias para quireira diferem a um nível de 95% de significância, tanto para o tratamento escuro quanto para o claro. Possivelmente o meio de cultivo com quireira de arroz formou poros mais estreitos, dificultando a circulação de ar e comprometendo as atividades metabólicas do fungo, uma vez que menos circulação de ar significa mais dificuldade de remoção do calor gerado metabolicamente e baixo fornecimento de O<sub>2</sub> e remoção deficiente de CO<sub>2</sub>.

**Tabela 4.5:** Concentração de conídios em embalagens de maior dimensão com substrato arroz tipo 1, nas condições em repouso e manipulada durante o período de fermentação (\*).

| <i>Fotoperíodo</i> | Repouso                        |                             | Manipulado a partir do 5º dia  |                             |
|--------------------|--------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
|                    | Média<br>(10 <sup>8</sup> /mL) | DP<br>(10 <sup>8</sup> /mL) | Média<br>(10 <sup>8</sup> /mL) | DP<br>(10 <sup>8</sup> /mL) |
| Escuro             | 3,63 <sup>a</sup>              | 2,49                        | 2,21 <sup>a</sup>              | 1,15                        |
| Claro              | 5,39 <sup>a</sup>              | 4,91                        | 3,44 <sup>a</sup>              | 2,02                        |

(\*) Médias seguidas de letras iguais indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tuckey a 95% de índice de significância.

**Tabela 4.6:** Médias das concentrações de conídios ( $10^8/\text{mL}$ ) produzidos em embalagens plásticas contendo 10 g e 500 g de arroz e quirera para os tratamentos claro e escuro

|         |        | Embalagem de 10 g |      | Embalagem de 500 g |      |
|---------|--------|-------------------|------|--------------------|------|
|         |        | Média             | DP   | Média              | DP   |
| Arroz   | Escuro | 5,72 <sup>a</sup> | 0,81 | 3,63 <sup>a</sup>  | 2,49 |
|         | Claro  | 6,84 <sup>a</sup> | 0,74 | 5,39 <sup>a</sup>  | 4,91 |
| Quirera | Escuro | 6,65 <sup>a</sup> | 1,04 | 1,43 <sup>b</sup>  | 0,83 |
|         | Claro  | 7,71 <sup>a</sup> | 0,7  | 2,27 <sup>b</sup>  | 0,7  |

Com relação aos nutrientes presentes nos dois substratos, de acordo com Storck (2004) e Generoso et al. (2008), pode-se observar que o único nutriente cujo valor difere expressivamente é a Fibra a qual se encontra em quantidade maior no arroz branco, o que pode ter influenciado a estrutura do meio de cultivo após o processo de autoclavagem, uma vez que o arroz se apresentou pouca modificação, apenas um pequeno amolecimento dos grãos, enquanto a quirera apresentou maior amolecimento, provocando aglomeração dos grãos. Tal característica provavelmente dificultou a circulação de ar nas embalagens de maior capacidade.

Na Tabela 4.7 são apresentados os resultados da análise de Tuckey dos resultados obtidos na fermentação do fungo *Metarhizium* em escala ampliada, relacionando os substratos arroz tipo 1 e quirera e a condicionante em repouso e manipulado a qual a fermentação em arroz tipo 1 foi submetido.

**Tabela 4.7:** Análise estatística dos resultados obtidos na fermentação do fungo *Metarhizium* em escala ampliada nos substratos arroz tipo 1 e quirera

| Fonte           |                      | Grau de Liberdade | Soma dos quadrados dos resíduos | Quadrado médio | Estatística de Fisher calculada | Probabilidade |
|-----------------|----------------------|-------------------|---------------------------------|----------------|---------------------------------|---------------|
| Substrato       | Condição             |                   |                                 |                |                                 |               |
| Arroz           | repouso e manipulado | 1                 | 0,266                           | 0,266          | 0,52                            | 0,512         |
| Arroz e Quirera | repouso              | 1                 | 1,115                           | 1,115          | 2,20                            | 0,212         |

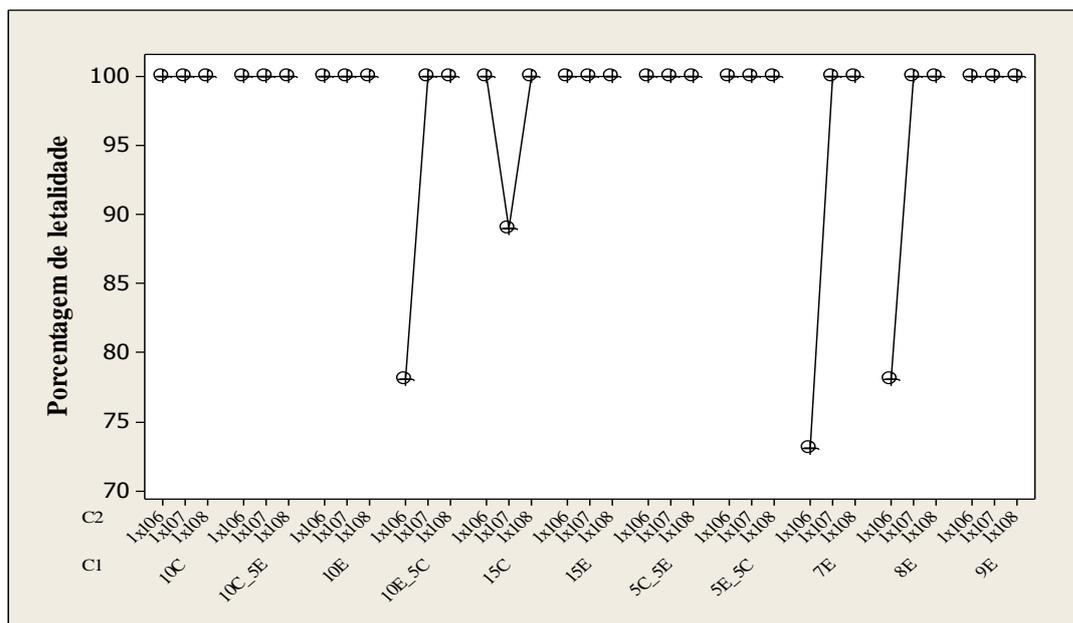
De acordo com os dados obtidos na análise, pode-se observar que a fermentação ocorrida no substrato arroz tipo 1 nas condicionantes em repouso e manipulado são iguais estatisticamente, resultado relevante ao se considerar os gastos em termos de produção industrial designados a manipulação das embalagens plásticas durante o período de fermentação o qual foi comprovado nesta análise laboratorial, desnecessários.

Com relação ao emprego do substrato quirera, as análises estatísticas também foram iguais, resultado este de grande importância em termos de produção industrial, pois o substrato quirera possui um preço de mercado inferior ao arroz tipo 1. Desta forma, sugere-se análises em ambiente industrial para verificar se a tendência dos resultados serão equivalentes de acordo com o método de produção em uma biofábrica.

#### 4.5 Teste de virulência

De acordo com dados obtidos por aplicação dos esporos de fungo sobre *D. flavipennella*, com esporos provenientes das diferentes condições de cultivo, que podem ser observados na Figura 4.4, a maioria dos tratamentos atingiram 100% de efetividade em um período inferior a dez dias, sendo que os tratamentos com maior concentração de esporos foram mais eficazes.

Figura 4.4: Porcentagem de letalidade das lagartas de broca de cana-de-açúcar (*D. flavipennella*) de acordo com o fotoperíodo utilizado na produção dos esporos e a concentração de conídios da solução borrifada.



A Tabela 4.8 apresenta a análise de variância a 95% de índice de significância relacionando o fotoperíodo utilizado na produção dos conídios e a concentração de conídios utilizado na preparação da solução empregada nas lagartas de broca de cana-de-açúcar (*D. flavipennella*).

**Tabela 4.8:** Análise de Tuckey da letalidade das lagartas de broca de cana-de-açúcar (*D. flavipennella*) relacionada com as concentrações de esporos utilizados como tratamento e a qualidade do esporo na letalidade produzido por diferentes fotoperíodos

| <i>Fonte</i>                                      | <i>Grau de Liberdade</i> | <i>Soma dos quadrados dos resíduos</i> | <i>Quadrado médio</i> | <i>Estatística de Fisher calculada</i> | <i>Probabilidade</i> |
|---|--------------------------|--|-----------------------|--|----------------------|
| Concentração de esporos                           | 2                        | 0,2276                                 | 0,01138               | 2,30                                   | 0,118                |
| Esporos produzidos no escuro                      | 4                        | 0,02423                                | 0,00606               | 0,75                                   | 0,578                |
| Esporos produzidos no claro                       | 1                        | 0,01827                                | 0,01827               | 4,53                                   | 0,100                |
| Esporos produzidos em alternância de 10 dias      | 1                        | 0,000067                               | 0,000067              | 0,20                                   | 0,678                |
| Esporos produzidos em alternância de 15 dias      | 1                        | 0,0000000                              | 0,0000000             | *                                      | *                    |
| Esporos produzidos 10 dias escuro e 10 dias claro | 1                        | 0,00206                                | 0,00206               | 1,00                                   | 0,374                |
| Esporos produzidos 15 dias escuro e 15 dias claro | 1                        | 0,03259                                | 0,03259               | 16,49                                  | 0,015                |

**Tabela 4.9:** Porcentagem de letalidade das lagartas de broca de cana-de-açúcar (*D. flavipennella*) acumulada por dia de exposição aos conídios de *M. anisopleae* na concentração de  $1 \times 10^6$  conídios/mL

| <i>Dia</i> | <i>7º dia</i> | <i>8º dia</i> | <i>9º dia</i> | <i>10º dia</i> | <i>C- 10d</i> | <i>C- 15d</i> | <i>E- 15d</i> | <i>5E_5 C</i> | <i>5C_5 E</i> | <i>10E_5 5C</i> | <i>10C_5 5E</i> |
|------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-----------------|-----------------|
| 1          | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,0            | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,0             | 0,0             |
| 2          | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,0            | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,0             | 0,0             |
| 3          | 2,2           | 6,7           | 11,1          | 0,0            | 0,0           | 0,0           | 8,9           | 0,0           | 2,2           | 0,0             | 0,0             |
| 4          | 20,0          | 24,4          | 24,4          | 24,4           | 6,7           | 13,3          | 20,0          | 8,9           | 13,3          | 24,4            | 8,9             |
| 5          | 31,1          | 37,8          | 28,9          | 31,1           | 26,7          | 20,0          | 40,0          | 26,7          | 40,0          | 44,4            | 24,4            |
| 6          | 44,4          | 44,4          | 40,0          | 42,2           | 33,3          | 33,3          | 46,7          | 53,3          | 60,0          | 46,7            | 46,7            |
| 7          | 55,6          | 51,1          | 55,6          | 55,6           | 51,1          | 60,0          | 68,9          | 75,6          | 66,7          | 73,3            | 66,7            |
| 8          | 62,2          | 71,1          | 73,3          | 75,6           | 71,1          | 66,7          | 82,2          | <u>91,1</u>   | 75,6          | 88,9            | 75,6            |
| 9          | 68,9          | 77,8          | <u>91,1</u>   | <u>93,3</u>    | 88,9          | 80,0          | <u>100,0</u>  | <u>95,6</u>   | 84,4          | <u>95,6</u>     | <u>93,3</u>     |
| 10         | 73,3          | 77,8          | <u>100,0</u>  | <u>100,0</u>   | 88,9          | 88,9          | <u>100,0</u>  | <u>95,6</u>   | 97,8          | <u>100,0</u>    | <u>100,0</u>    |

**Tabela 4.10:** Porcentagem de letalidade das lagartas de broca de cana-de-açúcar (*D. flavipennella*) acumulada por dia de exposição aos conídios de *M. anisopleae* na concentração de  $1 \times 10^7$  conídios/mL

| <i>Dia</i> | <i>7º dia</i> | <i>8º dia</i> | <i>9º dia</i> | <i>10º dia</i> | <i>C- 10d</i> | <i>C- 15d</i> | <i>E- 15d</i> | <i>5E_5 C</i> | <i>5C_5 E</i> | <i>10E_5 5C</i> | <i>10C_5 5E</i> |
|------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-----------------|-----------------|
| 1          | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,0            | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,0             | 0,0             |
| 2          | 0,0           | 11,1          | 0,0           | 0,0            | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,0             | 0,0             |
| 3          | 13,3          | 20,0          | 20,0          | 15,6           | 6,7           | 8,9           | 20,0          | 20,0          | 15,6          | 28,9            | 6,7             |
| 4          | 31,1          | 26,7          | 28,9          | 22,2           | 11,1          | 24,4          | 35,6          | 33,3          | 35,6          | 53,3            | 40,0            |
| 5          | 31,1          | 40,0          | 37,8          | 33,3           | 22,2          | 40,0          | 46,7          | 55,6          | 42,2          | 62,2            | 51,1            |
| 6          | 48,9          | 42,2          | 55,6          | 46,7           | 44,4          | 44,4          | 60,0          | 73,3          | 57,8          | 71,1            | 62,2            |
| 7          | 66,7          | 62,2          | 64,4          | 66,7           | 48,9          | 46,7          | 73,3          | <u>95,6</u>   | 68,9          | <u>91,1</u>     | 80,0            |
| 8          | 77,8          | 77,8          | 77,8          | 77,8           | 75,6          | 68,9          | 88,9          | <u>100,0</u>  | 86,7          | <u>100,0</u>    | <u>93,3</u>     |
| 9          | 82,2          | <u>93,3</u>   | 82,2          | 88,9           | 82,2          | 88,9          | <u>100,0</u>  | <u>100,0</u>  | <u>97,8</u>   | <u>100,0</u>    | <u>97,8</u>     |
| 10         | <u>100,0</u>  | <u>100,0</u>  | <u>100,0</u>  | <u>100,0</u>   | <u>100,0</u>  | 88,9          | <u>100,0</u>  | <u>100,0</u>  | <u>100,0</u>  | <u>100,0</u>    | <u>100,0</u>    |

**Tabela 4.11:** Porcentagem de letalidade das lagartas de broca de cana-de-açúcar (*D. flavipennella*) acumulada por dia de exposição aos conídios de *M. anisopleae* na concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/mL

| <i>Dia</i> | <i>7º dia</i> | <i>8º dia</i> | <i>9º dia</i> | <i>10º dia</i> | <i>C- 10d</i> | <i>C- 15d</i> | <i>E- 15d</i> | <i>5E_5 C</i> | <i>5C_5 E</i> | <i>10E_5 5C</i> | <i>10C_5 5E</i> |
|------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-----------------|-----------------|
| 1          | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,0            | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,0           | 0,0             | 0,0             |
| 2          | 42,2          | 44,4          | 44,4          | 8,9            | 8,9           | 20,0          | 20,0          | 4,4           | 0,0           | 0,0             | 0,0             |
| 3          | 44,4          | 53,3          | 55,6          | 11,1           | 13,3          | 24,4          | 20,0          | 22,2          | 20,0          | 28,9            | 8,9             |
| 4          | 48,9          | 66,7          | 66,7          | 33,3           | 20,0          | 33,3          | 24,4          | 44,4          | 33,3          | 48,9            | 35,6            |
| 5          | 57,8          | 77,8          | 73,3          | 44,4           | 33,3          | 33,3          | 31,1          | 68,9          | 53,3          | 73,3            | 66,7            |
| 6          | 66,7          | 82,2          | 77,8          | 46,7           | 37,8          | 40,0          | 46,7          | <u>91,1</u>   | 68,9          | 75,6            | 80,0            |
| 7          | 77,8          | 88,9          | 88,9          | 82,2           | 77,8          | 71,1          | <u>93,3</u>   | <u>97,8</u>   | 77,8          | <u>91,1</u>     | <u>93,3</u>     |
| 8          | 77,8          | <u>97,8</u>   | 88,9          | 88,9           | 80,0          | 77,8          | <u>100,0</u>  | <u>100,0</u>  | 86,7          | <u>100,0</u>    | <u>100,0</u>    |
| 9          | 86,7          | <u>100,0</u>  | 88,9          | 88,9           | <u>91,1</u>   | 77,8          | <u>100,0</u>  | <u>100,0</u>  | <u>100,0</u>  | <u>100,0</u>    | <u>100,0</u>    |
| 10         | <u>100,0</u>  | <u>100,0</u>  | <u>100,0</u>  | <u>100,0</u>   | <u>100,0</u>  | 77,8          | <u>100,0</u>  | <u>100,0</u>  | <u>100,0</u>  | <u>100,0</u>    | <u>100,0</u>    |

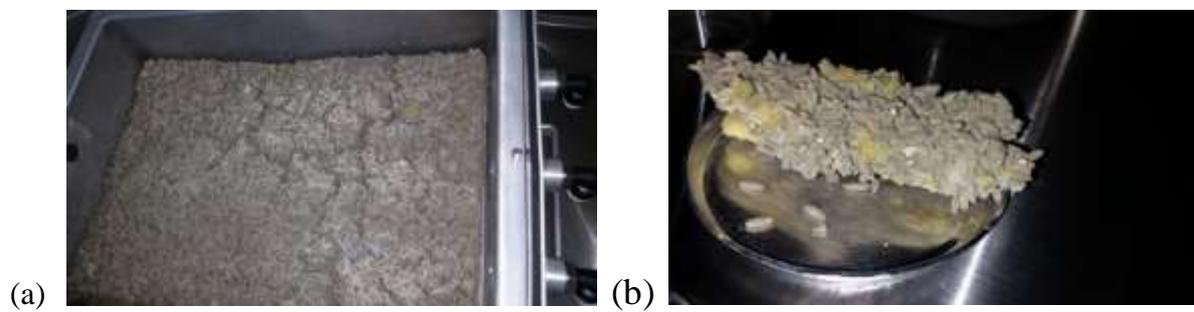
Estatisticamente os resultados são iguais, mesmo sendo observada uma tendência do tratamento com concentração a  $1 \times 10^6$  esporos/mL ser inferior aos tratamentos de concentração  $1 \times 10^7$  e  $1 \times 10^8$  esporos/mL conforme as Tabelas 4.9, 4.10 e 4.11, nas quais são demonstradas a letalidade das lagartas de broca de cana-de-açúcar por meio da porcentagem da letalidade acumulada por dia de exposição da lagarta aos conídios do fungo. Nota-se ainda que há uma tendência de menor letalidade para conídios produzidos com sete dias de cultivo. A virulência do microrganismo está relacionada com o amadurecimento dos conídios, uma vez que durante o processo de crescimento e desenvolvimento do microrganismo ocorre inicialmente a formação da colônia para posterior formação das estruturas de reprodução. Assim, suspeitou-se que os conídios produzidos nos estágios iniciais do cultivo não teriam armazenado os nutrientes em concentrações suficientes para que pudessem germinar satisfatoriamente ao encontrar o hospedeiro. Devido à grande dispersão dos resultados, não foi possível a comprovação estatística desta suposição, sendo necessários estudos mais intensivos para sua melhor avaliação.

Considerando-se que a partir do 8º dia de cultivo há 100% de letalidade na maior quantidade dos tratamentos, a decisão de cultivar os fungos por período superior deve ser decidida pela concentração de conídios. Como verificado na seção 4.2 desta dissertação, a quantidade de conídios produzidos tendem a estabilizar-se após o 9º dia de cultivo.

#### 4.6 Ensaios em Biorreator de Bandeja

Visualmente, não foi observado ressecamento da superfície do meio de cultivo, o que poderia ocorrer caso o ar não estivesse saturado na entrada do fermentador. O constante fluxo de ar permitiu a troca de gases e de calor produzido dentro do biorreator, proporcionando crescimento uniforme em toda a espessura da camada de substrato como mostra a Figura 4.5.

Figura 4.5: Fotografia da superfície do biorreator de bandeja carregado com 1kg de arroz tipo 1 após fermentação (a) e uniformidade das colônias na espessura do meio de cultivo (b).



A quantidade de conídios produzidos com cargas de substrato de 1 kg e 2 kg de arroz tipo 1 mostram que o biorreator conseguiu oferecer condições adequadas para o crescimento fúngico com altura de 4 cm de camada de substrato como pode ser observado na Tabela 4.10, devido à aeração e troca de calor adequadas.

**Tabela 4.12:** Produção de conídios em diferentes pesagens do substrato arroz tipo 1.

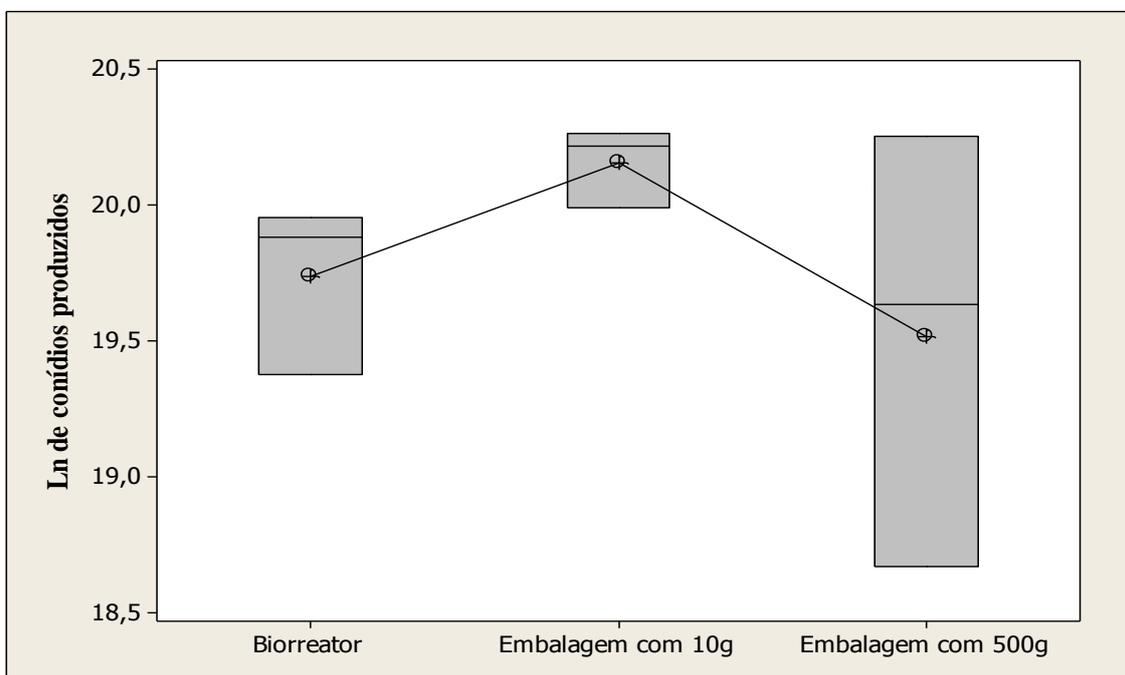
| <i>Massa de substrato (kg)</i> | <i>Produção de conídios <math>\times 10^8</math></i> | <i>Altura do substrato na caixa</i> |
|--------------------------------|--|-------------------------------------|
| 1                              | $3,62 \pm 1,44$                                      | 2 cm                                |
| 2                              | 3,32   | 4 cm                                |

Os testes no biorreator foram comparados à produção em embalagem plástica de arroz tipo 1 com intuito de se avaliar a eficiência de produção em biorreator. Os resultados obtidos no biorreator podem ser visualizados na Tabela 4.13.

**Tabela 4.13:** Resultado obtido na fermentação nos três tipos de recipientes utilizados

| <i>Recipiente</i>                             | <i>Quantidade de conídios/mL</i> |
|---|----------------------------------|
| Embalagem plástica de escala ampliada - 500 g | $3,62 \times 10^8$               |
| Embalagem plástica de escala menor – 10 g     | $6,32 \times 10^8$               |
| Biorreator de bandeja – 1 kg                  | $3,62 \times 10^8$               |
| Biorreator de bandeja – 2 kg                  | $3,32 \times 10^8$               |

Figura 4.6: Comparativo estatístico da produção de conídios do fungo *Metarhizium anisopliae* em diferentes escalas



Através da análise de Tuckey destes dados foi possível observar que os valores obtidos são estatisticamente iguais comprovando que o biorreator de bandeja desenvolvido apresentou bom desempenho em termos de produção de conídios, quando comparado com os resultados obtidos em embalagem plástica de maior dimensão. De acordo com a estrutura elaborada, o biorreator permite o aumento na sua capacidade de produção, favorecido pela sua praticidade operacional e a exigência de pouco espaço físico para a sua acomodação, quesito este contrário a produção em embalagens plástica, que requer estrutura ampla para acomodação das embalagens em prateleiras.

## 5 CONCLUSÕES

Os objetivos propostos para este trabalho foram atingidos, uma vez que foram identificadas as condições mais favoráveis à produção dos conídios de *Metarhizium anisopliae* e que o biorreator de bandeja desenvolvido foi capaz aumentar a escala de produção.

As principais conclusões que podem ser destacadas são

- A produção na ausência de luz é estatisticamente eficiente, produzindo quantidade considerável de conídios tanto em escala de menor capacidade, quanto na de maior, possuindo ação de virulência estatisticamente igual aos outros fotoperíodos. Fator este importante numa produção industrial onde não seria necessário manter o cultivo em ambientes iluminados, como ocorre nos dias atuais, permitindo uma economia em gastos com energia elétrica.
- A produção de conídios se torna estável a partir do 9º dia de crescimento fúngico e seus conídios estão aptos para o processo de adesão e invasão do inseto hospedeiro, ficando a critério do fabricante determinar sua eficácia através da concentração de conídios em solução, resultado este importante para viabilizar uma produção em escala industrial.
- Outro fator importante para uma produção industrial é o fator de manipular o substrato durante o período de cultivo o qual foi comprovado estatisticamente ação desnecessária e, até mesmo prejudicial ao desenvolvimento fúngico.
- O cultivo em embalagens com pouco substrato produz mais conídios do que em embalagens com maior quantidade de substrato, devido a melhores condições de troca de calor, fator este melhor observado na utilização do substrato quísera que apresentou melhores resultados na produção em embalagens de menor capacidade e pode ser considerado uma opção de substrato estatisticamente viável.
- E a utilização do biorreator de bandeja, que apresentou resultados consideráveis para produção em escala ampliada, principalmente por ser uma alternativa de maior praticidade.

## 6 BIBLIOGRAFIAS CITADAS

ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A.B. Microorganismos no controle de pragas. In: PINTO, A.S.; NAVA, D.E.; ROSSI, M.M.; MALERBO-SOUZA, D. T. Controle Biológico de pragas: na prática. Cap. 3, p.35-44. Piracicaba: CP2, 2006.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos In: ALVES, S. B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ, p.289-381, 1998.

ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M.; LOPES, R. B.; TAMAI, M. A. Use of Entomopathogenic Fungi in Latin America. *Advances in Microbial Control of Insect Pests*. pp 193-211. 2003.

ALVES, S. B.; LOPES, R. B.; VIEIRA, S. A.; TAMAI, M. A. Fungos Entomopatogênicos usados no controle de pragas na América latina, p.69-110. In ALVES, S. B.; LOPES, R. B. Controle microbiano de pragas na América Latina. Piracicaba, Fealq, 414p. 2008.

ARTHUR, S., THOMAS, M.B., LANGEWALD, J. Field observations of the effects of fenitrothion and *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* on non-target ground dwelling arthropods in the Sahel. *Biol. Cont.* 26, p. 333–340, 2003.

ASHLEY, V. M., MITCHELL, D. A.; HOWES, T. Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid-state fermentation in packed beds bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, v. 3, p. 141-150, 1999.

BALBO JÚNIOR, W.; MOSSIM, G. C. Ocorrência e tentativa de controle de pragas em cana-de-açúcar na Usina Santo Antônio. In: *Semana da cana-de-açúcar de Piracicaba*, 4. Piracicaba, 1999: AFOCAPI, p. 40-42, 1999.

BARBOSA, J.T.; RISCADO, G.M.; LIMA FILHO, M. Flutuação populacional da cigarrinha da cana-de-açúcar e seus inimigos naturais em Campos, RJ, em 1977. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Piracicaba, v. 8, n. 1, p. 39-46, 1979.

BEYS DA SILVA, W. O.; SANTI, L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in Rhipicephalus (Boophilus) microplus infection. *Fungal Biology*, Cambridge, v. 114, p. 10-15, 2010.

BOTELHO, P.S.M.; MENDES, A.C.; MACEDO, N.; SILVEIRA NETO, S. Curva populacional de *Mahanarva fimbriolata* em Araras - SP, e sua dependência com o balanço hídrico da região. *Brasil Açucareiro*, v.90, p.11-17, 1977.

BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; MESSIAS, C. L.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D.W. Effects of UV-B irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: a study of reciprocity and recovery. *Photochemistry and Photobiology*, Amsterdam, v.72, p.140-146, 2001a

BRAGA, G.U. L.; RANGEL, D. E. N.; FLINT, S. D., MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D.W. Damage and recovery from UV-B exposure in conidia of the entomopathogens *Verticillium lecanii* and *Aphanocladium album*. *Mycologia*, v. 94, p. 912-920, 2002.

BRAGA, G.U. L.; RANGEL, D. E. N.; FLINT, S. D., ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D.W. Conidial Pigmentation Is Important to Tolerance Against Solar-simulated Radiation in the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochemistry and Photobiology*, 82: 418–422, 2006.

CASCIATORI, F.P. Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido : ampliação de escala de biorreatores de leito fixo. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2015.

COELHO, M.A.Z. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos, 2007. Disponível em:

[http://www.eq.ufrj.br/biose/nukleo/aulas/Valorizacao/Valor%20Res%20Agroind\\_aula%2003.pdf](http://www.eq.ufrj.br/biose/nukleo/aulas/Valorizacao/Valor%20Res%20Agroind_aula%2003.pdf). Acesso em 10 de setembro de 2008.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento, 2014. Dados sobre projeção e consumo da cana-de-açúcar. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 07/06/2014.

CORRETORA MERCADO, 2015. Cotações encontradas. Disponível em: <http://www.clicmercado.com.br/novo/cotacoes/buscacot.asp>. Acesso em 26/05/2015.

CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; DEAMER, D. W. Hydration dependent phase changes in biological membrane. *Biophysics of water*, p.295-299, 1982.

CUNHA, L. P. da. Desenvolvimento de biorreator de bandeja para produção de esporos do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto. 2016.

DALSENTER, F.D.H. Efeito da temperatura na cinética de crescimento de *Rhizopusoryzae* em fermentação em estado sólido. Tese Doutorado (Ciências Bioquímicas) Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2005.

DINARDO MIRANDA, L.L., ANJOS, I.A., COSTA, V.P. & FRACASSO, J.V. Resistance of sugarcane cultivars to *Diatraea saccharalis*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47: 1-7, 2012.

DRIVER, F; MILNER, RJ; TRUEMAN, WH. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*, v. 104, p. 134-150, 2000.

EL-KADI, M.K. Novas perspectivas no controle de cigarrinhas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 4, Goiânia. Resumos ... Goiânia: SEB, 1977. p. 58-67, 1977.

FARIA, M. R.; WRIGHT S. P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, Amsterdam, v.43, p. 237-256, 2007.

FRANCISCO, E. A. Tolerância de bioinseticidas comerciais a base de *Metarhizium anisopliae* à radiação UV-A e UV-B e efeito do tempo de cultivo dos conídios. 2004. 59 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal, 2004.

FRANCO, M. P. J. Tolerância de conídios às radiações UV-A e UV-B em função do tempo de cultivo de fungos entomopatogênicos. 2005. 42 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal, 2005.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. Entomologia agrícola. Piracicaba: FEALQ, 920 p., 2002.

GENEROSO, R. A. R.; GOMES, P. C.; ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; BARRETO, S. L.T.; BRUMANO, G. Composição química e energética de alguns alimentos para frangos de corte em duas idades. Revista Brasileira de Zootecnia, v.37, n.7, p.1251-1256, 2008.

GUAGLIUMI, P. Cigarrinha da raiz. In: Pragas da cana-de-açúcar: Nordeste do Brasil. Rio de Janeiro: Instituto do Açúcar e do Alcool. p. 69-103. (Coleção Canavieira, 10), 1972-1973.

IGNOFFO, C. M.; GARCIA, C. Influence of conidial color inactivation of several entomogenous fungi (Hyphomycetes) by simulated sunlight. Environmental Entomology, v.21, p.913-917, 1992.

INSTITUTO BIOLÓGICO. Produtos e Processos: Bioinseticidas. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/bioinseticidas.php>. Acessado em: 04/06/2015

JENKINS, M. K., GARSIDE, P., INGULLI, E., MERICA, R.R., JOHSON, J.G., NOELLE, R.J. Visualization of Specific B and T Lymphocyte Interactions in the Lymph Node. Science 3 July 1998: Vol. 281 no. 5373 pp. 96-99.

LAURENTINO, C. L. Transferência de calor em leitos fixos com aplicação em reatores de fermentação em estado sólido. 2007. 105f. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2007.

LEITE, L.G., A. BATISTA FILHO, J.E.M. ALMEIDA & S.B. ALVES. Processos de produção, p. 33-44. In L.G. Leite, A. Batista Filho, J.E.M. Almeida & S.B. Alves. Produção de fungos entomopatogênicos. Ribeirão Preto, Alexandre de Sene Pinto, 92p, 2003.

LIU, Z.Y; LIANG, Z. Q; WHALLEY, A. J. S; YAO, Y. J. & LIU, A. Y. “*Cardyiceps brittle bankisoides*, a new pathogen of grups and its Anarmorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. J. Invertebr. Pathol., 78: 178-182, 2001.

MATOS, A. J. A. Crescimento, germinação, conidiação e resistência a luz ultravioleta de linhagens de *Metarhizium anisopliae*. 1983. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1983.

MATTA, E. A. F. e OLIVEIRA, M. Z. A. Efeito do inseticida Malatol 50E no crescimento do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin “in vitro”. In : Resumos do III Congresso Latino Americano de Entomologia e V Congresso Brasileiro de Entomologia, Bahia, 76 p., 1978.

MATTSSON, J. L. Opinion: Improved food safety requires integration of pest, plant and pesticide interactions. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Berlin, v. 3, n. 8, p. 259-264, 2008.

MENDES, A.C.; BOTELHO, P.S.M.; MACEDO, N.; SILVEIRA NETO, S. Behavior of the adults of the root frog hopper, *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) (Hom., Cercopidae), according to climatic parameters. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANETECHNOLOGISTS CONGRESS, 16., 1977, São Paulo. Proceedings ... São Paulo: ISSCT, 1977. p. 617-631.

MITCHELL, D. A. et al. New developments in solid-state fermentation. II. Rational approaches to the design, operation and scale up of bioreactors. Process Biochemistry, n. 35, p. 1211-1225, 2000.

MITCHELL, D. A.; LONSANE, B.K.; Definition, characteristics and potential. In: DOELLE, H.W.; MITCHELL, D.A.; ROLZ, C.E. Solid Substrate Cultivation. London: Elsevier. 1992. Cap. 1, p. 1-16, 1992.

NAVA, D.E.; PINTO, A. de S.; SILVA, S.D. dos A. e. Controle biológico da broca da cana-de-açúcar. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. 28 p. (Documentos / Embrapa Clima Temperado, 287)

NICHOLSON, W. L.; MUNAKATA, N.; HORNECK, G.; MELOSH, H. J.; SETLOW, P. Resistance of Bacillus endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 64, n. 3, p. 548-572, 2000.

OLIVEIRA, M. A. P.; MARQUES, E. J.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; BARROS, R. Efeito de Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. e Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorok. Sobre características biológicas de Diatraea saccharalis F. (Lepidoptera: Crambidae). Acta Scientiarum Biological Sciences, Maringá, v. 30, n. 2, p. 220-224, 2008.

PEREIRA, R.M., S.B. ALVES & P.R. REIS. Segurança no emprego de entomopatógenos, p.21-38. In S.B. Alves, Controle microbiano de insetos, Piracicaba, Fealq, 2ed., 1163p, 1998.

PEREIRA, M. F. A.; BENEDETTI, R. A. L.; ALMEIDA, J. E. M. Eficiência de Metarhizium anisopliae (Metsch) Sorokin no controle de Deois flavopicta (Stal.,1854), em pastagem de capim (Brachiaria decumbens). Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v. 75, n. 4 , p. 465-469, 2008.

PINTO, A. de S.; GARCIA, J. F.; BOTELHO, P. S. M. Controle biológico de pragas da cana-de-açúcar. In: PINTO, A. de S.; NAVA, D. E.; ROSSI, M. M.; MALERBO-SOUZA, D. T. (Org.). Controle biológico de pragas: na prática. Piracicaba: CP 2, 2006. p. 65-74.

PINTO, A.S. Guia ilustrado de pragas da cana-de-açúcar. Piracicaba, Piracicaba: CP2, 160 p, 2009.

RAGHAVARAO, K.S.M.S; RANGANATHAN, T.V.; KARANTH, N.G. Some engineering aspects of solid-state fermentaio. *Biochem. Eng. J.*, v. 13, p. 127-135, 2003.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Journal of Biotechnology*, V.1, p.1-15, 1998.

RAMACHANDRAN, M., POHEKAR, S.D. Application of multi-criteria decision making to sustainable energy planning—A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. V. 8, p. 365–381, Issue 4, 2004.

REFSTRUP, T. K.; LARSEN, J. C.; MEYER, O. Risk assessment of mixtures of pesticides. Current approaches and future strategies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, New York, v. 56, p. 174-192, 2010.

ROVEDA JR., A. C. Desenvolvimento de biorreator rotativo para fermentação em estado sólido. Monografia apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para a obtenção do título de Bacharel em Química Ambiental, 2008.

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

SILVA, C.C.M., MARQUES, E.J., OLIVEIRA, J.V. & VALENTE, E.C.N.. Preference of the parasitoid *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) for *Diatraea* (Lepidoptera: Crambidae). *Acta Scientiarum: Agronomy*, 34: 23-27, 2012.

SILVA, R.A.. Estudo de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok: Toxicidade a compostos extraídos de *Tibraca limbativentris* Stal (Heteroptera: Pentatomidae), efeitos de agroquímicos utilizados na cultura do arroz e aumento da patogenicidade a *T. limbativentris* com doses subletais de inseticidas químicos. Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, para a obtenção do título de Doutor em Química, 2012.

SILVA, Valda C.A. et al . Suscetibilidade de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) aos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.)

Sorok. **Neotrop. Entomol.**, Londrina , v. 32, n. 4, p. 653-658, Dec. 2003 . Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1519-566X2003000400016&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-566X2003000400016&lng=en&nrm=iso)>. Access on 23 Nov. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2003000400016>.

SOCCOL C.R. Physiologie et Métabolisme de *Rhizopus* en Culture Solide et Submergée en Relation Avec la Dégradation d'Amidon et la Production d'Acide L(+) Lactique. Thèse de Doctorat. Mention Génie enzymatique, Bioconversion et Microbiologie, Université de Technologie de Compiègne. Compiègne-France, p. 218, 1992.

ST LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, San Diego, v. 58, p. 415-426, 1991.

ST LEGER, R. J.; DURRANDS, P. K.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology*, San Diego, v. 52, p. 285-293, 1988.

STORCK, C. R. Uso dietético do arroz, de acordo com variações de medida de interesse nutricional, 2003, 109 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia dos Alimentos) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

TEIXEIRA, H.; CHITARRA, L. G.; ARIAS, S. M. S.; MACHADO, J. da C. Efeito de diferentes fontes de luz no crescimento e esporulação in vitro de fungos fitopatogênicos. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.25, n.6, p.1314-1320, nov./dez., 2001.

TONUS, M. Manejo integrado controla cigarrinhas em pastagens. *Revista Balde Branco*, São Paulo, n. 421, 1999.

WANG, C.; TYPAS, M.A.; BUTT, T.M. Detection and characterization of pr1 virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 213, p. 251-255, 2002.

WENZEL, I.M., F.H.C. GIOMETTI & J.E.M. ALMEIDA. Patogenicidade do isolado IBCB 66 de *Beauveria bassiana* à broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* em condições de laboratório. *Arquivos do Instituto Biológico*, 73: 259-261, 2006.

ZHAO, S. Cost-effective production of *Bacillus licheniformis* using simple netting bag solid bioreactor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, p. 2859 – 2863, 2008.

## **TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA**

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 03/06/2016

---

Assinatura do autor