



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

Lucas Portilho da Cunha

**Produção de esporos do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 utilizando
biorreator de leito empacotado.**

São José do Rio Preto
2020

Lucas Portilho da Cunha

Produção de esporos do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 utilizando biorreator de leite empacotado.

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor 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”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. João Cláudio Thoméo

São José do Rio Preto
2020

C972p	Cunha, Lucas Portilho da Produção de esporos do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> IBCB 425 utilizando biorreator de leite empacotado / Lucas Portilho da Cunha. -- São José do Rio Preto, 2020 112 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientador: João Cláudio Thoméo 1. <i>Metarhizium anisopliae</i>. 2. Reuso do substrato. 3. Biorreatores. 4. Cultivo em estado sólido. 5. Arroz tipo 1. 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.

Lucas Portilho da Cunha

**Produção de esporos do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425
utilizando biorreator de leito empacotado.**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor 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”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

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

Prof^a. Dr^a. Cristiane Sanchez Farinas
Embrapa - Instrumentação

Prof^a. Dr^a. Fernanda Perpétua Casciotori
UFSCar – São Carlos

Prof^a. Dr^a. Flavia Villas Boas
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Marcia Maria De Souza Moretti
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
06 de abril de 2020

Àquela que me conhece onde ninguém conhece e torna o que, às
vezes, aos meus olhos é complexo, em coisas simples,
minha esposa Jackeline.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me proporcionar oportunidades únicas, como esta, que vivo intensamente com muita alegria, pois por muitos anos desacreditei, mas Ele, aquele que é acima de tudo e de todos, me trouxe até aqui. Tudo é Dele, por Ele e para Ele, todas as coisas.

Não poderia deixar de agradecer de maneira alguma a minha esposa, pois sem ela na minha vida, acredito que talvez não teria chegado até aqui. Minha esposa, Jackeline, me torna uma pessoa melhor a cada dia, consegue fazer com que as melhores coisas que existem em mim floresçam de forma esplendida.

Outro alguém fundamental neste processo é meu orientador, Prof. Dr. João Claudio Thoméo, que não mediu esforços para me ajudar a chegar aqui, seus conselhos, seus ensinamentos e, principalmente, sua paciência me fizeram vê-lo como um pai. Além disso, hoje posso dizer que o considero um colega que levarei para a vida toda, pois com suas experiências, a cada reunião, nos instrui a não cometer erros e nos orienta a fim de sermos seres humanos melhores com humanidade, seriedade e honestidade. Obrigado, professor João, o senhor marcou a minha história, pois me ensinou não só com palavras, mas também com atitudes e essas pretendo levar para minha vida e para os meus futuros alunos.

Também quero agradecer a minha colega Flavia Vilas Boas que não mediu esforços para me auxiliar nas análises, as quais eu não tinha conhecimento, mas deram um toque especial ao meu trabalho.

Quero agradecer a prof.^a Dra. Célia Maria Landi Franco que nos ajudou com conselhos profissionais e tornou tudo mais compreensível neste trabalho. Também não poderia deixar de agradecer a prof.^a. Dra. Eleni Gomes que nunca me negou o empréstimo de algum material ou equipamento que fosse conferir a este trabalho mais credibilidade e qualidade.

A todos os professores do departamento de Engenharia e Ciência de alimentos: muito obrigado pela transmissão de conteúdo e de conhecimento, ao lado de cada um de vocês pude aprender algo diferente.

Quero agradecer aos meus colegas de laboratório que me ensinaram que conviver em grupo nem sempre é fácil, mas faz-se necessário; e colocar-se no lugar do outro e entendê-lo é fundamental para a convivência. Agradeço a ajuda em todas as análises e na caminhada, sou grato pelos amigos que ganhei neste período.

Ademais, quero agradecer a todos os técnicos que em vários momentos me auxiliaram, e que com seus conhecimentos tornaram os trabalhos que seriam pesados em leves e bons. Esse agradecimento e reconhecimento destina-se ao Luis, à Tânia e à Alana.

Também devo agradecimentos ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga e o técnico Luiz Roberto Falleiros Jr., do departamento de biologia, os quais me auxiliaram nos testes de microscopia de maneira excepcional e acrescentaram muito conhecimento e qualidade para este trabalho.

Quero agradecer a UNESP/IBILCE por fornecer toda condição necessária para a realização desta pesquisa.

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

*“Todas as coisas foram feitas por intermédio Dele,
e sem Ele nada do que foi feito se fez.” João 1:3*
Bíblia Sagrada

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo produzir esporos do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 em biorreator de leite empacotado visando o aumento da escala, propondo ainda alternativas para a extração dos esporos do meio de cultivo. Também se propõe compreender a preferência do fungo pelo arroz como substrato, procurando-se alternativas para redução dos custos de produção relativos a este substrato. Para isso, realizou-se o cultivo e o reuso do substrato em embalagens plásticas, onde se observou que o cultivo em arroz tipo 1 ainda é o melhor substrato para o fungo, quando comparado com os utilizados neste trabalho sendo, quísera de arroz e farelo de arroz, porém para o aumento de escala e reuso do substrato, a melhor alternativa é a mistura de arroz com bagaço de cana-de-açúcar na proporção de 9:1. Também se realizou ensaios em biorreatores de leite empacotado de 7.62 cm e 20 cm de diâmetro, utilizando a mistura de arroz e bagaço como substrato, e observou-se que, para ambas as configurações, o bagaço evitou a compactação do leite, não se observando temperaturas elevadas que interferissem no desenvolvimento do microrganismo. Com as análises de degradação do amido e da atividade das enzimas amilase total, alfa – amilase e protease, foi possível concluir que o fungo se desenvolve de maneira distinta a cada uso dos grãos e que, o maior consumo de amido ocorre no primeiro cultivo (R1), reduzindo-o em cerca de 30%. Análises de microscopia óptica foram realizadas nos grãos cultivados, onde se observou que no R1 as hifas do fungo penetram os grãos e no segundo (R2) e terceiro (R3) cultivos isso não ocorre, pois o crescimento ocorre apenas na superfície dos grãos. Constatou-se nos biorreatores que houve redução da massa de grãos de 24% após o R1, de 20% após o R2 e de 17% após o R3. A concentração total de esporos foi similar nos três cultivos sucessivos, mas a concentração total de esporos foi cerca de 2,5 vezes maior quando se fez os três cultivos em relação a um único cultivo. Para os testes de extração de esporos, utilizou-se uma técnica seca e outra úmida. Na extração a seco, foi utilizado um tambor rotativo com fluxo de ar seco e um ciclone para recolhimento dos esporos e na úmida, após a extração dos esporos com solução Tween, utilizou-se a técnica de *spray drying*, utilizando como carreador maltodextrina, sendo que ambas as técnicas apresentaram bons resultados quanto à separação e secagem dos esporos. No tambor rotativo, constatou-se tempo elevado para extração, mas obteve-se extração de até 61% dos esporos. Utilizando o *spray dryer* foi possível observar uma tendência na

diminuição da viabilidade dos esporos com o aumento de temperatura e aumento da viabilidade com concentrações de maltodextrina mais altas.

Palavras chaves: *Metarhizium anisopliae*; Reuso do substrato, Biorreatores; cultivo em estado sólido; arroz tipo 1.

ABSTRACT

This work aimed to produce spores of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 in packed-bed bioreactors targeting the scale-up, and also to propose alternatives to the extraction of the spores from the cultivation medium. The understanding of the preference of the fungus for the long rice as substrate was also verified in order to reduce the production costs associated to the rice. Therefore, the rice was cultivated in plastic packages and it was noticed that rice is still the best substrate for the fungal growth, even though for the scale-up and reutilization of the substrate it was necessary to mix it with sugarcane bagasse at a proportion 9:1 (rice:bagasse). Experiments in packed-beds of 7.62 and 20 cm internal diameter have been carried out using the mixture rice:bagasse and for both sizes no compaction was noted and no excessive temperature took place. From starch analysis and from the activities of total amylase, alpha-amylase and protease it was noticed that the microbe develops distinctly in each consecutive cultivation of rice, and that after the first cultivation (R1), the starch content was reduced by 30%. Optical microscopy of the cultivated grains revealed that during R1 the fungal hyphae penetrated the grains, but during the second (R2) and third (R3) cultivations the fungal growth is restricted to the grain surface. It was observed a substrate mass reduction in the packed-bed experiments of 24%, 20% and 17% after R1, R2 and R3, respectively. The total spore concentration was similar in the three consecutive cultivations, although the total production of spores was 2.5 times higher for the three consecutive cultivations when compared with a single cultivation. The spores were extracted using a dry technique and a moist one. For the dry extraction was used a rotating drum with dry air flow and a cyclone to restrain the dry spores, while for the moist alternative the spores were removed from the grains using a Tween solution followed by drying in a spray dryer, using maltodextrin as adjuvant. Both approaches presented good results in terms of spore separation and drying. The experiments in rotating drum were quite long, but the efficiency of extraction was very high, 61%. The dry spores from the spray dryer were less viable with the increase of the temperature and more viable with the increase of the maltodextrin concentration.

Keywords: *Metarhizium anisopliae*; Substrate reuse, Bioreactors; solid-state cultivation; long rice.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 5. 1 CURVAS DE REGRESSÃO LINEAR DA CONCENTRAÇÃO DE ESPOROS (Ce) NAS DIFERENTES PROPORÇÕES DE BAGAÇO.....	35
FIGURA 6. 1 - OS GRÃOS DE ARROZ APÓS O PRIMEIRO CULTIVO A) ANTES DA SECAGEM; B) DEPOIS DA SECAGEM A 50°C DURANTE 24 H.	45
FIGURA 6. 2 - CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DO AMIDO DOS GRÃOS DE ARROZ PELO FUNGO <i>M. ANISOPLIAE</i> IBCB 425	47
FIGURA 6. 3 - CINÉTICA DA ATIVIDADE DE AMILASE, AMILASE TOTAL E DE PROTEASE E DE LIBERAÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES DURANTE.	48
FIGURA 6. 4 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ESPOROS PRODUZIDOS PELO FUNGO <i>M. ANISOPLIAE</i> IBCB 425 NO R1, R2 E R3.	53
FIGURA 6. 5 - IMAGENS DE MICROSCOPIA ÓPTICA DOS GRÃOS DE ARROZ UTILIZADOS PELA PRIMEIRA VEZ PARA CULTIVO DO FUNGO <i>M. ANISOPLIAE</i> IBCB 425.	56
FIGURA 6. 6 - IMAGENS DE MICROSCOPIA ÓPTICA DOS GRÃOS DE ARROZ UTILIZADOS PELA SEGUNDA VEZ PARA CULTIVO DO FUNGO <i>M. ANISOPLIAE</i> IBCB 425.....	58
FIGURA 6. 7 - IMAGENS DE MICROSCOPIA ÓPTICA DOS GRÃOS DE ARROZ UTILIZADOS PELA TERCEIRA VEZ PARA CULTIVO DO FUNGO <i>M. ANISOPLIAE</i> IBCB 425.....	60
FIGURA 6. 8 - IMAGENS DE MICROSCOPIA ÓPTICA DOS GRÃOS DE ARROZ NO R1, R2 E R3 NO MOMENTO DE 120 HORAS COM AUMENTO DE 200X PARA A SUPERFÍCIE E ENDOSPERMA DOS GRÃOS.	61
FIGURA 7 1 - ESQUEMA DOS BIORREADORES DE LEITO EMPACOTADO ESTREITO (BRE) E LARGO (BRL).....	68
FIGURA 7 2 - PERFIS DE TEMPERATURA OBTIDOS NO CULTIVO DO FUNGO <i>M. ANISOPLIAE</i> IBCB 425 EM EMBALAGENS PLÁSTICAS EMPREGANDO-SE ARROZ E BAGAÇO DE CANA COMO SUBSTRATOS.....	72
FIGURA 7 3 - FOTOGRAFIAS DO LEITO EMPACOTADO CONSTITUÍDO POR MISTURA DE ARROZ E BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR NA PROPORÇÃO DE 9:1 APÓS O CULTIVO. A) BRE; B) BRL	75
FIGURA 7 4 - PERFIS DE TEMPERATURA AO LONGO CULTIVO DE <i>M. ANISOPLIAE</i> IBCB 425 EM BIORREATOR DE LEITO EMPACOTADO UTILIZANDO MISTURA DE ARROZ COM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR NA PROPORÇÃO DE 9:1, EMPREGANDO-SE A TÉCNICA DE REUSO DO SUBSTRATO	80
FIGURA 7 5 - CINÉTICA DE GERAÇÃO DE CO ₂ OBTIDO DO CULTIVO EM BIORREATOR DE LEITO EMPACOTADO..	81

FIGURA 8. 1 – SISTEMA UTILIZADO PARA A ROTAÇÃO DO TAMBOR.....	86
FIGURA 8. 2 - CICLONE UTILIZADO NOS TESTES DE EXTRAÇÃO A SECO COM DIMENSÕES .	86
FIGURA 8. 3 - MATERIAL RECOLHIDO NO CICLONE APÓS A EXTRAÇÃO A SECO.	89
FIGURA 8. 4 - DIAGRAMA DE PARETO PARA O AJUSTE DO MODELO ESTATÍSTICO AOS DADOS DE UMIDADE DOS PÓS DE MALTODEXTRINA-ESPOROS SECOS EM SPRAY-DRYER A 90% DE INTERVALO DE CONFIANÇA.....	92
FIGURA 8. 5 - DIAGRAMA DE PARETO PARA O AJUSTE DO MODELO ESTATÍSTICO AOS DADOS DE VIABILIDADE DOS CONÍDIOS APÓS SECAGEM EM SPRAY-DRYER A 90% DE INTERVALO DE CONFIANÇA.....	92

LISTA DE TABELAS

TABELA 5. 1 COMPOSIÇÃO DOS SUBSTRATOS	32
TABELA 5. 2 RESULTADOS DAS CONCENTRAÇÕES DE ESPOROS AO FIM DO CULTIVO DO FUNGO <i>M. ANISOPLIAE</i> IBCB 425 EM EMBALAGENS PLÁSTICAS COM DIVERSOS TIPOS DE SUBSTRATO.....	33
TABELA 6. 1 - CONCENTRAÇÃO DE ESPOROS (Ce) APÓS CULTIVO DO FUNGO <i>M. ANISOPLIAE</i> EM ARROZ TIPO 1 (R1, R2 E R3) EM EMBALAGENS PLÁSTICAS	42
TABELA 6. 2 - CONCENTRAÇÃO DE ESPOROS (Ce) APÓS CULTIVO EM ARROZ TIPO 1 E EM UMA MISTURA DE ARROZ TIPO 1 E BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR (BCA) PARA OS TRÊS CULTIVOS CONSECUTIVOS EM EMBALAGENS DE PLÁSTICO DE 400 G	43
TABELA 7. 1 - CONCENTRAÇÃO DE ESPOROS DO FUNGO <i>M. ANISOPLIAE</i> OBTIDO ATRAVÉS DO CULTIVO EM EMBALAGENS PLÁSTICAS UTILIZANDO COMO SUBSTRATO MISTURA DE ARROZ E BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR NA PROPORÇÃO DE 9:1.....	71
TABELA 7. 2 - CONCENTRAÇÕES DE ESPOROS (Ce) DO FUNGO <i>METARHIZIUM ANISOPLIAE</i> IBCB 425 AO FINAL DO TEMPO DE CULTIVO NO BIORREATOR ESTREITO (BRE) E EM EMBALAGENS PLÁSTICAS (400 G) APÓS O PRIMEIRO CULTIVO (R1) E TEMPERATURAS MÁXIMAS (TMAX).....	73
TABELA 7. 3 - CONCENTRAÇÃO DE ESPOROS POR MÓDULOS (CMod), CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE ESPOROS (Ce), TEMPERATURAS MÉDIAS E TEMPERATURAS MÁXIMAS (TMAX) AO FINAL DO CULTIVO NO BIORREATOR LARGO (BRL) APÓS O PRIMEIRO CULTIVO DO SUBSTRATO (R1).....	74
TABELA 7. 4 - CONCENTRAÇÕES DE ESPOROS (Ce), TEMPERATURAS MÁXIMAS (TMAX) DO FUNGO <i>M. ANISOPLIAE</i> IBCB 425 AO FINAL DO CULTIVO NO BIORREATOR ESTREITO (BRE) APÓS O PRIMEIRO (R1), SEGUNDO (R2) E TERCEIRO (R3) CULTIVOS.	77
TABELA 7.5 - CONCENTRAÇÕES DE ESPOROS POR MÓDULO (CMod), CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE ESPOROS (Ce) E TEMPERATURAS MÁXIMAS (TMAX) DO FUNGO <i>METARHIZIUM ANISOPLIAE</i> IBCB 425 AO FINAL DO TEMPO DE CULTIVO NO BIORREATOR LARGO (BRL) APÓS O PRIMEIRO CULTIVO (R1), SEGUNDO CULTIVO...	78
TABELA 8. 1 - PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO FATORIAL PARA OS ENSAIOS DE SECAGEM..	88
TABELA 8. 2 - CONCENTRAÇÃO DE ESPOROS OBTIDOS ATRAVÉS DA EXTRAÇÃO A SECO, UTILIZANDO TAMBOR ROTATIVO.....	89
TABELA 8. 3 - RESULTADOS OBTIDOS NA SECAGEM POR SPRAY DRYER	91

TABELA 8. 4 - TABELA 8.4: ANOVA PARA O AJUSTE DO MODELO QUADRÁTICO AOS DADOS EXPERIMENTAIS DE UMIDADE E VIABILIDADE PROVENIENTES DOS ENSAIOS DE SECAGEM EM <i>SPRAY-DRYER</i>	93
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. ESTRUTURA DA TESE	18
3. OBJETIVOS GERAIS	19
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
4.1. Controle biológico	20
4.2. <i>Metarhizium anisopliae</i>	22
4.3. Aplicações do fungo entomopatogênico <i>M. anisopliae</i>	23
4.3. Cultivo em estado sólido (CES).....	23
4.4. Produção industrial de esporos.	25
4.5. Biorreatores para produção de <i>M. anisopliae</i>	26
4.6. Extração de esporos	28
5. CULTIVO DO FUNGO <i>M.ANISOPLIAE</i> SUBSTRATOS DERIVADOS DO ARROZ TIPO 1	30
5.1. Introdução	30
5.2. Materiais e métodos	31
5.2.1. Microrganismo	31
5.2.2. Cultivo em embalagens de polipropileno	31
5.2.3. Condição de cultivo	32
5.2.4. Extração de esporos	32
5.3. Resultados e discussão	33
5.4. Conclusão.....	36
6. PRODUÇÃO DE ESPOROS DO FUNGO <i>METARHIZIUM ANISOPLIAE</i> UTILIZANDO COMO SUBSTRATO O ARROZ EM CULTIVOS CONSECUTIVOS	37
6.1. Introdução	37
6.2. Materiais e métodos	38
6.2.1. Mateiriais	38
6.2.2. Cultivo do fungo	39
6.2.3. Substrato	39
6.2.4. Determinações analíticas	40
6.2.4.1. Concentração de amido.....	40
6.2.5. Ensaio enzimáticos.....	40
6.2.6. Açúcares redutores	41
6.2.7. Microscopia óptica	41
6.2.8. Análise estatística	41
6.3. Resultados e discussão	42

6.3.1.	Cultivos consecutivos	42
6.3.2.	Adaptação do fungo nos grãos de arroz longo no R1, R2 e R3.....	45
6.3.3.	Cinética de esporulação do fungo para R1, R2 e R3	51
6.3.4.	Análises de microscopia optica para os grãos do R1, R2 e R3	53
6.4.	Conclusão.....	61
7.	CULTIVO DO FUNGO METARHIZIUM ANISOPLIAE IBCB 425 UTILIZANDO BIORREATOR DE LEITO EMPACOTADO E REALIZANDO O REUSO DO SUBSTRATO, ARROZ LONGO.....	63
7.1.	Introdução	63
7.2.	Materiais e Métodos.....	65
7.2.1.	Microrganismo	65
7.2.2.	Cultivo em embalagens de polipropileno	66
7.2.3.	Extração de esporos	67
7.2.4.	Cultivo em biorreator	67
7.2.5.	Reuso do substrato.....	69
7.2.6.	Cinética de crescimento fúngico através da produção de CO ₂	69
7.2.7.	Análise de porosidade do leito	69
7.2.8.	Análise estatística	70
7.3.	Resultados e Discussão	70
7.3.1.	Cultivo em embalagens plásticas.....	70
7.3.2.	Cultivo em biorreatores de leito empacotado	72
7.3.3.	Reuso do substrato utilizando biorreator de leito empacotado.....	76
7.3.4.	Estimativa da biomassa fúngica por geração de CO ₂	80
7.4.	Conclusão.....	81
8.	EXTRAÇÃO DE ESPOROS AGREGADOS AOS GRÃOS DE ARROZ TIPO 1.....	83
8.1.	Introdução	83
8.2.	Materiais e Métodos.....	84
8.2.1.	Microrganismo	84
8.2.2.	Cultivo em embalagens de polipropileno	84
8.2.3.	Extração a seco	85
8.2.4.	Extração de esporos líquida seguido de secagem em spray-dryer	87
8.2.5.	Testes de viabilidade	88
8.3.	Resultados e Discussão	88
8.4.	Conclusão.....	94
9.	TRABALHOS FUTUROS	95
	REFERÊNCIAS	96

1. INTRODUÇÃO

Existe um grande número de fungos entomopatogênicos atualmente sendo utilizados para o controle de diversas pragas agrícolas, a fim de que ocorra uma diminuição no uso de defensivos químicos, os quais podem causar sérios danos ao meio ambiente e ao ser humano. Na América Latina, os fungos mais utilizados são *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, sendo o último responsável por 33% das vendas no mercado latino-americano. Mais de 3 milhões de hectares são tratados com o fungo *M. anisopliae* e, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA, 2019), o uso de defensivos biológicos aumentou cerca de 70% no ano de 2018, movimentando R\$ 464,5 milhões, ante R\$ 262,4 milhões em 2017.

Diversos estudos demonstram o sucesso do fungo *M. anisopliae* no combate a diversas pragas, tendo sido catalogadas mais de 200 espécies de hospedeiros, dentre os quais estão o carrapato *Boophilus microplus*, o besouro *Alphitobius diaperinus* (Panzer), as moscas estáveis *Stomoxys calcitrans* (L.), *Haematobia irritans* (moscas de chifre) e *Mahanarva posticata* (cigarrinha da folha da cana-de-açúcar). Atualmente, a maior utilização de *M. anisopliae* é no combate à cigarrinha da cana-de-açúcar, pois com a proibição da queima da cana nos canaviais ocorreu aumento expressivo da praga, em virtude do acúmulo de palha nos campos. (ALONSO-DÍAZ et al., 2007; CASTRO et al., 2016; GALINDO-VELASCO et al., 2015; LOUREIRO et al., 2012; PAULA et al., 2000; POLAR et al., 2005; SANTOS et al., 2017).

Para uma efetividade da morte das pragas nas lavouras, faz-se necessária a concentração de 2×10^{13} esporos/ha, de modo que se torna necessária a produção do fungo em larga escala. Entretanto, atualmente o processo de produção de esporos de *M. anisopliae* é semiartesanal, com pouca automatização, sujeito a contaminações e a erros operacionais, dependente de mão de obra extensiva e sem controle sofisticado das diversas variáveis que afetam um processo microbiológico. Na maioria das indústrias, a produção é realizada em embalagens plásticas e todas as operações do processo de cultivo do fungo são realizadas manualmente, expondo o processo a diversas contaminações (MENDEZ-GONZALEZ; LOERA; FAVELA-TORRES, 2018).

Como alternativa, existem estudos utilizando biorreatores para a produção de esporos de fungos entomopatogênicos. A utilização de biorreatores visa obter um processo reprodutível, controlado, aumentar a produtividade e evitar contaminações exógenas. Van Breukelen et al., (2011), Arzumanov et al., (2005) e Dorta & Arcas,

(1998) descrevem que é possível o cultivo do fungo em biorreator de coluna empacotada, porém alguns problemas são relatados como compactação do meio e gradientes de temperatura. Os autores aventam a possibilidade de criar estratégias para a diminuição destes problemas, podendo melhorar as características estruturais do leito, com algum material inerte, e maior domínio das variáveis operacionais.

Normalmente, *M. anisopliae* é cultivado em arroz tipo 1, pois o mesmo fornece todos os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento e grande área superficial, além de manter sua estrutura física ao longo do cultivo (DORTA; ARCAS, 1998; KARANJA et al., 2004; KRUGER et al., 2014). No entanto, o custo associado ao uso do arroz tipo 1 é elevado, refletindo-se no custo do produto final, de modo que é necessário **entender as causas** da boa adaptação do fungo a esse substrato e avaliar alternativas ao seu uso ou mesmo **a** sua reutilização.

A extração dos esporos dos substratos nas biofábricas também é outra etapa do processo desprovida de tecnologia. Segundo Mascarin; Quintela, (2013); Alves; Faria, (2010), normalmente a extração ocorre de duas maneiras, uma com o uso de peneiras vibratórias e outra utilizando grandes agitadores que trituram os substratos junto aos esporos. Porém em ambas as alternativas não ocorre repetibilidade, há perdas significativas de esporos. Jenkins et al., (1998) relatam superficialmente a utilização de um equipamento improvisado que realiza diversas rotações com o meio para que os esporos desprendam dos substratos e através de um alto fluxo de ar sejam carregados e recolhidos em ciclone.

Neste contexto, esta tese buscou analisar a produção de esporos do fungo *M. anisopliae* em biorreator de leito empacotado de modo a superar dificuldades operacionais para a ampliação de escala do equipamento, propondo ainda alternativas para a extração dos esporos do meio de cultivo. Também buscou-se compreender a preferência do fungo pelo arroz como substrato, procurando-se alternativas para a redução dos custos de produção relativos a este substrato. Além disso, foram testados métodos de extração mais eficientes.

2. ESTRUTURA DA TESE

Esta tese apresentará os estudos realizados ao longo do doutorado, em formato de seções. Na Seção 3 apresentam-se os objetivos do trabalho. Na Seção 4 há uma revisão bibliográfica para maior compreensão e entendimento do trabalho desenvolvido.

Na Seção 5, é explorado o cultivo do fungo *M. anisopliae* em diferentes substratos derivados do arroz tipo 1 e, ainda, o uso de material inerte para melhoria da estrutura do leito para obtenção de melhores concentrações finais de esporulação.

Na Seção 6, discute-se sobre os cultivos consecutivos em arroz tipo 1 e sobre o reuso do substrato. Também procura-se avaliar como o fungo se desenvolve sobre os grãos no primeiro, segundo e terceiro uso desses.

Na Seção 7, são apresentados os resultados de cultivo do fungo *M. anisopliae* utilizando duas configurações de biorreatores de leito empacotado (estreito e largo), realizando cultivos consecutivos. Neste tópico, ademais, discute-se a possível ampliação de escala sendo projetada por meio do uso de modelagem matemática.

Na Seção 8, há o apresentam-se métodos alternativos para a extração dos esporos, utilizando um tambor rotativo e, para coleta a seco, e porremoção líquida e posterior secagem em spray dryer.

3. OBJETIVOS GERAIS

Esta tese teve por objetivo principal a ampliação de escala para a produção de esporos do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 utilizando biorreator de leito empacotado por cultivo em estado sólido, propondo-se alternativas para a redução do consumo de arroz, o principal substrato aplicado industrialmente, bem como alternativas tecnológicas para a extração dos esporos. Para tanto, os objetivos específicos foram:

- Avaliar a viabilidade de emprego de arroz e seus derivados no cultivo do fungo;
- Demonstrar a possibilidade de se realizar cultivos sucessivos com arroz em embalagens plásticas e em biorreatores;
- Compreender a preferência do fungo pelo arroz como substrato por meio da degradação de amido, concentração de açúcares redutores e pela síntese das principais enzimas degradadoras do substrato;
- Avaliar as estratégias de colonização impostas pelo fungo ao arroz nos três cultivos sucessivos;
- Ampliar a escala de produção dos esporos do fungo em biorreatores de coluna empacotada, demonstrando sua viabilidade técnica;
- Desenvolver novos métodos de extração de esporos do arroz em tambor rotativo e por secagem em *spray-dryer*.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Controle biológico

Os inseticidas sintéticos ou químicos proporcionam controle da praga alvo em curto prazo, mas alta ou média toxicidade aos mamíferos. Outro problema encontrado no uso de inseticidas sintéticos é a resistência que as pragas adquirem com o tempo, requerendo formulações mais tóxicas e em concentrações mais elevadas (FAROOQ; FREED, 2016).

A aceitabilidade e a utilização dos bioinseticidas crescem com o passar dos anos, mesmo com custos acima dos praticados para os inseticidas químicos, em decorrência das diversas vantagens decorrentes de seu emprego, tais como econômicas, ambientais, sociais e de segurança alimentar. Omkar; Kumar, (2016) realizaram um comparativo de desempenho entre bioinseticidas e inseticidas sintéticos e relataram que os custos para o desenvolvimento de inseticidas sintéticos podem chegar a 150 milhões de dólares, enquanto que para bioinseticidas os investimentos podem chegar a 2 milhões de dólares.

Os bioinseticidas proporcionam controle prolongado das pragas, baixa ou nenhuma toxicidade aos seres humanos, alta seletividade de pragas, eficiência na mortandade das pragas, que chega a 88,4%, dentre outras vantagens. Como desvantagens, pode-se os tempos longos para a morte das pragas, as dificuldades na aplicação, a alta sensibilidade às variáveis abióticas, como temperatura, umidade e radiação UV, embora estudos tenham encontrado soluções para alguns destes problemas com a aplicação de fotoprotetores para aumento da resistência dos bioinseticidas a temperatura e a raios UV (BILAL; HASSAN; KHAN, 2012; CASTRO et al., 2016; LACEY et al., 2015; LEE et al., 2015; PAULA et al., 2000; SCHOLTE; TAKKEN; KNOLS, 2007).

Existem diversos fungos, bactérias, vírus e insetos entomopatogênicos, dentre os principais destacam-se: os vírus *Baculoviridae*, o *Alphabaculovirus* [*nucleopolyhedroviruses* (NPVs)] e *Betabaculovirus* [*granuloviruses* (GVs)]. As principais bactérias são: Gram-positiva, formadora de esporos *B. thuringiensis* subsp., *L. (B.) sphaericus* e *Bacillus thuringiensis*, as gram-negativas, não formadoras de esporos *Serratia entomophila*, *Chromobacterium subtsugae*. e *B. thuringiensis* subsp. Também existe o grupo de insetos entomopatogênicos, conhecidos como parasitóides, os quais iniciam a vida como larva e quando adultos, tornam-se moscas ou vespas. As principais espécies são: as vespas *Trichogramma*, *Hymenoptera*: especialmente superfamílias *Chalcidoidea*, *Ichneumonoidea* e

4. Revisão Bibliográfica

Platygasteroide; as moscas: *Diptera* e a *Tachinidae* (CRUZ; MONTEIRO, 2004; OMKAR; KUMAR, 2016).

Os principais fungos entomopatogênicos ou fungos que causam doenças em insetos são: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium spp.*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea*, *Lecanicillium spp* e *Trichoderma harzianum*, porém existem mais de 700 espécies de fungos que são entomopatogênicos (CHAURASIA et al., 2016; GALINDO-VELASCO et al., 2015; LACEY et al., 2015; SCHMIDT et al., 2007).

Mesmo com toda essa extensa lista de bioinseticidas, poucos são os vírus e bactérias utilizados para o controle biológico, pois os vírus que são gerados em insetos demonstram, em sua maioria, pequeno ciclo de vida quando comparados aos fungos. Já entre as bactérias, a espécie mais utilizada atualmente é *Bacillus thuringiensis*, que possui alta virulência a diversos insetos. No entanto, fungos entomopatogênicos são os mais numerosos e mais diversos em virtude da quantidade de formulações com tais microrganismos e, ao contrário dos vírus e das bactérias que precisam ser ingeridos, os fungos podem parasitar de fora para dentro nos insetos, sendo mais rápidos e eficientes na maioria das vezes no combate das pragas. Diversos estudos comprovam a ação entomopatogênica de diversos fungos, em virtude disso, acredita-se que os fungos têm grande potencial o efetivo controle de pragas, pois quanto mais espécies, maior será o número de hospedeiros alcançados com o controle biológico (HUMBER, 2016; LEE et al., 2015).

Segundo Nishi e Sato (2017), os bioinseticidas representam cerca de 10% do mercado mundial de defensivos agrícolas. Na América Latina, 33% do mercado é ocupado pelo fungo *M. anisopliae*. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA, 2019), o uso de defensivos biológicos aumentou cerca de 70% em 2018, movimentando R\$ 464,5 milhões, ante R\$ 262,4 milhões em 2017 e há previsões de que o mercado de bioinseticidas no Brasil cresça entre 15-20% próximos anos Mascarin et al., (2018). Iwanicki et al., (2018) relatam que no Brasil já são mais de 3 milhões de hectares tratados com o fungo *M. anisopliae*. Segundo a consultoria *Dunham Trimmer - International Bio Intelligence* (DT, 2019), até 2025 o mercado de biocontrole deve movimentar cerca de 10 bilhões de dólares no mundo e 90% do mercado corresponderá a fungos que realizam o controle de pragas..

4.2. *Metarhizium anisopliae*

Em 1879, ocorreu o primeiro registro do fungo *M. anisopliae* por meio de estudos de Metschnikoff que na época o classificou como *Entomophthora anisopliae*. Quatro anos depois, em 1883, Sorokin reclassificou o fungo denominando como é conhecido atualmente, *Metarhiizum anisopliae* (DE ALVES et al., 1998). O gênero do fungo *Metarhizium* possui três espécies sendo: *M. anisopliae*, *M. flavoviride* e *M. álbum*. A espécie *M. anisopliae* pode ser subdividida em duas variedades: minor e majus, baseando-se no tamanho dos esporos. O fungo possui coloração variada, podendo ser de branca a esverdeada ou de marrom a castanho claro (ARRUDA, 2005; DRIVER; MILNER; TRUEMAN, 2000).

M. anisopliae é um fungo é classificado como acaricida e entomopatogênico e possuía anteriormente classificação como deuteromiceto, porém como a área biológica tem avançado nas pesquisas com DNA e RNA, foi possível descrever e reclassificar o fungo de forma correta. O fungo *M. anisopliae*, quando penetra a cutícula de seus hospedeiros, libera toxinas, causando a muscardine verde, uma manifestação patológica caracterizada pelo recobrimento completo do corpo do hospedeiro por esporos, levando-o à morte (DRIVER; MILNER; TRUEMAN, 2000; ALEGRE, 2005; BARATTO, 2005; HU; LEGER, 2002; STEINWENDER et al., 2014; WANG; ST. LEGER; WANG, 2016; ZHONG et al., 2016).

Para que o fungo cause a muscardine verde ou o fenômeno denominado entomopatogenicidade no hospedeiro, é necessário que ocorra diversos fatores mecânicos e bioquímicos correlacionados, dentre eles: a deposição do esporo do fungo na superfície do hospedeiro (cutícula), a germinação, a penetração, a colonização e o crescimento do fungo na parte externa do inseto (mumificação do inseto), seguida de esporulação (PEDRINI, 2017; SHIN; BAE; WOO, 2016; ST. LEGER; COOPER; CHARNLEY, 1991). Para a ruptura da cutícula do hospedeiro para posterior penetração das hifas, o fungo *M. anisopliae* secreta enzimas, como proteases, lipases e quitinases, as quais degradam os principais compostos presentes na superfície dos insetos (proteínas, quitina e lipídios) (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010).

Para cultivo do fungo *M. anisopliae*, a temperatura ótima está entre 25°C e 28°C (BARRETO et al., 2016; DORTA; ARCAS, 1998; POLAR et al., 2005). Keyser et al., (2014), Li; Feng, (2009) e Lanza; Monteiro; Malheiros, (2009), observaram que temperaturas tanto superiores quanto inferiores às temperaturas ótimas afetam diretamente a esporulação e o crescimento do fungo. Para que o fungo possua alta virulência, é necessário uma umidade relativa de 70% a 100% (HALLSWORTH; MAGAN, 1999).

4.3. Aplicações do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*

Várias pesquisas têm comprovado a eficiência do fungo *Metarhizium anisopliae* para controle de diversas pragas, no qual já inclui mais de 200 hospedeiros como: o carrapato de gado *Rhipicephalus microplus* e o carrapato *Boophilus microplus*, contra as mosca-dos-estábulos (*Stomoxys calcitrans*), para o controle do inseto *Alphitobius diaperinus*, uma das principais pragas da avicultura, contra piolhos de aves (*Mallophaga*), contra lavas do mosquito tigre asiático (*Aedes albopictus*), dentre outras pragas. Acredita-se que o fungo *M. anisopliae*, atualmente, seja o fungo mais proeminente para o controle biológico, em virtude da sua larga gama de hospedeiros e pela alta taxa de mortalidade, entre 80% e 100% (ALONSO-DÍAZ et al., 2007; ALVES et al., 2004; ARRUDA, 2005; BENELLI et al., 2018; GALINDO-VELASCO et al., 2015; PAULA et al., 2000; POLAR et al., 2005; WASSERMANN et al., 2016; WEBSTER et al., 2017).

Patel et al., (2015) realizaram um comparativo entre bioinseticidas e agentes químicos sintéticos, os quais foram aplicados para o controle de insetos que atacam a produção de berinjela do início do plantio até a colheita. Os autores relataram que alguns fungos, dentre eles *M. anisopliae*, forneceu um melhor custo benefício para o controle dessas pragas, demonstrando, que mesmo com os custos e dificuldades de aplicação, este fungo apresenta melhor custo benefício, quando comparado aos agentes sintéticos.

No Brasil, *M. anisopliae* é mais utilizado para controle da cigarrinha da folha e da raiz da cana-de-açúcar, *Mahanarva posticata* e *M. fimbriolata*, respectivamente. Tal aplicação tende a aumentar em virtude da proibição da queima da palha da cana-de-açúcar, estabelecido pelo decreto de lei 42.056 (06/08/1997), com previsão de proibição total em 2021, o qual irá favorecer o emprego e o desenvolvimento do controle biológico (ALMEIDA, J. E. M., BATISTA FILHO, 2001; LOUREIRO et al., 2012; OTTATI-DE-LIMA, 2007). Até 2015, o programa de controle biológico atingiu cerca de 3 milhões de hectares no Brasil, em virtude disso, o país é considerado o portador do maior programa de controle biológico do mundo (SANTOS et al., 2017).

4.3. Cultivo em estado sólido (CES)

O cultivo em estado sólido (CES) é denominado como o crescimento de microrganismos sobre uma matriz porosa insolúvel e com quantidade de água suficiente para satisfazer as necessidades do crescimento microbiano, sem exceder a capacidade de retenção de água do meio poroso (DEL BIANCHI et al., 2001; BEHERA; RAY, 2016; GERVAIS; MOLIN, 2003;

4. Revisão Bibliográfica

OZMIHCI, 2017; PEDRINI, 2017). A CES é um processo heterogêneo que consiste em três fases: sólida, líquida e gasosa, o qual oferece potencial para o cultivo de diversos microrganismos e desenvolvimento de bioprodutos de interesse (COSTA et al., 2018).

A escolha do substrato é muito importante na CES, pois determina indiretamente as concentrações dos metabólicos de interesse. O material sólido pode ser proveniente de culturas agrícolas ou serem resíduos agroindustriais (PANDEY, 2003). A maioria dos resíduos são ricos em açúcares e outras fontes facilmente degradáveis pela ação microbiana, o que favorece seu desenvolvimento, desta forma, se tornam adequados como matéria-prima para a geração de biocompostos (OZCIRAK ERGUN; OZTURK UREK, 2017). Dentre os rejeitos agroindustriais mais empregados como substrato na CES, estão: gramas verdes ou secas, bagaços de cana, de laranja ou de mandioca, farelos e palhas de trigo e de arroz, cascas de soja ou amendoim, sabugo e palha de milho e serragens (CASCIATORI et al., 2014).

Soccol (1992) relata que em CES a umidade inicial em substratos amiláceos deve estar entre 25% a 60%, e em celulósicos entre 60% a 80%. Em geral, grande parte dos substratos utilizados na CES possui forma granular. O tamanho das partículas e a porosidade do leito em um biorreator são fatores importantes em CES, visto que para desenvolvimento do microrganismo, é necessário acesso facilitado ao substrato e permeabilidade suficiente para as trocas gasosas. Quando se utilizam partículas pequenas, a área superficial aumenta, promovendo um aumento no crescimento microbiológico, porém com o crescimento microbiano, as hifas do microrganismo tendem a bloquear os poros, acarretando problemas na dissipação de calor e bloqueando a passagem de ar (PANDEY et al, 1999; DEL BIANCHI et al, 2001; FARINAS, 2015). Segundo Mitchell et al., (2000), na CES a atividade de água (a_w) varia entre 0,95 e 0,98, uma faixa adequada ao desenvolvimento de vários fungos, dentre eles, grande parte dos fungos filamentosos, como é o caso do fungo utilizado neste trabalho.

Vários autores realizaram a produção de enzimas utilizando a CES como: Aljammas; Al Fathi; Alkhalaf, (2017), que cultivaram o fungo *Rhizomucor miehei* EMCC 841 (NRRL 3420) em farelo de trigo com acréscimo de solução nutriente, afim de obter proteases; Rigo et al., (2010), que realizaram o cultivo de *Penicillium* P58 e P74 em farelo de soja com diferentes suplementos, para a síntese de lipases; Da Silva et al., (2018), que realizaram o cultivo do fungo *Trichoderma reesei* CCT-2768 em uma estrutura sólida composta na sua maior totalidade por palha da carnaúba, a fim de obter endoglucanase e xilanases, para posterior aplicação na produção de etanol de segunda geração; Zanelato et al., (2012) que realizaram o cultivo do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b por CES para produção de celulases e xilanases.

4. Revisão Bibliográfica

A CES também é a técnica utilizada para a produção de esporos de *M. anisopliae*, e diversas pesquisas que demonstram o uso de vários substratos para tal finalidade, tais como: Cunha et al., (2019) e Lopes (2016), utilizaram quirera de arroz e arroz tipo 1; Arzumanov; Jenkins; Roussos, (2005) misturaram arroz e bagaço de cana-de-açúcar (1:1); Van Breukelen et al., (2011) cultivaram em farelo de arroz, farelo de trigo, grãos de trigo e cânhamo enriquecido por solução nutriente.

Possivelmente, a composição do arroz tipo 1, apresentada por Walter; Marchezan; Avila, (2008), rica em amido e proteína, favorece o crescimento do fungo. No entanto, por ser o arroz um elemento básico da alimentação humana, faz-se necessária a busca de fontes alternativas para o cultivo de *M. anisopliae*. Lopes (2016) realizou testes de produção de esporos do fungo *M. anisopliae* com quirera de arroz e arroz tipo 1 e obteve produção de esporos em quirera estatisticamente igual à que obteve com arroz tipo 1.

Pesquisas com CES requerem estudos mais profundos em escala de frasco para a obtenção da condição ótima de cultivo, visando maximizar as concentrações dos metabólitos de interesse. Normalmente, as variáveis exploradas nestas etapas são composição do substrato, teor de umidade, pH, temperatura e duração do processo. Na etapa de biorreatores, ainda em pequena escala, as condições ótimas obtidas em frascos são adaptadas, buscando-se uma nova situação ideal. Finalmente, na escala piloto e industrial, buscam-se soluções de engenharia para superar as dificuldades adicionais devido ao aumento de escala, normalmente deficiências de aeração, elevação excessiva de temperatura e compactação de substrato (CASCIATORI et al., 2016).

4.4. Produção industrial de esporos.

Para obter eficiência na aplicação de *M. anisopliae* no campo, faz-se necessário a introdução inundativa, ou seja, é preciso uma concentração de 2×10^{13} /ha para uma letalidade de 88,4% das pragas (SCHMIDT et al., 2007), de modo que é necessário a produção do fungo em larga escala, visto que se faz necessário cerca de 5 - 10 kg de arroz cultivado com o fungo por hectare, dependendo da letalidade do fungo. No Brasil, já existem mais de 3 milhões de hectares tratados com o fungo e, como consequência, se faz necessário o uso de muito material para o controle das pragas, tendo como demanda uma produção industrial dos esporos de *M. anisopliae* em larga escala (DALZOTO; UHRY, 2009; IWANICKI et al., 2018; JARONSKI; JACKSON, 2012; MENDEZ-GONZALEZ; LOERA; FAVELATORRES, 2018; SCHMIDT et al., 2007; T.JARONSKI, 2014).

A produção industrial do fungo *M. anisopliae*, no Brasil, é semi-artesanal, ou seja, é um processo desprovido de tecnologia sofisticada e de controles efetivos, tornando-o propício a contaminações e sujeito a baixo rendimento. De um modo geral, o processo ocorre por CES, utilizando arroz tipo 1 como substrato. O cultivo ocorre em embalagens plásticas com capacidade de 400-500g de arroz tipo 1, que é inicialmente umidificado, passa pelo processo de esterilização térmica em autoclave e resfriamento natural para receber manualmente o inóculo (MASCARIN et al., 2018). A incubação ocorre por 15 dias em prateleiras dispostas em salas climatizadas a 28°C. Após a colonização, que ocorre entre o quarto e o quinto dia, as embalagens são abertas para uma maior aeração. Ao término dos 15 dias de cultivo, as embalagens são estocadas por até 7 dias em salas com dessecadores, para que os grãos sejam secos embalados em embalagens de maior capacidade ou que haja a remoção dos esporos do arroz através de agitação mecânica em peneiras ou agitadores, dois métodos que serão detalhados no tópico 4.6.

Existem empresas que comercializam os esporos em formulações secas ou líquidas (MFRUARAL, 2018). Outra opção também é a comercialização dos esporos agregados aos grãos do arroz tipo 1, porém, neste caso, o volume a ser comercializado é grande, gerando custos de transporte de armazenamento.

4.5. Biorreatores para produção de *M. anisopliae*

Os biorreatores para CES devem ter características, como: material resistente à corrosão, material não tóxico ao microrganismo, propiciar isolamento eficiente do ambiente externo, possuir eficiente aeração ao meio de cultivo e manter uniformidade do meio de cultivo no interior do biorreator (RAGHAVARAO; RANGANATHAN; KARANTH, 2003).

Mitchell et al., (2011) classifica os biorreatores para CES em quatro grupos, com base em sua forma de fornecimento de oxigênio ao microrganismo e a forma de agitação. Os biorreatores pertencentes ao primeiro grupo são os que possuem o leito estático ou agitado com pouca frequência durante o cultivo e que não recebem ventilação vigorosa. No segundo grupo fazem parte os biorreatores que recebem ventilação vigorosa, porém seu leito permanece estático ou com pouca movimentação. Os biorreatores do terceiro grupo são os biorreatores que consistem em ventilação não vigorosa com agitação contínua ou frequente durante todo o processo de cultivo. Fazem parte do quarto grupo os biorreatores que recebem forte ventilação e agitação frequente durante o cultivo.

4. Revisão Bibliográfica

A grande dificuldade encontrada na maioria dos biorreatores é a remoção do calor gerado, pois geralmente o substrato utilizado nos biorreatores é proveniente de matéria orgânica que possui baixa condutividade térmica efetiva, dificultando a dissipação do calor gerado durante o cultivo. Este problema é agravado nos biorreatores de bandeja e leito fixo, nos quais o meio de cultivo permanece estático durante o processo. Para que estratégias de agitação e reposição de água perdida por evaporação possam ser empregadas, é necessária uma outra classe de biorreator, a de tambores rotativos, que são expressivamente mais caros e de manutenção mais complexa do que os de leito fixo (CASCIATORI et al., 2016; GRAJALES et al., 2012).

Existem alguns poucos trabalhos sobre a produção de esporos de *M. anisopliae* em biorreatores de CES. Cunha et al. (2019) e Lopes (2016) realizaram o cultivo em biorreatores de bandeja, utilizando como substrato arroz tipo 1 e quirera de arroz, e obtiveram resultados próximos aos obtidos nas embalagens plásticas. Também concluíram que a quantidade final de esporos produzidos no biorreator de bandeja é maior em relação às embalagens plásticas, de modo a se poder reduzir o espaço físico para o cultivo. Os biorreatores de bandeja são simples, possuem leito estático e a aeração ocorre paralela à superfície do leito. Também é comum a base da bandeja ser perfurada para permitir uma melhor aeração do meio. Em geral, os problemas relacionados à elevação de temperatura neste tipo de biorreator tendem a ser mais severos do que no leito empacotado, uma vez que o ar entra apenas como um contorno convectivo na superfície do leito (ASHOK et al., 2017).

Roveda Junior (2008) realizou o cultivo do fungo *M. anisopliae* IBCB 425 em biorreatores de tambor rotativo utilizando como substrato arroz tipo 1, e obteve bons resultados quanto à concentração de esporos. Neste biorreator, é possível fazer um controle eficiente de temperatura e umidade do substrato pela aspersão periódica de água e agitação, porém o custo da construção e manutenção é alto e a capacidade máxima de enchimento deste biorreator não pode exceder 60%, com isso, o processo, muitas vezes, torna-se caro e inviável.

Breukelen et al. (2011) e Arzumanov et al. (2005) empregaram o leito empacotado ou coluna empacotada, com diferentes tipos de substratos, obtendo resultados distintos de produção de esporos, demonstrando a possibilidade do uso desta configuração de biorreator para esta finalidade. Breukelen et al. (2011) demonstra problemas com a ampliação de escala nesta configuração, pois obteve queda na produção de esporos do fungo em virtude das elevações das temperaturas axial e radial quando utilizou um biorreator de 200 mm de diâmetro interno e 600 mm de comprimento. Segundo Breukelen e colaboradores, uma possível causa para tal fenômeno teria sido a compactação e encolhimento do leito. Estudos

realizados por Arzumanov et al. (2005) **mostraram** que a umidade ideal do meio utilizado para o cultivo do fungo *M. anisopliae* deve ser de 58% no biorreator para que ocorra esporulação e elevados fluxos de ar podem afetar o desenvolvimento e a esporulação do fungo.

Geralmente, em CES, a configuração de biorreatores escolhida **é a que possui** leitos fixos, pois o microambiente se assemelha muito ao habitat dos microrganismos, porém como já relatado por diversos autores, os leitos estáticos de maiores proporções de escala são propensos **ao** acúmulo de calor, **à** compactação e **ao** encolhimento do meio. Como estratégias para diminuição destes problemas, **é** recomendado o uso de suporte inerte junto ao substrato para melhorar a estrutura do leito, tais como o bagaço de cana-de-açúcar (ARORA et al., 2017).

4.6. Extração de esporos

O processo de extração de esporos de *M. anisopliae* ainda é precário e existem poucos estudos que apresentam as alternativas. Segundo Mascarin; Quintela, (2013) e Jenkins et al., (1998), após o cultivo do fungo, os grãos de arroz com esporos são dispostos em bandejas plásticas ou de alumínio, que são colocadas em estufa elétrica à temperatura controlada de 28°C até atingirem peso constante, o que pode levar até três dias. Os autores relatam duas estratégias para extrair os esporos dos grãos: dispondo-os em peneiras vibratórias e utilizam-se tubos de PVC quando em menor escala, o qual é despejado o conteúdo das embalagens plásticas e na extremidade coloca-se tecido de “voile” para reter os esporos. Após a coleta dos esporos, estes são secos em um dessecador à 26°C, até a umidade de 2 – 3%. Em seguida, os esporos são dispostos em embalagens e congelados à – 10°C. Com este processo, os esporos podem ter uma vida útil de até 1 ano.

Segundo Alves; Faria, (2010), após o cultivo do fungo, as embalagens plásticas devem ser abertas para secagem em salas com baixa umidade por um período de 2 dias, após o que os grãos são transferidos para um liquidificador industrial e submetidos à agitação com água. Após a mistura, a suspensão passa por um filtro de papel com o auxílio de uma bomba a vácuo. Os filtros são dispostos em prateleiras em salas climatizadas a 26°C com umidade controlada a 10%, onde permanecem por 7 dias, sendo posteriormente moídos e embalados. Os autores recomendam manter as embalagens à temperatura de 2 – 4°C por até 9 meses.

Jenkins et al., (1998) relatam a utilização de um equipamento capaz de realizar a extração dos esporos, porém o equipamento foi uma adaptação de uma secadora de roupas doméstica, tornando-a um tambor rotativo, o qual recebia o material cultivado em embalagens

4. Revisão Bibliográfica

plásticas, seguido de agitação ou rotação, com o propósito de causar a separação dos esporos. Para a retirada dos esporos do tambor, foi inserido ar seco dentro deste, que carregava os esporos até ciclones que eram responsável por coletar os esporos.

Toegel et al., (2010) relatam a possibilidade de secagem de esporos de *M. anisopliae* por liofilização, junto a agentes excipientes. No entanto, os autores relatam que obtiveram resultados relativamente baixos de viabilidade. Destaque-se os altos custos associados à liofilização que podem tornar a técnica inviável.

A secagem por *spray drying* pode ser uma ferramenta interessante para o processamento dos esporos do fungo *M. anisopliae* junto a agentes carreadores, pois ao final do processo, existiriam esporos com baixa atividade de água, o que resultaria em tempo de vida de prateleira maior. Porém, problemas nas condições da operação de secagem podem resultar em baixa viabilidade dos esporos. Horaczek; Viernstein, (2004) utilizaram *spray-dryer*, liofilizador e leite fluidizado para secar soluções com esporos dos fungos *M. anisopliae* e *B. brongniartii*. Os autores empregaram uma calda composta por leite desnatado e polivinilpirrolidona (PVP K90) para a extração dos esporos, uma vez que ambos agentes tinham capacidade de proteger os esporos após a secagem. A liofilização resultou em esporos com maior viabilidade e os ensaios por *spray-drying* mostraram forte influência da temperatura de secagem sobre a viabilidade. Infelizmente, os autores pouco exploraram as variáveis de secagem em todos os aparatos testados.

5. CULTIVO DO FUNGO *M.anisopliae* EM SUBPRODUTOS DO ARROZ TIPO 1

5.1.Introdução

A produção industrial de esporos do fungo *M. anisopliae*, atualmente, é extremamente precária, sem a presença de automatização e controles sofisticados. Todo o processo necessita de muita mão de obra e ainda é exposto a diversas contaminações extrínsecas. O substrato utilizado para o cultivo do fungo também é um grave problema para a maioria das biofábricas, pois utilizam arroz tipo 1 como substrato. Segundo a Bolsa Brasileira de Mercadorias (BBMNET, 2019), o valor da saca de 50 kg de arroz tipo 1 é cerca de R\$ 94,00, ou seja, o kilo de arroz beneficiado é de R\$ 1,88. Segundo Schmidt et al., (2007), para que ocorra uma letalidade eficiente das pragas, seria necessário a concentração de 2×10^{13} por hectare, ou seja, sendo necessários cerca de 8 kg de substrato para obter a concentração relatada por Schmidt e pelos colaboradores, demonstrando que para produção de esporos do fungo, é necessário muito substrato, que poderia ser destinado à alimentação humana.

No Brasil, cerca de 3 milhões de hectares são tratados com o fungo *M. anisopliae*, ou seja, demanda-se aproximadamente cerca 24 mil toneladas de arroz tipo 1 para obter a concentração de esporos necessários para atender a demanda brasileira, isso sem contar outros microrganismos que também utilizam o arroz tipo 1 como substrato (CUNHA et al. 2019).

Muitas pesquisas visam a obtenção de um substrato que substitua o arroz tipo 1 por um resíduo agroindustrial ou até mesmo a otimização deste, a fim de diminuir os custos relacionados ao substrato. Como busca de uma alternativa para substituição do substrato, já foram testados grãos de feijão, sorgo e trigo (inteiros e quebrados), cevada, bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo, arroz, milho, soro do leite, casca de camarão, além de farinha de milho e casca de arroz, mas o arroz tipo 1 ainda é o substrato mais adequado. Van Breukelen et al., (2011) realizaram o cultivo do fungo em farelo de arroz, farelo de trigo, grãos de trigo e cânhamo suplementado com meio, contendo glicose, extrato de levedura e peptona bacteriológica em proporções de massa de 8: 1: 1., e os melhores resultados foram obtidos utilizando o cânhamo. Os autores relatam que nos leitos formados por farelo de arroz e farelo de trigo ocorre a compactação do leito formando canais de aeração, e em leitos formados por cânhamo, material fibroso esse fenômeno não ocorre, além da alta capacidade de retenção de água das fibras de cânhamo, que pode favorecer o arrefecimento do leito. Porém, como essa vegetação em diversos países ainda é proibida, o seu uso por biofábricas para produção de esporos do fungo *M. anisopliae* é complexo. Como alternativa, no Brasil, o cultivo e o uso de

cana-de-açúcar são altos para a geração de etanol, como consequência, há cerca de 1/3 de resíduos de toda a cana processada, que é descartado ou queimado para a geração de energia nas caldeiras (CASCIATORI; THOMÉO, 2018).

Diante do exposto acima, esta seção tem como objetivo encontrar um substrato substituto para o arroz tipo 1. Assim, será realizado o cultivo do fungo *M. anisopliae* em substratos derivados do arroz tipo 1 como: quirera e farelo de arroz, em mistura com bagaço de cana-de-açúcar em diversas proporções, além de utilizar mistura de arroz tipo 1 e bagaço.

5.2. Materiais e métodos

5.2.1. Microrganismo

Foi utilizada a linhagem do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* IBCB 425, fornecida pelo Instituto Biológico de São Paulo. No início dos experimentos, realizou-se a estocagem do fungo, em tubos de ensaios com meio de batata-dextrose-ágar (BDA) (Acumedia, EUA). Com o fungo já desenvolvido, adicionou-se óleo mineral, para que se formasse uma camada protetora da colônia. Os tubos de ensaio foram mantidos em câmeras frias, com temperaturas controladas à 4°C e utilizados nas repicagens para todos os ensaios realizados no presente trabalho. Para a inoculação do substrato, utilizou-se repicagem em frascos de Erlenmeyer inclinados, contendo 50 mL de meio de cultivo BDA, com auxílio de alça de platina. Os frascos foram armazenados em câmara DBO (TE – 371, Tecnal, Brasil) a 28 °C por 15 dias.

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

5.2.2. Cultivo em embalagens de polipropileno

Os ensaios de cultivo do fungo foram realizados em embalagens plásticas, contendo 10g de substrato. Utilizou-se embalagens plásticas com dimensões de 10x20cm e os substratos utilizados são descritos na Tabela 5.1. Em todas as embalagens, foram acoplados bocais de PVC, nos quais foram adicionados tampões de algodão envoltos por gaze, para garantir as trocas de gases e assegurar que não haja contaminação. Para facilitar a aeração e

garantir que não ocorra a aglomeração do substrato, adicionou-se, no interior das embalagens, arames em forma espiral.

Tabela 5. 1 Composição dos substratos

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

*amostra controle

Fonte: (Próprio autor)

5.2.3. Condição de cultivo

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

5.2.4. Extração de esporos

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

5.3. Resultados e discussão

Na Tabela 5.2, são dispostos os resultados da concentração de esporos (C_e) ao fim do cultivo do fungo em arroz tipo 1, quirera e farelo e em mistura destes substratos com bagaço de cana-de-açúcar. Nestes testes, foi fixada a quantidade de 10g de substrato, variando a proporção entre os substratos utilizados como descreve a Tabela 5.1 e também como pode ser visto nas Figuras 5.1a e 5.1b, as quais apresentam as curvas de regressão linear da (C_e) nas diferentes proporções de bagaço com altos coeficientes de regressão (R^2), ou seja, a estrutura afeta pouco a esporulação do fungo, porém a quantidade de arroz e quirera no meio afeta diretamente a quantidade de esporos produzido. Nos testes com farelo de arroz, é possível observar que com o aumento da concentração de bagaço na mistura, consequentemente, há aumento na C_e .

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

No arroz, o desenvolvimento do fungo já é bem conhecido e descrito por Agale; Gopalakrishnan; Ambhure, (2018); Méndez-González et al., (2018a); Freitas et al., (2014); Ottati-De-Lima et al., (2010); Soundarapandian; Chandra, (2007) Soundarapandian; Chandra, (2007). Santos et al., (2017), demonstra em seu trabalho que o uso de material inerte como bagaço de cana-de-açúcar e esponja vegetal junto ao arroz tipo 1 favorece a esporulação do fungo, em que se obteve resultados com concentração de 10^9 esporos/gss de arroz. Arzumanov; Jenkins; Roussos, (2005) realizaram o cultivo do fungo *M. anisopliae* em dois substratos: arroz e mistura de 50% (p / p) de arroz moído / bagaço de cana-de-açúcar, e foi obtido C_e em 10^9 esporos/gss de arroz. Van breukelen et al., (2011) demonstram em seu trabalho que a utilização de cânhamo (Hemparade, HempFlax bv, Holanda) como material inerte impregnado com nutrientes, contendo glicose, extrato de levedura e peptona bacteriológica em proporções maciças de 8: 1: 1, o que favoreceu a esporulação do fungo

5. Cultivo do fungo *M. anisopliae* em substratos derivados do arroz tipo 1

quando comparado aos outros substratos que foram utilizados para cultivo do fungo como: grão de trigo, farelo de trigo e farelo de arroz. Com os dados da Tabela 5.2, também foi possível observar que pequenas proporções de bagaço de cana-de-açúcar não demonstraram diminuição drástica na produção de esporos, ou seja, para um aumento de escala expressivo, a utilização da proporção 9:1 seria interessante.

Tabela 5. 2 Resultados das concentrações de esporos ao fim do cultivo do fungo *M. anisopliae* IBCB 425 em embalagens plásticas com diversos tipos de substrato.

Teste	Proporção (g)	Substrato	Ce (10 ⁹ esporos/gss)	DP
1	10	Arroz tipo 1	4,01 _A	0,07
2	10	Quirera de arroz	3,80 _{AB}	0,14
3	10	Farelo de arroz	1,85 _{DE}	0,15
4	1:9	Bagaço e arroz tipo 1	3,29 _B	0,02
5	2:8	Bagaço e arroz tipo 1	2,35 _{CD}	0,14
6	3:7	Bagaço e arroz tipo 1	1,89 _{CDE}	0,59
7	4:6	Bagaço e arroz tipo 1	0,80 _G	0,22
8	5:5	Bagaço e arroz tipo 1	0,585 _G	0,38
9	1:9	Bagaço e quirera de arroz	4,42 _A	0,50
10	2:8	Bagaço e quirera de arroz	4,18 _A	0,28
11	3:7	Bagaço e quirera de arroz	2,48 _C	0,22
12	4:6	Bagaço e quirera de arroz	1,63 _E	0,08
13	5:5	Bagaço e quirera de arroz	1,48 _{EF}	0,22
14	9:1	Bagaço e farelo de arroz	0,84 _G	0,56
15	8:2	Bagaço e farelo de arroz	0,84 _G	0,21
16	7:3	Bagaço e farelo de arroz	0,86 _{FG}	0,41
17	6:4	Bagaço e farelo de arroz	1,48 _{EF}	0,33
18	5:5	Bagaço e farelo de arroz	1,98 _C	0,09

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

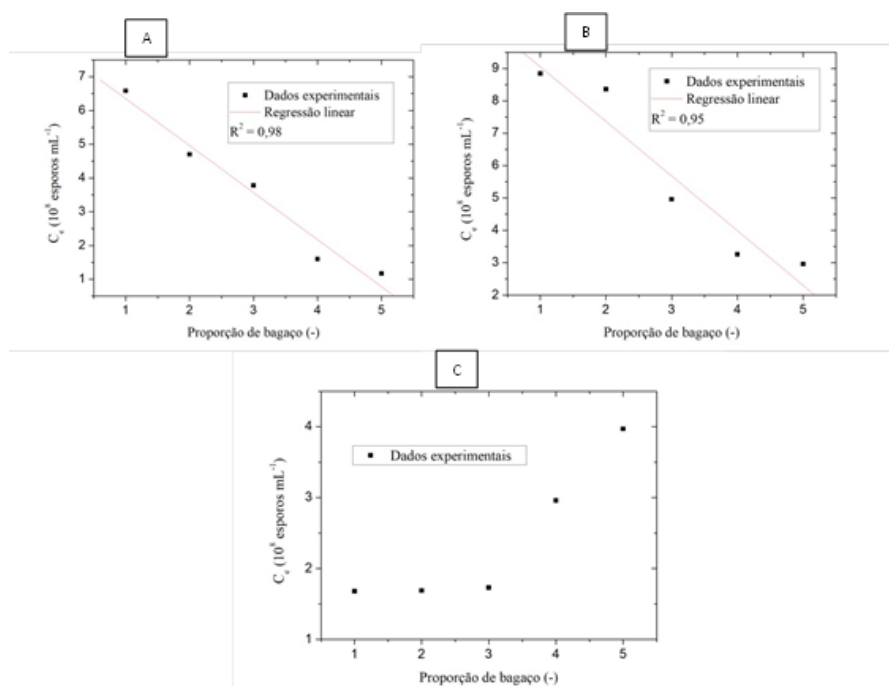
Fonte: (Próprio autor)

Na Tabela 5.2, também é possível observar que quando foram utilizadas misturas de farelo de arroz e bagaço, houve aumento da Ce com o aumento da concentração de bagaço, como mostra a Figura 5.1c. Essa elevação provavelmente ocorreu em virtude do aumento da

5. Cultivo do fungo *M. anisopliae* em substratos derivados do arroz tipo 1

porosidade do leito, pois quando foi realizado o cultivo apenas com farelo, houve a formação de grandes aglomerados, diminuindo a área disponível para o crescimento do fungo. Assim, quando o bagaço foi adicionado junto ao farelo, a estrutura do leito foi melhorada e ocorreu menor ou quase nenhuma aglomeração do meio de cultivo, aumentando a área superficial e melhorando a aeração do sistema. Com os dados da Tabela 5.2 foi possível observar os testes de cultivo com quirera de arroz, onde o fungo se desenvolveu bem, porém foi nítida a formação de diversos aglomerados, resultando em crescimento e esporulação heterogêneos. Deste modo, quando foi adicionada pequena quantidade de bagaço à quirera, a C_e aumentou, como demonstra os dados disponíveis na Tabela 5.2. Visivelmente, nos testes em que houve a adição de pouco bagaço junto à quirera, não se observou aglomerados de quirera de arroz durante todo o período de cultivo, favorecendo a esporulação e, assim, reduzindo os custos de produção de esporos do fungo *M. anisopliae* IBCB 425.

Figura 5. 1 Curvas de regressão linear da concentração de esporos (C_e) nas diferentes proporções de bagaço. a) bagaço com arroz; b) bagaço com quirera; c) bagaço com farelo.



Fonte: (Próprio autor)

Existem diversas pesquisas que buscam encontrar um substituto para o arroz tipo 1, porém ainda não foi encontrado algum substrato que seja completo como o arroz tipo 1 que é considerado ideal para o cultivo do fungo, pois possui grande área superficial quando comparado a alguns substratos e sua estrutura física pouco se altera ao longo do cultivo (DORTA; ARCAS, 1998). Kruger et al., (2014) e (BARRA-BUCAREI; VERGARA;

CORTES, (2016) cultivaram o fungo em arroz parboilizado e obtiveram maiores concentrações de esporos quando comparado às concentrações obtidas em arroz tipo 1; porém, como o valor de arroz parboilizado é maior, revela-se necessário uma avaliação econômica criteriosa para estabelecer a viabilidade de utilizar parboilizado ao invés do tipo 1.

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

5.4. Conclusão

Nesta seção, foi possível concluir que dentre os testes realizados em embalagens plásticas com diferentes substratos e proporções, os melhores resultados foram com arroz e quirera, porém para as próximas etapas do trabalho a quirera não foi utilizada. No próximo tópico deste trabalho será discutido sobre o reuso do substrato e uma das etapas que compõe essa técnica é a retirada dos esporos dos substratos que, por sua vez, geram atritos entre os grãos, fazendo com que, fiquem bem quebrados e frágeis. Considerando que a quirera é um subproduto do arroz tipo 1 quebrado, sua utilização para reuso seria complexo e a formação de aglomerados seria inevitável, dessa forma não se deu continuidade nos testes com quirera de arroz. Também se conclui que o uso de bagaço em pequenas proporções junto ao arroz é essencial para a esporulação do fungo, assim como também irá poder auxiliar nos testes de aumento de escala que serão discutidos nos próximos tópicos deste trabalho, além de evitar a formação de aglomerados de substratos e a compactação do leito.

6. PRODUÇÃO DE ESPOROS DO FUNGO METARHIZIUM ANISOPLIAE UTILIZANDO COMO SUBSTRATO O ARROZ EM CULTIVOS CONSECUTIVOS

6.1.Introdução

Nos últimos anos, o uso de produtos microbiológicos está aumentando em todo o mundo, em substituição aos agrotóxicos. Na América Latina, os fungos mais utilizados para controle biológico é o *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, respondendo por mais de 60% deste uso (NISHI; SATO, 2017). *M. anisopliae* combate mais de 200 espécies de insectos e ácaros e a sua aplicação no campo deve ser inundativa, exigindo grandes concentrações ($\sim 10^{13}$ esporos/ha), a fim de atingir elevados índices de letalidade, cerca de 85 - 90% (ALONSO-DÍAZ et al., 2007; GALINDO-VELASCO et al., 2015; LOUREIRO et al., 2012; PAULA et al., 2000; POLAR et al., 2005; SCHMIDT et al., 2007).

M. anisopliae é um hifomiceto com micélio hialino e hifas septadas, que podem ser simples de ramificado (DRIVER; MILNER; TRUEMAN, 2000; HU; LEGER, 2002; STEINWENDER et al., 2014; WANG; ST. LEGER; WANG, 2016; ZHONG et al., 2016). Várias enzimas estão envolvidas no fenômeno de entomopatogenicidade fúngica, tais como lipases, proteases e quitinases (DRIVER; MILNER; TRUEMAN, 2000; PEDRINI, 2017; WANG; ST. LEGER; WANG, 2016; ZHONG et al., 2016). No entanto, pouco é conhecido sobre as enzimas que degradam as fontes de carbono e nitrogênio dos substratos durante o período de cultivo do fungo *M. anisopliae*.

O substrato mais comum utilizado para a produção de *M. anisopliae* nas biofábricas é arroz tipo 1, uma vez que proporciona fontes bem equilibradas de nutrientes, tem grande área superficial e mantém a sua estrutura física ao longo do cultivo. No entanto, o custo deste substrato é elevado, além de ser um elemento fundamental para a nutrição humana; portanto, o conhecimento das causas da boa adaptação deste fungo para este substrato seria para melhorar o uso do próprio arroz e à busca de substratos mais baratos. Alguns estudos têm explorado os requisitos nutricionais de *M. anisopliae*, mostrando que as altas concentrações de fontes de carbono e de nitrogênio influenciam de maneira positiva o crescimento vegetativo do fungo, enquanto que as fontes deficientes favorecem o desenvolvimento sexual e consequente produção de esporos (IBRAHIM; BUTT; JENKINSON, 2002; RANGEL et al., 2004; RANGEL; ALSTON; ROBERTS, 2008; SHAH; BUTT, 2005). Muitos

trabalhos têm sido publicados sobre substratos alternativos para o arroz, tais como grãos de feijão, sorgo e trigo (inteiros e quebrados), assim como a farinha de milho e casca de arroz, mas o arroz, ainda é o substrato mais adequado (BHANU PRAKASH; PADMAJA; SIVA KIRAN, 2008; DORTA; ARCAS, 1998; KARANJA et al., 2004; KRUGER et al., 2014; RANGEL et al., 2004). Uma opção simples para reduzir os custos relacionados com o substrato seria o uso de arroz em cultivos consecutivos. No entanto, os poucos trabalhos disponíveis na literatura, realizaram cultivos com o fungo em arroz apenas duas vezes e eles não exploraram os mecanismos pelos quais o microrganismo assimila os nutrientes (BARRA-BUCAREI; VERGARA; CORTES, 2016; KRUGER et al., 2014).

. Este trabalho teve como objetivo, realizar o cultivo do fungo *M. anisopliae* em arroz tipo 1 em três cultivos sucessivos para obter informações sobre a cinética das mais importantes enzimas segregadas pelo fungo, a fim de degradar o substrato em cada cultivo. Uma análise detalhada de microscopia óptica foi realizada a fim de verificar a estratégia de ocupação das hifas fúngicas no substrato. Os resultados aqui apresentados serão de ajuda aos produtores industriais a reduzir significativamente os custos de produção de esporos de *M. anisopliae* e pesquisadores para encontrar substratos alternativos para substituir o arroz como substrato.

6.2. Materiais e métodos

6.2.1. Materiais

M. anisopliae IBCB 425 foi gentilmente cedido pelo Instituto Biológico de São Paulo (Brasil). A cultura da reserva foi mantida a 5°C em tubos de ensaio em batata-dextrose-agar de meio (PDA) coberto por uma fina camada de óleo mineral. Para produzir o inóculo, o fungo foi cultivado a 25°C durante 15 dias com PDA colocados em frascos de Erlenmeyer. Os esporos foram colhidos adicionando solução aquosa de Tween 80 (0,1%, v/v) no balão e raspando a superfície do ágar para desprendimento dos esporos. A concentração de esporos foi fixada em 10^7 esporos por grama de sólidos secos (GDS) em todos os testes.

6.2.2. Cultivo do fungo

O cultivo ocorreu em embalagens plásticas de polipropileno ao qual foram adaptadas com tubos de PVC (5,08 cm de diâmetros) na parte superior para permitir uma aeração segura. Fios espiral foram colocados no interior das embalagens para evitar o colapso da parede e tampões de algodão foram inseridos no interior dos tubos, a fim de permitir trocas gasosas para evitar a contaminação exógena. Se adicionou água ao substrato após a pesagem, e posteriormente as embalagens com o substratos foram submetidas por tratamento em autoclave a 121°C durante 35 min. Após o resfriamento do material, se adicionou a suspensão de esporos nas embalagens plásticas dentro do fluxo laminar para evitar contaminações exógenas, seguido pela manipulação vigorosa para homogeneização. O teor de humidade final do substrato em todos os testes foi de 48% (B.U).

Depois de 10 dias de cultivo, uma solução aquosa de Tween 80 (0,1% v/v) foi adicionada nas embalagens (5 ml de solução/gds), seguido de intensa agitação durante 50 minutos num banho de vai e vêm em 120 ciclos por minuto. A concentração de esporos foi determinada usando um microscópio óptico (40x) e uma câmara de Neubauer.

As amostras foram preparadas em diferentes pacotes de plástico e foram analisados em intervalos de tempo definidas para cada cultivo e análise. A maior parte das experiências foram realizadas com 10 g de substrato (de matéria seca), salvo quando indicado de outra forma.

6.2.3. Substrato

Como substrato se utilizou arroz tipo 1, adquirido em mercados locais. Três cultivos consecutivos foram realizados com a mesma amostra de arroz. O primeiro cultivo (R1) foi realizada como descrito na secção 2.2. Após a extração dos esporos, os grãos foram drenados e colocados em bandejas de metal (camadas de 2 cm de espessura) e a secagem foi realizada em forno de convecção durante 24 h a 50°C. Após o arrefecimento até à temperatura ambiente, os próximos dois cultivos consecutivos (R2 e R3) foram realizados como descrito anteriormente.

Algumas experiências foram realizadas adicionando o bagaço de cana de açúcar (BCA) junto ao arroz tipo 1 (proporção em peso 1:9, BCA/arroz) a fim de evitar aglomeração.

6.2.4. Determinações analíticas

6.2.4.1. Concentração de amido

Uma vez que o amido é a principal fonte de carbono para a nutrição de diversos fungos, usando o kit amido total Assay Kit (AA / AMG) (Megazyme International Ltd., Bray, Irlanda). Para o R1 as amostras foram retiradas em cada 24 horas, enquanto que para R2 e R3 em 0, 48, 120 e 240 h. Após a extração de esporos durante 50 minutos, as amostras foram drenadas e secas por congelação Modulyo (Thermo Fisher Scientific, Alemanha) durante 12 horas, moído em pó e peneirado (abertura de 0,5 milímetros). Deste pó peneirado, 100 mg de amostra foram alocadas em tubos de vidro, seguido de adição de 0,2 mL de etanol (80% v/v) e vigorosamente agitados num agitador de vórtice durante 1 min.

6.2.5. Ensaios enzimáticos

As atividades de amilase total, α -amilase e protease foram determinadas ao longo dos cultivos em intervalos de 24 h, a fim de compreender como o microrganismo degrada o substrato. As enzimas foram extraídos usando um 0,1 mol L⁻¹ de solução tampão de acetato de sódio a pH 5,0 e 4°C, com agitação vigorosa num banho de água de vai e vêm (120 ciclos min⁻¹) durante 4 h. A suspensão restante foi filtrada utilizando um pano para conter micélios e outras matérias em partículas. A suspensão filtrada foi centrifugada a 14900g a 5°C durante 30 min em uma centrifuga CR22N (Hitachi-Koki, Tóquio, Japão) e o sobrenadante foi filtrado em papel Whatman #1 e o filtrado foi analisado para a atividade da enzima. Todos os ensaios para a determinação da atividade da enzima eram espectrofotométrica.

O método descrito por Noda et al (2001) foi utilizado para a amilase total, que utiliza amido solúvel como substrato para quantificar açúcares redutores liberados pela atividade da enzima de acordo com o método de Miller (1959). Uma unidade de atividade da enzima foi descrita como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 mg de amido por minuto da reação.

α - amilase foi determinada utilizando o método descrito Cruz et al. (1997) que determina a diminuição da capacidade de ligação entre amido e iodo. Se utilizou como substrato amido solúvel e uma solução de iodo durante o ensaio. Uma unidade de atividade da enzima foi descrita como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 mg de amido por minuto da reação.

A atividade proteolítica foi determinada pelo método descrito por Alencar et al. (2003). O substrato utilizado foi azocaseína e uma unidade de atividade da enzima foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar o substrato, a fim de produzir um aumento na leitura da absorvância de 0,001 por minuto da reação.

6.2.6. Açúcares redutores

O método de Miller foi utilizado para a determinação da concentração de açúcares redutores a partir de amostras recolhidas a cada 24 h durante os cultivos (R1, R2 e R3). Uma vez que a preparação do substrato para o R2 e R3 se fez necessário o uso da secagem dos grãos, as amostras foram retiradas a 0, 2, 4, 6, 12, 18 e 24 h para a análise de açúcares redutores durante o período de secagem.

6.2.7. Microscopia óptica

Esta análise foi realizada com os grãos individuais de arroz tomadas a partir de amostras cultivadas a intervalos regulares durante os cultivos de R1, R2 e R3. A fim de fixar o micélio para os grãos, eles foram imersos numa solução de paraformaldeído (4%, w/w), tamponada por fosfato (0,1 mol L⁻¹) a pH 7,2 durante 4 h. Após a fixação, os grãos foram enxaguados com água da torneira, desidratados em etanol e imerso em parafina (Histosec, Merck, Darmstadt, Alemanha). Os grãos foram cortados e se utilizou para tingir as fatias hematoxilina-eosina. As amostras foram analisadas num microscópio óptico Olympus BX60 (Olympus, Tockio, Japão) com ampliação de 50x e 100x para a maioria das amostras e 200x para algumas amostras cultivadas em 120 h.

6.2.8. Análise estatística

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

6.3. Resultados e discussão

Neste trabalho, o arroz foi utilizado como substrato para avaliar a esporulação de *M. anisopliae* IBCB 425 em três cultivos consecutivos. A estratégia do microrganismo de consumo do substrato foi avaliada por meio da concentração de açúcares redutores, concentração de amido e atividade das enzimas, durante os períodos de cultivo do microrganismo (R1, R2 e R3).

6.3.1. Cultivos consecutivos

A Tabela 6.1 apresenta a concentração de esporos (C_e) para amostras de 10 g (controle) e 400 g (carga típica utilizada em biofábricas). Uma análise geral revela que é possível reutilizar o arroz para cultivar o fungo, embora ocorra diminuição na concentração de esporos, comparando do primeiro (R1) para o terceiro (R3) cultivo. No entanto, a concentração de esporos foi sempre da mesma ordem de grandeza para cada cultivo (10^8 esporos mL⁻¹). Observou-se a formação de aglomerados para R1 em cargas de 500 g, que ocasionou um desvio padrão (DP) maior quando comparada com a carga de 10 g. O efeito do tamanho da amostra não foi semelhante para R2 e R3, uma vez que a diminuição da C_e foi observada para o R2 que não foi observado para R3. A aglomeração também foi observada para R2 e R3 para ambas as cargas, o que também levou a um maior DP. Deve-se salientar que o teste de Levene's indicou homoscedástica entre as variâncias. Cunha et al., (2019) cultivaram *M. anisopliae* em arroz em embalagens plásticas de 500 g e também observaram agregação do substrato, de forma semelhante ao Van Breukelen et al. (2011), que cultivou o fungo em muitos substratos em um biorreator de leito fixo.

Tabela 6. 1 - Concentração de esporos (C_e) após cultivo do fungo *M. anisopliae* em arroz tipo 1 (R1, R2 e R3) em embalagens plásticas

Carga (g)	$C_e \times 10^8$ (esporos mL ⁻¹)		
	R1	R2	R3
10	8,05 ^{Aa} ± 0,07	7,75 ^{Aa} ± 0,42	4,47 ^{Ac} ± 0,54
400	7,44 ^{Aa} ± 0,20	5,58 ^{Bb} ± 0,27	4,97 ^{Ac} ± 0,33

(*) Nota: As médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na mesma coluna e por letras minúsculas na mesma linha não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ao nível de confiança de 95%.

Fonte: (Próprio autor)

A fim de minimizar a aglomeração, o bagaço de cana de açúcar foi utilizado como material inerte (proporção de peso de 9:1 arroz/BCA) e os resultados foram promissores, como pode ser visto na Tabela 6.2, onde se pode perceber que, para R2 e R3 a concentração de esporos para o meio estruturado com BCA foi sempre significativamente maior do que para testes que continham apenas arroz tipo 1. Visualmente, não foi observado qualquer aglomeração para as experiências com BCA. Sene et al., (2010) cultivada *M. anisopliae* em arroz tipo 1 (meio padrão), arroz vermelho, arroz tipo 1 suplementado com melaço de cana de açúcar, resíduos de cervejaria e arroz tipo 1 misturados com resíduos da fábrica de cerveja (1:1), entre outros. A maior concentração de esporos foi obtida com a mistura de arroz/resíduo de cervejaria, uma vez que os autores afirmaram que o resíduo forneceu boa estrutura física para o meio.

Tabela 6. 2 - Concentração de esporos (Ce) após cultivo em arroz tipo 1 e em uma mistura de arroz tipo 1 e bagaço de cana-de-açúcar (BCA) para os três cultivos consecutivos em embalagens de plástico de 400 g

	$C_e \times 10^8$ (esporos mL ⁻¹)		
	R1	R2	R3
Arroz	7,44 ^{Aa} ± 0,20	5,58 ^{Bb} ± 0,27	4,97 ^{Bb} ± 0,33
Arroz + BCA	7,56 ^{Aa} ± 0,19	7,00 ^{Aa} ± 0,25	6,11 ^{Ab} ± 0,40

(*) Nota: As médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na mesma coluna e por letras minúsculas na mesma linha não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ao nível de confiança de 95%.

Fonte: (Próprio autor)

Barra-Bucarei; Vergara; Cortes, (2016) utilizaram arroz parboilizado para cultivar *M. anisopliae* em dois cultivos consecutivos. O arroz foi suplementado com melaços de beterraba com duas concentrações (5 e 10%, m/m), e o cultivo foi realizado em duas temperaturas (22 e 25°C) e dois períodos de tempo (14 e 20 dias). Os resultados mostraram que a segunda cultura resultou em concentrações mais elevadas de esporos e que, a concentração do melaço não foi estatisticamente significativa. Kruger et al., (2014) realizaram o cultivo do fungo *M. anisopliae* em arroz parboilizado, quirera de arroz, arroz integral e o arroz branco inteiro, entre outros meios, em dois cultivos consecutivos e mostrou que a concentração de esporos foi semelhante para ambos os cultivos consecutivos quando foi utilizado arroz branco inteiro, enquanto que, para os

outros substratos, se observou decréscimos acentuados a partir do primeiro para o segundo cultivo.

Em termos de redução de custos e resíduos sólidos, a reutilização do arroz pode desempenhar um papel importante na produção em massa de esporos do fungo *M. anisopliae*. Em uma biofábrica típica brasileira para a produção de esporos de *M. anisopliae*, o arroz é o terceiro maior custo, seguido das despesas de capital e mão de obra. Portanto, qualquer tentativa de reduzir os custos relacionados com o substrato na redução do preço final dos esporos será relevante para obtenção de ganhos maiores. Deve se ressaltar que, depois de R1, há uma redução de 30% na massa de sólidos (base seca), enquanto que, após R2 e R3 as reduções são de 25% e 17%, respectivamente. Assim, não só uma redução de custos deve ser considerada quando se realiza o reuso do arroz, mas também a redução de resíduos liberados no meio ambiente. Tendo em conta os resultados apresentados na Tabela 6.2, cada grama de arroz seco é capaz de produzir $4.2 \cdot 10^9$, $3.88 \cdot 10^9$ e $3.39 \cdot 10^9$ esporos, para R1, R2 e R3, respectivamente, considerando-se o cultivo com o bagaço de cana. Portanto, para uma biofábrica típica deste processo, se utiliza cerca de 1 tonelada de arroz por mês, a primeira utilização iria resultar em $4,2 \cdot 10^{15}$ esporos e 700 kg de sólidos restantes. Após o segundo uso, $2,71 \cdot 10^{15}$ esporos seria produzido e 545 kg de sólidos, que, após a terceira cultura iria resultar em $1,77 \cdot 10^{15}$ esporos e 452 kg de resíduos. De acordo com as autoridades brasileiras como a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2019) cada 50 kg de arroz tipo 1 tem um custo de US\$ 22,99 à saca; Portanto, se o arroz foi usado apenas uma vez seriam produzidos, $4,2 \cdot 10^{15}$ esporos a um custo de US\$ 459,65. Se o arroz for utilizado em três cultivos consecutivos seria gerado, $8.68 \cdot 10^{15}$ esporos; no entanto, se esta quantidade de esporos for produzida usando arroz em um único cultivo, seria necessário uma quantia de 2.314 kg de arroz que resultaria em um custo de US\$1063,97. Com os cultivos consecutivos é possível obter cerca de 55% de redução nos custos com arroz e 45,5% na redução de resíduos liberados no meio ambiente. Obviamente, algumas despesas não foram computadas nesta estimativa, como a preparação do arroz para os cultivos do R2 e R3, mas certamente lucros expressivos ainda são esperados, mesmo se estes custos adicionais forem considerados.

Assumindo que $2 \cdot 10^{13}$ esporos/ha são necessários para eliminar 85% de insectos Schmidt et al., (2007) e que os esporos são produzidos com arroz em uma única utilização, sendo necessários 8 kg de arroz/ha. Assim, toda a área de plantação tratada

com esporos de *M. anisopliae* no Brasil, cerca 3.000.000 ha (IWANICKI et al., 2018), demandaria cerca de 24,000 ton de arroz a um custo de US\$ 11,035,200. Este montante não é expressivo considerando a produção total de arroz no Brasil que, está estimado em cerca de 10,4 milhões de toneladas, segundo autoridades brasileiras como o Portal de Informações Agropecuárias (PIA, 2019); No entanto, deve se ressaltar o total de resíduos liberados no meio ambiente, quando se observa o mercado de bioinseticidas que está em expansão, com crescimento em cerca de 70% apenas em 2017 (MAPA, 2019).

Foi possível observar que, após o primeiro cultivo (R1), os grãos estavam com uma coloração amarelada, como pode ser visto na Figura 6.1a. Acredita – se que, tal fenômeno tenha ocorrido em virtude da colonização do fungo sobre os grãos. Após secagem a 50°C, os grãos se possuíam uma coloração castanho, como apresentado na Figura 6.2b. Uma das hipóteses para tal coloração é que, tenha ocorrido à reacção de Maillard entre os açúcares redutores e os restantes aminoácidos do cultivo anterior (ORDÓÑEZ, 2005), como será discutido os tópicos seguintes.

Figura 6. 1 - Os grãos de arroz após o primeiro cultivo a) antes da secagem; b) depois da secagem a 50°C durante 24 h.



Fonte: (Próprio autor)

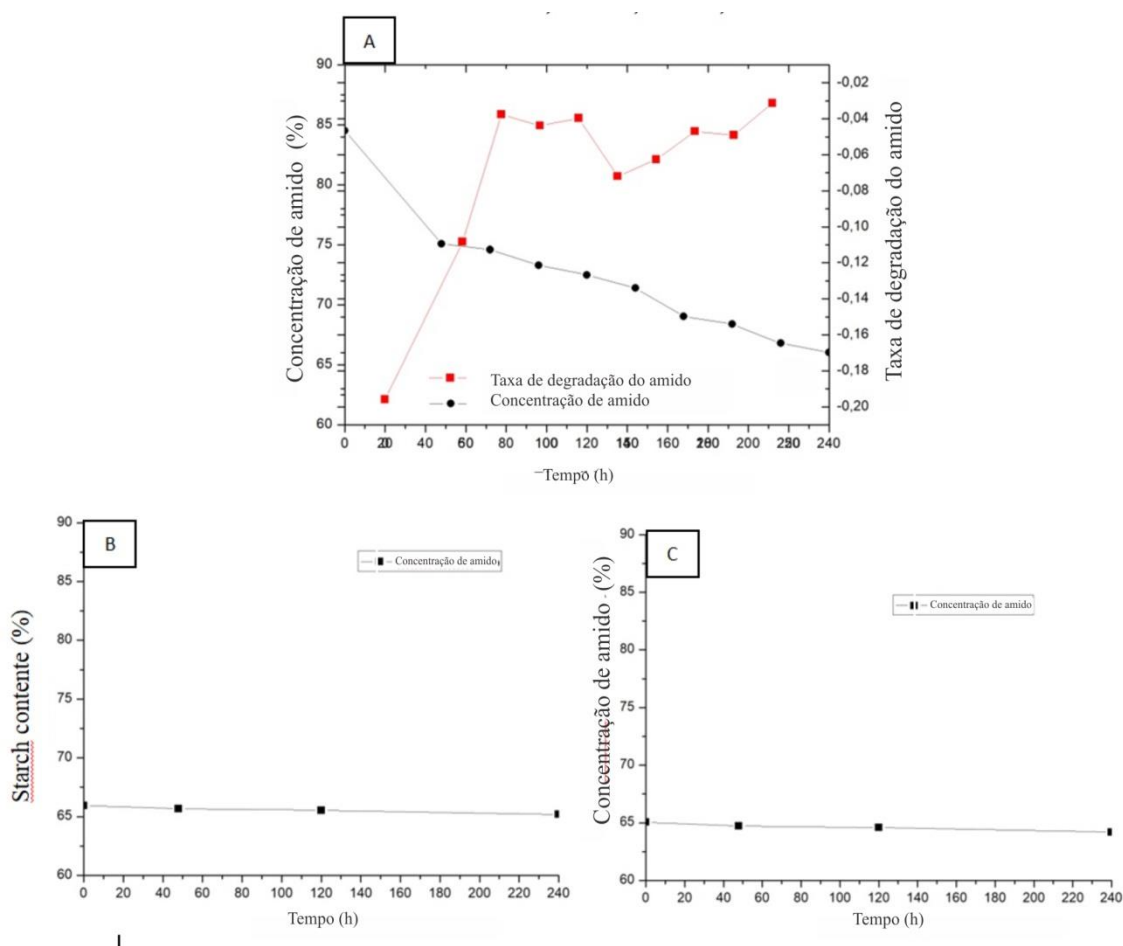
6.3.2. Adaptação do fungo nos grãos de arroz tipo 1 no R1, R2 e R3

A cinética de degradação do amido, de síntese de amilases e proteases e da liberação de açúcares redutores foi determinada para entender como o fungo degrada o substrato e os resultados são apresentados na Figura 6.2 e 6.3 respectivamente. Conforme mostrado na Figura 6.3, a secreção máxima de enzimas amilolíticas, ocorre

nas primeiras 72 horas de cultivo. Cunha et al., (2019) realizaram a captação de CO₂ gerada pelo fungo cultivado em arroz longo, utilizando biorreator de bandeja, onde observaram que, a maior geração de CO₂ ocorre com 72 horas de cultivo, indicando que neste momento entre o início até 72 horas de cultivo, é onde ocorrem as maiores reações químicas e bioquímicas para o desenvolvimento do fungo nos grãos do R1. Em termos de desenvolvimento do microrganismo, inicialmente ocorre quebra da dormência dos esporos, com consequente germinação e a polarização das hifas, denominada de fase *lag* ou de adaptação. Nesta fase, é importante que haja fontes de carbono facilmente assimiláveis, como carboidratos de baixo peso molecular para que ocorra o desenvolvimento do fungo. Como mencionado anteriormente, a partir do processo de moagem, alguns materiais de superfície são liberados e permanecem como poeira nos grãos de arroz. Dentro desses materiais, o amido representa cerca de 85% (Li et al 2019 - lavagem de arroz). Além disso, é possível que os grãos de arroz cru contenham proporção significativa de outros carboidratos de baixo peso molecular que possam ter sido gerados por danos físicos nos grânulos de amido resultantes do processo de moagem. Essa sugestão corrobora com os resultados apresentados na Figura 6a, onde foi possível observar uma atividade expressiva da amilase total. Aqui, esse resultado provavelmente atribui à atividade da enzima glucoamilase, uma vez que esta enzima hidrolisa os carboidratos de baixo peso molecular (por exemplo, maltose) e provavelmente deve estar atuando nos materiais de superfície presentes nos grãos de arroz. A amilase total relatada aqui é um ensaio de amido-iodo que mede a quantidade de amido degradado para determinar a atividade da α -amilase e glucoamilase. A enzima α -amilase ataca preferencialmente ligações α -1,4 nas regiões internas do substrato de cadeia longa, catalisando uma liberação de oligodextrinas. A glucoamilase já é responsável pela liberação de produtos de baixo peso molecular (por exemplo, glicose, maltose) de substratos de cadeia longa ou cadeia curta (Machado de Castro et al. 2018). Além disso, neste estudo, a atividade da α -amilase também foi determinada a partir da quantidade de açúcares redutores pelo ensaio DNS (Figura 6.3a). No entanto, os resultados da atividade da α -amilase permaneceram constantes durante todo o tempo de cultivo. Neste caso, poderíamos sugerir que o crescimento do fungo em grãos de arroz em R1 foi estimulado principalmente pela hidrólise de amidos livres e outros carboidratos de baixo peso molecular via enzima glucoamilase. Assim, enquanto o fungo secretava as enzimas amilolíticas e hidrolisavam a fração amilácea dos grãos de

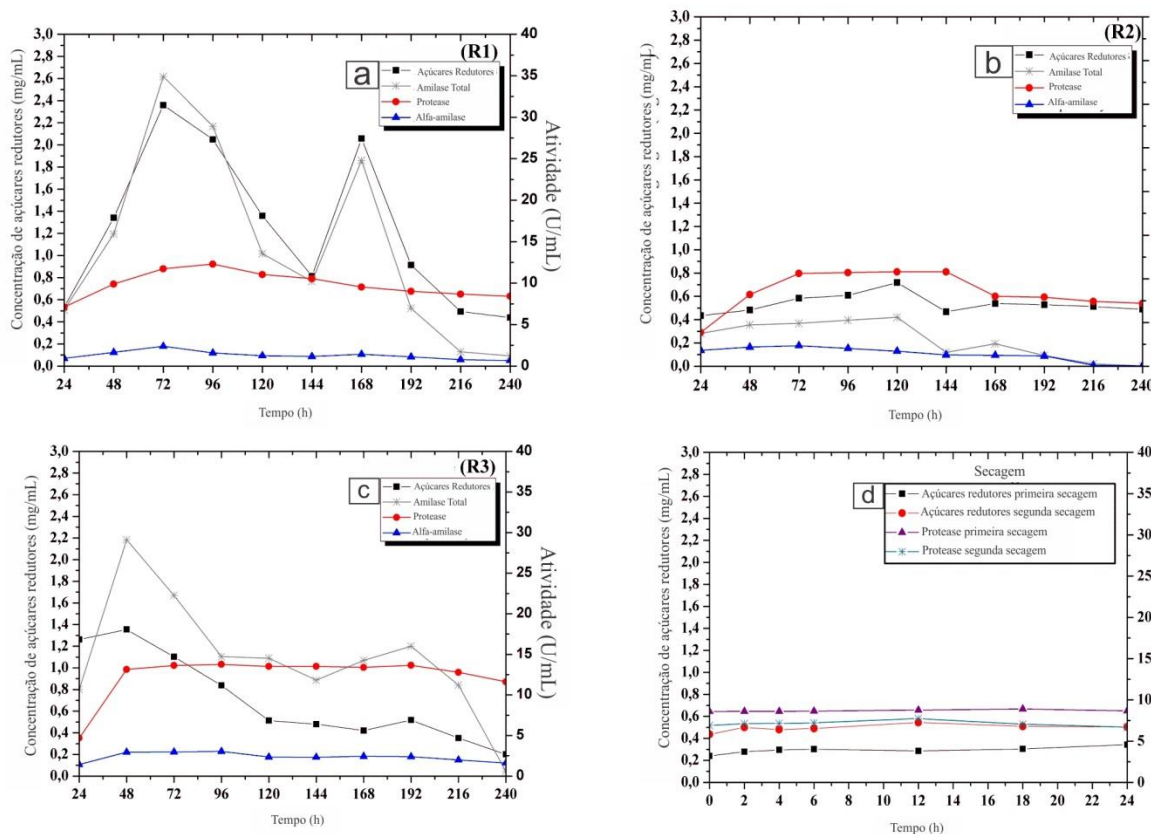
arroz, havia também um aumento nos produtos de hidrólise, ou seja, um aumento no teor de açúcares redutores (Figura 6.3a), apresentando uma tendência de consumo de amido e geração de produtos, tal fenômeno é observado em dois momentos do R1, com 72 horas e 120 horas de cultivo, indicando que durante o período de cultivo ocorre o esgotamento de fontes nutricionais de preferência do fungo, necessitando secretar enzimas, para atacar o substrato e assim, gerar produtos de sua preferência. Daryaei et al., (2016) relatam que o fungo utiliza nos substratos nutrientes de preferência e que somente utiliza outros componentes presentes no substrato quando ocorre o esgotamento das fontes nutricionais de preferência.

Figura 6. 2 - Cinética de degradação do amido dos grãos de arroz pelo fungo *M. anisopliae* IBCB 425: a) R1; b) R2; c) R3



Fonte: (Próprio autor)

Figura 6. 3 - Cinética da atividade de amilase, amilase total e de protease e de liberação dos açúcares redutores durante a) primeira cultivo do arroz (R1), b) segundo cultivo (R2), c) terceiro cultivo (R3) e d) durante o período de secagem após R1 e R2.



Fonte: (Próprio autor)

Por outro lado, em R2 foi possível observar que a degradação dos amidos provavelmente é constante (Figura 6.2b), apenas 1% durante todo o tempo de cultivo. Da mesma forma, houve uma redução nas atividades enzimáticas e açúcares redutores no cultivo de R2 (Figura 6.3b) quando comparado ao R1. Esses resultados sugeriram que no R2 o fungo *M. anisopliae* IBCB 425 tinha capacidade de crescer em outra fonte de energia que não o amido. É possível que, mesmo na presença de amido, ele tenha utilizado ácidos orgânicos para o crescimento e tenhamos uma explicação plausível para esse comportamento do perfil. Nossa hipótese é que o fungo utilizou o conteúdo remanescente de proteína de R1 como fonte de energia em R2. Li et al 2019 identificaram alguns componentes dos materiais de superfície do arroz e os autores observaram que além do amido, a superfície dos grãos de arroz também contém até cerca de 36,1% do conteúdo de proteínas. É possível que, durante o procedimento de extração de R1 seguido de secagem e autoclave para preparar o substrato para R2,

houve uma quebra no conteúdo dessas proteínas liberando alguns peptídeos e aminoácidos para o cultivo de R2. Murad et al. 2008 realizou a análise proteômica das secreções enzimáticas envolvidas no metabolismo fúngico de carboidratos/nitrogênio de *M. anisopliae* na presença da praga de insetos *Callosobruchus maculatus*. Os autores identificaram várias enzimas proteolíticas, incluindo a enzima metionina-gama-liase, que está envolvida na via metabólica de quebra de aminoácidos e pequenos peptídeos em metanodiol mais 2-oxobutanoato. Esses metabólitos são seguidos por uma sequência complexa de reações para produzir succinil-CoA e, portanto, o ciclo do ácido tricarboxílico. É possível que em R2 a superfície dos grãos de arroz contenha alguns peptídeos e aminoácidos livres que foram utilizados por *M. anisopliae* durante o crescimento. Se a hipótese estiver correta, além da protease, os fungos também secretavam outras enzimas envolvidas na quebra de aminoácidos e pequenos peptídeos, como a metionina-gama-liase. Dentro de algumas moléculas intermediárias produzidas nessa sequência de reações até a produção de succinil-CoA, há também as moléculas de CO₂ liberadoras (GENESAN e WEIMER, 2017). De fato, essa abordagem parece fazer sentido com outros resultados obtidos de respirometria (CO₂). Medidas indiretas da quantidade de biomassa gerada durante o período de cultivo através de dados de respirometria (CO₂), com o uso de biorreator de leito empacotado (dados apresentados no próximo tópico), demonstraram que o fungo se desenvolve de maneira distinta em cada uso do substrato. Para o R1, obtém-se o máximo de concentração de CO₂ com 72 horas de cultivo (2,32 moles), para o R2 com 42 horas (6,47 moles) e para o R3 com 48 horas (2,61 moles). Neste estudo, o metanodiol foi supostamente obtido a partir de aminoácidos desaminados, mas também é o produto de enxofre geralmente relatado pela decomposição da metionina. Ruiz Herrera e Starkey (1969) mencionaram que muitos microrganismos, incluindo diversas bactérias e actinomicetos, além de fungos atacam a metionina, mas não conseguem usá-la como substrato para o crescimento. Enquanto isso, os mesmos autores também mencionaram que alguns fungos necessitavam de uma fonte de energia utilizável, como a glicose para o crescimento, ou seja, faziam co-dissimilação. Provavelmente, esse foi o modo utilizado pelo *M. anisopliae* durante o cultivo de R2, ou seja, ele metabolizou uma pequena quantidade de glicose do amido, como mostrado nas Figuras 6.2b e 6.3b, no entanto, utilizou os peptídeos e aminoácidos remanescentes de R1 como fonte de carbono e nitrogênio para o crescimento em R2.

No R3 foi possível observar que, uma pequena fração dos amidos foi degradada (Figura 6.2c), apenas 1% de degradação, semelhante ao R2. Por outro lado, o perfil de atividades enzimáticas e açúcares redutores liberados pelo R3 permanece próximo ao R1. Neste estudo, os grãos de arroz foram autoclavados três vezes consecutivas com uma umidade de 45%. Esse teor de umidade não é capaz de gelatinizar os grânulos de amido dentro dos grãos de arroz. Enquanto isso, é possível que durante os dois primeiros aquecimentos (autoclave R1 e R2) os grãos de arroz absorvam um pequeno teor de água, levando a uma pequena expansão dos grânulos de amido presentes na superfície dos grãos de arroz. Além disso, é possível que esses grânulos de amido tenham sido gradualmente gelatinizados durante as três esterilizações consecutivas e no R3 as moléculas de amilose e pequenas amilopectinas no interior dos grânulos de amido foram lixiviadas e, assim, concluindo o processo de gelatinização dos grânulos de amido presentes em a superfície dos grãos de arroz. De acordo com Tester e Morrison 1990, mencionou que a amilose é considerada o principal componente lixiviado que poderia formar uma rede tridimensional durante a retrogradação. Mais recentemente, Li et al. 2017 identificou e caracterizou as quantidades e características estruturais moleculares do amido lixiviado de grãos de arroz durante o cozimento. Os autores estudaram os grãos de 12 variedades de arroz cozido e os autores observaram que, em grãos longos de sunrice, o teor de amilose lixiviada pode atingir 44% do amido lixiviado total. O maior conteúdo de amilose lixiviada no R3 poderia justificar um ligeiro aumento na atividade da α -amilase por *M. anisopliae* durante o cultivo de R3 (Figura 6.3c). Como mencionado anteriormente, esta enzima ataca preferencialmente ligações α -1,4 nas regiões internas do substrato de cadeia longa, isto é, longas cadeias de amilose. Ao mesmo tempo, libera oligodextrinas a serem atacadas pela glucoamilase (representada pela atividade total da amilase), levando a um aumento nos açúcares redutores, como mostra a Figura 6.3c. Além disso, no R3 houve um ligeiro aumento da atividade da protease, ou seja, neste cultivo o fungo *M. anisopliae* também utilizaram o teor de proteínas como fonte de carbono e nitrogênio para crescer. De fato, essa abordagem parece fazer sentido com os resultados obtidos pela respirometria (CO₂), onde é possível observar uma produção intermediária de CO₂ em R3 do que as de R1 e R2, que têm seu cultivo suportado basicamente amido e proteína, respectivamente.

A enzima protease durante os períodos de cultivo (R1, R2 e R3), permaneceram praticamente constantes por todo período de cultivo, indiferente do uso, porém na

maioria das vezes estava em oposição à atividade da amilase total. Durante o período de secagem a atividade da enzima protease permaneceu constante, diferindo das enzimas amilolíticas.

6.3.3. Cinética de esporulação do fungo para R1, R2 e R3

Para entender se existe alguma alteração no desenvolvimento do fungo *M. anisopliae* IBCB 425 no uso da técnica do reuso do arroz tipo 1, realizou a cinética de esporulação do fungo para o R1, R2 e R3. Na Figura 6.4a é apresentada a cinética de esporulação do fungo *M. anisopliae* para o R1, R2 e R3 e a Figura 6.4b são apresentadas as concentrações de produção de esporos diária, onde se realizou a contagem diária menos a contagem do dia anterior para obter a produção de esporos diária durante o período de cultivo.

De acordo com a Figura 6.4a se observa uma tendência na cinética de esporulação do fungo *M. anisopliae* para o R1 e R3. Para o R2 obteve-se um perfil com aumento da concentração de esporo constante, sem oscilações durante o período de cultivo, modelo semelhante ao obtido para a sintetização das enzimas para o R2 (Figura 6.3b), onde a sintetização de enzimas ocorreu em menor intensidade, quando comparado aos reusos e não obtendo aumentos ou declínios expressivos durante o cultivo. Entretanto, também se observa que a menor concentração de esporos obtida foi para o R2 e embora a cinética obtida tenha menores oscilações, foi a que se obteve menor concentração de esporos no final do cultivo. Esse perfil pode ser atribuído à via metabólica usada por *M. anisopliae* durante o crescimento. Como mencionado anteriormente, em R2, o problema dos fungos utilizou a fração protéica como fonte de carbono e nitrogênio durante o cultivo. Já se sabe que os carboidratos são as fontes primárias de energia e carbono para o microrganismo majoritário durante seu crescimento. Além disso, também é sabido que nas bactérias do ácido láctico (LBA) a capacidade de formar colônias em meio sólido é perdida no início da iniciação de carboidratos (STUART et al., 1999) e pelo menos esses microrganismos são capazes de usar fontes alternativas de carbono, como aminoácidos para energia, é usado para a síntese de proteínas e biomoléculas, e não para a geração de massa celular (GANESAN et al., 2007). Neste estudo, levanta-se a hipótese de que, no crescimento de R2 *M. anisopliae*, usando pequenos peptídeos e aminoácidos como fonte de carbono, isso leva a uma diminuição da produção de micélio após uma diminuição na produção de esporos. As oscilações observadas no R1 e R3, se deve ao fato do esgotamento de fontes nutricionais de fácil acesso ao seu

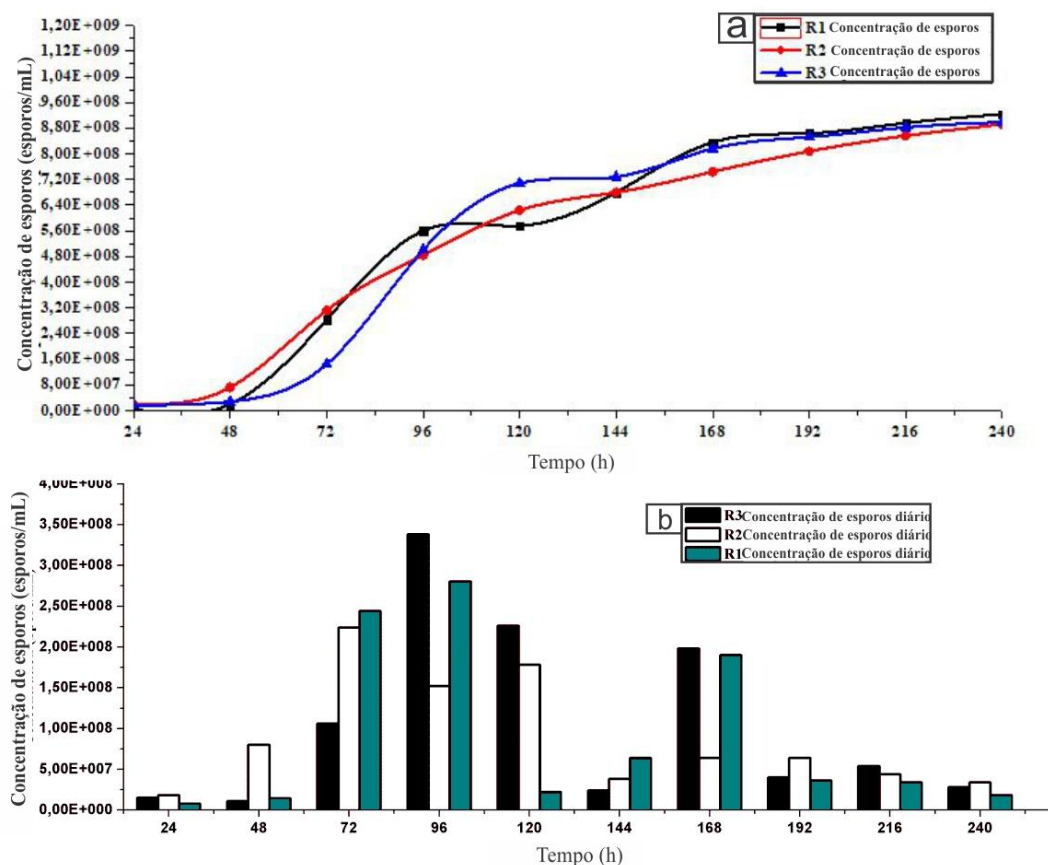
desenvolvimento. Nos tópicos anteriores, isso foi bem explorado, e sabe que no R1, principalmente, o fungo tem dois grandes momentos de transformação de amido em nutrientes de fácil acesso (72 horas e 120), demonstrando que a esporulação do fungo não deva ser constante por todos os dias de cultivo, pois o fungo precisa metabolizar o substrato para dar continuidade no seu desenvolvimento. Já no R2 isso não ocorre, pois segundo conclusões firmadas no tópico anterior o fungo se encontra em situação favorável, não sendo necessários grandes sintetizações do substrato durante o período de cultivo.

Na Figura 6.4b se obtém a esporulação diária do fungo para o R1, R2 e R3, onde se observa que a esporulação ocorre de maneira heterogênia entre os usos dos grãos, demonstrando novamente que o fungo se desenvolve de maneira distinta em cada uso dos grãos. Estatisticamente para o R1 os dias de maior esporulação ocorrem entre o 3-4 dia, para o R2 3-5 dia e para o R3 o maior dia de esporulação é o 4. Esse resultado está de acordo com as hipóteses mencionadas anteriormente, uma vez que isso pode ser atribuído à via metabólica utilizada por *M. anisopliae* durante o crescimento. Liu et al., 2008 mencionaram que a degradação da metionina pode ser uma das maiores vias metabólicas do catabolismo da metionina em alguns microrganismos do queijo. Também se observa que quando se realiza o reuso do substrato a esporulação ocorre de maneira mais acelerada, quando comparada com o R1, onde o fungo necessitou se adaptar, sintetizar e se desenvolver como foi amplamente discutido no Tópico 6.3.2. Já para os reusos esses fenômenos são acelerados, uma das hipóteses é as fontes nutricionais disponíveis nos grãos no R2 e R3, pois quando o fungo encontra fontes nutricionais de preferências seu desenvolvimento pode ser acelerado, em virtude do encurtamento do processo de adaptação e metabolização do substrato (DARYAEI et al., 2016).

Issaly et al., (2005) realizaram um estudo para encontrar a melhor condição de cultivo submerso do fungo *M. anisopliae* variando em proporções C:N (Carbono e Nitrogênio), com a melhor condição encontrada que foi na proporção de 1:6 de C:N realizaram a cinética de esporulação do fungo *M. anisopliae* através do mesmo tipo de cultivo, onde encontraram um perfil de esporulação em função do tempo parecido ao encontrado neste trabalho, entretanto aqui o cultivo durou 240 horas e os autores paralisaram o cultivo com 196 horas de cultivo obtendo concentrações $1,2 \times 10^9$. Sun; Fuxa; Henderson, (2002) realizaram o cultivo do fungo *M. anisopliae* em cupins para

que após a morte dos insetos obtivessem a cinética de esporulação do fungo durante 11 dias e os autores obtiveram porcentagens diárias de produção de esporos próximas às obtidas neste trabalho, demonstrando que o desenvolvimento do fungo nos insetos e nos grãos de arroz tipo 1 são parecidos.

Figura 6. 4 - Cinética de produção de esporos produzidos pelo fungo *M. anisopliae* IBCB 425 no R1, R2 e R3: a) somatório; b) produção diária.



Fonte: (Próprio autor)

6.3.4. Análises de microscopia optica para os grãos do R1, R2 e R3

Neste estudo, as manchas de hematoxilina e eosina foram utilizadas na análise microscópica para observar como os fungos se desenvolvem nos grãos de arroz. A hematoxilina tem uma cor azul-púrpura profunda e mancha ácidos nucleicos mostrando detalhes intranucleares claros, enquanto a eosina é rosa, mancha o citoplasma celular e proteínas de maneira inespecífica. Em um tecido típico, os núcleos são corados em azul, enquanto o citoplasma e a matriz extracelular têm graus variados de coloração rosa (FISCHER et al., 2008). No presente estudo, provavelmente o azul da mancha é

atribuído às hifas de *M. anisopliae*, devido à presença do núcleo em seus corpos hifos septados (BECHARA et al. 2011). Por outro lado, a mancha rosa pode ser atribuída aos componentes dos grãos de arroz. As células do endosperma do arroz têm paredes finas e são amiloplastas contendo grânulos de amido. Além disso, as duas camadas celulares mais externas dos grãos de arroz são ricas em proteínas e lipídios e possuem amiloplastos menores e grânulos compostos de amido (ZHOU et al. 2002). As análises microscópicas foram realizadas nas amostras 0, 48, 120 e 240 horas de cultivo do R1, R2 e R3. Após as análises iniciadas, foi necessário realizar algumas análises com aumento maior nas 120 horas do R1, R2 e R3 para comprovar algumas questões relacionadas ao desenvolvimento de fungos nos grãos.

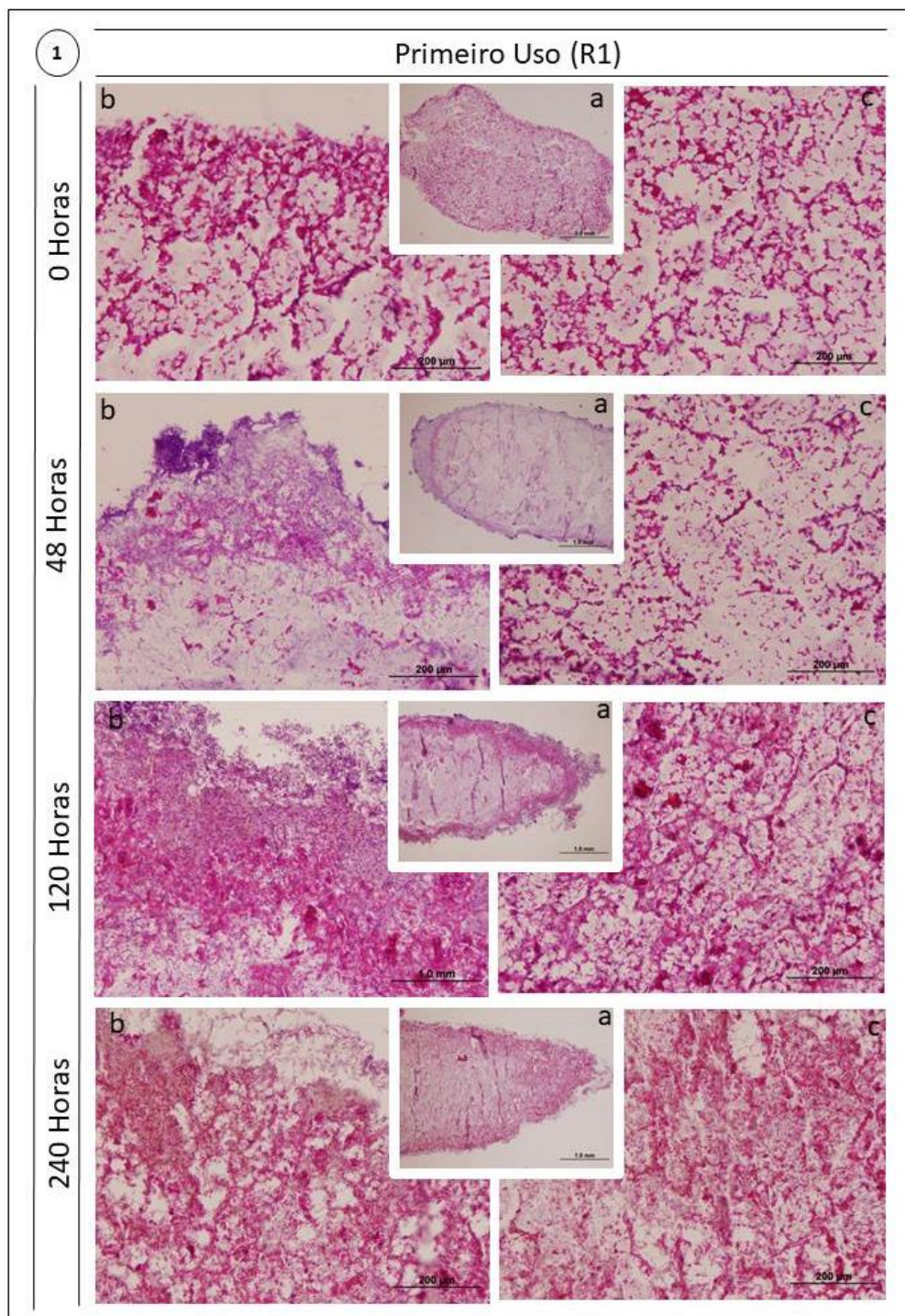
A Figura 8 mostra as micrografias ópticas no primeiro uso (R1). Às 0 horas foi possível observar apenas manchas cor de rosa, ou seja, componentes de grãos de arroz. É provável que desta vez não tenha sido suficiente para os esporos germinarem e os fungos colonizarem a superfície dos grãos de arroz. Entretanto, às 48 e 120 horas, foi possível observar a mancha azul ao redor da superfície dos grãos de arroz. É possível que esse material seja a hifa fúngica *M. anisopliae*. Esses resultados corroboram com a hipótese mencionada anteriormente, ou seja, os fungos cultivados na superfície dos grãos de arroz. Além disso, na Figura 6.5 às 120 e 240 horas foi possível observar algumas linhas em azul manchado dentro do grão de arroz. É possível que durante a preparação do substrato sólido (por exemplo, processo de autoclave) o material tenha sofrido alguma ruptura que foi colonizada por *M. anisopliae* durante o cultivo. Schrank; Vainstein, (2010) realizaram análises de microscopia eletrônica, demonstrando a diversidade de linhagens do fungo *M. anisopliae* onde os autores concluíram que o fungo pode apresentar diferentes tamanhos de esporos variando a linhagem do fungo e observaram o desenvolvimento do fungo no hospedeiro. Após 72 horas da adesão do esporo sobre a cutícula do hospedeiro, os autores observaram desenvolvimento do fungo bem parecido aos obtidos com 48 horas de cultivo no arroz tipo 1, demonstrando que o desenvolvimento do fungo na superfície do arroz é parecido com o desenvolvimento do fungo nos hospedeiros.

De acordo com a Figura 6.5, com 120 horas de cultivo, fica nítido o crescimento e desenvolvimento do fungo no grão, com o aumento da quantidade de hifas presente no grão. Observa-se que as hifas crescem por toda a superfície do grão (Figura 6.5 – a – 120 horas), demonstrando que quanto maior for a área superficial do sólido, maior será

o crescimento do fungo, e que existem diversas hifas penetrando o grão (Figura 6.5 – b – 120 horas). Com 120 horas de cultivo, no endosperma do grão existe muito material proteico (manchas avermelhadas no meio do endosperma), o qual consiste em material hidrolisado pelas enzimas proteazes produzidas pelo fungo *M. anisopliae* IBCB 425 durante o período de cultivo. Quando se observa a atividade da enzima protease em 120 horas (Figura 6.3a) constata-se que a enzima possui alta atividade nesse período, demonstrando que neste momento ocorrem conversões de nutrientes dentro do grão. Algumas manchas avermelhadas também podem ser observadas na superfície do grão entre as hifas e a cutícula com 120 horas do R1, demonstrando que o fungo realiza a secreção de diversas enzimas que efetuam a conversão do meio, para que o fungo tenha nutrientes disponíveis para o seu desenvolvimento. Leemon; Jonsson, (2012) realizaram análises de microscopia eletrônica e óptica em carrapatos e moscas varejeiras parasitados com o fungo *M. anisopliae*, para entender como ocorre o desenvolvimento do fungo sobre os hospedeiros. Com as imagens os autores puderam demonstrar o momento do rompimento da cutícula do inseto e assim a entrada das hifas do fungo no artrópode. Também concluíram que com 80 horas de cultivo foi possível verificar uma alta massa de hifas sobre o artrópode, assim como verificado nas imagens apresentadas neste trabalho com 48 e 120 horas de cultivo em ambos os cultivos. Entretanto, para o crescimento do fungo sobre as moscas não foi possível observar esporos germinativos, a conclusão foi que o fungo penetra pela boca das moscas e tem seu crescimento interno, diferenciado do crescimento em carrapatos e do arroz tipo 1 como demonstrado neste trabalho (Figura 6.5, 6.6 e 6.7), demonstrando que o desenvolvimento do fungo nem sempre será igual e sim dependerá de fontes nutricionais disponíveis encontradas para seu desenvolvimento.

Com 240 horas de cultivo a quantidade de hifas presentes na superfície do grão diminui drasticamente, como pode ser visto na Figura 6.5 (Figura 6.5a – 240 horas). Isso pode ocorrer em virtude da falta de nutrientes, visto que o fungo cresce na superfície e o micélio se espessa e, dessa forma, a difusão de nutrientes do interior do grão até sua superfície e depois através da camada de micélio é limitante e não fornece os nutrientes necessários à manutenção das colônias superiores. Outra dificuldade, que as hifas podem encontrar nesse período, é para que ocorra aeração na região entre a superfície dos grãos e as hifas, pois como ocorre o crescimento de hifas sobre hifas, as inferiores possivelmente ficam sem oxigenação.

Figura 6. 5 - Imagens de microscopia óptica dos grãos de arroz utilizados pela primeira vez para cultivo do fungo *M. anisopliae* IBCB 425: a) imagem geral do grão; b) superfície do grão; c) endosperma do grão.



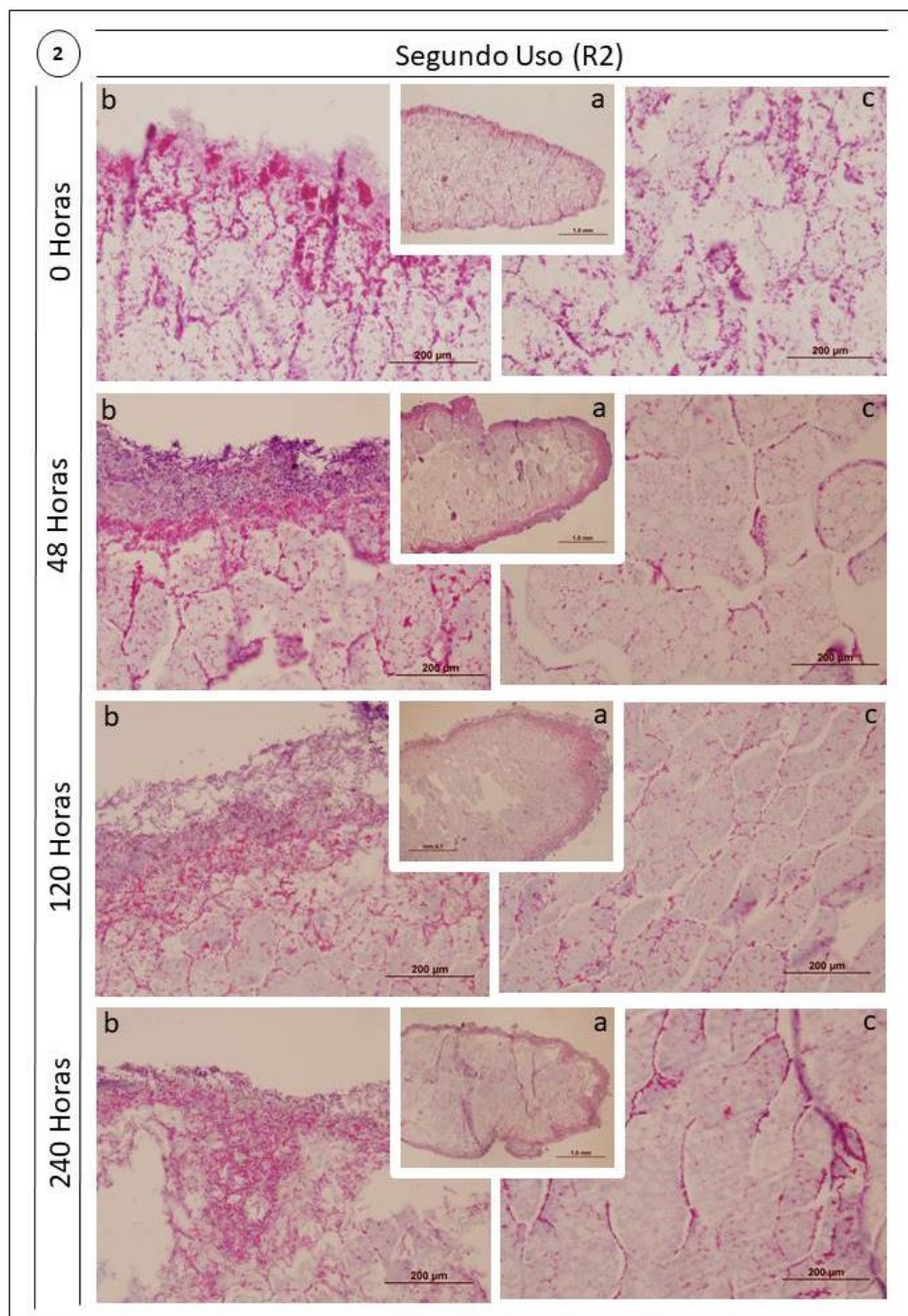
Fonte: (Próprio autor)

Ao contrário de R1 às 0 horas, as micrografias ópticas da segunda utilização (R2) da Figura 6.6 (0 horas) mostraram manchas azuis na superfície dos grãos de arroz. Provavelmente são as hifas fúngicas remanescentes de R1. Na Figura 6.6 são apresentadas imagens dos grãos do R2, onde é possível observar que o fungo não penetra os grãos, crescendo apenas em sua superfície. Isso fica explícito nas imagens para 48 e 120 horas de cultivo (Figura 6.6), uma vez que no endosperma não são observadas hifas. Na figura 6.8 onde são apresentadas imagens do endosperma e da superfície do grão para o R1, R2 e R3 com 120 horas de cultivo com aumento de 200x esse fenômeno fica mais visível, onde é possível observar que nas grânulos de amido dentro do endosperma do grão de arroz não é observada a presença de hifas ou esporos do fungo para o R2 e R3, diferenciando do R1 que é possível observar grande quantidade de hifas dentro e fora dos grânulos de amido dentro do endosperma do grão. Esse crescimento na superfície também demonstra que de alguma forma existiam os nutrientes em concentração suficiente na superfície do grão para o desenvolvimento inicial do fungo *M. anisopliae* IBCB 425. Segundo Jabor et al., (2009) o fungo *M. anisopliae* não é exigente para que ocorra seu desenvolvimento quanto a questões nutricionais, pois os autores realizaram o cultivo do fungo utilizando diversas fontes de carbono como: glicose, glicerina, levulose, maltose, sacarose e quitina, e observaram que, pequenas quantidades de carboidratos eram suficientes para o desenvolvimento do fungo, demonstrando que as pequenas frações de carboidrato presentes na superfície dos grãos aqui apresentados, já seriam suficientes para que ocorresse o desenvolvimento do fungo sobre a superfície dos grãos. Os autores ainda relatam em suas pesquisas sobre a influência nutricional no crescimento e esporulação do fungo que meios ricos em nutrientes se obtém altas taxas de crescimento em hifas, e não de esporos e meios intermediários, com poucos nutrientes e baixas fontes de carbono favorece a esporulação do fungo, explicando os resultados de esporulação obtidos neste trabalho para o R2 e R3 (Tabela 6.2), onde é provável que existisse baixo teor de nutrientes na superfície dos grãos. Ressalte-se que o tamanho das partículas era menor no R2, como se pode constatar comparando-se as Figuras 6.5 e 6.6, pois antes de cada uso do substrato ocorrem lavagens dos grãos danificando a estrutura dos mesmos. Outro efeito modificador da estrutura do grão é que, como o fungo se desenvolve, ocorre a conversão do substrato em biomassa fúngica, CO₂ e água. Com a diminuição da partícula, as distâncias a serem percorridas pelos nutrientes por difusão no interior do grão

6. Produção de esporos do fungo *Metarhizium anisopliae* utilizando como substrato o arroz em cultivos consecutivos

diminuem, tornando eficiente a nutrição do microrganismo. De forma similar ao R1 dos grãos, ao final do cultivo do R2 a concentração de hifas nos últimos dias de cultivo também diminuiu.

Figura 6. 6 - Imagens de microscopia ótica dos grãos de arroz utilizados pela segunda vez para cultivo do fungo *M. anisopliae* IBCB 425: a) imagem geral do grão; b) superfície do grão; c) endosperma do grão.

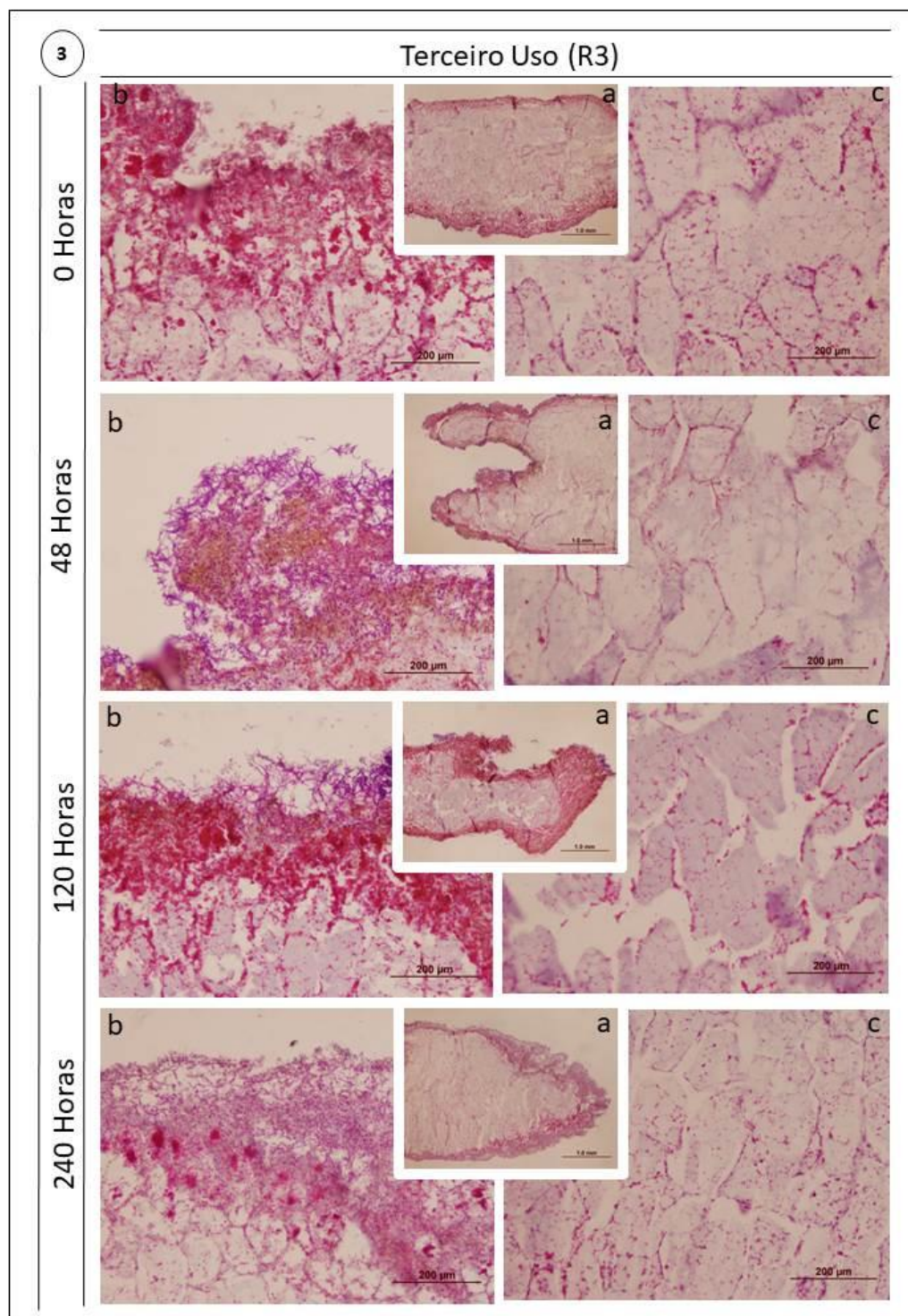


Fonte: (Próprio autor)

Para o R3 (Figura 6.7), o desenvolvimento do fungo nos grãos é semelhante ao R2, porém, se observa que os grãos apresentam mais fissuras e aumento da área superficial. Consequentemente, mais hifas foram observadas nestas áreas, ou seja, demonstrando mais uma vez que, quanto maior a área superficial do grão maior será o crescimento do fungo. Também é possível observar pela Figura 6.7 que, no momento inicial do cultivo, (Figura 6.7 – a – 0 horas) existem na superfície do grão diversos borões avermelhados, que provavelmente consistem de material proteico proveniente de hifas e enzimas remanescentes do cultivo anterior, demonstrando que mesmo com as lavagens dos grãos, parte considerável de material proteico fica retido nos grãos. Oli et al., (2014) relatam que quase toda a proteína presente no grão de arroz fica presente na superfície do grãos e que dentro dos grãos de arroz, exista apenas amido que muitas vezes não é totalmente gelatinizado no centro do grãos, em virtude da disponibilidade de água, pois a difusividade da água do grão é baixa. Quando se observa as atividades das enzimas durante o período de secagem dos grãos (Figura 6.3d) é possível confirmar essa hipótese, pois durante o período de secagem a enzima protease permaneceu ativa durante todo o período de secagem. De Melo et al., (2007) realizaram análises de microscopia eletrônica sobre pulgas infectadas com o fungo *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana* onde foi possível observar que com 96 horas após a aderência dos esporos na cutícula das pulgas houve um grande aumento na quantidade de hifas na superfície das pulgas analisadas, demonstrando mais uma vez que o fungo tem seu maior crescimento sobre a superfície dos hospedeiro e afirmando o que foi observado neste trabalho que, o fungo *M. anisopliae* tem seu maior crescimento ou quase todo na superfície dos grãos e quando possível penetra a cutícula do grão em busca de nutrientes.

Não foram encontrados trabalhos que realizaram análises de microscopia para entender como o fungo se desenvolve no substrato ou da preferencia do fungo por este substrato, apenas pesquisas que visam entender como o fungo se desenvolve nas pragas (desenvolvimento esse que causa a muscardine verde ou fenômeno de entomopatogenicidade). Mediante ao conhecimento adquirido com tais análises, será possível encontrar um substrato que possua características parecidas com o arroz tipo 1 ou ainda otimizar o reuso do substrato, através de suplementação do substrato, para que, se obtenha esporos com alta virulência em menos tempo e com maior concentração por grama seca de substrato.

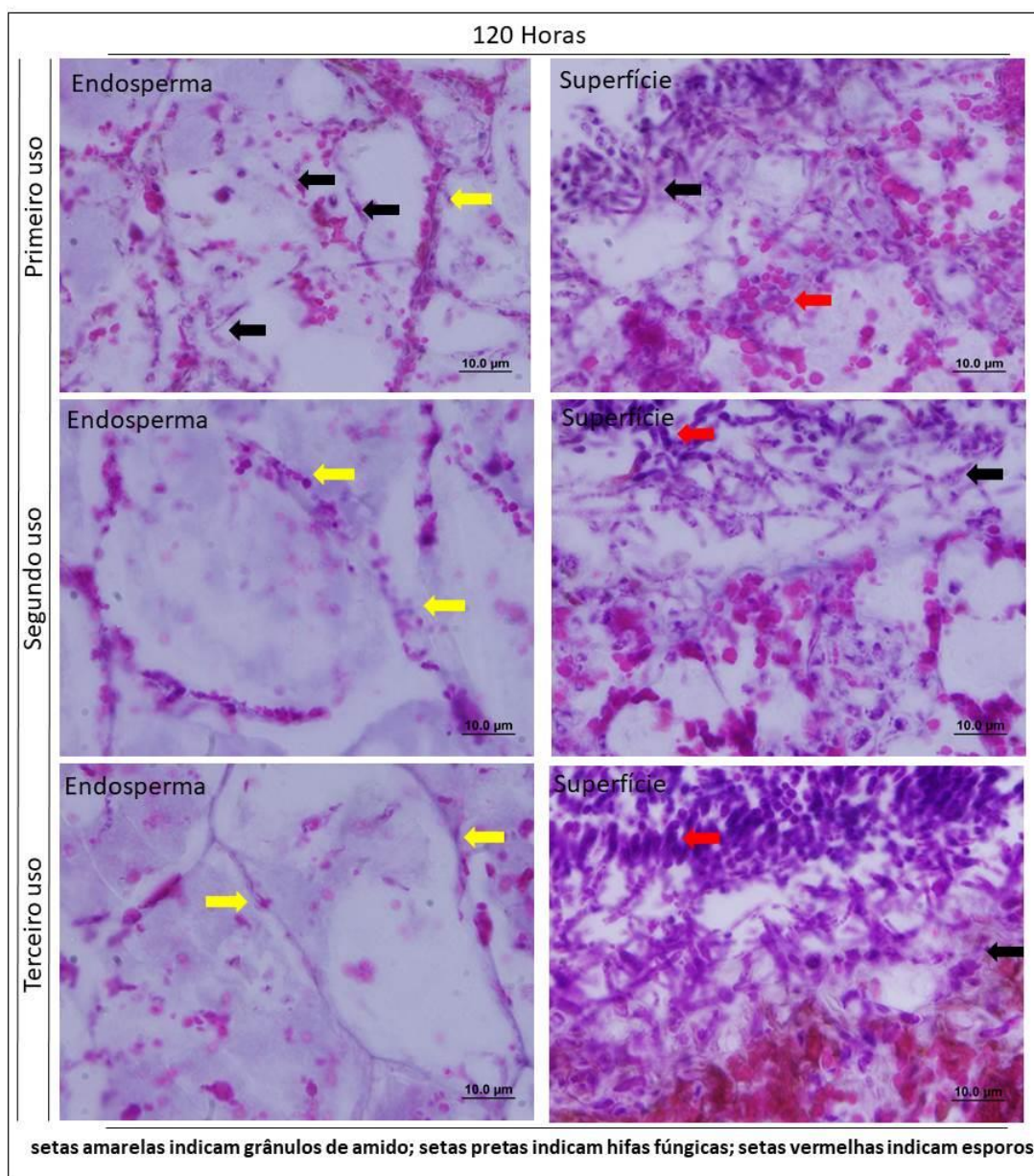
Figura 6. 7 - Imagens de microscopia ótica dos grãos de arroz utilizados pela terceira vez para cultivo do fungo *M. anisopliae* IBCB 425: a) imagem geral do grão; b) superfície do grão; c) endosperma do grão.



Fonte: (Próprio autor)

6. Produção de esporos do fungo *Metarhizium anisopliae* utilizando como substrato o arroz em cultivos consecutivos

Figura 6. 8 - Imagens de microscopia ótica dos grãos de arroz no R1, R2 e R3 no momento de 120 horas com aumento de 200x para a superfície e endosperma dos grãos.



Fonte: (Próprio autor)

6.4. Conclusão

O Objetivo principal desta seção era conseguir realizar o reuso do substrato e este objetivo foi alcançado, demonstrando que, com a implementação do reuso do substrato nas biofábricas é possível gerar economia e diminuir a quantidade de resíduos liberados no meio ambiente. Impactando diretamente no preço e lucro final dos esporos produzidos em biofábricas.

6. Produção de esporos do fungo *Metarhizium anisopliae* utilizando como substrato o arroz em cultivos consecutivos

Para um futuro aumento de escala utilizando biorreatores também se observou que seria necessário a inclusão de bagaço de cana-de-açúcar junto ao substrato na proporção de 9:1 (arroz?bagaço) para diminuir os impactos com compactação do leito e formação de aglomerados o que, será possível discutir e analisar com os testes do próximo tópico, onde serão discutidos sobre testes de ampliação de escala utilizando biorreatores de leito empacotado utilizando a técnica de reuso do substrato.

Com as análises analíticas (degração de amido, atividades de enzimas e concentração de açúcares redutores), foi possível observar que o fungo se adapta de maneira heterogênea a cada uso do substrato. Também se observou que a maior degração do amido ocorre no R1, sendo degradado cerca de 20%, enquanto que nos R2 e R3 a degradação foi cerca de 1%.

Com a cinética de esporulação de se observou que o fungo possui uma tendência de esporulação parecida no R1 e R3, já o R2 apresentou características distintas, apresentando a menor concentração de esporos final. Quanto a esporulação diária, se observou que nos R2 e R3 o fungo tem a esporulação diária logo nos primeiros dias, enquanto que no R1 o fungo demora um pouco mais para esporular.

Com as análises de microscopia óptica foi possível observar que o fungo no R1 penetra os grãos e que suas hifas penetram as células vegetais e seu crescimento ocorre sobre a superfície e dentro dos grãos, porém para o R2 e R3 as hifas não penetram o grão e o crescimento do fungo ocorre apenas na superfície do grão.

7. CULTIVO DO FUNGO METARHIZIUM ANISOPLIAE IBCB 425 UTILIZANDO BIORREATOR DE LEITO EMPACOTADO E REALIZANDO O REUSO DO SUBSTRATO ARROZ TIPO 1

7.1.Introdução

O fungo *Metarhizium anisopliae* tem se tornado uma ferramenta para realizar o controle biológico de diversas espécies de pragas presentes nas lavouras. Já existem registros de que o fungo *M. anisopliae* combate cerca de 200 espécies de pragas (SANTOS et al., 2017). Segundo a consultoria *Dunham Trimmer - International Bio Intelligence* (DT, 2019) até 2025 o mercado de biocontrole deve movimentar cerca de 10 bilhões de dólares no mundo. Segundo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA, 2019), houve crescimento de cerca de 70% no uso de bioinseticidas no país em 2018, sendo tratados cerca de 3 milhões de hectares com *M. anisopliae* para controle da cigarrinha das raízes de cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (IWANICKI et al., 2018; MAPA, 2019; NISHI; SATO, 2017).

Entretanto, no Brasil, a produção de esporos de *M. anisopliae* ocorre de maneira semi-artesanal na maioria das biofábricas, com muitas etapas manuais, resultando em altos índices de contaminação exógena e baixa produtividade. Como substrato, utilizam arroz tipo 1 e o cultivo ocorre em embalagens plásticas de até 500g (MASCARIN et al., 2018). Segundo Dalzoto; Uhry, (2009) as empresas necessitam padronizar a produção de esporos para garantir alta produtividade e letalidade, pois as concentrações de esporos variam entre 10^{11} e 10^{13} esporos/há, dependendo da praga alvo, com cerca de 85-90% de letalidade. Por falta de padronização, algumas empresas recomendam a aplicação de 500 g da mistura de arroz e esporos por hectare, enquanto para outras a recomendação é de até 10 kg. Considerando o pior cenário, seria necessário cerca de 10 kg de arroz cultivado com o fungo por hectare, ou seja, para atender a demanda do Brasil, seria necessário cerca 30 milhões de quilos de arroz, demonstrando a necessidade de desenvolver processos controlados para a produção industrial de esporos do fungo *M. anisopliae* (DALZOTO; UHRY, 2009; JARONSKI; JACKSON, 2012; MENDEZ-GONZALEZ; LOERA; FAVELA-TORRES, 2018; SCHMIDT et al., 2007; T.JARONSKI, 2014).

O arroz é o substrato mais empregado no cultivo de *M. anisopliae*, pois possui nutrientes facilmente assimiláveis pelo microrganismo e em altas concentrações, tem

7. Cultivo do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 utilizando biorreator de leito empacotado e realizando o reuso do substrato, arroz longo

grande área superficial e mantém sua estrutura física ao longo do cultivo (BHANU PRAKASH; PADMAJA; SIVA KIRAN, 2008; DORTA; ARCAS, 1998; KARANJA et al., 2004; KRUGER et al., 2014; RANGEL et al., 2004). No entanto, o arroz é um dos maiores custos de produção dos esporos, de modo que uma das alternativas para redução de custos seria a reutilização do substrato em cultivos sucessivos. Entretanto, poucos estudos foram publicados na literatura reutilizando o arroz, os quais o cultivaram apenas duas vezes consecutivas, ambos em embalagens plásticas, sendo os resultados similares para ambos os cultivos (BARRA-BUCAREI; VERGARA; CORTES, 2016; KRUGER et al., 2014).

Como alternativa ao uso de embalagens plásticas, o cultivo em biorreatores minimiza a possibilidade de contaminação exógena e fornece alternativas de controle das variáveis de processo, principalmente da temperatura de cultivo. Poucos trabalhos foram encontrados na literatura que empregaram biorreatores para o cultivo em estado sólido de *M. anisopliae*. Méndez-González et al., (2018a) apresentaram uma revisão dos biorreatores empregados para a produção de agentes para o controle biológico de pragas e reportaram que esporos de *M. anisopliae* foram produzidos em embalagens plásticas, leitos estacionários (empacotado e de bandeja) e leitos agitados (tambor rotativo), embora neste último a produção tenha sido baixa, uma vez que Van Breukelen et al. (2011) afirmaram que o fungo é pouco tolerante a agitação. De acordo com Mendez-Gonzales et al. (2018a), a altura limite do leito de arroz nos biorreatores de bandeja é de 4 cm, enquanto que Cunha et al. (2019) demonstraram experimentalmente que para espessuras de até 6 cm a concentração de esporos foi elevada e que, por simulação de transferência de calor, afirmaram que a altura limite era de 8 cm. Desta forma, a ampliação de escala nesta classe de biorreatores torna-se muito limitada. Van Breukelen et al., (2011), Dorta; Arcas, (1996) e Dorta & Arcas, (1998), demonstram que o cultivo do fungo em biorreator de coluna empacotada é uma alternativa promissora, obtendo elevadas concentrações de esporos. Dorta; Arcas et al. (1996) e Dorta e Arcas (1998) cultivaram o fungo em uma mistura de farelo de trigo e palha de arroz, esta última empregada para dar estrutura física ao meio poroso. Van Breukelen et al. (2011) empregaram cânhamo (*Cannabis ruderalis*) enriquecido com uma solução de glicose, peptona e extrato de levedura, farelo de trigo, farelo de arroz e grãos de trigo para o cultivo do fungo e obtiveram melhores resultados para o cânhamo enriquecido. Os

7. Cultivo do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 utilizando biorreator de leito empacotado e realizando o reuso do substrato, arroz longo

autores ainda reportaram que o farelo de trigo sofreu aglomeração e encolhimento ao longo do processo.

Uma dificuldade intrínseca dos biorreatores de leito empacotado é a elevação de temperatura ao longo do cultivo devido à baixa capacidade de remoção de calor pelo meio sólido orgânico, de modo que a ampliação de escala para diâmetros elevados é um problema a ser resolvido. Van Breukelen et al. (2011) operaram biorreatores de até 20 cm de diâmetro e não reportaram problemas de elevação excessiva de temperatura, enquanto que Dorta e Arcas (1998) operaram um biorreator de 15 cm de diâmetro e constataram uma elevação de temperatura de até 10°C acima da temperatura ideal, resultando numa concentração de esporos cinco vezes menor do que em um biorreator 2,5 cm de diâmetro. Não foram encontrados na literatura trabalhos que fizeram cultivo sucessivos de arroz em biorreatores.

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo realizar o aumento de escala da produção de esporos de *M. anisopliae* IBCB 425, cultivado em arroz em biorreatores de leito empacotado. O arroz utilizado em três cultivos sucessivos e a concentração de esporos obtida foi similar em todos eles. Foram empregadas duas escalas do biorreator, uma delas piloto, e os resultados foram satisfatórios em ambas. Este trabalho é de utilidade a produtores de esporos de *M. anisopliae*, que poderão reduzir os custos de produção e cultivar o fungo em ambiente de condições controladas.

7.2. Materiais e Métodos

7.2.1. Microrganismo

Foi utilizada a linhagem IBCB 425 do fungo *Metarhizium anisopliae*, fornecida pelo Instituto Biológico de São Paulo. No início dos experimentos, realizou-se a estocagem do fungo em tubos de ensaios com meio de cultura batata-dextrose-água (BDA). Com o fungo já desenvolvido, foi adicionado óleo mineral para que se formasse uma camada protetora a colônia cobrindo 1 cm acima da mesma. Os tubos de ensaio foram mantidos em câmara DBO com temperatura controlada de 4°C e estas culturas estoque foram utilizadas em todos os ensaios realizados no presente trabalho. Foi utilizada até a terceira geração do fungo de *M. anisopliae* IBCB 425 (três repiques consecutivos da mesma colônia), pois após a terceira geração foi possível observar que o crescimento do fungo começava a ficar lento.

7. Cultivo do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 utilizando biorreator de leito empacotado e realizando o reuso do substrato, arroz longo

Para inoculação do substrato, foi realizada a repicagem em frascos de Erlenmeyer inclinados contendo 50 mL de meio de cultivo BDA, com auxílio de alça de platina. Os frascos foram armazenados em câmara DBO a 28°C por 15 dias. A solução inóculo foi preparada adicionando solução aquosa de Tween 80 a 0,1 % (v/v) à superfície da colônia, seguido de raspagem da superfície do meio de cultivo com alça de platina para facilitar o desprendimento dos esporos. A concentração de esporos foi fixada em 10^7 esporos/g de substrato seco (gss) em todos os testes realizados.

7.2.2. Cultivo em embalagens de polipropileno

Foram realizados ensaios em embalagens plásticas de polipropileno contendo 10g e 400g de arroz (peso seco), misturado com bagaço de cana-de-açúcar na proporção em peso de 9:1 arroz:bagaço. O bagaço foi empregado para dar estrutura física ao meio de cultivo e evitar aglomeração. O arroz foi adquirido no comércio local e foi empregado sem qualquer procedimento adicional. O bagaço foi gentilmente cedido pela Usina Vale, de Onda Verde, SP, e foi seco em estufa de convecção forçada a 60°C até peso constante e peneirado em peneiras com aberturas 1 e 2 mm, sendo empregada a fração retida entre ambas.

Estes ensaios serviram como controle ao cultivo nos biorreatores, sendo o cultivo da menor massa a condição ideal e a de maior massa o que se emprega hoje nas biofábricas. As embalagens plásticas de polipropileno tinham um tubo de PVC adaptado à sua abertura, dentro do qual foram colocados tampões de algodão para propiciar as trocas gasosas e evitar contaminação exógena. Os materiais foram esterilizados em autoclave por 30 minutos à 121°C. Após o resfriamento, foi adicionada água suficiente para que a umidade inicial do substrato fosse 48% (base úmida), sendo a umidade aferida numa balança de elemento infravermelho MB 45 (OHAUS, Parsippany, EUA). O fungo foi cultivado por 10 dias em câmara D.B.O a 28°C, seguindo recomendação da literatura (CUNHA et al., 2019; DORTA; ARCAS, 1998; KEYSER et al., 2014; LI; FENG, 2009).

7. Cultivo do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 utilizando biorreator de leito empacotado e realizando o reuso do substrato, arroz longo

7.2.3. Extração de esporos

Realizou – se a extração de esporos ao adicionar 5 mL/ gss de solução Tween 80 a 0,1 % ao meio cultivado. Essa solução foi adicionada às embalagens plásticas, seguido de agitação em banho metabólico com agitação recíprocante a 120 bpm (batimentos por minutos) durante 50 minutos. Desta suspensão foram retiradas amostras para contagem dos esporos com auxílio de câmara de Neubauer acoplada a um microscópio de 40x de magnificação.

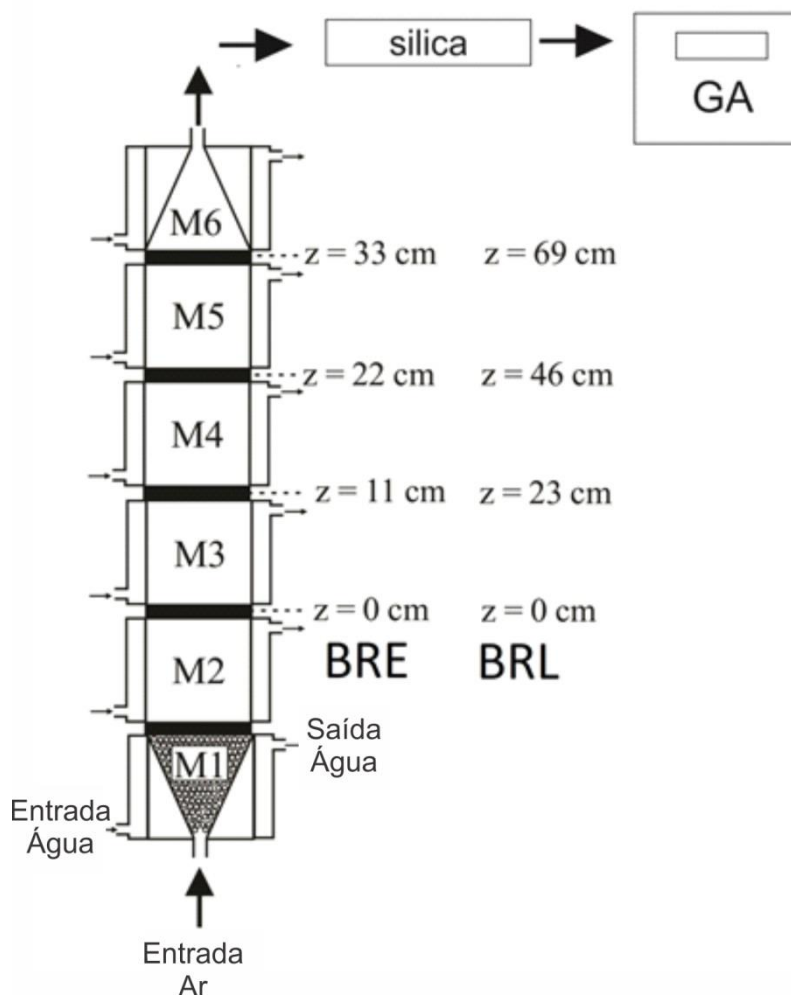
7.2.4. Cultivo em biorreator

Foram utilizadas duas configurações de biorreatores de leito empacotado de diâmetros diferentes, ambos feitos em alumínio, representados na Figura 7.1. Os biorreatores foram feitos em módulos encamisados de 10 cm de diâmetro interno e 10 cm de comprimento (BRE, biorreator estreito) e 20 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento (BRL, biorreator largo). Em ambos os aparatos haviam módulos cônicos de entrada, recheados com esferas de vidro de 3mm de diâmetro, utilizados para uniformizar o escoamento de ar. Acima destes módulos cônicos foram colocados módulos preenchidos com bagaço de cana úmido para garantir que o ar entrasse saturado na região de cultivo. No topo dos biorreatores foram colocados módulos cônicos, sem recheio, para direcionar o escoamento do ar para a atmosfera. A seção de cultivo era composta por três módulos, contendo 400g de substrato no total (360g de arroz e 40 g de bagaço) para BRE e 1,5 kg para cada módulo (1350 g de arroz e 150 g de bagaço), sendo um total de 4,5 Kg de substrato para BRL. No biorreator largo, foram colocadas telas metálicas entre os módulos para evitar compactação do substrato. Os módulos eram encamisados, por onde circulava água mantida à temperatura de 28°C utilizando um banho termostático. Antes dos ensaios os biorreatores foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 40 minutos.

O monitoramento da temperatura dentro dos biorreatores foi realizado introduzindo-se termopares do tipo T em flanges de nylon posicionadas entre os módulos, de modo que, as extremidades dos sensores foram posicionadas no centro dos módulos. Os termopares foram conectados a um sistema de aquisição de dados CompactDAQ® (National Instruments, Austin, EUA), gerenciado por uma rotina elaborada em ambiente LabView 8.1.

7. Cultivo do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 utilizando biorreator de leito empacotado e realizando o reuso do substrato, arroz longo

Figura 7 1 - Esquema dos biorreatores de leito empacotado estreito (BRE) e largo (BRL), módulos: 1 – Módulo de entrada; 2- Bagaço úmido; 6- Módulo de saída; 3, 4 e 5 – Seção de cultivo; z – Posição dos termopares; GA – Analisador de gases



Fonte: (Próprio autor)

O ar foi fornecido por um compressor, passou por um filtro com algodão para retirada de impurezas grosseiras, teve sua vazão determinada por um medidor de vazão mássico (Cole Parmer, Vernon Hills, Illinois, EUA), de 1 L/m para BRE e 12 L/m para o BRL, foi saturado em uma coluna de umidificação, recheada de esferas de vidro preenchida com água destilada estéril e passou por um filtro microbiológico de membrana Midisart® 2000 (Sartorius GmbH, Goettingen, Alemanha)

Os substratos inoculados foram preparados em embalagens plásticas, como descrito na seção 2.1. O empacotamento foi feito adicionando-se pequenas quantidades de

7. Cultivo do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 utilizando biorreator de leito empacotado e realizando o reuso do substrato, arroz longo

sólidos e acomodando-os gentilmente na coluna, seguindo-se recomendação de Casciadori et al., (2014) para empacotamentos soltos.

7.2.5. Reuso do substrato

Com o objetivo de reduzir os custos de produção com substrato, foram realizados ensaios cultivando-se o fungo sucessivamente por três vezes no mesmo substrato, daqui em diante identificados como R1, R2 e R3. Após cada cultivo, realizou-se a extração dos esporos como descrito na seção 2.3, após o que os grãos foram secos em estufa de convecção forçada a 50°C por 24 h. Após a secagem, os grãos foram novamente pesados, colocados em embalagens plásticas, umidificados, esterilizados, resfriados, inoculados e empacotados no biorreator novamente.

7.2.6. Cinética de crescimento fúngico através da produção de CO₂

A cinética de crescimento do fungo nos biorreatores foi avaliada por meio da geração de CO₂, uma vez que a concentração deste gás, é uma medida indireta para mensurar a biomassa gerada pelo microrganismo (FARINAS et al., 2011). Os gases foram coletados na saída das colunas ao longo do cultivo e foram encaminhados a uma coluna resfriada recheada com esferas de vidro para redução da umidade do gás, após o que foram conduzidos a um analisador de CO₂ com sensor de infravermelho NDIR (Alphasense Ltd., Great Notley, GB), conectado ao sistema de aquisição de dados CompactDAQ.

7.2.7. Análise de porosidade do leito

Para a alteração da estrutura do leito, foi necessário determinar a porosidade do leito formado por mistura de arroz e bagaço na proporção de 9:1. Para tanto, foi empregado o método do deslocamento volumétrico em provetas de 50 mL preenchidas por tolueno (DE BONI; 2007). O volume do leito foi determinado pela altura total das partículas na proveta para a obtenção da densidade *bulk*, conhecida a massa de material sólido. O volume das partículas foi obtido pelo deslocamento do tolueno da coluna, de modo a determinar-se a densidade das partículas. A porosidade do leito foi determinada por meio de sua definição clássica:

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

7. Cultivo do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 utilizando biorreator de leito empacotado e realizando o reuso do substrato, arroz longo

Onde ρ_s é a densidade do leito de arroz, ρ_p é a densidade da partícula de arroz, e ε é a porosidade do leito.

7.2.8. Análise estatística

Foram realizadas análises de variância one way para os resultados dos experimentos de reuso utilizando biorreator de leito empacotado para o R1, R2 e R3.

7.3. Resultados e Discussão

Neste trabalho, o fungo *M. anisopliae* IBCB 425 foi cultivado em biorreatores de colunas empacotadas com diferentes dimensões e os resultados comparados com o cultivo em embalagens plásticas, de modo a poder-se demonstrar a viabilidade de ampliação de escala em um ambiente de condições de cultivo controladas e com menor possibilidade de contaminação exógena. O substrato, arroz misturado a bagaço de cana, foi cultivado em três cultivos sucessivos, de modo a poder-se avaliar a redução dos custos de produção dos esporos.

7.3.1. Cultivo em embalagens plásticas

Na Tabela 7.1 são apresentadas as concentrações de esporos obtidos através do cultivo em 10g e 400g, onde é possível observar que estatisticamente não houve diferença entre os resultados obtidos. O bagaço de cana de cana-de-açúcar junto aos substratos reestruturou o leito com sucesso, não permitindo a formação de aglomerados e compactação do leito nas embalagens, como observado por Cunha et al. (CUNHA et al., 2019) em cultivos com apenas grãos de arroz tipo 1 em embalagens plásticas onde também observou diferença nos resultados obtidos quando o cultivo ocorreu com 10g e 500g de substrato, indicando que o bagaço de cana-de-açúcar junto ao substrato na proporção utilizada neste trabalho, pode favorecer a reestruturação do leito de maneira efetiva, diminuindo problemas como a formação de aglomerados que, impede o crescimento do microrganismo entre as partículas em contato.

Na Figura 7.2 são apresentados os perfis de temperatura resultantes da geração de calor metabólico durante o cultivo do fungo para as cargas substrato de 10g e 400g em embalagens plásticas. Observe-se para menor carga a temperatura é bem controlada,

7. Cultivo do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 utilizando biorreator de leito empacotado e realizando o reuso do substrato, arroz longo

uma vez que a temperatura máxima foi de 28,7 °C ($T_{\max}$) após 72h de cultivo e temperatura média de 28,2 °C (T_m), com desvio padrão de 0,7 °C. Já para a carga de 400 g, $T_{\max}$ foi de 29,8°C, também com 72h de cultivo, T_m foi 29,3°C, com desvio padrão de 1,8°C, demonstrando ser esta uma condição com menor controle de temperatura, embora ainda dentro de condições adequadas para o cultivo, como demonstrou Cunha et al. (2019). Estes autores cultivaram o fungo somente em arroz, em embalagens contendo 500 g de substrato seco, e observaram $T_{\max}$ de 31,0°C e a formação de aglomerados após o cultivo, de modo que o uso de bagaço de cana forneceu a estrutura física adequada ao meio e contribuiu para a remoção de calor metabólico devido ao aumento da porosidade do meio, pois leitos formados apenas por arroz possui uma porosidade de 0,464 como descreve Cunha et al. (2019), e leitos formados por mistura de arroz e bagaço de cana-de-açúcar na proporção de 9:1 é de 0,632 obtidos nos testes realizados neste trabalho.

Tabela 7. 1 - Concentração de esporos do fungo *M. anisopliae* obtido através do cultivo em embalagens plásticas utilizando como substrato mistura de arroz e bagaço de cana-de-açúcar na proporção de 9:1.

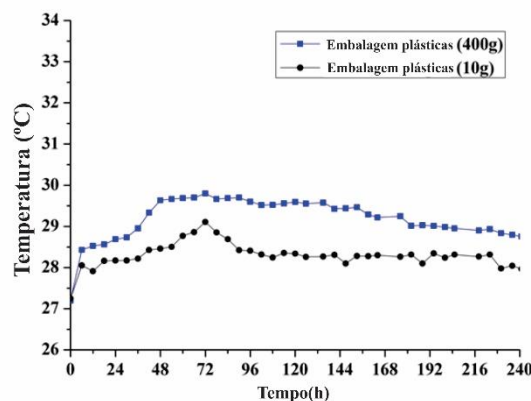
Carga	Ce (10 ⁹ esporos/gss)	DP (10 ⁸ esporos/gss)	CV (%)	T_{max}
10g	3,91 _a	0,15	3,8	28,7°C
400g	3,63 _a	0,24	6,6	29,8°C

(*) Letras diferentes nas linhas indicam que há diferença estatística entre as médias pelo teste de Tuckey ao nível de 5 % de significância; Ce = concentração de esporos; $T_{\max}$ = temperatura máxima.

Fonte: (Próprio autor)

7. Cultivo do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 utilizando biorreator de leito empacotado e realizando o reuso do substrato, arroz longo

Figura 7 2 - Perfis de temperatura obtidos no cultivo do fungo *M. anisopliae* IBCB 425 em embalagens plásticas empregando-se arroz e bagaço de cana como substratos.



Fonte: (Próprio autor)

7.3.2. Cultivo em biorreatores de leito empacotado

Na Tabela 7.2 são apresentadas as concentrações de esporos (C_e) e a temperatura máxima observadas no cultivo em biorreator de leito empacotado estreito (BRE) com e sem bagaço junto ao substrato, onde é possível constatar que não há diferença estatística as médias de C_e no biorreator com bagaço e nas embalagens de 400g e que os coeficientes de variação são similares aos obtidos por Cunha et al. (2019) em biorreatores de bandeja. As temperaturas máximas (T_{max}) obtidas em ambos os ensaios foram praticamente iguais, indicando que ambas as condições de cultivo propiciaram razoável controle de temperatura, assim como (T_m) que foi a mesma para ambas configurações, indicando que o biorreator fornece ao microrganismo condições parecidas as obtidas em embalagens plásticas. Ao final dos ensaios, foi observado visualmente bom crescimento do fungo em todas as posições no biorreator, sem a formação de aglomerados, constatando-se que o uso do bagaço de cana propiciou boa estrutura física ao leito e, conseqüentemente, boa aeração. O fenômeno de adesão do arroz à parede da coluna e conseqüente deficiência de crescimento relatado por Van Breukelen et al., (2011) não foi observado.

A utilização do bagaço junto ao substrato favoreceu os resultados obtidos, e isso pode ser observado em dois aspectos, como: o aumento da concentração de esporos e não ocorrência da compactação do leito, diferente do que ocorreu quando se utilizou apenas arroz tipo 1, onde houve forte compactação do leito e assim não ocorrendo o

7. Cultivo do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 utilizando biorreator de leito empacotado e realizando o reuso do substrato, arroz longo

desenvolvimento do microrganismo no meio do leito, havendo desenvolvimento de maneira visível, apenas nas extremidades, ou seja, nas partículas que permaneceram longe da parede do BRE sem bagaço. A temperatura obtida no BRE sem bagaço, também indica que a parte estrutural do leito foi um fator crítico para a diminuição da C_e , pois mesmo que, a T_{max} seja maior quando se utiliza apenas arroz tipo 1 a T_m é igual aos outros testes, indicando que a temperatura não foi um fator para a diminuição da C_e .

Tabela 7. 2 - Concentrações de esporos (C_e) do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 ao final do tempo de cultivo no biorreator estreito (BRE) e em embalagens plásticas (400 g) após o primeiro cultivo (R1) e temperaturas máximas (T_{max}).

Cultivo	C_e (10^9 esporos/gss)	DP (10^8 esporos/gss)	CV (%)	T_{max} (°C)
BRE s/ bagaço	1,95 ^b	0,24	12,3	31,0
BRE c/ bagaço	3,12 ^a	0,25	8,0	29,8
Embalagem Plástica	3,63 ^a	0,24	6,6	29,7

(*) DP- Desvio padrão; CV- coeficiente de variação (CV = Média/DP). Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey a 95% de intervalo de confiança.

Fonte: (Próprio autor)

Na Tabela 7.3 são apresentadas as concentrações de esporos por módulo obtidas no biorreator largo (BRL), a concentração de esporos média (C_M) e as temperaturas média e máxima por módulo. Comparando-se as concentrações de esporos nos biorreatores estreito e largo não foi observada diferença estatística significativa, de modo que se pode considerar que a ampliação de escala foi bem sucedida. Comparando-se as concentrações de esporos entre os módulos do BRL constata-se que os resultados são similares e não apresentam diferença estatística significativa, embora tenha havido diferença expressiva da temperatura máxima entre os módulos. No entanto, é possível observar que a temperatura máxima atinge valores cerca de 4,9°C acima da temperatura ideal de cultivo. De acordo com Cunha et al. (2019), temperaturas próximas a 30°C resultam em concentração de esporos similares às obtidas a 28°C e que a 33°C a concentração de esporos reduz-se praticamente metade da concentração ideal. Assim, poder-se-ia esperar que houvesse redução significativa em C_e no biorreator largo, mas deve-se levar em consideração que esta temperatura é medida no centro do tubo, de modo que as temperaturas em direção à parede são inferiores, aproximando-se da

7. Cultivo do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 utilizando biorreator de leito empacotado e realizando o reuso do substrato, arroz longo

condição favorável ao cultivo. Assim, pode-se afirmar que a escala piloto foi capaz de manter as condições de cultivo dentro de limites aceitáveis, o que também se reflete nos baixos coeficientes de variação de C_e .

Tabela 7. 3 - Concentração de esporos por módulos (C_{Mod}), concentração média de esporos (C_e), temperaturas médias e temperaturas máximas (T_{max}) ao final do cultivo no biorreator largo (BRL) após o primeiro cultivo do substrato (R1).

Módulo	C_{Mod} (10^9 esporos/gss)	DP (10^9 esporos/gss)	CV (%)	T_{max} (°C)	T_{Med} (°C)	C_e (10^9 esporos/gss)	DP (10^9 esporos/gss)	CV (%)
3	3,67	0,25	6,8	30,5	28,9			
4	3,57	0,21	5,8	32,9	30,4	3,62	0,22	6,07
5	3,63	0,20	5,5	31,4	29,3			

(*) DP- Desvio padrão; CV- coeficiente de variação (CV = Média/DP).

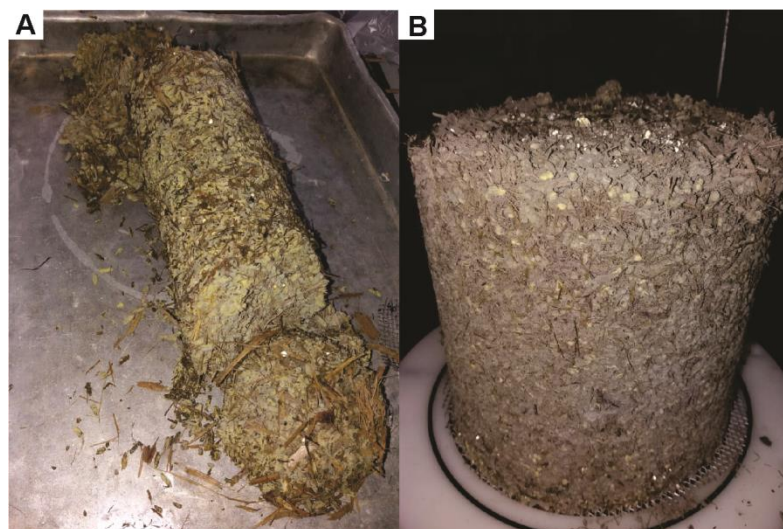
Fonte: (Próprio autor)

Portanto, no BRL a parede do tubo já não proporciona o controle efetivo da temperatura do meio de cultivo, como também observado por Perez; Casciadori; Thoméo, (2019) que empregaram biorreatores de dimensões similares para o cultivo do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em uma mistura de bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo. No presente estudo, a porção média do leito foi a mais aquecida, o que contradiz resultados de Casciadori et al., (2016) que previu, por simulação empregando um modelo a duas fases, que o topo do biorreator seria a região mais aquecida, e um sistema de cultivo similar ao de Perez; Casciadori; Thoméo, (2019).

Similarmente ao biorreator estreito, foi observado visualmente que o crescimento do fungo no biorreator largo foi uniforme, demonstrando novamente a importância de se usar bagaço de cana como agente estruturante do leito. Em ensaios preliminares realizados (dados não apresentados), observou-se a necessidade de se colocar as telas de contenção entre os módulos do BRL, pois sem as mesmas houve compactação do leito e a altura final da coluna foi cerca de 50 cm inferior à altura original. A Figura 7.3 mostra que a colonização do meio de cultivo foi uniforme para ambos os biorreatores.

7. Cultivo do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 utilizando biorreator de leito empacotado e realizando o reuso do substrato, arroz longo

Figura 7 3 - Fotografias do leito empacotado constituído por mistura de arroz e bagaço de cana-de-açúcar na proporção de 9:1 após o cultivo. a) BRE; b) BRL



Fonte: (Próprio autor)

Dorta e Arcas, (1998) cultivaram *M. anisopliae* em biorreatores de leito empacotado feitos em vidro com 2,5, 8 e 15 cm de diâmetro, sendo o controle de temperatura realizado colocando-se os biorreatores em uma sala com temperatura controlada. Foram observadas variações radiais e longitudinais de temperatura nos dois biorreatores maiores, sendo a variação radial de 3,3 °C ($T_{\max} = 32$ °C) na coluna de 8 cm e de 5,4 °C ($T_{\max} = 37,8$ °C) na de 15 cm, uma diferença não muito expressiva entre ambas as colunas, mas com temperaturas máximas bem distintas que interferiram expressivamente nas concentrações de esporos obtidas. Neste trabalho, as elevações de temperatura observadas para BRE e BRL foram inferiores à obtidas por Dortas e Arcas, possivelmente devido ao material de construção dos biorreatores (alumínio neste trabalho) e pelo emprego de água para refrigerar o leito, pois o vidro proporciona uma resistência à condução expressiva e o ar proporciona uma resistência convectiva muito superior à da água, de modo que a temperatura na face interior do tubo certamente era distinta da ajustada para a sala climatizada. Outro aspecto que poderia explicar a menor elevação de temperatura neste trabalho é a porosidade do leito, que certamente é superior à da mistura farelo de trigo com palha de arroz (proporção 1:1), proporcionando melhor aeração.

Dorta e Arcas (1998) afirmaram ainda que devido às variações radiais de temperatura, a concentração de esporos foi maior na região da parede do tubo do que no centro do leito, pois os autores observaram variação da umidade do meio de cultivo,

7. Cultivo do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 utilizando biorreator de leito empacotado e realizando o reuso do substrato, arroz longo

provocada pela variação de temperatura. Neste trabalho não se coletou dados de temperatura radialmente como já citado e também não foi determinada a umidade do meio de cultivo ao final do processo. Quanto aos perfis longitudinais, Dorta e Arcas notaram que, para o biorreator de 15 cm, houve aumento da temperatura com o aumento da altura de leito, assim como observado neste trabalho, embora Dorta e Arcas tenham empregado um biorreator de apenas 32 cm.

Van breukelen et al., (2011) realizaram ensaios em biorreatores de leito empacotado com dimensões de 20, 40 e 200mm de diâmetro e 80, 180 e 600 mm de altura, respectivamente. Como meio de cultivo foi utilizado cânhamo impregnado com glicose, extrato de levedura e peptona bacteriológica (proporções em peso 8: 1: 1). Os autores observaram que no biorreator de maior diâmetro houve compactação na base do leito, resultando em saturação incompleta do ar de entrada, o que promoveu o ressecamento de aproximadamente 5% do volume total do leito. Também constataram que na região da parede houve condensação de água, resultando em baixa esporulação. Como consequência, a concentração de esporos obtida nesta escala foi cerca de 40% inferior à obtida no reator menor. A questão da compactação foi resolvida neste trabalho por meio das telas postadas entre os módulos, enquanto que os problemas de parede comentados por Dorta e Arcas (1998) e por van Breukelen et al. (2011) não foram observados.

7.3.3. Reuso do substrato utilizando biorreator de leito empacotado

Os resultados dos ensaios para o primeiro, segundo e terceiro cultivos sucessivos do arroz (R1, R2 e R3, respectivamente), nos biorreatores estreito e largo são apresentados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. Para o BRE, houve redução de 24% na massa de meio de cultivo do R1 para o R2 e de 20% do R2 para o R3, enquanto que para o BRL houve redução de 20% do R1 para o R2 e de 23% do R2 para o R3. Não houve variação significativa na concentração média de esporos ao final dos cultivos, de modo que o reuso do substrato é uma prática que pode resultar em expressiva redução de custos operacionais para os fabricantes de esporos. Com apenas um uso do substrato no BRE foram obtidos $1,30 \times 10^{12}$ esporos, enquanto que para os três cultivos foram obtidos $3,19 \times 10^{12}$ esporos, um aumento de quase 2,5 vezes, enquanto que para o BRL o aumento foi similar, de 2,4 vezes. Evidentemente, os custos de secagem do material têm que ser avaliados e ensaios que evitem esta operação devem ser realizados para que a

7. Cultivo do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 utilizando biorreator de leito empacotado e realizando o reuso do substrato, arroz longo

viabilidade econômica do reuso possa ser confirmada. Como observado para o cultivo único, os coeficientes de variação obtidos nos três cultivos foram pequenos, demonstrando que o processo é bem controlado. Kruger et al., (2014) empregaram diversos substratos para o cultivo de *M. anisopliae* (arroz, arroz parboilizado, arroz integral e trigo) em embalagens plásticas e obtiveram concentrações de esporos próximas às obtidas neste trabalho, mas afirmaram que apenas arroz parboilizado pode ser reutilizado em dois cultivos sucessivos. Barra-Bucarei; Vergara; Cortes, (2016) também reutilizaram arroz parboilizado em dois cultivos sucessivos e obtiveram concentrações de esporos próximas para os dois cultivos.

Tabela 7. 4 - Concentrações de esporos (C_e), temperaturas máximas (T_{max}) do fungo *M. anisopliae* IBCB 425 ao final do cultivo no biorreator estreito (BRE) após o primeiro (R1), segundo (R2) e terceiro (R3) cultivos.

Cultivo	Massa inicial (g)	C_e (10^9 esporos/gss)	DP (10^9 esporos/gss)	CV (%)	T_{max} (°C)
R1	400	3,25 ^A	0,24	7,3	29,8
R2	304,1	3,45 ^A	0,12	3,4	30,5
R3	242,5	3,46 ^A	0,24	6,9	30,2

(*) DP- Desvio padrão; CV- coeficiente de variação ($CV = Média/DP$). Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey a 95% de intervalo de confiança.

Fonte: (Próprio autor)

Observe-se na Tabela 7.4 que para o BRE as temperaturas máximas e médias obtidas ao longo do cultivo pouco foram afetadas nos três cultivos. Porém, quando se observa os dados da Tabela 7.5 para os testes em BRL, as temperaturas máximas no R2 foram ligeiramente acima das observadas nos outros cultivos, mas não o suficiente para provocar alterações significativas na concentração média de esporos. Nas Tabelas 7.4 e 7.5 também se observa baixos coeficientes de variação dos resultados para os três cultivos sucessivos em ambas as dimensões dos biorreatores.

7. Cultivo do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 utilizando biorreator de leito empacotado e realizando o reuso do substrato, arroz longo

1 Tabela 7.5 - Concentrações de esporos por modulo (C_{Mod}), concentração média de esporos (C_e) e temperaturas máximas (T_{max}) do fungo
2 *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 ao final do tempo de cultivo no biorreator largo (BRL) após o primeiro cultivo (R1), segundo cultivo

Cultivo	Módulo	Massa inicial (kg)	C_{Mod} (10 ⁹ esporos/gss)	DP (10 ⁹ esporos/gss)	CV (%)	T_{max} °C	C_e (10 ⁹ esporos/gss)	DP (10 ⁹ esporos/gss)	CV (%)
R1	M3	1,500	3,67	0,25	6,8	30,4	3,62 ^A	0,22	6,0
	M4	1,500	3,57	0,21	5,8	32,9			
	M5	1,500	3,63	0,20	5,5	31,3			
R2	M3	1,100	3,54	0,14	3,9	30,7	3,44 ^A	0,14	4,0
	M4	1,300	3,31	0,15	4,5	33,8			
	M5	1,200	3,48	0,13	3,7	30,8			
R3	M3	0,846	3,52	0,17	4,8	29,9	3,44 ^A	0,16	4,8
	M4	1,019	3,34	0,20	5,9	32,8			
	M5	0,897	3,47	0,13	3,7	30,8			

3 (*) DP- Desvio padrão; CV- coeficiente de variação (CV = Média/DP). Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente de acordo com o teste de
4 Tukey a 95% de intervalo de confiança.
5 Fonte: (Próprio autor)
6
7
8

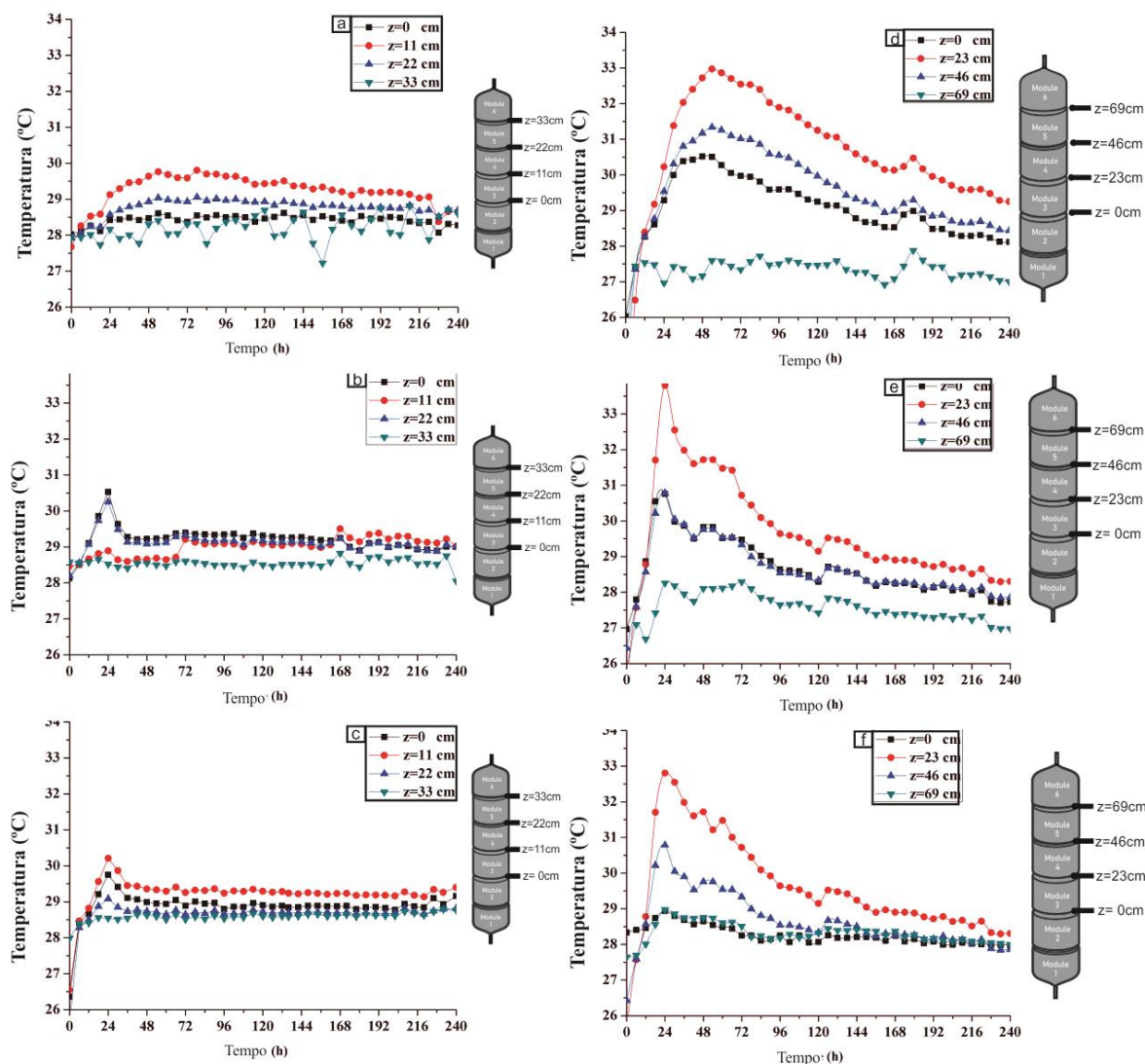
7. Cultivo do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 utilizando biorreator de leite empacotado e realizando o reuso do substrato, arroz longo

Foi possível verificar visivelmente que os grãos de arroz tinham suas estruturas alteradas, havendo quebra dos grãos após cada cultivo. No entanto, não foi observada compactação do meio de cultivo e constatou-se visualmente que a colonização do meio foi uniforme para os três cultivos.

Na Figura 7.4 se observa que houve pouca variação longitudinal de temperatura no biorreator pequeno, enquanto que para o biorreator grande houve variação de temperatura mais expressiva, sendo as temperaturas mais elevadas observadas na porção mediana do leite. Também se observa que no R2 e R3 a cinética de geração de calor metabólico difere da do R1, sendo o pico de temperatura obtido em tempos mais curtos para R2 e R3. Estudos da presença de açúcares redutores no meio de cultivo (dados não mostrados) indicaram que no início do R2 e do R3 há concentração expressiva de açúcares, de modo a sustentar o crescimento microbiano em tempos mais curtos do que no primeiro cultivo, quando o fungo teve que sintetizar enzimas, principalmente amilases, para a quebra da fonte de carbono, preferencialmente amido.

7. Cultivo do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 utilizando biorreator de leito empacotado e realizando o reuso do substrato, arroz longo

Figura 7. 4 - Perfis de temperatura ao longo cultivo de *M. anisopliae* IBCB 425 em biorreator de leito empacotado utilizando mistura de arroz com bagaço de cana-de-açúcar na proporção de 9:1, empregando-se a técnica de reuso do substrato a) R1 - BRE; b) R2 - BRE; c) R3 - BRE; d) R1 - BRL; e) R2 - BRL; f) R3 - BRL



Fonte: (Próprio autor)

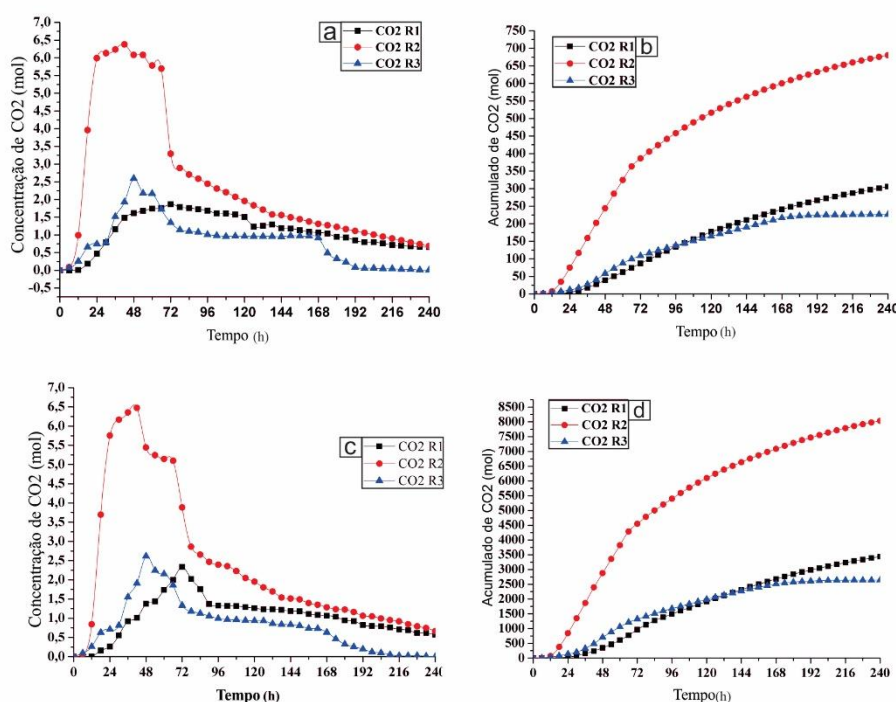
7.3.4. Estimativa da biomassa fúngica por geração de CO₂

Como destacado anteriormente, a reutilização do substrato ocasionou diferenças na adaptação do microrganismo ao substrato e, conseqüentemente, nas fases de crescimento do fungo. Para entender melhor o desenvolvimento do microrganismo foi determinada a concentração de CO₂ na saída das colunas, pois a geração de CO₂ é uma medida indireta para mensurar a biomassa microbiana (FARINAS et al., 2011).

7. Cultivo do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 utilizando biorreator de leito empacotado e realizando o reuso do substrato, arroz longo

Na Figura 7.5 são apresentadas as concentrações de CO₂ instantânea e acumulada, onde é possível observar que o fungo tem seu desenvolvimento alterado no reuso do substrato. Note-se que as concentrações de CO₂ no R2 é expressivamente maior que no R1 e R3. No entanto, embora a quantidade de biomassa no R2 tenha sido maior, as concentrações de esporos nos três cultivos sucessivos foram similares, indicando que o crescimento vegetativo não é diretamente proporcional ao sexual. A ocorrência da máxima concentração de CO₂ não é coincidente com a ocorrência da máxima temperatura em ambos os biorreatores, mostrada na Figura 7.4, indicando que alguns aspectos do processo metabólico do microrganismo precisam ser melhor compreendidos. A similaridade dos resultados das concentrações de CO₂ em ambos os biorreatores indica boa adaptação do fungo às condições de cultivo, mesmo que as variações de temperatura tenham sido mais intensas no BRL.

Figura 7.5 - Cinética de geração de CO₂ obtido do cultivo em biorreator de leito empacotado. a) instantânea - BRE; b) acumulada - BRE; c) instantânea - BRL; d) acumulada - BRL.



Fonte: (Próprio autor)

7.4. Conclusão

O objetivo principal deste tópico foi alcançado, onde se demonstrou que é possível realizar a ampliação de escala no uso de biorreator de leito empacotado para cultivo do

7. Cultivo do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 utilizando biorreator de leito empacotado e realizando o reuso do substrato, arroz longo

fungo *M. anisopliae* IBCB 425, bem como a reutilização do substrato em cultivos sucessivos. Observou-se que a mistura entre bagaço de cana e arroz favorece o aumento de escala, devido ao aumento da porosidade e à melhor estruturação física do leito. O crescimento do fungo nas duas escalas empregadas, uma das quais piloto, foi uniforme, não sendo observadas regiões de crescimento deficiente. Em todos os ensaios foi constatada baixa variabilidade dos resultados, indicando que o processo foi bem controlado. A elevação de temperatura notada no biorreator de escala piloto foi expressiva, mas não provocou redução significativa na concentração de esporos final. As concentrações de esporos nos três cultivos sucessivos foram similares e constatou-se redução na massa de substrato de cerca de 20% de um cultivo para outro, reduzindo a concentração total de esporos. Ainda assim, ao se cultivar sucessivamente o arroz, a concentração final de esporos foi 2,5 vezes maior do que a de um cultivo único. As análises de distribuição de temperatura e das concentrações de CO₂ indicaram diferenças de adaptação do fungo ao meio nos diferentes cultivos, o que não provocou alteração na concentração de esporos em cada um deles.

Os resultados obtidos são de interesse de produtores industriais de esporos para controle biológico de pragas, devido à possibilidade de utilizarem biorreatores para o cultivo do fungo, num ambiente de condições operacionais mais controladas e com menor possibilidade de contaminação exógena, além da redução dos custos de produção devido ao reuso do substrato.

8. EXTRAÇÃO DE ESPOROS AGREGADOS AOS GRÃOS DE ARROZ TIPO 1

8.1.Introdução

Com o uso desenfreado de agentes químicos para controle de pragas nas lavouras, tem desencadeado diversos problemas graves ao meio ambiente, como o risco de extinção das abelhas que, caso ocorra pode levar a um desequilíbrio para toda a humanidade (YOSRI; ABDEL-AZIZ; SAYED, 2018). Para que tais impactos sejam reduzidos, uma alternativa é o uso de bioinseticidas que, além de não ser prejudicial ao ser humano, também pode ser muito específico para controle de diversas pragas. Na América Latina um dos fungos mais utilizados é o fungo *Metarrhizium anisopliae*, o qual possui mais de 200 pragas catalogadas nas quais o fungo foi identificado como hospedeiro (SANTOS et al., 2017).

No Brasil o maior uso de *M. anisopliae* é para controle da cigarrinha da folha da cana-de-açúcar, no qual já são mais de 3 milhões de hectares de cana-de-açúcar tratados com o fungo (CASTRO et al., 2016). Porém, para sucesso na aplicação do microrganismo se faz necessária a introdução inundativa com concentrações de 10^{11} - 10^{13} esporos/há para que ocorra uma mortalidade de 85-90% das pragas (DALZOTO; UHRY, 2009; SCHMIDT et al., 2007). Para tanto, se faz necessária a produção de esporos em massa, mas atualmente na maioria das biofábricas, todas as etapas que compõe o processo de produção de esporos é desprovido de tecnologia e equipamentos sofisticados, não sendo diferente, para a etapa de extração de esporos, onde ao fim do cultivo, as embalagens plásticas são abertas para que ocorra a secagem do substrato e em seguida seguem para a extração, podendo ser de duas maneiras, uma por peneiras vibratórias, que provoca muita perda de esporos para o ambiente (MÉNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2018b) e a outra por mistura do substrato com água e a utilização de liquidificadores industriais, formando uma suspensão que é filtrada à vácuo a seguir, em filtros de papel que são posteriormente secos em estufa (ALVES; FARIA, 2010; MASCARIN; QUINTELA, 2013). Jenkins et al., (1998) relatam o uso de uma secadora de roupas adaptada, onde era adicionado o substrato e que era feita girar para a remoção dos esporos, que eram a seguir arrastado por ar seco injetado no interior da secadora a altas vazões, sendo os esporos recolhidos em ciclones. Existem poucas pesquisas envolvendo o assunto, mas no intuito de modernizar a extração e secagem de esporos *M. anisopliae* Horaczek; Viernstein, (2004), utilizaram spray-dryer, liofilizador e leito fluidizado para secar soluções com esporos dos fungos *B. brongniartii* e *M. anisopliae*. Os autores empregaram

8. Extração de esporos agregados aos grãos de arroz tipo 1

uma calda composta por leite desnatado e polivinilpirrolidona (PVP K90) para a extração dos conídios, uma vez que ambos agentes tinham capacidade de proteger os conídios após a secagem. A liofilização resultou em conídios com maior viabilidade e os ensaios por spray-drying mostraram forte influência da temperatura de secagem sobre a viabilidade. Infelizmente, os autores pouco exploraram as variáveis de secagem em todos os aparatos testados.

Mediante ao exposto, este trabalho tem como objetivo realizar a extração seca dos esporos, utilizando um tambor rotativo, e a extração líquida, seguida por secagem em spray-dryer, de modo a modernizar esta etapa da produção de esporos.

8.2. Materiais e Métodos

8.2.1. Microrganismo

Foi utilizada a linhagem do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* IBCB 425, fornecida pelo Instituto Biológico de São Paulo. Inicialmente se realizou o desenvolvimento do microrganismo em placas de Petri por 15 dias à 28°C. Após desenvolvimento do fungo, se realizou a estocagem do fungo, em tubos de ensaios com meio de batata-dextrose-água (BDA) (Acumedia, EUA) durante 15 dias à 28°C. Após os 15 dias e com o fungo já desenvolvido, adicionou-se óleo mineral, para que se formasse uma camada protetora da colônia. Os tubos de ensaio foram mantidos em câmaras frias a 4°C até o instante da repicagem. Para a inoculação do substrato, os esporos foram transferidos para frascos Erlenmeyer inclinados, contendo 50 mL de meio de cultivo BDA, com auxílio de alça de platina. Os frascos foram armazenados em câmara DBO a 28 °C por 15 dias.

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

8.2.2. Cultivo em embalagens de polipropileno

Para os ensaios de extração, foram realizados cultivos em embalagens plásticas de polipropileno, com dimensões de 20x30cm. Em cada embalagem foi acondicionado um total

8. Extração de esporos agregados aos grãos de arroz tipo 1

de 500g de substrato, uma mistura de arroz com bagaço de cana-de-açúcar na proporção de 9:1. Em todas as embalagens foram acoplados bocais de PVC, nos quais foram acoplados tampões de algodão envoltos por gaze, para garantir as trocas de gases e assegurar que não haja contaminação exógena. Para facilitar a aeração e garantir que não ocorra a aglomeração do substrato, adicionou-se no interior das embalagens arames em forma espiral.

O fungo foi cultivado a 28°C, por um período de 10 dias em câmara DBO em ausência de luz (CUNHA et al., 2019; DORTA; ARCAS, 1998; POLAR et al., 2005). A umidade do substrato foi inicialmente determinada em analisador de umidade MB45 (Ohaus, Parsippany, NJ USA) e ajustada com água destilada, para que após a adição do inóculo, a umidade fosse 48% (b.u.). A esterilização do material ocorreu em autoclave a 121°C durante 30 minutos.

Neste tópico os testes foram realizados em embalagens plásticas para viabilizar a obtenção dos esporos para que, em trabalhos futuros sejam realizados testes de cultivo em biorreatores para posteriormente a extração dos esporos ocorra no extrator.

8.2.3. Extração a seco

Ao fim do cultivo foi realizada a extração a seco dos esporos do substrato utilizando um tambor com dimensões de 20cm de diâmetro e 40cm de comprimento, assentado sobre dois roletes de rotação controlada originalmente empregado para mover um moinho de jarros MJRCFH025C (P.H.D, Piracicaba-SP, Brasil), como mostra a Figura 8.1. Dentro do tambor havia duas aletas retas longitudinais com 2cm de lagura, postadas perpendicularmente em relação à parede do tambor, a fim de aumentar a agitação interna das partículas. Para retirada dos esporos de dentro do tambor. O ar utilizado foi fornecido por um compressor, que antes passava por um filtro para retenção de partículas maiores, em seguida era medido em um medidor de vazão para que, em seguida percolasse uma coluna de sílica gel, para que fosse parcialmente seco, em seguida o ar seco era injetado dentro do tambor em velocidade controlada, sendo os esporos coletados em um ciclone. Foram realizados dois ensaios em uma condição determinada em ensaios preliminares. A vazão de ar empregada foi de 33 L/min, o tempo de rotação foi de 12 horas a 60 rpm e grau de enchimento do tambor de 35% (equivalente a 1750g de substrato). O ciclone utilizado possuía dimensões como mostra a Figura 8.2.

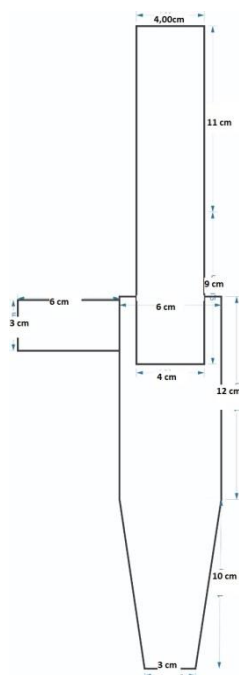
8. Extração de esporos agregados aos grãos de arroz tipo 1

Figura 8. 1 – Sistema utilizado para a rotação do tambor



Fonte: (Próprio autor)

Figura 8. 2 - Ciclone utilizado nos testes de extração a seco com dimensões



Fonte: (Próprio autor)

Ao fim do período de extração, pesou-se a massa recolhida no ciclone, à qual foi adicionada 1 L de solução Tween 80 a 0,1% para posterior contagem dos esporos. O restante do material sólido retido no tambor foi transferido para embalagens plásticas com dimensões

Lucas Portilho da Cunha

8. Extração de esporos agregados aos grãos de arroz tipo 1

de 40x80cm, que receberam 3 L de solução Tween 80, seguido de agitação em um banho com agitação recíprocante MA 095 (Marconi, Piracicaba, BRA) a 120 b.p.m por 50 minutos. Ao término do período de agitação, realizou-se a contagem dos esporos.

8.2.4. Extração de esporos líquida seguido de secagem em spray-dryer

Ao fim do cultivo, realizou-se a extração de esporos adicionando-se 5 mL/gss de solução aquosa de Tween 80 a 0,1 % às embalagens, seguindo-se de agitação recíprocante a 120 batimentos por minutos durante 50 minutos. Da suspensão resultante foram coletadas amostras para contagem dos esporos, ajustando-se a concentração de esporos para 10^8 esporos/mL para todos os ensaios de secagem.

Os ensaios foram realizados em spray-dryer modelo MSD 0.5 (Labmaq, Ribeirão Preto, Brasil), dotado de bico atomizador de duplo fluido com orifício de saída de 1,0 mm e câmara de secagem com 51 cm de altura e diâmetro interno de 13 cm, sendo a coleta dos pós no ciclone de alumínio apresentado na Figura 8.2. A temperatura de saída (T_s), a vazão de alimentação da suspensão (Q_{alim}) e a proporção adjuvante/conídios (ST) foram as variáveis controladas. Para o bombeamento da suspensão foi empregada uma bomba peristáltica QDOS-30 (Watson-Marlow, Falmouth, Reino Unido). Em todos os ensaios de secagem os parâmetros pressão do ar de atomização, vazão do ar de secagem e vazão do ar de atomização foram fixados em 4,5 Kgf/cm², 0,55 m³/min e 40 L/min, respectivamente, baseado em testes preliminares. A suspensão de esporos e adjuvante foi mantida em constante agitação, à temperatura ambiente, com auxílio de um agitador magnético. Os efeitos da secagem sobre os esporos foram analisados através dos testes de viabilidade, descritos no Tópico 8.2.5. Para os ensaios de secagem, empregou-se como adjuvante maltodextrina 40 DE. Os ensaios seguiram um planejamento estatístico fatorial do tipo Box-Behnken, com análise por superfície de resposta, sendo as variáveis proporção adjuvante:conídios (m/v) onde se fixou a concentração de esporos e variou a concentração de maltodextrina, temperatura de saída e vazão de alimentação da suspensão as apresentadas na Tabela 8.1.

8. Extração de esporos agregados aos grãos de arroz tipo 1

Tabela 8. 1 - Planejamento estatístico fatorial para os ensaios de secagem

Variaveis	Níveis		
	-1	0	1
T_s (°C)	75	90	105
Q_{alim} (mL/min)	5	10	15
ST (%)	10	15	20

Fonte: (Próprio autor)

8.2.5. Testes de viabilidade

Para avaliar a influência da secagem sobre a qualidade dos esporos, foram realizados testes de viabilidade dos esporos, realizado por micro cultivo em lamínula de vidro. Para cada tratamento de secagem foram preparadas duas lamínulas, sobre as quais foram previamente marcados três círculos em sua face inferior, recobertas com uma fina camada de meio BDA. Pingou-se com o auxílio de um conta gotas, uma gota da suspensão fúngica sobre o meio de cultura em cada círculo. A suspensão foi obtida a partir do material seco, ao qual foi adicionada solução aquosa de Tween 80, fixando-se a concentração 10^8 esporos/mL em todos os ensaios.

As lamínulas foram acondicionadas individualmente em câmaras úmidas e incubadas por 16 horas em DBO a 28°C. As câmaras úmidas foram preparadas em placas de Petri, com duas porções de algodão umedecido com água destilada, e duas hastes de madeira para darem suporte às lâminas. Após o período de incubação, adicionou-se uma gota de corante azul-lático sobre a área dos círculos, para deter a germinação e facilitar a visualização dos esporos. Em seguida a observação foi realizada em microscópio óptico com 40x de aumento, identificando-se esporos germinados e não germinados. Os esporos germinados eram aqueles cujo tubo de germinação apresentava tamanho de ao menos duas vezes o tamanho do esporo.

8.3.Resultados e Discussão

Na Tabela 8.2 são dispostas as concentrações coletadas após extração a seco em tambor rotativo e o controle realizando a extração com solução Tween, onde é possível observar que se coletou 61% dos esporos no ciclone e o restante por extração líquida (restante que ficou no tambor agregados aos substratos). Na Figura 8.3 é possível observar o material

8. Extração de esporos agregados aos grãos de arroz tipo 1

recolhido no ciclone, o qual onde se constata que junto aos esporos recolhidos também se recolheu material fibroso (bagaço de cana-de açúcar), indicando que o ciclone não está bem dimensionado para recolher apenas esporos, bem como grãos de arroz tipo 1 são observados.

Tabela 8. 2 - Concentração de esporos obtidos através da extração a seco, utilizando tambor rotativo.

	10^{12} Esporos	CAT (g)	EC 10^{12} Esporos
Ciclone	1,28	1750g	5,35
Tambor	0,81		
Total obtidos	2,09		

(*)Nota: EC- Extração convencionial com Tween; CAT: Carga total de substrato utilizada na extração.

Fonte: (Próprio autor)

Figura 8. 3 - Material recolhido no ciclone após a extração a seco.



Fonte: (Próprio autor)

Ao término da extração líquida no tambor, foi possível observar que os grãos de arroz possuíam coloração escura, também observada nos ensaios anteriores quando se empregou

8. Extração de esporos agregados aos grãos de arroz tipo 1

apenas a extração líquida. Também foi possível observar em testes preliminares que quanto mais úmidos os grãos, mais difícil era a extração dos esporos das partículas e para isso foi necessário um tempo maior de extração para que ocorresse a secagem parcial do meio de cultivo.

Na Tabela 8.2 é possível observar que a concentração de esporos recolhida no ciclone foi próxima a concentração de esporos obtidas utilizando a técnica de extração de esporos convencional com solução Tween, demonstrando que o equipamento pode se tornar uma ferramenta para as biofábricas. Se otimizadas as variáveis (frequência de rotação, o fluxo de ar, tamanho do tambor, grau de enchimento, número de aletas, umidade do ar de arraste e tempo de extração) e aprimorado o dimensionamento do ciclone, acredita-se poder melhorar a eficiência de coleta.

A extração de esporos dos grãos foi projetada pensando na redução de volume para transporte e também para aumentar a vida de prateleira deste produto, porém neste trabalho não foi realizado testes para tal averiguação, assim como testes de viabilidade para extração a seco.

Na Tabela 8.3 são apresentados os resultados dos ensaios realizados em *spray-dryer*, onde se pode observar baixa umidades dos pós secos e viabilidade moderada dos esporos. Nas Figuras 8.4 e 8.5 são apresentados os diagramas de pareto resultantes da ANOVA do modelo ajustado aos dados experimentais para as respostas umidade e viabilidade, respectivamente, assumindo-se intervalo de confiança de 90%. Note-se que os fatores linear e quadrático ligados à temperatura e o fator de inferência cruzada temperatura-sólidos totais foram significativos para a umidade e que nenhum dos fatores foi significativo para a viabilidade. Tais resultados ficam mais evidentes na distribuição de fontes de variabilidade apresentada na Tabela 8.4, onde se observa que o modelo para a umidade é preditivo, mas para a viabilidade não. As maiores fontes de erro devem-se à falta de ajuste do modelo aos dados experimentais, denotando que o modelo deveria ser reparametrizado, ou um novo conjunto de dados relativos a uma redefinição das faixas das variáveis preditoras deveria ser analisado.

Também é possível observar que a recuperação de sólidos ficou entre 47-59%, sendo o modelo não preditivo neste caso e os resultados não apresentados em detalhe. Tais rendimentos são comuns nesta escala de equipamento, mas tendem a ser expressivamente maiores em *spray-dryers* de escala industrial.

8. Extração de esporos agregados aos grãos de arroz tipo 1

Tabela 8. 3 - Resultados obtidos na secagem por spray dryer

Teste	T _s (°C)	Q _{alim} (mL/min)	ST (%)	Peso (g)	Rendimento (%)	Umidade (%)	Viabilidade (%)
1	-1	-1	0	7,05	47	3,85	42,27
2	1	-1	0	6,81	45	2,75	30,00
3	-1	1	0	6,51	43	4,12	30,29
4	1	1	0	8,91	59	3,10	25,87
5	-1	0	-1	5,75	58	3,80	43,5
6	1	0	-1	4,78	48	3,93	25,00
7	-1	0	1	9,1	46	5,15	21,11
8	1	0	1	9,2	46	2,04	27,34
9	0	-1	-1	4,83	48	2,58	28,09
10	0	1	-1	5,07	51	1,38	48,75
11	0	-1	1	9,18	46	2,88	18,57
12	0	1	1	9,86	49	3,02	63,00
13	0	0	0	7,75	52	3,09	31,26
14	0	0	0	7,21	48	2,44	36,16
15	0	0	0	6,77	45	3,18	34,62

(*) Nota: T_s – temperatura de saída, ST – concentração de maltodextrina, Q_{alim} vazão de alimentação.
 Fonte: (Próprio autor)

8. Extração de esporos agregados aos grãos de arroz tipo 1

Figura 8. 4 - Diagrama de pareto para o ajuste do modelo estatístico aos dados de umidade dos pós de maltodextrina-esporos secos em spray-dryer a 90% de intervalo de confiança

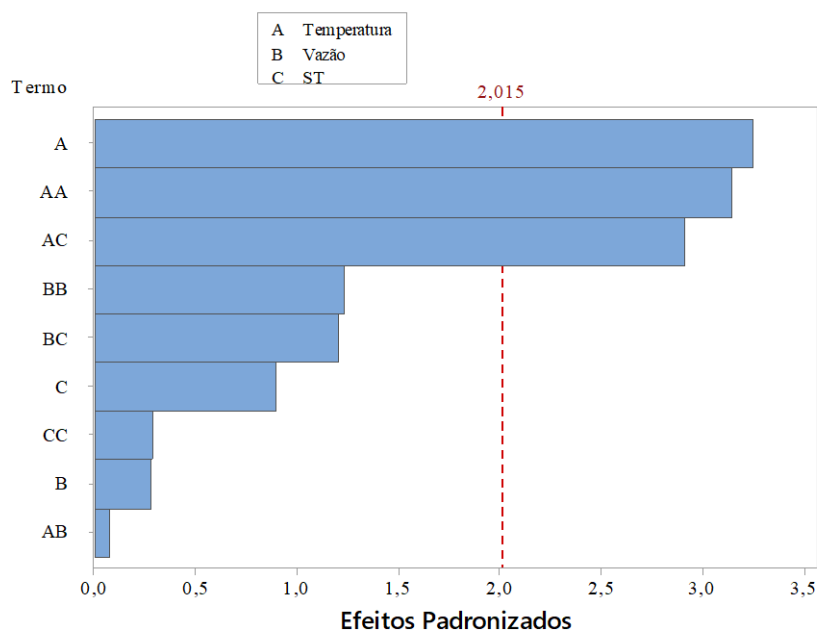
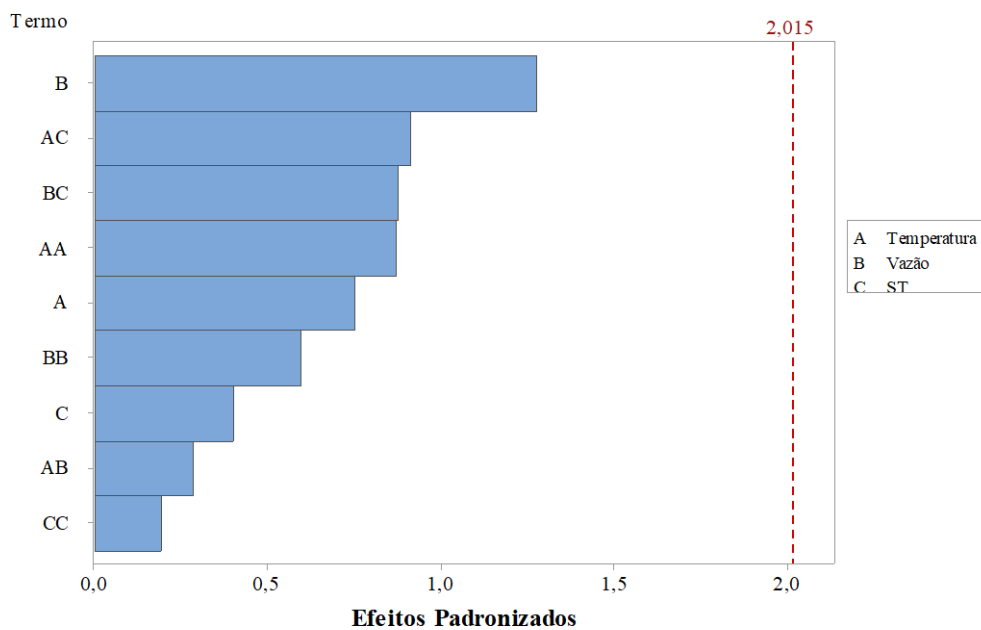


Figura 8. 5 - Diagrama de pareto para o ajuste do modelo estatístico aos dados de viabilidade dos conídios após secagem em spray-dryer a 90% de intervalo de confiança.



8. Extração de esporos agregados aos grãos de arroz tipo 1

Tabela 8. 4 ANOVA para o ajuste do modelo quadrático aos dados experimentais de umidade e viabilidade provenientes dos ensaios de secagem em *spray-dryer*.

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-p
Umidade					
Modelo	9	10,3722	1,15247	3,74	0,080
Erro	5	1,5401	0,30802		
Falta de ajuste	3	1,2141	0,40468	2,48	0,300
Erro puro	2	0,3261	0,16303	*	*
Total	14	11,9124			
Viabilidade					
Modelo	9	973,05	108,117	0,59	0,768
Erro	5	915,94	183,187		
Falta de ajuste	3	903,38	301,126	47,96	0,020
Erro puro	2	12,56	6,279	*	*
Total	14	1888,99			

(*) GL: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados residual; QM: quadrado médio dos resíduos.
 Fonte: (Próprio autor)

A umidade dos pós pode ser considerada adequada para posterior armazenamento, embora uma análise de atividade de água pudesse fornecer informações mais valiosas neste sentido. A viabilidade foi baixa e serão necessários outros ensaios para se definir se a técnica é adequada a este tipo de produto ou não. Possivelmente, o agente carreador poderia ser avaliado para proporcionar maior proteção aos esporos, bem como a quantidade de sólidos totais. As temperaturas ficam limitadas à capacidade de secagem das partículas e não se prevê que possam ser reduzidas significativamente.

Horaczek; Viernstein, (2004), verificaram forte influência da temperatura sobre a viabilidade a viabilidade dos esporos de *Beauveria brongniartii*, assim como observado nos testes realizados neste trabalho. As temperaturas de saída do *spray-dryer* destes autores foram expressivamente mais baixas das aqui empregadas, inferiores a 73%, e enquanto as temperaturas de saída foram superiores a 53°C, a germinação foi superior a 90%, caindo expressivamente acima desta temperatura. Ressalte-se que a vazão de suspensão empregada pelos autores variou entre 1 e 4 mL/min, de modo a controlar a temperatura na saída do secador, vazões estas significativamente inferiores às aqui empregadas. Assim, considerando-se as temperaturas de saída e as vazões de suspensão aqui empregadas, as viabilidades encontradas podem ser consideradas promissoras. Kassa et al. (2004) também realizaram a

8. Extração de esporos agregados aos grãos de arroz tipo 1

secagem de esporos do fungo *M. anisopliae* obtidos por cultivo submerso (contendo 3% de biomalte e 1% de extracto de levedura), utilizando um *spray-dryer* com temperatura de entrada e saída de 64°C e 48°C, respectivamente, e como carreadores utilizaram leite em pó e melaço na proporção de 1:1, onde observaram após 24 horas germinação de cerca de 90% dos esporos, porém Kassa e colaboradores observaram uma diminuição na viabilidade dos esporos. Já Krall et al. (1997) relatam efeitos da secagem sobre a germinação e não na viabilidade dos esporos. Krall e colaboradores observaram que os esporos secos demoraram mais que o comum para germinarem, mas que a viabilidade foi praticamente a mesma de esporos não secos. Os esporos utilizados por Krall e colaboradores foram obtidos por cultivo líquido composto por 2% de glicose, 2% de extrato de levedura, 1,5% íngreme e 0,2% de Tween, que pode ter ajudado na proteção dos blastosporos, no trabalho não é relatado o uso de carreadores junto a solução de blastosporos.

8.4. Conclusão

O objetivo principal desta seção foi extrair os esporos dos grãos do substrato, podendo-se afirmar que uma das técnicas foi positiva, a de extração a seco, e que a outra, extração com líquido e posterior secagem por *spray-dryer*, é promissora, mas carece de melhor desenvolvimento.

A extração a seco em tambor rotativo proporcionou boa recuperação dos esporos. O processo, de um modo geral, é simples e há uma redução expressiva no tempo de secagem e extração dos grãos, quando comparado aos processos convencionais encontrados na indústria.

Na extração líquida seguida por secagem em *spray-dryer*, a viabilidade dos esporos foi fortemente afetada pelas variáveis do processo, temperatura, vazão de suspensão e quantidade de sólidos totais, ficando em torno de 50%. A umidade dos pós secos, constituídos por esporos, frações miceliais e maltodextrina, foi inferior a 5%, indicando boa perspectiva para o posterior armazenamento dos pós. A técnica mostrou-se promissora, mas ainda requer muitos ajustes antes de ser considerada viável.

9. Trabalhos futuros

9. TRABALHOS FUTUROS

Com este trabalho foi possível a abertura de novas vertentes ainda não conhecidas no cultivo do fungo *M. anisopliae* e como sempre se deve ter continuidade, este trabalho indica as seguintes etapas para obter melhorias e diminuição nos custos de produção dos esporos do fungo *M. anisopliae*:

- Realizar testes em novos substratos, para que, com as informações aqui detalhadas da preferência do fungo se encontre um substrato parecido com as características do arroz tipo 1 e com menor valor de mercado.

- Também se recomenda testes em biorreator de leito empacado com dimensões maiores e mais módulos.

- Outra linha de estudo aqui iniciada foi a abertura para modelagem matemática com os dados de CO₂, onde se indica, a geração de biomassa durante o período de cultivo, sendo possível assim obter dados de ampliação de escala de maneira a não influenciar no desenvolvimento do microrganismo.

- Aumentar a amplitude das variáveis aqui pouco exploradas para extração de esporos em tambor rotativo, onde se demonstrou ser uma ótima alternativa para extração dos esporos agregados ao substrato.

- Outros testes a serem explorados é o de secagem de esporos em spray dryer, onde aqui se indicou que é possível realizar, porém a quantidade de carreador utilizada neste trabalho foi pouca, sendo necessário realizar novos testes aumentando a quantidade de carreador.

REFERÊNCIAS

AGALE, S. V; GOPALAKRISHNAN, S.; AMBHURE, K. G. Mass Production of Entomopathogenic Fungi (*Metarhizium anisopliae*) using Different Grains as a Substrate. v. 7, n. 1, p. 2227–2232, 2018.

ALEGRE, P. CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE QUITINASES DO Tese de Doutorado César Milton Baratto César Milton Baratto. p. 122, 2005.

ALENCAR, R. B.; BIONDI, M. M.; PAIVA, P. M. G.; VIEIRA, V. L. A; CARVALHO JR, L. B.; BEZERRA, R. S. Alkaline proteases from digestive tract of four tropical fishes. *Brazilian Journal of Food Technology*. Vol. 6, 2003, p. 279-284.

ALJAMMAS, H. A.; AL FATHI, H.; ALKHALAF, W. Study the influence of culture conditions on rennin production by *Rhizomucor miehei* using solid-state fermentations. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 2017.

ALMEIDA, J. E. M., BATISTA FILHO, A. Banco de Microrganismos Entomopatogênicos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 20, p. 30–33, 2001.

ALONSO-DÍAZ, M. A; GARCÍA, L; GALINDO-VELASCO, E; LEZAMA-GUTIERREZ, R; ANGEL-SAHAGÚN, C. A; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I; FRAGOSO-SÁNCHEZ, H. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 3–4, p. 336–340, 2007.

ALVES, L. F. A; ALVES, VIVIANE S; BRESSAN, D.F; NEVES, P. M.O.J; ALVES, S. B. Ocorrência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em adultos de cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) em aviários comerciais em Cascavel, PR. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 6, p. 793–795, 2004.

ALVES, R. T.; FARIA, M. Pequeno Manual Sobre Fungos Entomopatogênicos. **Embrapa Cerrados**, p. 47, 2010.

ARORA, S; DUBEY, M; SINGH, P; RANI, R; GHOSH, S. Effect of mixing events on the production of a thermo-tolerant and acid-stable phytase in a novel solid-state fermentation bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 61, n. June, p. 12–23, 2017.

Referências

- ARRUDA, W. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E MORFOFISIOLÓGICA DE DIFERENTES ISOLADOS DO FUNGO ENTOMOPATOGENICO *Metarhizium anisopliae* E ANÁLISE MORFOLÓGICA DO PROCESSO DE INFECÇÃO EM *Boophilus microplus* Caracterização Molecular e Morfofisiológica de Diferentes Isolados do. 2005.
- ARZUMANOV, T.; JENKINS, N.; ROUSSOS, S. Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3–4, p. 1037–1042, 2005.
- ASHOK, A; DORIYA, K; RAO, D. R. M; KUMAR, D. S. Design of solid state bioreactor for industrial applications: An overview to conventional bioreactors. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, n. October 2016, p. 11–18, 2017.
- BARRA-BUCAREI, L.; VERGARA, P.; CORTES, A. Conditions to optimize mass production of *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin 1883 in different substrates. **Chilean journal of agricultural research**, v. 76, n. 4, p. 448–454, 2016.
- BARRETO, L. P; LUZ, C; MASCARIN, G. M; ROBERTS, D. W; ARRUDA, W; FERNANDES, É. K.K.. Effect of heat stress and oil formulation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* s.s. on tick cuticle and artificial medium. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 138, p. 94–103, 2016.
- BECHARA et al. Histological events and detection of *Metarhizium anisopliae* using specific primers in infected immature stages of the fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae). 2011
- BEHERA, S. S.; RAY, R. C. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 656–669, 2016.
- 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.
- BEYS DA SILVA, W. O; WALTER O; SANTI, L; CORRÊA, A. P. F; SILVA, L. A.D; BRESCIANI, F. R; SCHRANK, A; VAINSTEIN, M. H. The entomopathogen *Metarhizium anisopliae* can modulate the secretion of lipolytic enzymes in response to different substrates

Referências

including components of arthropod cuticle. **Fungal Biology**, v. 114, n. 11–12, p. 911–916, 2010.

BHANU PRAKASH, G. V. S.; PADMAJA, V.; SIVA KIRAN, R. R. 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.

BILAL, H.; HASSAN, S. A.; KHAN, I. A. Isolation and efficacy of entomopathogenic fungus (*Metarhizium anisopliae*) for the control of *Aedes albopictus* Skuse larvae: Suspected dengue vector in Pakistan. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 4, p. 298–300, 2012.

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.

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

CASCIATORI, F. P.; THOMÉO, J. C. Heat transfer in packed-beds of agricultural waste with low rates of air flow applicable to solid-state fermentation. **Chemical Engineering Science**, v. 188, p. 97–111, 2018.

CASTRO, T., MAYERHOFER, J., ENKERLI, J., EILENBERG, J., MEYLING, N. V., MORAL, R. DE A., DEMÉTRIO, C.G.B., DELALIBERA, I. Persistence of Brazilian isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. robertsii* in strawberry crop soil after soil drench application. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 233, p. 361–369, 2016.

CHAURASIA, A., LONE, Y., WANI, O., GUPTA, U.S. Effect of certain entomopathogenic fungi on oxidative stress and mortality of *Periplaneta americana*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 127, p. 28–37, 2016.

CONAB. **CONAB**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do->

Referências

- mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-de-conjunturas-de-arroz>. Acesso em: 20 set. 2019.
- COSTA, J.A.V., TREICHEL, H., KUMAR, V., PANDEY, A. Advances in Solid-State Fermentation. In: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. [s.l.] Elsevier, 2018. v. 302p. 1–17.
- CRUZ, I.; MONTEIRO, M. A. R. Controle Biológico da Lagarta do Cartucho do Milho, *Spodoptera frugiperda*, utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma pretiosum*. **Comunicado Técnico 98, EMBRAPA**, 2004.
- CRUZ, R.; SOUZA, E. L.; HOFFMAN, E. H. E.; BELINI, M. Z.; CRUZ, V.D.; VIEIRA, C. R. Relationship between carbon source, production and pattern action α -amylase from *Rhizopus* sp. *Rev. Microbiol.* Vol. 28, Pag.101-105, 1997.
- CUNHA, L.P; CASCIATORI, P., CENÇO, I. DE, THOMÉO, J.C. Production of conidia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* ICB 425 in a tray bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2019.
- DA SILVA, F.L., DE OLIVEIRA CAMPOS, A., DOS SANTOS, D.A., DE OLIVEIRA JÚNIOR, S.D., DE ARAÚJO PADILHA, C.E., DE SOUSA JUNIOR, F.C., DE MACEDO, G.R., DOS SANTOS, E.S. Pretreatments of Carnauba (*Copernicia prunifera*) straw residue for production of cellulolytic enzymes by *Trichoderma reesei* CCT-2768 by solid state fermentation. **Renewable Energy**, v. 116, p. 299–308, 2018.
- DALZOTO, P. R.; UHRY, K.F. CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS NO BRASIL POR MEIO DE *BEAUVERIA BASSIANA* (BALS.) VUILL. **Biológico**, v. 71, p. 37–41, 2009.
- DARYAEI, A., JONES, E.E., GLARE, T.R., FALLOON, R.E. Nutrient amendments affect *Trichoderma atroviride* conidium production, germination and bioactivity. **Biological Control**, v. 93, p. 8–14, 2016.
- DE, C., NAME, K.P.O., LEITE, A.F.G., ALVES, R.T., OLIVEIRA, M.A.S., FIALHO, J.D.F., RODRIGUES, M., FARIA, D., REJANE, A. *anisopliae* E *E Sporothrix Beauveria*. **Biocontrol News and Information**, n. 1977, p. 1977–1977, 1998.

Referências

- DE MELO, D.R., DA CRUZ, G.B., REIS, R.C.S., BITTENCOURT, V.R.E.P. Desenvolvimento dos fungos *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 e *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 sobre *Ctenocephalides felis felis* (Bouch??, 1835). **Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology** Oficial do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, v. 16, n. 3, p. 166–170, 2007.
- DE SOUZA MORETTI, M.M., YU, W., ZOU, W., FRANCO, C.M.L., ALBERTIN, L.L., SCHENK, P.M., GILBERT, R.G. Relationship between the molecular structure of duckweed starch and its in vitro enzymatic degradation kinetics. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 244–251, 2019.
- 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.; ERTOLA, R. J. Characterization of growth and sporulation of. **Enzyme**, v. 229, n. 96, p. 434–439, 1996.
- DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, J. W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycological Research**, v. 104, n. 2, p. 134–150, 1 fev. 2000.
- DT. c® **Global Biocontrol Market Overview Trends , Drivers & Insights**. Disponível em: <http://dunhamtrimmer.com/?page_id=58>. Acesso em: 10 out. 2019.
- FARINAS, C.S., VITCOSQUE, G.L., FONSECA, R.F., NETO, V.B., COURI, S. Modeling the effects of solid state fermentation operating conditions on endoglucanase production using an instrumented bioreactor. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 1186–1192, 2011.
- FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179–188, 2015.
- 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.

Referências

- FREITAS, A.F., LOUREIRO, E.D.S., ELIETE, M., ALMEIDA, B. DE, GUSTAVO, L., PESSOA, A. Rendimento de conídios e germinação de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Ascomycota: Clavicipitaceae) cultivados em arroz. **Agricultural Entomology**, v. v.81, p. 75–78, 2014.
- GALINDO-VELASCO, E., LEZAMA-GUTIÉRREZ, R., CRUZ-VÁZQUEZ, C., PESCADOR-RUBIO, A., ANGEL-SAHAGÚN, C.A., OJEDA-CHI, M.M., RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I., CONTRERAS-LARA, D. Efficacy of entomopathogenic fungi (Ascomycetes: Hypocreales) against adult *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) under stable conditions in the Mexican dry tropics. **Veterinary Parasitology**, v. 209, n. 3–4, p. 173–178, 2015.
- GANESAN et al. Carbohydrate starvation causes a metabolically active but nonculturable state in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2498-2512. 2007
- GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p. 85–101, 2003.
- GRAJALES, L.M., XAVIER, N.M., HENRIQUE, J.P., THOMÉO, J.C. Mixing and motion of rice particles in a rotating drum. **Powder Technology**, v. 222, p. 167–175, 2012.
- HALLSWORTH, J. E.; MAGAN, N. Water and Temperature Relations of Growth of the Entomogenous Fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 74, n. 3, p. 261–266, 1999.
- HORACZEK, A.; VIERNSTEIN, H. Comparison of three commonly used drying technologies with respect to activity and longevity of aerial conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. **Biological Control**, v. 31, n. 1, p. 65–71, 2004.
- HU, G.; LEGER, R. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 6383–6387, 2002.
- 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.
- IBRAHIM, L., LAHAM, L., TOUMA, A., IBRAHIM, S. Mass Production, Yield, Quality,

Referências

- Formulation and Efficacy of Entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* Conidia. **British Journal of Applied Science & Technology**, v. 9, n. 5, p. 427–440, 2015.
- IBRAHIM, L.; BUTT, T. M.; JENKINSON, P. Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, v. 106, n. 6, p. 705–715, 2002.
- ISSALY, N., CHAUVEAU, H., AGLEVOR, F., FARGUES, J., DURAND, A. Influence of nutrient, pH and dissolved oxygen on the production of *Metarhizium flavoviride* Mf189 blastospores in submerged batch culture. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3–4, p. 1425–1431, 2005.
- IWANICKI, N.S.A., FERREIRA, B. DE 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.
- JABOR, I.A.S., PAMPHILE, J.A., RODRIGUES, S.B., MARQUES-SILVA, G.G., ROCHA, C.L.M.S.C. DA. Análise do desenvolvimento do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em resposta a fatores nutricionais. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 25, n. 2, p. 497–501, 2009.
- JARONSKI, S. T.; JACKSON, M. A. **Mass production of entomopathogenic Hypocreales**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier Ltd, 2012.
- JENKINS, N.E., HEVIEFO, G., LANGEWALD, J., J, A., LOMER, C.J., PARK, S., SL, B. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. **BioControl**, v. 19, n. 1, p. 21–32, 1998.
- KARANJA, L.W., PHIRI, N.A., ODUOR, G.I., VUELLEMIN, B., SOROKIN, M. Effect of Different Solid Substrates on Mass Production of *Beauveria Bassiana* and *Metarhizium Anisopliae* Entomopathogens. n. July 2016, p. 789–797, 2004.
- KASSA, A., STEPHAN, D., VIDAL, S., ZIMMERMANN, G., Production and processing of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* submerged conidia for locust and grasshopper control. *Mycol. Res.* 108, 93–100. 2004.

Referências

- KEYSER, C.A., FERNANDES, É.K.K., RANGEL, D.E.N., ROBERTS, D.W. Heat-induced post-stress growth delay: A biological trait of many *Metarhizium* isolates reducing biocontrol efficacy? **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 120, p. 67–73, 2014.
- KRALL, S., PEVELING, R., BA DIALLO, D., STEPHAN, D., WELLING, M., ZIMMERMANN, G.,. Locust control with *Metarhizium flavoviride*: New approaches in the development of a biopreparation based on blastospores. *New Strateg. Locust Control* 151–158. 1997.
- 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.
- LACEY, L.A., GRZYWACZ, D., SHAPIRO-ILAN, D.I., FRUTOS, R., BROWNBRIDGE, M., GOETTEL, M.S. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 1–41, 2015.
- LANZA, L. M.; MONTEIRO, A. C.; MALHEIROS, E. B. Sensibilidade de *Metarhizium anisopliae* à temperatura e umidade em três tipos de solos. **Ciência Rural**, v. 39, p. 6–12, 2009.
- 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.
- LEEMON, D. M.; JONSSON, N. N. Comparative studies on the invasion of cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) and sheep blowflies (*Lucilia cuprina*) by *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, n. 2, p. 248–259, 2012.
- LI, J.; FENG, M. G. Intraspecific tolerance of *Metarhizium anisopliae* conidia to the upper thermal limits of summer with a description of a quantitative assay system. **Mycological Research**, v. 113, n. 1, p. 93–99, 2009.
- LI et al.,. The molecular structural features controlling stickiness in cooked rice, a major palatability determinant. **Scientific Reports**.2017

Referências

- LI et al..Washing rice before cooking has no large effect on the texture of cooked rice. 2018
- LIU et al., Comparative Genomics of enzymes in flavor – forming pathways from amino acids in lactic acid bacteria. *Applied and Enviromental Microbiology*. 4590- 4600.2019
- LOPEZ-RAMIREZ, N., VOLKE-SEPULVEDA, T., GAIME-PERRAUD, I., SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., FAVELA-TORRES, E.Effect of stirring on growth and cellulolytic enzymes production by *Trichoderma harzianum* in a novel bench-scale solid-state fermentation bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 265, n. April, p. 291–298, 2018.
- LI et al.,. The molecular structural features controlling stickiness in cooked rice, a major palatability determinant. **Scientific Reports**. 2017
- LOUREIRO, E.S., BATISTA FILHO, A., ALMEIDA, J.E.M., MENDES, J.M., PESSOA, L.G.A. Efficiency of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok isolates in the control of the sugarcane spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) in field conditions. **Arq. Inst. Biol**, v. 79, n. 1, p. 47–53, 2012.
- MAPA. **Mistério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Mercado de biodefensivos cresce mais de 70 % no Brasil em um ano Controle biológico**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/Noticias/Feffmercado-De-Biodefensivos-Cresce-Em-Mais-De-50-No-Brasil>>. Acesso em: 10 fev. 2019.
- MASCARIN, G.M., LOPES, R.B., DELALIBERA, 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, n. December 2017, p. 46–53, 2018.
- MASCARIN, G. M.; QUINTELA, E. D. Técnica de produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* para uso em controle biológico. 2013.
- MÉNDEZ-GONZÁLEZ, F., LOERA-CORRAL, O., SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., FAVELA-TORRES, E. Chapter 7 – Bioreactors for the Production of Biological Control Agents Produced by Solid-State Fermentation. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**, p. 109–121, 2018a.
- MÉNDEZ-GONZÁLEZ, F., LOERA-CORRAL, O., SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.,

Referências

- FAVELA-TORRES, E. Bioreactors for the Production of Biological Control Agents Produced by Solid-State Fermentation. In: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. [s.l.] Elsevier, 2018b. p. 109–121.
- MENDEZ-GONZALEZ, F.; LOERA, O.; FAVELA-TORRES, E. Conidia production of *Metarhizium anisopliae* in bags and packed column bioreactors. **Current Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 65–69, 1 mar. 2018.
- MILLER, G. L. “Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar”. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959
- MITCHELL, D.A., KRIEGER, N., STUART, D.M., PANDEY, A. New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1211–1225, 2000.
- MITCHELL, D.A., DE LIMA LUZ, L.F., KRIEGER, N., BEROVIČ, M. Bioreactors for Solid-State Fermentation. **Comprehensive Biotechnology, Second Edition**, v. 2, p. 347–360, 2011.
- MURAD. Proteomic analysis of *Metarhizium anisopliae* secretion in the presence of the insect pest. **Microbiology**, 154, 3766–3774. 2008
- 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.
- NODA, T.; FURUTA, S.; SUDA, I. “Sweet potato β -amylase immobilized on chitosan beads and its application in the semi-continuous production of maltose”. *Carbohydrate Polymers*, v. 44, n. 3, p. 189–195, 2001.
- 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.
- OMKAR; KUMAR, B. Biocontrol of Insect Pests. In: **Ecofriendly Pest Management for Food Security**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 25–61.
- OTTATI-DE-LIMA, E. L. Produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria*

Referências

bassiana (Bals.) Vuill. em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre estruturas infectivas desses entomopatógenos. p. 92, 2007.

OTTATI-DE-LIMA, E.L., FILHO¹, A.B., ALMEIDA¹, J.E.M., GASSEN¹, M.H., WENZEL¹, I.M., ALMEIDA¹, A.M.B. DE, ZAPPELLINI¹, L.O. Produção Semissólida De *Metarhizium Anisopliae* E *Beauveria Bassiana* Em Diferentes Substratos E Efeito Da Radiação Ultravioleta E Da Temperatura Sobre Propágulos Desses Entomopatógenos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 4, p. 651–659, 2010.

OZCIRAK ERGUN, S.; OZTURK UREK, R. Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. **Annals of Agrarian Science**, v. 15, n. 2, p. 273–277, 2017.

OZMIHCI, S. Performance of batch solid state fermentation for hydrogen production using ground wheat residue. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 37, p. 23494–23499, 2017.

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

PATEL, S., MANDLOI, R., PRAJAPATI, S., SAXENA, A.K., PARMAR, R., SINGH, O.P.. Assessment the efficacy and economic of insecticides and bio-pesticides against major insect pest combination of brinjal (*Solanum Melongena* Linn.) cv. JB-64. **Plant Archives**, v. 15, n. 2, p. 923–930, 2015.

PAULA, A., FRAZZON, G., DA, I., VAZ JUNIOR, S., MASUDA, A., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 94, p. 117–125, 2000.

PEDRINI, N. Molecular interactions between entomopathogenic fungi (Hypocreales) and their insect host: Perspectives from stressful cuticle and hemolymph battlefields and the potential of dual RNA sequencing for future studies. **Fungal Biology**, p. 1–10, 2017.

PEREZ, C. L.; CASCIATORI, F. P.; THOMÉO, J. C. Strategies for scaling-up packed-bed bioreactors for solid-state fermentation: The case of cellulolytic enzymes production by a thermophilic fungus. **Chemical Engineering Journal**, v. 361, n. July 2018, p. 1142–1151,

Referências

2019.

PIA. **Portal de Informações Agropecuárias**. Disponível em: <<https://portaldeinformacoes.conab.gov.br/safra-evolucao-dashboard>>. Acesso em: 10 out. 2019.

POLAR, P., DE MURO, M.A., KAIRO, M.T.K., MOORE, D., PEGRAM, R., JOHN, S.A., ROACH-BENN, C. Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 134, n. 1–2, p. 159–167, 2005.

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

RANGEL, D.E.N., ALSTON, D.G., ROBERTS, D.W. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 87, n. 2–3, p. 77–83, 2004.

RANGEL, D. E. N.; ALSTON, D. G.; ROBERTS, D. W. Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelial growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. **Mycological Research**, v. 112, n. 11, p. 1355–1361, 2008.

RIGO, E., NINOW, J.L., DI LUCCIO, M., VLADIMIR OLIVEIRA, J., POLLONI, A.E., REMONATTO, D., ARBTER, F., DE OLIVEIRA, D., TREICHEL, H. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1132–1137, 2010.

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

RUIZ-HERRERA; STARKEY. Dissimilation of Methionine by fungi. **Journal of Bacteriology**, 544-551. 1969

STUART et al.. Influence of carbohydrate starvation and arginine on culturability and amino

Referências

- acid utilization of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**. 665-673. 1999
- SANTOS, V., MASCARIN, G.M., DA SILVA LOPES, M., ALVES, M.C.D.F., REZENDE, J.M., GATTI, M.S.V., DUNLAP, C.A., DELALIBERA JÚNIOR, Í. 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.
- 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.** In: **Bol.** Disponível em: <<https://www.embrapa.br/web/mobile/publicacoes/-/publicacao/189419/metodologia-de-aplicacao-do-fungo-metarhizium-anisopliae-var-acridum-para-o-controle-do-gafanhoto-rhammatocerus-schistocercoides-em-campo>>.
- SCHOLTE, E. J.; TAKKEN, W.; KNOLS, B. G. J. 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, dez. 2010.
- 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. **Arq. Inst. Biol**, v. 77, n. 3, p. 449–456, 2010.
- SHAH, F. A.; BUTT, T. M. Influence of nutrition on the production and physiology of sectors produced by the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 250, n. 2, p. 201–207, 2005.
- 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.
- SHIN, T. Y.; BAE, S. M.; WOO, S. D. Screening and characterization of antimicrobial substances originated from entomopathogenic fungi. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v.

Referências

19, n. 4, p. 1053–1059, 2016.

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

ST. LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, n. 3, p. 415–426, 1991.

STEINWENDER, B. M. et al. Molecular diversity of the entomopathogenic fungal *Metarhizium* community within an agroecosystem. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 123, p. 6–12, 2014.

SUN, J.; FUXA, J. R.; HENDERSON, G. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Coptotermes formosanus* and in vitro. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 81, n. 2, p. 78–85, 2002.

TESTER ; MORRISON. Swelling and gelatinization of cereal starches. I. Effects of amylopectin, amylose, and lipids. **Cereal Chemistry**, 67, 551-557. 1990

T.JARONSKI, S. Mass Production of Entomopathogenic Fungi: State of the Art. In: **Mass Production of Beneficial Organisms**. [s.l: s.n.]. p. 357–413.

TOEGEL, S., SALAR-BEHZADI, S., HORACZEK-CLAUSEN, A., VIERNSTEIN, H.. Preservation of aerial conidia and biomasses from entomopathogenic fungi *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae* during lyophilization. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 105, n. 1, p. 16–23, 2010.

VAN BREUKELEN, 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.

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

WANG, J. B.; ST. LEGER, R. J.; WANG, C. Advances in Genomics of Entomopathogenic Fungi. **Advances in Genetics**, v. 94, p. 67–105, 2016.

Referências

- WASSERMANN, M. et al. Biological control of *Ixodes ricinus* larvae and nymphs with *Metarhizium anisopliae* blastospores. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 5, p. 768–771, 2016.
- WEBSTER, A., PRADEL, E., SOUZA, U.A., MARTINS, J.R., RECK, J., SCHRANK, A., KLAFKE, G. Does the effect of a *Metarhizium anisopliae* isolate on *Rhipicephalus microplus* depend on the tick population evaluated? **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 2, p. 270–274, 2017.
- YOSRI, M.; ABDEL-AZIZ, M. M.; SAYED, R. M. Larvicidal potential of irradiated myco-insecticide from *Metarhizium anisopliae* and larvicidal synergistic effect with its mycosynthesized titanium nanoparticles (TiNPs). **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, jun. 2018.
- ZANELATO, A.I., SHIOTA, V.M., GOMES, E., DA SILVA, R., THOMÉO, J.C. Endoglucanase production with the newly isolated *Myceliophthora* sp. I-1D3b in a packed bed solid state fermentor. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1536–1544, 2012.
- ZHONG, W., YU, A., LIU, X., TONG, Z., ZHANG, H. DEM/CFD-DEM Modelling of Non-spherical Particulate Systems: Theoretical Developments and Applications. **Powder Technology**, v. 302, p. 108–152, 1 nov. 2016.
- Zhou Z, Cao F, Chen JY. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai).;34(3):298-304. 2002