



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

Lucas Portilho da Cunha

**Aspectos de engenharia da produção do fungo entomopatogênico
Metarhizium anisopliae em biorreator de bandeja.**

São José do Rio Preto
2016.

Lucas Portilho da Cunha

**Aspectos de engenharia da produção do fungo entomopatogênico
Metarhizium anisopliae em biorreator de bandeja.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de concentração Engenharia de Alimentos, 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
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Perpétua Casciotori

São José do Rio Preto

2016.

Lucas Portilho da Cunha

**Aspectos de engenharia da produção do fungo entomopatogênico
Metarhizium anisopliae em biorreator de bandeja.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de concentração Engenharia de Alimentos, 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.^a Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
UNESP – São José do Rio Preto

Prof.^a Dr. Fabio Bentes Freire
UFSCar – São Carlos

São José do Rio Preto
28 de março de 2016.

**“Dedico este trabalho primeiramente a Deus, e a minha esposa,
que esteve ao meu lado me apoiando totalmente em todos os momentos”.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me proporcionar oportunidades únicas, por permitir que acontecimentos extraordinários como ser um Mestrando acontecesse em minha vida, e de uma forma inesperada.

Quero deixar aqui registrado a minha enorme e imensa gratidão pela minha esposa, que por vários momentos, quando pensei em desistir, ela me apoiou e me impulsionou a continuar na batalha. Foi minha auxiliadora, conselheira, ajudadora e principalmente minha encorajadora. Se chequei até aqui devo muito isso a ela, a minha querida que nunca desistiu de mim.

Outro alguém essencial, para que eu chegasse até esse momento, é meu orientador Prof. Dr. João Claudio Thoméo, que não mediu esforços para me ajudar a chegar aqui com seus conselhos, ensino e principalmente pela paciência em todos os sentidos, ele foi como um “Pai”.

Também quero agradecer a minha co-orientadora Prof. Dr^a. Fernanda Perpétua Casciotori, que me ensinou coisas novas com paciência, mesmo à distância, e se dedicou a este trabalho com muito afinco, sem medir esforços para me auxiliar em tudo que eu precisei.

Quero deixar aqui registrado o meu enorme carinho e afeto por meu tio Prof. Ms Adauto Nunes da Cunha que não somente acreditou mais também apoio e incentivou de várias maneiras, para que hoje tivesse interesse nos estudos. Como o primeiro da família a possuir um diploma e que hoje tem uma carreira brilhante, é um orgulho tê-lo como tio e um exemplo a ser seguido.

Quero agradecer ao IBILCE/UNESP por fornecer toda condição de trabalho para realização deste trabalho.

*“Mas buscai primeiro o seu reino e a sua justiça,
e todas estas coisas vos serão acrescentadas”
(Bíblia Sagrada, Mateus 6:33)*

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de um biorreator de bandeja capaz de produzir esporos do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Para esse fim, foi utilizado um biorreator de bandeja para a produção de esporos, que por sua vez foi avaliada em função da carga de substrato empregada. As variações de temperatura no biorreator foram simuladas e observadas experimentalmente. Para o desenvolvimento do biorreator, inicialmente foram realizados ensaios em embalagens plásticas contendo 10g e 500g de substrato, de modo a avaliar como o aumento da carga de meio fermentativo poderia influenciar na produção de esporos. Nestes ensaios, foram medidas as temperaturas no centro geométrico das embalagens e a elevação de temperatura foi relacionada à produção de esporos. Realizou-se uma análise de área superficial do arroz tipo 1 e da quirera de arroz para avaliar a interferência desta propriedade na produção de esporos. A partir dos resultados em embalagens plásticas foram realizados experimentos em um biorreator de 40 cm de comprimento, 29 cm de largura por 12 cm de altura, escoando ar sobre as partículas no sentido da maior dimensão. Foram empregadas cargas de 1, 2 e 3kg de arroz tipo 1, correspondente à altura de leito de 2, 4 e 6 cm, respectivamente, e 1 kg de quirera, correspondendo a 2 cm de altura. A temperatura nas posições de entrada e saída de ar e no meio geométrico do meio de cultivo foram medidas ao longo dos ensaios. A fermentação nas embalagens plásticas e no biorreator foram realizadas a 28°C. Para estimar a geração de calor metabólico do meio de cultivo, foram coletados dados de consumo de O₂ e liberação de CO₂ durante o período de incubação. Para tal, foi realizada a fermentação em um biorreator de leito empacotado cilíndrico, sendo os gases provenientes do leito e conduzidos a um analisador de gases. Foi proposto um modelo matemático unidimensional, capaz de prever os perfis de temperatura e o crescimento fúngico ao longo do processo em qualquer posição do biorreator. Os resultados experimentais em embalagens plásticas e no biorreator mostraram que menores quantidades de substrato são favoráveis à maior estabilidade da temperatura do meio de cultivo, resultando em maiores quantidades de esporos. No teste de área superficial, foi possível observar um aumento na área da quirera de arroz e conseqüentemente aumento da quantidade de esporos. Nos testes de cinética de crescimento, pode-se observar que o consumo de O₂ é baixo comparado a outros fungos. Os dados de simulação não demonstraram sobreaquecimento do meio de cultivo no biorreator com o aumento de carga, o que não afetaria a produção de esporos. Também pode-se observar com os dados de simulação que a

temperatura da superfície do meio de cultivo não sofreu sobreaquecimento. Porém, com os dados experimentais, foi possível observar um sobreaquecimento no meio de cultivo, em virtude da geração de calor metabólico. Os dados experimentais demonstraram que os melhores resultados obtidos no biorreator, para produção de esporos do fungo *Metarhizium anisopliae*, foram com cargas de 1 Kg, correspondente a 2 cm de altura de substrato e que com cargas maiores os perfis de temperatura apresentaram elevado aquecimento no meio de cultivo.

Palavras-chaves: *Metarhizium anisopliae*. Biorreator de bandeja. Cinética de crescimento.

ABSTRACT

This study aimed to develop a bioreactor tray capable of producing spores of the fungus *Metarhizium anisopliae* entomopathogenic. To this end, we used a tray bioreactor for the production of spores, which in turn was evaluated according to the employed substrate load. Temperature variations in the bioreactor were simulated and observed experimentally. For the development of bioreactor assays were carried out in plastic bags containing substrate 10g and 500g in order to evaluate how increasing fermentative medium loading could influence the production of spores. In these tests we measured the temperature at the geometric center of the packages and the temperature rise was related to spore production performed -. A surface area analysis of rice Type 1 and broken rice to evaluate the interference at this property in the production of spores. From the results in plastic containers experiments were performed in a bioreactor of 40 cm long, 29 cm wide by 12 cm, air flowing onto the particles in the direction of the largest dimension. Loads were applied to 1, 2 and 3 kg of rice type 1, corresponding to the bed height of 2, 4 and 6 cm, respectively, and 1 kg of grits, corresponding to 2 cm. The temperature at the inlet position and the air outlet and the geometric mean of the culture medium were measured throughout the tests. Fermentation in plastic packaging and the bioreactor were carried out at 28 C. To estimate the generation of metabolic heat of culture medium were collected consumption data The O₂ and CO₂ release during the incubation period. To this end, the fermentation was performed in a bioreactor cylindrical packed bed, and the gases from the bed and driven to a gas analyzer. A one-dimensional mathematical model capable of predicting the temperature profile and fungal growth during the process at any position of the bioreactor is proposed. The experimental results in plastic bottles and bioreactor showed that smaller amounts of substrate are conducive to increased stability of the temperature of the medium, resulting in larger amounts of spores. In the test surface area, it was possible to observe an increase in the area of rice grits and therefore increasing the amount of spores. In the growth kinetics tests, it can be seen that the O₂ consumption is low compared to other fungi. Simulation data showed no overheating of the culture medium in the bioreactor with the increased load, which would not affect the production of spores. It can also be observed with the simulation data as the temperature of the surface of the medium has not suffered overheating. However, with the experimental data, it was possible to observe overheating in the culture medium by virtue of the generation of metabolic heat. The experimental data show that the best results obtained in

the bioreactor for the production of *Metarhizium anisopliae* spores of the fungus were to loads of 1 kg, corresponding to 2 cm substrate height and with larger loads temperature profiles showed high heat in the middle cultivation.

Keywords: *Metarhizium anisopliae*. Bioreactor tray. Growth kinetics.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	OBJETIVOS	14
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1	<i>Metarhizium anisopliae</i> : classificação e descrição	15
3.2	Fatores de cultivo para o fungo <i>Metarhizium anisopliae</i>	17
3.3	Produção industrial de esporos de <i>Metarhizium anisopliae</i>	18
3.4	Fermentação em Estado Sólido (FES)	19
3.5	Biorreatores para fermentação em estado sólido.....	20
3.6	Modelo para biorreator de bandeja	21
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1.	Microrganismo e substrato	23
4.2.	Fermentação em embalagens de polipropileno	23
4.3.	Biorreator de bandeja e descrição do processo de cultivo	25
4.4.	Modelagem e simulação da geração de calor metabólico gerado pelo meio de cultivo em arroz tipo 1.....	27
4.4.	Cinética de crescimento microbiano	32
4.5.	Análise de porosidade do leito	32
4.6.	Área de superficial do arroz e quireira de arroz.....	33
4.7.	Teste de umidade	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
5.1	Temperatura e concentração de esporos em embalagens plásticas.	35
5.2	Temperatura e concentração de esporos no biorreator de bandeja.	38
5.3	Área de superfície do arroz tipo 1 e quireira de arroz	44
5.4.	Umidade do meio de cultivo	46
5.5.	Resultados de modelagem e simulação.	46
5.6.	Cinética de crescimento através do consumo de O ₂	50
6	CONCLUSÕES	53
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	54
8	BIBLIOGRAFIA	55

1. INTRODUÇÃO

Os bioinseticidas adquirem cada vez mais espaço no mercado de defensivos agrícolas e um dos motivos para tal é a busca por uma alimentação com menor concentração de agrotóxicos. Segundo Almeida e Batista Filho (2001), o custo elevado dos inseticidas químicos também contribui para o aumento da produção de bioinseticidas. Como as pragas se tornam resistentes à ação dos inseticidas químicos com o decorrer de aplicações prolongadas, pesquisas para o desenvolvimento de novos produtos biológicos se tornaram necessárias. Segundo Lacey et al. (2015), outro fator relevante para o aumento das pesquisas e do mercado dos bioinseticidas é o impacto da nova legislação Europeia, que restringe o uso de inseticidas químicos, principalmente os que contêm desreguladores endócrinos.

As técnicas para controle biológico de pragas apresentam as seguintes vantagens: especificidade e seletividade, controle duradouro, ocasionado pelo estabelecimento do patógeno em determinada área de cultura, baixa ou nenhuma toxicidade para o ser humano e outros animais, quando selecionados corretamente. As desvantagens são: dificuldade de aplicação, ação lenta e necessidade de maiores cuidados no armazenamento para manter a viabilidade e patogenicidade do microrganismo (ALVES, 1998).

Há diversas aplicações de microrganismos entomopatogênicos em diferentes setores de agronegócios. Um exemplo é a aplicação do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em camas aviárias, que apresenta resultados promissores, para o controle biológico de *Alphitobius diaperinus* (Panzer). Estes insetos são hospedeiros de microrganismos patogênicos às aves, os quais comprometem o trato digestivo, afetando sua conversão alimentar (ALVES et al. 2004; ARRUDA, 2005; POLAR et al. 2005). Outro estudo, citado por Vazquez et al. (2015), utilizando o fungo *Metarhizium anisopliae*, apresenta elevada eficiência contra moscas estáveis *Stomoxys calcitrans* (L.), em bovinos leiteiros naturalmente infestados.

No Brasil, os estudos com microrganismos entomopatogênicos iniciaram-se há mais de cinquenta anos. Desde 1964, o fungo *Metarhizium anisopliae* passou a ser utilizado em lavouras, para o controle da cigarrinha da folha da cana-de-açúcar, uma das pragas mais comuns desta cultura. Atualmente, a aplicação de *Metarhizium anisopliae* ainda é destaque, pois a proibição das queimadas e o aumento do corte mecanizado da cana-de-açúcar favorece o aumento da palha no solo, resultando em um ambiente favorável às pragas (ALMEIDA E BATISTA FILHO, 2001; LOUREIRO et al., 2012; OTTATI-DE-LIMA, 2007).

De um modo geral, os procedimentos de produção do fungo *Metarhizium anisopliae* são artesanais, desprovidos de tecnologia e controles sofisticados de processo. Algumas informações importantes, como temperatura, aeração, pH, substrato ideal, umidade e outros fatores que podem afetar diretamente o crescimento micelial do fungo e sua esporulação, são pouco conhecidas e controladas. Na maioria das indústrias, a produção é realizada com embalagens de polietileno e o substrato utilizado é o arroz tipo 1, como atualmente é realizada a produção pela indústria Oligos Biotecnologia, de São José do Rio Preto-SP.

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver um biorreator para produção de esporos de *Metarhizium anisopliae* por fermentação em estado sólido (FES) em biorreator de bandeja. Para tanto, foi projetado e construído um biorreator e a produção de esporos foi relacionada à área superficial dos substratos, arroz tipo 1 e quirera de arroz, e à elevação de temperatura decorrente da geração de calor metabólico, para diferentes cargas de substrato no interior do biorreator. Os dados experimentais foram comparados a resultados de modelagem matemática e simulação, permitindo antever possíveis efeitos resultantes da ampliação de escala do equipamento.

2. OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver um biorreator de bandeja para produção de esporos do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Para tanto, os objetivos específicos foram:

- Produzir o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em embalagens plásticas de polipropileno com pequena (10g) e grande (500g) quantidade de substrato para avaliar a influência da geração de calor metabólico sobre a produção de esporos;
- Determinar a área superficial das partículas de arroz tipo 1 e de quirera de arroz por análise de imagens e relacionar o aumento de área com a produção de esporos;
- Estimar a taxa de geração de calor metabólico através da cinética de crescimento do fungo;
- Modelar o fenômeno da transferência de calor em um biorreator de bandeja aerado pela sua superfície livre e simular a distribuição de temperatura no interior do biorreator;
- Obter esporos do fungo em biorreator de bandeja com arroz tipo 1 e quirera de arroz com alturas de substrato variadas, determinando-se a temperatura em posições variadas do sistema e comparando-se os resultados com os de simulação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

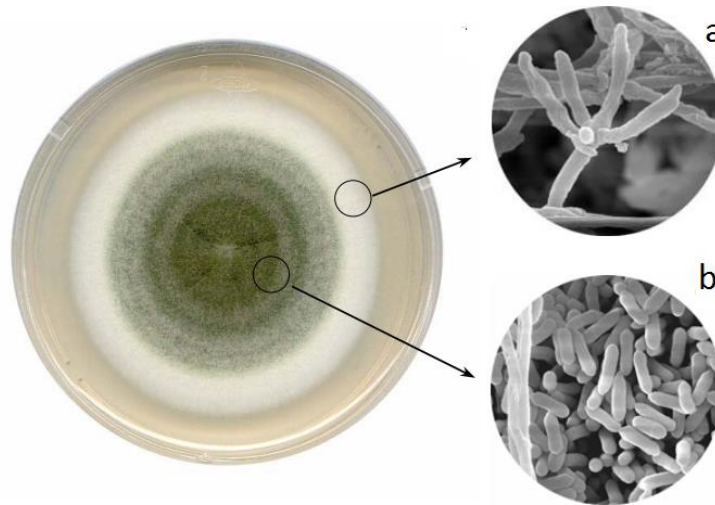
3.1 *Metarhizium anisopliae*: classificação e descrição

Metarhizium anisopliae é um fungo filamentosso entomopatogênico e acaricida, causador da doença muscardine verde (DRIVER et. al., 2000, LIU et. al., 2001). Apresenta micélio hialino e septado, com conidióforos característicos, no qual surgem esporos (normalmente uninucleados, cilíndricos e de dimensões variadas), como se pode observar na Figura 3.1. Teve seu primeiro registro em 1879 por Metschnikoff e foi classificado como *Entomophthora anisopliae*; em 1883, Sorokin reclassificou o fungo como *Metarhizium anisopliae* (ALVES, 1998).

Driver et al. (2000) classifica o fungo *Metarhizium* em três espécies, *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium flavoviride* e *Metarhizium álbum*, sendo a primeira subdivida em duas variedades: *Metarhizium anisopliae minor* e *majus*, baseado no tamanho dos esporos, o qual quando abaixo de 9 µm é considerado *minor* e quando entre 9,1 e 18 µm é considerado *majus*, como se pode observar na Figura 3.2. A coloração do fungo pode variar de branca esverdeada e de marrom a castanho claro (ALVES, 1998; ARRUDA, 2005; MACEDO, 2005).

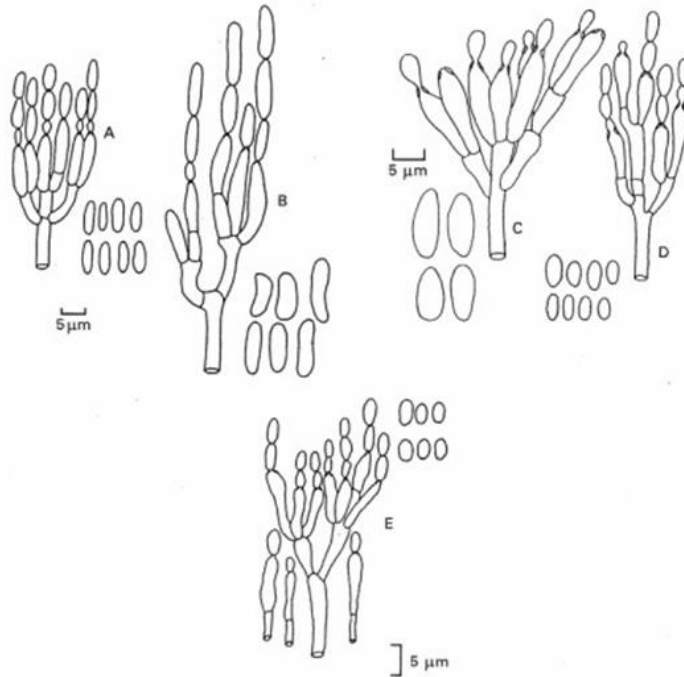
Liu et. al, (2001) e Baratto (2005) relata em seus trabalhos que anteriormente conheciam-se duas formas de reprodução anamórficas de *Metarhizium anisopliae*, a reprodução assexual e a reprodução parasexual. A reprodução assexual é responsável pelo crescimento vegetativo, já a reprodução parasexual é responsável pelos fenômenos de heterocariose e recombinação mitótica, o que classificava o fungo *Metarhizium anisopliae* como deutoromiceto. Em novos estudos foi induzida a sua forma sexuada em um isolado de *Metarhizium anisopliae var. majus*, sendo seu telemórfico, como *Cardyiceps brittle bankisoides*, e considerado como ascomiceto.

Figura 3.1. Detalhes morfológicos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.
a) conidióforo; b) morfologia do esporos.



(Extraído de ARRUDA, 2005).

Figura 3.2. Estrutura dos esporos 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. álbum*.



(Extraído de ALVES, 1998).

3.2 Fatores de cultivo para o fungo *Metarhizium anisopliae*

Existem diversos fatores bióticos e abióticos que influenciam o desenvolvimento, crescimento, esporulação e a capacidade de infecção dos fungos entomopatogênicos. Os fatores bióticos são os que envolvem os patógenos e os hospedeiros, enquanto os abióticos são os que envolvem o ambiente no qual o fungo é cultivado, tais como temperatura, luminosidade, umidade absoluta e relativa e pH, dentre outros (OTTATI-DE-LIMA, 2007).

A eficiência de virulência do fungo *Metarhizium anisopliae* depende de umidade relativa, que deve estar entre 70 a 100 % (HALLSWORTH; MAGAN, 1999). Os efeitos da umidade do meio de cultivo para esporulação do fungo *Metarhizium anisopliae* foram demonstrados por Arzumanov et al. (2005), que realizaram experimentos em biorreator de coluna. Entre as diferentes condições testadas, houve esporulação significativa com 58 % de umidade do arroz no fermentador. Os mesmos autores citam que a aeração forçada também é um fator muito importante no período de incubação, pois quando aplicada de forma excessiva ao meio de cultivo pode prejudicar a esporulação do fungo *Metarhizium anisopliae* devido ao ressecamento do meio fermentativo.

A temperatura é outro fator importante que influencia na ativação ou inativação do fungo, sendo a temperatura ótima de cultivo do *Metarhizium anisopliae* entre 25 e 28 °C (DORTA; ARCAS, 1998; POLLAR, 2005). Os efeitos da temperatura sobre o desenvolvimento do fungo *Metarhizium anisopliae* foram demonstrados por Keyser et al. (2014), que cultivaram o fungo por X dias à 28°C e depois expuseram as colônias a 5°C e 40°C, resfriando posteriormente para 28°C, completando o cultivo por mais Y dias. As colônias que forem expostas a 40°C tiveram desenvolvimento irregular e lento, enquanto as que foram submetidas a 5°C recuperaram desenvolvimento normal. Li e Feng (2009) e Lanza et al., (2009), também realizaram estudos sobre a influencia da temperatura no crescimento do fungo *Metarhizium anisopliae* e observaram melhores resultados de produção entre 21°C à 31,5°C, temperaturas a baixo e acima das ótimas foi observado um declínio na produção de esporos do fungo *Metarhizium anisopliae*, explicitando a importância do controle da temperatura no processo de cultivo do fungo.

Estudos realizados por Lopes (2015) e Roveda Junior (2008) explicitam os efeitos da luminosidade na produção de esporos do fungo *Metarhizium anisopliae*. Os resultados não demonstram grande influência dos regimes claro contínuo, escuro contínuo ou claro e escuro intermitente sobre a produção, porém nota-se aumento significativo na esporulação quando os

esporos são expostos à iluminação por lâmpadas fluorescentes de baixa intensidade, em comparação aos tratamentos com alta intensidade ou na ausência de luz.

3.3 Produção industrial de esporos de *Metarhizium anisopliae*

Para uma aplicação eficiente em lavouras e no campo é necessária uma quantidade suficiente de esporos para introduções inundativas, ou seja, aplica-se o fungo em grandes quantidades. Para que isso ocorra, é necessária uma elevada produção de esporos do fungo.

Atualmente, a produção em larga escala de fungos entomopatogênicos é artesanal ou semi-industrial, sendo esta desprovida de tecnologia sofisticada e de controles efetivos, o que torna os processos vulneráveis a contaminações e pouco produtivos. De um modo geral, a produção do fungo *Metarhizium anisopliae* ocorre por fermentação em estado sólido (FES), utilizando arroz como substrato, com incubação em salas climatizadas a temperaturas de 28°C como realizado pela indústria Oligos Biotecnologia, de São José do Rio Preto-SP.

O processo de cultivo do fungo *Metarhizium anisopliae* é uma prática muito trabalhosa, necessitando de esterilização do substrato, inoculação e incubação do fungo em embalagens plásticas, tendo oportunidade para ocorrência de contaminações (PEREIRA; ALVES, 1998).

Em geral, o arroz é colocado em embalagens plásticas com capacidade entre 300 e 600 gramas de arroz cru, o qual é previamente autoclavado e resfriado para então ser inoculado com a suspensão de esporos. A incubação ocorre em salas refrigeradas e as embalagens ficam dispostas em prateleiras por cerca de 15 dias. Após a colonização, o arroz é removido da embalagem e preparado para procedimentos posteriores, que podem ser o simples empacotamento em embalagens de maior capacidade ou a remoção dos esporos do arroz.

Por ser um processo sujeito a várias etapas manuais, há grande dificuldade de aumento de escala da produção. Com o aumento do interesse por bioinseticidas, é notória a necessidade de implementação de controles eficientes de processo na produção do fungo, bem como de se construir e desenvolver equipamentos que diminuam ou eliminem o manuseio do material durante o processo de produção.

3.4 Fermentação em Estado Sólido (FES)

A FES é um processo de cultivo em que ocorre o crescimento de microrganismos sobre e no interior de partículas porosas úmidas. A quantidade de líquido contido na matriz sólida deve ser mantida em valores de atividade de água, que assegurem o conveniente crescimento e metabolismo celular, mas que não exceda a capacidade máxima de retenção de água na matriz (DEL BIANCHI et al., 2001; GERVAIS; MOLIN, 2003). Dois tipos de sólidos são utilizados em FES, um deles é o próprio substrato, utilizado pelo microrganismo como fonte de nutrientes, e o outro atua como suporte de uma solução de nutrientes (SABU et al., 2005).

A utilização de fungos filamentosos em FES tem chamado a atenção de pesquisadores, devido à alta capacidade de desenvolvimento desses microrganismos em atividade de água moderada. Seu desenvolvimento é constituído por hifas aéreas, propícias à colonização sobre matrizes sólidas (DANTAS; AQUINO, 2010; FARINAS, 2015, SOCCOL, 1992). A técnica também tem apresentado melhor produtividade e produtos com melhores características, quando comparados a produtos obtidos em fermentação submersa (ROBINSON; NIGAM, 2003).

Existem algumas vantagens no uso da técnica de FES, que difere dos outros tipos de fermentação, por exemplo, o pouco uso de água durante o processo, pouco gasto de energia, riscos inferiores de contaminação em virtude da baixa quantidade de água utilizada durante o processo. Apesar destas vantagens, a aplicação do processo FES apresenta dificuldades no monitoramento e no controle de diferentes variáveis. A FES apresenta dificuldade de mistura, dissipação de calor, formação de gradientes de pH e tempos mais longos de fermentação (COSTA, 2012; FARINAS et. al, 2011; ROCHA, 2010; RODRIGUES-ZÚÑIGA et al. 2011).

Para que a FES ocorra com sucesso, observou-se a necessidade de que o microrganismo tenha acesso facilitado a todo o substrato, ou seja, o tamanho das partículas e a porosidade do leito são muito importantes. Quanto menor a partícula, maior a área superficial, aumentando a atividade biológica. Porém, para leitos de partículas pequenas o crescimento das hifas tende a bloquear os poros, de modo que a circulação de ar e a dissipação de calor tornam-se grandes problemas (DEL BIANCHI et al, 2001; FARINAS, 2015; PANDEY et al, 1999).

O teor de umidade do sólido pode variar de 25 a 60 % de umidade inicial para substratos amiláceos (arroz, trigo, centeio, cevada, milho e mandioca) e 60 a 80% para substratos celulósicos (palhas, cascas, bagaço e farelos) (SOCCOL, 1992).

O preparo e a escolha do substrato é um fator importante para a FES e é necessário considerar os níveis de atividade de água e de umidade ideais para cada substrato. O teor de umidade do sólido pode variar de 25 a 60 % de umidade inicial para substratos amiláceos (arroz, trigo, centeio, cevada, milho e mandioca) e 60 a 80% para substratos celulósicos (palhas, cascas, bagaço e farelos) (SOCCOL, 1992). É possível ainda a adição de nutrientes ao meio, para que se alcancem níveis ótimos no desenvolvimento microbiano. A maioria dos substratos utilizados em FES possui forma granular e essa característica permite que os grãos armazenem água em seu volume. Alguns substratos utilizados em FES são bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de laranja, arroz, farelos de trigo e de soja e outros tipos de resíduos agroindustriais (SANTOS, 2007),

Estudos com FES requerem etapas exploratória em menor escala para avaliar a adaptação do fungo ao meio de cultura e também a viabilidade de produção de metabólitos pelo microrganismo. Normalmente nessa etapa são controlados a composição, o teor de umidade e pH do substrato, temperatura e a duração do processo de cultivo. Estes estudos são necessários para desenvolver um biorreator que satisfaça as necessidades do processo, porém, não se recomenda que as condições ideais encontradas em menor escala sejam transferidas diretamente para os testes de biorreator, lembrando que condições dinâmicas em biorreatores são diferentes (CASCIATORI et al. 2016).

3.5 Biorreatores para fermentação em estado sólido

Segundo Raghavarao et al. (2003), o biorreator é o principal equipamento do processo em que a matéria prima, sob condições ideais, é convertida no produto desejado. Para que se obtenha eficiência máxima na fermentação é necessário que o biorreator atenda a alguns requisitos, tais como: a) ser construído com um material resistente, que contenha o substrato e que não sofra corrosão e nem seja tóxico para o organismo; b) ter custo acessível; c) evitar a entrada de contaminantes; d) propiciar um sistema de aeração eficiente, capaz de realizar a oxigenação do meio de cultivo de forma eficiente e que remova o calor metabólico; e) manter uniformidade do meio de cultivo no interior do biorreator. O processo de FES pode ser

operado de forma descontínua, semi-contínua e contínua, sendo os processos descontínuos os mais comuns.

Existem diferentes tipos de biorreatores para FES, como bandeja, leito empacotado, leito fluidizado e tambor rotativo. Schmidell et al. (2001) e Mitchell et al. (2006) descrevem as principais características dos biorreatores mais utilizados em FES. Biorreatores de bandeja são os mais simples e os mais utilizados em escala industrial, em virtude, do baixo custo de aplicação e baixas exigências de manutenção (CASCIATORI, 2016). Suas principais características são: camada relativamente fina de substrato distribuído em uma grande área; não possui aeração através do leito, embora o fundo da bandeja possa ser perfurado para facilitar a difusão do ar; a temperatura varia muito na camada de substrato. A desvantagem desse tipo de biorreator é que necessita de grande espaço para a planta de operação e também a automação é complexa. Biorreatores de leito empacotado têm substratos estáticos em uma coluna vertical; sua base é perfurada, através da qual aeração é aplicada e a umidade do meio é mantida por percolação de ar saturado, possibilitando melhor controle de temperatura e melhor aeração quando comparado aos biorreatores de bandeja. As desvantagens são dificuldades de extração do produto final, crescimento não uniforme do microrganismo, dificuldade na remoção do calor e conseqüente dificuldade de escalonamento. Reactores de tambor rotativo, por sua vez, têm como principais características a possibilidade de repor a água retirada do meio fermentativo pelo ar e eficiente controle de temperatura. A desvantagem deste biorreator é que a rotação pode causar danos aos microrganismos e o custo de equipamento é elevado.

3.6 Modelo para biorreator de bandeja

Os modelos matemáticos são ferramentas utilizadas para o projeto, a ampliação de escala e o aprimoramento da operação dos biorreatores. O modelo deve descrever de forma eficiente os fenômenos de transporte dentro do leito, representando as trocas de massa e energia no meio fermentativo (MITCHELL et al., 2003)

Os primeiros modelos de biorreatores de bandeja foram desenvolvidos a fim de investigar aspectos de desempenho do biorreator. Raghavarao et al (1993) realizaram testes com aproximação de estado pseudo-estacionário para a difusão de O_2 em função do meio de cultivo, a fim de alcançar uma equação algébrica que descrevesse a concentração de O_2 em função da altura no interior do biorreator. Pouco depois, foi possível observar que as

temperaturas elevadas são fatores mais importantes que as concentrações de O_2 em função da altura. Szewczyk (1993) escreveu um balanço de energia considerando estado pseudo-estacionário para conseguir uma equação algébrica que descrevesse a temperatura dentro do leito em função da altura, a fim de explorar a eficácia de arrefecimento dentro do leito. Rajagopalan e Modak (1994) e Smits et. al. (1999) apresentam os modelos mais recentes para biorreator de bandeja, no qual consideram os balanços de massa e energia e não consideram a suposição de estado pseudo-estacionário.

Para o balanço de energia, Rajagopalan e Modak (1994) consideram condução e produção de calor metabólico e acúmulo, como segue na Equação 3.1.

$$\rho_s \cdot C_{p_s} \cdot \frac{\partial T}{\partial t} = k_b \cdot \frac{\partial^2 T}{\partial z^2} + r_Q \quad (3.1)$$

em que ρ_s é a densidade do leito, C_{p_s} é a capacidade calorífica do leito, k_b é a condutividade térmica efetiva do leito, T é a temperatura, z é a coordenada vertical e do lado direito da equação r_Q é a taxa de geração de energia metabólica pelo fungo. O primeiro termo corresponde à condução de calor e o segundo termo está relacionado com a geração de calor metabólico. Não foi considerado evaporação dentro do biorreator, em virtude da aeração estar saturada inibindo evaporação do meio de cultivo.

Rajagopalan e Modak (1994) utilizaram este modelo para analisar as interações que ocorrem entre a altura do meio de cultivo e a temperatura do ar no *headspace*. Eles observaram que para um melhor controle da temperatura deve – se utilizar uma cama de meio de cultivo entre 1 e 3 cm no *headspace* deve ser mantido a temperatura ótima de crescimento do fungo. Limitações de transferência de massa e de calor em biorreatores de bandeja, influenciam as condições ambientais dentro do biorreator, podendo ocorrer gradientes de temperaturas no meio de cultivo. Em virtude disto, o modelo pode ter o seu uso limitado na otimização do projeto.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

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

4.1. Microrganismo e substrato

Foi utilizada a linhagem do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*, fornecida pelo Instituto Biológico de São Paulo. No início dos experimentos, realizou-se a estocagem do fungo em tubos de ensaios com meio de batata-dextrose-ágar (BDA, Acumedia). Com o fungo já desenvolvido, foi adicionado óleo mineral para que se formasse uma camada protetora sobre a colônia, cobrindo-se 1 cm acima da mesma. Os tubos de ensaio foram mantidos em refrigerador doméstico. Para a preparação do inóculo, as colônias foram repicadas em meio BDA colocados em erlenmeyers inclinados, os quais foram dispostos em câmara DBO a 28°C. As culturas mantidas nos tubos de ensaio foram utilizadas nas repicagens para todos os cultivos realizados.

Para inoculação em arroz tipo1 ou quirera de arroz, foi feita repicagem em frascos de Erlenmeyer inclinados contendo 50 mL de meio de cultivo BDA, com auxílio de alça de platina. Os frascos foram colocados em câmara DBO a 28 °C, por no mínimo 15 dias.

O inóculo foi preparado adicionando-se solução Tween 80 a 0,1 % à superfície da colônia contida nos frascos de Erlenmeyer, raspando-se a superfície com alça de platina para facilitar o desprendimento dos esporos. Foi fixada a concentração de 10^8 esporos/mL, e foram adicionados 1 mL de suspensão para cada 16,7g de substrato em base úmida em todos os ensaios.

Nos experimentos de cultivo em meio sólido, foram utilizados como substratos arroz tipo 1 da marca “Rosalito” e quirera de arroz.

4.2. Fermentação em embalagens de polipropileno

Foram realizados ensaios de cultivo do fungo em embalagens plásticas contendo 10 g e 500 g de substrato. As embalagens plásticas utilizadas para realizar os ensaios com 10 g de substrato foram de 10 x 20 cm e para os ensaios com 500 g de substrato foram de 30 x 40 cm.

As embalagens maiores são similares às utilizadas em biofabricas para a produção do fungo *Metarhizium anisopliae*.

Às embalagens plásticas de 10 g foram acoplados bocais de PVC, aos quais foram fixados tampões de algodão envoltos por gaze, garantindo as trocas de gases e assegurando que não houvesse contaminação. Também foram colocados, no interior das embalagens plásticas, arames em forma de espiral para facilitar a aeração do meio e evitar a aglomeração do substrato, bem como o colapso da embalagem plástica quando da esterilização em autoclave, como segue na Figura 4.1. As embalagens plásticas de 500 g foram preparadas da mesma maneira como realizado pela empresa Oligos Biotecnologia, de São José do Rio Preto - SP. As mesmas ficaram parcialmente lacradas até o 5º dia de fermentação, após este período as embalagens foram abertas para maior aeração, como segue na Figura 4.2.

Em geral, as biofábricas operam com embalagens contendo massas variadas de substrato. A massa de 300 g é a empregada na empresa Oligos Biotecnologia, de São José do Rio Preto-SP. Assim, a massa de 10 g empregada visa minimizar possíveis gradientes de temperatura e umidade no meio de cultivo, representando uma situação ideal de cultivo, enquanto que a massa de 500 g propõe uma situação drástica, na qual os gradientes seriam expressivos e poderiam afetar o metabolismo microbiano e consequentemente a produção de esporos.

Figura 4.1. Embalagem de polipropileno 10 x 20 cm preparado para fermentação.



Figura 4.2. Embalagem de polipropileno 30 x 40 cm preparado para fermentação.



4.3. Biorreator de bandeja e descrição do processo de cultivo

Um biorreator de bandeja foi projetado e construído para o processo de crescimento do fungo *Metarhizium anisopliae* em meio sólido. O material utilizado para a bandeja foi alumínio e possui dimensões de 40 cm de comprimento, 29 cm de largura e 12 cm de altura, como pode ser visto na Figura 4.3. Com uma entrada e uma saída de ar, tampa superior e gaveta externa, permitiu o monitoramento de temperatura dentro do biorreator e na entrada e saída de ar. No interior do biorreator havia uma placa de alumínio com furos de 0,05 cm cada e com espaçamento de 0,5 cm entre eles, utilizada para posicionar a extremidade dos termopares no meio geométrico do meio de cultivo e no meio geométrico do *headspace*.

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 e antes de entrar no biorreator, passou por um filtro cerâmico e em seguida por um filtro com algodão para retirada de impurezas e contaminantes microbiológicos. A vazão do fluido foi 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 microbiológico de membrana (*Midisart® 2000 In-Line Air Filter*), após o que foi conduzido ao interior do biorreator. O ar escoava através do *headspace*, paralelamente à

superfície do leito de arroz. O biorreator e a coluna de umidificação do ar foram colocados em câmara DBO durante a fermentação. A Figura 4.4 apresentam fotos do biorreator com vista lateral.

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 4.3. Esquema da bandeja utilizada para cultivo do fungo.

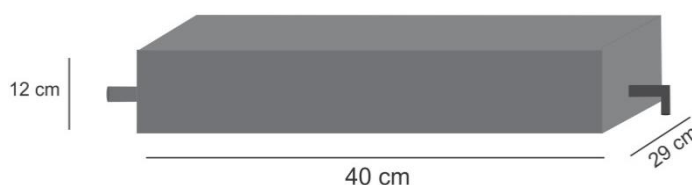
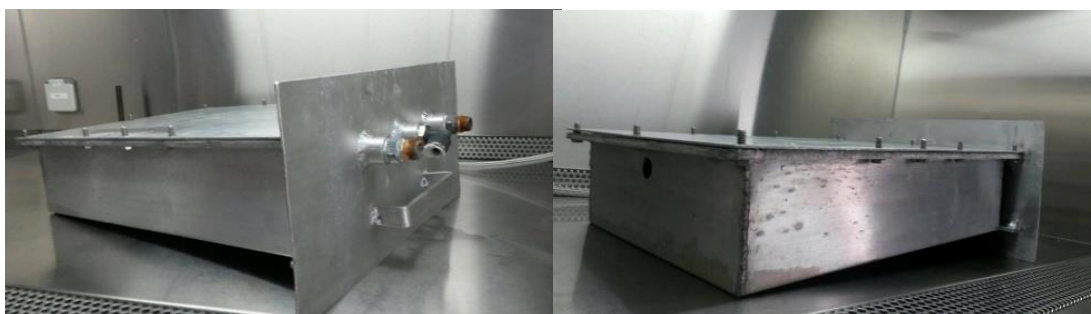


Figura 4.4. Fotos do biorreator de bandeja projetado e construído para o processo de crescimento do fungo *Metarhizium anisopliae*.



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 30 mL de suspensão de esporos com concentração de 10^8 esporos/mL. Com adição da suspensão inoculante, o meio de cultivo atinge 58% umidade (b.u.). Realizada a homogeneização do inóculo no substrato dentro das embalagens plásticas, o material foi levado à 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, também em alumínio, 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, 4 e 6 cm, correspondendo a 1, 2 e 3 kg, respectivamente, para quirera de arroz foi realizado teste com espessura 2 cm, correspondente a 1 kg. 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.

Como amostra controle, para cada ensaio realizado no biorreator de bandeja, foi preparado e incubado simultaneamente uma embalagem plástica fermentadora, contendo 10 g do substrato utilizado no biorreator; inoculado com a mesma suspensão de esporos.

4.4. Modelagem e simulação da geração de calor metabólico gerado pelo meio de cultivo em arroz tipo 1

A equação utilizada para o balanço de energia no meio de cultivo arroz tipo 1 em biorreator de bandeja foi proposta por Rajagopalan e Modak (1994), apresentada na Equação 3.1, do capítulo 3 desta dissertação, considerando a hipótese de que a remoção de calor por evaporação é desprezível quando se utiliza aeração saturada.

A simulação foi realizada utilizando-se o software MatLab[®] R2011a, versão 7.12 (MATHWORKS, NATICK, USA).

O programa elaborado permitiu prever as distribuições de temperaturas em diferentes posições do leito e também foi possível estimar a biomassa fúngica. Os parâmetros térmicos e físicos do leito utilizados no modelo foram obtidos de trabalhos anteriores desenvolvidos pelo grupo de pesquisa liderado pelo mesmo orientador desta dissertação. Alguns parâmetros foram calculados e outros extraídos de literatura.

Figura 4.5. Esquema de parâmetro da simulação.



A modelagem foi realizada para um biorreator de bandeja unidimensional, com uma entrada de ar e uma saída, com a bandeja não possuindo abertura inferior.

Para o cálculo da quantidade de calor metabólico gerado (r_q) foi utilizado o modelo logístico (equação 4.1) que representa o crescimento do microrganismo ao longo da fermentação.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_g X \left(1 - \frac{X}{X_m}\right) \quad (4.1)$$

onde X é a concentração de biomassa (kg de biomassa/ kg biomassa seca) e X_m é a máxima concentração de biomassa. A dependência da taxa específica de crescimento μ_g (s^{-1}) com a temperatura foi assumida como segue nas Equações 4.2, 4.3 e 4.4 respectivamente, conforme proposto por Sangsurasak e Mitchell (1998).

$$\mu_g = \mu_{gopt}, \text{ para } T \leq T_{opt} \quad (4.2)$$

$$\mu_g = \left(\frac{b + (T_{max} - T_{opt})}{(T_{max} - T_{opt})} \right) \left(\frac{\mu_{gopt}(T_{max} - T)}{b + (T_{max} - T)} \right), \text{ para } T_{opt} \leq T \leq T_{max} \quad (4.3)$$

$$\mu_g = 0, \text{ para } T \geq T_{max} \quad (4.4)$$

onde μ_{gopt} representa a taxa de crescimento específico (s^{-1}), T_{opt} temperatura ótima de crescimento, T_{max} temperatura máxima de desenvolvimento do fungo. As condições de contorno adotadas para o modelo foram:

Em $z = 0$; Contorno de 3ª espécie ou convectivo na superfície do leito

$$dT(1) = \left(\frac{1}{\rho_p \cdot c_{pp}} \right) \cdot \left(\left(K_b \cdot \frac{\left(\left(\frac{(T_2 - T_1)h}{h} \right) + \alpha \right) (T_1 - T_a)}{(K_b/h)} \right) \right) + (\rho_s \cdot r_q \cdot dX(1)) \quad (4.5)$$

Em $z = Z$;

Contorno de 1ª espécie ou de temperatura constante no contato com a parede inferior do leito

$$dT(n) = \left(\frac{1}{\rho_p \cdot c_{pp}} \right) \cdot \left(\left(\frac{K_b \cdot (T_p - 2 \cdot T(n) + T(n-1))}{h/h} \right) + \rho_s \cdot r_q \cdot dX(n) \right) \quad (4.6)$$

Para $t = 0$, $T = T_0$

Tabela 4.1. Definições dos parâmetros das condições de referencia do leito para simulação.

Parâmetro ou Variável	Descrição	Valor/ Unidade	Fonte e comentários
r_q	Energia liberada de biomassa produzida. Multiplicado pelo fator de correção de kg de biomassa por esporos	$5,66e^{-14} \times 8366000$ (J/kg)	Calculado
X_m	Máxima concentração de biomassa.	$7,44e^{10}$ (esporos/ Kg)	Calculado
X_0	Concentração de biomassa inicial.	$X_m/40$ (esporos/ kg)	Calculado
μ_{opt}	Taxa de crescimento específico ótimo.	0,02688 (h-1)	Calculado
ε	Porosidade do leito de arroz cozido.	0,464 (Adimensional)	Calculado
ρ_s	Densidade do leito de arroz do biorreator.	$(\varepsilon \cdot \rho_a + (1 - \varepsilon) \cdot \rho_p)$ (kg/m ³)	Calculado

Tabela 4.1. Continuação

Parâmetro ou Variável	Descrição	Valor/ Unidade	Fonte e comentários
c_{ps}	Calor específico do leito.	$[(\varepsilon \cdot \rho_a \cdot (c_{pa} + f \cdot H_{vap})) + ((1 - \varepsilon) \cdot \rho_p \cdot c_{pp})] / \rho_s$ (J/kg/°C)	Perry et. al. (2008)
k_b	Condutividade térmica efetiva do leito	$[\varepsilon \cdot k_a + (1 - \varepsilon) \cdot k_s]$ (J/h/m/°C)	Perry et. al. (2008)
α	Coefficiente convectivo de transferência de calor na superfície do leito.	$[Nu \cdot ka / 0,4]$ (J/h/m ² /°C)	Perry et. al. (2008)
T_{max}	Temperatura máxima em que ocorre crescimento	35°C	
T_{opt}	Temperatura ótima de crescimento	28°C	
T_a	Temperatura de entrada do ar	28°C	
T_0	Temperatura inicial do leito	28°C	
T_p	Temperatura da parede do biorreator	28°C	
z	Altura do leito	(0,02); (0,04); (0,06) (Metros)	

Tabela 4.2. Definições dos parâmetros das condições de referencia das partículas.

Parâmetro ou Variável	Descrição	Valor/ Unidade	Fonte e comentários
ρ_p	Densidade de partícula do arroz cozido.	1684,3 (kg/m ³)	Calculado por Choi e Okos (1986)
ρ_a	Densidade do ar.	1,14 (Kg/m ³)	Perry et. al. (2008)
c_{pa}	Calor específico do ar.	1005 (J/kg/°C)	Perry et. al. (2008)

Tabela 4.2. Continuação

Parâmetro ou Variável	Descrição	Valor/ Unidade	Fonte e comentários
c_{pp}	Calor específico do arroz.	2174 (J/kg/°C)	Calculado por Choi e Okos (1986)
H_{vap}	Calor latente de vaporização da água.	2414300 (J/kg-água/°C)	Perry et. al. (2008)
f	Capacidade do ar de carregar água	0,00246 (Kg-água/kg-ar/°C)	Perry et. al. (2008)
k_a	Condutividade térmica do ar.	0,021 (W/m/°C)	Calculado por Choi e Okos (1986)
k_s	Condutividade térmica do arroz cozido	0,31 (W/m/°C)	Calculado por Choi e Okos (1986)
Vazão	Vazão do ar.	0,150 (m ³ /h)	
V_{sup}	Velocidade superficial do ar.	$[vazão/(0,29 \cdot (0,12 - esp))]$ (m/h)	Calculado
Visco	Viscosidade cinemática do ar	$3600 \cdot 15,47e^{-6}$ (m ² /h)	Perry et. al. (2008)
Rey	Número de Reynolds	$(V_{sup} \cdot 0,4 / visco)$ (Adimensional)	Perry et. al. (2008)
Pr	Número de Prandt	0,6 (Adimensional)	Perry et. al. (2008)
Nu	Número de Nusselt	$[0,664 \cdot Rey^{0,5} \cdot Pr^{1/3}]$ (Adimensional)	Perry et. al. (2008)

4.4. Cinética de crescimento microbiano

O substrato foi preparado e inoculado da mesma forma como feito para o biorreator de bandeja, mas foi acondicionado em um fermentador de leito empacotado cilíndrico com 9,5 cm de diâmetro e 12,5 cm de comprimento.

O fermentador possuía uma entrada de ar, com percolação longitudinal e na saída do leito o ar foi transferido para uma coluna empacotada com sílica gel para retenção de umidade, sendo em seguida transferido para o analisador de gases Tandem Pro (MAGELLAN BIOTECH, Borehamwood, UK) que registrou as concentrações de oxigênio e de gás carbônico na corrente de saída. A cinética de crescimento do fungo foi obtida com base no consumo de O₂ e na liberação de CO₂ pelo metabolismo respiratório do fungo ao longo do cultivo.

4.5. Análise de porosidade do leito

Para aplicação dos modelos matemáticos, foi necessário determinar a porosidade do leito de arroz. Para tanto, foram utilizadas provetas de 50 mL, arroz tipo 1 da marca “Rosalito” e tolueno (DE BONI; 2007).

Inicialmente, foi pesada cada proveta vazia, após o que adicionou-se o arroz autoclavado até a marca de 20 mL. Foram dadas batidas na parede da proveta para que o arroz se acomodasse sem ser pressionado. Em seguida, as provetas foram novamente pesadas, após o que adicionou-se tolueno para preenchimento dos espaços vazios entre as partículas, sem ultrapassar a marca dos 20 mL. As provetas contendo arroz e tolueno foram novamente pesadas. Este procedimento foi repetido para cinco amostras independentes.

Ao término dos ensaios, foi possível calcular a porosidade do leito, através da Equação 4.7 (SILVA, 2003; MATA e DUARTE, 2002, CASCIATORI et. al., 2014).

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_P}{\rho_S} \quad (4.7)$$

Onde ρ_S é a densidade do leito de arroz, ρ_P é a densidade da partícula de arroz, e ε é a porosidade do leito.

4.6. Área de superficial do arroz e quirera de arroz

Em estudos anteriores de Lopes (2015), observou-se maior produção de esporos do fungo *Metarhizium anisopliae* no substrato quirera de arroz quando comparado ao arroz tipo 1, atribuindo-se tal resultado à maior área superficial da quirera. Este teste foi realizado para comprovar se realmente a área superficial da quirera é maior que a do arroz tipo 1.

Para verificação experimental dessa suposição, foram realizados experimentos de determinação da área superficial disponível para colonização do fungo em leito de arroz tipo 1 e de quirera. Ambos os materiais foram submetidos aos mesmos processos de umidificação e esterilização usados para a fermentação, porém os substratos foram umidificados com solução de Rodamina B à 0,01% (corante para coloração do substrato, para identificação da área superficial pelo programa). Após resfriamento, os sólidos foram colocados em placas de Petri e fotografados com câmera digital. Em seguida, as fotos tiveram seu formato modificado de JPG para Bitmap de 24 bits, formato exigido pelo programa LensEye, após o que foram importadas para o programa para determinação da área superficial.

4.7. Teste de umidade

Realizou-se teste de umidade em embalagens plásticas com dimensões de 15x20 cm com 100 g de substrato. Os testes foram realizados com arroz tipo 1 da marca “Rosalito” e quirera de arroz.

Os substratos foram preparados normalmente para a fermentação, pesados, umidificados, esterilizados e receberam a suspensão fungica. Nas embalagens, foram acoplados a bocais de PVC, aos quais foram fixados tampões de algodão envoltos por gaze, garantindo as trocas de gases e assegurando que não houvesse contaminação. Também foram colocados, no interior das embalagens plásticas, arames em forma de espiral para facilitar a aeração do meio e evitar a aglomeração do substrato, bem como o colapso da embalagem plástica quando da esterilização em autoclave.

A umidade foi determinada em um analisador de umidade MB45 (OHAUS®); foram coletadas amostras antes da umidificação, após a umidificação e ao fim da fermentação. As amostras tiveram pesos variados que variaram entre 2,815 g a 3,331g.

Também realizou-se teste de umidade ao final do processo de cultivo em biorreator de bandeja com quirera de arroz. Foram coletadas amostras no fundo e na parte superior da entrada e da saída de ar.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Temperatura e concentração de esporos em embalagens plásticas.

Nos ensaios em embalagens plásticas contendo 10 e 500g de arroz tipo 1 e de 500 g de quirera de arroz, buscou – se simular experimentalmente o procedimento adotado nas biofábricas.

Nestas embalagens, mediou-se a temperatura ao longo da fermentação, sendo os resultados apresentados nas Figuras 5.1 e 5.2 com arroz tipo 1 e nas Figuras 5.3 e 5.4 com quirera de arroz, onde se observou as oscilações de temperaturas durante o processo nos dois fermentadores, sendo o valor máximo de temperatura observado nas embalagens contendo 10g de arroz tipo 1 de material inoculado 31°C e nas de 500g 35°C.0. Nas embalagens contendo quirera, observou-se temperaturas semelhantes, sendo o valor máximo para embalagens de 10g foi 31,4 °C e para embalagens de 500 g 34°C. Na Tabela 5.1 são apresentadas as temperaturas máximas observadas ($T_{m\acute{a}x}$) e seus respectivos desvios padrão (DP) para a média dentre todas as temperaturas registrados, bem como a concentração de esporos (C_c) produzidos após o período de incubação em cada embalagem.

Figura 5.1. Temperaturas durante o cultivo em embalagens plásticas de 500g de arroz tipo 1.

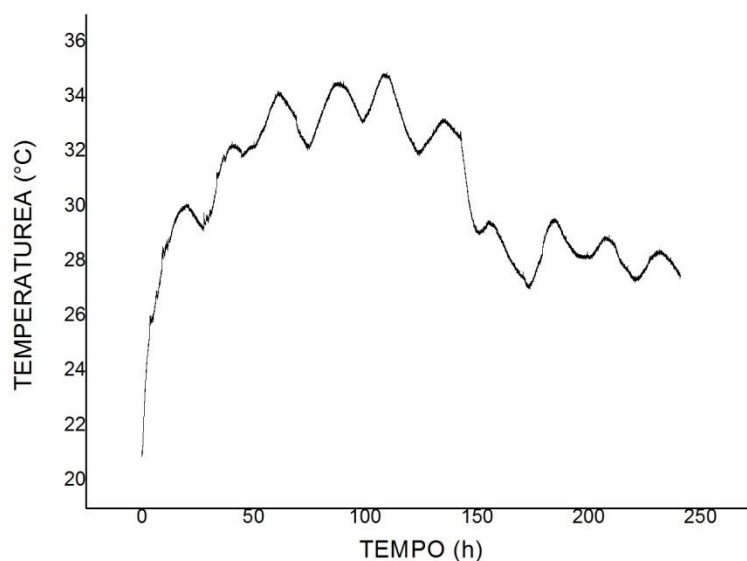


Figura 5.2. Temperaturas durante o cultivo em embalagens plásticas de 10g de arroz tipo 1.

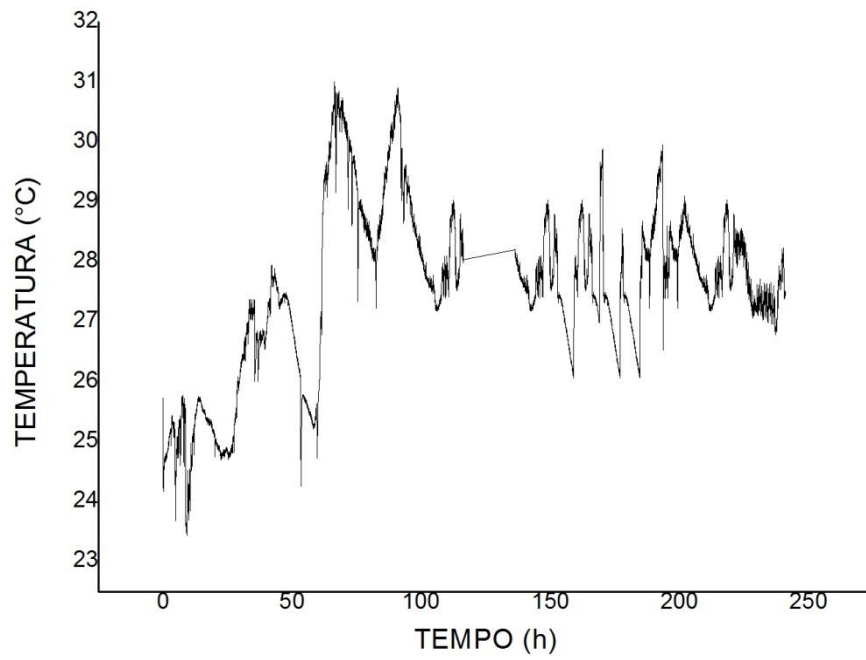


Figura 5.3. Temperaturas durante o cultivo em embalagens plásticas de 500g de quirera de arroz.

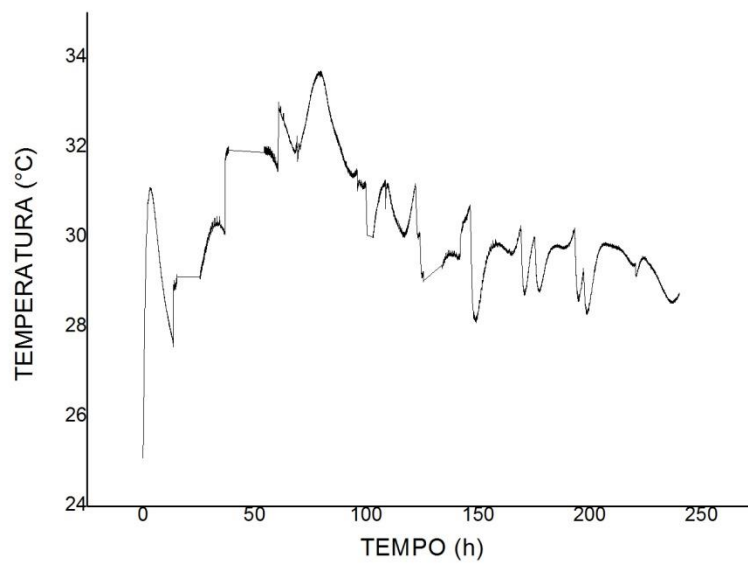


Figura 5.4. Temperaturas durante o cultivo em embalagens plásticas de 10g de quirera de arroz.

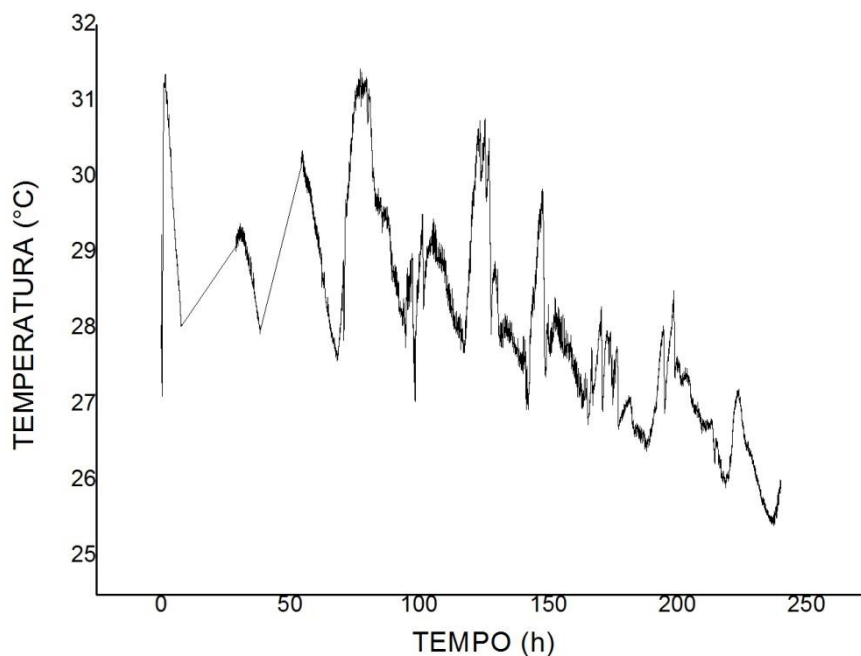


Tabela 5.1. Temperaturas e concentrações de esporos após 10 dias de cultivo em embalagens plásticas.

Fermentador	C_c	$T_{m\acute{a}x}$	C_c	$T_{m\acute{a}x}$
	(10^8 / mL)	($^{\circ}C$)	(10^8 / mL)	($^{\circ}C$)
	ARROZ TIPO 1		QUIRERA DE AROZ	
Embalagem plástica de 10g	6,77±0,39	31,0°C ± 1,42	7,50±0,42	31,4±1,34
Embalagem plástica de 500g	2,94±0,58	35,0°C ± 2,51	3,35±0,21	34,0±1,36

Em decorrência da elevação de temperatura, a concentração de esporos para as embalagens de 500g com arroz tipo 1 foi menor, evidenciando a influência da variável temperatura no metabolismo e na fisiologia microbiana.

Keyser et al. (2014) realizou testes expondo o fungo *Metarhizium anisopliae* em diferentes condições de temperaturas, entre 20°C e 40°C. Os autores demonstraram que os melhores resultados foram obtidos em condições de temperatura no intervalo de 24°C a 32°C, e que quando o ensaio foi realizado expondo a 20°C e acima de 35°C observou-se diminuição na produção de esporos do fungo. Estes autores também expuseram os fungos a 40°C e 5°C, por um período de 48 horas retornando o cultivo à 28°C a seguir. Os autores constataram que as colônias submetidas a 40°C não atingiram seu desenvolvimento ótimo, o que difere das

expostas a 5°C, que atingiram seu desenvolvimento ótimo. Com base no estudo de Keyser et al. (2014), pode-se afirmar que a elevação da temperatura nas embalagens de 500 g afetou o crescimento do fungo durante o período de fermentação, principalmente nas 100 primeiras horas. Estudos sobre a interferência da temperatura também foram realizados por Li e Feng (2009) e Lanza et al., (2009), que, observaram que os melhores resultados de produção do fungo *Metarhizium anisopliae* foram entre 21°C à 31,5°C, notando um declínio na produção quando o fungo ficou exposto a temperaturas abaixo de 20°C e acima de 32°C.

O aumento na produção de esporos cultivados em embalagens plásticas com quirera de arroz foi 10,8% maior do que em arroz para as embalagens de 10g e 13,9% maior para embalagens de 500g, evidenciando grande influência da área superficial do substrato sobre a produção de esporos, uma vez que a área superficial da quirera foi 8,0% maior do que a do arroz, como se dá no item 5.6 deste capítulo.

Como as temperaturas máximas nos ensaios com arroz e quirera foram próximos em ambas as embalagens, acredita-se que não há grandes alterações estruturais do meio de cultivo para ambas as partículas de transferência de calor e que o mecanismo dominante seja de condução através da fase sólida, a qual tem a mesma composição para os dois meios de cultivo.

5.2 Temperatura e concentração de esporos no biorreator de bandeja.

Os ensaios no biorreator de bandeja foram realizados com diferentes quantidades de substrato, a fim de se encontrar um parâmetro de aumento de escala na produção de esporos do fungo *Metarhizium anisopliae*. Os testes com arroz tipo 1 foram realizados com 1 kg, 2 kg e 3 kg, correspondentes às camadas de meio de cultivo de 2, 3 e 6 cm, respectivamente, e os resultados da variação de temperatura no biorreator são apresentados nas Figuras 5.5, 5.6 e 5.7, respectivamente. O teste com quirera de arroz foi realizado com 1kg, correspondente a camada de meio de cultivo de 2 cm, sendo os resultados são representados na Figura 5.8. Nos testes com 1 kg e 3kg de arroz tipo 1 coletou-se dados de temperatura na entrada (T_e) e saída do biorreator (T_s), no centro geométrico do meio de cultivo (T_c) e no sobre-espço acima do substrato (*headspace*) (T_h), sendo que para a fermentação de 2 kg de arroz tipo 1 foram coletados dados apenas na entrada e na saída. Para o teste com 1 kg de quirera coletou-se dados de temperatura na entrada (T_e) e saída do biorreator (T_s), no centro geométrico do meio de cultivo (T_c) e no sobre-espço acima do substrato (*headspace*) (T_h).

Na Tabela 5.2 são apresentadas as concentrações de esporos produzidos com arroz tipo 1 em cada fermentação, bem como as temperaturas máximas observadas no meio de cultivo e o desvio padrão para a média de todas as temperaturas do ensaio. Em todas as fermentações realizadas no biorreator de bandeja preparou-se uma embalagem plástica de 10 g para controle e, ao término do período de cultivo, comparou-se a quantidade de esporos produzidos na embalagem plástica com a quantidade de esporos produzidos no biorreator de bandeja. Na Tabela 5.3 é apresentada a concentração de esporos produzidos com quirera de arroz, bem como as temperaturas máximas observadas no meio de cultivo e o desvio padrão. Também para esse teste foi preparada uma embalagem plástica de 10 g para controle.

Figura 5.5. Temperaturas durante o cultivo em biorreator de bandeja com 1kg de arroz tipo 1 como meio de cultivo (camada de 2cm de espessura).

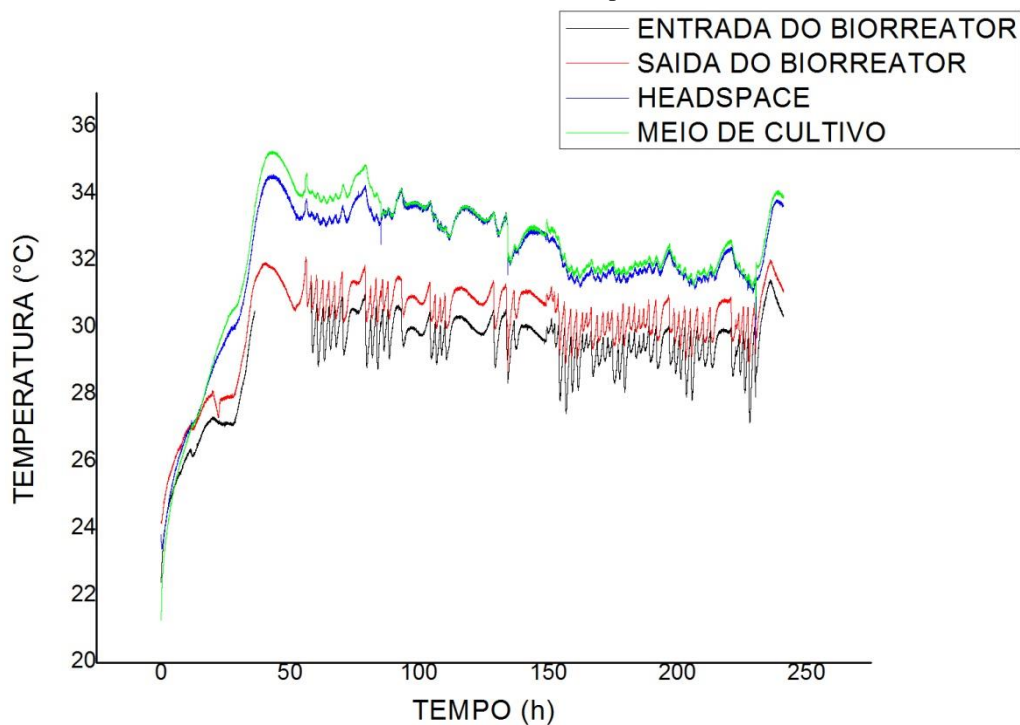


Figura 5.6. Temperaturas durante o cultivo em biorreator de bandeja com 2kg de arroz tipo 1 como meio de cultivo (camada de 4cm de espessura).

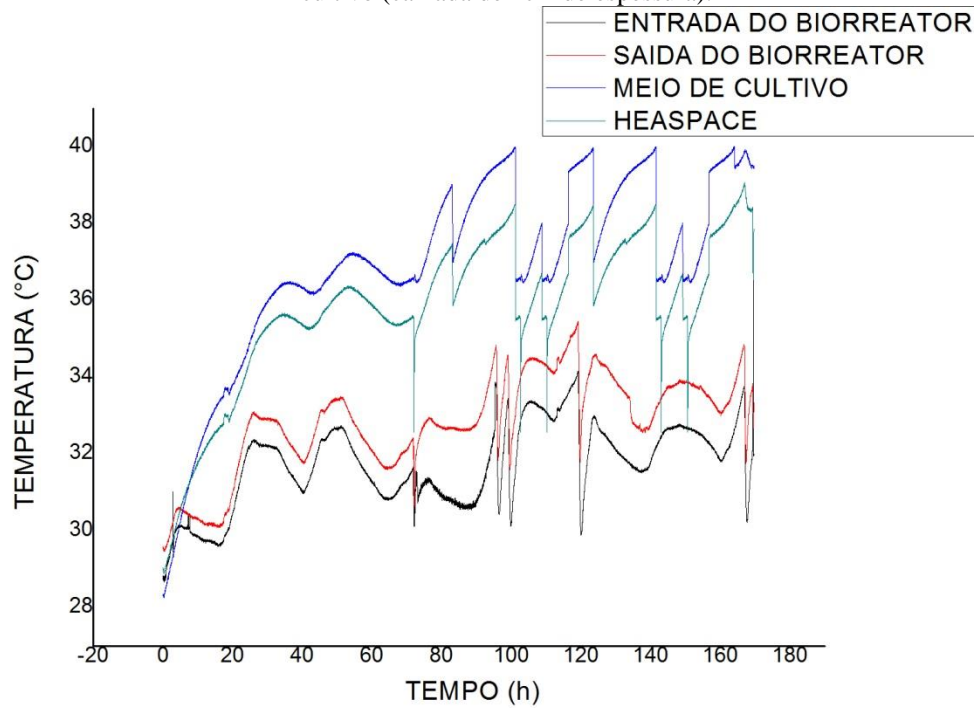


Figura 5.7. Temperaturas durante o cultivo em biorreator de bandeja com 3kg de arroz tipo 1 como de cultivo (camada de 6cm de espessura).

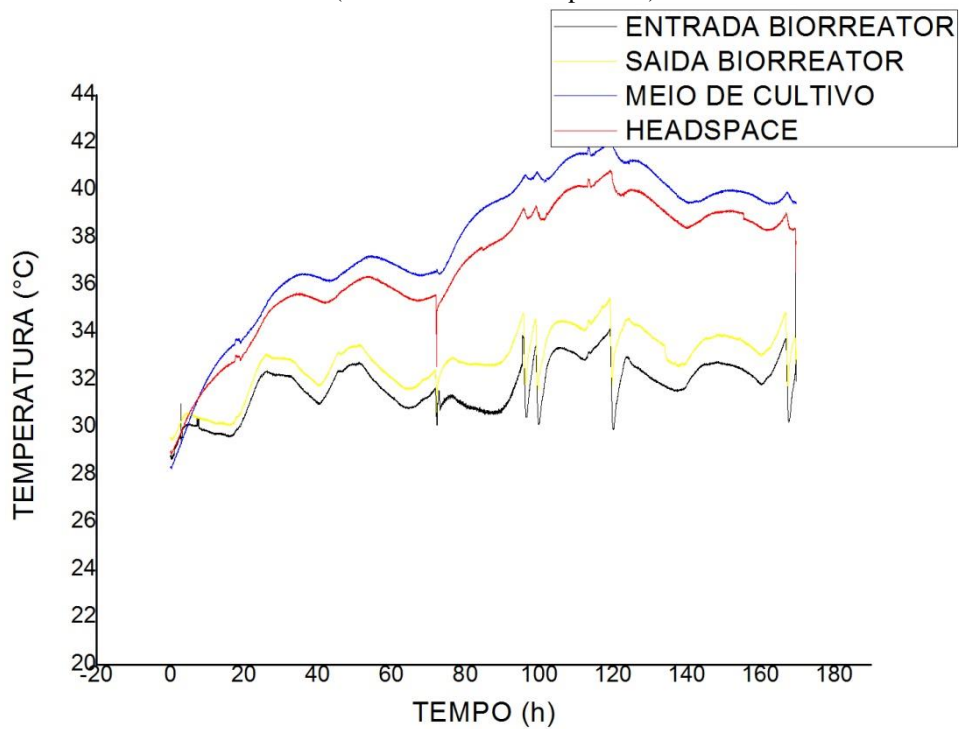


Figura 5.8. Temperaturas durante o cultivo em biorreator de bandeja com 1 kg quirera de arroz como meio de cultivo (camada de 2cm de espessura).

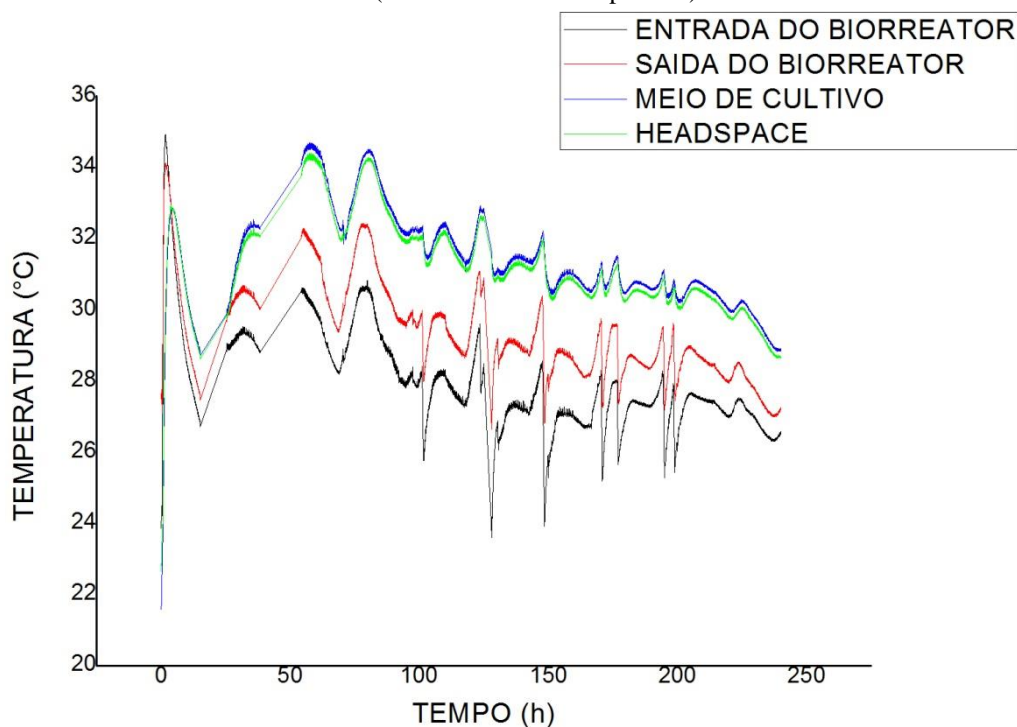


Tabela 5.2. Produção de esporos nas embalagens de controle e no biorreator de bandeja com substrato arroz tipo 1 da marca “Rosálito”.

C_{controle} (10g) (10^8 esporos / mL)	Massa de meio de cultivo (kg)	Espessura (cm)	C_C (10^8 esporos / mL)	$T_{\text{máx}}$ (°C)
$6,77 \pm 0,39$	1	2	$3,21 \pm 1,24$	$35 \pm 2,19$
$6,55 \pm 0,43$	2	4	NC*	$39 \pm 2,43$
$6,45 \pm 0,49$	3	6	NC*	$41 \pm 3,06$

(*) Não foi observado crescimento do fungo

Tabela 5.3. Produção de esporos na embalagem de controle e no biorreator de bandeja com substrato quirera de arroz.

C_{controle} (10g) (10^8 esporos / mL)	Massa de meio de cultivo (kg)	Espessura (cm)	C_C (10^8 esporos / mL)	$T_{\text{máx}}$ (°C)
7,5	1	2	3,02	$35 \pm 1,44$

Nos testes no biorreator de bandeja para 1 kg de meio de cultivo, correspondente a 2 cm de espessura, não foi observado ressecamento do meio de cultivo, uma vez que o escoamento de ar estava saturado na entrada do fermentador. O constante escoamento de ar permitiu a troca de gases e de calor produzidos dentro do biorreator, assegurando o

crescimento uniforme por toda a espessura da camada do substrato, como explicita as Figuras 5.9 e 5.10. Apenas na base do leito, em contato com a parede inferior do biorreator, observou-se baixo crescimento, uma vez que visualmente constatou-se excesso de água não ligada a matriz porosa que, provavelmente bloqueou os poros entre as partículas e dificultou as trocas gasosas. Tal excesso pode ser devido a produção de água através do processo metabólico, a qual excederia a capacidade de retenção de água pelo meio poroso, ou mesmo ao fato de que a umidade inicial utilizada para o cultivo, cerca de 58%, fosse superior a capacidade de retenção. No entanto, somente testes específicos da capacidade higroscópica do arroz nas condições de cultivo poderão esclarecer tais suposições. Na Figura 5.5 pode – se observar nos perfis de temperatura que em 50 horas T_c atinge o valor máximo de 35°C, havendo um pequeno declínio a seguir. O perfil de temperatura T_h é semelhante ao de T_c , diferindo ligeiramente apenas nas primeiras 50 horas, quando T_h atinge o valor máximo de 34°C. Os perfis de temperatura T_c e T_s não diferem drasticamente, em vista das pequenas variações que ocorreram durante o processo de fermentação, atingindo um valor máximo de 32°C.

Realizou-se um comparativo entre o que foi produzido no biorreator de bandeja com o que foi produzido na embalagem plástica de controle e observou-se que as quantidades de esporos produzidos em embalagens plásticas de 10 g é superior a quantidade de esporos produzidos em biorreator com 1 Kg de meio de cultivo. O comparativo indica que durante o período de cultivo no biorreator existam possíveis fatores que estão afetando diretamente o crescimento microbiano do fungo. Note-se que a concentração de esporos produzidos no biorreator é próxima à observada para as embalagens plásticas de 500g (Tabela 5.1), cuja temperatura também atingiu um valor máximo de 35°C, evidenciando a forte influência da espessura da camada de cultivo sobre o metabolismo e, conseqüentemente, da remoção deficiente de calor sobre o cultivo.

Figura 5.9. Fotografia da superfície do biorreator de bandeja após o cultivo para a massa de substrato de 1kg (2cm de espessura)



Figura 5.10. Fotografia da vista lateral do meio de cultivo após a fermentação para a massa de substrato de 1kg (2cm de espessura)



Na fermentação com 2 kg de meio de cultivo, correspondente a 4 cm de espessura, não se observou o crescimento do fungo *Metarhizium anisopliae*. Acredita-se que esse fenômeno seja atribuído aos altos valores de temperatura durante o período de fermentação atingindo um valor máximo de 39 °C, levando a inativação do fungo. Ao fim da fermentação, quando aberto o biorreator, foi constatado o crescimento de outros parasitas, um dos quais, suspeita-se que seja *Aspergillus Flavus Link*, em uso em outras pesquisas do grupo.

Para os ensaios com 3 kg de meio de cultivo, correspondente a 6 cm de espessura, também não se observou a produção do fungo *Metarhizium anisopliae*. Novamente acredita-se que o principal motivo seja a remoção deficiente do calor metabólico, gerado. Observou-se que as temperaturas foram elevadas, atingindo um valor máximo de 41,8°C, que corresponde a um valor muito acima da condição ótima de crescimento do fungo, 28°C (Lopes, 2015;

Keyser et. al. 2014). De acordo com Keyser et al. (2014), o fungo *Metarhizium anisopliae* é sensível a temperaturas elevadas.

Os dados obtidos no teste realizado com 1 kg de quirera de arroz, correspondente a 2 cm de altura de meio de cultivo, foram semelhantes aos dados obtidos com arroz tipo 1 com 1 kg e correspondente a 2 cm de altura de substrato. Foi observado um valor máximo de T_c de 35°C e um perfil de temperatura similar ao do arroz ao longo do tempo. Não se observou ressecamento do meio de cultivo, uma vez que o fluxo de ar estava saturado na entrada do fermentador, o constante fluxo de ar permitiu a troca de gases e de calor produzidos dentro do biorreator, assegurando o crescimento uniforme por toda a espessura da camada do substrato.

5.3 Área de superfície do arroz tipo 1 e quirera de arroz

Lopes (2015) demonstrou em seu trabalho que a produção de esporos do fungo *Metarhizium anisopliae* foi maior quando utilizada quirera de arroz como substrato. Por este motivo, antes de realizar testes com quirera de arroz no biorreator de bandeja, determinou-se a área superficial das partículas para avaliar possível influência da área superficial na produção de esporos. Na Figura 5.11 são apresentadas as fotografias das amostras de arroz e de quirera tingidos com o corante rodamina, e na Figura 5.12 as imagens digitalizadas pelo *software* LensEye, os parâmetros utilizados para reconhecimento da área superficial do arroz e da quirera e os resultados da área superficial identificada pelo software são apresentados na Tabela 5.4. Observou-se que a quirera tem uma área de cerca de 8,6% maior do que a área do arroz tipo 1.

Como mencionado anteriormente, a partir dos resultados obtidos nos ensaios em embalagens plásticas, a concentração de esporos empregando-se quirera como substrato é 16,8% maior do que utilizando-se arroz, para embalagens contendo 10g de substrato, e 13,9% maior para embalagens de 500g, sugerindo-se uma relação direta entre o aumento da área de cultivo e o aumento da concentração de esporos. No entanto, tal aumento não se repetiu nos ensaios realizados no biorreator, indicando que as limitações impostas pelas condições adversas de processo superem o ganho provocado pelo aumento da área das partículas.

Tabela 5.4. Demonstração da área superficial do arroz tipo 1 e quirera de arroz.

	ARROZ TIPO 1	QUIRERA DE ARROZ	DIFERENÇA (%)
Área (pixels)	46393	30525	-
Área (contorno)	35855	26217	-
Área identificada (%)	77,29	85,89	8,6

Figura 5.11: Imagem digitalizada dos sólidos com rodamina:

a) arroz tipo 1; b) quirera de arroz.

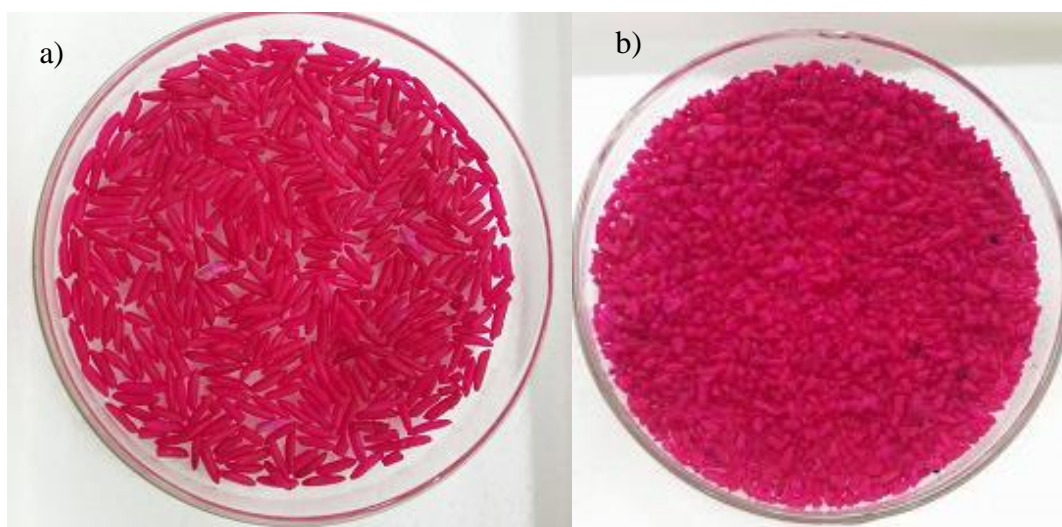
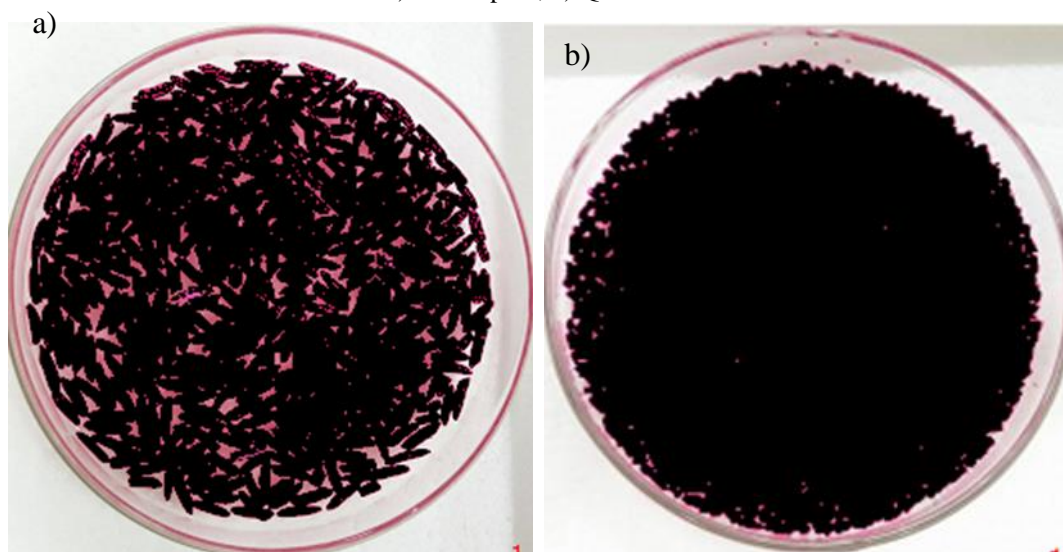


Figura 5.12. Imagem digitalizada das partículas

a) arroz tipo 1; b) Quirera de arroz.



5.4. Umidade do meio de cultivo

Para obter a umidade no fim da fermentação preparou-se embalagens com 100 g de arroz tipo 1 da marca “Rosalito”, e quirera de arroz. Estes passaram por todo o processo de fermentação, as embalagens foram preparadas com bocais de PVC, receberam arames espirais e tampão de algodão. Em seguida, os meios de cultivo foram pesados, umidificados e em seguida esterilizados e, após o resfriamento, receberam a suspensão fungica. Foram coletadas amostras do arroz antes e após a umidificação, e ao término do processo de cultivo. Na Tabela 5.5, são apresentadas as umidades do meio de cultivo em embalagens com 100g de substrato.

Tabela 5.5. Umidade do meio de cultivo (b.u.) em embalagens plásticas contendo 100g de substrato

	ARROZ TIPO 1	QUIRERA DE ARROZ
Antes da umidificação	13,3	9,8
Após umidificação	39,8	41,1
Final da fermentação	54,8	48,0

Com estes resultados observou-se que a umidade da quirera se diferencia 3,5% do arroz tipo 1, embora a quantidade de água adicionada a ambas tenha sido a mesma. Os dados revelam que a quirera tem uma capacidade de retenção de água menor do que a do arroz, possivelmente em virtude a estrutura dos poros interpartículas, que dificultem a penetração de água na quirera. Ao final das fermentações em biorreator de bandeja com arroz tipo 1, observou-se que havia água no fundo da bandeja, quando fermentado com quirera de arroz esse fenômeno já não foi observado.

5.5. Resultados de modelagem e simulação.

As simulações aqui apresentadas seguiram parâmetros dispostos na Tabela 4.1 e as condições iniciais já apresentadas no presente trabalho. Foram realizadas simulações para arroz tipo 1 com diferentes quantidades, sendo elas: 1kg, 2kg e 3kg correspondentes a 2 cm, 4cm e 6 cm de altura. As distribuições de temperatura e de produção de conídios estão apresentadas nas Figuras 5.13, 5.14 e 5.15, para as cargas substrato de 1, 2 e 3Kg, respectivamente.

Figura 5.13. Resultados de simulação com 1 kg de substrato correspondente a 2 cm de altura de meio de cultivo para biorreator de bandeja: a) Distribuição de temperatura por todo o biorreator de bandeja
 b) Distribuição de esporos por todo biorreator; c) Quantidade de esporos estimado no centro geométrico do biorreator; d). Temperatura do centro geométrico do meio de cultivo do biorreator; e). Temperatura da superfície do meio de cultivo do biorreator;

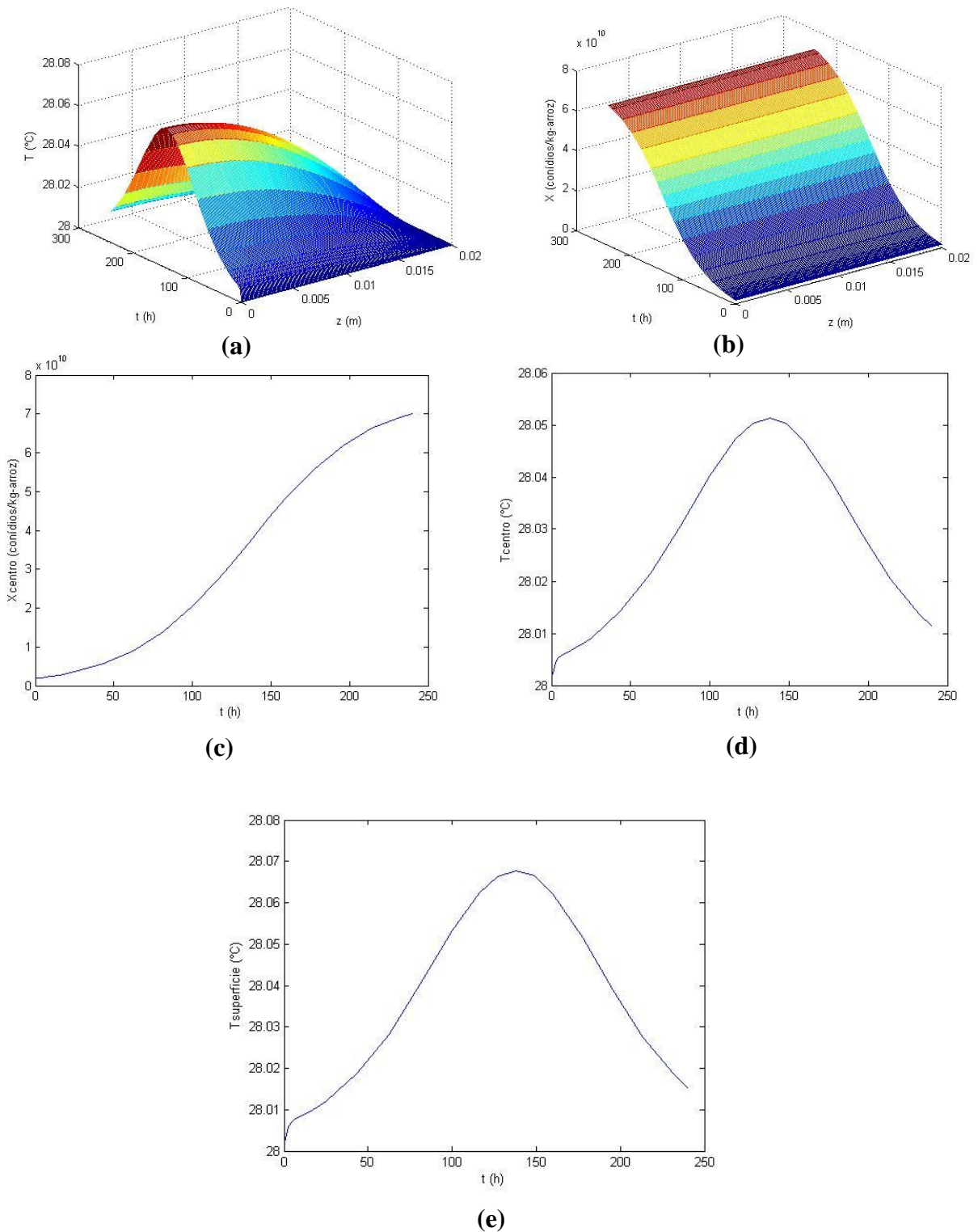


Figura 5.14. Resultados de simulação com 2 kg de substrato correspondente a 4 cm de altura de meio de cultivo para biorreator de bandeja: a) Distribuição de temperatura por todo o biorreator de bandeja b) Distribuição de esporos por todo biorreator; c) Quantidade de esporos estimado no centro geométrico do biorreator; d). Temperatura do centro geométrico do meio de cultivo do biorreator; e). Temperatura da superfície do meio de cultivo do biorreator;

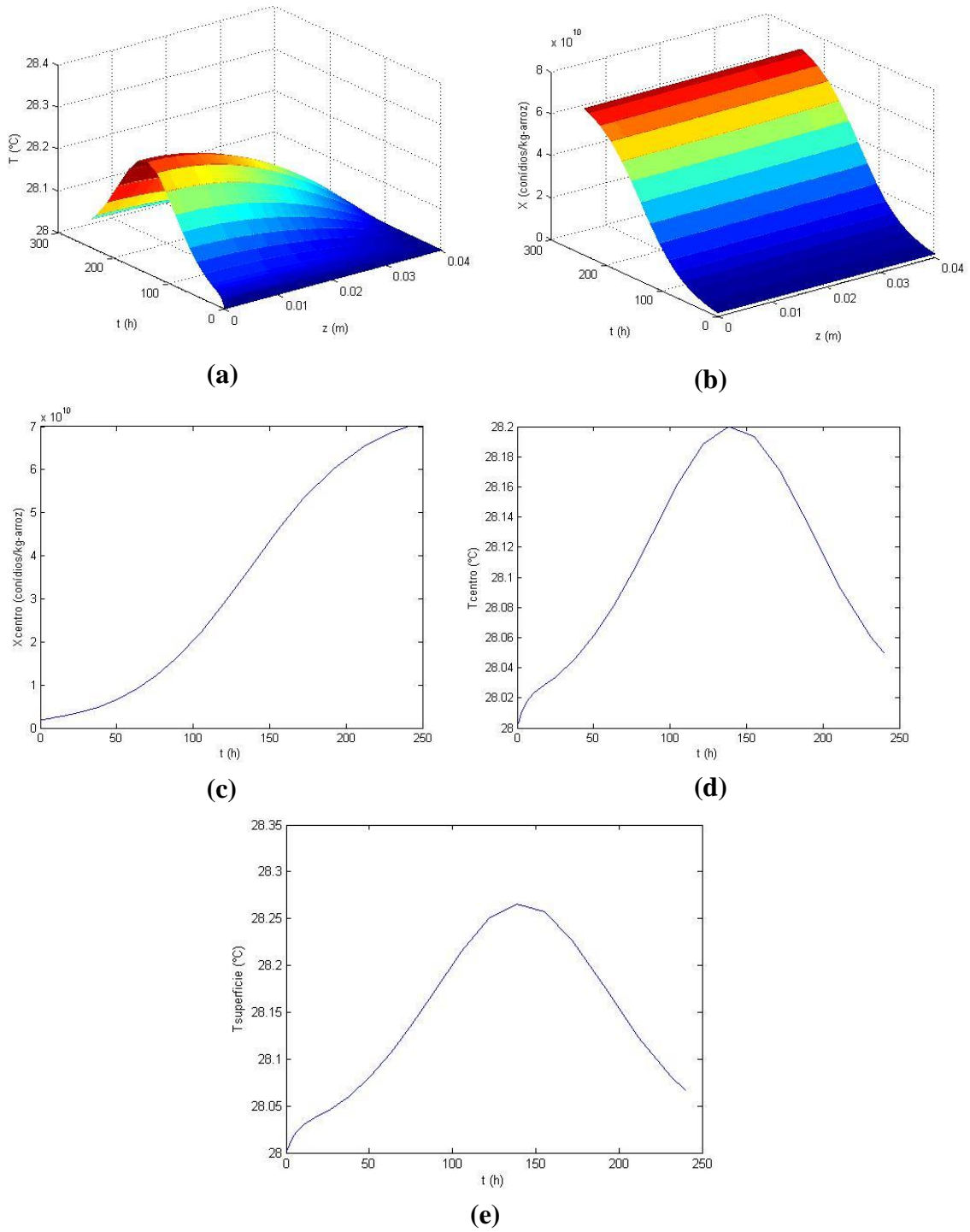
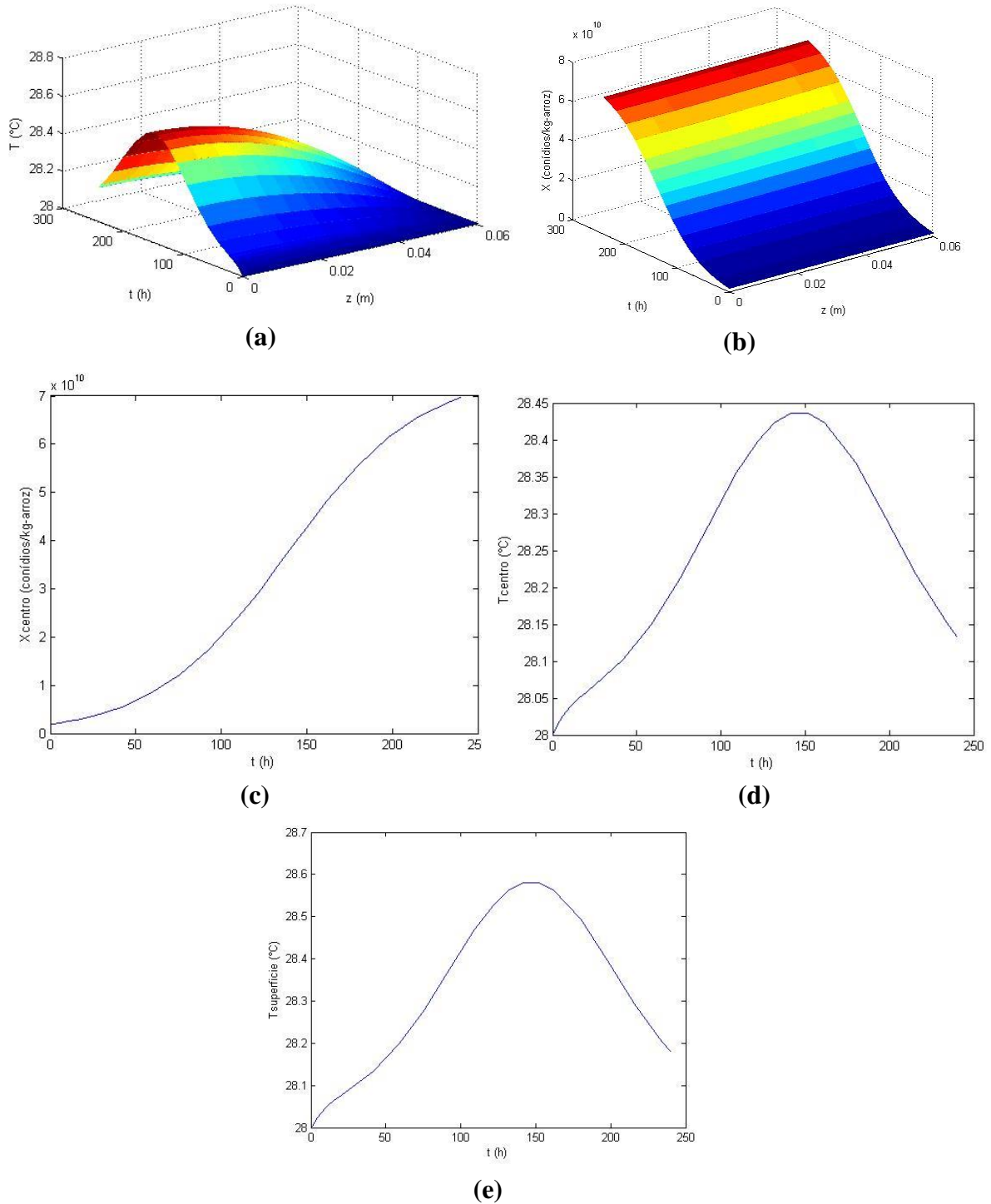


Figura 5.15. Resultados de simulação com 3 kg de substrato correspondente a 6 cm de altura de meio de cultivo para biorreator de bandeja: a) Distribuição de temperatura por todo o biorreator de bandeja b) Distribuição de esporos por todo biorreator; c) Quantidade de esporos estimado no centro geométrico do biorreator; d). Temperatura do centro geométrico do meio de cultivo do biorreator; e). Temperatura da superfície do meio de cultivo do biorreator;



Os resultados obtidos com o modelo utilizado não representam com fidelidade a realidade dos ensaios, como pode ser constatado pela temperatura no centro do biorreator para

1 kg de arroz tipo 1 onde o valor máximo experimentalmente obtido foi de 35°C, e o simulado 28,0°C . Outro aspecto a ser destacado é o tempo necessário a se obter a temperatura máxima no centro do biorreator que experimentalmente foi de 50 horas e na simulação próximo a 50 horas.

Não observou-se crescimento do fungo com 3 kg de substrato, em virtude dos níveis elevados de temperaturas, que causaram favorecimento a proliferação de microrganismos oportunistas. No entanto, as simulações apresentam valores de temperaturas adequados a *Metarhizium anisopliae*, como pode ser observado nas figuras 5.14 e 5.15.

Tais desvios entre os resultados simulados e os experimentais podem estar relacionados a deficiências do modelo ou a imprecisões da determinação de geração de calor metabólico. O modelo proposto é muito simples, mas as principais hipóteses a ele associadas (escoamento térmico unidimensional, não evaporação de calor e meio pseudo homogêneo) são factíveis, restando a cinética de crescimento incorreta como causa provável.

5.6. Cinética de crescimento através do consumo de O₂.

Para este teste foi utilizado um biorreator de leito empacotado, no qual a aeração percolava pelo meio do substrato dentro do biorreator. A aeração acontecia no sentido vertical ascendente. Em seguida o ar era direcionado para uma coluna recheada de sílica gel, para retenção de umidade e em seguida era transferido para o analisador de gases. Na figura 5.16 pode se observar a cinética de atividade metabólica do fungo através da liberação de CO₂.

Figura 5.16. Cinética de crescimento do fungo *Metarhizium anisopliae*, através da liberação de CO₂.

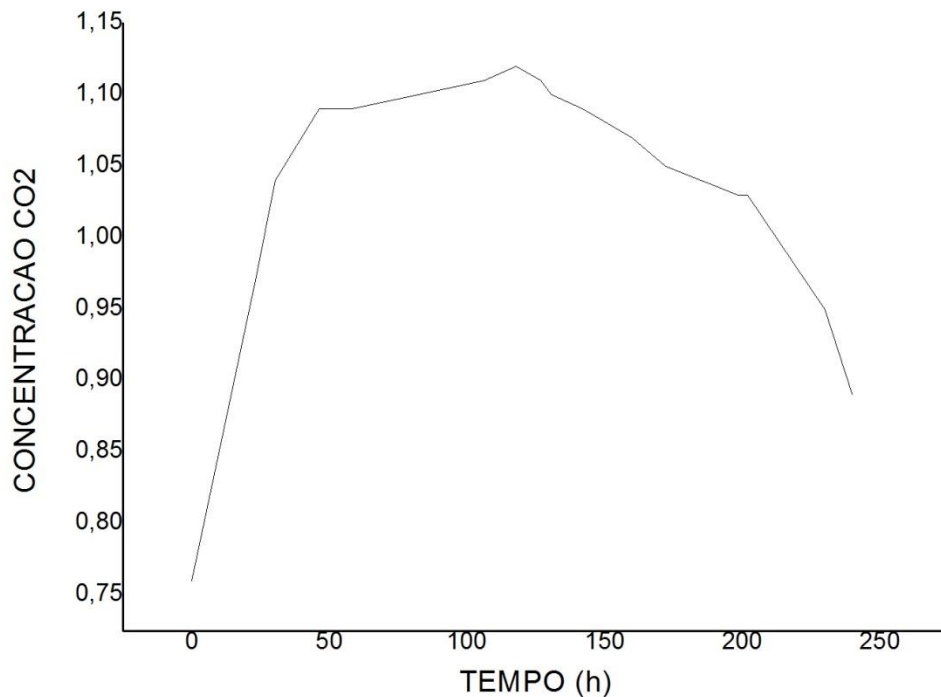


Tabela 5.6. Quantidade de esporos obtidos em biorreator de leito empacotado com 50g de arroz tipo 1 como substrato..

	C_c (10^8 esporos / mL)
Biorreator de leito empacotado	4,56

Na Figura 5.16, observou-se que a maior atividade metabólica ocorreu entre 50 e 120 horas, concordando com os dados experimentais de temperatura no centro do biorreator e nas embalagens plásticas. Com essas informações pode – se afirmar que o fungo *Metarhizium anisopliae* tem seu metabolismo acelerado desde o início da fermentação até 50 horas de cultivo, após o que entra em fase estacionária. No entanto a taxa de liberação de CO₂ foi muito baixa, indicando algum problema na determinação. Portanto, é possível acreditar-se que a cinética de atividade metabólica esteja correta, mas os valores das concentrações não.

No biorreator de leito empacotado observou-se crescimento de $4,56 \times 10^8$ esporos/ml superior, portanto, à concentração obtida no biorreator de bandeja. O resultado apresentou indícios de que o biorreator de leito empacotado é mais eficiente do que o biorreator de bandeja, porém deve – se lembrar que o teste foi realizado apenas com 50 g de arroz tipo 1, e

que com quantidades maiores de substratos e um biorreator de leito empacotado com dimensões maiores, poderiam ocorrer intensas variações radiais e longitudinais de temperaturas, comprometendo o desenvolvimento do fungo. Breukelen et al.(2011) e Dortas e Arcas (1998), demonstram em seus estudos com ampliação de escala, gradientes térmicos e gradientes de umidade, nas direções axiais e radiais, na produção do fungo *Metarhizium anisopliae*, com biorreatores de leito empacotado. Breukelen et al. (2011) também relatam em seus estudos que ao término do cultivo, observou-se que não havia crescimento do fungo *Metarhizium anisopliae* próximo as paredes do biorreator. Na Figura 5.17 pode – se observar que o crescimento do fungo *Metarhizium anisopliae* não foi uniforme por todo o meio de cultivo.

Figura 5.17. Fotos do substrato após o período de cultivo. A) visão do fundo do biorreator; b) vista lateral do substrato fora do biorreator.



6 CONCLUSÕES

O principal objetivo deste trabalho foi a produção de esporos do fungo *Metarhizium anisopliae* em biorreator de bandeja, e este objetivo foi atingido. No entanto, prevê-se dificuldades em ampliar a escala desta classe de biorreatores pelo aumento da espessura da camada de meio de cultivo, em virtude a sobreaquecimento ao longo da fermentação.

Dentre os testes realizados no biorreator de bandeja, só foram obtidos resultados positivos para 1 kg de substrato, correspondente a 2cm de espessura do meio de cultivo. Com esses resultados observou-se a necessidade de uma nova arquitetura de biorreator de bandeja, onde as dimensões de largura e comprimento sejam maiores, para aumentar a capacidade de substrato, mantendo a camada fina.

A produção de esporos do fungo foi maior em embalagens plásticas contendo pequena quantidade de substrato do que nas embalagens maiores e no biorreator, em virtude à maior uniformidade térmica na pequena camada de meio de cultivo.

A produção de esporos do fungo *Metarhizium anisopliae* com o uso de quirera de arroz é maior do que a obtida com arroz tipo 1, em embalagens plásticas com pequena ou grande quantidade de substrato, em virtude à maior área superficial da quirera, contudo, tal aumento não foi observado no cultivo no biorreator.

Através da cinética de produção de gases metabólicos observou-se que o metabolismo do fungo *Metarhizium anisopliae* é acelerado até 50 horas de cultivo, tornando-se estável à seguir.

Os dados de simulação não representaram a má dissipação de calor que o ocorre dentro do biorreator, apresentando baixas elevações na temperatura, para estudos futuros com o modelo será necessária à modificação de alguns parâmetros, que descreva melhor a fermentação durante o período de cultivo.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir da compreensão dos mecanismos e térmicos de cultivo do fungo *Metarhizium anisopliae* em biorreator de bandeja, sugere – se o que segue para o desenvolvimento de futuros trabalhos, como realizar mais testes com quirera de arroz no biorreator de bandeja, realizar fermentações em biorreator de leite empacotado em escala laboratorial e também em escala piloto, entender análises que proporcione uma melhor análise sobre a cinética de crescimento para resultados mais satisfatório com o modelo utilizado, analisar as fontes nutricionais que o arroz tipo possui, que favorecem o crescimento do fungo *Metarhizium anisopliae*, e desta forma encontrar um substrato que seja mais viável economicamente para a indústria que atenda as necessidades nutricionais para o desenvolvimento do fungo *Metarhizium anisopliae* e também desenvolver um método de extração de esporos através do uso de biorreator rotativo.

8 BIBLIOGRAFIA

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

ALVES, S. B. **Fungos entomopatogênicos : Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, p.289-381, 1998.

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

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

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

BARATTO, C. M. **Caracterização de genes de quitinases do entomopatógeno e acarida *Metarhizium anisopliae***. Tese (Doutorado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2005.

CASCIATORI, F, P; BUCK, A. B; THOMÉO, J. C; TSOTSAS, E. Two-phase and two-dimensional model describing heat and water transfer during solid-state fermentation within a packed-bed bioreactor. **Chemical Engineering Journal**. Vol. 287, Pag. 103–116. 2016.

CASCIATORI, F. P; LAURENTINO, L. C; TABOGA, S, R; CASCIATORI, P. A; THOMÉO, J. C. Structural properties of beds packed with agro-industrial solid by-products applicable for solid-state fermentation: Experimental data and effects on process performance. **Chemical Engineering Journal**. Vol. 255. Pag. 214–224. 2014.

CHOI, Y., AND M.R. OKOS. Effects of Temperature and Composition on the Thermal Properties of Foods. In Food Engineering and Process Applications. London: **Elsevier Applied Science Publishers**. 1:93-101, 1986

COSTA, P, N. **Otimização da produção de tanase por *aspergillus sp.* em fermentação em estado sólido (FES)**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade federal de lavras, 2012.

DANTAS, E. M. AQUINO, L. C. L. Fermentação em estado sólido de diferentes resíduos para a obtenção de lipase microbiana. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.12, n.1, p.81-87, 2010.

DE BONI, L. A. B. **Introdução Clássica à Química Geral**. Porto Alegre, Ed. Tchê Química Cons. Educ. LTDA, 2007.

- DEL BIANCHI, V. L; MORAES, I. O; CAPALBO, D. M.F. **Fermentação em estado sólido**. SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. Engenharia Bioquímica. São Paulo. Ed. Edgard Blücher. Cap 13. v.2, 2001.
- DORTAS, B; ARCAS, J. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-state fermentation with forced aeration. **Enzyme and Microbial Technology**. Vol. 23, Pag. 501–505.1998.
- DRIVER, F; MILNER, RJ; TRUEMAN, WH. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycological Research**, Vol. 104, p. 134-150, 2000.
- FARINAS, C, S; VITCOSQUE, G, L; FONSECA, R. F; NETO, V. B; COURI, S. Modeling the effects of solid state fermentation operating conditions on endoglucanase production using an instrumented bioreactor”. **Industrial Crops and Products**. Vol. 34, Pag. 1186–1192. 2011.
- FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. Ver. Vol. 52, Pag 179–188, 2015.
- FENG, M. G; LI, J. Intraspecific tolerance of *Metarhizium anisopliae* conidia to the upper thermal limits of summer with a description of a quantitative assay system. **Mycological Research**. Vol. 113. Pag.93–99. 2009.
- GERVAIS, P; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Vol. 13, Pag. 85–101, 2003.
- HALLSWORTH, J.E; MAGAN, N. Water and Temperature Relations of Growth of the Entomogenous Fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Pag. 261–266. 1999
- KEYSER, C.A; FERNANDES, E.K.K; RANGEL, D.E.N; ROBERTS, D.W. Heat-induced post-stress growth delay: A biological trait of many *Metarhizium* isolates reducing biocontrol efficacy. **Journal of Invertebrate Pathology**. Vol. 120, pag. 67-73. 2014
- LACEY, L. A; GRZYWACZ, D; SHAPIRO-LLAN, D. I; FRUTOS, R; BROWNBRIDGE, M; GOETTEL, M.S. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, Vol. 132, pag. 1–41, 2015.
- LANZA, L. M; MONTEIRO, A, C; MALHEIROS, E. B. Sensibilidade de *Metarhizium anisopliae* à temperatura e umidade em três tipos de solos. **Cienc. Rural**. Vol.39. 2009.
- LIU, Z.Y; LIANG, Z. Q; WHALLEY, A. J. S; YAO, Y. J. & LIU, A. Y. *Cardyiceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its Anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. **J. Invertebr. Pathol.** Vol. 78: 178-182, 2001.
- LOPES, I. C. **Produção de esporos do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em diferentes condições de cultivo e em biorreator de bandeja**. Qualificação (Mestrado em Microbiologia) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, 2015.

LOUREIRO, E.S; FILHO, A.B; ALMEIDA, J.E.M; MENDES, J.M; PESSOA, L.G.A. Eficiência de isolados de *metarhizium anisopliae* (metsch.) Sorok. No controle da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar, *mahanarva fimbriolata* (stal, 1854) (hemiptera: cercopidae), em condições de campo”. **Arq. Inst. Biol.** Vol.79, p.47-53, 2012.

MACEDO, D. **Seleção e caracterização de *Metarhizium anisopliae* visando ao controle de *Mahanarva fimbriolata* (Hemíptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar.** Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005, Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP, 2005.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N; BEROVIC, M. **Solid-State Fermentation Bioreactors Fundamentals of Design and Operation.** Berlin: Springer-Verlag. 2006.

MITCHELL, D.A; OSCAR, F. V.M; NADIA, K. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. **Biochemical Engineering Journal.** Vol. 13, Pag. 137–147. 2003.

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

PANDEY, A; SELVAKUMAR, P; SOCCOL, C.R; NIGAM, P. “Solid stade fermentation for the production of industrial enzymes”. **Current Science.** Vol. 77, p. 149-162, 1999.

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.

PERRY, R. H.; BENSLOW, L. R.; BEIMESCH, W. E.; HECHT, J. P.; KEMP, I.; LANGRISH, T.; SCHWARTZBACH, C.; SMITH, F. L. **Perry’s Chemical Engineers’ Handbook.** 8ed. New York: McGraw-Hill, 2008.

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

Raghavarao, K.S.M.S; Ranganathan, T.V; Karanth, N.G.” Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal.** Vol.13, Pag. 127–135. 2003.

RAGHEVA RAO, M.K. GOWTHAMAN, N.P. GHILDYAL, N.G. KARANTH. A mathematical model for solid state fermentation in tray bioreactors, **Bioprocess. Eng.** 8 255–262. (1993).

ROBINSON, T; NIGAM, P. Bioreactor desing for protein enrichment of agricultural residues by solid stade fermentation. **Biochemical Engineering Journal,** v. 13, p. 197-203, 2003.

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

ROVEDA JUNIOR, 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.

SABU, A; PANDEY, A; DAUD, J. M; SZAKACS, G. Tamarind seed powder and palm kernel cake: two novel agro residues for the production of tannase under solid state fermentation by *Aspergillus niger* ATCC 16620. **Bioresource Technology.** Vol. 96, Pag. 1223–1228. 2005.

SANTANA, R. S. M. **Produção de enzimas amilolíticas através da fermentação em estado sólido.** Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB - Campus de Itapetinga/Itapetinga, BA: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2012.

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

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial. Engenharia Bioquímica.** São Paulo. Ed. Edgard Blücher. Cap. 8 v.2, 2001.

SINGHANIA, R. R; PATEL, A. K; SOCCOL, C.R; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal.** Vol. 44, , Pag. 13–18.2009.

SMITS,J.P. VAN SONSBEEK, TRAMPER, H.M. KNOL, J. W. GEELHOED, W. PEETERS, M., RINZEMA, A. Modelling fungal solid-state fermentation: the role of inactivation kinetics. **Bioprocess Eng.** Vol.20, 391– 404. 1999.

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.

SZEWCZYK, K.W. The influence of heat and mass transfer on solid state fermentation. **Acta Biochim. Polon.** 40 90–92. 1993.

TEIXEIRA, H; CHITARRA, L.G; ARIAS, S.M.S; MACHADO, J.C. Efeito de diferentes fontes de luz no crescimento e esporulação in vitro de fungos fitopatogênicos. **Ciênc. Agrotec., Lavras,** Vol.25, 1314-1320, 2001.

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