

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta **Dissertação** será disponibilizado somente a partir de 30/03/2026.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

LUCAS ANDRÉ MOREIRA

DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTURA EFICIENTE PARA
***Hirsutella thompsonii*: EFEITOS SOBRE A PRODUÇÃO DE**
QUITINASES, PROTEASES E CONCENTRAÇÃO FÚNGICA EM
FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Araraquara

2024

LUCAS ANDRÉ MOREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTURA EFICIENTE PARA
Hirsutella thompsonii: EFEITOS SOBRE A PRODUÇÃO DE
QUITINASES, PROTEASES E CONCENTRAÇÃO FÚNGICA EM
FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos.

Área de Concentração: Biomateriais, Bioprocessos e Bioprodutos

Orientador(a): Prof. Dr. Álvaro de Baptista Neto

Araraquara

2024

M838d Moreira, Lucas André.
Desenvolvimento de meio de cultura eficiente para *Hirsutella thompsonii*: efeitos sobre a produção de quitinases, proteases e concentração fúngica em fermentação submersa / Lucas André Moreira. – Araraquara, 2024.
106 f. : il.

Orientador: Álvaro de Baptista Neto.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos. Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos.

1. Acaricida. 2. Bioinsumos. 3. Otimização. 4. Biotecnologia. 5. Controle biológico. I. Baptista Neto, Álvaro de, orient. II. Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030170PO
Esta ficha não pode ser modificada



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Desenvolvimento de meio de cultura eficiente para *Hirsutella thompsonii*:
Efeitos sobre a produção de quitinases, proteases e concentração
fúngica em fermentação submersa

AUTOR: LUCAS ANDRÉ MOREIRA

ORIENTADOR: ALVARO DE BAPTISTA NETO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos, área: Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ALVARO DE BAPTISTA NETO (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp

Profa. Dra. DERLENE ATTILI DE ANGELIS (Participação Virtual)
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas / Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)

Profa. Dra. VALÉRIA DE CARVALHO SANTOS EBINUMA (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 30 de setembro de 2024

**Dedico a todos que vieram antes
de mim e lutaram para que eu
pudesse chegar até onde cheguei**

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus que me permitiu que estivesse aqui e pudesse chegar até onde cheguei. Agradeço a toda espiritualidade e aos meus guias que cuidam dos meus caminhos e estão presentes em todas as minhas conquistas. Salve suas forças!

Agradeço a minha mãe, Ilza, que sempre me ensina que o amor é a chave do sucesso de qualquer processo. Obrigado por cuidar tão bem de mim, por acreditar no meu potencial, por essa pessoa tão iluminada e alegre. Não existirão palavras que conseguem descrever a importância da sua presença em minha vida!

Agradeço ao meu pai, Dourival, que me ensina todos os dias sobre a importância do companheirismo, do poder de um abraço e de uma palavra de conforto. Obrigado por ser essa pessoa que também cuida tão bem de mim e acredita nos meus sonhos. Um dia espero retribuir tudo o que fez por mim!

Agradeço a minha irmã, Yasmim, a mulher mais corajosa e determinada que eu conheço. Obrigado por me ensinar o significado de irmandade, por compartilhar sonhos e conquistas. Desejo que seu brilho nunca se perca e que você continue conquistando o mundo, pois ele é pequeno demais para você!

Agradeço a minha companheira de vida, Ana Laura, por dizer sim para mim todos os dias. Obrigado por segurar a barra em momentos difíceis, por me fazer acreditar em momentos que nem eu mesmo acreditava, por cuidar de mim todo esse tempo. Sou apaixonado em compartilhar a vida contigo e espero cuidar de você tão bem quanto cuida de mim!

Agradeço aos meus sogros, Coseti e César, e aos meus cunhados, Guilherme e Adassa, por me acolherem tão bem e por acreditar no meu potencial. Obrigado por todo conhecimento trocado, por toda mesa posta e por todas as risadas dadas!

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Álvaro que deu a oportunidade de realizar esse projeto. Muito obrigado por acreditar nessa ideia, por me acolher, por toda orientação dada e todo conhecimento trocado. Você é uma referência de pesquisador!

Agradeço aos sócios da Solatus: Leonardo, Fábio, Gilberto e José Ribeiro por depositarem a confiança em mim, pelo investimento no projeto e por terem me dado a oportunidade de realizar esse sonho pessoal. Espero que tenha contribuído com o sucesso dessa empresa e desejo que atinjam patamares inimagináveis!

Agradeço em especial a Marina, referência em tudo o que faz. Muito obrigado por todo o conhecimento trocado, por todos os conselhos dados e principalmente por também ter acreditado no meu potencial! Espero um dia me tornar um profissional como você!

Agradeço a dupla, Lucas e Eduardo, por tornarem os dias de trabalho mais leves e alegres. Obrigado por todas as conversas trocadas e pelos risos dados!

Agradeço ao Cláudio e a Dona Fran, amigos que jamais imaginei que faria. Obrigado por terem cruzado meu caminho e me ensinarem o significado de amizade!

Agradeço aos demais membros da Solatus por todas as trocas!

Agradeço a UNESP por todo apoio e suporte!

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

“O que eu vi sou eu
O que eu senti, o que eu sofri, sou eu
Sou eu quando eu quero, até quando eu não quero ser
Por isso eu só morro quando meu samba morrer
Sou eu andando fora da linha
Sou eu andando nos trilhos
Sou eu no sorriso dos meus antepassados
E também no sorriso dos meus filhos
Sou eu na dor e no prazer
Por isso eu só morro quando o meu samba morrer
Eu sou a força da minha mãe e a fraqueza dela também
Eu sou a alegria do meu pai e a tristeza dele também
Sou novo, tradição
Sou rap, samba no pé
Soldado filho de Ogum, certeza do meu axé
De tudo o que passou por mim
Eu sou o que eu posso ser
Por isso eu só morro quando o meu samba morrer”

Pra curar a dor do mundo - Marcelo D2

RESUMO

As pragas agrícolas representam um grande desafio para a produção global e, embora os pesticidas químicos sejam amplamente utilizados para enfrentar esse problema, eles trazem riscos ambientais significativos. Como alternativa sustentável, produtos biológicos à base de microrganismos, como o fungo entomopatogênico *Hirsutella thompsonii*, têm mostrado ser soluções eficazes. Esse fungo produz quitinase, uma enzima que decompõe a quitina nos exoesqueletos dos artrópodes, sendo o seu isolado utilizado como um bioacaricida. Este estudo teve como meta otimizar os parâmetros de cultivo de *H. thompsonii* para aumentar a produção de células viáveis e quitinase, visando melhorar a eficiência do produto biológico. Foram avaliadas diversas fontes de carbono e nitrogênio, razões C/N, pH inicial e vazão da aeração em fermentação submersa. Mesmo sem o uso de um indutor específico para quitinase, o fungo apresentou produção significativa de enzimas e produção de células viáveis. Entre as fontes de carbono testadas, a sacarose foi a mais eficiente, enquanto o extrato de soja se destacou como melhor fonte de nitrogênio. A combinação desses nutrientes resultou na maior produção de quitinase ($22,15 \pm 1,25$ U/mL) e na maior concentração de células viáveis ($5,50E+08 \pm 2,12E+08$ UFC/mL) após 360 horas de cultivo. A análise com o desenho composto central mostrou que o pH do meio é crítico para a produção de quitinase, enquanto as concentrações de açúcar e extrato de soja foram fatores chave para a produção de protease. Os níveis de protease foram mais altos nos primeiros dias, enquanto a produção de quitinase aumentou após o sétimo dia, sugerindo uma relação inversa entre as duas enzimas. A produção ideal de biomassa e quitinase foi alcançada quando se avaliou em frascos de 5 L com um sistema de aeração acoplado, na vazão de 4,0 L/min, sendo que vazões menores ou maiores foram menos eficazes. Esses resultados sublinham a importância de ajustes precisos nas condições de cultivo para maximizar a produção enzimática e a eficácia do produto biológico.

Palavras-chave: acaricida; bioinsumos; otimização; biotecnologia; controle biológico.

ABSTRACT

Agricultural pests represent a major challenge for global production, and although chemical pesticides are widely used to tackle this issue, they pose significant environmental risks. As a sustainable alternative, biological products based on microorganisms, such as the entomopathogenic fungus *Hirsutella thompsonii*, have proven to be effective solutions. This fungus produces chitinase, an enzyme that breaks down chitin in the exoskeletons of arthropods, and its isolate is used as a bioacaricide. This study aimed to optimize the cultivation parameters of *H. thompsonii* to increase the production of viable cells and chitinase, aiming to improve the efficiency of the biological product. Various carbon and nitrogen sources, C/N ratios, initial pH, and aeration rates in submerged fermentation were evaluated. Even without the use of a specific inducer for chitinase, the fungus showed significant enzyme production and viable cell production. Among the carbon sources tested, sucrose was the most efficient, while soybean extract stood out as the best nitrogen source. The combination of these nutrients resulted in the highest chitinase production (22.15 ± 1.25 U/mL) and the highest concentration of viable cells ($5.50\text{E}+08 \pm 2.12\text{E}+08$ CFU/mL) after 360 hours of cultivation. The central composite design analysis showed that the pH of the medium is critical for chitinase production, while sugar and soybean extract concentrations were key factors for protease production. Protease levels were higher in the early days, while chitinase production increased after the seventh day, suggesting an inverse relationship between the two enzymes. Optimal biomass and chitinase production were achieved when evaluated in 5 L flasks with an attached aeration system, at a flow rate of 4.0 L/min, with lower or higher flow rates being less effective. These results underscore the importance of precise adjustments in cultivation conditions to maximize enzymatic production and the effectiveness of the biological product.

Keywords: acaricide; bioinputs; optimization; biotechnology; biological control.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: desenho ilustrativo de um ácaro fitófago da família Tetranychidae.	25
Figura 2: tipologias de controle biológico de insetos-praga na agricultura.....	29
Figura 3: esquema sintetizando a colonização de fungos entomopatogênicos em artrópodes .	33
Figura 4: colônias de <i>H. thompsonii</i> cultivadas em meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA)..	34
Figura 5: Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas conidiogênicas de <i>H. thompsonii</i>	35
Figura 6: modo de ação das diferentes quitinases.	38
Figura 7: porcentagem do uso de biodefensivos para o ano de 2023	44
Figura 8: número de produtos biológicos registrados ao decorrer do tempo.	44
Figura 9: aparato do sistema de aeração que acopla nos recipientes com meio de cultura	51
Figura 10: influência de diferentes fontes de carbono ao decorrer do tempo na produção de células viáveis e da enzima quitinase pelo fungo <i>H. thompsonii</i>	55
Figura 11: influência de diferentes fontes de nitrogênio ao decorrer do tempo na produção de células viáveis pelo fungo <i>H. thompsonii</i>	60
Figura 12: influência de diferentes fontes de nitrogênio ao decorrer do tempo na produção de quitinase pelo fungo <i>H. thompsonii</i>	63
Figura 13: influência de diferentes combinações entre duas fontes de carbono e de nitrogênio ao decorrer do tempo na produção de células viáveis e da enzima quitinase pelo fungo <i>H. thompsonii</i>	66
Figura 14: influência da constituição de sais presentes no meio utilizando planejamento fatorial completo 2^3 ao decorrer do tempo na produção de células viáveis e da enzima quitinase pelo fungo <i>H. thompsonii</i>	71
Figura 15: gráfico de superfície de resposta para produção de células viáveis em 360 horas.	72
Figura 16: influência da constituição de sais presentes no meio utilizando planejamento fatorial completo 2^3 ao decorrer do tempo na produção da enzima quitinase pelo fungo <i>H. thompsonii</i>	73
Figura 17: gráfico de superfície de resposta para produção de células viáveis em 360 horas.	74

Figura 18: influência do balanço C/N e do pH inicial no meio utilizando desenho composto central rotacional ao decorrer do tempo na produção de células viáveis pelo fungo <i>H. thompsonii</i>	76
Figura 19: Diferentes cálculos para identificação de outliers presentes na amostragem de 10 dias do fungo <i>H. thompsonii</i> para os diferentes testados no planejamento experimental.	79
Figura 20: gráfico de superfície de resposta para produção de células viáveis em 10 dias.....	80
Figura 21: influência do balanço C/N e do pH inicial no meio utilizando desenho composto central rotacional ao decorrer do tempo na produção da enzima quitinase pelo fungo <i>H. thompsonii</i>	81
Figura 22: Diferentes cálculos para identificação de outliers presentes na amostragem de 10 dias do fungo <i>H. thompsonii</i>	84
Figura 23: influência do balanço C/N e do pH inicial no meio utilizando desenho composto central rotacional ao decorrer do tempo na produção da enzima protease pelo fungo <i>H. thompsonii</i>	86
Figura 24: gráfico de superfície de resposta para produção de células proteases em 7 dias...	88
Figura 25: interação entre a produção de protease e a produção de quitinase ao decorrer do tempo de fermentação.....	89
Figura 26: Concentração de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de <i>H. thompsonii</i> em diferentes taxas de aeração (0, 2, 4, e 8 L/min) em frascos tipo Erlenmeyer de 5 L contendo sistema de aeração ao longo de 240 horas.	91
Figura 27: Concentração de biomassa fúngica (mg/mL) de <i>H. thompsonii</i> em diferentes taxas de aeração (0, 2, 4, e 8 L/min) em frascos tipo Erlenmeyer de 5 L contendo sistema de aeração ao longo de 240 horas.	91
Figura 28: Concentração de quitinases (U/mL) de <i>H. thompsonii</i> em diferentes taxas de aeração (0, 2, 4, e 8 L/min) em frascos tipo Erlenmeyer de 5 L contendo sistema de aeração ao longo de 240 horas.	92
Figura 29: Concentração do consumo de proteínas totais de <i>H. thompsonii</i> em diferentes taxas de aeração (0, 2, 4, e 8 L/min) em frascos tipo Erlenmeyer de 5 L contendo sistema de aeração ao longo de 240 horas.	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: principais espécies de ácaros encontradas atualmente em culturas agrícolas.....	26
Tabela 2: principais programas de controle biológico que foram relatados pela agricultura brasileira.	30
Tabela 3: Fungos produtores de quitinases em Fermentação Submersa (FSbm) e em Fermentação em Estado Sólido (FES).....	39
Tabela 4: diferentes composições do meio de cultura com as melhores fontes de carbono e nitrogênio selecionada em testes anteriores.....	48
Tabela 5: diferentes composições de meio de cultura utilizando o cloreto de potássio, sulfato de magnésio e o fosfato dipotássico como fonte de sais minerais..	49
Tabela 6: diferentes composições de meio de cultura utilizando o pH inicial, extrato de soja como fonte de nitrogênio e açúcar como fonte de carbono.	50
Tabela 7: Análise de variância dos tratamentos com diferentes fontes de carbono para produção de células viáveis em 360 horas.	56
Tabela 8: Resultados do teste de Tukey para comparação das médias da produção de célula viáveis (UFC/mL) entre diferentes fontes de carbono produzidos em 360 horas..	56
Tabela 9: Análise de variância dos tratamentos com diferentes fontes de carbono para produção de quitinase em 360 horas.	58
Tabela 10: Resultados do teste de Tukey para comparação das médias da produção de quitinase (U/mL) entre diferentes fontes de carbono produzidos em 360 horas..	58
Tabela 11: análise de variância dos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio para produção de células viáveis em 360 horas.....	61
Tabela 12: Resultados do teste de Tukey para comparação das médias da produção de células viáveis (UFC/mL) entre diferentes fontes de nitrogênio produzidas em 360 horas..	62
Tabela 13: análise de variância dos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio para produção de quitinase em 360 horas.....	63
Tabela 14: Resultados do teste de Tukey para comparação das médias da produção de quitinase (U/mL) entre diferentes fontes de nitrogênio produzidas em 360 horas.	64
Tabela 15: análise de variância dos tratamentos com diferentes consórcios para produção de células viáveis em 360 horas.	67

Tabela 16: Resultados do teste de Tukey para comparação das médias da produção de células viáveis (UFC/mL) entreas diferentes combinações da fonte de carbono e fonte de nitrogênio produzidas em 360 horas.	68
Tabela 17: análise de variância dos tratamentos com diferentes consórcios para produção de quitinase em 360 horas.	68
Tabela 18: Resultados do teste de Tukey para comparação das médias da produção de quitinases (U/mL) entreas diferentes combinações da fonte de carbono e fonte de nitrogênio produzidas em 360 horas.....	69
Tabela 19: análise estatística descritiva do fatorial completo 2^3 tendo a produção de células viáveis como variável resposta.	71
Tabela 20: análise estatística descritiva do fatorial completo 2^3 tendo a produção de células viáveis como variável resposta.	74
Tabela 21: análise estatística descritiva do desenho composto central rotacional tendo a produção de células viáveis como variável resposta	77
Tabela 22: análise estatística descritiva do desenho composto central rotacional tendo a produção de células viáveis como variável resposta e a retirada dos pontos outliers	80
Tabela 23: análise estatística descritiva do desenho composto central rotacional tendo a produção de quitinase como variável resposta.	83
Tabela 24: análise estatística descritiva do desenho composto central rotacional tendo a produção de quitinase como variável resposta após retirada dos pontos outliers.	85
Tabela 25: análise estatística descritiva do desenho composto central rotacional tendo a produção de protease como variável resposta	88

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius

Atm – Atmosfera (unidade de pressão

BDA – Batata Dextrose Ágar

BSA – Albumina de Soro Bovina

DNS – Ácido 3,5-dinitrossalicílico

EC – *Enzyme Comission*

FAO – *Food and Agriculture Organization of USA*

FES – Fermentação em Estado Sólido

FSbm – Fermentação Submersa

g – Grama

L – Litro

mg – Miligrama

mL – Mililitro

m/m – Massa por massa

m/v – Massa por volume

NAG – N-acetil-glicosamina

pH – Potencial Hidrogeniônico

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

v/v – volume por volume

SUMÁRIO

<u>1. INTRODUÇÃO</u>	<u>18</u>
<u>2. OBJETIVOS</u>	<u>22</u>
2.1 OBJETIVO GERAL	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
<u>3. REVISÃO DA LITERATURA</u>	<u>23</u>
3.1. AGRICULTURA FRENTE À SEGURANÇA ALIMENTAR E ÀS MUDANÇAS CLIMÁTICAS	23
3.2. PRAGA AGRÍCOLAS: ÁCAROS	24
3.3. INSUMOS AGRÍCOLAS	27
3.4. CONTROLE BIOLÓGICO	29
3.5. FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS.....	31
3.6. HIRSUTELLA THOMPSONII	33
3.7. ENZIMAS LÍTICAS E O PAPEL DAS QUITINASES	37
3.8. PRODUÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	40
3.9. PARÂMETROS FERMENTATIVOS	41
3.10. MERCADO DE BIOLÓGICOS	43
<u>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</u>	<u>46</u>
4.1. MANUTENÇÃO DA LINHAGEM	46
4.2. OBTENÇÃO DE SUSPENSÃO DE ESPOROS	46
4.3. PRODUÇÃO DA ENZIMA QUITINASE E CÉLULAS VIÁVEIS EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FSBM).....	46
4.4. FONTE DE CARBONO	47
4.5. FONTE DE NITROGÊNIO	47
4.6. INFLUÊNCIA DE UM CONSÓRCIO ENTRE AS FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO	48
4.7. INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DE SAIS DO MEIO DE CULTURA UTILIZANDO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO	49
FONTE: O AUTOR.	49
4.8. INFLUÊNCIA DO BALANÇO CARBONO/NITROGÊNIO E DO pH INICIAL NO MEIO DE CULTURA UTILIZANDO DESENHO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL	50
FONTE: O AUTOR.	50
4.9. INFLUÊNCIA DA VAZÃO DE AR.....	51
FONTE: O AUTOR.	51
4.10. OBTENÇÃO DAS ENZIMAS EXTRACELULARES.....	51
4.11. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA	52

4.12. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE QUITINOLÍTICA	52
4.13. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	53
4.15. ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS	53
4.18. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	53
<u>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	<u>54</u>
5.1. INFLUÊNCIA DA FONTE DE CARBONO	54
5.2. INFLUÊNCIA DA FONTE DE NITROGÊNIO	60
5.4. INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DE SAIS	70
5.5. INFLUÊNCIA DO BALANÇO C/N E DO pH INICIAL NO MEIO DE CULTIVO UTILIZANDO DESENHO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL	75
5.6. INFLUÊNCIA DA VAZÃO DE AR.....	90
5.7. VIABILIDADE ECONÔMICA E ANÁLISE DE MERCADO	94
<u>6. CONCLUSÃO.....</u>	<u>97</u>
<u>REFERÊNCIAS</u>	<u>98</u>

1. INTRODUÇÃO

Um dos principais problemas que afetam a produção agrícola no mundo é causado por pragas agrícolas, que levam a grandes perdas de safras anualmente. De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), há uma estimativa de que a cada ano uma taxa de 20 a 40% da produção agrícola mundial, em torno de 220 bilhões de dólares, seja perdida em decorrência de pragas agrícolas (FAO, 2022). Somente no Brasil, essa perda é de aproximadamente 7,7% (quase 25 milhões de toneladas de produtos agrícolas), ocasionando perdas econômicas de 17,7 bilhões de dólares (Bayer, 2022).

As pragas agrícolas consistem em organismos que causam danos às plantas, como patógenos e pestes (insetos e nematóides). Atualmente, uma das medidas mais utilizadas para o controle dessas pragas agrícola são os pesticidas químicos, que tiveram seu uso global aumentado em 30% entre 2000 a 2022 (FAO, 2022). Todavia, diversos estudos vêm demonstrando que o uso dessas substâncias gera enormes prejuízos para o meio ambiente e à saúde humana, além de que sua eficiência ao longo do tempo é reduzida, uma vez que os insetos-alvo adquirem resistência (Schmaltz, 2020). Mozzaquatro e colaboradores (2021) ao fazerem um estudo sobre o custo-benefício da substituição de insumos químicos por biológicos verificaram que a utilização do manejo biológico na cultura da soja acarretou uma economia de 13,31%. Já Arnaouty e colaboradores (2020) fizeram um estudo comparativo entre programas de controle biológico e químico em cultura de pimentão e observaram que o custo de um programa químico para um ciclo de cultivo é de 49,1 USD, enquanto o biológico é de 35,4 USD, além disso o biológico aumentou a produção em até 35% em relação ao controle, sem a utilização de qualquer controle de pragas, e 17,88% em relação ao químico. Diante disso, a utilização de produtos biológicos se mostra uma abordagem de baixo custo, sustentável e ecologicamente correta para a proteção das colheitas contra pragas agrícolas. No entanto, embora os biológicos sejam uma excelente alternativa, não é possível substituir 100% os químicos em todas as situações. Isso se deve à variabilidade nas condições de campo, à necessidade de controle rápido em situações de alta infestação, e à falta de eficácia de alguns produtos biológicos contra pragas ou doenças específicas, que exigem o uso de produtos químicos para assegurar a produtividade e garantir a estabilidade das safras. (Ram *et al.*, 2018; Baker *et al.*, 2020).

De acordo com a Instrução Normativa Conjunta Nº 3 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, de 10 de março de 2006, os produtos biológicos para controle de pragas, são os organismos vivos de ocorrência natural ou que sofreram alguma adição natural de material hereditário, exceto os organismos submetidos a técnicas de modificação genética e que podem ser de origem animal, vegetal ou microbiana (Brasil, 2019). Segundo o Agrofit, banco de informações sobre produtos agroquímicos do Brasil, o mercado global de biopesticidas em 2020 obteve uma taxa de crescimento de 16% desde 2015. Somente no Brasil o número de produtos biológicos registrados passou de 1 em 2005 para 482 até fevereiro de 2023. Dentre esses produtos biológicos, os que ganham destaque são os fungos entomopatogênicos, princípio ativo de 39% dos produtos disponíveis no mercado (Agrofit, 2020).

Os fungos com atividade entomopatogênica são aqueles capazes de adentrar os insetos hospedeiros através de sua cutícula e causar doenças e/ou até a morte dos mesmos. Tais fungos são capazes de colonizar um amplo espectro de espécies de insetos e ácaros, além de causar epizootias em condição natural, sendo que os fungos pertencentes a classe Ascomycota são os que mais possuem propriedades entomopatogênicas, como *Beauveria*, *Metarhizium*, *Hirsutella*, *Purpureocillium*, *Cordyceps*. (Liitwin, 2020).

Dentre esses fungos, um que vem ganhando destaque é a *Hirsutella thompsonii* (Fisher) (Hypocreales: Ophiocordycipitaceae), um micoacaricida que possui alta eficiência contra uma diversidade de ácaros, como por exemplo o ácaro-da-falsa-ferrugem-dos-citros *Phyllocoptruta oleivora* Ashmead (Acari:Eriophyidae), sendo uma das principais pragas de culturas cítricas, além do ácaro-rajado *Tetranychus urticae* Bolland (Acari:Tetranychidae), que é a principal praga de uma ampla gama de hortaliças, plantas ornamentais e culturas como a do algodão e da batata doce, além de outros hemípteros e lepidópteros (Wu *et al.*, 2020, Hussain *et al.*, 2021). Além disso, estudos como o de Ferreira *et al.* (2024), realizado na Embrapa, demonstram a eficácia do fungo no controle biológico desses ácaros na cultura de cocos, destacando a sua potencialidade em sistemas agrícolas sustentáveis.

No Brasil, não há muitos produtos registrados que utilizam *Hirsutella thompsonii* como ingrediente ativo. Os dois principais são o Skupa-Mite®, registrado pelo MAPA sob o número 36819, utiliza a cepa CCT 7765 e é um acaricida microbiológico que apresenta rápida ação e pode ser aplicado em diversas culturas sem período de carência. Outro produto é o Mitekill Thomptrix®, também baseado na cepa CCT 7765, que é desenvolvido para o controle de

pragas, oferecendo uma alternativa biológica eficaz e sustentável no manejo de ácaros. Ambos registrados pela Agrobiológica.

O processo de infecção do fungo entomopatogênico *H. thompsonii*, compartilhando características com outros fungos do mesmo grupo, pode ser dividido em quatro etapas descrito por Castrejón Antonio (2012). Inicialmente, ocorre a adesão do esporo à cutícula do inseto, mediada pelas hidrofobinas (Li *et al.*, 2010). Em seguida, fatores ambientais como umidade, temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes e oxigenação desencadeiam a germinação do esporo, formando um tubo germinativo que interage com receptores na cutícula, facilitando a penetração (Toledo *et al.*, 2010). O tubo germinativo, além de exercer força mecânica, libera enzimas que degradam os tecidos do inseto. Na terceira fase, o fungo se desenvolve dentro do inseto, produzindo estruturas secundárias, como conídios, hifas e blastosporos que se espalham pelo corpo, alimentando-se dos fluidos do inseto e liberando toxinas que levam à sua morte (Beys-da-silva *et al.*, 2010). Na última etapa, após a morte do inseto, o fungo esgota os recursos nutritivos e passa a produzir esporos para sua reprodução (Bruck & Lewis, 2002). Dentro desse contexto, é crucial no processo algumas enzimas como lipases, proteases e principalmente quitinases que desempenham papel fundamental na degradação da cobertura externa, facilitando a infecção do fungo (Castrejón-Antonio, 2012; ManninO *et al.*, 2019). Além disso, os fungos entomopatogênicos produzem uma diversidade de estruturas que também são infectivas seguindo o mesmo padrão do processo dos esporos, como blastóporos (Feng *et al.*, 10994), hifas germinativas (Hajek & Leger, 1994) e conídios (Humber, 2008).

A produção do fungo *H. thompsonii* como agente biológico acaricida é um processo que pode ser realizado tanto por fermentação submersa quanto por fermentação sólida. Atualmente a forma mais utilizada é a fermentação sólida, que envolve a colonização de cereais pelo fungo e é realizada em sacos plásticos sob condições controladas, sendo considerado um método eficiente para a produção em larga escala de conídios. Já a fermentação submersa é vantajosa por permitir a obtenção de uma elevada quantidade de outras estruturas fúngicas, como micélio, blastóporos e conídios facilitando o crescimento inicial rápido do fungo (Rossi-Zalaf, 2007). Além disso este método utiliza matrizes preparadas em meio líquido, reduzindo o tempo necessário para a produção. Geralmente, as fermentações em estado sólido levam em torno de 10 a 15 dias, enquanto a fermentação submersa leva cerca de 3 a 5 dias, para se chegar na mesma concentração que os cultivos em estado sólido (EMBRAPA, 2009).

Diante da crescente demanda por biopesticidas mais eficientes e sustentáveis, a necessidade de aprimorar a produção desses produtos torna-se evidente, dada a importância de atender a um mercado em expansão de insumos agrícolas mais eficazes e amigáveis ao meio ambiente. Apesar dos diversos estudos que têm avaliado a eficácia do fungo entomopatogênico *H. thompsonii* no campo, identifica-se uma lacuna significativa no que diz respeito à produção de células viáveis desse microrganismo e uma lacuna ainda mais ampla quando se trata da produção de enzimas, especialmente as quitinases. A escassez de pesquisas nesse âmbito destaca a necessidade de preencher essa lacuna e, consequentemente, ressalta a importância e o caráter inovador deste projeto. Ao abordar a produção mais eficiente e escalonável não apenas do microrganismo, mas também das enzimas essenciais, este projeto propõe uma contribuição significativa para o desenvolvimento de biopesticidas mais eficazes, sustentáveis e alinhados às demandas de um setor agrícola em constante evolução.

6. CONCLUSÃO

Mesmo na ausência de um indutor específico para a produção de quitinase, o fungo entomopatogênico *Hirsutella thompsonii* CBMAI 2832 é capaz de produzir quitinase e células viáveis em concentrações elevadas. A melhor fonte de carbono identificada no estudo foi a sacarose, enquanto o extrato de soja se mostrou a melhor fonte de nitrogênio. As condições ótimas para o crescimento e produção de quitinase foram obtidas com uma combinação de pH inicial de 6,0, 15 g/L de extrato de soja e 5 g/L de açúcar, resultando em um máximo de $5,5 \times 10^8$ UFC/mL e uma atividade de quitinase de $8,0 \pm 0,16$ U/mL após 360 horas de cultivo.

O planejamento experimental indicou que o pH do meio de cultivo tem um efeito significativo sobre a produção de quitinase, enquanto as concentrações de açúcar e extrato de soja afetam principalmente a produção de protease. Além disso, todas as variáveis testadas influenciam a produção de unidades formadoras de colônias (UFC). A produção de protease foi mais elevada nos primeiros dias de cultivo, enquanto a produção de quitinase se intensificou após o sétimo dia, sugerindo uma relação inversa entre as duas enzimas, com condições ótimas distintas para cada uma.

A aeração de 4 L/min foi a mais eficiente para otimizar a produção de biomassa, UFC e quitinase na linhagem *H. thompsonii* CBMAI 2832. Vazões menores, de 0 e 2 L/min, foram menos eficazes tanto para o crescimento quanto para a produção enzimática, enquanto uma vazão maior, de 8 L/min, também não proporcionou o melhor desempenho global.

Esses resultados demonstram a importância de ajustes finos nas condições de cultivo, como a aeração e os parâmetros químicos do meio, para otimizar a produção de bioinsumos à base de *H. thompsonii*. A otimização dessas condições permitiu a formulação de um bioacaricida mais eficaz, com produção elevada de quitinase, destacando a relevância de controlar rigorosamente o processo de fermentação para o desenvolvimento de bioacaricidas de alto desempenho.

REFERÊNCIAS

- ABATI, K. **Produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium rileyi* (Farlow) por fermentação líquida e sólida**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2015.
- AITA, B. C. *et al.* Production of cell-wall degrading enzymes by solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 3, p. 103193, 2019.
- AGRAWAL, Y. *et al.* Genome sequence, comparative analysis, and evolutionary insights into chitinases of entomopathogenic fungus *Hirsutella thompsonii*. **Genome biology and evolution**, v. 7, n. 3, p. 916-930, 2015.
- AGROFIT. Disponível em:
http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 07/01/2022.
- ALENCAR FILHO, J. M. T.; *et al.* Análise da composição centesimal da soja e um de seus principais produtos, o extrato de soja. **Atena editora**. v3. c7. p. 53-61. 2019.
- ALPINO, T. D. M. A. *et al.* Os impactos das mudanças climáticas na Segurança Alimentar e Nutricional: uma revisão da literatura. **Ciência & Saúde Coletiva**. v.27, p.273-86, 2022.
- ALVES, J. N. O.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Production of invertases by anamorphic (*Aspergillus nidulans*) and teleomorphic (*Emericella nidulans*) fungi under submerged fermentation using rye flour as carbon source. **Advances in Microbiology**, v. 3, p. 421-429, 2013.
- ALVES, E. A. *et al.* Process development to obtain a cocktail containing cell-wall degrading enzymes with insecticidal activity from *Beauveria bassiana*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 156, p. 107484, 2020.
- ARAKANE, Y.; MUTHUKRISHNAN, S. Insect chitinase and chitinase-like proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 67, p. 201-216, 2010.
- ARAÚJO, J. L. **Prospecção científica sobre bioinsumos agrícolas**. Trabalho de conclusão de curso. UFCG. Campina Grande. 2023.
- ARNAOUTY, S. A.; EL-HENEIDY, A. H.; AFIFI, A. I.; HEIKAL, I. H.; KORTAM, M. N. Comparative study between biological and chemical control programs of certain sweet pepper pests in greenhouses. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 30, p. 1-7, 2020.
- BAKER, Brian P.; GREEN, Thomas A.; LOKER, Ali J. Biological control and integrated pest management in organic and conventional systems. **Biological Control**, v. 140, p. 104095, 2020.
- BANKS, Nathan. The arachnida of Florida. **Proceedings of the Academy of natural Sciences of Philadelphia**, p. 120-147, 1904.

BARRIOS-GONZÁLEZ, J.; TARRAGÓ-CASTELLANOS, M. R. Solid-state fermentation: special physiology of fungi. **Fungal metabolites. Reference series in phytochemistry. Springer, Cham**, p. 319-347, 2017.

BARON, N. C.; RIGOBELLO, E. C.; ZIED, D. C.. Filamentous fungi in biological control: current status and future perspectives. **Chilean journal of agricultural research**, v. 79, n. 2, p. 307-315, 2019.

BAYER. Controle de pragas agrícolas. 19/04/2022. Disponível em:

<https://www.bayer.com.br/pt/blog/controle-de-pragas-agricolas#:~:text=Segundo%20a%20Organiza%C3%A7%C3%A3o%20das%20Na%C3%A7%C3%B5es,aproximadamente%2020%20bilh%C3%B5es%20de%20d%C3%B3lares>.

Acesso em 07 jan. 2023.

BENTO, J. M. S. MORAES, G. J.; WARUMBY, J. F.; BELLOTI, A. C. Controle biológico da cochonilha no nordeste do Brasil. In: PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole. p. 395-408 2002.

BERTOLO, F. O. A. Acarofauna associada à *Vitis* sp. em Caxias do Sul, RS. 2011.

BEYS-DA-SILVA, W. O.; SANTI, L.; CORRÊA, A. P. F.; SILVA, L. A.; BRESCIANI, F. R.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* sl. can modulate the secretion of lipolytic enzymes in response to different substrates including components of arthropod cuticle. **Fungal Biology**. v. 114, p. 911-916, 2010.

BILGO, E. *et al.* Native entomopathogenic *Metarhizium spp.* from Burkina Faso and their virulence against the malaria vector *Anopheles coluzzii* and non-target insects. **Parasites & vectors**, v. 11, p. 1-6, 2018.

BONDAR, G. A cultura de cacao na Bahia. **(No Title)**, 1938.

BALDONI, D. B. *et al.* **Prospecção de fungos quitinolíticos e produção de quitinases por fermentação em estado sólido**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria. 2022.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020. Brasília, 2020. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/decreto-n-10.375-de-26-de-maio-de-2020-258706480>. Acesso em: 17 jan. 2024.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Bioinsumos. Brasília, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inovacao/bioinsumos>. Acesso em: 17 jan. 2024.

BRUCK D.J.; LEWIS L.C. Rainfall and crop residue effect on soil dispersion and *Beauveria bassiana* spread to corn. **Applied Soil Ecology**. v. 20, p. 183-190. 2002.

CARDIN, A. Brazil's pesticide use surpasses major nations. **The Rio Times**, 2023. Disponível em: <https://www.riotimesonline.com/brazils-pesticide-use-surpasses-major-nations/>. Acesso em: 16 out. 2024.

CARNEIRO, P. Brasil expande área com defensivos em 105% em 2023, aponta pesquisa. **Safras & Mercado**, 2024. Disponível em: <https://safras.com.br/brasil-expande-area-com-defensivos-em-105-em-2023-aponta-pesquisa/>. Acesso em: 10 out. 2024.

CASTREJÓN ANTONIO, J. E. Potenciación de la producción de enzimas degradadoras de cutícula a partir dos aislamientos monospóricos de *Beauveria bassiana* (BALS:) vuillemin para mejorar el biocontrol de la conchuela del frijol, *epilachna varivestis* (MULSANT). Tese de Doutorado. **Universidad Autónoma de Nuevo León**. 2012.

CHAGAS, M. C. M.; PARRA, J. R. P.; MILANO, P.; NASCIMENTO, A. M.; PARRA, A. L. G. C.; YAMAMOTO, P. T. *Ageniaspis citricola*: criação e estabelecimento no Brasil. In: PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole. p. 377-394. 2002.

CORAGEM, R. D. **Produção de quitinase por fungos do gênero Trichoderma**. Trabalho de Conclusão de Curso. UFPE. 2023.

CROPLIFE BRASIL. (2023). Biodefensivos Cada Vez Mais Presentes no Campo. Recuperado de: <https://croplifebrasil.org/noticias/biodefensivos-cada-vez-mais-presentes-no-campo/>. Acesso em: 19 jan. 2024.

CUTRIM, F. A. *et al.* Influência de meios de cultura e da interação carbono-nitrogênio no crescimento e esporulação de *Penicillium sclerotigenum*. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 85-88, 2006.

DACANAL, G. C.; MENEGALLI, F. C. Experimental study and optimization of the agglomeration of acerola powder in a conical fluid bed. **Powder Technology**, v. 188, n. 3, p. 187-194, 2009.

DAVYDOV, R. *et al.* The application of pesticides and mineral fertilizers in agriculture. In: **MATEC web of conferences**. p. 11003. EDP Sciences, 2018.

DOMENE, S. *et al.* Segurança alimentar: reflexões sobre um problema complexo. **Estudos Avançados**, v. 37, p. 181-206, 2023.

DOMINGUEZ, A. L.; RODRIGUES, L. R.; LIMA, N. M.; TEIXEIRA, J. A. An overview of the recent developments on fructooligosaccharide production and applications. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, p. 324-337, 2014.

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

DONATTI, A. C. *et al.* Production and regulation of cuticle-degrading proteases from *Beauveria bassiana* in the presence of *Rhammatocerus schistocercoides* cuticle. **Current Microbiology**, v. 56, p. 256-260, 2008.

DONZELLI, B. G. G.; KRASNOFF, S. B. Molecular genetics of secondary chemistry in *Metarhizium* fungi. **Advances in genetics**, v. 94, p. 365-436, 2016.

DUO-CHUAN, L. Review of fungal chitinases. **Mycopathologia**. v. 161, n. 6, p. 345-360, 2006.

EHLER, L. E. Integrated pest management (IPM): definition, historical development and implementation, and the other IPM. **Pest management science**, v. 62, n. 9, p. 787-789, 2006.

EMBRAPA. 2024. Perguntas e Respostas sobre Pragas Quarentenárias. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Recuperado de: <https://www.embrapa.br/tema-pragas-quarentenarias/perguntas-e-respostas#:~:text=Pragas%20s%C3%A3o%20qualquer%20esp%C3%A9cie%2C%20ra%C3%A7a,danifica%20plantas%20ou%20produtos%20vegetais>. Acessado em 16 de jan. de 2024.

ESLAMI, N.; ANZABI, Y.; NOURAZAR, M. A. Comparison of the Effect of Temperature and Different Culture Media on the Possibility of Growth of *Salmonella Typhimurium* (ATCC: 14028). **International Journal of Medical Laboratory**, 2023.

FAGERIA, N. K. **Nitrogen management in crop production**. CRC press, 2014.

FAO. World Food and Agriculture – Statistical Yearbook 2022. Rome. 2022.

FAO – Food and Agriculture Organization. Dados sobre alimentação e agricultura. FAOSTAT. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Acesso em: 16 jan. 2023.

FERREIRA, C. T. *et al.* **Manejo de *Aceria guerreronis* Keifer (Acari: Eriophyidae) em coqueiro, na Amazônia oriental**. 2024. Tese de Doutorado. Ufra-Campus Belém.

FENG, M. G.; POPRAWSKI, T. J.; KHACHATOURIANS, G. G. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. **Biocontrol science and technology**, v. 4, n. 1, p. 3-34, 1994.

FIGUEIREDO, M. P. *et al.* **Potencial biotecnológico do uso de filtrados de *Trichoderma asperellum* com indução de quitinases e proteases no controle de larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae)**. 2024. Tese de Doutorado. Ufra-Campus Belém.

FISHER, F. E. *et al.* Entomogenous Fungi attacking Scale Insects and Rust Mites on Citrus in Florida. **Journal of Economic Entomology**, v. 43, n. 3, 1950.

FLORÊNCIO, J. *et al.* Ethanol, acetaldehyde, and methanol in the gas phase and rainwater in different biomes and urban regions of Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 929, p. 172629, 2024.

FONTES, E.M.G.; PIRES, C.S.S.; SUJII, E.R. Estratégias de uso e histórico. In: FONTES, E.M.G.; VALADARES-INGLIS, M.C. **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília: Embrapa, . p. 21-43. 2020.

FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. Controle biológico de pragas da agricultura. EMBRAPA 2020.

FORBES BRASIL. (2022, Março 25). Como o Brasil se Tornou Líder Mundial em Bioinsumos. Forbes Brasil. Recuperado de: <https://forbes.com.br/colunas/2022/03/como-o-brasil-se-tornou-lider-mundial-em-bioinsumos/>. Acessado em 19 de jan de 2024.

GERSON, U.; KENNETH, R.; MUTTATH, T. I. *Hirsutella thompsonii* U a fungal pathogen of mites. II. Host-pathogen interactions. **Annals of Applied Biology**, v. 91, n. 1, p. 29-40, 1979.

GLOBORURAL. (2023, Maio). Bioinsumos: Mercado de R\$ 17 Bilhões até 2030. Vozes do Agro. Globo Rural. Recuperado de: <https://globorural.globo.com/opiniaovozes-do-agro/noticia/2023/05/bioinsumos-mercado-de-r-17-bilhoes-ate-2030.ghtml>. Acessado em 19 de jan de 2024.

GREENFIELD, B. P. J. *et al.* Conidia of the insect pathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, fail to adhere to mosquito larval cuticle. **Royal Society Open Science**, v. 1, n. 2, p. 140193, 2014.

GOETTEL, M. S. *et al.* Measurement of internal *Beauveria bassiana* to ascertain non-target impacts on arthropods in field environments. **Biocontrol Science and Technology**, v. 31, n. 8, p. 834-849, 2021.

GOMAA, E. Z. Microbial chitinases: properties, enhancement and potential applications. **Protoplasma**, v. 258, n. 4, p. 695-710, 2021.

GOMES, J. P. A. *et al.* Uso de microrganismos eficientes como alternativa para agricultura sustentável: um referencial teórico. **Agroecologia: Métodos e Técnicas para uma Agricultura Sustentável**, v. 5, p. 340-355, 2021.

GHOSH, S. *et al.* Filamentous fungi for sustainable remediation of pharmaceutical compounds, heavy metal and oil hydrocarbons. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 11, p. 1106973, 2023.

HAJEK, A.; ST. LEGER, R. Interactions between fungal pathogens and insect host. **Annual Review of Entomology**. v. 39, p. 293-322.1994.

HAQ, I. *et al.* Purification and Characterization of a *Thermostable Cellobiohydrolase* from *Thermotoga petrophila*. **Protein and Peptide Letters**, v. 25, n. 11, p. 1003-1014, 2018.

HOELL, I. A.; VAAJE-KOLSTAD, G.; EIJSINK, V. G. Structure and function of enzymes acting on chitin and chitosan. **Biotechnology and Genetic Engineering Biopolymers**. v. 14, p. 1581-1595, 2010.

HAMID, R.; KHAN, M. A.; AHMAD, M.; AHMAD, M. M.; ABDIN, M. Z.; MUSARRAT, J.; JAVED, S. Chitinases: An update. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**. v. 5, p. 21–29, 2013.

HIRAPARA, I. M.; GHETIYA, L. V. Effect of different solid media and liquid media on growth, sporulation and biomass of *Hirsutella thompsonii* Fisher. 2023.

HUMBER, R. A. Evolution of entomopathogenicity in fungi. **Journal of invertebrate pathology**, v. 98, n. 3, p. 262-266, 2008.

HUSSAIN, M.; AVERY, P B.; ZHU, W.; PITINO, M.; ARTHURS, S. P.; WANG, P.; QIU, D.; MAO, R. Pathogenicity of *Cordyceps javanica* (Hypocreales: Cordycipitaceae) to *Diaphorina citri* (Homoptera: Liviidae) adults, with ultrastructural observations on the fungal infection process. **Agronomy**. v. 11, n. 12, p. 2476, 2021.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Projeção da população do Brasil e Unidades da Federação por sexo e idade para o período 2010-2060. Brasília, DF, 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/index.html>. Acesso em: 16 jan. 2024.

JANA, A.; MAITY, C.; HALDER, S. K.; MONDAL, K. C.; PATI, B. R.; MOHAPATRA, P. K. Enhanced tannase production by *Bacillus subtilis* PAB2 with concomitant antioxidant production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 4, p. 363-371, 2013.

JARONSKI, S. T. Mass production of entomopathogenic fungi—state of the art. **Mass production of beneficial organisms**, p. 317-357, 2023.

KIDANU, S.; HAGOS, L. Research and application of entomopathogenic fungi as pest management option: a review. **Journal of Environment and Earth Science**, v. 10, n. 3, p. 31-39, 2020.

KIG, C.; TURKEL, S.; TEMIZKAN, G. Isolation and characterization of glucose derepressed invertase mutants from *Schizosaccharomyces pombe*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.69, n. 12, p. 2475-2478, 2005.

KOCH, L. W.; HILDEBRAND, A. A.; A microscopical study of infection of the roots of strawberry and tobacco seedlings by micro-organisms of the soil. **Canadian Journal of Research**, v. 14, n. 1, p. 11-26, 1936.

KOPITTKE, P. M. *et al.* Soil and the intensification of agriculture for global food security. **Environment international**, v. 132, p. 105078, 2019.

LACEY, L. A. *et al.* Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of invertebrate pathology**, v. 132, p. 1-41, 2015.

LEHNINGER, T. M.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica. 6ª Edição, Ed. Artmed, 2014.

LI, J.; YING, S.H.; SHAN, L. T.; FENG, M. G. A new non-hydrophobic cell wall protein (CWP10) of *Metarhizium anisopliae* enhances conidial hydrophobicity when expressed in *Beauveria bassiana*. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 85, p. 975-984. 2010.

LI, Z.; ALVES, S. S.; ROBERTS, D.; FAN, M.; DELALIVERA, I.; TANG, J.; LOPES, R. B.; FARIA, M.; RANGEL, D. E. N. Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. **Biocontrol Science & Technology**. v. 20, p. 117-136, Aug. 2010.

LINS JUNIOR, J. C. L. Manejo integrado de pragas na cultura do tomate: uma estratégia para a redução do uso de agrotóxicos. **Extensão em Foco (ISSN: 2317-9791)**, v. 7, n. 1, p. 6-22, 2019.

LITWIN, A.; NOWAK, M.; RÓŻALSKA, S. Entomopathogenic fungi: unconventional applications. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**. v. 19, n. 1, p. 23-42, 2020.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BOND, J. S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 45, p. 30433-30437, 2008.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. Microbiologia de Brock. Artmed, 14ed., 2016.

MANNINO, M. C.; HUARTE-BONNET, C.; DAVYT-COLO, B.; PEDRINI, N. Is the insect cuticle the only entry gate for fungal infection? Insights into alternative modes of action of entomopathogenic fungi. **Journal of Fungi**. v. 5, n. 2, p. 33, 2019.

MAGANHOTO, N. H. **otimização dos parâmetros para fermentação líquida submersa de *Clonostachys rosea***. Trabalho de Conclusão de Curso. UFLA. 2020.

MASCARIN, G. M.; JARONSKI, S. T. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 1-26, 2016.

MASSON-DELMOTTE, V. P. *et al.* (Ed.) Global Warming of 1.5°C: An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty. Cambridge, UK: **Cambridge University Press**, 2022.

MCCOY, C. W.; HILL, A. J.; KANAVEL, R. F. A liquid medium for the large-scale production of *Hirsutella thompsonii* in submerged culture. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 19, n. 3, p. 370-374, 1972.

MCCOY, C. W.; COUCH, T. L.; WEATHERWAX, R. A simplified medium for the production of *Hirsutella thompsonii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 1978.

MCGREGOR, E. A. Descriptions of seven new species of red spiders. **Proceedings of the United States National Museum**, 1917.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Mapa registra recorde de 95 defensivos de controle biológico em 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/Mapa-registra-recorde-de-95-defensivos-biologicos-em-2020>. Acesso em: 07/01/2023.

MIRA, P.; YEH, P.; HALL, B. G. Estimating microbial population data from optical density. **PLoS One**, v. 17, n. 10, p. e0276040, 2022.

MISHRA, S. *et al.* Insights into the microbial degradation and biochemical mechanisms of carbamates. **Chemosphere**, v. 279, p. 130500, 2021.

MOHAMMAD-RAZDARI, A. *et al.* Recent advances in E-monitoring of plant diseases. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 201, p. 113953, 2022.

MOLNÁR, I.; GIBSON, D. M.; KRASNOFF, S. B. Secondary metabolites from entomopathogenic Hypocrealean fungi. **Natural product reports**, v. 27, n. 9, p. 1241-1275, 2010.

MONDAL, S. *et al.* Journey of enzymes in entomopathogenic fungi. **Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering**, v. 18, n. 2, p. 85-99, 2016.

MONTEIRO-JÚNIOR, J. E. M.; GRANGEIRO, T. B.; NOGUEIRA, N. A. P. Chitinases as antibacterial proteins: a systematic review. **Journal of Young Pharmacists**. v. 10, n. 2, p. 144-148, 2018.

MONTESINO-MATÍAS R.; VINIEGRA-GONZÁLEZ G.; ALATORRE-ROSAS R.; LOERA-CORRAL O. Perfiles de actividad enzimática extracelular de *Beauveria bassiana* involucrados en los mecanismos de virulencia hacia *Tenebrio monitor*. En memorias del **XXXI Congreso Nacional de Control Biológico**, Zacatecas, México. 2008.

MORA, M. A. E.; CASTILHO, A. M. C.; FRAGA, M. E. Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, 2018.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera. **Annual Review of Entomology**. v. 44, p. 257-289, 1999.

MOZZAQUATRO, L. B.; ROSSATO, M. V.; RADDATZ, J. C. Custo-benefício da Substituição de Insumo Químico por Biológico no Cultivo da Soja. In: **Congresso USP de controladoria e contabilidade**, 21., 2021, São Paulo. Anais [...]. São Paulo: FIPECAFI, 2021. Disponível em: <https://congressosp.fipecafi.org/anais/21UspInternational/congressinho-todos-trabalhos.html>. Acesso em: 22 jul. 2024.

NADEEM, H.; RASHID, M. H.; SIDDIQUE, M. H.; AZEEM, F.; MUZAMMIL, S.; JAVED, M. R.; ALI, M. A.; RASUL, I.; RIAZ, M. Microbial invertases: a review on kinetics, thermodynamics, physiochemical properties. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1202-1210, 2015.

NEPOMOCENO, T. A. R.; PLEIN, C.; CARNIATTO, I. Desenvolvimento sustentável na agricultura familiar: implicações para o controle biológico de insetos-praga. **International Journal of Environmental Resilience Research and Science**, v. 5, n. 1, p. 1-19. 2023.

NEVES, M. F. Os biológicos, bioinsumos e bioprodutos: um mar de oportunidades. Ci Orgânicos. Recuperado de: <https://ciorganicos.com.br/biblioteca/os-biologicos-bioinsumos-e-bioprodutos-um-mar-de-oportunidades/>. Acessado em 19 de jan. de 2024.

ORNELA, P. H. O. **Produção de quitinases pelo fungo *Aspergillus niveus* em fermentação submersa e em estado sólido utilizando resíduos da indústria pesqueira do camarão e análise do potencial antifúngico**. Tese de doutorado. UNESP. 2022.

PAPINI, S.; ANDREA, M.M.; LUCHINI, L.C. Segurança ambiental no controle químico de pragas e vetores. São Paulo: Editora Atheneu, 2014.

PARRA, J. R. P.; ALVES, G. R.; DINIZ, A. J. F.; VIEIRA, J. M. 2016. *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae): mass rearing and potential use of the parasitoid in Brazil. **Journal of Integrated Pest Managemen.**, v. 7, n. 1, p. 1-11, Jan. 2016.

PATEL, M. *et al.* *Bacillus subtilis* ER-08, a multifunctional plant growth-promoting rhizobacterium, promotes the growth of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) plants under salt and drought stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023.

PELAEZ, V.; MIZUKAWA, G. Estratégias de diversificação na indústria de agrotóxicos: de sementes a biopesticidas. **Ciência Rural**, v. 47, n. 2, p. 1-7, 2017.

PINHEIRO, K. F.; MOREIRA, A.N.; PEREZ, J.O. & MOURA, M.D.C.S. Diversidade de ácaros em variedade de uva de vinho no Vale de São Francisco. **III Congresso de Pesquisa e Inovação na Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica**, Fortaleza, 2008.

POMMER, V. *et al.* Avaliação de fontes alternativas de carbono na produção de quitinase extracelular por fungos filamentosos. **Análise Crítica das ciências biológicas e da Natureza**. v. 2, c. 20, p. 223-230, 2019.

POTENZA, R. F. *et al.* Análise das emissões brasileiras de e suas implicações para as metas climáticas do Brasil 1970 - 2020 gases de efeito estufa. Brasília, **DF: SEEG**, 2021.

PUCHETA DÍAZ, M. *et al.* Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. **Interciencia**, v. 31, n. 12, p. 856-860, 2006.

RAVI, A. *et al.* Effect of zinc oxide nanoparticle supplementation on the enhanced production of surfactin and iturin lipopeptides of endophytic *Bacillus* sp. Fc11 and its ameliorated antifungal activity. **Pest Management Science**, v. 77, n. 2, p. 1035-1041, 2021.

RIBEIRO, A. P. S. **Produção de quitinases por fermentação por *Trichoderma* sp.** Tese de Doutorado. UNICAMP. 2020.

RIBEIRO, M. C. Avaliação e monitoramento dos níveis de contaminação por resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal comercializados no Estado de Minas Gerais, Brasil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e44610212802-e44610212802, 2021.

ROLLAND, F.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J. M. Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. **Trend in Biochemical Sciences**, v. 26, n. 5, p. 310 – 317, 2001.

ROSSI-ZALAF, L. S.; ALVES, S. B.; VIEIRA, S. A. Efeito de meios de cultura na virulência de *Hirsutella thompsonii* (Fischer)(Deuteromycetes) para o controle *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes)(Acari: Tenuipalpidae). **Neotropical Entomology**, v. 37, p. 312-320, 2018.

ROTHER, P. D. H. *et al.* **QUITINASE DE *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T: PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA**. Tese de mestrado. 2022.

SAHA, B. C. *et al.* Pilot scale conversion of wheat straw to ethanol via simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource technology**, v. 175, p. 17-22, 2015.

SALVADORI, J. R.; SALLES, L. A. Controle biológico dos pulgões do trigo. In: PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. **São Paulo: Manole**, p. 427-447. 2002.

SAMSON, R. A.; MCCOY, C. W.; O'DONNELL, K. L. Taxonomy of the acarine parasite *Hirsutella thompsonii*. **Mycologia**, v. 72, n. 2, p. 359-377, 1980.

SANGORRÍN, M. P.; FOLCO, E. J.; MARTONE, C. M.; SÁNCHEZ, J. J. Purification and characterization of a protease inhibitor from white croaker skeletal muscle (*Micropogon opercularis*). **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 33, p. 691-699, 2001.

SANTI, L. *et al.* Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 874-880, 2010.

SCHMALTZ, S. Produção de enzimas hidrolíticas por *Beauveria bassiana* em fermentação submersa assistida por ultrassom. Tese de mestrado. 2020.

SCHMALTZ, S. *et al.* Ultrasound-assisted fermentation for production of β -1, 3-glucanase and chitinase by *Beauveria bassiana*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 96, n. 1, p. 88-98, 2021.

SERRA, L. S. *et al.* Revolução Verde: reflexões acerca da questão dos agrotóxicos. **Revista Científica do Centro de Estudos em Desenvolvimento Sustentável da UNDB**, v. 1, n. 4, p. 2-25, 2016.

SILVA, W. O. B. *et al.* Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 8, p. 829-834, 2009.

SHUKLA, P. R. *et al.* (Ed.) Climate Change 2022: Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge, UK: **Cambridge University Press**, 2022.

SKINNER, M.; PARKER, B. L.; KIM, J. S. Role of entomopathogenic fungi in integrated pest management. **Integrated pest management**, p. 169-191, 2014.

SMITH, H. S. On some phases of insect control by the biological method. **Journal of Economic Entomology**. v.12, n.47, p. 288-292, 1919.

SOTELO-MUNDO, R. R. *et al.* The lysozyme from insect (*Manduca sexta*) is a cold-adapted enzyme. **Protein and peptide letters**, v. 14, n. 8, p. 774-778, 2007.

SUNG, G. H. *et al.* A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 44, n. 3, p. 1204-1223, 2007.

TENBERG, J. *et al.* When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. **Journal of Pest Science**, v. 94, n. 1, p. 665-676, 2021.

TOLEDO, A.; ALIPPI, A.; LENICOV, R. Growth inhibition of *Beauveria bassiana* by bacteria isolated from the cuticular surface of the corn leafhopper, *Dalbulus maidis* and the planthopper, *Delphacodes kuscheli*, two important vectors of maize pathogens. **Journal of Insect Science**. v. 2, p.1-12. 2010.

UNITED NATIONS. Population Division of the Department of Economic and Social Affairs of the United Nations Secretariat. **World Population Prospects: The 2012 Revision**. New York. 2022. Disponível em: <https://population.un.org/wpp/>. Acesso em: 15 jan. 2024.

VAN LONG, N. N.; JOLY, C.; DANTIGNY, P. Active packaging with antifungal activities. **International Journal of Food Microbiology**. v. 220, p. 73-90, 2016.

VINCENT, J. F.V; WEGST, U. G.K. Design and mechanical properties of insect cuticle. **Arthropod structure & development**, v. 33, n. 3, p. 187-199, 2004.

XIE, Fuhong *et al.* *Bacillus amyloliquefaciens* 35 M can exclusively produce and secrete proteases when cultured in soybean-meal-based medium. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 209, p. 112188, 2022.

WANG, C.; ST LEGER, R. J. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 5, p. 808-816, 2007.

WANG, Y. *et al.* Efficient extraction of chitin from crustacean waste via a novel ternary natural deep eutectic solvent. **Carbohydrate polymers**, v. 286, p. 119281, 2022.

WEIBELZAHN, E.; LIBURD, O. E. Epizootic of *Acalitus vaccinii* (Acari: Eriophyidea) caused by *Hirsutella thompsonii* on southern highbush blueberry in north-central Florida. **Florida Entomologist**, p. 601-607, 2009.

WESSELS, J. L.; UNIFORMED SERVICES UNIVERSITY OF THE HEALTH SCIENCES. The Cloning, Characterization, and Functional Analysis of Murine Pregnancy Specific Glycoproteins. 1999.

WU, S.; TOWES, M. D.; OLIVEIRA-HOFMAN, C.; BEHLE, R. W.; SOMMONS, A. M.; SHAPIRO-ILAN, D. I. Environmental tolerance of entomopathogenic fungi: a new strain of *Cordyceps javanica* isolated from a whitefly epizootic versus commercial fungal strains. **Insect**. v. 11, n. 10, p. 711, 2020.

ZHANG, Z. Q.; RHODE, B. E. A faunistic summary of acarine diversity in New Zealand. **Systematic and Applied Acarology**, v. 8, n. 1, p. 75-84, 2003.

ZHANG, T. *et al.* The effect of lactic acid bacteria fermentation on physicochemical properties of starch from fermented proso millet flour. **Food Chemistry**, v. 437, p. 137764, 2024.

ZHAO, H.; LOVETT, B.; FANG, W. Genetically engineering entomopathogenic fungi. **Advances in genetics**, v. 94, p. 137-163, 2016.

ZHU, J. Y. *et al.* Learning behavior of *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae) can help in adapting from feeding on alternative prey to target prey. **Systematic and Applied Acarology**, v. 27, n. 10, p. 1957-1969, 2022.

ZOMMARA, M. *et al.* Probiotic and technological characterization of selected *Lactobacillus strains* isolated from different egyptian cheeses. **BMC microbiology**, v. 23, n. 1, p. 160, 2023.

YAZID, N. A.; BARRENA, R.; KOMILIS, D.; SÁNCHEZ, A. Solid-State Fermentation as a novel paradigm for organic waste valorization: A Review. **Sustainability**, v. 9, n. 2, p. 224. 2017.