



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus São José do Rio Preto

Isabela Valente Vicente

**Produção de esporos de *Metarhizium anisopliae* IBCB
425 em resíduos agroindustriais por cultivo em estado
sólido**

São José do Rio Preto

2021

Isabela Valente Vicente

Produção de esporos de *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 em resíduos agroindustriais por cultivo em estado sólido

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, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq

Orientador: Prof. Dr. João Cláudio Thoméo

Coorientador: Dr. Lucas Portilho da Cunha

São José do Rio Preto

2021

V632p

Vicente, Isabela Valente

Produção de esporos de *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 em resíduos agroindustriais por cultivo em estado sólido / Isabela Valente Vicente. -- São José do Rio Preto, 2021

141 p.

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

Orientador: João Cláudio Thoméo

Coorientador: Lucas Portilho da Cunha

1. *Metarhizium anisopliae*. 2. Resíduos agroindustriais. 3. Otimização. 4. Vigor e patogenicidade. 5. Custos de produção. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Isabela Valente Vicente

Produção de esporos de *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 em resíduos agroindustriais por cultivo em estado sólido

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, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq

Comissão Examinadora

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

Prof^a. Dr^a. Cristiane Sanchez Farinas
UFSCar – São Carlos

Prof. Dr. Gabriel Moura Mascarin
Embrapa Meio Ambiente - Jaguariúna

São José do Rio Preto

13 de maio de 2021

*À minha família e a todos que acreditaram em mim.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, sem Ele nada é possível.

Agradeço à minha família por todo o apoio e incentivo.

Agradeço à UNESP/IBILCE e o DETA pela oportunidade.

Agradeço ao meu Orientador Prof. Dr. João Cláudio pela oportunidade, por todo aprendizado e pela paciência.

Agradeço ao meu Coorientador Dr. Lucas Portilho da Cunha, quem me apresentou a UNESP, por toda ajuda, aprendizado e paciência.

Agradeço a todos os professores, colegas e funcionários da UNESP que de alguma forma colaboraram com meu trabalho.

Agradeço a todos os colegas de laboratório pela troca de experiência.

Agradeço à minha amiga Renata, que me ajudava antes mesmo que eu estivesse no mestrado.

Agradeço especialmente à minha amiga Daiane, por toda ajuda, até mesmo nas horas mais difíceis, por sempre me escutar e pela troca de experiência.

Agradeço aos alunos de graduação Maria Fernanda, Maicon e Thiago por toda ajuda.

Agradeço à empresa Oligos Biotecnologia pela colaboração.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcos Faria e ao Prof. Dr. Gabriel Mascarin pela atenção e colaboração.

Agradeço ao Prof. Fabrício Mendes, que tanto colaborou com este trabalho.

O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil.

Por fim, agradeço imensamente a todos que de alguma forma colaboraram com esta dissertação.

“Tudo posso naquele que me fortalece. ” (Filipenses 4:13)
Bíblia Sagrada

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de esporos do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 em CES, substituindo o arroz por um resíduo sólido agroindustrial, otimizando as condições de cultivo, avaliando a qualidade dos esporos produzidos e os custos de produção no substrato alternativo. Os resíduos empregados inicialmente foram: farelo de milho, quirera de milho, farelo de trigo, farelo de arroz, farelo de soja, bagaço de malte e bagaço de uva, todos acrescidos de bagaço de cana-de-açúcar (BC) para a estruturação física do meio. Realizou-se ensaios para seleção do resíduo que proporcionasse concentrações de esporos similares às obtidas no arroz e que possuísse um custo menor, por isso a mistura farelo de milho:BC foi escolhida para prosseguir com os ensaios. Realizou-se dois ensaios de otimização das condições de cultivo, com os fatores: proporção (substrato:suporte), temperatura e umidade, porém não obteve-se uma condição ótima. Portanto, fixou-se a temperatura de cultivo em 27°C, a proporção de 8:2 e a umidade de 70%, para os posteriores ensaios. A partir do ensaio de cinética de esporulação, notou-se significativo aumento da produção de esporos a partir do 10º dia de cultivo, por isso adotou-se 15 dias de cultivo, o qual alcançou $7,43 \times 10^9$ esporos/ gsa. Nos ensaios de aumento de escala, utilizou-se embalagens com 300 g de substrato como realizado na indústria, com a mistura farelo de milho:BC (7:3, 8:2 e 9:1) e somente arroz, entre as proporções de farelo de milho:BC não houve diferença estatística ($3,47 \times 10^9$; $3,17 \times 10^9$ e $3,29 \times 10^9$ esporos / gsa respectivamente), apenas quando comparado com o arroz ($5,84 \times 10^9$ esporos/ gsa). Foram realizados ensaios de vigor e patogenicidade, comparando os esporos produzidos no arroz:BC e no farelo de milho:BC, constatou-se que os esporos produzidos no farelo de milho:BC são tão vigorosos e patogênicos quando àqueles produzidos no arroz:BC. A análise de custos de produção, comparando os custos com o arroz e com o farelo de milho:BC em uma biofábrica de pequeno/médio porte, demonstrou que a substituição do substrato é viável e pode diminuir os custos com a produção de esporos em cerca de R\$ 83.649,00 reais anualmente.

Palavras-chave: *Metarhizium anisopliae*. Resíduos agroindustriais. Otimização. Vigor e patogenicidade. Custos de produção.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the spore production of the fungus *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 in CSS, replacing rice with a solid agro-industrial residue, optimizing the conditions of cultivation, evaluating the quality of the spores produced and the costs of production in the alternative substrate. The residues used initially were: corn bran, corn broken, wheat bran, rice bran, soy bran, malt bagasse and grape bagasse, all added with sugarcane bagasse (SB) for structuring medium physics. Tests were carried out to select the residue that would provide spore concentrations similar to those obtained in rice and that had a lower cost, that is why the corn bran:SB mixture was chosen to proceed with the tests. Two tests were carried out to optimize the cultivation conditions, with the following factors: proportion (substrate:support), temperature and humidity, but an optimum condition was not obtained. Therefore, the culture temperature was set at 27 °C, the proportion of 8:2 and the humidity of 70%, for the subsequent tests. From the sporulation kinetics test, there was a significant increase in spore production from the 10th day of cultivation, so it was adopted 15 days of cultivation, which reached $7,43 \times 10^9$ spores/ gsa. In the scale-up tests, packaging with 300 g of substrate was used as performed in the industry, with the mixture of corn bran:SB (7:3, 8:2 and 9:1) and only rice, between the proportions of corn bran:SB there was no statistical difference ($3,47 \times 10^9$; $3,17 \times 10^9$ and $3,29 \times 10^9$ spores/ gsa respectively), only when compared to rice ($5,84 \times 10^9$ spores/ gsa). Tests of vigor and pathogenicity were performed, comparing the spores produced in rice:SB and in corn bran:SB, it was found that the spores produced in corn bran:SB are as vigorous and pathogenic as those produced in rice:SB. The analysis of production costs, comparing the costs with rice and corn bran:SB in a small/medium sized bio-factory, demonstrated that the substrate replacement is viable and can reduce the costs with spore production in about R\$ 83,649.00 reais annually.

Keywords: *Metarhizium anisopliae*. Agro-industrial waste. Optimization. Vigor and pathogenicity. Production costs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Número de registros de produtos biológicos de 2005-2020.....	24
Figura 3.2. Ingredientes ativos utilizados no controle biológico.....	25
Figura 3.3. Ciclo de infecção do carrapato pelo fungo entomopatogênico <i>Metarhizium anisopliae</i>	27
Figura 3.4. Fluxograma do processo de produção em sistema de CES estático dos esporos do fungo <i>M. anisopliae</i>	35
Figura 3.5. Fluxograma do processamento a seco do milho.....	40
Figura 3.6. Quirera de milho.....	41
Figura 3.7. Farelo de milho.....	41
Figura 3.8. Anatomia do grão de milho.....	42
Figura 3.9. Bagaço de cana.....	44
Figura 3.10. Farelo de trigo.....	45
Figura 3.11. Farelo de arroz.....	46
Figura 3.12. Farelo de soja.....	47
Figura 3.13. Bagaço de malte.....	48
Figura 3.14. Bagaço de uva.....	50
Figura 4.1. Larva de <i>Zophobas morio</i>	60
Figura 5.1. Classificação dos grãos de arroz por intervalos de área superficial..	76
Figura 5.2. Classificação das frações de farelo de milho por intervalos de área superficial.....	77

Figura 5.3. Diagrama de Pareto para o ajuste do modelo estatístico aos fatores da primeira otimização das condições de cultivo para a mistura farelo de milho:BC, com intervalo de confiança de 95%.....	86
Figura 5.4. Diagrama de Pareto para o ajuste do modelo estatístico aos fatores da segunda otimização das condições de cultivo para a mistura farelo de milho:BC, com intervalo de confiança de 95%.....	89
Figura 5.5. Cinética da produção de esporos ao longo de 15 dias de cultivo em farelo de milho a 27°C, 70% de umidade e proporção 8:2 (substrato:BC).....	93
Figura 5.6. Divisão de custos que compõe o CAPEX.....	105
Figura 5.7. Divisão dos custos que compõe o OPEX para a produção de esporos de <i>M. anisopliae</i> em arroz.....	108
Figura 5.8. Divisão dos custos que compõe o OPEX para a produção de esporos de <i>M. anisopliae</i> em farelo de milho.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Níveis empregados nos ensaios de otimização.....	56
Tabela 4.2. Matriz de planejamento para os ensaios de otimização.....	57
Tabela 4.3. Dados gerais da produção de esporos de <i>M. anisopliae</i>	61
Tabela 5.1. Concentração de esporos dos ensaios de seleção dos substratos com 48% de umidade, à 28 °C por 10 dias de cultivo.....	65
Tabela 5.2. Concentração de esporos nos substratos macerados, à 28 °C por 10 dias de cultivo.....	67
Tabela 5.3. Classificação dos grãos de arroz por intervalos de área superficial.....	75
Tabela 5.4. Classificação das frações de farelo de milho por intervalos de área superficial.....	76
Tabela 5.5. Informações gerais do farelo de milho e arroz.....	78
Tabela 5.6. Produção de fungos entomopatogênicos em resíduos agroindustriais.....	79
Tabela 5.7. Resultados obtidos no primeiro ensaio de otimização das condições de cultivo empregando-se a mistura farelo de milho:BC.....	85
Tabela 5.8. ANOVA para o ajuste do modelo quadrático aos dados experimentais da primeira otimização das condições de cultivo com o farelo de milho:BC.....	86
Tabela 5.9. Resultados obtidos no segundo ensaio de otimização das condições de cultivo empregando-se a mistura farelo de milho:BC.....	88
Tabela 5.10. ANOVA para o ajuste do modelo quadrático aos dados experimentais da segunda otimização das condições de cultivo com o farelo de milho:BC.....	88

Tabela 5.11. Temperaturas de cultivo utilizadas na literatura para a produção de <i>M. anisopliae</i> , por CES.....	90
Tabela 5.12. Cinética da produção de esporos ao longo de 15 dias de cultivo em farelo de milho a 27 °C, 70% de umidade e proporção 8:2 (substrato:BC).....	93
Tabela 5.13. Tempos de cultivos propostos na literatura para a produção de esporos de <i>M. anisopliae</i> , por CES.....	95
Tabela 5.14. Produção de esporos em embalagens plásticas de 300 g com 15 dias de cultivo.....	97
Tabela 5.15. Vigor dos esporos produzidos na mistura farelo de milho:BC e no arroz, com 15 dias de cultivo, à 27 °C.....	99
Tabela 5.16. Patogenicidade dos esporos produzidos no farelo de milho:BC e no arroz, com 15 dias de cultivo, à 27 °C.....	100
Tabela 5.17. Custos que compõem o CAPEX para implantação de biofábrica de produção de esporos empregando farelo de milho como substrato.....	104
Tabela 5.18. Custos que compõem o OPEX para implantação de biofábrica de produção de esporos empregando arroz como substrato.....	108
Tabela 5.19. Custos que compõem o OPEX para implantação de biofábrica de produção de esporos empregando farelo de milho como substrato.....	109
Tabela 5.20. Indicadores econômicos da produção dos esporos no farelo de milho/BC.....	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABCBIO	Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico
ABIMILHO	Associação Brasileira das Indústrias do Milho
ANOVA	Análise de Variância
AP	Apressório
atm	atmosfera
b. u.	base úmida
BC	Bagaço de cana-de-açúcar
BDA	batata-dextrose-ágar
CAPEX	<i>Capital expenditure</i> – Despesas de capital
CB	Controle Biológico
CBP	Controle Biológico de Pragas
Ce	Concentração de esporos
CES	Cultivo em Estado Sólido
cm	centímetro
cm ²	centímetro quadrado
CO	Conídios
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CV	Coeficiente de Variação
d	dias
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DV	Desvio Padrão
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> - Organização da Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FES	Fermentação em Estado Sólido
FIESP	Federação das Indústrias do Estado de São Paulo
FM	Farelo de Milho
FSm	Fermentação Submersa
g	grama
GL	Graus de Liberdade
gsa	grama de substrato ativo
gss	Gramas de substrato seco

GT	Tubo germinativo
H	Hifas
h	horas
ha	hectare
kcal	quilocaloria
kg	quilograma
L	litro
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
MIP	Manejo Integrado de Pragas
mL	mililitro
mm	milímetro
MSR	Metodologia de Superfície de Resposta
N	Nitrogênio
NaNO ₃	Nitrato de sódio
°C	grau Celsius
ONU	Organização das Nações Unidas
OPEX	<i>Operational expenditure</i> – Despesas operacionais
P	Fósforo
P (p/p)	Proporção
p/p	peso por peso
<i>Payback</i>	Tempo de retorno
pH	Potencial Hidrogeniônico
PVC	Policloreto de vinila
QM	Quadrado Médio dos resíduos
R\$	Reais
SQ	Soma de Quadrados residual
T (°C)	Temperatura
TIR	Taxa Interna de Retorno
U (%)	Umidade
ufc	unidades formadoras de colônia
US \$	Dólar
UV	Ultravioleta

v/v	volume por volume
VPL	Valor Presente Líquido
μl	microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS GERAIS.....	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
3.1. Manejo Integrado de Pragas e Controle Biológico.....	22
3.2. Fungos entomopatogênicos.....	25
3.2.1. <i>Metarhizium anisopliae</i>	30
3.2.2. Produção em massa de esporos.....	32
3.3. Fermentação em estado sólido.....	36
3.4. Potencialização da produção industrial de entomopatógenos.....	37
3.4.1 Resíduos agroindustriais.....	37
3.4.1.1. Subprodutos do milho.....	39
3.4.1.2. Bagaço de cana.....	43
3.4.1.3. Farelo de trigo.....	44
3.4.1.4. Farelo de arroz.....	45
3.4.1.5. Farelo de soja.....	46
3.4.1.6. Resíduo de malte.....	47
3.4.1.7. Resíduo de uva.....	48
3.4.2. Otimização dos parâmetros de produção.....	50
3.5. Análise de custos.....	51
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
4.1. Microrganismo.....	53
4.2. Substratos empregados nos cultivos em estado sólido.....	54
4.3. Ensaios de seleção de resíduos sólidos.....	54
4.4. Ensaios de otimização das condições de cultivo com farelo de milho.....	56
4.5. Cinética de esporulação.....	57
4.6. Ensaios de ampliação de escala.....	58
4.7. Ensaios de vigor dos esporos.....	58
4.8. Ensaios de patogenicidade do fungo.....	59
4.9. Análise granulométrica.....	60
4.10. Análise de custos.....	61

4.11. Análises estatísticas.....	62
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
5.1. Ensaio de seleção dos resíduos sólidos.....	63
5.2. Ensaio de otimização das condições de cultivo com farelo de milho.....	84
5.2.1. Primeiro ensaio de otimização.....	84
5.2.2. Segundo ensaio de otimização.....	87
5.3. Cinética de esporulação.....	92
5.4. Ensaio de ampliação de escala.....	96
5.5. Ensaio de vigor.....	99
5.6. Ensaio de patogenicidade.....	100
5.7. Análise de custos de produção.....	102
6. CONCLUSÃO.....	114
7. TRABALHOS FUTUROS.....	115
REFERÊNCIAS.....	116

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da população mundial, chegando a 9,7 bilhões de pessoas até 2050 (DEJO, 2019), cresce proporcionalmente a demanda por alimentos e o desafio da produção agrícola sustentável, promovendo alimentos mais saudáveis com maior rendimento por área e menor impacto ambiental.

O controle biológico de pragas (CBP) apresenta-se como alternativa viável e sustentável na busca pela diminuição do uso de agroquímicos (SEIBER, 2014). Segundo projeções globais, estima-se um crescimento anual do mercado de agentes de CBP em US\$ 11,35 bilhões, até 2022 (DUNHAMTRIMMER, 2017). O Brasil está entre os principais países da América Latina que utiliza o CBP, com mais de 10 milhões de hectares tratados, podendo movimentar US\$ 5 bilhões nos próximos anos devido ao crescimento do mercado interno (ABCBIO, 2019a; ABCBIO, 2019b).

Dentre os microrganismos registrados para o biocontrole de pragas agrícolas, os fungos entomopatogênicos são os mais produzidos e utilizados na América Latina, com ênfase para os gêneros *Metarhizium* e *Beauveria*, os quais dividem cerca de 60% da produção total de biodenstivos na América Latina (FARIA; WRAIGHT, 2007; MASCARIN *et al.*, 2019). O fungo cosmopolita *Metarhizium anisopliae* é o mais produzido no Brasil, com aplicação em mais de 3 milhões de hectares, visando ao controle principalmente de pragas que atacam lavouras de cana-de-açúcar (ALVES *et al.*, 2008; IWANICKI *et al.*, 2018; MASCARIN *et al.*, 2019).

Metarhizium anisopliae apresenta patogenicidade a mais de 300 espécies de insetos de diversas ordens (FARGUES *et al.*, 1975; ALVES, 1998; ROBERTS; ST LEGER, 2004; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). Para que ocorra o biocontrole das pragas de modo efetivo, é necessária aplicação inundativa de esporos no campo, a uma concentração de 2×10^{13} esporos/ ha, dependendo da praga alvo, da eficiência de germinação e da virulência do isolado, o que demanda produção em massa desses propágulos (BUTT, 2002; SCHIMIDT *et al.*, 2007).

A produção em massa de esporos do fungo *M. anisopliae* é feita por cultivo em estado sólido e emprega arroz como substrato, devido às suas

características nutricionais e estrutura física (WALTER; MARCHEZAN; AVILA, 2008; CUNHA *et al.*, 2020c). Porém, o custo elevado do arroz encarece o produto final, além deste grão ser um alimento básico da nutrição humana (MASCARIN; QUINTELA, 2013; CUNHA *et al.*, 2020c).

Os resíduos sólidos agroindustriais são alternativas abundantes e econômicas em substituição ao arroz. A rica composição nutricional de alguns desses rejeitos, em açúcares, minerais e proteínas, além de boa estrutura física, fornecem condições apropriadas para a produção em massa dos propágulos fúngicos, os esporos. Ademais, a utilização de resíduos no CES auxilia na preservação do meio ambiente, pois o descarte indevido dos mesmos ou sua queima causa sérios problemas ambientais, além de agregar valor a esses resíduos, devido à geração de produtos de interesse econômico (COUTO, 2008; NASCIMENTO SILVA *et al.*, 2018). Santos *et al.* (2021), realizaram o cultivo sólido de *M. anisopliae* em diversos farelos para a produção de esporos, e obtiveram altas concentrações de esporos.

Visto isso, neste trabalho buscou-se avaliar a produção de esporos do fungo *M. anisopliae* IBCB 425, substituindo o arroz por um resíduo sólido agroindustrial otimizando as condições de cultivo, avaliando a qualidade dos esporos produzidos e o impacto desta substituição nos custos de produção industrial dos esporos deste fungo.

A importância de estudos que tornem a produção de fungos entomopatogênicos menos onerosa e mais sustentável, motivou a ampla avaliação de relevantes etapas da produção de esporos em um resíduo agroindustrial, desde a seleção de resíduos, a otimização das condições de cultivo, a qualidade dos esporos, ampliação de escala, até a viabilidade econômica industrial desta substituição.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a produção de esporos do fungo *Metarhizium anisopliae* em CES, substituindo o arroz por um resíduo sólido agroindustrial, otimizando as condições de cultivo, avaliando a qualidade dos esporos e os custos de produção no substrato alternativo.

Em vista disso, os objetivos específicos foram:

- Selecionar resíduos agroindustriais que produzam concentrações de esporos similares ou superiores às obtidas em arroz;
- A partir da identificação do substrato mais promissor, otimizar as condições de cultivo, controlando as variáveis umidade, composição e temperatura;
- Obter a cinética de esporulação do fungo *M. anisopliae* durante o cultivo com o substrato selecionado;
- Avaliar a produção de esporos no substrato selecionado e no arroz na mesma escala utilizada pela indústria;
- Avaliar o vigor e a patogenicidade dos esporos produzidos no substrato alternativo;
- Avaliar os custos de produção de esporos em arroz e no substrato alternativo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Manejo Integrado de Pragas e Controle Biológico

De acordo com estimativas da ONU (DEJO, 2019) e da FAO (2017) em 2050 a população mundial será de 9,7 bilhões de pessoas, sendo 70% desse total, urbana. Proporcional ao crescimento populacional, há o aumento da demanda por alimentos, com consumidores cada vez mais exigentes e preocupados com a qualidade do que ingere, e o desafio da agricultura sustentável. É intensa a pesquisa por práticas agronômicas que aumentem o rendimento das culturas sem aumentar a área cultivada e com menor impacto ambiental possível, e que forneça alimentos saudáveis. Visto isso, intensifica-se o uso de ações como o Manejo Integrado de Pragas (MIP).

O MIP é um conjunto práticas, as quais visam prevenir, controlar e manter pragas agrícolas abaixo do nível de dano econômico, a partir de soluções mais sustentáveis e tecnologias complementares. Une o controle físico, o químico e o biológico, com a intenção de reduzir o uso massivo de defensivos químicos, flexibilizar o manejo de pragas em diferentes culturas e melhorar a eficiência do monitoramento. Em meio as principais ações, destacam-se: controle cultural ou físico, rotação de cultura, destruição de focos secundários e hospedeiros alternativos, adubação, poda, irrigação, drenagem, uso de barreiras, consórcio de culturas; controle biológico, uso de inimigos naturais, patógenos, predadores, parasitoides; controle comportamental, manejo com feromônios, atrativos ou repelente; controle genético, plantas transgênicas, melhoramento de cultivares selecionadas resistentes; controle químico, uso racional de produtos químicos e tecnologias, ferramentas de precisão para monitoramento (BIRCH; BEGG; SQUIRE, 2011; PARRA, 2014).

O controle biológico (CB) é a introdução ou o manejo de inimigos naturais em uma determinada área, visando ao controle de pragas agrícolas, mantendo o equilíbrio populacional. O CB é uma das principais práticas alternativas ao uso de pesticidas químicos, por apresentar vantagens interessante do ponto de vista sustentável, como: menor impacto ambiental, não são moléculas químicas sintéticas, tem baixa ou nenhuma toxicidade, não gera

resíduos tóxicos, não polui, possui alta seletividade, mantendo organismos benéficos, não desenvolvem pragas resistentes, mantém a biodiversidade e não tem restrições no cultivo orgânico (BETTIOL *et al.*, 2009; SEIBER *et al.*, 2014).

O aumento do rendimento das culturas traz a vulnerabilidade das mesmas ao ataque de pragas, uma grande parcela do que é produzido não é aproveitado por causa de pragas agrícolas. Neste cenário, reduzir o uso de agroquímicos torna-se um desafio, não só pelas suas desvantagens, como: custo com dependência, custo para reduzir impactos na saúde e meio ambiente, controle a curto prazo, resistência a pragas, alta toxicidade e perda da biodiversidade, mas, pelo alto custo para desenvolver moléculas de pesticidas novas, e pelas exigências do mercado externo. O Brasil, como um dos maiores países exportadores de *commodities*, deve adequar suas mercadorias às exigências do mercado internacional, que muitas vezes não aceita produtos que tenham sido tratados com determinados defensivos químicos (FAROOQ; FREED, 2016; OMKAR, 2016; FONTES; VALADARES-INGLIS, 2020). Omark (2016), realizou um comparativo de custos, para o desenvolvimento de um novo bioinseticida pode chegar cerca de US\$ 2 milhões de dólares o investimento, para desenvolver moléculas sintéticas novas de pesticidas, o custo pode chegar a US\$ 150 milhões de dólares.

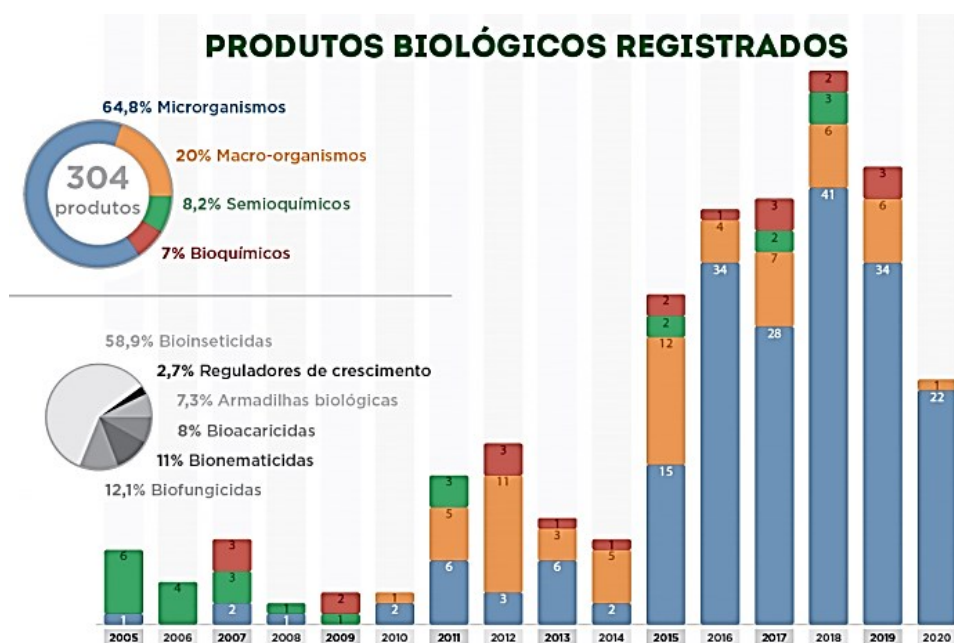
Devido à extensa área agrícola do Brasil, aliada à busca por produtos sustentáveis e orgânicos, tanto pelo mercado interno quanto externo, disparam o uso de produtos de origem biológica, colocando o país como um dos maiores protagonistas em programas de controle biológico de pragas do mundo (SANTOS *et al.*, 2017).

Segundo projeções globais, para 2025, a taxa de crescimento anual do mercado de biopesticidas deve ser superior a 16%, em virtude da alta demanda dos mercados latino-americano e asiático. Na América Latina, cresce o uso de práticas sustentáveis e assim o emprego de biológicos, com projeções de crescimento de 18% ao ano, com destaque para o Brasil, o México e a Argentina, países com grandes demandas desses produtos. Estimativas apontam para um aumento do mercado de biológicos na América Latina, podendo ultrapassar o continente asiático, até 2025, região está com maior participação no mercado (DUNHAMTRIMMER, 2017). Entre os anos de 2017 e 2018, verificou-se um aumento de 77% na comercialização de produtos de controle biológico,

movimentando cerca de R\$ 464,5 milhões, a expectativa é que chegue a alcançar US\$ 5 bilhões nos próximos anos. O mercado de biológicos no Brasil está em constante crescimento, segundo estimativas 25% ao ano, acima do esperado para o mercado global (ABCBIO, 2019a; ABCBIO, 2019b).

Atualmente, o uso do controle biológico no Brasil passa dos 10 milhões de hectares tratados, principalmente nas culturas de maior interesse econômico, como: soja, milho e cana-de-açúcar. Contando com mais de 228 produtos de origem biológica, registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), como apresentado na Figura 3.1., com ingredientes ativos a base de: insetos, bactérias, vírus, nematoides e fungos, este último ocupando uma parcela significativa (Figura 3.2.), além de produtos derivados de plantas e feromônios (SARWAR, 2015; ABCBIO, 2019a; ABCBIO, 2019b; FONTES; VALADARES-INGLIS, 2020).

Figura 3.1. Número de registros de produtos biológicos de 2005-2020.

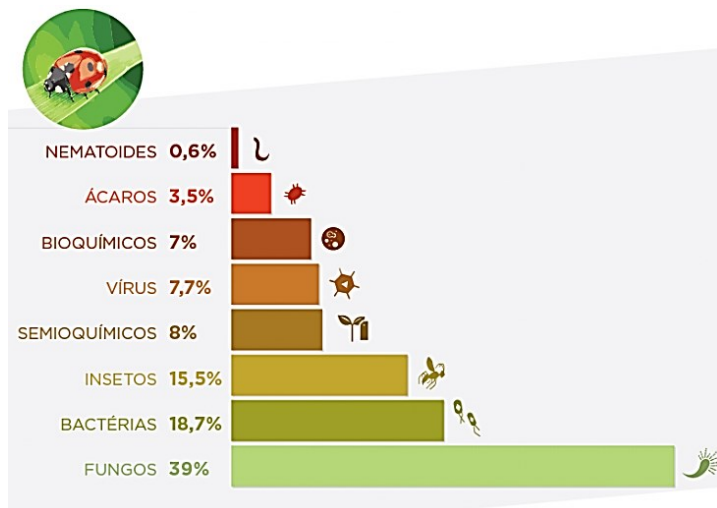


Fonte: CROPLIFE BRASIL, 2020; AGROFIT, 2020.

Algumas bactérias e vírus também são estudados e utilizados no controle biológico, porém diferentemente dos fungos, os vírus por exemplo, possuem um ciclo de vida curto e necessitam de um hospedeiro vivo para se multiplicarem, além disso, esses microrganismos precisam ser ingeridos para provocarem doenças em insetos, ao contrário dos fungos que agem por contato,

potencializando o modo de ação e eficientes no controle da praga, abrangendo uma ampla gama de hospedeiros (LEE *et al.*, 2015; HUMBER, 2016).

Figura 3.2. Ingredientes ativos utilizados no controle biológico.



Fonte: CROPLIFE BRASIL, 2020; AGROFIT, 2020.

3.2. Fungos entomopatogênicos

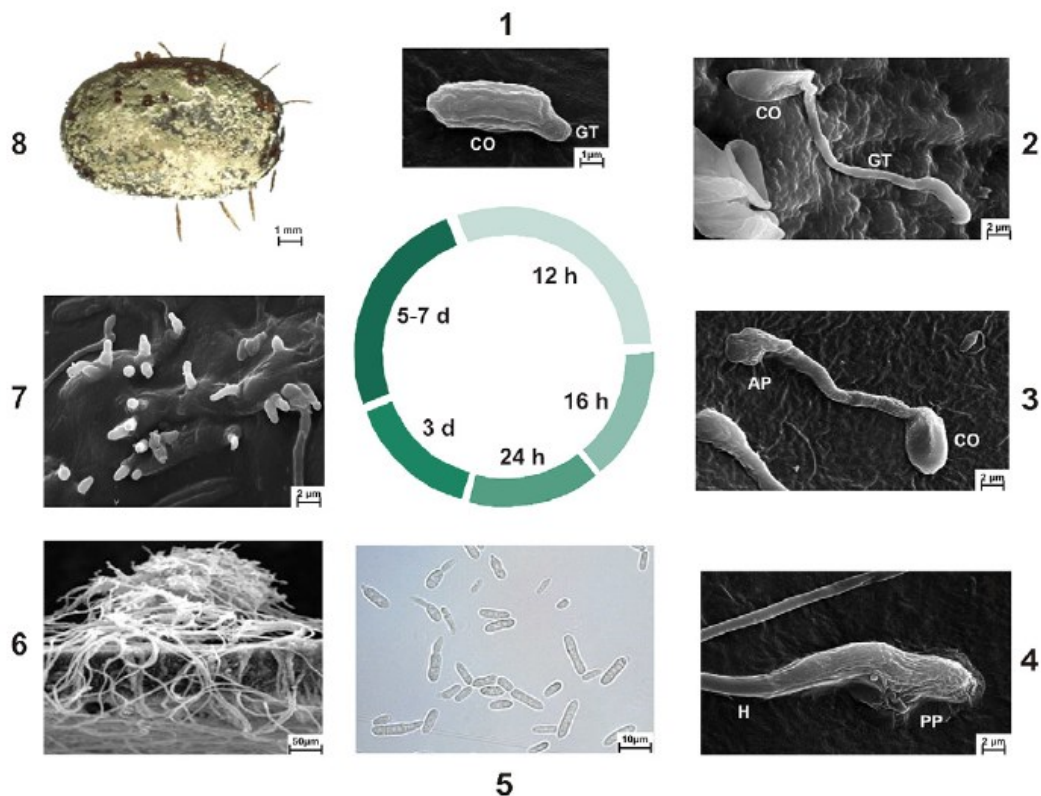
Os principais fungos entomopatogênicos utilizados pertencem ao filo dos Ascomycotas, sendo os gêneros mais relevantes: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Akanthomyces* (anteriormente *Lecanicillium*) e *Cordyceps* (anteriormente *Isaria*), e as espécies *Metarhizium rileyi* (anteriormente *Nomuraea*) e *Hirsutella thompsonii* (ROY *et al.*, 2006; JARONSKI, 2014; KEPLER *et al.*, 2017).

Microrganismos entomopatogênicos são aqueles que possuem a capacidade de desenvolverem doenças em determinados insetos, parasitando o hospedeiro e iniciando o processo de infecção, são classificados como inimigos naturais (FONTES; VALADARES-INGLIS, 2020).

O processo de infecção ocasionado pelo fungo em artrópodes é complexo, e implica em uma série de reações físicas, químicas e biológicas. Devido ao modo de ação ser por contato, estes microrganismos são capazes de infectar pragas em diferentes instares. O processo inicia quando os esporos do fungo entram em contato com a cutícula do hospedeiro, composta em grande parte por quitina, a qual reveste o corpo e o intestino do inseto. Em seguida, ocorre o reconhecimento do inseto pelo microrganismo, e a adesão dos esporos

a cutícula, através de ligações hidrofóbicas de van der Waals e interações eletrostáticas. A partir disso, os esporos começam a germinar, produzem hifas de penetração, tubos germinativos e apressórios, esses rompem a carapaça quitinosa pela ação mecânica e secreção de enzimas, como: proteases, lipases, quitinases, celulasas, β -galactosidases e peptidases, entre outras, encontradas principalmente nos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria* e *Cordyceps*, as quais degradam compostos da cutícula, permitindo a chegada à hemolinfa (fluido que preenche os vasos e a hemocela, nos invertebrados, com características mistas do sangue e da linfa dos vertebrados). O então processo de penetração é complexo e pode variar, devido a composição da quitina ser heterogênea, diferindo de acordo com a espécie, alimentação e instar do inseto. Quando atinge a hemolinfa, o fungo produz estruturas semelhantes a leveduras, chamados blastosporos, para evitar que o sistema imunológico do inseto o reconheça e comece a se defender, em seguida começa a produção de toxinas que provocam distúrbios no inseto, e então o fungo passa a utilizar os nutrientes do hospedeiro, levando-o a morte, esse processo como um todo leva cerca de 3 a 7 dias após o primeiro contato. Após a morte do inseto, a ação enzimática que ocorreu fornece nutrientes para o fungo, o qual produz hifas que emergem do corpo do então hospedeiro e esporula sob condições ideais, transformando o cadáver do inseto em foco secundário de dispersão de seus propágulos, possibilitando o início de um ciclo (Figura 3.3. e 3.4.) (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010; JARONSKI, 2014; SÁNCHEZ-PÉREZ *et al.*, 2014; FONTES; VALADARES-INGLIS, 2020).

Figura 3.3. Ciclo de infecção do carrapato pelo fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. 1 - aderência de conídios a cutícula do hospedeiro; 2 - germinação dos conídios; 3 - diferenciação do tubo germinativo em apressórios; 4 - penetração da cutícula; 5 - microscopia óptica de diferenciação de hifas em blastosporos e corpos de hifas; 6 - colonização do hospedeiro; 7 - extrusão para a superfície do cadáver hospedeiro e 8 - produção de conídios em cadáveres de carrapatos. CO - conídios; GT - Tubo germinativo; AP - apressório; H - hifas; h - horas; d - dias; digitalização microscópio eletrônico.



Fonte: SCHRANK; VAINSTEIN, 2010.

Para que o processo de infecção ocorra com êxito, são necessárias condições ideais as quais influenciam diretamente o fungo, como: fatores ambientais, alta umidade relativa, temperaturas amenas, moderada incidência de radiação UV, solo e biota; fatores do patógeno, alta patogenicidade, virulência e especificidade, persistência no campo e estabilidade no armazenamento; fatores do hospedeiro, grau de suscetibilidade ao patógeno, instar, condições do sistema imunológico, dieta e densidade populacional. Ventos, chuvas e organismos da biota, podem auxiliar na dispersão de propágulos dos patógenos (BUTT, 2002; FONTES; VALADARES-INGLIS, 2020).

A escolha de um microrganismo para uso no controle biológico, depende de características importantes, como: tipo de propágulo produzido, no caso dos fungos são os esporos; entomopatogenicidade; boa virulência; capacidade de tolerância as variáveis ambientais, dessecação, radiação UV, temperatura; rápida velocidade de germinação; eficiente processo de infecção; alta especificidade a pragas de interesse; possibilidade de produção em massa viável e em substratos alternativos; possibilidade de incorporação de adjuvantes para formulações comerciais, sem comprometimento da qualidade, estabilidade durante o armazenamento e aplicação, e segurança a saúde humana e animal (BUTT, 2002; POURSEYED *et al.*, 2010).

Existem diferentes tipos de formulações para produtos biológicos, sendo as principais: propágulos extraídos por peneiração ou misturados com o substrato triturado em que cresceram, formulados como pó molhável; concentrado emulsionável; péletes; cápsulas, entre outros (KARANJA, PHIRI, ODUOR, 2010; ABCBIO, 2019c). As formulações mais utilizadas pelas indústrias são a de pó molhável. A extração de propágulos por peneiração é possível com equipamentos próprios para esta finalidade e que não exigem alto investimento, geralmente há incorporação de adjuvantes que auxiliam na aplicação. Já a mistura de propágulos com o meio de crescimento triturado pode ser possível com equipamentos mais simples, não geram resíduos, porém pode ocorrer problemas como o entupimento do bico de pulverização, caso essa mistura não fique bem homogênea. Faria; Magalhães (2001), citam que muitos produtos, geralmente, ainda são rústicos, com grandes quantidades de inertes e pouco práticos, fatores que podem levar ao entupimento no momento da aplicação. O tipo de formulação depende da estabilidade e do tipo de propágulo produzido, do método de aplicação e até mesmo da praga alvo.

Os gêneros *Metarhizium* e *Beauveria* são os fungos entomopatogênicos mais produzidos e empregados no controle biológico, pelo vasto espectro de pragas que atingem (principais ordens: coleópteros, lepidópteros e hemípteros) e pela possibilidade de reprodução em laboratório (MICHEREFF FILHO *et al.*, 2009; RUIU, 2018). Na América Latina, mais de 60% do mercado de produtos biológicos correspondem aos fungos entomopatogênicos, onde as espécies *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* dividem igualmente esta grande parcela (FARIA; WRAIGHT, 2007; NISHI; SATO, 2017). No Brasil, *M. anisopliae*

representa mais de 90% do total de fungos produzidos. Com aplicação em mais de 3 milhões de hectares, para o controle principalmente de cigarrinhas (Hemiptera: *Cercopidae*) da cana-de-açúcar, a qual pode gerar perdas em torno de 11% no peso da safra e 15% na produção industrial, colocando o Brasil como portador do maior programa de controle biológico com entomopatógenos fúngicos, do mundo (ALVES *et al.*, 2008; ALMEIDA, 2014; SANTOS *et al.*, 2017; IWANICKI *et al.*, 2018).

Além do uso para controle biológico, os fungos também podem ser utilizados em consórcio como biofertilizantes para plantas de interesse econômico. Os biofertilizantes são uma alternativa sustentável, econômica e saudável, para reduzir a dependência por fertilizantes químicos e outros agroquímicos, visto que aumentam a produtividade da área tratada, melhoram a nutrição da planta e os agroecossistemas, entre outros. Em meio as vantagens, as mais citadas e estudadas são no auxílio da fixação nitrogênio atmosférico (N), na solubilização do fósforo (P) e na síntese do sideróforo (composto orgânico que atua na captação de ferro pelos organismos) para formar nutriente que torna o ferro facilmente disponível para a planta (JI *et al.*, 2020). Vega (2018), realizou uma revisão sobre o avanço nos estudos do uso de fungos entomopatogênicos como endófitos e biofertilizantes de plantas, relatou que de 85 artigos publicados sobre o tema até 2017, 93% concentra os gêneros *Metarhizium* e *Beauveria*, sendo que a maior parte dos trabalhos envolvem culturas anuais e perenes de grande importância agrônômica. Litwin; Nowak; Rózska (2020), citam que esses mesmos gêneros de fungos podem ser utilizados também para a remoção de poluentes tóxicos, de metais pesados, para a biossíntese de nanopartículas e a biotransformação esteroides. Farias *et al.* (2018), estudaram o consórcio de cinco fungos entomopatogênicos, *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Pochonia chlamydosporia*, *Purpureocillium lilacinum*, e *Trichoderma asperellum*, como promotores no crescimento das plantas e colonizadores da micorrízica arbuscular de cana-de-açúcar, milho e soja, e constataram que o consórcio de fungos melhora o crescimento radicular da soja e milho e colonizam a micorrízica arbuscular da soja e da cana-de-açúcar. Relatam que isso provavelmente acontece devido aos fungos serem produtores de fitohormônios, e induzirem as plantas a produzirem fitohormônios, além de melhorar a absorção de nutrientes e água do solo. Behie; Bidochka (2014), mencionam a possibilidade de relações

simbióticas entre fungos do solo e plantas terrestres, como benefício, a transferência de nitrogênio mineralizado. As plantas terrestres perdem nitrogênio para insetos herbívoros, os fungos entomopatogênicos endófitos infectam e matam esses insetos, e estabelecem relações com as plantas, assim transferem o nitrogênio desses insetos para as plantas novamente. Em estudos, o fungo *Metarhizium* foi capaz de transferir quantidades significativas de nitrogênio derivado de insetos às plantas, aumentando a produtividade geral.

3.2.1. *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium anisopliae é um fungo entomopatogênico, pertence ao filo Ascomycota, ordem Hypocreales, tem como habitat o solo, a rizosfera de plantas e artrópodes, é encontrado em várias regiões do mundo. É um dos fungos mais produzidos e utilizados no controle biológico, devido às condições necessárias ao seu desenvolvimento, como temperatura e umidade, e a ampla gama de hospedeiros que parasita. De acordo com Alves (1998), a temperatura ideal de desenvolvimento do fungo *M. anisopliae* é entre 24 e 30°C e em pH 6,9, condições ótimas de crescimento, o que facilita a sobrevivência do fungo após ser aplicado a campo, além da capacidade de crescer em substratos alternativos e viáveis, em massa. *M. anisopliae* é um fungo filamentosso anamórfico, cresce vegetativamente com hifas, produzindo micélios, reproduz assexuadamente formando esporos, propágulos utilizados no controle de pragas. Devido à coloração esverdeada de seus esporos, o que auxilia na proteção contra raios ultravioleta (UV), quando há o processo de infecção em um inseto-praga, ocorre a muscardine verde, fenômeno no qual o fungo recobre o cadáver do inseto com seus esporos. (ALVES 1998; ROBERTS; ST LEGER, 2004; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010).

Os fungos filamentosos crescem nos substratos sólidos em forma de hifas, que podem ser aéreas, que estão em contato com o ar, ou penetrantes, que são as que estão em contato direto com o meio, responsáveis pela degradação enzimática do substrato (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006). Portanto, a preferência do fungo por algum substrato se dá principalmente pela

sua capacidade de produzir enzimas e pela composição do substrato contendo nutrientes que sejam assimiláveis.

O grande interesse por esse fungo se deve principalmente à sua ampla patogenicidade a mais de 300 espécies de insetos, pertencentes a várias famílias de diferentes ordens, como: Orthoptera, Dermaptera, Hemiptera, Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Coleoptera e Homoptera, entre outras (FARGUES *et al.*, 1975; ALVES, 1998). Entre as pragas que este fungo controla, destacam-se: o carrapato de gado *Rhipicephalus microplus* (FERNANDES; BITTENCOURT; ROBERTS, 2012); o cascudinho dos aviários *Alphitobius diaperinus*, uma das principais pragas da avicultura (ALVES *et al.*, 2004); contra piolhos de aves, *Mallophaga* (BENELLI *et al.*, 2018); contra gafanhotos *Schistocerca gregaria*, *Schistocerca pallens*, *Stiphra robusta* e *Rhammatocerus schistocercoides*. (TOUNOU *et al.*, 2008, VALICENTE, 2009); cupins do gênero *Cornitermes* (VALICENTE, 2009; FALAHZADAH *et al.*, 2019); *Haematobia irritans* (mosca do chifre) e *Stomoxys calcitrans* (mosca-dos-estábulo) (VELASCO-REYES *et al.*, 2019); *Helicoverpa armigera* (FITE *et al.*, 2020); *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho) (RAMOS *et al.*, 2020); no Brasil, *M. anisopliae* é usado para controlar um complexo de cigarrinhas, incluindo *Mahanarva fimbriolata* (cigarrinha-da-raíz) e *Mahanarva posticata* (cigarrinha-das-folhas), *Deois flavopicta* (cigarrinha-dos-capinzais), *Notozulia entreriana* (cigarrinha-das-pastagens) (ALVES 1998; FARIA; MASCARIN *et al.*, 2019; ALMEIDA, 2019) e vetores de doenças humanas, como: vetores da dengue, do vírus da chikungunya, da zika e da febre amarela (*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*) (SCHOLTE; TAKKEN; KNOLS, 2007), da malária (*Anopheles gambiae*) (SCHOLTE *et al.*, 2003; SCHOLTE; TAKKEN; KNOLS, 2007; GREENFIELD *et al.*, 2015).

Segundo Quintela; Yokoyama; Roberts (1994), após três repicagens consecutivas, o fungo *M. anisopliae* deve ser passado por um inseto hospedeiro para readquirir vigor e virulência característicos. Butt *et al.* (2006), relatam que é perceptível o declínio na virulência de fungos entomopatogênicos a cada repicagem e que essa taxa é diferente entre as cepas, sendo que alguns fungos diminuem sua virulência a partir da primeira repicagem e outros a mantêm por até 12 repicagens.

Shah; Wang; Butt (2005), recuperaram a virulência de *M. anisopliae*, através do cultivo em larvas de *Tenebrio molitor* e *Galleria mellonella*, e verificaram que a passagem dos esporos pelos hospedeiros aumentou a virulência e a taxa de germinação dos mesmos. Mora *et al.* (2016), avaliaram a virulência de diferentes isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* contra larvas de *T. molitor* e *G. mellonella* e analisaram o tempo letal a partir de tratamentos com diferentes concentrações de esporos. *G. mellonella* e *T. molitor* são insetos-praga conhecidos por serem suscetíveis a essas duas espécies de fungos entomopatogênicos, por isso são usados como insetos modelo para a recuperação do vigor de fungos entomopatogênicos do solo, e também como insetos hospedeiros modelos em bioensaios (MONTESINOS-MATÍAS *et al.*, 2011).

Tenebrio molitor (tenébrio pequeno) e *Zophobas morio* (tenébrio gigante) são pragas que acometem muitos silos de armazenamento de grãos, gerando grande perdas. Entretanto, também são criados para alimentação de répteis, aves e peixes, devido ao seu alto valor proteico. São encontrados em casas de pesca e vendidos para servirem de iscas. São menos exigentes quanto à alimentação, quando comparado a *G. mellonella*, que exige uma dieta mais específica e complexa (ORESTE *et al.*, 2012; MORA *et al.*, 2016).

Para que o controle biológico seja efetivo, faz-se necessária a aplicação inundativa de esporos no campo, uma concentração de 2×10^{13} esporos / ha de *M. anisopliae* para atingir 88,4% de letalidade, o que requer a produção em massa desse propágulo, garantindo que o inseto-praga entrará em contato com o mesmo e ocorrerá o processo de infecção (BUTT, 2002; SCHIMIDT *et al.*, 2007). Obtendo uma concentração de esporos na ordem de 10^9 esporos/ g de substrato, seriam necessários de 1,5 a 8 kg de substrato com esporos por hectare para alcançar a dose recomendada em um único tratamento (ANGEL-CUAPIO *et al.*, 2015).

3.2.2. Produção em massa de esporos

Ravensberg (2011), cita etapas e pontos críticos importantes na produção em massa de fungos entomopatogênicos, a qual requer cuidados. Que consiste em:

Escolha do fungo – se é possível a produção em laboratório, em larga escala e qual a capacidade de crescimento em substratos alternativos; qual a faixa de hospedeiros que atinge; vigor e virulência; se é viável economicamente; se tem mercado e qual o tipo de propágulo que será produzido. Os esporos são preferidos aos blastosporos, por serem hidrofóbicos, isso lhes conferem maior resistência durante o processo em larga escala, armazenamento e após aplicação em campo.

Método de produção – influencia diretamente a quantidade e qualidade dos propágulos; deve proporcionar condições para a produção de grandes quantidades de propágulos e de alta qualidade com o menor custo possível, além da possibilidade de ampliação de escala. Devido a preferência pelos esporos, esses são em grande maioria produzidos por cultivo em estado sólido (CES), a escala de produção é um dos principais parâmetros que determinará as possíveis escolhas de produção.

- Meio de cultivo: deve ser eficiente, proporcionar nutrientes essenciais e estrutura para o crescimento do fungo e preferencialmente ser de baixo custo, como alguns resíduos por exemplo. Pode-se otimizar o meio, visando maiores rendimentos, a partir de pré-tratamentos e uso de aditivos.

- Método de cultivo em estado sólido – em sacos plásticos: baixos custos iniciais e de instalação, baixo conhecimento técnico, altos custos com mão-de-obra, risco de contaminação e dificuldades em aumento de escala; biorreatores: controle de parâmetros, menor risco de contaminação, custo de inicialização médio alto e de instalação, conhecimento técnico necessário e influência da composição do meio.

- Extração dos esporos – algumas empresas fornecem o meio de cultivo triturado juntamente com os esporos, o que pode acarretar problemas de entupimento durante a pulverização do produto, porém existem equipamentos que fazem a separação de esporos do substrato, seja por centrifugação ou por peneiras, obtendo um produto mais puro e homogêneo, sem afetar a qualidade do mesmo.

Formulação – deve ser estabelecida uma dose, previamente testada e que tenha bons resultados em campo, satisfazendo as necessidades de controle; ter longo prazo de validade sem perder a qualidade e viabilidade; ser um produto de fácil manejo, tanto para transporte quanto para aplicação em

campo; ter adjuvantes que não interfiram na qualidade do produto, ou que possam melhorar o mesmo, sem riscos para o aplicador; ser bem embalado e com especificações como: número de propágulos no produto, viabilidade, virulência (eficácia), pureza (contaminantes microbianos), parâmetros físicos (nível de umidade, tamanho de partícula) entre outros exigidos pela legislação.

Armazenamento – é crucial, se refrigerado pode manter a qualidade dos esporos por mais tempo e manter a estabilidade do produto até que chegue ao seu destino, porém tem um custo maior.

Atualmente, a maior parte da produção de biopesticidas no Brasil é por CES, carente de tecnologias avançadas, processos sofisticados e controle de parâmetros, dependendo em grande parte de procedimentos artesanais e intensa mão-de-obra. A produção em escala industrial do fungo *M. anisopliae* (Figura 3.4.), ocorre em sacos de polipropileno transparentes, com aproximadamente 300 - 500 g de arroz tipo 1, substrato utilizado pelas indústrias devido suas características nutricionais e estrutura física proporcionarem o crescimento do fungo, o qual é previamente umedecido e esterilizado. Após o substrato ser inoculado manualmente, com suspensão de esporos, estes são acomodados nas prateleiras em salas climatizadas a 28° C por 15 dias, posteriormente a esse período as embalagens são abertas e dispostas em salas com desumidificadores por cerca de 7 dias, para que em seguida ocorra a extração a seco de esporos do substrato, por agitação mecânica ou peneiras, ou a trituração do substrato juntamente com os esporos, e assim formulação do produto seco (ALVES; FARIA, 2010; MASCARIN; QUINTELA, 2013; CUNHA *et al.*, 2020b; CUNHA, 2020c).

Figura 3.4. Fluxograma do processo de produção em sistema de CES estático dos esporos do fungo *M. anisopliae*.



Fonte: a própria autora.

O arroz (*Oryza sativa*) tipo 1 é o substrato de cultivo mais utilizado pela indústria para a produção não só do *M. anisopliae*, mas também de outros fungos entomopatogênicos, pois fornece nutrientes essenciais em quantidades satisfatórias para o crescimento e desenvolvimento desses fungos, além de proporcionar adequada área superficial para colonização. É fonte de amido, carboidrato importante, que é degradado por enzimas amilolíticas produzidas por *M. anisopliae* e posteriormente consumido pelo fungo, também proporciona proteínas, vitaminas e minerais. O arroz é um dos cereais mais consumidos no mundo, e tem relevante importância na economia de países como o Brasil. Por esse motivo e devido ao fato do arroz utilizado para o crescimento fúngico ser o mesmo tipo de arroz utilizado para a alimentação humana, a demanda concorre frente ao preço de mercado encarece o produto final, que são os esporos (YE *et al.*, 2006; WALTER; MARCHEZAN; AVILA, 2008; CUNHA, 2020c).

3.3. Fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido (FES) pode ser definida como o processo envolvendo o crescimento microbiano em materiais sólidos, na ausência de água líquida livre. Entretanto, o meio deve possuir umidade suficiente para o desenvolvimento e crescimento microbiano. A água presente encontra-se fortemente ligada a esse meio, e deve estar em quantidade adequada, pois se a umidade for insuficiente, não ocorre a difusão de solutos e nutrientes, há um estresse hídrico e a desnaturação de enzimas importantes que influenciam diretamente o metabolismo do microrganismo. Se a umidade for alta, não há a difusão de gases nos espaços entre os sólidos. Os meios são insolúveis e atuam como suporte e/ou fonte de nutrientes essenciais para o crescimento microbiano (GERVAIS; MOLIN, 2003; PANDEY, 2003; CASCIATORI, 2011).

A FES possui alguns aspectos importantes frente à fermentação submersa (FSm), os quais influenciam diretamente na escolha de qual usar. Vantagens da FES: maiores rendimentos; devido à baixa umidade; menos chances de contaminação; menos gasto com o produto final, visto que é mais concentrado; custos mais baixos com o tratamento de resíduos; melhor aeração; simula condições do habitat natural de fungos, principal grupo de microrganismos de interesse e mais utilizados na FES; baixo consumo de energia e a possibilidade de uso como meio de crescimento, substratos simples e de baixo custo, como resíduos agroindustriais abundantes, os quais na maioria das vezes servem como suporte e fonte nutrientes para o microrganismo, sem a necessidade de suplementação do meio, além de manterem a disponibilidade durante a fermentação (PANDEY, 2003; HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004; WANG; YANG, 2007; MIENDA; IDI; UMAR, 2011).

Em virtude das características da FES, os fungos filamentosos se adaptam melhor a esse tipo de fermentação. As hifas permitem o crescimento em diferentes substratos, são menos exigentes nos requisitos umidade e nutrientes, quando comparados a outros microrganismos, facilitando a produção, os esporos são maiores, mais resistentes (por ter uma parede externa mais espessa), estáveis a estresses e tem maior viabilidade do que aqueles produzidos em FSm, além de serem hidrofóbicos, fator de relevância para o processo de infecção no inseto-praga (AGOSIN *et al.*, 1997; FENG; LIU; TZENG,

2000; HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004; WANG; YANG, 2007; CASCIATORI, 2011; JARONSKI; JACKSON, 2012; DE LA CRUZ QUIROZ *et al.*, 2015).

3.4. Potencialização da produção industrial de entomopatógenos

3.4.1 Resíduos agroindustriais

O interesse no uso de resíduos sólidos agroindustriais para a produção de esporos de fungos entomopatogênicos por CES, surge como possibilidade para diminuir o custo de produção, dar um destino sustentável a esses rejeitos e agregar valor. Boa parte dos resíduos e subprodutos agroindustriais são destinados a alimentação animal devido ao seu baixo valor de mercado. Entretanto, alguns resíduos, como aqueles derivados do milho, passam por processamentos para melhorar o aproveitamento e a digestibilidade do alimento no trato ruminal (MOURÃO *et al.*, 2012), o que pode acarretar custos. Visto que, o uso de resíduos para a produção de microrganismos entomopatogênicos pode agregar maior valor a estes substratos.

Entende-se por resíduos agroindustriais, materiais ou subprodutos orgânicos e biodegradáveis, que foram descartados em algum processo. São oriundos do processamento de plantas ou animais, provenientes principalmente da indústria de alimentos, agricultura, silvicultura e resíduos domésticos. Em países como o Brasil, com extensa área e intensa atividade agrícola, esses rejeitos são produzidos em abundância e tem inferior valor de mercado. Com isso, tornam-se alternativas ao uso do arroz tipo 1, reduzindo os custos operacionais e assim do produto final (ZHANG; JIN; KELLY, 2007; COUTO, 2008).

O uso desses resíduos no CES gera produtos de interesse e de alto valor agregado, e torna o processo sustentável, uma vez que as empresas deixam de gastar com o descarte desses rejeitos, que quando eliminados de maneira incorreta, como em aterros ou queimados geram sérios problemas ambientais (COUTO, 2008; CASCIATORI, 2015).

De acordo com Balasubramanian; Tyagi (2017), a produção de biopesticidas e biofertilizantes a partir de resíduos, economiza cerca de US\$ 20 bilhões em pesticidas e fertilizantes químicos na agricultura.

Embora os resíduos agroindustriais diferem entre si em vários parâmetros, de modo geral são ricos em açúcares, proteínas e minerais, e possuem características estruturais e mecânicas favoráveis, proporcionando condições ao crescimento de fungos filamentosos. A escolha do meio que servirá como substrato, depende de características como, composição química, capacidade de retenção de água, tamanho das partículas e área superficial, entre outros, visto que interferem diretamente no processo de produção e na qualidade dos propágulos, virulência, viabilidade e estabilidade. Cada microrganismo possui necessidades nutricionais específicas, além disso, partículas muito pequenas aumentam a área superficial, porém, com o crescimento microbiano, ocorre a diminuição dos poros, e problemas com a transferência de massa e gases, dificultando a remoção do calor metabólico produzido, prejudicando o desenvolvimento microbiano (PANDEY *et al.*, 1999; DEL BIANCHI; MORAES; CAPALBO, 2001; CASCIATORI, 2011; JARONSKI; JACKSON, 2012; FARINAS, 2015).

Além dos atributos relacionados aos microrganismos, fatores de produção também influenciam na escolha do resíduo a ser utilizado, como: a disponibilidade e o custo do processo de produção em massa em si, o qual deve ser de baixo custo e produzir altas concentrações de propágulos viáveis; o que se pretende produzir (biomassa ou esporos); se o produto tem mercado e quais as pragas alvo; tipo de formulação viável (em pó, líquida, em óleo, entre outras); características do produto final e método de aplicação. Alguns substratos necessitam passar por processamento ou tratamento antes da inoculação, para se adequar às necessidades do microrganismo, como: quebra, moagem e peneiramento, para obter a granulometria desejada e um meio homogêneo; suplementação com nutrientes essenciais; correção de pH; hidrólises; umidificação; adição de agentes sequestrantes e esterilização, por exemplo, porém, algumas dessas etapas demandam um custo elevado, o que pode ser crucial na escolha do substrato (PANDEY, 2003). Os resíduos podem ser utilizados diretamente como fonte de nutrientes e suporte para o desenvolvimento microbiano, ou em alguns casos, um resíduo servirá para a demanda nutricional exigida e outro resíduo para dar suporte ao meio, o qual pode ou não ser aproveitado pelo microrganismo. Entre os resíduos mais utilizados no CES, tanto para a produção enzimática quanto para a de

biopesticidas, destacam-se: bagaços de cana-de-açúcar, laranja e mandioca, cascas de frutas, arroz e soja, palhas e farelos de trigo, arroz e milho, sabugo de milho, serragens, grãos de sorgo, soja e cevada, entre outros (PANDEY; KANAUIA, 2008; CASCIATORI, 2011; CASCIATORI *et al.*, 2014; REDDY *et al.*, 2017). Segundo Pandey *et al.* (2000), o uso do bagaço de cana-de-açúcar em bioprocessos representaria uma fração mínima do total produzido, por isso o interesse, caso essa quantia viesse a afetar o suprimento às usinas, isso poderia fazer com que estas buscassem por fornos mais eficientes.

Segundo a projeção agropecuária a longo prazo, realizada pelo MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento) os grãos com maior destaque principalmente pela importância e alta produção, são: arroz, feijão, milho, soja e trigo (MAPA, 2019). Em uma revisão sobre a utilização de resíduos e subprodutos de cereais, como matéria-prima para a produção de enzimas via CES, os autores identificaram três principais substratos mais utilizados: trigo, arroz e resíduos de milho. Apontaram que esses são mais utilizados devido à grande produção, e por proporcionarem condições para a produção de uma ampla gama de enzimas (TEIGISEROVA; BOURGINE; THOMSEN, 2021). Diante disso, os principais resíduos utilizados no presente trabalho são oriundos de grandes culturas agrícolas e produzidos em abundância, além de serem utilizados também para a produção de enzimas, principalmente devido à composição destes.

3.4.1.1. Subprodutos do milho

O Brasil é um dos principais países produtores e exportadores de milho do mundo, com produção total da safra 2019/2020 em torno de 100 milhões de toneladas, e produção global cerca de 1,11 bilhão de toneladas (CONAB, 2020; FIESP, 2020; SYNGENTA BRASIL, 2020). Segundo projeções do MAPA, até 2028/29 a produção total de milho no país pode chegar a 140,1 milhões de toneladas (MAPA, 2019).

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta monocotiledônea gramínea, pertencente à família Poaceae, produz flores monóicas, ou seja, apresenta flores masculinas e femininas separadas, mas no mesmo indivíduo. Produz seus

frutos, os grãos, fundidos em várias ráquis, denominada sabugo (MAGALHÃES *et al.*, 2002).

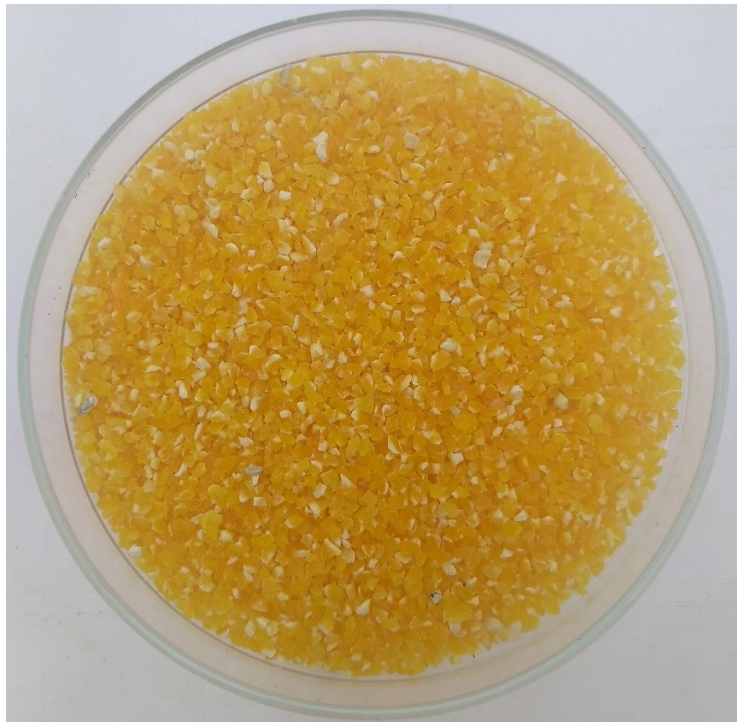
O milho para uso alimentar requer processamento, que pode ser através da moagem dos grãos limpos, a seco ou úmida. A moagem a seco (Figura 3.5.) consiste na moagem tradicional dos grãos visando à separação dos seus componentes (endosperma, gérmen e farelo) por corte ou atrito. Após a separação dos constituintes mais nobres, sobram a quirera e o farelo, que possuem baixo valor de mercado, se diferenciam apenas pelo tamanho, sendo a quirera (Figura 3.6.) ou quirera grossa com granulometria maior que a do farelo (Figura 3.7.) ou também conhecido como quirera fina. Já a moagem úmida ocorre a partir da maceração dos grãos em água com dióxido de enxofre, para favorecer também a separação dos constituintes do grão (amido, glúten, fibra e gérmen) (ROSE; INGLET; LIU, 2010; MOURÃO *et al.*, 2012).

Figura 3.5. Fluxograma do processamento a seco do milho.



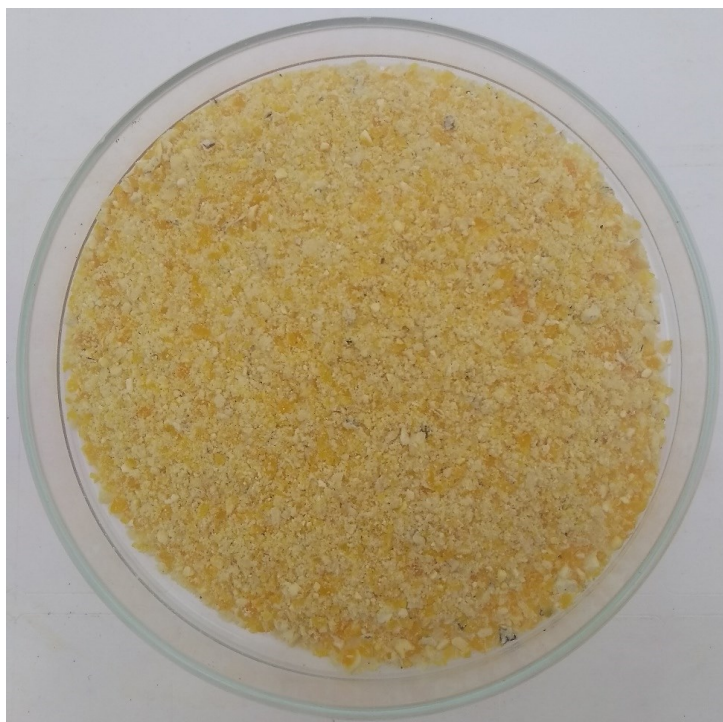
Fonte: ABIMILHO 2008.

Figura 3.6. Quirera de milho.



Fonte: a própria autora.

Figura 3.7. Farelo de milho.



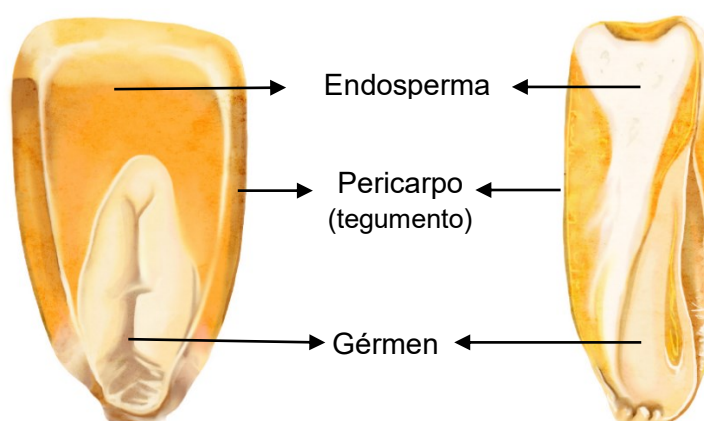
Fonte: a própria autora.

O beneficiamento a partir do processamento do milho a seco é destinado a obtenção de produtos como: canjicas, farinhas, fubás, *grits*, flocos e óleo, entre outros. Porém, gera abundantes subprodutos como farelos, que nem sempre são utilizados pelas indústrias, devido ao seu baixo valor de mercado e problemas tecnológicos enfrentados, sendo destinado a ração animal ou gerando preocupação e gasto com seu descarte (ELMEKAWY *et al.*, 2013; CODA; KATINA; RIZZELLO, 2015; STRAZZI, 2015;).

O farelo de milho é composto de milho quebrado, oriundo da parte mais externa do grão, pericarpo ou casca, partes do endosperma (Figura 3.8.), e pode conter também resquícios de palha e sabugo, é constituído de carboidratos (polissacarídeos), proteínas, fibras (celulose, hemicelulose e lignina) e outros compostos que conferem alto valor biológico (HONIG; RACKIS, 1979; PIRES *et al.*, 1999; MOURÃO *et al.*, 2012; CODA; KATINA; RIZZELLO, 2015; YADAV *et al.*, 2016; ABIMILHO, 2020). Não há composição química do milho ou do farelo única e exata, pois esta é influenciada por fatores genéticos, edafoclimáticos e do beneficiamento (MOURÃO *et al.*, 2012).

O rendimento do farelo de milho pode atingir de 60 a 70 g/ kg de milho processado, proporcional ao aumento da produção de milho, há o aumento da produção de farelo (ROSE; INGLET; LIU, 2010).

Figura 3.8. Anatomia do grão de milho.



Fonte: adaptado ABIMILHO, 2020.

Karanja; Phiri; Oduor, (2010), cultivaram dois isolados de *M. anisopliae* em diferentes resíduos sólidos, machicha (um produto residual da fermentação tradicional e consistindo em farinha de milho, milheto e / ou sorgo), milho

quebrado, arroz e casca de milho. Ambos isolados produziram uma quantidade significativamente maior de esporos por 250 g de substrato em milho quebrado (8,03 g e 7,36 g) e arroz (5,43 g e 6,68 g), em comparação com machicha e casca de milho

Inúmeras pesquisas estudam o uso de alguns farelos, como de milho e de trigo, na alimentação humana, devido à sua composição nutricional ser rica em fibras, porém, grande parte dos consumidores ainda preferem produtos feitos à base de farinha branca refinada. A não aceitabilidade se dá por conta da textura e do sabor desses farelos, que ficam perceptíveis e tornam produtos como pães, por exemplo, menos atraentes. Além disso, as características físico-químicas desses resíduos interferem significativamente na estrutura das massas, enfraquece a rede de glúten, diminuindo a qualidade e a resistência da massa, e conseqüentemente pães de menor volume e menor elasticidade. Para amenizar esses problemas, pode-se usar pré-tratamentos que visam melhorar os aspectos tecnológicos desses farelos, como: moagem, tratamento enzimático, tratamento térmico, extrusão, e outros, entretanto pode ter um custo mais desvantajoso economicamente (PRUECKLER *et al.*, 2014; CODA; KATINA; RIZZELLO, 2015).

3.4.1.2. Bagaço de cana

A cana (*Saccharum officinarum* L.) é uma monocotiledônea gramínea, pertencente à família Poaceae, é propagada assexuadamente através de partes de colmos, denominados toletes, o interesse pelo cultivo se deve a alta capacidade de armazenar energia e produção de matéria seca (THIAGO; VIEIRA, 2002; MARAFON, 2012).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana, cultura de relevante importância econômica para o país. A partir da cana se obtém o açúcar e o etanol, sendo um setor de grande geração de empregos e também de resíduos, como o bagaço de cana, o qual é em boa parte empregado para a produção de energia elétrica através da sua queima. Além do bagaço também são gerados como resíduos: a vinhaça, a torta de filtro, a palhada e água residual, utilizados principalmente como fertilizantes (VIGNA, 2018).

O bagaço (Figura 3.9.) é um dos resíduos agroindustriais de composição lignocelulósica mais produzidos no Brasil. Para cada tonelada de cana

processada, são gerados em torno de 250kg de bagaço. Sua natureza fibrosa é composta de 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina, o que torna sua utilização em bioprocessos muito atraente, visto que a fração necessária de bagaço nesse tipo de processo seria pequena e não afetaria seu uso nas usinas para a geração de energia (PANDEY *et al.*, 2000; LORENCINI, 2013).

Figura 3.9. Bagaço de cana.



Fonte: a própria autora.

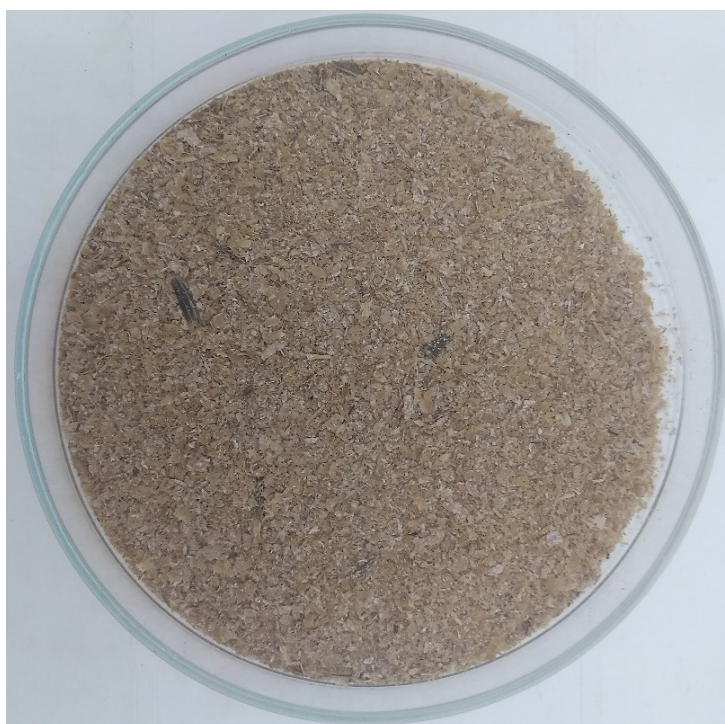
3.4.1.3. Farelo de trigo

O trigo (*Triticum aestivum* L.) também é uma monocotiledônea gramínea, pertencente a família Poaceae, apresenta características morfológicas parecidas com as de outros cereais de inverno como a aveia, centeio e cevada, apesar de se adaptar bem a climas subtropicais. Produz inflorescências que dão origem as infrutescências, os grãos de trigo, que podem ter diferentes formatos e tamanhos, características botanicamente importantes para diferenciar cultivares. Grande parte da produção e do beneficiamento do trigo é para a obtenção da farinha de trigo branca (SCHEEREN; CASTRO; CAIERAO, 2015).

O trigo assim como o milho, quando utilizado para alimentação requer a etapa de beneficiamento de seus grãos, que geralmente ocorre pelo processo

de moagem, separando o farelo, o gérmen e o endosperma, este último dará origem a farinha de trigo. O farelo (Figura 3.10.) apesar de ser considerado um subproduto de baixo valor, apresenta composição rica em nutrientes, carboidratos, nitrogênio, fósforo e lipídios, é composto principalmente por partes do endosperma, camada de aleurona e pericarpo. Cerca de 1 tonelada de trigo processado gera 770kg de farinha e 230kg de farelo (VAN DER BORGHT, 2005; PENARIOL, 2006; WESENDONCK, 2012; PRUECKLER, 2014).

Figura 3.10. Farelo de trigo.



Fonte: a própria autora.

3.4.1.4. Farelo de arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) também é uma monocotiledônea gramínea, pertencente a família Poaceae, produz inflorescências denominadas panículas. É o alimento básico de praticamente todo o mundo, destaca-se pelo cultivo ser em áreas alagadas e também pela adaptação e produção de arroz sequeiro (BARRETO *et al.*, 2002; FONSECA *et al.*, 2008).

O processo básico de beneficiamento do arroz consiste no recebimento do arroz em casca, como é colhido, este então passa pelo processo de descascagem, onde separa-se a casca do grão de arroz, obtendo o arroz

integral. Para se obter o arroz branco, os grãos devem passar pelo processo de polimento, onde é separado o farelo de arroz (constituído de tegumento, pericarpo, aleurona e gérmen) do grão de arroz branco. O farelo de arroz (Figura 3.11.) é rico em nutrientes e minerais, possui elevada quantidade de lipídios e proteínas. A partir do farelo de arroz é possível obter ração, farinha, óleo de arroz, concentrado de proteínas e proteína coagulada, cada 100kg de arroz em casca gera aproximadamente cerca de 60 kg de arroz branco, 20 kg casca, 10kg farelo e 10 kg fragmentos (JULIANO; BECHTEL, 1985; EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2004 a, b; OLI *et al.*, 2014).

Figura 3.11. Farelo de arroz.



Fonte: a própria autora.

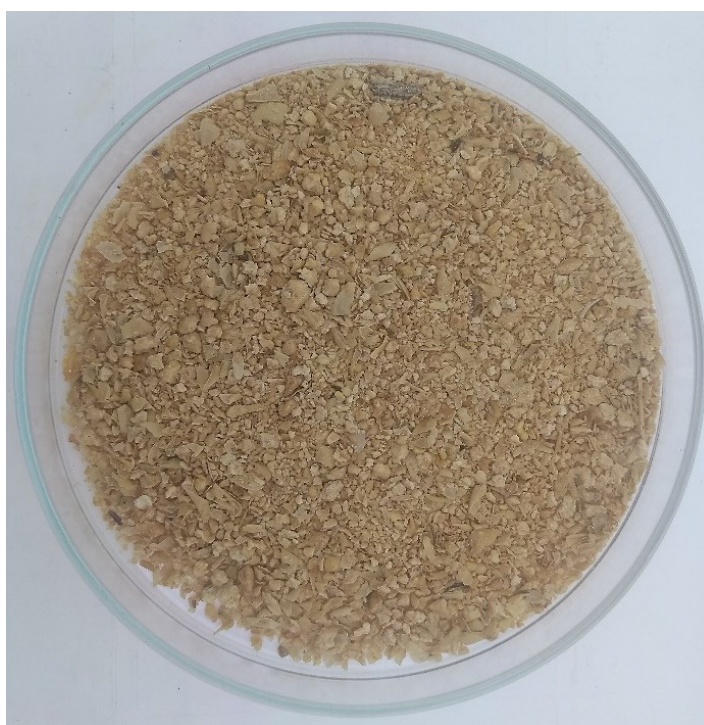
3.4.1.5. Farelo de soja

A soja (*Glycine max* L.) é uma dicotiledônea leguminosa, pertencente à família Fabaceae. É um dos grãos mais produzidos no Brasil, utilizada principalmente devido a sua rica composição proteica para alimentação humana e animal (JARDINE; BARROS, 2020?).

A soja tanto para alimentação humana quanto animal passa pelo processo de beneficiamento. Primeiramente separa-se a casca dos grãos

através de equipamentos de moagem, a casca pode ou não ser misturada com o farelo de soja, dependendo do tipo de subproduto que se pretende comercializar, para isso, está deve ser moída e tostada. Os grãos então seguem passando pelo processo de laminação, posterior expansão através de vapor, refrigeração e extração do óleo por solvente hexano, após a extração do óleo é obtido o farelo de soja (Figura 3.12.), o qual deve passar pelo processo de tostagem para recuperar o hexano (dessolventização) ainda presente e desativar fatores antinutricionais. O farelo de soja é um dos principais subprodutos utilizado como fonte proteica na alimentação animal, isso porque pode apresentar cerca de 44% a 48% de proteína bruta em sua composição (BELLAYER; SNIZEK JUNIOR, 1999; THIAGO; SILVA, 2003; D'ARCE, 2006).

Figura 3.12. Farelo de soja.



Fonte: a própria autora.

3.4.1.6. Resíduo de malte

A cevada (*Hordeum vulgare* L.) também é uma monocotiledônea gramínea, pertencente à família Poaceae, com a produção mais concentrada em países de clima temperado também de desenvolve bem em países com clima subtropical, como em algumas regiões do Brasil, é utilizada principalmente na

produção do malte para a indústria cervejeira. Entende-se por malte o processo de germinação de um cereal qualquer sob condições de umidade e temperatura controladas (KALNIN, 1999; CAIERÃO, 2008).

O resíduo de malte ou bagaço de cevada (Figura 3.13.) é o resíduo sólido oriundo do processo de produção da cerveja, é gerado durante a filtração do mosto antes da fervura, composto de restos de cascas e polpa de grãos de malte de cevada, e de outros cereais que possam ser adicionados, como arroz, trigo, milho, centeio e aveia, entre outros. É o resíduo sólido gerado em maior quantidade, cerca de 14 a 20 kg a cada 100 litros de cerveja produzida. Sua rica composição em açúcares, proteínas e minerais, faz com que este resíduo seja utilizado na alimentação animal e desperta o interesse de seu uso em bioprocessos, apesar de sua composição bromatológica variar de acordo com o processo empregado durante a produção da cerveja e os cereais utilizados (CABRAL FILHO, 1999; SANTOS; RIBEIRO, 2005; SENE, 2010; CORDEIRO, 2011; MUSSATTO, 2014).

Figura 3.13. Bagaço de malte.



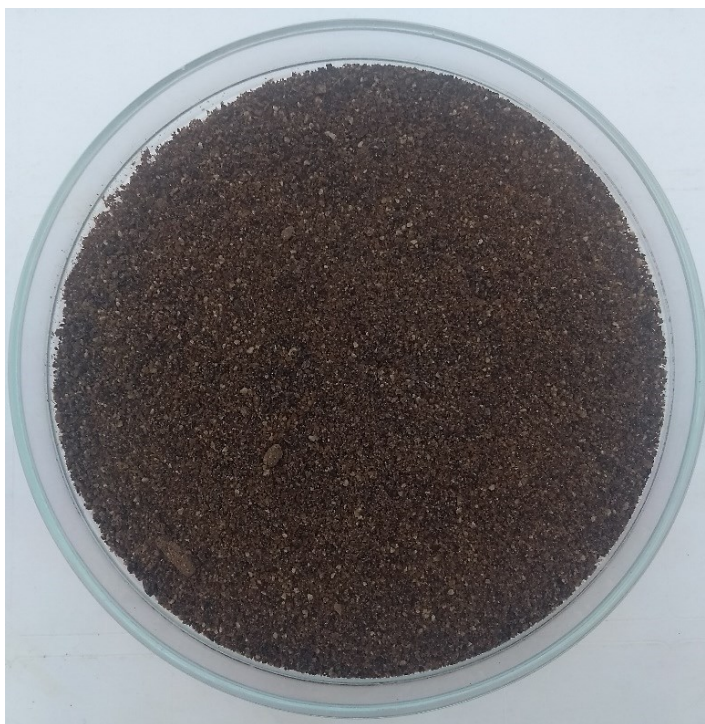
Fonte: a própria autora.

3.4.1.7. Resíduo de uva

A videira é a planta que dá origem a uva (*Vitis vinifera* L.) pertencente à família Vitaceae, o cultivo da uva denomina-se viticultura, o qual é realizado a partir de plantas clonais propagadas por estaquia ou enxertia. A morfologia da uva se destaca por ser plantas do tipo trepadeiras, com caule lenhoso, apresentando gavinhas que auxiliam no suporte da planta, as inflorescências podem ser bissexuadas ou unissexuadas, as quais dão origem as infrutescências denominadas também de cachos. Dentre os produtos obtidos a partir da uva processada, destacam-se: vinho, suco, vinagre, geleias e passas, entre outros (ALBUQUERQUE, 2003).

O vinho tinto é uma das bebidas mais antigas e produzidas no mundo, gera grandes quantidades de resíduos, composto principalmente de polpa residual do fruto, sementes, cascas e engaço. Apesar de ser biodegradável necessita de devido descarte para não gerar problemas ambientais. Em virtude da composição do resíduo de uva (Figura 3.14.) ser rica nutricional, ter antioxidantes, bioativos, compostos fenólicos, fibras e óleos, cresce o interesse pelo uso deste resíduo na geração de produtos de alto valor agregado, na indústria de alimentos, como suplementos; em cosméticos; fitoterápicos; na indústria agrícola, como material condicionante de solo, e na alimentação animal, entre outros (STRAPASSON, 2016; TONON *et al.*, 2018).

Figura 3.14. Bagaço de uva.



Fonte: a própria autora.

3.4.2. Otimização dos parâmetros de produção

Otimizar um processo consiste em obter um melhor rendimento e máximo aproveitamento deste. Existem diversas técnicas para esta finalidade, e a metodologia de superfície de resposta (MSR) é uma das mais utilizadas. A MSR consiste em um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas, as quais descrevem e modelam as interações de vários parâmetros diferentes simultaneamente, com o propósito de encontrar a melhor condição, fornecendo o ajuste de uma equação polinomial ou quadrática aos resultados dos dados experimentais. Inicialmente, deve-se escolher quais serão os fatores ou as variáveis independentes (umidade, temperatura, pH, concentração, entre outros) e os níveis desses fatores, que são os diferentes valores dentro de uma variável, de acordo com o objetivo do estudo. Em seguida é realizada a escolha do projeto experimental e realizado um planejamento experimental, que é um conjunto específico de experimentos com combinações dos níveis dos fatores. Os resultados então serão as variáveis dependentes, as quais permitem o ajuste de modelos matemáticos, em funções que descrevem e possibilitam explorar o

sistema em questão, baseado no desenho experimental. Por fim, o modelo é avaliado e verificado se há necessidade de algum ajuste. Assim, é possível identificar qual a condição ótima e os efeitos das interações entre os diferentes níveis. Ao contrário das técnicas convencionais que avaliam um fator de cada vez, a MSR permite a redução do número de experimentos, economia de tempo, produtos e trabalho, e respostas mais rápidas e confiáveis (CHEN *et al.*, 2005; BEZERRA *et al.*, 2008; PRAKASH; PADMAJA; KIRAN, 2009; FARLIAHATI *et al.*, 2010; SIVASUBRAMANIAN; NAMASIVAYAM, 2014).

O Box-Behnken é um tipo de projeto experimental utilizado em MSR. Este por sua vez, não contém um experimento fatorial completo ou fracionado incorporado, as combinações dos tratamentos são em três fatores codificados, para um modelo quadrático utiliza-se três níveis. Por apresentarem menos pontos que outros tipos de projetos, é menos trabalhoso (FERREIRA *et al.*, 2007; BEZERRA *et al.*, 2008).

Thomas; Larroche; Pandey (2013), citam o uso da metodologia de superfície de resposta para a otimização dos parâmetros de produção no CES, como: temperatura, pH, umidade, tipo de substrato, uso de inerte, aeração, tamanho da partícula, entre outros, ressaltam que esses fatores interferem consideravelmente na produção e qualidade dos esporos.

O Diagrama de Pareto é um recurso muito utilizado na estatística, consiste em um gráfico que permite organizar os dados de forma hierárquica, de acordo com a frequência em que ocorrem, auxiliando na identificação e avaliação dos parâmetros e suas interações mais significativas sobre cada variável.

3.5. Análise de custos

A análise de custos para a implantação de uma empresa é primordial, visto que é uma ferramenta necessária nas tomadas de decisões. Além de auxiliar na precificação dos produtos, na otimização da produção e na valorização do estoque, é por meio desta que se faz a contabilidade dos ganhos e dos gastos da empresa e quanto é preciso para que se mantenha o processo operante. É a partir da análise de custos que se identifica os fatores de produção que mais influenciam no custo do produto final. Para realiza-la, inicialmente divide-se os custos em fixos, que não alteram no decorrer do processo, e custos

variáveis, que dependem da demanda da produção (MENDES, 2015; BRANDÃO; CAMPOS; GONÇALVES, 2019).

O CAPEX (*Capital expenditure*) é o investimento fixo ou capital inicial, dividido em custos diretos (equipamentos, instrumentos, acessórios, bombas, etc.) e custos indiretos (instalações, engenharia, assessoria, etc.), necessários para iniciar as operações. Já o OPEX (*Operational expenditure*) se refere aos custos variáveis necessários para manter o processo, como: insumos, mão-de-obra, impostos, energia, entre outros. A partir da análise de custo é possível realizar a análise de sensibilidade do processo com base nos indicadores econômicos e assim ter a constatação da lucratividade do processo. Entre eles encontram-se: o Valor Presente Líquido (VPL) que consiste na soma algébrica de todos os fluxos de caixa descontados para o instante presente a uma dada taxa de juros, segundo Baasel (1990), é uma medida utilizada para comparar alternativas em um projeto, quanto maior é o VPL, melhor é a alternativa; a Taxa Interna de Retorno (TIR) que mede a rentabilidade do investimento por unidade de tempo. Segundo Baasel (1990), são esperados valores entre 15% a 30% para indústrias; e o Tempo de retorno (*Payback*) que é o prazo de recuperação do investimento, quanto maior for o tempo de retorno, menos atrativo se torna o investimento (MENDES, 2015).

Porém, ainda existem poucos trabalhos que estudam a avaliação econômica do processo produtivo de entomopatógenos fúngicos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Câmpus de São José do Rio Preto, SP, Brasil.

4.1. Microrganismo

Foi empregada a linhagem *Metarhizium anisopliae* IBCB 425, cedida gentilmente pelo Instituto Biológico de São Paulo. O fungo foi armazenado em tubos de ensaio vedados, contendo meio de batata-dextrose-ágar (BDA, Acumedia, EUA). Após o pleno desenvolvimento do fungo, adicionou-se uma fina camada de óleo mineral, para a proteção das colônias. Os tubos então foram mantidos em câmaras refrigeradas a 4°C até a sua utilização.

As repicagens foram realizadas em frascos de Erlenmeyer (250 mL) inclinados, contendo 50 mL de meio de cultivo BDA, com auxílio de alça de platina. Os frascos foram posteriormente armazenados em câmara DBO a 28 °C por 15 dias. Utilizou-se somente até a terceira geração do fungo, consistindo em três repicagens consecutivas da mesma colônia (QUINTELA; YOKOYAMA; ROBERTS, 1994). A cada dois meses, o fungo era repicado em larvas de tenébrio gigante (*Zophobas morio* - Coleoptera: Tenebrionide), para que não ocorresse a perda da virulência e a qualidade dos esporos. As larvas eram acomodadas em placas de Petri contendo algodão umedecido com água destilada e posteriormente esterilizadas (1 atm; 30 minutos à 120°C). O processo de inoculação ocorria em Erlenmeyers inclinados contendo BDA, no qual as larvas, após esterilizadas, eram dispostas e inoculadas com 1 mL suspensão de esporos na concentração de 10^7 esporos/ mL, após os 15 dias de cultivo, com o auxílio de uma alça de platina, eram realizados os repiques do fungo que crescia apenas em cima das larvas, em Erlenmeyers com BDA.

Para o preparo dos inóculos, adicionou-se solução Tween 80 a 0,1 % (v/v) aos frascos, raspando-se a superfície da colônia com a alça de platina para o desprendimento dos esporos. Foi fixada a concentração de 10^7 esporos/ mL

em todos os ensaios, realizando-se a contagem de esporos em Câmara de Neubauer, com ajuda de microscopia óptica com aumento de 400x.

Todos os materiais utilizados foram previamente esterilizados (1 atm; 30 minutos à 120°C) e os procedimentos realizados em câmara de fluxo laminar.

4.2. Substratos empregados nos cultivos em estado sólido

Como substratos para os ensaios de seleção utilizou-se: quirera de milho, farelo de milho, farelo de trigo, farelo de soja e farelo de arroz, adquiridos em mercado local; resíduo de malte e resíduo de uva, gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Vanildo Del Bianchi, do laboratório de Bioprocessos (LaBio) da mesma universidade. Como material suporte inerte, utilizou-se o bagaço de cana-de-açúcar (BC), cedido gentilmente pela Usina Vale, de Onda Verde, SP. O arroz tipo 1 utilizado nos ensaios como controle também foi adquirido em mercado local.

Para os experimentos, o resíduo de uva, o resíduo de malte e o BC foram previamente secos em estufa de convecção forçada à 65 °C até peso constante, com o intuito de evitar a degradação microbiológica desses resíduos devido à rica composição nutricional e para melhor manejo e armazenamento durante os ensaios. O bagaço de uva foi posteriormente triturado em moinho de facas, para se obter uma granulometria menor e homogênea. O BC foi primeiramente peneirado em peneira de 3 mm de abertura, e em seguida peneirado em peneira de 1,41 mm de abertura, utilizando-se o material retido entre as peneiras.

Todos os substratos foram mantidos em embalagens de polietileno de parede espessa em câmara de congelamento a -16°C, para conservação até a sua utilização.

4.3. Ensaios de seleção de resíduos sólidos

Os ensaios de seleção dos resíduos sólidos mais promissores em termos de produção de esporos foram realizados em embalagens plásticas de polipropileno com dimensões de 10x20cm com 10 g de substrato, previamente umedecidos e homogeneizados. As embalagens foram fechadas com bocais de PVC e tampões de algodão envoltos com gaze, para que ocorresse a troca de

gases, sem a passagem de microrganismos contaminantes. Após os resíduos terem sido umedecidos, foram autoclavados (1 atm; 30 minutos a 120°C) e posteriormente inoculados com 1 mL de suspensão de esporos de 10^7 esporos/mL em câmara de fluxo laminar, concentração de esporos fixa utilizada em todos os ensaios. Todos os ensaios foram incubados em câmara DBO em ausência de luz por 10 dias, seguindo-se recomendações de Lopes (2016) e Cunha (2020). Em todos os ensaios foram feitas amostras de controle em mistura de arroz com bagaço de cana-de-açúcar na proporção 9:1 (p/p) com 48% de umidade (base úmida b. u. como as demais deste trabalho). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, assim como os demais ensaios. Foi medida inicialmente a umidade dos substratos em um analisador de umidade infravermelho MB 45 (OHAUS, Parsippany, EUA), para posteriores ajustes de umidade.

A extração dos esporos foi similar em todos os ensaios, foi realizada adicionando-se 10 mL/ gss (grama de substrato seco) de solução Tween 80 (0,1 % v/v), ao meio cultivado, seguido de agitação recíprocante em banho metabólico (Marconi, Dubnoff, Brazil) a 120 ciclos por minutos durante 50 minutos. Desta suspensão foram retiradas amostras para contagem dos esporos com auxílio de Câmara de Neubauer, em microscópio óptico.

Para os ensaios de seleção dos substratos fixou-se a temperatura de cultivo em 28°C e as proporções substrato:suporte em 5:5; 7:3 e 9:1(p/p).

Inicialmente, realizou-se ensaios fixando a umidade do substrato em 48% (b. u.) por ser a condição ótima encontrada para o cultivo em arroz (Cunha *et al.*, 2019, 2020c) adicionando água destilada antes da esterilização para se obter a umidade desejada.

Considerando a heterogeneidade dos resíduos em relação à composição química e à sua constituição física, que afetam a retenção de água, foram também realizados ensaios de maceração, no qual os resíduos foram pesados e embebidos com água destilada por uma noite, em seguida drenados, empregando-se peneiras, e acomodados nas embalagens plásticas para serem esterilizados. Nesta etapa adquiriu-se os resíduos de malte e de uva.

4.4. Ensaios de otimização das condições de cultivo com farelo de milho

Após a realização dos ensaios de seleção dos substratos, optou-se pela mistura farelo de milho/BC para prosseguir para os ensaios de otimização das condições de cultivo, visando obter a maior concentração de esporos possível. Os ensaios foram realizados em embalagens plásticas com 10 g de substrato (ativo:suporte), como descrito no item 4.3.

Os ensaios de otimização foram realizados seguindo-se um planejamento estatístico fatorial do tipo Box-Behnken, com análise de variância e superfície de reposta. Foram realizados dois ensaios de otimização. Em ambos ensaios utilizou-se os níveis de temperaturas em 27°C; 30°C e 33°C, embasadas em Cunha *et al.* (2019), e os níveis de proporção substrato:suporte em 7:3; 8:2 e 9:1 (p/p). Para o primeiro ensaio de otimização, estabeleceu-se os níveis de umidade em 45%; 65% e 85%, tendo como referência a umidade do arroz empregado por Cunha (2020c), Soccol (1992), e os ensaios de maceração. Porém, os resultados para estes ensaios de otimização não foram conclusivos e decidiu-se então alterar os níveis de umidade inicial para 65%, 70% e 75%. A Tabela 4.1. reúne as condições de ambos os ensaios de otimização e a Tabela 4.2. a matriz de planejamento.

Tabela 4.1. Níveis empregados nos ensaios de otimização.

Ensaios	Fatores	Níveis		
		-1	0	1
Primeiro Segundo	Temperatura (°C)	27	30	33
	Proporção (substrato:suporte)	7:3	8:2	9:1
	Umidade (% b.u.)	45	65	85
		65	70	75

Fonte: a própria autora.

Tabela 4.2. Matriz de planejamento para os ensaios de otimização.

Ensaio	Temperatura (°C)	Umidade (%)		Proporção (p/p)*
		Primeiro ensaio	Segundo ensaio	
1	27°C	45%	65%	8:2
2	33°C	45%	65%	8:2
3	27°C	85%	75%	8:2
4	33°C	85%	75%	8:2
5	27°C	65%	70%	7:3
6	33°C	65%	70%	7:3
7	27°C	65%	70%	9:1
8	33°C	65%	70%	9:1
9	30°C	45%	65%	7:3
10	30°C	85%	75%	7:3
11	30°C	45%	65%	9:1
12	30°C	85%	75%	9:1
13	30°C	65%	70%	8:2
14	30°C	65%	70%	8:2
15	30°C	65%	70%	8:2

*Proporção – substrato:suporte.

Fonte: a própria autora.

4.5. Cinética de esporulação

Após os ensaios de otimização optou-se pela condição favorável à produção de esporos no farelo de milho:BC (temperatura 27°C, proporção farelo:bagaço 8:2 umidade 70%), para a qual realizou-se a cinética de esporulação do fungo ao longo de 15 dias de cultivo, tempo médio de cultivo do fungo frequentemente observado na indústria. Para isso, foram realizados ensaios como descrito no item 4.3., em triplicata, em embalagens com 10 g de substrato (ativo:suporte) sendo realizada a contagem diária de esporos em ensaios destrutivos de amostras.

4.6. Ensaios de ampliação de escala

Para avaliar a produção de esporos em uma escala próxima à empregada industrialmente, foram feitos ensaios com 300 g (b.u.) de substrato, preparados em embalagens de polipropileno de 35x45cm com bocais de PVC acoplados e tampões de algodão. Após serem umedecidos, os substratos foram autoclavados (1 atm; 30 minutos a 120°C) e posteriormente inoculados com 30 mL de suspensão de esporos de 10^7 esporos/ mL em câmara de fluxo laminar. Foram realizados ensaios utilizando-se apenas arroz a 48% de umidade (b.u.), como ocorre industrialmente, para servir de controle ao cultivo com a mistura de farelo de milho com bagaço de cana-de-açúcar, nas proporções de 7:3, 8:2 e 9:1(p/p) (substrato:suporte) e 70% de umidade. Os cultivos foram feitos à 27 °C por 15 dias, com as embalagens dispostas verticalmente em DBO. A extração dos esporos ocorreu como descrito no item 4.3.

4.7. Ensaios de vigor dos esporos

Foi avaliado o vigor dos esporos produzidos na mistura farelo de milho:BC na proporção 8:2 (substrato:suporte), com 70% de umidade, comparando com aqueles produzidos no arroz (controle), na proporção 9:1 (substrato:suporte) com 48% de umidade, ambos com 15 dias de cultivo, a 27 °C, em embalagens com 10 g de substrato (ativo:suporte). Após o cultivo do fungo, os substratos cultivados arroz e farelo de milho:BC, foram dispostos em dessecadores com sílica gel (substituída a cada 2 dias), por 10 dias, após serem secos, os esporos foram extraídos como descrito no item 4.3. Os esporos foram inoculados por gota (15 µl) em placas de Petri contendo meio BDA. As placas inoculadas foram secas em câmara de fluxo laminar por 15 min e incubadas a 27 °C por 18 h. Os ensaios foram realizados em triplicata. A concentração de esporos vigorosos foi determinada avaliando a germinação dos esporos após incubação, por observação microscópica direta com aumento de 400x. Foram considerados vigorosos os esporos com tubos germinativos maiores do que o diâmetro de um esporo não germinado.

4.8. Ensaios de patogenicidade do fungo

Foi avaliada a patogenicidade dos esporos produzidos na mistura farelo de milho:BC na proporção 8:2 (substrato:suporte), com 70% de umidade, comparando-se os resultados com os de esporos produzidos no arroz (controle), na proporção 9:1 (substrato:suporte) com 48% de umidade, ambos com 15 dias de cultivo, a 27°C, em embalagens com 10 g de substrato (ativo:suporte). Para esses ensaios, foram utilizadas larvas de *Zophobas morio*, medindo 4 - 5 cm (Figura 4.1.), adquiridas no comércio local.

Após o cultivo do fungo no arroz e no farelo de milho:BC, preparou-se suspensões de esporos extraídos como descrito no item 4.3. Os ensaios foram realizados por imersão das larvas nas suspensões com 10^8 esporos/ mL, e em água destilada com Tween 80 (0,1 % v/v) para as testemunhas, por 20 segundos. As larvas foram posteriormente, acondicionadas em caixas plásticas, com papel filtro no fundo para conter o excesso da suspensão e tampadas com telas que permitam a ventilação natural. Os ensaios foram realizados três vezes no tempo e cada tratamento (farelo de milho:BC; arroz; testemunha) em duplicata, contendo quinze larvas cada. Os tratamentos foram acondicionados em câmara DBO à 27°C por 15 dias, durante os quais as larvas foram alimentadas com vegetais frescos (substituídos a cada 2 dias) e farelo de trigo. Foi acompanhado diariamente o número de mortes das lagartas (POTRICH *et al.*, 2007; ORESTE *et al.*, 2012; SANTOS, 2013).

Figura 4.1. Larva de *Zophobas morio*.



Fonte: a própria autora

4.9. Análise granulométrica

Realizou-se a análise granulométrica da área superficial dos grãos de arroz e do farelo de milho, substrato selecionado dentre os demais resíduos, empregando-se o *software Image-Pro Plus* de tratamento de dados de imagem, afim de comparar a área superficial disponível de cada meio para o crescimento do fungo. Para o cálculo da área superficial específica de cada substrato, utilizou-se a Equação 1.

$$\text{Área superficial específica} = \frac{\text{área superficial total}}{\text{peso total da amostra}} \quad (1)$$

Onde multiplicou-se o número de partículas pela média da área superficial de cada intervalo, somou-se o total de cada intervalo, obtendo a área superficial total de cada imagem e dividiu-se pelo peso de cada amostra, 0,1 g para o farelo de milho e 0,5 g para o arroz.

4.10. Análise de custos de produção

Para avaliar a redução dos custos de produção dos esporos de *M. anisopliae* IBCB 425 utilizando o substrato alternativo comparado com a produção em arroz, realizou-se uma análise de custos e determinados indicadores econômicos. A análise de custos foi realizada com o auxílio do *Software* de planilha de dados Excel, a partir do qual foi feita a relação de custos e lucro. Os dados quantitativos de produção (Tabela 4.3.) foram fornecidos gentilmente por uma biofábrica de pequeno porte, Oligos Biotec, situada em São José do Rio Preto – SP, que produz esporos de *M. anisopliae* em arroz tipo 1 em embalagens plásticas.

Tabela 4.3. Dados gerais da produção de esporos de *M. anisopliae*.

Produção de esporos		
Substrato inoculado		
kg/dia	150	
t/ano	37,5	
Rendimento esporos		
Kg/mês	22,5	
kg/ano	270	
Formulação (kg)		
Esporos (g)	320	
Adjuvante caulim (g)	680	
Dose	650 g	10 ha

Fonte: Oligos Biotec (2020).

Os custos de equipamentos, como: autoclave, extrator de peneira vibratória, câmara de refrigeração, ar-condicionado, seladora, desumidificadores e substrato alternativo, foram determinados através de pesquisas de mercado, com empresas do ramo. O custo do bagaço de cana foi o mesmo utilizado por Mendes (2015).

Foram calculados o CAPEX e o OPEX do processo, sendo CAPEX o investimento fixo ou capital inicial, dividido em custo diretos (equipamentos, instrumentos, acessórios) e custo indiretos (instalações, engenharia, assessoria, etc.), necessários para começar as operações. OPEX são os custos variáveis e necessários para manter o processo, como: insumos, mão-de-obra, impostos e energia, entre outros (MENDES, 2015). Como indicadores econômicos foram calculados o TIR – Taxa Interna de Retorno, o VPL – Valor Presente Líquido e o *Payback* que mede o prazo de recuperação do investimento.

4.11. Análises estatísticas

As comparações entre os valores das médias dos diferentes tratamentos foram feitas usando o teste de Tukey a nível de confiança de 95% através do *software* Minitab 18 (Minitab Inc., State College, EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Ensaio de seleção dos resíduos sólidos

Para identificar quais substratos possibilitariam a maior produção de esporos de *Metarhizium anisopliae* IBCB 425, foram realizados os ensaios de seleção. Assim, fixou-se a umidade do meio em 48% e a temperatura em 28°C, condições ótimas encontradas para o arroz tipo 1 por Cunha *et al.*, (2019) e (2020c), variou-se os substratos e as proporções substrato:suporte (5:5; 7:3 e 9:1), sendo o suporte bagaço de cana-de-açúcar, considerado inerte. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.1.

De acordo com a Tabela 5.1., os substratos avaliados foram capazes de produzir esporos, porém, de modo geral, apresentaram concentrações de esporos, na ordem de 10^8 esporos/ gsa (grama de substrato ativo), inferiores às obtidas para arroz tipo 1 por Cunha *et al.* (2020b) na ordem de 10^9 esporos/gsa. Entre as proporções empregadas, a de 7:3 (substrato:suporte) foi a que obteve maiores concentrações de esporos, estatisticamente superior que as outras proporções empregadas. Industrialmente isso não seria ruim, visto que a proporção 5:5 ocupa um espaço maior devido ao maior volume do meio, devido à maior quantidade de bagaço, e a proporção de 9:1 necessita ser mais homogeneizada por ter uma quantidade menor de bagaço, demandando maior mão-de-obra. Acredita-se que os altos valores de desvio padrão e de coeficiente de variação observados possam estar relacionados à adaptação do fungo no meio, devido à heterogeneidade dos substratos e às variações nas granulometrias. Os altos valores dos coeficientes de variação (CV) observados teriam impacto na previsão da quantidade total de esporos produzidos quando da operação industrial.

O farelo de trigo foi o meio que alcançou a maior produção de esporos, estatisticamente superior que o obtido nos outros substratos, nas três proporções empregadas. O farelo de arroz, o farelo de milho e a quirera de milho não diferiram estatisticamente entre si. Entretanto, a proporção de 7:3 ainda foi a que proporcionou a maior concentração de esporos. Acredita-se que o farelo de trigo possa ter proporcionado maior concentração de esporos devido à presença de

carboidratos amiláceos facilmente assimiláveis pelo fungo em concentrações mais elevadas do que nos outros resíduos.

Tabela 5.1. Concentração de esporos dos ensaios de seleção dos substratos com 48% de umidade, à 28 °C por 10 dias de cultivo.

Resíduos	Proporções substrato:suporte (p/p)								
	5:5			7:3			9:1		
	C _e 10 ⁸ (esporos/gsa)	DV 10 ⁸ (esporos/gsa)	CV (%)	C _e 10 ⁸ (esporos/gsa)	DV 10 ⁸ (esporos/gsa)	CV (%)	C _e 10 ⁸ (esporos/gsa)	DV 10 ⁸ (esporos/gsa)	CV (%)
Farelo de arroz + BC	6,40 ^{Bb}	2,40	37,5	5,43 ^{Ba}	0,86	15,8	6,22 ^{Bab}	1,78	28,6
Farelo de milho + BC	4,80 ^{Bb}	1,60	33,3	5,71 ^{Ba}	0,14	2,5	4,89 ^{Bab}	0,89	18,2
Farelo de trigo + BC	13,6 ^{Ab}	0,9	7,1	22,0 ^{Aa}	14,0	63,6	11,7 ^{Aab}	0,3	2,5
Quirera de milho + BC	7,20 ^{Bb}	1,60	22,2	8,57 ^{Ba}	1,14	13,3	5,26 ^{Bab}	0,23	4,4

*C_e: concentrações de esporos por grama de substrato ativo (gsa); BC – bagaço de cana; DV – desvio padrão; CV (%) – coeficiente de variação (CV=DV/média. 100). As médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na mesma coluna e por letras minúsculas na mesma linha diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ao nível de confiança de 95%.

(Fonte: a própria autora)

A água tem importante função no CES, que é a de mediar reações bioquímicas, solubilizar nutrientes, metabólitos e gases, dentre outras, de modo que a determinação do conteúdo ideal de água depende de cada sistema de cultivo (PANDEY, 2003). Logo, se a umidade do meio for baixa, os nutrientes ficarão retidos. Em substratos amiláceos, a água tem o papel de hidratar e de participar da gelatinização do amido presente, o qual fica disponível para a hidrólise e aproveitamento pelo fungo, que secreta amilases que hidrolisam o amido em glicose (CRIPWELL; ZYL; VILJOEN-BLOOM, 2020). Gervais; Molin (2003), citam que se a umidade do meio for baixa, dificulta a difusão de solutos, prejudicando o crescimento microbiano. Damir (2006), avaliou a produção de esporos de dois isolados de *B. bassiana* e um de *M. anisopliae* em grãos de trigo, de milho e de milho quebrado, em diferentes umidades. Concluiu, que dos fungos testados, *M. anisopliae* foi capaz de produzir mais esporos, nos três meios, e que a produção de esporos foi influenciada pelo volume de água no substrato, apresentando maiores produções na proporção (substrato:água) 1:1,5.

No intuito de avaliar como o processo de umidificação poderia afetar o processo microbiológico, realizou-se ensaios de maceração, no qual os substratos foram previamente pesados e embebidos com água destilada e deixados descansar por uma noite. Em seguida, os materiais foram drenados através de peneiras e preparados para serem inoculados e incubados à 28°C. Para os meios de granulometria mais fina, como o farelo de arroz e o bagaço de uva, foi fixada a umidade de 80% (b.u.) com a intenção de alcançar uma umidade alta no substrato, adicionou-se água destilada para atingir a umidade desejada antes de esterilizar. Nesta etapa, foram adquiridos os resíduos de malte e de uva. Os resultados das concentrações de esporos estão apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2. Concentração de esporos nos substratos macerados, à 28 °C por 10 dias de cultivo.

Resíduos	Proporções substrato:suporte (p/p)								
	5:5			7:3			9:1		
	C _e 10 ⁹ (esporos/gsa)	DV 10 ⁹ (esporos/gsa)	CV (%)	C _e 10 ⁹ (esporos/gsa)	DV 10 ⁹ (esporos/gsa)	CV (%)	C _e 10 ⁹ (esporos/gsa)	DV 10 ⁹ (esporos/gsa)	CV (%)
Farelo de arroz + BC	4,28 ^{CDc}	0,12	2,9	2,17 ^{CDb}	0,34	15,7	2,50 ^{CDa}	0,05	1,85
Farelo de milho + BC	4,24 ^{Bc}	0,32	7,6	8,29 ^{Bb}	1,2	14,5	7,71 ^{Ba}	1,62	21,04
Farelo de trigo + BC	8,68 ^{Bc}	1,00	11,5	8,11 ^{Bb}	0,80	9,9	6,27 ^{Ba}	0,71	11,34
Quirera de milho + BC	2,64 ^{Cc}	0,08	3,2	3,00 ^{Cb}	0,77	25,7	3,42 ^{Ca}	0,09	2,61
Resíduo de malte + BC	10,08 ^{Ac}	0,07	6,3	9,71 ^{Ab}	0,80	8,3	9,18 ^{Aa}	0,02	0,25

Tabela 5.2. Continuação.

Resíduos	Proporções substrato:suporte (p/p)								
	5:5			7:3			9:1		
	$C_e 10^9$	$DV 10^9$	CV	$C_e 10^9$	$DV 10^9$	CV	$C_e 10^9$	$DV 10^9$	CV
	(esporos/gsa)	(esporos/gsa)	(%)	(esporos/gsa)	(esporos/gsa)	(%)	(esporos/gsa)	(esporos/gsa)	(%)
Resíduo de uva + BC	1,72 ^{Dc}	0,21	12,6	1,31 ^{Db}	0,06	4,6	2,64 ^{Da}	0,12	4,69
Arroz + BC (+)							4,34	0,15	3,8

* C_e : concentrações de esporos por grama de substrato ativo (gsa); BC – bagaço de cana; DV – desvio padrão; CV (%) – coeficiente de variação ($CV=DV/média \cdot 100$). As médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na mesma coluna e por letras minúsculas na mesma linha diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ao nível de confiança de 95%.

(+) Extraído de Cunha *et al.* (2020b)

(Fonte: a própria autora)

As concentrações de esporos obtidas nos ensaios com maceração foram superiores aos sem maceração. Possivelmente, o contato da água com os resíduos por tempo prolongado antes do cultivo permitiu que nutrientes tenham sido solubilizados e se tornado facilmente disponíveis ao fungo, favorecendo seu crescimento vegetativo. Além disso, os materiais foram autoclavados e com isso o aquecimento da água presente internamente aos materiais pode ter feito com que estruturas celulares tenham se rompido, tornando-as mais acessíveis às ações enzimáticas. Os melhores resultados foram observados estatisticamente para a proporção substrato:BC de 9:1.

Comparando os valores de desvio padrão e de coeficiente de variação dos resultados de 48% de umidade com os de maceração, observa-se que estes indicadores foram menores com a maceração. Isso pode ter ocorrido devido à interação íntima que os substratos tiveram com a água durante a maceração, que permitiu que parte dos nutrientes, necessários aos estágios iniciais do cultivo, fossem solubilizados na água. Sendo os materiais heterogêneos e a adição da água e posterior homogeneização procedimentos manuais, é possível que a umidificação imediatamente antes da esterilização térmica não tenha sido eficiente, de modo a haver variação da concentração de água no meio e consequente heterogeneidade do cultivo que resultou em alta variabilidade. Somente ensaios com coletas de amostras em diferentes partes dos meios de cultivo e análises de umidade e de concentração de nutrientes (açúcares redutores, proteínas, amido, etc.) poderia confirmar esta hipótese.

O farelo de soja não teve seus resultados apresentados, pois, favoreceu apenas o crescimento micelial do fungo *M. anisopliae* IBCB 425, o qual não é o foco do presente estudo. Santos (2017), empregou farelo de soja para a produção de esporos de *M. anisopliae*, porém não alcançou resultados satisfatórios, como no presente estudo. Penariol (2006) e Dallastra; Ramalho; Agudelo (2019), obtiveram baixas concentrações de esporos quando utilizaram o farelo de soja como meio. Santoro *et al.* (2005) e Afifah *et al.* (2021), concluíram que fontes de nitrogênio são importantes durante o desenvolvimento do fungo, por favorecerem o crescimento micelial. Segundo Rezende (2009), geralmente ocorre o processo de produção de esporos quando o fungo já consumiu todo o nitrogênio do meio e ainda há carbono. No caso do farelo de soja, acredita-se que este tenha uma quantidade maior de nitrogênio do que de carbono, por isso

tenha suportado apenas o crescimento de biomassa. Mishra; Kumar; Malik (2016), ao utilizarem resíduos para a produção de esporos de *B. bassiana*, encontraram que as maiores concentrações de esporos eram obtidas em meios com maior relação C:N e as menores concentrações de esporos foram em meios com menores relações C:N.

O resíduo de malte foi o resíduo que apresentou maior produção de esporos, em todas as proporções. Acredita-se que isso ocorra devido à presença de cereais, como a cevada, milho e trigo, de alto valor nutricional e à disponibilidade de carboidratos assimiláveis pelo fungo que perduram durante o processo de fabricação da cerveja, pois, segundo Clark e colaboradores (1987), resíduos de cervejaria podem conter altas quantidades de proteínas e carboidratos.

O farelo de trigo e o farelo de milho foram os substratos que apresentaram maiores concentrações de esporos com a maceração, depois do bagaço de malte, e não diferiram estatisticamente entre si. Acredita-se que isso tenha ocorrido devido a quantidade de amido presente nos meios, cerca de 35,5 e 54,4% respectivamente (TD SOFTWARE, 2021). Santos (2017), ao empregar farelo de trigo e farelo de milho para a produção de esporos de *M. anisopliae*, ressalta que é possível obter concentrações de esporos consideráveis nestes meios devido a maior área superficial destes substratos e a relevante composição nutricional dos mesmos, o que está de acordo com o presente trabalho.

A quirera de milho, foi o substrato que resultou em uma das menores concentrações de esporos, possivelmente devido à sua maior granulometria que pode ter dificultado o acesso do fungo aos nutrientes, apesar de ter granulometria próxima à do arroz. Isso pode ter ocorrido devido à grande quantidade de celulose e hemicelulose presente no pericarpo do grão de milho. Segundo Mourão *et al.* (2012), cerca de 23% e 67% da quirera de milho são de celulose e hemicelulose, respectivamente, e o fungo *M. anisopliae* não tem sido reportado na literatura como bom produtor de celulasas e hemicelulasas para degradar estes constituintes do grão, dificultando o acesso a compostos de baixo peso molecular. Isso pode explicar porque o fungo não utiliza o bagaço de cana-de-açúcar como fonte de nutriente, devido a sua composição ser em grande parte de celulose e hemicelulose. O que também pode ter ocorrido é que o fungo

encontrou dificuldade em romper a camada proteica que envolve os grânulos de amido, devido à natureza compacta dos mesmos. Para a ruptura desta camada proteica podem ser usados alguns processamentos, como moagem, tostagem, peletização, laminação a vapor, expansão e extrusão (MCALLISTER *et al.*, 1990; MOURÃO *et al.*, 2012). Pires *et al.* (1999) e Mourão *et al.* (2012), citam que, quando o grão de milho passa por algum tipo de processamento que quebre a estrutura do endosperma, há a exposição dos grânulos de amidos, que ficam susceptíveis a gelatinização quando entram em contato com a água e são expostos ao calor, facilitando a degradação enzimática.

Ao avaliar o aumento da concentração de esporos entre os ensaios com diferentes formas de umidificação, o menor aumento na maceração foi verificado para a quirera (2,7 vezes maior na maceração), enquanto que o maior aumento foi para o farelo de milho (7,8 vezes), ficando o farelo de trigo em posição intermediária (5,4 vezes). Desta forma, reforça-se a dificuldade em se lixiviar os nutrientes ao se empregar a quirera de milho na maceração.

O farelo de arroz e o resíduo de uva foram os substratos com menores concentrações de esporos, em ordem decrescente respectivamente. O resíduo de uva foi o substrato com as menores concentrações de esporos, isso pode ter ocorrido devido a composição do meio, a qual possibilita a produção de esporos, porém, carece de um equilíbrio correto entre as fontes de carbono e nitrogênio, necessárias para o pleno desenvolvimento do fungo, visto que este resíduo é rico em celulose, fitoquímicos, proteínas e minerais. A uva é uma das frutas com maiores quantidades de compostos fenólicos quando comparada com outras frutas e vegetais, sabe-se que compostos fenólicos podem ter ação antifúngica dependendo da quantidade e do tipo em que são encontrados (MACHEIX; FLEURIET; BILLOT, 1990; OLIVEIRA *et al.*, 2007). Strapasson (2016), realizou a análise de pH da farinha de resíduo de uva, e encontrou valores entre 3,6 e 4,0, isso também pode interferir de forma significativa no crescimento microbiano, visto que o fungo *M. anisopliae* prefere pH próximo do neutro 7,0 (PRAKASH; PADMAJA; KIRAN, 2008).

No farelo de arroz é possível observar uma diminuição da concentração de esporos nas proporções (substrato:suporte) de 7:3 e 9:1, quando comparadas a proporção 5:5, isso pode ter ocorrido devido à granulometria deste meio ser mais fina, acredita-se que quando há o aumento da quantidade de substrato e a

diminuição do conteúdo de suporte, ocorre a aglomeração desse material dificultando o crescimento fúngico entre as partículas. Santos (2017), também cultivou *M. anisopliae* em farelo de arroz e obteve baixas concentrações de esporos. A autora salienta que isso possa ter ocorrido devido à formação de grumos do meio, que impediram o crescimento e desenvolvimento do fungo, o que corrobora com o discutido no presente estudo. Dorta *et al.* (1990), avaliaram a produção do fungo *M. anisopliae* em meio contendo apenas farelo de arroz e meio contendo farelo de arroz + casca de arroz, obtiveram uma produção maior de esporos, o dobro, no meio com a casca e atribuem esses resultados ao grau de aglomeração do meio, que é menor no meio contendo a casca, permitindo assim a troca gasosa. Oli *et al.* (2014), estudaram a absorção de água de diferentes tipos de arroz e concluíram que o arroz integral absorve menos água do que o arroz beneficiado devido principalmente à camada de farelo presente no grão integral, a qual contém grande quantidade de lipídeos e proteínas, resultando em uma camada hidrofóbica que dificulta a difusão de água no grão. Esta composição do farelo de arroz rica em lipídeos e proteínas pode explicar porque a produção de esporos foi relativamente menor neste substrato, acredita-se que o farelo de arroz apesar de ser oriundo de um grão rico em amido, o arroz, e apresentar cerca de 25% de amido (TD SOFTWARE, 2021), não é capaz de disponibilizar esse amido para a hidrólise e consumo do fungo.

Observa-se que o processo de maceração foi capaz de proporcionar bons resultados, porém ainda na mesma ordem de grandeza de concentração de esporos observadas para o arroz (CUNHA *et al.*, 2020b). A partir destes resultados, optou-se por trabalhar com diferentes níveis de umidade, pois acreditou-se que a quantidade de água empregada, baseada em experimentos para arroz, não era adequada a materiais com alto teor de fibras, uma vez que a literatura demonstrou que estes materiais necessitam de conteúdos de água mais elevados do que materiais predominantemente amiláceos (SOCCOL, 1992). Estes ensaios foram realizados sem maceração, uma vez que o propósito deste trabalho é a substituição do arroz tipo 1 em escala industrial, de modo que uma etapa de maceração certamente trará inconvenientes operacionais devido a: macerar e drenar o substrato; geração água residuária que carece de tratamento para descarte adequado; aumento da possibilidade de contaminação microbiana, visto que estes resíduos possuem uma carga microbiana nativa.

Cavalcante *et al.* (2008), também maceraram os substratos (arroz, farelo de milho e farelo de trigo) que utilizaram para a produção de esporos de *Trichoderma* e concluíram que, dependendo do tempo de imersão, pode ocorrer a solubilização de alguns nutrientes que são perdidos para o meio líquido, além de afetar a estrutura do meio.

No decorrer da pesquisa bibliográfica por referências, observou-se que diversos autores que trabalham com o cultivo de fungos entomopatogênicos, ao tratarem da umidificação do meio, relatam que os meios foram imersos em água por um determinado período e logo após drenados, ou que foi adicionada certa quantidade de água ao meio, sem deixar claro a umidade inicial e final do substrato, metodologias essas que dificultam a reprodutibilidade e a referência de tais trabalhos.

Para prosseguir com os ensaios de otimização das condições de cultivo, selecionou-se apenas um substrato para dar continuidade, considerando que todos os meios foram capazes de produzir esporos com concentrações da mesma ordem de grandeza da obtida no arroz, então optou-se por avaliar outros quesitos, como: acessibilidade, custo, características físicas e manuseio.

O farelo de soja não proporcionou a esporulação do fungo. Com a quirera de milho foi possível obter esporulação, porém em baixas concentrações. O bagaço de uva e o farelo de arroz apresentam granulometria fina, o que faz com que os substratos formem aglomerados mesmo em mistura com bagaço de cana, dificultando o crescimento microbiano. Além disso, o bagaço de uva, necessita de operações de secagem e moagem para homogeneizar sua granulometria, não sendo vantajoso economicamente e industrialmente.

O bagaço de malte, assim como o bagaço de uva, necessita de cuidados especiais durante o transporte e armazenamento, devido à alta umidade desses resíduos e a rica composição nutricional, que favorecem o crescimento de diversos microrganismos. Cordeiro (2011), cita que o bagaço de malte é um resíduo com potencial para uso em diversas áreas, porém a sua alta umidade, é um dos fatores limitantes durante o transporte e armazenamento do mesmo, e que fungos e leveduras são os principais microrganismos responsáveis pela degradação deste resíduo. O bagaço de malte possui composição bromatológica heterogênea, devido a possível adição de diferentes cereais e outros produtos, variando entre as indústrias de bebidas (CABRAL FILHO, 1999). Além de já ser

também utilizado na alimentação de ruminantes (VELASCO *et al.*, 2009). Por essas razões e pela alta demanda que as biofábricas exigiriam desse resíduo, este não foi selecionado para as próximas etapas.

O farelo de trigo, apesar de proporcionar concentrações de esporos similares às do farelo de milho, não foi selecionado devido à sua granulometria, a qual é mais fina que a do farelo de milho e propensa a compactar, visto que necessita-se de uma quantidade bem maior de BC para ter uma boa estrutura física do meio, sem compactação. Além disso, foi possível observar que o fungo demora mais para miceliar e esporular no farelo de trigo, aspecto importante do ponto de vista de que esse substrato fica mais susceptível à contaminação por patógenos em um processo manual, por exemplo.

Diante disso, o farelo de milho foi o substrato selecionado, visto que: é um resíduo abundante encontrado com certa facilidade durante todo o ano, pois cada quilo de milho processado pode render de 60-70 g de farelo de milho (ROSE; INGLET; LIU, 2010), e não necessita de pré-tratamentos.

No quesito preço, este se mostra vantajoso em relação ao arroz tipo 1, uma vez que o farelo de milho custa cerca de R\$ 1,20 / kg em contrapartida com R\$ 3,10 / kg do arroz tipo 1. Valores obtidos a partir de pesquisa de mercado, realizada na cidade de São José do Rio Preto/SP, entre os meses de abril e maio de 2020, em quatro empresas fornecedoras atacadistas.

O farelo de milho, por ser um resíduo, pode apresentar heterogeneidade em sua composição química, visto que esta é influenciada por fatores genéticos, edafoclimáticos e do beneficiamento (MOURÃO *et al.*, 2012), e isto pode interferir na produção de esporos. Porém, custo do farelo de milho em relação ao do arroz é a uma das principais vantagens deste resíduo, além da concentração de esporos produzidas neste serem próximas a concentração obtida no arroz. Além disso, o farelo de milho é um subproduto amiláceo, visto que o milho contém de 70 a 80% de amido (ROSTAGNO *et al.*, 2011), portanto, acredita-se que qualquer alteração em sua composição não afetaria a disponibilidade deste carboidrato para o fungo, que consome uma pequena parcela de amido, como analisado por Cunha (2020c). De acordo com Rezende (2009), a diversidade de proteínas (glutêina, albumina, prolamina e globulina) presentes no arroz, um dos fatores responsáveis pela preferência do fungo por este substrato. O milho por sua vez, também apresenta diversos tipos de

proteínas (albumina, zeína, globulina, gluteína 1, 2 e 3), o que pode ser responsável pela boa adaptação e esporulação do fungo a este meio (LANDRY; MOUREAUX, 1970), além de conter micronutrientes essenciais, como o ferro e o cálcio (AFIFAH *et al.*, 2021).

Cunha (2020c), ao realizar análises enzimáticas de amilase no cultivo de *M. anisopliae* no arroz, ressaltou a importância de o meio conter fontes de carboidratos facilmente assimiláveis para o desenvolvimento do fungo, e cita que durante o processo de moagem do arroz, alguns constituintes, como carboidratos de baixo peso molecular, podem ser liberados e permanecerem como poeira no grão, facilitando o aproveitamento pelo fungo durante o crescimento inicial. Acredita-se o farelo de milho por ser mais fino que a quirera de milho, passa a fornecer fontes de amido e proteínas mais acessíveis ao fungo, devido a maior área superficial disponível e maior acesso ao conteúdo presente no endosperma.

Nas Tabelas 5.3. e 5.4. e nas Figuras 5.1. e 5.2. é possível observar a análise granulométrica da área superficial do arroz (7% b.u.) e do farelo de milho (9% b.u.) respectivamente.

Tabela 5.3. Classificação dos grãos de arroz por intervalos de área superficial.

Classe (cor)	Quantidade de objetos		Média da área superficial (cm ²)	Intervalo de tamanho (cm ²)
	número	%		
	8	29,6	0,0491	< 0,0502
	6	22,2	0,0523	0,0502 - 0,0534
	8	29,6	0,0565	0,0534 - 0,0581
	5	18,5	0,0609	0,0581 - 0,0627

Fonte: a própria autora.

Figura 5.1. Classificação dos grãos de arroz por intervalos de área superficial.



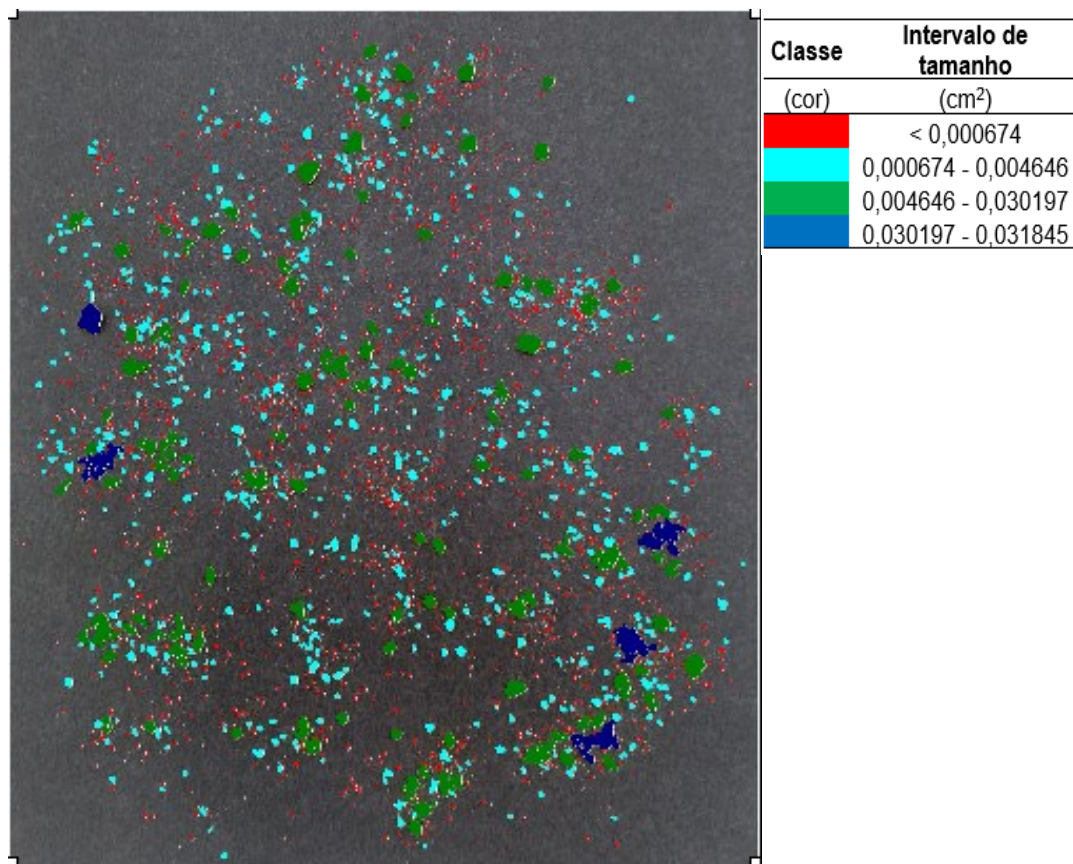
Fonte: a própria autora

Tabela 5.4. Classificação das frações de farelo de milho por intervalos de área superficial.

Classe	Quantidade de objetos		Média da área superficial	Intervalo de tamanho
(cor)	número	%	(cm ²)	(cm ²)
	2050	76,6	0,000227	< 0,000674
	508	19,0	0,001697	0,000674 - 0,004646
	113	4,2	0,010126	0,004646 - 0,030197
	5	0,2	0,043909	0,030197 - 0,031845

Fonte: a própria autora.

Figura 5.2. Classificação das frações de farelo de milho por intervalos de área superficial.



Fonte: a própria autora

Verifica-se, a partir dos resultados obtidos com a análise de granulometria, que os grãos de arroz apresentam valores de área superficial próximos, variando de 0,04 a 0,06 cm², e bem distribuídos nos intervalos de tamanhos, resultando em um substrato de granulometria homogênea. Já o farelo de milho, apresenta valores de área superficial entre 0,0002 e 0,04 cm², sendo que a maior parte deste meio se encontra classificada no menor intervalo de tamanho, o que resulta em um substrato de granulometria heterogênea.

Acredita-se que a granulometria homogênea do arroz interfira de maneira positiva no desenvolvimento do fungo, explicando a preferência por este meio e a uniformidade na produção de esporos. Segundo PANDEY *et al.* (1999), partículas menores proporcionam maiores áreas de contato do meio com o fungo, e assim maior aproveitamento do substrato, como é o caso do farelo de milho, como observado o maior valor da área superficial específica na Tabela 5.5. No entanto, substratos pulverulentos tende a formar aglomerados, que

limitam a colonização pelo fungo. Para que não ocorra a compactação do meio e dificulte a troca gasosa, utilizou-se neste trabalho bagaço de cana como suporte para estruturar o meio. Logo, a diferença de granulometria entre os substratos passa a ser um fator contornável e que deve ser analisado empregando-se outros parâmetros como a porosidade do meio, a tortuosidade, a distribuição de tamanho de poros, dentre outros (CANEDO *et al.*, 2021). Na Tabela 5.5. encontra-se informações gerais referentes ao custo, área superficial e composição centesimal do farelo de milho e do arroz.

Tabela 5.5. Informações gerais do farelo de milho e arroz.

	Farelo de milho	Arroz
Preço R\$/ kg	1,20	3,10
Área superficial específica	26,91 cm ² / g	2,92 cm ² / g
Composição*¹ (g/100g)		
Valor energético (kcal)	224	365
Proteína	8,36	7,13
Gorduras totais	0,92	0,66
Carboidratos	85,64	79,95
Fibra alimentar	79	1,3
Amido (%)	54* ²	85* ³

(*¹) TABNUT (2021). (*²) TD SOFTWARE (2021). (*³) WALTER; MARCHEZAN; AVILA, 2008.

Fonte: a própria autora.

Na Tabela 5.5. são apresentadas informações gerais do farelo de milho e do arroz, com o intuito de facilitar a visualização e comparação entre os meios. Os preços dos substratos e a área superficial foram discutidos anteriormente. Observa-se que a composição centesimal do farelo de milho e do arroz apresentam valores próximos quanto ao valor energético, proteína, gorduras e carboidratos, o que pode explicar o fato de alcançar concentrações de esporos próximas entre os meios. Observa-se que tanto o farelo de milho quanto o arroz possuem elevadas quantidades de amido, apesar do farelo de milho ter um teor menor do que o arroz, ainda sim seria o suficiente para a demanda de consumo do fungo, que é cerca de 20%, segundo Cunha (2020c).

Há estudos com diferentes fungos entomopatogênicos utilizando diversos resíduos sólidos a partir do CES, como apresentado na Tabela 5.6.

Tabela 5.6. Produção de fungos entomopatogênicos em resíduos agroindustriais.

Fungo entomopatogênico	Resíduos	Produção	Referência
<i>M. anisopliae</i>	arroz	$6,5 \times 10^9$ ufc/ g	Reddy <i>et al.</i> (2017)
	sorgo	$3,5 \times 10^9$	
	milho	$1,0 \times 10^9$	
	farelo de trigo	$8,0 \times 10^8$	
	trigo	$7,5 \times 10^8$	
<i>M. anisopliae</i>	arroz	$5,91 \times 10^9$ ufc/ g	Joaquín; Stiward (2013)
	milho	$2,35 \times 10^{10}$	
	cevada	$4,90 \times 10^8$	
	trigo	$3,77 \times 10^8$	
	sorgo	$3,13 \times 10^8$	
<i>Isaria fumosorosea</i>	arroz	$8,47 \times 10^9$	
	milho	$1,99 \times 10^9$	
	cevada	$3,14 \times 10^9$	
	trigo	$3,63 \times 10^8$	
	sorgo	$1,54 \times 10^8$	
<i>Lecanicillium lecanii</i>	arroz	$2,66 \times 10^9$	
	milho	$4,47 \times 10^7$	
	cevada	$5,38 \times 10^8$	
	trigo	$1,36 \times 10^9$	
	sorgo	$1,51 \times 10^9$	

Tabela 5.6. Continuação.

Fungo entomopatogênico	Resíduos	Produção	Referência
<i>I. farinosa</i>	farelo de soja	1,3 x 10 ⁹ esporos/ g	Mascarin; Alves; Lopes (2010)
	quirela de milho	1 x 10 ⁹	
<i>I. fumosorosea</i>	arroz integral	1,1 x 10 ⁹	Sahayaraj; Namasivayam (2008)
<i>B. bassiana</i>	trigo	11,76 x 10 ¹⁰ esporos/ 100 g	
<i>P. fumosoroseus</i>	sorgo	10,37 x 10 ¹¹	
<i>V. lecanii</i>	sorgo	11,31 x 10 ¹⁰	
<i>Bipolaris euphorbiae</i>	sorgo em grão	4,74 x 10 ⁶ esporos/ g	Penariol <i>et al.</i> (2008)
	casca de soja	4,72 x 10 ⁶	
<i>Lecanicillium lecanii</i> JAB 02	trigo grosso e sorgo (85:15%)	2,03 x 10 ⁷ esporos/ g	Machado <i>et al.</i> (2009)
	trigo grosso e lentilha em (70:30%)	4,21 x 10 ⁷	
	farelo de trigo e sorgo em (85:15%)	2,62 x 10 ⁷	
	farelo de trigo e lentilha em (70:30%)	1,42 x 10 ⁷	
<i>Lecanicillium lecanii</i> JAB 45	trigo grosso e lentilha (55: 45%)	5,07 x 10 ⁷	
	farelo de trigo e trigo em grão em (70: 30%)	10,52 x 10 ⁷	
	farelo de trigo e painço em (85:15%)	5,62 x 10 ⁷	
	farelo de trigo e lentilha em (70: 30%)	5,47 x 10 ⁷	
<i>M. anisopliae</i>	arroz + resíduo de cervejaria (1:1)	11,3 x 10 ⁸ esporos/ g	Sene <i>et al.</i> (2010)
<i>Trichoderma viride</i>	bagaço de uvas e borras de vinho	6,65 x 10 ⁹ ufc/ g	Zhihui <i>et al.</i> (2008)

Fonte: a própria autora.

Verifica-se na Tabela 5.6. que é possível considerável produção de diferentes fungos entomopatogênicos em resíduos sólidos agroindustriais. Reddy *et al.* (2017) e Mascarin; Alves; Lopes (2010), realizaram os ensaios em

embalagens plásticas e os demais autores citados em frascos de erlenmeyers. Observa-se que alguns autores apresentam os resultados obtidos a partir da contagem de esporos, estrutura reprodutiva dos fungos, enquanto outros autores, utilizam a contagem de unidades formados de colônia (ufc), que representa o crescimento vegetativo fúngico. Apesar de serem estágios diferentes de desenvolvimento do fungo, são formas de representar o rendimento obtido.

Reddy *et al.* (2017), obtiveram maior produção de *M. anisopliae* em arroz devido à composição rica em amido, o qual é hidrolisado por amilases produzidas pelo fungo, e convertido em glicose, para posterior aproveitamento microbiano. Entretanto alguns outros meios testados pelos autores também contêm amido, como o milho, trigo e o sorgo. Provavelmente, além do amido, podem haver carboidratos de baixo peso molecular que são mais facilmente assimilados pelo fungo, presentes nos grãos de arroz, de acordo com Cunha (2020c). Joaquín, Stiward (2013), avaliaram o rendimento de três fungos entomopatogênicos diferentes, *M. anisopliae*, *I. fumosorosea* e *L. lecanii*, em cinco substratos diferentes, arroz, milho moído, cevada, trigo e sorgo. Obtiveram maior produção de *M. anisopliae* em milho ($2,35 \times 10^{10}$ ufc/ g) e arroz ($5,91 \times 10^9$ ufc/ g), para *I. fumosorosea* a maior produção foi nos meios arroz ($8,47 \times 10^9$ ufc/ g) e cevada ($3,14 \times 10^9$ ufc/ g), para *L. lecanii* a maior produção de esporos foi nos meios arroz ($2,66 \times 10^9$ ufc/ g) e sorgo ($1,51 \times 10^9$ ufc/ g). Os autores concluem que as diferenças de produção entre os fungos nos diferentes substratos se dão devido a adaptabilidade de cada microrganismo ao meio, principalmente em razão da disponibilidade de nutrientes e da capacidade de cada fungo de assimilar determinados constituintes. Estes autores sustentam ainda que não apenas a umidade do meio é relevante no cultivo, mas a interação água-substrato, uma vez que o mesmo fungo se desenvolve bem em substratos diferentes com umidade diferentes, como pode ser observado no presente trabalho. Os mesmos autores ainda ressaltam que o milho moído é o substrato mais indicado para substituir o arroz na produção de *M. anisopliae*, devido ao rendimento do fungo ser superior e ao menor custo, como aqui observado.

Mascarin; Alves; Lopes (2010), mencionam que dentre os resíduos testados para *I. farinosa* e *I. fumosorosea*, os meios de grãos de trigo e casca de arroz exibiram baixas concentrações de esporos devido provavelmente à relação

C:N e à composição nutricional dos mesmos, as quais não foram adequadas às exigências dos fungos testados. Citam ainda que fatores como o tamanho da partícula do substrato, relacionada com a porosidade do meio, e a umidade do meio podem ter interferido no crescimento microbiano.

No presente trabalho, foram testadas várias proporções substrato:suporte nos ensaios de otimização das condições de cultivo de farelo de milho, como se verá adiante, para que o efeito da porosidade do leite pudesse ser avaliado. Neste sentido, visando a ampliação de escala para condições de cultivo industriais, é necessário haver um equilíbrio entre os requisitos nutricionais do meio (quantidade de substrato ativo) e a estrutura física do meio (quantidade de inerte fibroso) que favoreça a troca de gases e remoção de calor metabólico.

Penariol *et al* (2008), alcançaram maiores produções de esporos de *Bipolaris euphorbiae* em sorgo e em casca de soja, e mencionam que provavelmente a composição nutricional dos meios foram adequadas às exigências do fungo testado. Machado *et al* (2009), produziram esporos de dois isolados de *Lecanicillium lecanii* utilizando misturas de diferentes substratos, trigo grosso, farelo de trigo, farelo de soja, sorgo, quirera de milho, lentilha e painço, e citam que essas misturas podem proporcionar uma composição nutricional mais equilibrada para o fungo. Sene *et al.* (2010), apontam que o resíduo de cervejaria exerceu apenas o papel de suporte do meio, quando utilizado juntamente com o arroz para a produção de *M. anisopliae*, e que quando o fungo foi cultivado somente no resíduo de cervejaria, este proporcionou uma produção média de esporos ($1,9 \times 10^8$ esporos/ g de substrato), que isso pode ter ocorrido devido a razões nutricionais. Este achado não é condizente com os resultados aqui apresentados para o resíduo de malte, o qual foi utilizado como substrato ativo, alcançando $1,08 \times 10^{10}$ esporos/ gsa, o que demonstra a dificuldade em se empregar um resíduo cuja caracterização depende de informações do fornecedor e das características do processamento a que foi sujeito. Zhihui *et al.* (2008), conseguiram boa produção de *Trichoderma viride* em bagaço de uvas e borras de vinho, mencionando que esses resíduos são compostos por vários nutrientes que contribuem para o crescimento microbiano. Tekam; Kelwatkar; Das (2018), avaliaram a produção de esporos de *M.*

anisopliae em diferentes resíduos (grama preta, feijão-caupi, grama verde, lentilha, ervilha, rajma, amendoim, soja, bolo de gergelim e bolo de neem) e concluíram que em todos esses meios o fungo foi capaz de se desenvolver e esporular durante o período todo de cultivo, obtendo concentração de esporos em 10^7 esporos/ mL, sendo o feijão-caupi o meio que proporcionou maior esporulação. Os autores sustentam que a maior concentração de esporos pode ser devido à composição do feijão caupi, que possui mais nitrogênio do que carbono e assim favorecer mais o crescimento do fungo. Esta hipótese dos autores não corresponde totalmente com o observado no presente estudo, visto que o fungo desenvolveu melhor em substratos com elevadas quantidades de carbono, como o bagaço de malte, farelo de milho e farelo de trigo.

Vários autores suplementam os meios de cultivo sólido para aumentar a produção de esporos. Mishra; Kumar; Malik (2016), fizeram adição de nutrientes (Dextrose 1,5%, NaNO_3 0,25%, KH_2PO_4 0,1%, MgSO_4 0,05%) aos resíduos testados (farelo de trigo, casca de arroz, ervilha-de-pombo, urad, torta de sementes da pongâmia e de pinhão manso e resíduos de folhas de chá) e obtiveram o melhor resultado com o meio casca de arroz ($1,8 \times 10^9$ esporos/ g de substrato) para *B. bassiana*. Tewari; Bhanu (2004), suplementaram vários resíduos com farinha de grão de bico como fonte de nitrogênio orgânico, para a produção de *T. harzianum*, alcançaram melhores resultados com a palha de trigo ($11,52 \times 10^8$ ufc/ g de substrato), palha de arroz ($11,96 \times 10^8$ ufc/ g); bagaço de cana ($11,79 \times 10^8$ ufc/ g) e resíduo de papel ($11,07 \times 10^8$ ufc/ g). Pandey, Kanauija (2008), adicionaram sacarose em diversos grãos para a produção de esporos de *M. anisopliae*, obtiveram os seguintes resultados: grãos de milho ($4,76 \times 10^7$ esporos/ mL), sorgo ($6,85 \times 10^7$ esporos/ mL), painço ($6,83 \times 10^7$ esporos/ mL), soja ($4,93 \times 10^7$ esporos/ mL), cevada ($5,20 \times 10^7$ esporos/ mL) e trigo ($5,98 \times 10^7$ esporos/ mL), testados. Prakash; Padmaja; Kiran, (2008) adicionaram extrato de levedura aos substratos arroz, cevada e sorgo para otimizar a produção de esporos de *M. anisopliae*, obtiveram: $6,2 \times 10^{10}$; $4,9 \times 10^{10}$ e $4,5 \times 10^{10}$ esporos/ g de substrato, respectivamente. De modo geral, com exceção de Prakash; Padmaja; Kiran (2008), os restantes dos autores citados acima obtiveram rendimentos abaixo do encontrado no presente trabalho. Para uso em escala industrial, a suplementação com determinados elementos pode encarecer o processo de produção, tornando a substituição do substrato inviável. No caso

dos autores Tewari; Bhanu (2004), que suplementaram com farinha de grão-de-bico, esta além de ter um valor alto é utilizada como alimento. Com isso, os substratos utilizados no presente trabalho não receberam nenhum tipo de suplementação.

5.2. Ensaio de otimização das condições de cultivo com farelo de milho

Para os ensaios de otimização, empregou-se os níveis de temperatura em 27°C; 30°C e 33°C, mesmos níveis utilizados por Cunha *et al.* (2019). As proporções (substrato:suporte) utilizadas foram de 7:3; 8:2 e 9:1, já que foi a faixa de proporções em que se obteve maiores concentrações de esporos nos ensaios de seleção.

5.2.1. Primeiro ensaio de otimização

A princípio, estabeleceu-se os níveis de umidade em 45%; 65% e 85%, baseados naqueles encontrados na literatura para o arroz (Cunha, 2020c) e para substratos amiláceos-celulósicos. Segundo Soccol, (1992), para substratos amiláceos (arroz, trigo, centeio, cevada, milho e mandioca) o teor de umidade para o CES varia de 25 e 60%, enquanto que para os celulósicos (palhas, cascas, bagaço e outros) os teores são mais elevados, de 60 a 80%. Nestes ensaios, adicionou-se água destilada imediatamente antes da esterilização, sendo os resultados experimentais obtidos para o planejamento estatístico fatorial Box-Behnken apresentados na Tabela 5.7. A análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 5.8. indicou que o modelo não foi preditivo a 95% de intervalo de confiança, devido ao grande erro de falta de ajuste do modelo aos dados experimentais, e que apenas o fator umidade provocou variação significativa na resposta concentração de esporos, como pode ser visto no diagrama de Pareto apresentado na Figura 5.3.

Tabela 5.7. Resultados obtidos no primeiro ensaio de otimização das condições de cultivo empregando-se a mistura farelo de milho:BC.

Ensaio	T (°C)	U (%)	P (p/p)	Ce 10 ⁸ (esporos/gsa)
1	27°C	45%	8:2	13,5
2	33°C	45%	8:2	8,75
3	27°C	85%	8:2	7,75
4	33°C	85%	8:2	4,75
5	27°C	65%	7:3	62,0
6	33°C	65%	7:3	19,4
7	27°C	65%	9:1	46,0
8	33°C	65%	9:1	36,0
9	30°C	45%	7:3	42,0
10	30°C	85%	7:3	5,43
11	30°C	45%	9:1	42,4
12	30°C	85%	9:1	8,00
13	30°C	65%	8:2	47,3
14	30°C	65%	8:2	44,5
15	30°C	65%	8:2	33,5
Média (esporos/gsa)				28,1
DV (esporos/gsa)				1,91
CV (%)				68,0

* T (°C) – Temperatura; U (%) – Umidade; P (p/p) – Proporção substrato:suporte; Ce – Concentração de esporos por gsa; DV – Desvio Padrão; CV – Coeficiente de variação (CV = DP/Média).

Fonte: a própria autora.

A média da concentração de esporos da Tabela 5.7. é de $2,81 \times 10^9$ esporos/gsa, com elevado coeficiente de variação, típico de um modelo não preditivo. Em termos práticos, isso significa que as condições de cultivo têm que ser melhor estabelecidas para que a produção de esporos possa ser estável e previsível, uma condição necessária em termos de aplicação industrial.

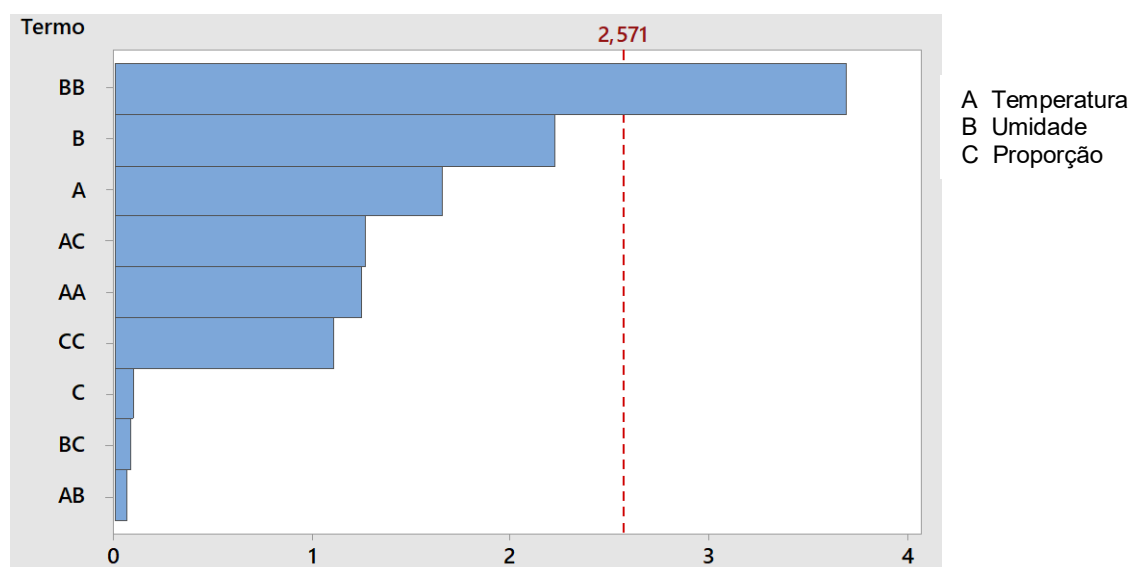
Tabela 5.8. ANOVA para o ajuste do modelo quadrático aos dados experimentais da primeira otimização das condições de cultivo com o farelo de milho:BC.

Fonte de variabilidade	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
<i>Modelo</i>	9	4,30904	4,78782	2,89	0,127
<i>Erro</i>	5	8,26930	1,65386		
Falta de ajuste	3	7,21055	2,40352	4,54	0,186
Erro puro	2	1,05875	5,29375	*	*
<i>Total</i>	14	5,13597			

GL - graus de liberdade; SQ - soma de quadrados residual; QM - quadrado médio dos resíduos.

Fonte: a própria autora.

Figura 5.3. Diagrama de Pareto para o ajuste do modelo estatístico aos fatores da primeira otimização das condições de cultivo para a mistura farelo de milho:BC, com intervalo de confiança de 95%.



Fonte: a própria autora.

Observa-se que com a otimização das condições não foi possível obter uma condição ótima de crescimento do fungo, o que significa que o fungo estudado se adaptou bem a todas as condições empregadas em todos os níveis, tendo em vista a elevada concentração de esporos observada. Diante deste resultado inconclusivo, estreitou-se a faixa de umidade trabalhada, por ser o fator

significativo para a produção dos esporos. Acreditou-se que devido à ampla faixa de umidade, esta poderia estar de certa forma mascarando os resultados. Assim, estabeleceu-se os níveis de umidade em 65%, 70% e 75%.

5.2.2. Segundo ensaio de otimização

No segundo ensaio de otimização das condições de cultivo, foram mantidos os níveis da temperatura de cultivo, em 27°C; 30°C e 33°C, assim como os níveis de proporção (substrato:suporte), de 7:3; 8:2 e 9:1, modificando-se apenas os níveis de umidade para 65%; 70% e 75%, sendo os resultados destes ensaios apresentados na Tabela 5.9. e a ANOVA na Tabela 5.10.

Observa-se na Tabela 5.9. que novamente o modelo não foi preditivo a 95% de intervalo de confiança. De um modo geral, os resultados da segunda otimização foram superiores aos do primeiro, visto que para todos os tratamentos os valores de C_e são da ordem de 10^9 esporos/gsa, que a média de C_e ($4,05 \times 10^9$ esporos/ gsa) é maior e a dispersão é menor ($CV = 41,5\%$). Neste ensaio, nenhum fator provocou variação significativa em C_e , como apresentado no diagrama de Pareto da Figura 5.4.

Tabela 5.9. Resultados obtidos no segundo ensaio de otimização das condições de cultivo empregando-se a mistura farelo de milho:BC.

Ensaio	T (°C)	U (%)	P (p/p)	Ce x 10 ⁹ (esporos/gsa)
1	27°C	65%	8:2	4,47
2	33°C	65%	8:2	5,55
3	27°C	75%	8:2	2,00
4	33°C	75%	8:2	2,90
5	27°C	70%	7:3	6,23
6	33°C	70%	7:3	3,96
7	27°C	70%	9:1	3,13
8	33°C	70%	9:1	3,60
9	30°C	65%	7:3	3,17
10	30°C	75%	7:3	6,89
11	30°C	65%	9:1	5,27
12	30°C	75%	9:1	1,48
13	30°C	70%	8:2	2,18
14	30°C	70%	8:2	6,48
15	30°C	70%	8:2	3,83
Média (esporos/gsa)			4,08	
DV (esporos/gsa)			1,69	
CV (%)			41,5	

* T (°C) – Temperatura; U (%) – Umidade; P (p/p) – Proporção substrato:suporte; Ce – Concentração de esporos por gsa; DV – Desvio Padrão; CV – Coeficiente de variação (CV = DP/Média).

Fonte: a própria autora.

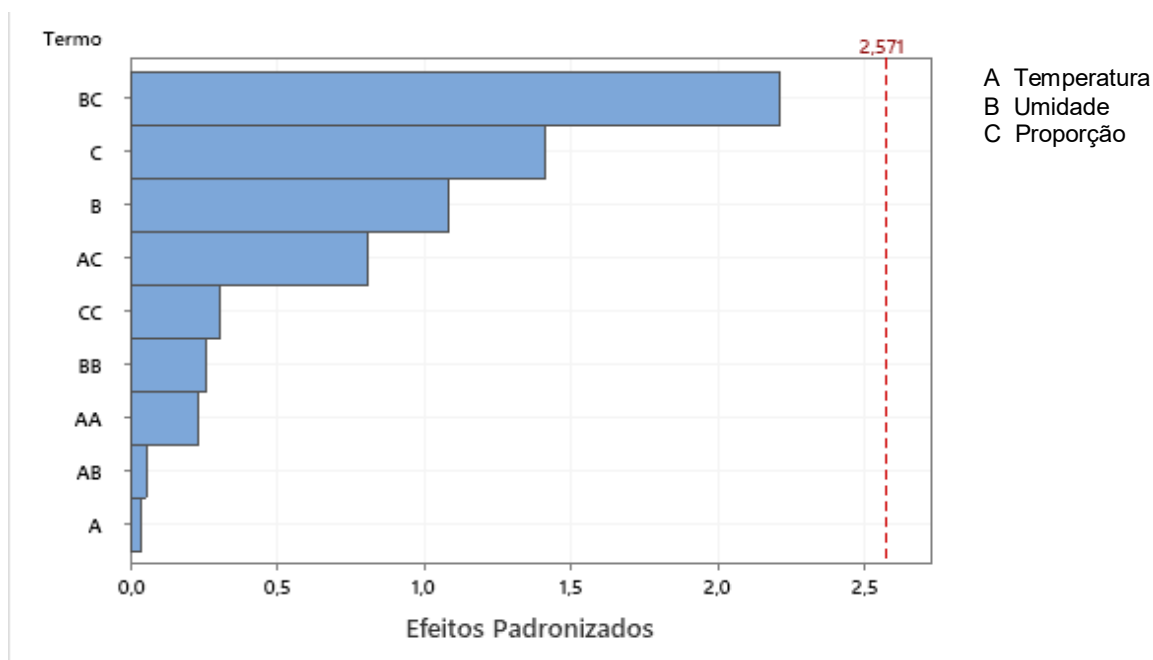
Tabela 5.10. ANOVA para o ajuste do modelo quadrático aos dados experimentais da segunda otimização das condições de cultivo com o farelo de milho:BC.

Fonte de variabilidade	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	2,57098	2,85665	1,00	0,533
Erro	5	1,43464	2,86927		
Falta de ajuste	3	4,96770	1,65590	0,35	0,796
Erro puro	2	9,37866	4,68933	*	*
Total	14	4,00562			

GL - graus de liberdade; SQ - soma de quadrados residual; QM - quadrado médio dos resíduos.

Fonte: a própria autora.

Figura 5.4. Diagrama de Pareto para o ajuste do modelo estatístico aos fatores da segunda otimização das condições de cultivo para a mistura farelo de milho:BC, com intervalo de confiança de 95%.



Fonte: a própria autora.

Assim, constata-se que, mesmo com o segundo ensaio de otimização, ainda não foi possível encontrar uma condição ótima de cultivo, e que estreitando a faixa de umidade o fungo se adaptou melhor, visto que de modo geral a produção de esporos foi maior em comparação com o primeiro ensaio. Por isso, para os ensaios subsequentes fixou-se o ponto central do planejamento fatorial empregado (temperatura 27°C, umidade 70% e proporção substrato:suporte 8:2). Em termos de aplicação prática, o fato de não haver uma condição ótima permite maior flexibilidade no preparo do substrato e nas condições de cultivo, de modo que o controle das variáveis de processo não tenha que ser muito rigoroso. Por outro lado, o planejamento de produção fica mais complexo devido à grande variabilidade dos resultados, ainda que dentro da ordem de 10^9 esporos/gsa.

Evidencia-se que caso os ensaios de otimização fossem realizados por um período maior de cultivo, como o ensaio de cinética de esporulação, provavelmente teríamos concentrações de esporos mais altas, porém, acredita-se que esse aumento seria proporcional em todas as condições trabalhadas, e que ainda sim não se teria uma condição ótima.

Na Tabela 5.11. é possível conferir as temperaturas mais utilizadas por diferentes autores para a produção de esporos de *M. anisopliae* em CES.

Tabela 5.11. Temperaturas de cultivo utilizadas na literatura para a produção de *M. anisopliae*, por CES.

Substratos	Temperatura (°C)	Rendimentos	Referência
Arroz, Farelo de trigo, Farelo de milho, Farelo de trigo + farelo de arroz, Farelo de trigo + farelo de aveia	25°C	10 ⁸ e 10 ⁹ esporos/ g	Santos <i>et al.</i> (2021)
Arroz	26°C	10 ¹⁰ esporos/ g	Mascarin; Quintela (2013)
Gramma preta, Feijão-caupi, Gramma verde, Lentilha, Ervilha, Rajma, Amendoim, Soja, Bolo de gergelim, Bolo de Neem	25°C	10 ⁷ esporos/ mL	Tekam; Kelwatkar (2018)
Arroz parboilizado, Arroz branco inteiro, Arroz quebrado, Arroz em casca, Casca de arroz, Trigo	27°C	10 ⁷ , 10 ⁸ e 10 ⁹ esporos/ g	Kruger <i>et al.</i> (2014)
Milho, Soja, Painço, Sorgo, Cevada, Trigo	25°C	10 ⁷ esporos/ mL	Pandey; Kanaujia (2008)
Casca de café, Resíduo de chá, Farelo de trigo, Resíduos vegetais	27°C	10 ⁷ esporos/ g	Tewelde, Alemu (2019)
Arroz, Sorgo, Milho, Farelo de trigo, Trigo	28°C	10 ⁸ e 10 ⁹ ufc/ g	Reddy <i>et al.</i> (2017)
Arroz + resíduo de cervejaria (1:1)	25°C	10 ⁸ esporos/ g	Sene <i>et al.</i> (2010)
Arroz, Milho, Cevada, Trigo, Sorgo	26°C	10 ⁸ , 10 ⁹ e 10 ¹⁰ ufc/ g	Joaquín; Stiward (2013)

Fonte: a própria autora.

Observa-se na Tabela 5.11. que as temperaturas mais utilizadas na literatura para a produção de *M. anisopliae* por CES, em pequena escala, seja em arroz ou resíduos, são próximas as temperaturas utilizadas no presente estudo. Visto que os autores citados alcançaram satisfatórias concentrações de esporos, a qual depende também de outros fatores de produção e da cepa utilizada. Arthurs; Thomas (2001), avaliaram o efeito da temperatura na esporulação de *M. anisopliae* em cadáveres de gafanhotos do deserto (*Schistocerca gregária*) e concluíram que, após 10 dias de inoculação sob condições de cultivo constantes, a esporulação foi otimizada nas temperaturas entre 20 e 30 °C, com cerca de 10⁹ esporos/ inseto. Os autores observaram ainda que a 25 °C o rendimento de esporos foi maior quando os cadáveres permaneceram em contato com o substrato úmido e que houve baixa produção de esporos a 15 e 40 °C, não havendo esporulação a 10 e 45 °C. Polar *et al.* (2005), realizaram experimentos com dois isolados de *M. anisopliae* para determinar se seriam capazes de crescer em temperaturas próximas à da superfície de bovinos e assim serem patogênicos do carrapato *Boophilus microplus*. A tolerância e a patogenicidade dos isolados foi comparada na temperatura padrão utilizada (28 °C) e nas temperaturas semelhantes à da superfície do gado, entre 31 e 35 °C. Os autores concluíram que o diâmetro da colônia de ambos isolados diminuiu com o aumento da temperatura, e que a patogenicidade de ambos isolados a 28°C foi semelhante, porém de 31 a 35 °C houve diferença na patogenicidade entre as cepas. Namasivayam; Aarthi; Anbazhahan (2015), avaliaram o efeito do pH, teor de umidade, temperatura e da ocorrência de pesticidas sintéticos na produção de *M. anisopliae* em solo *in vitro*. Os autores empregaram os níveis de temperatura 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C, e concluíram que até 50 °C houve o crescimento de unidades formadoras de colônia, porém em temperaturas superiores não. Cunha *et al.* (2019), utilizaram três níveis de temperatura (27, 30 e 33 °C) na produção de esporos de *M. anisopliae* em biorreator de bandeja com cultivo em arroz. Concluíram que a 33 °C a produção de esporos foi menor quando comparada às outras temperaturas, porém ainda era consideravelmente elevada. Desta forma, a melhor faixa de temperatura para *M. anisopliae* é entre 20 a 35 °C, a qual engloba as temperaturas propostas no presente estudo.

Joaquín; Stiward (2013), avaliaram a produção de *M. anisopliae* em resíduos sólidos e no arroz, utilizando umidades de 75 e 73%, respectivamente. Abiy; Tesfaye (2019), otimizaram a produção de esporos de três isolados de *M. anisopliae*, em resíduos sólidos casca de café, resíduos de chá, farelo de trigo e resíduos vegetais. Dentre os substratos que proporcionaram maiores produções de esporos, destacaram-se os resíduos vegetais, com teor de umidade de 60%, na faixa de temperatura de 27°C a 30 °C. Prakash; Padmaja; Kiran, (2008) otimizaram as condições de cultivo para arroz, cevada e sorgo visando a produção de esporos de *M. anisopliae*, em diferentes níveis de pH (6,15; 6,5; 7,0; 7,5 e 7,84), umidade (para a cevada: 67; 65; 70; 75; e 83%, para o arroz: 3; 10; 20; 30 e 37%, e para o sorgo: 67; 65; 70; 75 e 83%) e de concentração de extrato de levedura, (0,65; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,34 g). Estes estudos proporcionaram melhores concentrações de esporos para a umidade de 75,68% para sorgo, 73,21% para cevada e 22,34% para arroz; pH de 7,01 para o arroz, 7,06 para sorgo e em 6,76 para cevada, e concentração de extrato de levedura de 1,45% para o arroz, 1,54% para o sorgo e 2,21% para a cevada. Qiu *et al.*, (2019) otimizaram a temperatura (24 °C; 25 °C e 26 °C), a umidade do substrato (50%; 60% e 70%) e o tempo de cultivos, em dias (10; 12 e 14) para o cultivo de *B. bassiana* em resíduo de cervejaria e encontraram como condições ótimas 60% de umidade, 25 ° C e 12 dias de cultivo. Nota-se que as condições mais otimizadas no processo de produção de esporos de fungos entomopatogênicos são umidade e temperatura, e que os níveis empregados são próximos aos deste trabalho, assim como os melhores resultados são obtidos também nas condições próximas as utilizadas aqui.

5.3. Cinética de esporulação

Inicialmente adotou-se o tempo de cultivo em 10 dias, de acordo com Lopes (2016) e Cunha (2020), que cultivaram o fungo *M. anisopliae* em arroz por este período. Porém, na indústria, o tempo de cultivo em média é de 15 dias, por isso optou-se por realizar o ensaio de cinética de esporulação.

De acordo com a Tabela 5.12. e com a Figura 5.5. é possível observar um aumento considerável da produção de esporos ao longo do cultivo em 15 dias.

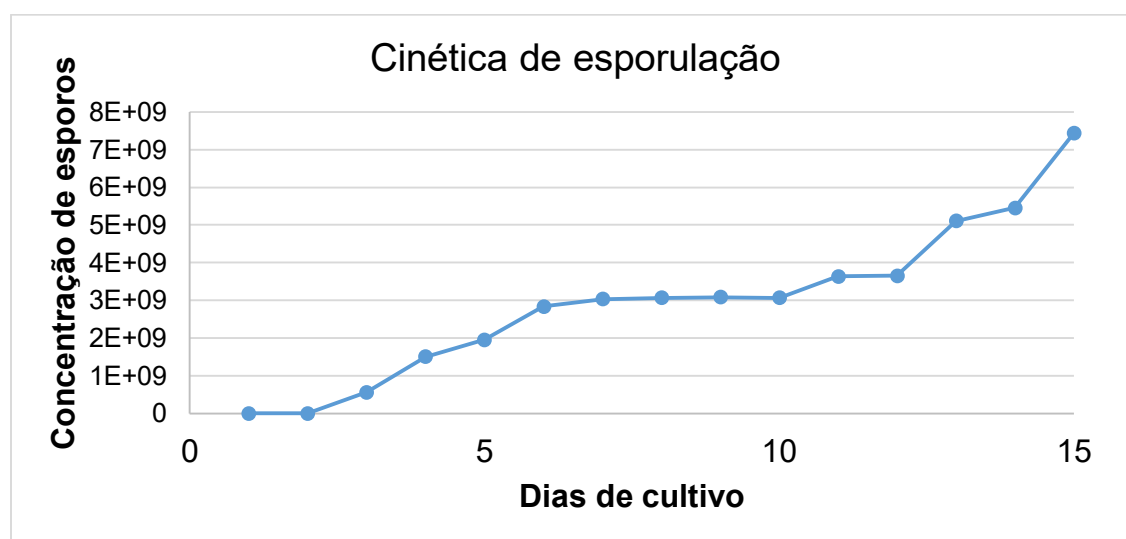
Tabela 5.12. Cinética da produção de esporos ao longo de 15 dias de cultivo em farelo de milho a 27 °C, 70% de umidade e proporção 8:2 (substrato:BC).

Dia de cultivo	$C_e \times 10^9$ (esporos/gsa)	DV	CV
1º	0	±0	0
2º	0	±0	0
3º	0,55	±0,5	9,14
4º	1,5	±0,36	24,04
5º	1,95	±0,1	5,13
6º	2,83	±0,37	13,25
7º	3,03	±0,24	8,13
8º	3,07	±0,11	3,76
9º	3,08	±0,75	24,34
10º	3,07	±0,11	3,76
11º	3,63	±0,17	4,83
12º	3,65	±0,67	18,53
13º	5,1	±0,17	3,39
14º	5,45	±0,57	10,58
15º	7,43	±0,6	8,10

DV – Desvio Padrão; CV – Coeficiente de variação (CV = DP/Média).

Fonte: a própria autora.

Figura 5.5. Cinética da produção de esporos ao longo de 15 dias de cultivo em farelo de milho a 27 °C, 70% de umidade e proporção 8:2 (substrato:BC).



Fonte: a própria autora.

De acordo com Lopes (2016), a qual também realizou a cinética da produção de esporos do fungo *M. anisopliae* ao longo de 11 dias, ao 9º dia de cultivo a produção de esporos começa a se estabilizar e não há mais nenhum aumento significativo. No entanto, na Figura 5.5., observa-se que há também estabilização da produção de esporos do 7º ao 10º dia de cultivo, mas que a partir do 10º dia há um aumento considerável da produção de esporos. Acredita-se que esse aumento da concentração de esporos a partir do 11º possa ser um segundo ciclo de esporulação de *Metarhizium* que se acumularam e proporcionaram maior produção de esporos. Isso pode ter ocorrido devido a heterogeneidade da granulometria do farelo de milho, que proporcionou condições favoráveis à segunda geração de esporos. Considera-se que seja interessante para a indústria também adotar o cultivo de 15 dias para o farelo de milho:BC, mas que ainda sejam necessárias avaliações mais criteriosas em relação ao custo-benefício, produção de esporos e dias de cultivo. Outro aspecto a ser considerado é quanto ao vigor e virulência dos esporos.

Santos (2017), também realizou o cultivo do fungo *M. anisopliae* em resíduos sólidos, por 15 dias, e obteve consideráveis concentrações de esporos, nas ordens de 10^8 e 10^9 esporos/ g. A mesma autora ressalta que adotou 15 dias de cultivo, pois em resíduos a conidiogênese do fungo ocorre mais tardiamente, o que está de acordo com o encontrado no presente estudo.

Na Tabela 5.13. é possível conferir os períodos de cultivo mais utilizados por diferentes autores para a produção de esporos de *M. anisopliae* em CES.

Tabela 5.13. Tempos de cultivos propostos na literatura para a produção de esporos de *M. anisopliae*, por CES.

Substratos	Tempo de cultivo (dias)	Rendimentos	Referência
Arroz	10	10^8 e 10^9 esporos/ g	Santos <i>et al.</i> (2021)
Farelo de trigo, Farelo de milho, Farelo de trigo + farelo de arroz, Farelo de trigo + farelo de aveia	15		
Arroz	7-8	10^{10} esporos/ g	Mascarin; Quintela (2013)
Arroz parboilizado, Arroz branco inteiro, Arroz quebrado, Arroz em casca, Casca de arroz, Trigo	12	10^7 , 10^8 e 10^9 esporos/ g	Kruger <i>et al.</i> (2014)
Milho, Soja, Painço, Sorgo, Cevada, Trigo	18	10^7 esporos/ mL	Pandey; Kanauija (2008)
Casca de café, Resíduo de chá, Farelo de trigo, Resíduos vegetais	14	10^7 esporos/ g	Tewelde, Alemu (2019)
Arroz, Sorgo, Milho, Farelo de trigo, Trigo	7	10^8 e 10^9 ufc/ g	Reddy <i>et al.</i> (2017)
Arroz + resíduo de cervejaria (1:1)	7	10^8 esporos/ g	Sene <i>et al.</i> (2010)

Fonte: a própria autora.

Observa-se na Tabela 5.12. que a média do tempo de cultivo proposto na literatura para a produção de esporos do *M. anisopliae* em pequena escala, é de 11 dias de cultivo, seja em arroz ou em resíduos agroindustriais. Porém, é preciso analisar cada caso particularmente, visto que as produções de esporos dependem de outros fatores de produção e da cepa utilizada.

Tekam; Kelwatkar; Das (2018), avaliaram a produção de esporos de *M. anisopliae* em diferentes resíduos: grama preta, feijão-caupi, grama verde, lentilha, ervilha, rajma, amendoim, soja, bolo de gergelim e bolo de nem, em 10, 20 e 30 dias de cultivo. Concluíram que em todos esses meios o fungo foi capaz de se desenvolver e esporular progressivamente durante o período todo de cultivo, obtendo concentração de esporos em 10^7 esporos/ mL.

Joaquín; Stiward (2013), avaliaram a produção *M. anisopliae*, *I. fumosorosea* e *L. lecanii* em diferentes resíduos, ao longo de 7, 12 e 17 dias de cultivo. Observaram que o *M. anisopliae* e o *L. lecanii* obtiveram um rendimento crescente durante todo o período de cultivo, já a *I. fumosorosea* apresentou a produção mais estável do 7° ao 12° dia de cultivo, e o maior rendimento do 12° ao 17° dia. Com isso, nota-se a importância de avaliar a esporulação do fungo ao longo de um período de cultivo mais extenso do que somente de 10 dias, visto que a cepa, as condições e o tipo de meio influenciam significativamente na esporulação do fungo, que pode ter um processo de adaptação e assimilação de nutrientes diferente em cada caso.

Segundo Tewari; Bhanu (2004), os farelos oriundos de cereais proporcionam um crescimento micelial mais lento, mas elevadas concentrações de esporos, e isso pode ocorrer devido à grande carga nutricional destes meios. Acredita-se que o fungo demore mais para crescer em meios alternativos devido ao tempo que leva para sintetizar os compostos.

5.4. Ensaio de ampliação de escala

Para avaliar a produção de esporos em uma escala similar às aplicadas na indústria, realizou-se ensaios em embalagens plásticas contendo 300 g de substrato, com amostras compostas apenas por arroz, como na prática industrial, e amostras compostas por farelo de milho e bagaço de cana, nas proporções de 7:3, 8:2 e 9:1 (substrato:suporte), mesmos níveis utilizados nos ensaios de otimização. Na Tabela 5.14. encontram-se as concentrações de esporos obtidas.

Tabela 5.14. Produção de esporos em embalagens plásticas de 300 g com 15 dias de cultivo.

Proporção (substrato:suporte)	Ce 10⁹ (esporos/gsa)	DV 10⁹ (esporos/gsa)	CV (%)
FM + BC 7:3	3,47 ^b	0,58	16,9
FM + BC 8:2	3,17 ^b	0,10	3,3
FM + BC 9:1	3,29 ^b	0,52	15,9
Arroz	5,84 ^a	0,55	9,5

*FM + BC - farelo de milho + bagaço de cana. Ce - concentração de esporos. DV - desvio padrão. CV (%) - coeficiente de variação (CV=DV/média. 100). As médias seguidas por diferentes letras minúsculas diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ao nível de confiança de 95%.

Fonte: a própria autora.

Observa-se na Tabela 5.14. que não houve diferença estatística nas concentrações de esporos obtidas entre as três proporções utilizadas para mistura farelo de milho:BC. Esperava-se que o aumento de escala pudesse refletir em uma diferença significativa entre as concentrações de esporos obtidas com as diferentes proporções, pois problemas de compactação e aglomeração do substrato, de remoção deficiente de calor metabólico e de aeração insuficiente tenderiam a ser intensificados na escala ampliada, porém isso não ocorreu. Da mesma forma, acreditava-se que a mistura com maior quantidade de farelo teria potencial para gerar mais biomassa e consequentemente mais esporos, o que também não ocorreu. Assim, parece haver uma interação entre os requisitos nutricionais do microrganismo e as características físicas do meio, sendo que a maior proporção (9:1) favoreceria a nutrição e a menor (7:3) as propriedades físicas do meio.

Comparando os valores de desvio padrão e de coeficiente de variação da Tabela 5.14 com os valores do farelo de milho:BC da Tabela 5.2. com 10 g de substrato, observa-se que tanto o desvio padrão quanto o coeficiente de variação dos ensaios com 300 g de substrato são menores do que aqueles com 10 g de substrato. Ao comparar a concentração de esporos obtida na cinética de esporulação com 15 dias de cultivo, na proporção farelo de milho:bagaço de 8:2, com 10 g de substrato, observa-se que este valor é superior ao obtido com a ampliação de escala na proporção de 8:2, com 300 g de substrato, neste caso,

isso pode ter ocorrido devido ao aumento de escala refletir em problemas citados acima, como compactação do meio e baixa remoção de calor.

Os resultados obtidos com a mistura farelo de milho:BC apenas se diferenciam estatisticamente do resultado obtido com arroz, cerca de 1,7 vezes maior para o arroz. Ainda assim, considerando-se que o preço do arroz é cerca de 2,6 vezes maior do que o do farelo (Tabela 5.5.) e que ambas as concentrações são da ordem de 10^9 , acredita-se que a substituição do arroz pelo farelo na prática industrial seja atrativa economicamente. Estes resultados mostram que qualquer proporção utilizada de farelo de milho:BC possibilitaria a produção de esporos com elevada concentração, sendo que a escolha da proporção a ser utilizada no ambiente industrial ficaria a critério do espaço disposto para o cultivo, pois a proporção 7:3 ocupa um volume maior devido a maior quantidade de bagaço, enquanto que a proporção de 9:1 necessita ser homogeneizada mais cuidadosamente, requerendo maior tempo de manipulação.

Ao final dos 15 dias de cultivo foi visível a esporulação uniforme do fungo em todo o substrato nas três proporções farelo de milho:BC e no arroz, sendo que apenas a proporção de farelo de milho:BC 9:1 apresentou a formação de aglomerados. Visivelmente, não foi possível identificar a presença de micélio ao final do cultivo, porém ao extrair e realizar a contagem dos esporos no microscópio, observou-se ainda grande presença de micélio, nas três proporções utilizadas. Dorta; Ertola; Arcas (1996), ao cultivarem o fungo *M. anisopliae* em biorreator de coluna empacotada em escala laboratorial, com aeração forçada, no meio a base de farelo de arroz e casca de arroz, obtiveram que apesar da quantidade de micélio ter diminuído durante a esporulação, a biomassa total (micélio + esporos) aumentou, que isso se deve ao tipo de síntese de biomassa do fungo, que tem crescimento blástico, onde ao final da hifa ocorre uma diferenciação e a formação de um ou mais esporos.

Cunha; Homma; Thoméo (2019), ao avaliarem a influência da carga de substrato na esporulação de *M. anisopliae* em embalagens plásticas, concluíram que o espaço livre acima do meio de cultivo para aeração, também denominado *headspace*, tem grande influência no desenvolvimento do fungo, podendo impactar negativamente o cultivo, sendo que um pequeno *headspace* pode dificultar a troca gasosa e um grande *headspace* pode propiciar o ressecamento

do leite. Nos ensaios com 300 g de substrato, observou-se que o *headspace* não interferiu negativamente visto que foi possível obter concentração de esporos similar às embalagens contendo 10 g de substrato, como obtido no segundo ensaio de otimização. Entretanto, caso aumentasse significativamente a carga de substrato, seria interessante testar embalagens de diferentes tamanhos, e avaliar o impacto que estas teriam no desenvolvimento do fungo.

5.5. Ensaios de vigor

Avaliou-se o vigor dos esporos produzidos na mistura farelo de milho:BC na proporção 8:2 (substrato:suporte), com 70% de umidade, comparando com aqueles produzidos no arroz (controle), na proporção 9:1 (substrato:suporte) com 48% de umidade, ambos com 15 dias de cultivo a 27 °C. Na Tabela 5.15. encontram-se os resultados obtidos.

Tabela 5.15. Vigor dos esporos produzidos na mistura farelo de milho:BC e no arroz, com 15 dias de cultivo, à 27 °C.

Meio de cultivo	Média de esporos vigorosos (%)	DV
Farelo de milho:BC	94,30 ^b	± 0,57
Arroz:BC	95,66 ^a	± 0,57

DV – desvio padrão. As médias seguidas por diferentes letras minúsculas diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ao nível de confiança de 95%.

Fonte: a própria autora.

Na Tabela 5.15. é possível observar que o vigor dos esporos obtidos no farelo de milho:BC e no arroz tiveram diferença estatística, porém foram superiores a 80%, valor mínimo aceitável para preparados comerciais indicado por Alves, Faria (2010), para esporos de *M. anisopliae*.

Desta forma, no que diz respeito ao vigor dos esporos, ambos os substratos são equivalentes. Na produção em massa de entomopatógenos fúngicos é necessário considerar não apenas o aspecto quantitativo, mas também qualitativo dos esporos produzidos, uma vez que modificando alguma etapa do processo, como o meio de cultivo no presente estudo, este pode interferir na qualidade dos esporos. A importância de se obter esporos vigorosos está na relevância do processo de infecção do fungo ao hospedeiro. Entende-se por vigor a capacidade e a força de germinação e crescimento do tubo germinativo

que o esporo possui em um determinado período (FARIA *et al.*, 2015). Segundo ainda os mesmos autores, a rápida velocidade de germinação em um curto período de incubação fornece resultados mais precisos da qualidade dos esporos. Esporos mais vigorosos causam maior infecção no hospedeiro e em menor tempo. De acordo com Mascarin; Quintela (2013), o ideal é de 18 horas o período de incubação para os ensaios de vigor, como realizado no presente estudo.

Faria; Hajek; Wraight (2010), comentaram sobre o dano que a embebição dos esporos cultivados por CES podem causar. Para os autores, resultados mais confiáveis de vigor dos esporos são obtidos após a reidratação rápida dos esporos, assim aqueles que por ventura vierem a sofrerem danos de embebição não serão contabilizados como vigorosos. Desta forma, o presente estudo optou por realizar a secagem dos esporos em ambiente desidratado por sílica por 10 dias, período em média que a indústria leva para secar os esporos, e realizar a rápida reidratação dos esporos.

5.6. Ensaios de patogenicidade

Avaliou-se a patogenicidade dos esporos produzidos na mistura farelo de milho:BC na proporção 8:2 (substrato:suporte), com 70% de umidade, comparando-se os resultados com os de esporos produzidos no arroz (controle), na proporção 9:1 (substrato:suporte) com 48% de umidade, ambos com 15 dias de cultivo a 27 °C em larvas de *Zophobas morio*. Na Tabela 5.16. encontram-se os resultados obtidos da média de mortalidade total.

Tabela 5.16. Patogenicidade dos esporos produzidos no farelo de milho:BC e no arroz, com 15 dias de cultivo, à 27 °C.

Amostra	Média de mortalidade (%)
Controle	10
Farelo de milho:BC	82 ^a
Arroz:BC	84 ^a

As médias seguidas letras minúsculas iguais não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ao nível de confiança de 95%.

Fonte: a própria autora.

Na Tabela 5.16. é possível observar que a mortalidade média das larvas tratadas com os esporos extraídos de farelo de milho:BC e de arroz foi elevada,

e não diferiram estatisticamente. Verifica-se que foi possível alcançar uma alta porcentagem de mortalidade das larvas com os esporos produzidos no farelo de milho quanto no arroz, acima de 80%.

Como enfatizado na seção 5.5 sobre o vigor dos esporos, na produção massal de propágulos de fungos entomopatogênicos é necessário considerar os aspectos qualitativos dos esporos produzidos, como por exemplo o vigor e a patogenicidade, esta última a capacidade do fungo em infectar o hospedeiro e causar sua morte.

Utilizou-se larvas de *Z. morio*, ou tenébrio gigante, devido à facilidade de aquisição na região onde foi realizado o estudo e ao manejo simples das mesmas. Para todos os ensaios fixou-se a concentração de esporos em 10⁸ esporos/ mL, concentração essa utilizada por diversos autores que trabalharam com o fungo *M. anisopliae* resultando em altas mortalidade de diferentes hospedeiros (MORA *et al.*, 2016; AGUILERA-COGLEY *et al.*, 2020; MEMBANG *et al.*, 2021).

Lopes (2016), realizou ensaios de virulência com o fungo *M. anisopliae* na broca da cana, com esporos produzidos com 7 e 10 dias de cultivo, e concluiu que o tempo de cultivo influência significativamente na virulência dos esporos, uma vez que obteve maior mortalidade das brocas com esporos produzidos em 10 dias de cultivo. A autora ressalta que isso pode ter ocorrido devido à maturidade dos esporos, sendo que os esporos com sete dias de cultivo provavelmente não teriam ainda armazenado nutrientes em concentração suficiente para germinarem no hospedeiro. Acredita-se que os resultados satisfatórios encontrados no presente estudo estão de acordo com a autora citada acima, uma vez que os esporos produzidos nesses ensaios são com 15 dias de cultivo.

Ao longo dos 15 dias de acompanhamento dos ensaios, observou-se que em todas as amostras tratadas com esporos, produzidos tanto no farelo de milho quanto no arroz, todas as larvas sofreram ecdise, ou seja, a troca do exoesqueleto, camada composta principalmente de quitina que protege o corpo, a qual é substituída em cada estágio da vida do inseto, enquanto que as larvas controle não realizaram ecdise. Tanto o tenébrio pequeno (*Tenebrio molitor*) quanto o tenébrio gigante (*Z. morio*) pertencem à ordem dos coleópteros (normalmente denominados de besouros), os quais são holometábolos, ou seja,

passam pelo processo de metamorfose completa, (ovo, larva, pupa e inseto adulto), podendo sofrer até 30 ecdises neste processo. Diversos estudos buscam entender os mecanismos que levam o inseto a realizar mais ou menos ecdises, sabendo-se que estes fenômenos são controlados por hormônios endócrinos (RUPPERT; BARNES, 1996; GALLO *et al.*, 2002). Acredita-se que o observado neste trabalho possa ter ocorrido como uma forma de defesa das larvas frente à infecção pelo fungo, visto que o controle não realizou ecdise. Alguns autores ressaltam que os mecanismos de defesa dos insetos frente a perturbações são complexos, e envolvem diferentes processos, adaptações, produção de compostos e até a capacidade de realizar a ecdise, uma vez que os insetos são capazes adaptar o seu desenvolvimento e a resposta imune de acordo com o tipo de perturbação e isolado entomopatogênico (SEYEDTALEBI *et al.*, 2017; MONFARDINI, 2018; FONTES; VALADARES-INGLIS, 2020).

5.7. Análise de custos de produção

Avaliou-se a viabilidade de substituição do arroz tipo 1 pelo substrato alternativo, o farelo de milho, foi realizada uma análise de custos de uma planta de produção de esporos de pequeno porte, similar à Oligos Biotec que processa cerca de 3 toneladas de substrato (arroz) ao mês, resultando em 22,5 kg de esporos no mesmo período, a fim de obter indicadores econômicos objetivos para a alteração em nível industrial. Na análise realizada não foi levado em consideração os custos de distribuição do produto.

O processo de produção industrial tradicional dos esporos de *M. anisopliae* avaliado ocorre da seguinte maneira: o substrato (arroz) é acomodado em caixas plásticas e coberto com certa quantidade de água e umidificado por cerca de 40 minutos até que atinja textura macia e aproximadamente 40% de umidade, então 300-400 g (b.u.) do substrato é disposto manualmente em embalagens plásticas, segue para a esterilização em autoclave; após resfriamento, o substrato é inoculado com a suspensão de esporos (10^8 esporos/gss) em câmara de fluxo laminar, seguido de agitação manual vigorosa. As embalagens são então encaminhadas para uma sala climatizada (28 °C) por condicionadores de ar e são dispostas em prateleiras por 15 dias; após a incubação, as embalagens são levadas para salas de secagem, onde são

abertas e expostas a ar seco por desumidificadores, por cerca de 7 dias. Após a secagem ocorre a extração dos esporos do substrato em peneiras vibratórias e os esporos extraídos são então colocados em embalagens plásticas e armazenados em câmaras de refrigeração (-16 °C) para posterior formulação.

A base de cálculo empregada na análise dos custos de produção é similar à apresentada na seção 4.10. para o arroz, onde estabeleceu-se a quantidade diária de substrato inoculado, o rendimento de esporos, a quantidade de esporos e de adjuvante para formular 1 kg de produto e a quantidade de produto que corresponde a uma dose recomendada para tratar 10 ha.

Na Tabela 5.17. encontram-se os custos diretos e indiretos, contingência e custos com contratos, os quais compõem o CAPEX, o valor de capital inicial necessário para iniciar o processo. Na Figura 5.6. observa-se o que cada custo ocupa dentro do CAPEX.

Tabela 5.17. Custos que compõem o CAPEX para implantação de biofábrica de produção de esporos empregando farelo de milho como substrato.

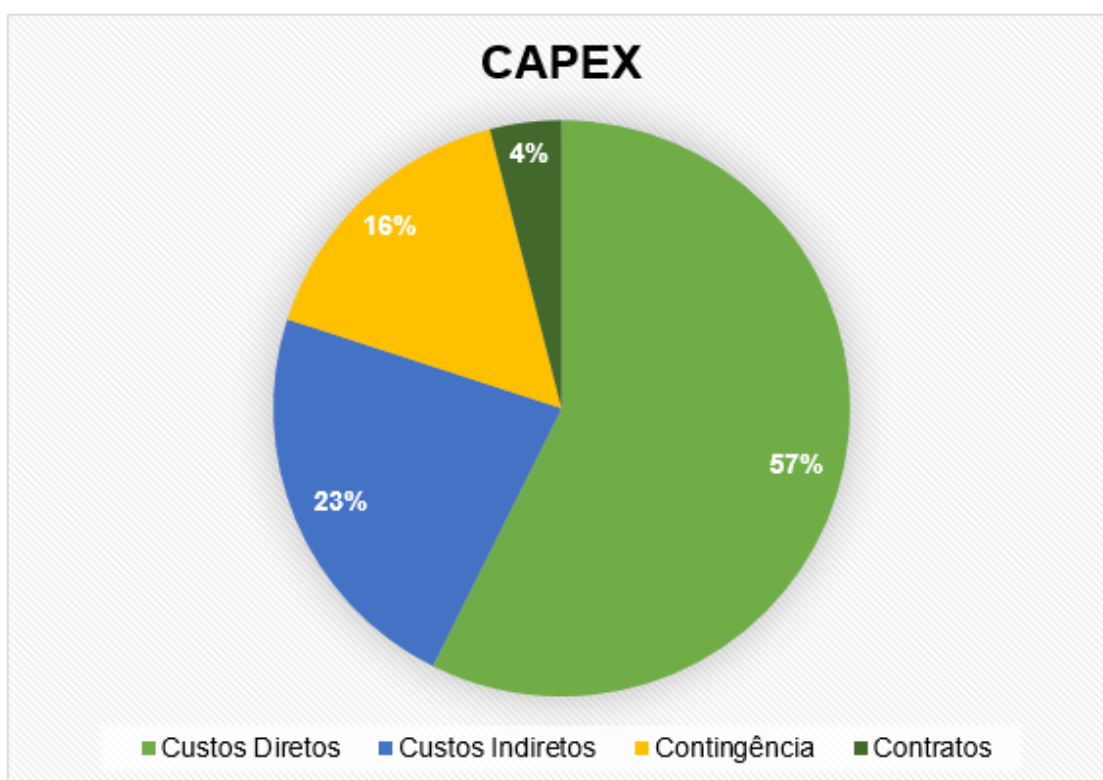
CAPEX			
<i>Custos Diretos</i>	<i>Equipamentos + Instalação</i>		<i>446.098,00</i>
Tipo	R\$ (unidade)	Quantidade	Total
Autoclave ^{*1}	200.000,00	1	200.000,00
Ar-condicionado	2.000,00	9	18.000,00
Desumidificador	2.000,00	2	4.000,00
Extrator vibratório	20.000,00	2	40.000,00
Câmara de refrigeração ^{*2}	55.000,00	2	110.000,00
Seladora	2.000,00	1	2.000,00
Instalações prediais	720,98/m ²	100m ²	72.098,00
<i>Custos Indiretos</i>			<i>176.000,00</i>
Automação			29.700,00
Montagem e interligações			29.700,00
Obra civil			29.700,00
Engenharia e supervisão			59.400,00
<i>Contingência</i>			<i>124.419,60</i>
<i>Contratos</i>			<i>31.104,90</i>
<i>Investimento Total: Capital Fixo (C indireto + C direto)</i>			<i>777.622,50</i>

(^{*1}) Autoclave horizontal de aproximadamente 950 L.

(^{*2}) Câmara de refrigeração de 29 m³ cada.

Fonte: a própria autora.

Figura 5.6. Divisão de custos que compõe o CAPEX.



Fonte: a própria autora.

Os custos diretos correspondem a 57% do valor do CAPEX, entre equipamentos e instalação industrial, como descrito na Tabela 5.17. Os custos indiretos a correspondem 23% do total, se referem a serviços terceirizados necessários antes do início da operação, tais como automação, montagens, obras, engenharia e supervisão. A contingência, corresponde a 16% do CAPEX, visa cobrir possíveis eventualidades. O custo com contratos, foi estimado em 4% do valor CAPEX. O CAPEX não estabelece relação com o tipo de substrato utilizado, visto que não se modificou o processo produtivo. As porcentagens utilizadas para os cálculos de custos indiretos, contingência e contratos, foram baseados em Peters; Timmerhaus (1991).

Observa-se que no CAPEX os equipamentos de maior custo são a autoclave e as câmaras de refrigeração, que correspondem a 88% dos custos com equipamentos. A autoclave é o equipamento que será utilizado para esterilizar o substrato antes da inoculação e é imprescindível ao processo, visto que os resíduos agroindustriais carregam uma grande carga microbiana natural. De acordo com Rezende (2009), que realizou a contagem padrão de bactérias

aeróbicas mesófilas, fungos filamentosos e leveduras, de diferentes tipos de arroz e derivados (integral, parboilizado, quirera, orgânico e polido), a quirera possui maior diversidade e quantidade de contaminantes dentre os substratos analisados, embora os outros resíduos tenham carga microbiana também elevada. Em relação às câmaras de refrigeração, considerou-se o uso de duas câmaras, uma para armazenar o substrato e o suporte, farelo de milho e bagaço, do momento do recebimento até o uso, evitando a degradação dos mesmos, e a outra para armazenar os esporos extraídos, tendo em vista a necessidade de um armazenamento controlado e asséptico desses esporos, visto que a temperatura e umidade são diferentes durante o armazenamento dos substratos e dos esporos.

Os restantes dos equipamentos correspondem aos menores custos diretos do CAPEX, como: os condicionadores de ar, necessários para climatizar a sala de inoculação e as salas de incubação e secagem dos esporos; os desumidificadores, utilizados durante o processo de secagem do substrato com o fungo; os extratores de peneira vibratória, em número de dois, um para separar e homogeneizar o bagaço e o outro para extrair os esporos do substrato; e a seladora utilizada na finalização do produto formulado para a venda.

Para uma empresa de pequeno porte, como apresentado aqui, com produção por batelada, não se considera conveniente ter equipamentos extras para atender uma possível situação de emergência, caso algum equipamento apresente falhas, visto que, manter a manutenção frequente dos equipamentos seria mais econômico do que o custo com equipamentos sobressalentes. Caso fosse planejado uma empresa com produção em maior escala, seria interessante analisar quais equipamentos poderiam ser adquiridos a mais.

De acordo com a análise do presente estudo, o capital inicial necessário para o processo de produção de esporos do fungo *M. anisopliae* IBCB 425, seria de R\$ 777.622,50 reais. Palucci; Moreira (2015), realizaram análise de viabilidade de uma biofábrica de produção de esporos de *M. anisopliae* em arroz, obtiveram que o valor do investimento alcançou R\$ 92.341,46 reais, cerca de 12% do encontrado no presente trabalho. Porém, observa-se que os autores concentraram os custos de investimentos em equipamentos e utensílios de laboratório, visto que não calcularam os custos indiretos do processo, a contingência, não utilizaram extratores vibratórios para a separação dos

esporos, consideraram apenas duas autoclaves de 250 L cada e não contabilizaram equipamentos de refrigeração de grande porte para armazenar o substrato e os esporos produzidos até a formulação e venda. Descontando do total do CAPEX, os valores que os autores não incluíram em seu trabalho, obtém-se um valor de cerca de R\$ 150.000,00 reais, próximo ao total do investimento encontrado por Palucci e Moreira quando atualizados pelo IGP-M, considerando-se nos cálculos que o investimento havia sido feito em abril de 2015, com reajuste até março de 2021, sem considerar juros, o que resultaria em um investimento de cerca de R\$ 160 mil. Oliveira (2019), realizou uma análise de custos da produção de esporos do *M. anisopliae* nos resíduos sólidos agroindustriais quíntera de arroz, farelo de soja e farelo de trigo (proporção de 1:1:1), em escala piloto em um biorreator de bandeja, com capacidade para produzir 10kg de substrato inoculado por mês. A partir da análise de custos, o autor teve maior custo inicial com equipamentos, como no presente trabalho, em valores inferiores aos deste trabalho devido ao tipo de processo e a escala trabalhada.

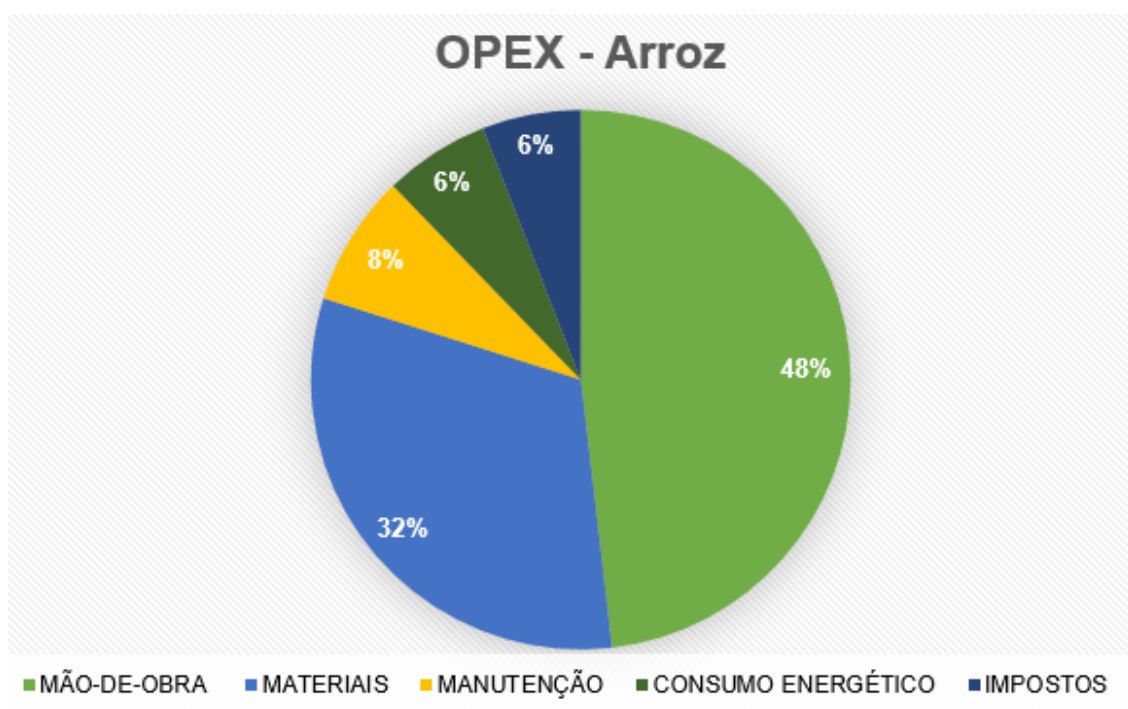
O OPEX são os custos necessários para manter o funcionamento contínuo do processo. Na Tabela 5.18. são apresentados os custos do OPEX utilizando o arroz como substrato. Na Figura 5.7. são apresentadas as divisões dos custos com o arroz, que compõem o OPEX.

Tabela 5.18. Custos que compõem o OPEX para implantação de biofábrica de produção de esporos empregando arroz como substrato.

OPEX - arroz	
MATERIAIS	250.693,00
Substrato (arroz)	116.250,00
Caulim	10.063,00
Fungo	11.880,00
Embalagem	112.500,00
CONSUMO ENERGÉTICO	50.000,00
MÃO-DE-OBRA – 14 funcionários	380.400,00
MANUTENÇÃO	62.210,00
IMPOSTOS / TAXAS / ENCARGOS	46.657,00
CUSTO DE MANUFATURA (Custos variáveis + Impostos/Taxas/Encargos)	789.960,00

Fonte: a própria autora.

Figura 5.7. Divisão dos custos que compõe o OPEX para a produção de esporos de *M. anisopliae* em arroz.



Fonte: a própria autora.

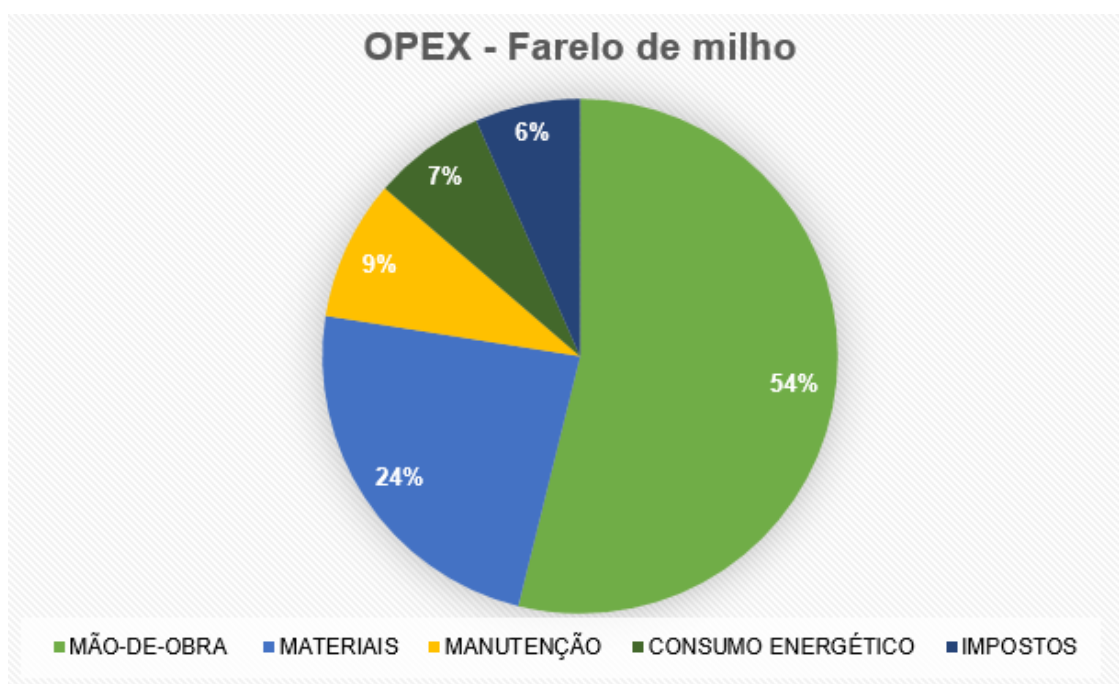
Na Tabela 5.19. são apresentados os custos do OPEX para a produção de esporos no farelo de milho. Na Figura 5.8. são apresentadas as divisões dos custos que compõem o OPEX utilizando o farelo de milho.

Tabela 5.19. Custos que compõem o OPEX para implantação de biofábrica de produção de esporos empregando farelo de milho como substrato.

OPEX – farelo de milho	
MATERIAIS	167.044,00
Substrato + inerte	32.601,00
Caulim	10.063,00
Fungo	11.880,00
Embalagens	112.500,00
CONSUMO ENERGÉTICO	50.000,00
MÃO-DE-OBRA – 14 funcionários	380.400,00
MANUTENÇÃO	62.210,00
IMPOSTOS / TAXAS / ENCARGOS	46.657,00
CUSTO DE MANUFATURA (Custos variáveis + Impostos/Taxas/Encargos)	706.311,00

Fonte: a própria autora.

Figura 5.8. Divisão dos custos que compõe o OPEX para a produção de esporos de *M. anisopliae* em farelo de milho.



Fonte: a própria autora.

Ao se comparar os custos OPEX com o arroz (Tabela 5.18.) com os custos para farelo de milho (Tabela 5.19.), é possível verificar que apenas os custos com os substratos alteraram. Além dos custos dos substratos, os demais custos em materiais são: adjuvante caulim, utilizado na formulação do produto a ser vendido; custos com a cepa de *M. anisopliae* IBCB 425, pago mensalmente; e embalagens de polipropileno para o cultivo e embalagens específicas para o armazenamento e venda do produto, as quais devem ser impermeáveis, resistentes a rupturas e assépticas, devem impedir a troca gasosa e passagem de umidade para os esporos. O consumo energético diz respeito ao consumo direto de energia elétrica pelos equipamentos utilizados. A mão-de-obra, são os custos com salários, definidos de acordo com a média salarial no Brasil, e demais obrigações trabalhistas dos colaboradores, considera-se 14 funcionários necessários para o processo de produção do fungo, dentre esses, 12 colaboradores, que recebem de acordo com o salário mínimo atualizado, ficam encarregados dos procedimentos laboratoriais, preparo dos substratos, inoculação, manejo dos lotes e extração dos esporos; um colaborador de nível superior (Engenheiro Agrônomo ou Biólogo) capacitado para o controle de qualidade do produto, vigor e virulência; e um gerente, que recebem de acordo com o piso salarial pertinente. A manutenção, impostos e taxas, são calculados de acordo com porcentagens pré-estabelecidas, como no CAPEX.

Para o processo de produção do fungo *M. anisopliae*, é possível observar que os custos com mão-de-obra (Figuras 5.7. e 5.8.), considerando 14 funcionários, que trabalham 8 horas por dia, 5 dias por semana, somam 48% do valor do OPEX para o arroz, e mais de 50% para o farelo de milho, acarretando uma despesa anual de R\$ 380.400,00 reais. Era esperado que esse tipo de custo abrangesse grande parte do OPEX, visto que o processo é semi artesanal e carece em grande parte de mão-de-obra. No OPEX, pode-se ainda ter custos agregados ao longo do processo, como despesas com aluguéis de terceiros, seguros, impostos, juros e entre outros (MENDES, 2015).

Considerando o processo de produção dos esporos com farelo de milho:BC, o custo dos materiais com este substrato seria de 24% do total do OPEX, correspondendo a cerca de R\$ 167.044,00 reais/ ano, dos quais R\$ 32.601,00 reais são os custos somente com o farelo de milho e com o bagaço. Já a produção de esporos no arroz tipo 1, o custo é de cerca de 32% do OPEX,

representando R\$ 250.693,00 reais/ ano, sendo que R\$ 116.250,00 reais é somente o custo com o arroz. É possível observar, que a participação dos custos dos meios de cultivo no OPEX não diferem expressivamente, devido aos altos custos de mão-de-obra, diminuindo o impacto que teria a substituição do substrato. Entretanto, quando se analisa o montante de recursos em valores absolutos, este é 3,6 vezes maior para o arroz, cerca de R\$ 83.649,00 reais. Para uma indústria de pequeno porte não é interessante dispendir quantia tão alta para aquisição do arroz, pois afeta o capital de giro da empresa. Palucci; Moreira (2015), ao analisarem a viabilidade de uma biofábrica de produção de *M. anisopliae*, relataram que obtiveram custos variáveis em torno de R\$ 131.535,50 reais com o substrato arroz parboilizado e utensílios. Os autores realizaram os cálculos para um processo onde se inocula 360 kg de arroz por dia trabalhado, e estimaram R\$ 98.256,36 anuais com despesas de mão-de-obra, incluindo-se os encargos, que reajustados pelo IGP-M dariam cerca de R\$ 170 mil. No entanto, o trabalho citado não utilizou adjuvantes em suas formulações, pois considerou-se que os esporos seriam vendidos juntamente com o substrato (arroz); além disso, não foram contabilizados custos com embalagens apropriadas para o armazenamento do fungo; por fim, a biofábrica seria operada por apenas três colaboradores, o que, baseado na experiência real da Oligos Biotec, é inviável. Assim, empregando-se os dados de Palucci e Moreira para salários e demais despesas com mão de obra em 2015 e expandindo o número de colaboradores para oito, os gastos com mão-de-obra seriam de R\$ 187.632,96, que reajustados pelo IGP-M dariam R\$ 324.033,25, muito próximo do que aqui foi previsto. Por esta razão, devido ao maior capital de giro disponível, a substituição do arroz tipo 1 pelo farelo de milho passa a ser interessante para as biofábricas.

Na Tabela 5.20. são apresentados os indicadores econômicos da substituição do arroz pelo farelo de milho:BC no processo de produção dos esporos do *M. anisopliae* empregando-se a proporção substrato:suporte 8:2.

Tabela 5.20. Indicadores econômicos da produção dos esporos no farelo de milho:BC.

Proporções farelo de milho:BC	Indicadores econômicos		
	VPL	TIR	Payback (anos)
8:2	R\$ 14.002.518	261,98%	1,22

* VPL – Valor Presente Líquido; TIR – Taxa Interna de Retorno.

Fonte: a própria autora.

O Valor Presente Líquido (VPL) representa a soma do fluxo de caixa já com descontos, quanto maior é o VPL melhor é o negócio. A Taxa Interna de Retorno (TIR) mede a rentabilidade do investimento no tempo, em geral anualmente. O *Payback*, ou tempo de retorno, é o prazo que leva para a recuperação do valor investido, medido em anos, e quanto maior, menos interessante é o investimento (MENDES, 2015).

Observa-se que o VPL e o TIR apresentam valores bem elevados e que o *Payback* é baixo, o que mostra que o investimento tem um bom retorno. Estes valores elevados são devido à alta margem de lucro que se obtém sobre a venda do produto formulado, ou seja, o custo que se tem para a produção dos esporos é baixo quando comparado com o valor de venda do produto, o que gera uma alta margem de lucro. O processo em si, que não utiliza de tecnologia sofisticada, não encarece o produto, o qual gera de custo unitário em torno de R\$ 146,00 reais (produzido em arroz) e R\$ 78,00 reais (produzido no farelo de milho), por dose de 650 g, que é recomendada para uso em 10 hectares. Faria; Magalhães (2001) citam que o preço médio de venda de um bioinseticida por hectare pode ser de R\$ 40,00 a R\$ 50,00 reais. Grimm (2001), considera o preço médio de prateleira de bioinseticidas em torno de US \$ 8,00 à US \$ 12,00/ há, equivalente a aproximadamente R\$ 45,00 à R\$ 68,00 reais (cotação do dólar à R\$ 5,70 reais em 12/04/2021). Oliveira (2019), realizou uma pesquisa de mercado com diversas empresas que produzem esporos de *M. anisopliae* e chegou a valores que variam entre R\$ 160,00 a R\$ 500,00 reais cada 500g do produto.

Palucci; Moreira (2015), analisaram os indicadores econômicos do processo de produção de esporos do *M. anisopliae* em uma biofábrica, obtiveram

o VPL de R\$ 66.404,27; a TIR de 15,49% e o *Payback* de 4,21 anos, índices menores do que os encontrados no presente estudo. Estes valores encontrados pelos autores, consideram um valor de venda do produto de R\$ 8,00/kg de esporos + arroz, valor bem abaixo do citado pela literatura, mesmo quando reajustado pelo IGP-M, o que daria R\$ 13,82. Os mesmos autores ainda realizaram a análise de sensibilidade do processo alterando o valor de venda do produto, assim alcançaram melhores índices, com o preço de venda a R\$ 9,60 reais/ kg, a TIR é de 32%; o VPL de R\$ 273.975,18 reais e o *Payback* de 2,99 anos, o que mostra que o preço de venda do produto tem influência direta no investimento e que se o preço de venda do produto do estudo citado fosse próximo do preço citado na literatura, provavelmente os indicadores econômicos seriam melhores.

6. CONCLUSÃO

O principal objetivo proposto deste trabalho foi atingido, uma vez que se produziu esporos do fungo *Metarhizium anisopliae* por cultivo em estado sólido em um resíduo agroindustrial em concentrações, vigor e patogenicidade próximos aos obtidos em arroz, substrato normalmente empregado em biofábricas, de modo a poder reduzir os custos operacionais de produção industrial

Os substratos testados: farelo de milho, farelo de trigo e resíduo de malte, mostraram-se aptos ao cultivo de *M. anisopliae* produzindo esporos em concentrações próximas e superiores às do arroz. Dentre os meios de cultivo testados, a mistura farelo de milho e bagaço de cana de açúcar (substrato:inerte) foi a selecionada para ensaios da otimização das condições de cultivo devido à facilidade de aquisição, custo, composição química e física.

Os ensaios de otimização com a mistura farelo de milho:bagaço de cana demonstraram que o fungo é capaz de crescer e esporular em uma ampla faixa de umidade, temperatura e composições do meio de cultivo. O cultivo desta mistura em embalagens de capacidade similar às empregadas em indústria resultou em concentração de esporos similar às obtidas com arroz, demonstrando que ampliação de escala foi bem sucedida e que o fungo está apto a ser cultivado neste meio em condições de cultivo industriais. Os esporos produzidos no farelo de milho:BC são tão vigorosos e patogênicos quantos àqueles produzidos no arroz.

A partir da análise de custos de produção verifica-se que é viável a substituição do arroz pelo farelo de milho:BC na indústria, diminuindo os custos com substrato. Desta forma, conclui-se que a mistura entre farelo de milho e bagaço de cana de açúcar (substrato:inerte) tem potencial para ser aplicada no ambiente industrial para a produção de esporos de *M. anisopliae*, tornando a produção mais econômica.

7. TRABALHOS FUTUROS

Diante dos resultados obtidos nesta dissertação, acredita-se que os seguintes trabalhos poderiam aprimorar os estudos realizados até então:

- Avaliar a fermentação bifásica com resíduos agroindustriais para a produção de inóculos em menos tempo.
- Avaliar a esporulação do fungo em misturas de resíduos agroindustriais em diferentes proporções.
- Avaliar métodos de extração dos esporos a seco.
- Avaliar vigor e virulência dos esporos produzidos nos resíduos em diferentes condições e tempos de armazenamento.
- Avaliar a produção de esporos em resíduos sólidos agroindustriais em biorreatores.

REFERÊNCIAS

ABCBIO - **Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico**. O controle biológico no Brasil traz mais sustentabilidade na produção de alimentos. 2019b. Disponível em: < <https://www.abcbio.org.br/blog/controle-biologico-no-brasil/> > Acesso em 16 de abril de 2020.

ABCBIO - **Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico**. O crescimento do biocontrole na agricultura. 2019a. Disponível em: < <https://www.abcbio.org.br/blog/biocontrole/> > Acesso em 16 de abril de 2020.

ABCBIO - **Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico**. Produtos biológicos de controle trazem inovação nas suas fórmulas. 2019c. Disponível em: < <https://www.abcbio.org.br/blog/produtos-biologicos/> > Acesso em 16 de abril de 2020.

ABIMILHO – **Associação Brasileira das Indústrias do Milho**. Disponível em: <http://www.abimilho.com.br/> >. 2008.

ABIMILHO – **Associação Brasileira das Indústrias do Milho**. Riqueza do grão. Disponível em: < <http://www.abimilho.com.br/milho> >. Acesso em: 3 de setembro de 2020.

ABIY, T.; TESFAYE, A. Evaluation and Optimization of Agro-industrial Wastes for Conidial Production of *Metarhizium anisopliae* isolates under Solid State Fermentation. **Momona Ethiopian Journal of Science**, v. 11, n. 2, p. 209-228, 2019.

AFIFAH, L.; DESRIANA, R.; KURNIATI, A.; MARYANA, R. Viability of Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin in Some Alternative Media and Different Shelf-Life. **International Journal of Agriculture System**, v. 8, n. 2, p. 108-118, 2021.

AGOSIN, E.; COTORAS, M.; MUNOZ, G.; SAN MARTIN, R.; VOLPE, D. Comparative properties of *Trichoderma harzianum* spore produced under solid state and submerged culture conditions. In: **Advances in solid state fermentation**. Springer, Dordrecht, 1997. p. 463-473.

AGROFIT.

Disponível

em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 19/06/2020.

AGUILERA-COGLE, V. A.; JAÉN-TORRIJOS, M.; ÁVILA-RODRÍGUEZ, L. Y.; HERRERA-VÁSQUEZ, J. Á.; JAÉN-SANJUR, J. N.; BARBA-ALVARADO, A. A. Identificación y virulencia de *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) como agente de control biológico de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) en Panamá. **Idesia (Arica)**, v. 38, n. 1, p. 59-65, 2020.

ALBUQUERQUE, T. C. S. Videira (*Vitis* sp). In: CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A. (Coord.). Ecofisiologia de fruteiras: abacateiro, aceroleira, macieira, pereira e videira. **Embrapa Semiárido - Capítulo em livro técnico (INFOTECA-E)**. Piracicaba: Agronomica Ceres, 2003.

ALMEIDA, J. E. M. Cigarrinha-da-raiz da cana: como controlar. **Revista Cultivar Grandes Culturas**, v. 177, p. 30-31, 2014.

ALMEIDA, J. E. M. Microbial Control of Sugarcane Pests. In: Natural Enemies of Insect Pests in Neotropical Agroecosystems. **Springer, Cham**, p. 427-436. 2019.

ALVES, L. F.; ALVES, V. S.; BRESSAN, D. F.; NEVES, P. M.; 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**, v. 33, n. 6, p. 793–795, 2004.

ALVES, R. T.; FARIA, M. Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos. Planaltina (DF), **Embrapa Cerrados**, p. 26-31, 2010.

ALVES, S. B. Controle Microbiano de Insetos. **Piracicaba/FEALQ**. 1163 p. 1998.

ALVES, S. B.; LOPES, R. B.; VIEIRA, S. A.; TAMAI, M. A. Fungos Entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: Controle Microbiano de Pragas na América Latina: avanços e desafios. **Piracicaba: FEALQ**, 2008. p.69-110.

ANGEL-CUAPIO A.; FIGUEROA-MONTERO A.; FAVELA-TORRES E.; VINIEGRA- GONZALEZ G.; PERRAUD-GAIME I.; LOERA O. Critical values of porosity in rice cultures of *Isaria fumosorosea* by adding water hyacinth: Effect on conidial yields and quality. **Appl Biochem Biotechnol** 177: 446-57. 2015.

ARORA, S.; RANI, R.; GHOSH, S. Bioreactors in solid state fermentation technology: design, applications and engineering aspects. **Journal of biotechnology**, v. 269, p. 16-34, 2018.

ARTHURS, S.; THOMAS, M. B. Effects of temperature and relative humidity on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in mycosed cadavers of *Schistocerca gregaria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, n. 2, p. 59-65, 2001.

BAASEL, W. D. **Preliminary Chemical Engineering Plant Design**. 2nd edition. Van Nostrand Reinhold. New York. 1990. 572p.

BALASUBRAMANIAN, S.; TYAGI, R. D. Biopesticide production from solid wastes. In: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. **Elsevier**, 2017. p. 43-58.

BARRETO, J. F.; RAMALHO, A.; MARTINS, G.; UTUMI, M.; DIAS, M.; XAVIER, J. Recomendações técnicas para o cultivo do arroz no Amazonas. **Embrapa Amazônia Ocidental**. Circular Técnica, 2002.

BEHIE, S. W.; BIDOCHKA, M. J. Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: an additional branch of the soil nitrogen cycle. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 5, p. 1553-1560, 2014.

BELLAVER, C.; SNIZEK JUNIOR, P. N. Processamento da soja e suas implicações na alimentação de suínos e aves. In: **Congresso Brasileiro de Soja**. Londrina-PR: EMBRAPA, 1999.

BENELLI, G.; CASELLI, A.; DI GIUSEPPE, G.; CANALE, A. Control of biting lice, Mallophaga – a review. **Acta Tropica**, v. 177, n. June 2017, p. 211–219, 2018.

BETTIOL, W.; GHINI, R.; MARIANO, R. R. L.; MICHEREFF, S. J.; MATTOS, L. P. V.; MOLO ALVARADO, I. C.; PINTO, Z. V. Supressividade a fitopatogenos habitantes do solo. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariuna: **Embrapa Meio Ambiente**, p. 187-208. 2009.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008.

BIRCH, A. N. E.; BEGG, G. S.; SQUIRE, G. R. How agro-ecological research helps to address food security issues under new IPM and pesticide reduction policies for global crop production systems. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 10, p. 3251-3261, 2011.

BRANDÃO, C. O.; CAMPOS, S. P. O.; GONÇALVES, A. M. M. A importância de utilizar a análise de custo como ferramenta de gestão. **REVISTA FAIPE**, v. 9, n. 1, p. p. 12-17, 2019.

BUTT, T. M. Use of entomogenous fungi for the control of insect pests. In: Agricultural applications. **Springer**, Berlin, Heidelberg, 2002. p. 111-134.

BUTT, T. M.; WANG, C.; SHAH, F. A.; HALL, R. Degeneration of entomogenous fungi. In: An ecological and societal approach to biological control. **Springer**, Dordrecht, 2006. p. 213-226.

CABRAL FILHO, S. L. S. **Avaliação do resíduo de cervejaria em dietas de ruminantes através de técnicas nucleares e correlatas**. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo. 1999.

CAIERÃO, E. Cevada: história e evolução. In: BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T. (Ed.). **Origem e evolução de plantas cultivadas**. Embrapa Trigo - Capítulo em livro científico (ALICE). Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008.

CANEDO, M. S.; FIGUEIREDO, M. F. S.; THOMIK, M.; VORHAUER-HUGET, N.; TSOTSAS, E.; THOMÉO, J. C. Porosity and pore size distribution of beds composed by sugarcane bagasse and wheat bran for solid-state cultivation. **Powder Technology** 386. 166–175. 2021.

CASCIATORI, F. P. **Obtenção de parâmetros físicos e térmicos para simulação e projeto de bioreatores de fermentação em estado sólido em leite fixo**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2011.

CASCIATORI, F. P. **Produção de celulasas fúngicas por fermentação em estado sólido: ampliação de escala de biorreatores de leite fixo**. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2015.

CASCIATORI, F. P.; LAURENTINO, C. L.; 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**, v. 255, p. 214-224, 2014.

CAVALCANTE, R. S.; LIMA, H. L.; PINTO, G. A.; GAVA, C. A.; RODRIGUES, S. Effect of moisture on *Trichoderma* conidia production on corn and wheat bran by solid state fermentation. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, n. 1, p. 100-104, 2008.

CHEN, X.; LI, Y.; DU, G.; CHEN, J. Application of response surface methodology in medium optimization for spore production of *Coniothyrium minitans* in solid-state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 4, p. 593-599, 2005.

CLARK, J. H.; MURPHY, M. R.; CROOKER, B. A. Supplying the protein needs of dairy cattle from by-product feeds. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 5, p. 1092-1109, 1987.

CODA, R.; KATINA, K.; RIZZELLO, C. G. Bran bioprocessing for enhanced functional properties. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 50-55, 2015.

CONAB – **Companhia Nacional de Abastecimento**. Produção de grãos chega a 251,9 milhões de toneladas e mantém recorde da safra. (2020). Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/3282-producao-de-graos-chega-a-251-9-milhoes-de-toneladas-e-mantem-recorde-da-safra-brasileira> >. Acesso em 3 de setembro de 2020.

CORDEIRO, L. G. **Caracterização e viabilidade econômica do bagaço de malte oriundo de cervejarias para fins energéticos**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Paraíba. 2011.

COUTO, S. R. Exploitation of biological wastes for the production of value-added products under solid-state fermentation conditions. **Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology**, v. 3, n. 7, p. 859-870, 2008.

CRIPWELL, R. A.; ZYL, W. H.; VILJOEN-BLOOM, M. **Fungal Biotechnology: Fungal Amylases and Their Applications**. 2020.

CROPLIFE BRASIL. **Conheça os protagonistas dos produtos biológicos disponíveis no Brasil**. 2020. Disponível em: <<https://croplifebrasil.org/noticias/conheca-os-protagonistas-dos-produtos-biologicos-disponiveis-no-brasil/>>. Acesso em: 10 de setembro de 2020.

CUNHA, L. P. **Produção de esporos do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 utilizando biorreator de leito empacotado**. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2020 (c).

CUNHA, L. P.; CASCIATORI, F. P.; LOPES, I. C.; THOMÉO, J. C. Production of conidia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* ICB 425 in a tray bioreactor. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 42, n. 11, p. 1757-1768, 2019.

CUNHA, L. P.; CASCIATORI, F. P.; VICENTE, I. V.; GARCIA, R. L.; THOMÉO, J. C. *Metarhizium anisopliae* conidia production in packed-bed bioreactor using rice as substrate in successive cultivations. **Process Biochemistry**, 2020 (b).

CUNHA, L. P.; GARCIA, R. L.; VICENTE, I. V.; THOMÉO, J. C. Produção de esporos do fungo *Metarhizium anisopliae* ICB425 por cultivo em estado sólido com uso de resíduos como substrato. **Revista de Engenharia e Tecnologia**, v. 12, n. 1, 2020 (a).

CUNHA, L. P.; HOMMA, V. K.; THOMÉO, J. C. Influência da carga de substrato na esporulação do fungo *metarhizium anisopliae* em embalagens plásticas. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 6, p. 6736-6744, 2019.

DALLASTRA, E. D. G.; RAMALHO, E. X.; AGUDELO, L. M. G. Valorização de resíduos agroindustriais para a produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* por processos de fermentação em estado sólido. In: VOIGT, C. L. (Org). **Impactos das Tecnologias na Engenharia Química** 3. p. 29-39. v. 3. Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2019.

D'ARCE, M. A. B. R. O processamento industrial do óleo vegetal e do farelo. **Revista Visão Agrícola-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**,(5), p. 140-141, 2006.

DAMIR, M. E. Effect of growing media and water volume on conidial production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Biological Sciences**, v. 6, n. 2, p. 269-274, 2006.

DE LA CRUZ QUIROZ, R.; ROUSSOS, S.; HERNÁNDEZ, D.; RODRÍGUEZ, R.; CASTILLO, F.; AGUILAR, C. N. Challenges and opportunities of the bio-pesticides production by solid-state fermentation: filamentous fungi as a model. **Critical reviews in biotechnology**, v. 35, n. 3, p. 326-333, 2015.

DEJO, F. População mundial deve ter mais 2 bilhões de pessoas nos próximos 30 anos. **UNICEF – ONU News**. 2019. Disponível em < <https://news.un.org/pt/story/2019/06/1676601>>. Acesso em: março de 2021.

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

DORTA, B.; ARCAS, J. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-state fermentation with forced aeration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 7-8, p. 501-505, 1998.

DORTA, B.; BOSCH, A.; ARCAS, J. A.; ERTOLA, R. J. High level of sporulation of *Metarhizium anisopliae* in a medium containing by-products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 6, p. 712-715, 1990.

DORTA, B.; ERTOLA, R. J.; ARCAS, J. Characterization of growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-substrate fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 6, p. 434-439, 1996.

DUNHAMTRIMMER LLC. **Markets for biological products: global market landscape**. 2017. Disponível em: <<http://www.bpia.org/member-company/dunham-trimmer-llc/>>. Acesso em: agosto de 2020.

ELMEKAWY, A.; DIELS, L.; DE WEVER, H.; PANT, D. Valorization of cereal based biorefinery byproducts: reality and expectations. **Environmental science & technology**, v. 47, n. 16, p. 9014-9027, 2013.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. A Embrapa, o arroz e você, juntos, por um Brasil melhor!: o arroz na indústria. **Embrapa Arroz e Feijão-Fôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E)**. 2004 a. Disponível em <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/217251>> Acesso: fevereiro de 2021.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. A Embrapa, o arroz e você, juntos, por um Brasil melhor!: utilização do farelo de arroz. **Embrapa Arroz e Feijão-Fôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E)**. 2004 b. Disponível em <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/216830>> Acesso: fevereiro de 2021.

FALAHZADAH, M. H.; KARIMI, J.; MORAVVEJ, G.; TARASCO, E. Isolation and characterization of *Metarhizium* isolates from the soil of Afghanistan and their mycoinsecticide effects against subterranean termite (*Anacanthotermes vagans*). **Redia-Giornale Di Zoologia**, v. 121, 2019.

FAO - **Organização da Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura**. BOJANIC, A. Desafio 2050 - 7 ANOS DA VISÃO 2050. (2017) In: <http://desafio2050.org/arquivos/pdf/7anos_de_Vision_2050-Alan_Bojanic.pdf > Acesso: 9 de abril de 2020.

FARGUES, J.; DURIEZ, T.; ANDRIEV, S.; POPEYE, R.; ROBERT, P. Étude immunologique comparée de souches de *Metarhizium anisopliae* (DELACR.) sien champignon hyphomycète entomopathogène. **Comptes Rendus Hebdomadaires de Séances Del' Academie des Sciences**, v. 281, Sér. D, p. 1781-1784, 1975.

FARIA, M. R.; HAJEK, A. E.; WRAIGHT, S. P. Imbibitional damage in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium acridum*, and *Metarhizium anisopliae*. **Biological Control**, v. 51, n. 3, p. 346-354, 2010.

FARIA, M. R.; LOPES, R. B.; SOUZA, D. A.; WRAIGHT, S. P. Conidial vigor vs. viability as predictors of virulence of entomopathogenic fungi. **Journal of invertebrate pathology**, v. 125, p. 68-72, 2015.

FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 22, n. 1, p. 18-21, 2001.

FARIA, M. R.; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological control**, v. 43, n. 3, p. 237-256, 2007.

FARIAS, C. P.; CARVALHO, R. C.; RESENDE, F. M.; AZEVEDO, L. C. Consortium of five fungal isolates conditioning root growth and arbuscular mycorrhiza in soybean, corn, and sugarcane. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 90, n. 4, p. 3649-3660, 2018.

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179–188, 2015.

FARLIAHATI, M. R.; RAMANAN, R. N.; MOHAMAD, R.; PUSPANINGSIH, N. N. T.; ARIFF, A. B. Enhanced production of xylanase by recombinant *Escherichia coli* DH5 α through optimization of medium composition using response surface methodology. **Annals of Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 279-285, 2010.

FAROOQ, M.; FREED, S. Infectivity of housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) to different entomopathogenic fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 807–816, 2016.

FENG, K. C.; LIU, B. L.; TZENG, Y. M. *Verticillium lecanii* spore production in solid-state and liquid-state fermentations. **Bioprocess Engineering**, v. 23, n. 1, p. 25-29, 2000.

FERNANDES, É. K.; BITTENCOURT, V. R.; ROBERTS, D. W. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. **Experimental parasitology**, v. 130, n. 3, p. 300-305, 2012.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; DA SILVA, E. G. P.; DOS SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; DAVID, J. M.; ANDRADE, J. B.; BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. C. S. F.; NETO, B. B. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of chromatography A**, v. 1158, n. 1-2, p. 2-14, 2007.

FIESP – **Federação das Indústrias do Estado de São Paulo**. Safra Mundial de Milho 2019/20 – 11º Levantamento do USDA. (2020). Disponível em: < <https://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safra-mundial-de-milho-2/attachment/file-20200312130632-boletimilhomarco2020/> >. Acesso em: 3 de setembro de 2020.

FITE, T.; TEFERA, T.; NEGERI, M.; DAMTE, T.; SORI, W. Evaluation of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Bacillus thuringiensis* for the management of *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory and field conditions. **Biocontrol Science and Technology**, v. 30, n. 3, p. 278-295, 2020.

FONSECA, J. R. F.; CUTRIM, V. D. A. C.; GUSMÃO, A. R. E. G.; FARIA, J. M. F. Descritores botânicos, agronômicos e fenológicos do arroz (*Oryza sativa* L.). **Embrapa Arroz e Feijão**, 2008.

FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. Controle biológico de pragas da agricultura. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Livro técnico** (INFOTECA-E). Brasília, DF: Embrapa, 2020. 510 p.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S. S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMINI, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. Entomologia agrícola. Piracicaba: **FEALQ**. 920 p. ISBN 85-71333-011-5. 2002.

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

GREENFIELD, B. P.; PEACE, A.; EVANS, H.; DUDLEY, E.; ANSARI, M. A.; BUTT, T. M. Identification of *Metarhizium strains* highly efficacious against *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* larvae. **Biocontrol Science and Technology**, v. 25, n. 5, p. 487-502, 2015.

GRIMM, C. Economic feasibility of a small-scale production plant for entomopathogenic fungi in Nicaragua. **Crop Protection**, v. 20, n. 7, p. 623-630, 2001.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175-186, 2004.

HONIG, D. H.; RACKIS, J. J. Determination of the total pepsin-pancreatin indigestible content (dietary fiber) of soybean products, wheat bran, and corn bran. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 27, n. 6, p. 1262-1266, 1979.

HUMBER, R. A. Seeking stability for research and applied uses of entomopathogenic fungi as biological control agents. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 19, n. 4, p. 1019–1025, 2016.

IGP – M. **Índice Geral de Preços – Mercado**. Disponível em: <<https://www3.bcb.gov.br/CALCIDADAOPublico/corrigirPorIndice.do?method=corrigirPorIndice#:~:text=A%20atualiza%C3%A7%C3%A3o%20%C3%A9%20obtida%20multiplicando,IPCA%2F100%2B1>> Acesso em: março de 2021.

IWANICKI, N. S. A.; FERREIRA, B. O.; MASCARIN, G. M.; JÚNIOR, Í. D. Modified Adamek's medium renders high yields of *Metarhizium robertsii* blastospores that are desiccation tolerant and infective to cattle-tick larvae. **Fungal Biology**, v. 122, n. 9, p. 883–890, 2018.

JARDINE, J. G. ; BARROS, T. D. Soja. **AGEITEC – Agência Embrapa de Informação Tecnológica**. 2020?. Disponível em < <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fbl23vmz02wx5eo0sawqe3vtdl7vi.html> >. Acesso em: março de 2021.

JARONSKI, S. T. Mass production of entomopathogenic fungi: state of the art. In: Mass production of beneficial organisms. **Academic Press**, 2014. p. 357-413.

JARONSKI, S. T.; JACKSON, M. A. Mass production of entomopathogenic Hypocreales. **Manual of techniques in invertebrate pathology**, v. 2, 2012.

JI, S.; LIU, Z.; LIU, B.; WANG, Y.; WANG, J. The effect of *Trichoderma* biofertilizer on the quality of flowering Chinese cabbage and the soil environment. **Scientia Horticulturae**, v. 262, p. 109069, 2020.

JOAQUÍN, Á.; STIWARD, F. **Evaluación de sustratos orgánicos para la producción de hongos entomopatógenos por fermentación en sustrato sólido**. UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN – Peru. 2013.

JULIANO, B.O.; BECHTEL, D.B. The rice grain and its gross composition. In: JULIANO, B.O. (Ed.). **Rice: chemistry and technology**. Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists, 1985. Cap.2, p.17-57.

KALNIN, J. R. **Avaliação estratégica para implantação de pequenas cervejarias**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. 1999.

KARANJA, L. W.; PHIRI, N. A.; ODUOR, G. I. Effect of different solid substrates on mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* entomopathogens. In: 12th KARI **Biennial Scientific Conference**, Nairobi, Kenya. 2010. p. 8-12.

KEPLER, R. M.; LUANGSA-ARD, J. J.; HYWEL-JONES, N. L.; QUANDT, C. A.; SUNG, G. H.; REHNER, S. A.; AIME, C.; HENKEL, T. W. ; SANJUAN, T.; ZARE, R.; CHEN, M.; LI, Z.; ROSSMAN, A. Y.; SPATAFORA, J. W.; SHRESTHA, B. A phylogenetically-based nomenclature for *Cordycipitaceae* (Hypocreales). **IMA fungus**, v. 8, n. 2, p. 335-353, 2017.

KRUGER, R. D.; POSADAS, J. B.; LEWYLLE, M. A.; MINI, J. I.; LECUONA, R. E. Solid substrate production and formulation of an isolate of *Metarhizium anisopliae* for biological control of stem bug *Tibraca limbativentris*. **World Applied Sciences Journal**, v. 32, n. 7, p. 1242-1251, 2014.

LANDRY, J.; MOUREAUX, T. Heterogeneity of the glutelins of the grain corn: Selective extraction and composition in amino acids of the three isolated fractions. **Bull. Soc. Chem. Biol.**, Princeton, 1970.

LEE, W. W.; SHIN, T. Y.; BAE, S. M.; WOO, S. D. Screening and evaluation of entomopathogenic fungi against the green peach aphid, *Myzus persicae*, using multiple tools. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 18, n. 3, p. 607–615, 2015.

LITWIN, A.; NOWAK, M.; RÓŻALSKA, S. Entomopathogenic fungi: unconventional applications. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, p. 1-20, 2020.

LOPES, I. C. **Produção de conídios do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em diferentes condições de cultivo e em biorreator de bandeja**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2016.

LORENCINI, P. **Otimização do pré-tratamento ácido de bagaço de cana para a sua utilização como substrato na produção biológica de hidrogênio**. Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. 2013.

MACHADO, A. C. R.; MONTEIRO, A. C.; MOCHI, D. A.; YOSHIDA, L. Resíduos e subprodutos agroindustriais e grãos como substratos para produção do fungo entomopatogênico *Lecanicillium lecanii*. **Bragantia**, v. 68, n. 3, p. 703-714, 2009.

MACHEIX, J. J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. The main phenolics of fruits. **Fruit phenolics**, p. 1-98, 1990.

MAGALHAES, P. C.; DURAES, F. O.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. Fisiologia do milho. **Embrapa Milho e Sorgo**. Circular Técnica 22, 2002.

MAPA – **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Projeções do Agronegócio: Brasil 2018/19 a 2028/29 projeções de longo prazo. Secretaria de Política Agrícola. – Brasília: MAPA/ACE, 2019.

MARAFON, A. C. Análise quantitativa de crescimento em cana-de-açúcar: uma introdução ao procedimento prático. **Embrapa Tabuleiros Costeiros-Documentos (INFOTECA-E)**, 2012.

MASCARIN, G. M.; ALVES, S. B.; LOPES, R. B. Culture media selection for mass production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 4, p. 753-761, 2010.

MASCARIN, G. M.; LOPES, R. B.; DELALIBERA JR, Í.; FERNANDES, É. K. K.; LUZ, C.; FARIA, M. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of invertebrate pathology**, v. 165, p. 46-53, 2019.

MASCARIN, G. M.; QUINTELA, E. D. Técnica de produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* para uso em controle biológico. **Embrapa Arroz e Feijão-Documentos (INFOTECA-E)**, 2013.

MCALLISTER, T. A.; K. J. CHENG; L. M. RODE; C. W. FORSBERG. Digestion of barley, maize, and wheat by selected species of ruminal bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 10, p. 3146-3153, 1990.

MEMBANG, G.; AMBANG, Z.; MAHOT, H. C.; KUATE, A. F.; FIABOE, K. K. M.; HANNA, R. Thermal response and horizontal transmission of cameroonian isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*—Candidates for microbial controls of the banana root borer *Cosmopolites sordidus*. **Fungal Ecology**, v. 50, p. 101042, 2021.

MENDES, F. B. **Avaliação técnico-econômica da produção de enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2015.

MICHEREFF FILHO, M.; DE FARIA, M. R.; WRAIGHT, S. P.; SILVA, K. F. A. S. Micoínseticidas e micoacaricidas no Brasil: como estamos após quatro décadas?. **Embrapa Hortaliças** - Artigo em periódico indexado (ALICE), 2009.

MIENDA, B. S.; IDI, A.; UMAR, A. Microbiological features of solid state fermentation and its applications-An overview. **Research in Biotechnology**, v. 2, n. 6, 2011.

MISHRA, S.; KUMAR, P.; MALIK, A. Suitability of agricultural by-products as production medium for spore production by *Beauveria bassiana* HQ917687. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture**, v. 5, n. 2, p. 179-184, 2016.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. Solid-state fermentation bioreactors: fundamentals, design and operation. **Springer-Verlag**: Berlin, 2006.

MONFARDINI, R. D. **Evolução das vias de controle do desenvolvimento tecidual em holometábolos**. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo. 2018. Data de liberação 2022.

MONTESINOS-MATÍAS, R.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; ALATORRE-ROSAS, R.; LOERA, O. Relationship between virulence and enzymatic profiles in the cuticle of *Tenebrio molitor* by 2-deoxy-d-glucose-resistant mutants of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 9, p. 2095-2102, 2011.

MORA, M. A. E.; CHACÓN-OROZCO, J. G.; HAKAKA, R.; ROUWS, J. R. C.; FRAGA, M. E. Molecular characterization and virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) and *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 19, p. 662-668, 2016.

MOURÃO, R. C.; PANCOTI, C. G.; MOURA, A. M.; FERREIRA, A. L.; BORGES, A. L. C. C.; REIS, R. Processamento do milho na alimentação de ruminantes. **Pubvet**, v. 6, p. Art. 1289-1294, 2012.

MUSSATTO, S. I. Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 7, p. 1264-1275, 2014.

NAMASIVAYAM, S. K. R.; AARTHI, R.; ANBAZHAHAN, P. Studies on factors influencing the viability of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* in soil adapting culture dependent method. **Journal of Biopesticides**, v. 8, n. 1, p. 23, 2015.

NASCIMENTO SILVA, J.; MASCARIN, G. M.; DOS SANTOS GOMES, I. C.; TINÔCO, R. S.; QUINTELA, E. D.; DOS REIS CASTILHO, L.; FREIRE, D. M. G. New cost-effective bioconversion process of palm kernel cake into bioinsecticides based on *Beauveria bassiana* and *Isaria javanica*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 6, p. 2595-2606, 2018.

NISHI, O.; SATO, H. Species diversity of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride* species complexes isolated from insects in Japan. **Mycoscience**, v. 58, n. 6, p. 472–479, 2017.

OLI, P.; WARD, R.; ADHIKARI, B.; TORLEY, P. Parboiled rice: understanding from a materials science approach. **Journal of Food Engineering**, v. 124, p. 173-183, 2014.

OLIVEIRA, A. D. S. **Análise econômica da produção do fungo *Metarhizium anisopliae* por fermentação em estado sólido**. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal do Tocantins. 2019.

OLIVEIRA, M. D. S.; DORS, G. C.; SOARES, L. A. D. S.; FURLONG, E. B. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, n. 3, p. 253-262, 2007.

OMKAR, K. B. Biocontrol of Insect Pests. In: Ecofriendly Pest Management for Food Security. [s.l.] **Elsevier**, 2016. p. 25–61.

ORESTE, M.; BUBICI, G.; POLISENO, M.; TRIGGIANI, O.; TARASCO, E. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin against *Galleria mellonella* L. and *Tenebrio molitor* L. in laboratory assays. **Redia**, v. 95, p. 43-48, 2012.

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) - Faculdade de Ciências Agronômicas - UNESP. 2007.

PALUCCI, J. A.; MOREIRA, G. C. Viabilidade econômica de uma Biofabrica para controle da Cigarrinha das Raízes em Usina de Açúcar e Alcool. **Revista IPecege**, v. 1, n. 3/4, p. 58-74, 2015.

PANDEY, A. Aspects of fermenter design for solid-state fermentations. **Process Biochemistry**, v. 26, n. 6, p. 355-361, 1991.

PANDEY, A. K.; KANAUIA, K. R. Effect of different grains as solid substrates on sporulation, viability and pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin. **Journal of Biological Control**, v. 22, n. 2, p. 369-374, 2008.

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

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current science**, p. 149-162, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

PARRA, J. R. P. Biological control in Brazil: an overview. **Scientia Agricola**, v. 71, n. 5, p. 420-429, 2014.

PENARIOL, M. C. **Requisitos nutricionais e produção massal de *Bipolaris euphorbiae*.** Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. 2006.

PENARIOL, M. C.; MONTEIRO, A. C.; PITELLI, R. A.; PEREIRA, G. T. Produção de *Bipolaris euphorbiae* em meios de cultura sólidos e líquidos obtidos de grãos e resíduos agroindustriais. **Bragantia**, v. 67, n. 4, p. 805-814, 2008.

PETERS, M. S.; TIMMERHAUS, K. D. Plant Design and Economics for Chemical Engineers. New York: **McGraw-Hill**. 4-th Ed. 1991.

PIRES, A. J. V.; GARCIA, R.; CECON, P. R.; NEIVA, J. N. M.; SARMENTO, P. Amonização da quirera de milho com alta umidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, n. 6, p. 1186-1193, 1999.

POLAR, P.; MURO, M. A.; KAIRO, M. T.; 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**, v. 134, n. 1-2, p. 159-167, 2005.

POTRICH, T. D.; LORINI, I.; VOSS, M.; STEFFENS, M. C. S.; PAVANI, D. P. Metodologia de criação de *Tenebrio molitor* em laboratório para obtenção de larvas. Passo Fundo: **EMBRAPA Trigo**, 2007. Disponível em: < ORESTE >. Acesso em: 9 de setembro de 2020.

POURSEYED, S. H.; TAVASSOLI, M.; BERNOUSI, I.; MARDANI, K. *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales): an effective alternative to chemical acaricides against different developmental stages of fowl tick *Argas persicus* (Acari: Argasidae). **Veterinary parasitology**, v. 172, n. 3-4, p. 305-310, 2010.

PRAKASH, G. B.; PADMAJA, V.; KIRAN, R. S. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1530-1537, 2008.

PRUECKLER, M.; SIEBENHANDL-EHN, S.; APPRICH, S.; HOELTINGER, S.; HAAS, C.; SCHMID, E.; KNEIFEL, W. Wheat bran-based biorefinery 1: Composition of wheat bran and strategies of functionalization. **LWT-Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 211-221, 2014.

QIU, L.; LI, J. J.; LI, Z.; WANG, J. J. Production and characterization of biocontrol fertilizer from brewer's spent grain via solid-state fermentation. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2019.

QUINTELA, E. D.; YOKOYAMA, L. P.; ROBERTS, D. W. Metodologia e custo de produção de *Metarhizium anisopliae* em quirera de arroz. **EMBRAPA-SPI**, 1994.

RAGHAVARAO, K. S. M. S.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N. G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 127-135, 2003.

RAMOS, Y.; TAIBO, A. D.; JIMÉNEZ, J. A.; PORTAL, O. Endophytic establishment of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in maize plants and its effect against *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 30, n. 1, p. 1-6, 2020.

RAVENSBERG, W. J. Mass production and product development of a microbial pest control agent. In: A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control of arthropods. **Springer**, Dordrecht, 2011. p. 59-127.

REDDY, G. B.; SUKUMAR, K.; KUMAR, K. R.; SWARNABALA, G.; REDDY, K. V.; MUNEEL, V. Economical Biomass production of aerial conidia of *Metarhizium anisopliae* MCC0051 using Agri residues as Solid substrate and its Bioefficacy in controlling *Helicoverpa armigera*. **Journal of Agriculture and Veterinary Science**, v. 10, pp 42-46, 2017.

REZENDE, J. M. **Influência da qualidade de diferentes tipos de arroz e inibidores de proteinases no rendimento e na virulência de conídios do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Mestch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales)**. Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. 2009.

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

ROSE, D. J.; INGLETT, G. E.; LIU, S. X. Utilisation of corn (*Zea mays*) bran and corn fiber in the production of food components. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 6, p. 915-924, 2010.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; HANNAS, M. I.; SAKOMURA, N. K.; PERAZZO, F. G.; SARAIVA, A.; TEIXEIRA, M. L.; RODRIGUES, P. B.; OLIVEIRA, R. F.; BARRETO, S. L. T.; BRITO, C. O. Tabelas brasileiras para aves e suínos. **Composição de alimentos e exigências nutricionais**, 4. Ed. – Viçosa: Departamento de Zootecnia, UFV, 2011.

ROY, H. E.; STEINKRAUS, D. C.; EILENBERG, J.; HAJEK, A. E.; PELL, J. K. Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 331-357, 2006.

RUIU, L. Microbial biopesticides in agroecosystems. **Agronomy**, v. 8, n. 11, p. 235, 2018.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R.D. Zoologia dos Invertebrados. 6 ed. São Paulo: **Ed. Roca**. 1028p. 1996.

SAHAYARAJ, K.; NAMASIVAYAM, S. K. R. Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by products. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 12, 2008.

SÁNCHEZ-PÉREZ, L. C.; BARRANCO-FLORIDO, J. E.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, S.; CERVANTES-MAYAGOITIA, J. F.; RAMOS-LÓPEZ, M. A. Enzymes of entomopathogenic fungi, advances and insights. **Advances in Enzyme Research**, v. 2, n. 2, p. 65-76, 2014.

SANTORO, P. H.; NEVES, P. M. D. O. J.; DA SILVA, R. Z.; AKIMI, S.; ZORZETTI, J. Produção de esporos de *Beauveria bassiana* (Bals). Vuill. num processo bifásico utilizando diferentes meios líquidos. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 26, n. 3, p. 313-319, 2005.

SANTOS, M. S.; RIBEIRO, F. M. Cervejas e Refrigerantes, **CETESB**, São Paulo. 58 p. 2005.

SANTOS, P. S.; ABATI, K.; MENDOZA, N. V. R.; MASCARIN, G. M.; JÚNIOR, I. D. Nutritional impact of low-cost substrates on biphasic fermentation for conidia production of the fungal biopesticide *Metarhizium anisopliae*. **Bioresource Technology Reports**, v. 13, p. 100619, 2021.

SANTOS, P. S. **Adaptações no sistema de produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales)**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2017.

SANTOS, V. **Riqueza e alterações morfofisiológicas associadas à infecção por vírus de RNA de fita dupla no fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae***. Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo, 2013.

SANTOS, V.; MASCARIN, G. M.; DA SILVA LOPES, M.; ALVES, M. C. D. F.; REZENDE, J. M.; GATTI, M. S. V.; DUNLAP, C. A.; JÚNIOR, Í. D. Identification of double-stranded RNA viruses in Brazilian strains of *Metarhizium anisopliae* and their effects on fungal biology and virulence. **Plant Gene**, v. 11, p. 49-58, 2017.

SARWAR, M. Microbial insecticides-an ecofriendly effective line of attack for insect pests management. **International Journal of Engineering and Advanced Research Technology**, v. 1, n. 2, p. 4-9, 2015.

SCHEEREN, P. L.; CASTRO, R. L.; CAIERAO, E. Botânica, morfologia e descrição fenotípica. In: BORÉM, A.; SCHEEREN, P. L. (Ed.). **Trigo: do plantio à colheita**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2015. Cap. 2, p. 35-55. Embrapa Trigo - Capítulo em livro científico (ALICE). 2015

SCHMIDT, F. G. V.; SILVA, J. B. T.; FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P.; ALVES, R. T.; LECOQ, M. Methodology of application of the fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* for the control of the grasshopper *Rhammatocerus schistocercoides* in the field. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 208, 2007.

SCHOLTE, E. J.; NJIRU, B. N.; SMALLEGANGE, R. C.; TAKKEN, W.; KNOLS, B. G. Infection of malaria (*Anopheles gambiae* ss) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Malaria journal**, v. 2, n. 1, p. 29, 2003.

SCHOLTE, E. J.; TAKKEN, W.; KNOLS, B. G. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Acta Tropica**, v. 102, n. 3, p. 151-158, 2007.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1267-1274, 2010.

SEIBER, J. N.; COATS, J.; DUKE, S. O.; GROSS, A. D. Biopesticides: state of the art and future opportunities. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 48, p. 11613-11619, 2014.

SENE, L.; ALVES, L. F. A.; LOBRIGATTE, M. F. P.; THOMAZONI, D. Produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* em meio sólido à base de resíduos agroindustriais. **Arquivos de Instituto Biológico**, v. 7, p. 449-456, 2010.

SEYEDTALEBI, F. S.; SAFAVI, S. A.; TALAEI-HASSANLOUI, R.; BANDANI, A. R. Quantitative comparison for some immune responses among *Eurygaster integriceps*, *Ephestia kuehniella* and *Zophobas morio* against the entomopathogenic fungus *Beuveria bassiana*. **Invertebrate Survival Journal**, v. 14, n. 1, p. 174-181, 2017.

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

SIVASUBRAMANIAN, S.; NAMASIVAYAM, S. Statistical optimization of physical conditions for phenol degradation using effective microorganism-I. **NISCAIR-CSIR**, India. 2014.

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**. 1992. 218 p. Thèse de Doctorat. Mention Génie enzymatique, Bioconversion et Microbiologie, Université de Technologie de Compiègne. Compiègne-France, 1992.

STRAPASSON, G. C. **Caracterização e utilização do resíduo de produção de vinho no desenvolvimento de alimentos com propriedade funcional**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná. 2016.

STRAZZI, S. Derivados do milho são usados em mais de 150 diferentes produtos industriais. **Visão Agrícola**, v. 13, p. 146-150, 2015.

Syngenta Brasil. **Milho safrinha: Brasil deve ter bons resultados em 2020.** (2020). Disponível em: < [https://portalsyngenta.com.br/noticias/milho-safrinha-brasil-deve-ter-bons-resultados-em-2020#:~:text=Relat%C3%B3rio%20do%20USDA%20\(Departamento%20de,1%20C14%20bilh%C3%A3o%20de%20tonelada](https://portalsyngenta.com.br/noticias/milho-safrinha-brasil-deve-ter-bons-resultados-em-2020#:~:text=Relat%C3%B3rio%20do%20USDA%20(Departamento%20de,1%20C14%20bilh%C3%A3o%20de%20tonelada) >. Acesso em: 3 de setembro de 2020.

TABNUT – Tabela de Composição Química dos Alimentos. Departamento de Informática em Saúde da Escola Paulista de Medicina/Unifesp. Base de Dados de Nutrientes do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). 2021. Disponível em: < <http://tabnut.dis.epm.br/>>. Acesso em abril de 2021.

TD SOFTWARE – **Composição química dos alimentos.** Disponível em: < <https://www.agropecuaria.inf.br/composicao-quimica-de-alimentos>>. Acesso em fevereiro de 2021.

TEIGISEROVA, D. A.; BOURGINE, J.; THOMSEN, M. Closing the loop of cereal waste and residues with sustainable technologies: an overview of enzyme production via fungal solid-state fermentation. **Sustainable Production and Consumption**, 2021.

TEKAM, K. D.; KELWATKAR, N. M.; DAS, S. B. Evaluation of economic medium for mass multiplication of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 5, p. 2790-2795, 2018.

TEWARI, L.; BHANU, C. Evaluation of agro-industrial wastes for conidia based inoculum production of bio-control agent: *Trichoderma harzianum*. **CSIR**. 2004.

TEWELDE, A.; ALEMU, T. Evaluation and Optimization of Agro-industrial Wastes for Conidial Production of *Metarhizium anisopliae* isolates under Solid State Fermentation. **Momona Ethiopian Journal of Science**, v. 11, n. 2, p. 209-228, 2019.

THIAGO, L. D. S.; SILVA, J. M. Soja na alimentação de bovinos. **Embrapa Gado de Corte-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2003.

THIAGO, L. D. S.; VIEIRA, J. M. Cana-de-açúcar: uma alternativa de alimento para a seca. **Embrapa Gado de Corte-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2002.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146-161, 2013.

TONON, R.; SILVA, C.; GALDEANO, M.; SANTOS, K. M. O. Tecnologias para o Aproveitamento Integral dos Resíduos da Indústria Vitivinícola. **Embrapa Agroindústria de Alimentos-Documentos (INFOTECA-E)**, 2018.

TOUNOU, A. K.; KOOYMAN, C.; DOURO-KPINDOU, O. K.; POEHLING, H. M.; Interaction between *Paranosema locustae* and *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, two pathogens of the desert locust, *Schistocerca gregária* under laboratory conditions. **Journal of invertebrate pathology**, v. 97, n. 3, p. 203-210, 2008.

VALICENTE, F. H. Controle biológico de pragas com entomopatógenos. **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo** em periódico indexado (ALICE), 2009.

VAN BREUKELLEN, F. R.; HAEMERS, S.; WIJFFELS, R. H.; RINZEMA, A. Bioreactor and substrate selection for solid-state cultivation of the malaria mosquito control agent *Metarhizium anisopliae*. **Process biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 751-757, 2011.

VAN DER BORGHT, A.; GOESAERT, H.; VERAVERBEKE, W. S.; DELCOUR, J. A. Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: Overview of the main processes and the factors involved. **Journal of Cereal Science**. 2005, 41, 221-237.

VARGAS, L.; ROMAN, E. S. Conceitos e aplicações dos adjuvantes. **Embrapa Trigo-Documentos (INFOTECA-E)**, 2006.

VEGA, F. E. The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. **Mycologia**, v. 110, n. 1, p. 4-30, 2018.

VELASCO, F. O.; GONÇALVES, L. C.; TEIXEIRA, A. M.; FARIA JR, W. G.; MAGALHÃES, F. A. In: **Alimentos para gado de leite**. 1.ed. GONÇALVES, L.C.; BORGES, I.; FERREIRA, P.D. (Ed) Belo Horizonte: FEPMZV, 2009. 578p.

VELASCO-REYES, I. D.; CRUZ-VÁZQUEZ, C.; ÁNGEL-SAHAGÚN, C.; MEDINA-ESPARZA, L.; RAMOS-PARRA, M. Control of *Haematobia irritans* and *Stomoxys calcitrans* with *Metarhizium anisopliae* in naturally infested cattle. **Revista MVZ Córdoba**, v. 24, n. 1, p. 7091-7096, 2019.

VIGNA, G. P. USO DA TRIFLURALINA GOLD NORTOX NA CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR. **Informativo Técnico**. NORTOX. Ed. 08. 2018.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A. D. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p. 1184-1192, 2008.

WANG, L.; YANG, S. -T. Chapter 18—Solid State Fermentation and Its Applications. In *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources: New Technologies and Applications*; **Elsevier** B.V.: Amsterdam, The Netherlands, 2007; pp. 465–489.

WESENDONCK, W. R. **Valor nutricional de diferentes subprodutos do trigo para suínos em crescimento**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia. 2012.

YADAV, M. P.; HICKS, K. B.; JOHNSTON, D. B.; HOTCHKISS JR, A. T.; CHAU, H. K.; HANAH, K. Production of bio-based fiber gums from the waste streams resulting from the commercial processing of corn bran and oat hulls. **Food Hydrocolloids**, v. 53, p. 125-133, 2016.

YE, S. D.; YING, S. H.; CHEN, C.; FENG, M. G. New solid-state fermentation chamber for bulk production of aerial conidia of fungal biocontrol agents on rice. **Biotechnology letters**, v. 28, n. 11, p. 799-804, 2006.

ZHANG, Z. Y.; JIN, B.; KELLY, J. M. Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi. **Biochemical engineering journal**, v. 35, n. 3, p. 251-263, 2007.

ZHIHUI, B.; BO, J.; YUEJIE, L.; JIAN, C. H. E. N.; ZUMING, L. I. Utilization of winery wastes for *Trichoderma viride* biocontrol agent production by solid state fermentation. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, n. 3, p. 353-358, 2008.