

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.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo desta pesquisa foi determinar os parâmetros ótimos de cultivo do fungo filamentoso *Hirsutella thompsonii* para maximizar a produção de células viáveis e da enzima quitinase em fermentação submersa, com o propósito de formular um produto eficiente para aplicação em bioinsumos agrícolas.

2.2 Objetivos específicos

Selecionar os melhores parâmetros de cultivo para a produção de células viáveis e da enzima quitinase em fermentação submersa, tais como:

- Fontes adicionais de carbono e nitrogênio;
- Avaliação do efeito de sais no meio de cultivo.
- Avaliação da razão carbono/nitrogênio;
- Avaliação de fontes indutoras de produção de quitinase;
- Avaliação da estabilidade da enzima no caldo de cultivo
- Avaliação de condições de cultivo (aeração, pH inicial do cultivo);
- Avaliação do escalonamento inicial do processo, com a transição de frascos de 500 mL para frascos de 5 L.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Agricultura frente à segurança alimentar e às mudanças climáticas

De acordo com as projeções mais recentes da Divisão de População da ONU, em 2022 a população mundial atingiu 8 bilhões de pessoas, e espera-se que cresça para aproximadamente 9,7 bilhões em 2050 e 10,4 bilhões em 2100. (United nations, 2022). No contexto brasileiro, que atualmente conta com cerca de 215 milhões de habitantes, as estimativas apontam para um aumento de 231 milhões em 2050 e 285 milhões em 2100 (IBGE, 2022). Este panorama destaca um dos maiores desafios contemporâneos: garantir a segurança alimentar. Além disso, a forma como produzimos e consumimos alimentos revela a necessidade de melhorias, ressaltando a importância de maximizar a qualidade e produtividade das lavouras (Domene *et al.*, 2023).

Somado a isso, o processo agrícola atualmente em uso foi reconhecido como um dos principais impulsionadores das mudanças climáticas (Domene *et al.*, 2023). Ao analisarmos a situação nacional, o Brasil figura como o quinto maior emissor de gases de efeito estufa no mundo, sendo que o setor agropecuário contribuiu com 27% das emissões em 2020, enquanto mudanças no uso da terra e desmatamento responderam por 46% (Potenza *et al.*, 2021). Se essas emissões persistirem nos níveis atuais, é previsto um aumento global na temperatura de 1,5°C antes de 2030 e de 2°C antes de 2050 (Alpino *et al.*, 2022), acarretando queda na produtividade, aumento na presença de pragas e impactos negativos nos preços, o que terá implicações adversas na produção agrícola (Masson-Delmotte *et al.*, 2022; Shukla *et al.*, 2022). Esses impactos são agravados por projeções que indicam uma redução de 18% a 25% na produção global de alimentos devido a pragas, com patógenos responsáveis por mais 10% a 15% dessa perda (Mohammad-Razdari *et al.*, 2022). Consequentemente, para atender às demandas mundiais por lavouras, será necessário o uso de cerca de 65 mil toneladas de pesticidas e mais de 2,16 milhões de toneladas de fertilizantes minerais anualmente para alcançar os rendimentos visados pela produção agrícola (Davydov *et al.*, 2018).

Assim, mesmo reconhecendo que a garantia de uma alimentação adequada para a população e a restauração do clima do planeta dependa de diversos fatores, o desenvolvimento de uma agricultura sustentável se consolida como uma das causas mais importantes para a sobrevivência humana (Kopittke *et al.*, 2019).

3.2. Praga agrícolas: ácaros

Segundo a Embrapa (2024) pragas agrícolas são definidas como quaisquer espécies, raça ou biótipo de planta, animal ou agente patogênico que danifica plantas ou produtos vegetais. Essas podem ser divididas em patógenos, que são agentes causadores de doenças (ex.: bactérias, vírus, fungos e nematoides), e pestes, que são organismos invasores que atacam e causam danos as plantas (ex.: insetos). Dessa forma, praga é qualquer organismo que o ser humano julga como sendo prejudicial a si mesmo, seus plantios, animais e/ou sua propriedade (Lins Júnior, 2019).

Já foram descritas cerca de um milhão de espécies de insetos, sendo apenas 10% consideradas pragas agrícolas. Esses organismos podem causar danos de forma direta, quando ataca a parte comercial propriamente dita da planta, ou de forma indireta, quando causa problemas em partes da planta que não são comerciais refletindo na produção final. Além de consumir as plantas, os insetos também podem transmitir patógenos, podendo facilitar a proliferação de bactérias e o desenvolvimento de fungos que injetam toxinas nos vegetais tornando o alimento não consumível para os humanos (Papini, 2014; Lins Júnior, 2019).

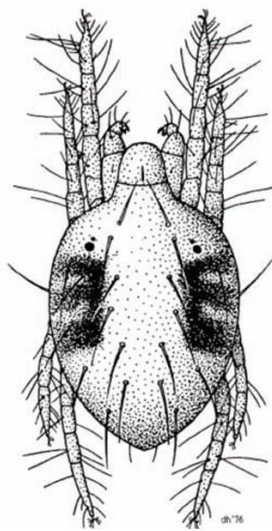
Uma das principais pestes agrícolas são os ácaros, organismos classificados como artrópodes quelicerados da classe Arachnida, subclasse Acari, e correspondem ao segundo mais numeroso grupo de artrópodes, sendo apenas superado pelo grupo dos insetos. Geralmente são pequenos, não ultrapassando 0,5 mm de comprimento, habitam diferentes ambientes, tanto terrestre como o aquático, e apresentam hábitos alimentares diversos, como predação, saprofitismo, ou seja, se alimentam de microrganismos ou matéria orgânica em decomposição ou podem ser parasitas de outros animais (Bertolo *et al.*, 2011).

Embora ácaros e insetos pertençam a grupos taxonomicamente distintos, ambos causam danos significativos à agricultura. No entanto, quando falamos de entomopatógenos, a maior parte das pesquisas e esforços está voltada para o controle de insetos praga. Essa disparidade pode ser explicada, em parte, pela atenção histórica dada aos insetos devido ao seu impacto direto e amplamente documentado nas grandes culturas agrícolas (Goettel *et al.*, 2021). Por outro lado, os ácaros, apesar de também causarem prejuízos consideráveis, como a *Tetranychus urticae*, que afeta mais de 200 plantas hospedeiras, incluindo culturas de alto valor econômico, como soja e morango (Zhu *et al.*, 2022), ainda não recebem a mesma atenção em estudos entomopatogênicos. Isso pode se dever à menor visibilidade dos danos causados por ácaros

comparado aos insetos, ao ciclo de vida mais curto e à dificuldade em isolar agentes patogênicos específicos para controle biológico eficiente (Van Leeuwen et al., 2021). Além disso, a identificação de ácaros e a caracterização de suas interações com patógenos ainda é um desafio técnico, o que limita o avanço de pesquisas voltadas para este grupo de organismos.

Todavia, o que a agricultura mais teme são os ácaros fitófagos (Figura 1), pois se alimentam do conteúdo citoplasmático das células vegetais. Para isso, utilizam de suas quelíceras modificadas em forma de estiletes para perfurar diferentes partes da planta. Em seguida, por meio do furo, eles sugam o alimento para o interior de seu aparelho digestivo com a ajuda de uma bomba de sucção localizada na faringe. Assim, os danos as plantas são ocasionadas tanto pelos furos com o estilete quanto pelo esvaziamento do conteúdo celular dos tecidos vegetais. Já os sintomas causados variam de diferentes fatores, como de espécie para espécie, da densidade populacional, do estágio de desenvolvimento, da estrutura vegetal atacada e da duração do ataque (Pinheiro *et al.*, 2008). A Tabela 1 sintetiza as principais espécies de ácaros encontradas na produção agrícola.

Figura 1 - Desenho ilustrativo de um ácaro fitófago da família Tetranychidae.



Fonte: Zhang (2003).

Tabela 1 – Principais espécies de ácaros encontradas atualmente em culturas agrícolas.

Nome popular	Nome científico	Culturas	Sintomas	Referências
Ácaro-rajado	<i>Tetranychus urticae</i>	Seringueira, bananeiras, videiras etc.	Iniciam como pequenas áreas cloróticas nas folhas, posteriormente, o local de ataque fica necrosado. Na parte superior das folhas se visualizam as lesões, manchas amareladas, que evoluem para vermelho	Koch, 1936
Ácaro-vermelho	<i>Oligonychus ilicis</i>	Eucaliptos, café, erva-mate	É encontrado na face superior das folhas; as regiões atacadas tornam-se bronzeadas e cobertas com pequena quantidade de teia, à qual ficam aderidas partículas carregadas pelo vento.	McGregor, 1917
Ácaro-vermelho-europeu	<i>Panonychus ulmi</i>	Macieiras, videiras, pereiras e pessegueiros	Folhas apresentaram bronzeamento, com manchas avermelhadas na face adaxial, resultando em sua queda prematura.	Koch, 1936
Ácaro-verde-da-mandioca	<i>Mononychellus tanajoa</i>	Mandioqueiras e algodojeiras	Os maiores danos são observados na região apical das folhas, com o retardamento de seu crescimento, observado pela redução do comprimento dos internódios.	Bondar, 1938
Ácaro-branco	<i>Polyphagotarso nemus latus</i>	Citros, mamoeiro, videiras, pimentão, batata, tomate	Atacam as folhas mais jovens. Folhas tornam-se deformadas; sua face inferior adquire aspecto corticoso. Frutos infestados tornam-se geralmente cinza-prateados, podendo apresentar tamanho menor que frutos não atacados.	Banks, 1904

Fonte: o autor.

3.3. Insumos agrícolas

As pragas agrícolas são um dos fatores mais alarmantes quando se trata de produtos cuja origem é o campo, todavia com o avanço da agricultura foram desenvolvidos inúmeros métodos de controle como físicos, químicos, biológicos e culturais (Lins Júnior, 2019). Por volta da década de 1960 as produções agrícolas passaram por uma transformação chamada Revolução Verde, a qual difundiu-se tecnologias voltadas para uma agricultura que objetiva multiplicar a produção de alimentos (Pelaez & Mizukawa, 2017). Para isso intensificou-se a utilização dos defensivos químicos (agrotóxicos) e fertilizantes sintéticos que aliado ao desenvolvimento genético de sementes contribui para a ampliação do programa que elevaria a produção agrícola no mundo (Serra *et al.* 2016). Um exemplo foi a produção global de trigo que aumentou cerca de 200 milhões de toneladas na década de 1960 para mais de 750 milhões de toneladas na década de 2000, ou seja, um aumento de cerca de 210%. O mesmo aconteceu para a produção de arroz e milho que teve um aumento de 100 e 200% entre 1960 e a década de 2000. (FAO, 2022). Embora se tenha alcançado tal aumento de produção agrícola, esse modelo produtivista veio com um custo que acarretou inúmeros impactos negativos mundiais e vem se tornando insustentável, pois causa poluição aos ecossistemas e seu uso possui efeitos nocivos à saúde do agricultor e do consumidor final (Fontes & Valadares-inglis, 2020).

No Brasil, a Revolução Verde impulsionou o setor agropecuário que transformou um país importador de alimentos para um dos países que se consolidam como os um dos maiores produtores e exportadores e commodities agrícolas (Araújo, 2023). Em decorrência disso, o uso de insumos químicos foi se intensificando, tornando o Brasil extremamente dependente de agrotóxicos e fertilizantes químicos oriundos do mercado internacional, como exemplo o mercado de fertilizantes nitrogenados, fosforados e potássicos (FAO, 2019; Gomes *et al.*, 2021). Além disso, o processo de tais insumos demandam alto custo energético, consumo de combustível fóssil e vem acompanhados de inúmeras perdas por volatilização, imobilização ou outros processos geoquímicos reduzindo sua eficiência (Fageria, 2014). O Brasil continua a ser o maior consumidor de defensivos agrícolas do mundo, com um aumento significativo no uso desses insumos. Em 2023, o país registrou um total de 1.424.588 toneladas de defensivos aplicados, representando uma alta de 9,5% em relação ao ano anterior. Os herbicidas foram responsáveis por 47% desse total, seguidos por fungicidas e inseticidas, que somaram 22% cada um (Carneiro, 2024). Essa tendência de aumento no uso de defensivos se deve, em parte, à expansão da área cultivada e às condições climáticas que favorecem a proliferação de pragas e

doenças. Esse cenário levanta questões sobre a sustentabilidade da agricultura no país, visto que o uso excessivo de defensivos pode acarretar sérios problemas ambientais e de saúde pública, apesar de os defensivos serem considerados essenciais para a produtividade agrícola em larga escala (Cardin, 2024).

Dentro desse contexto surge o conceito do Manejo Integrado de Pragas (MIP), que objetiva a minimização dos problemas expostos. Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos em 1996, o MIP pode ser definido como “uma abordagem sustentável de manejo de pragas, através da combinação de ferramentas biológicas, culturais, físicas e químicas de maneira a minimizar riscos econômicos, de saúde e ambientais”. A longo prazo, essa abordagem holística de manejo inseto-praga deve reduzir o uso de agrotóxicos, fornecendo economia para o agricultor e proteção tanto para o meio ambiente quanto para a saúde humana (Ehler, 2006). Sendo a utilização de bioinsumos um dos maiores aliados na agricultura que visa a redução de agrotóxicos e outros agroquímicos.

Os bioinsumos têm ganhado destaque no Brasil, sendo considerados produtos, métodos e tecnologias de origem orgânica que beneficiam a cadeia produtiva agrícola. Com o objetivo de fomentar e regularizar a produção e uso desses insumos, foi instituído, através do Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020, o Programa Nacional de Bioinsumos (PNB). Este programa é uma iniciativa do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) e visa promover a utilização sustentável de bioinsumos, beneficiando agricultores e o meio ambiente (Brasil, 2020).

O PNB se alinha a três principais objetivos: fortalecer o uso de bioinsumos no agronegócio brasileiro, garantir a qualidade e a segurança dos produtos e promover a capacitação e a formação de boas práticas entre os produtores. Entre as ações propostas, destaca-se a criação de manuais de boas práticas e a realização de treinamentos para assegurar que os bioinsumos sejam produzidos de acordo com as normas e especificações técnicas, garantindo sua eficácia e segurança para o meio ambiente e para a saúde pública (Brasil, 2020).

Além disso, o programa está em consonância com iniciativas mais amplas, como o Plano Nacional de Fertilizantes (PNF) e a Portaria nº 471, que estabelece diretrizes para a adaptação à mudança do clima e a redução das emissões de carbono na agropecuária. Essas políticas refletem um compromisso com a sustentabilidade e a inovação no setor agrícola, reconhecendo a importância dos bioinsumos na promoção de práticas agrícolas mais sustentáveis e na mitigação dos impactos ambientais (Brasil, 2020).

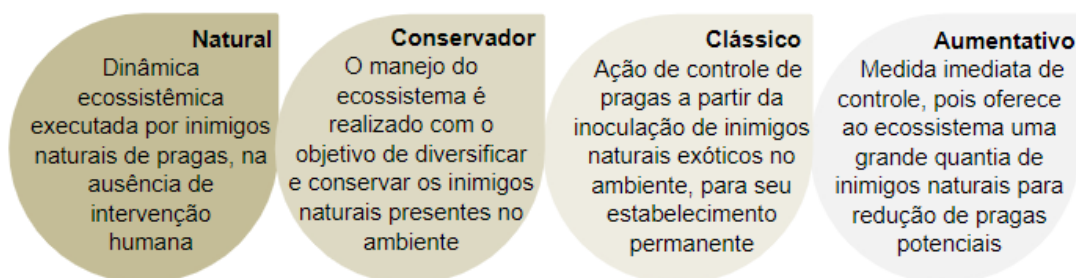
3.4. Controle biológico

Apesar do termo controle biológico estar em alta atualmente, ele não se refere a um conceito novo. Há milhares de anos, essa técnica já era empregada, porém, a definição do termo só foi proposta em 1919 por Harry Smith da Universidade da Califórnia como sendo “a supressão de populações de insetos pela ação de seus inimigos naturais nativos ou introduzidos” (Smith, 1919). Esse conceito foi se remodelando ao decorrer do tempo devido aos avanços do MIP e a sua relação em colaboração no equilíbrio das dinâmicas socioambientais, ficando definido como:

[...] redução de populações de organismos indesejáveis que ocorrem nos agroecossistemas nos quais inimigos naturais, como predadores, parasitoides, parasitas, herbívoros, competidores e patógenos, mantenham sob controle qualquer população com potencial nocivo à atividade humana, como as pragas da agricultura (Fontes; Pires; SujiI, 2020, p. 22).

Existem três agentes que estão envolvidos nesse conjunto de mecanismos: o agente de controle biológico, a praga propriamente dita e a parte humana que irá se privilegiar do processo de controle realizado pelo agente (Stenberg *et al.*, 2021). Além disso, o controle biológico pode ser classificado em quatro tipologias descritas pela Figura 2, cujo funcionamento do sistema produtivo pode ser afetado por seus mecanismos e ter impacto no desenvolvimento sustentável.

Figura 2 - Tipologias de controle biológico de insetos-praga na agricultura.



Fonte: Nepomoceno (2023).

Na agricultura brasileira, muitos foram os programas de controle biológico que marcaram sua trajetória, porém muitos desses não foram publicados sendo o primeiro caso de sucesso relatado em 1992 por Robs ao introduzir *Prospaltella berlesei* (Howard) (Hymn., Aphelinidae), um inseto parasitóide, para o controle da cochonilha-branca da amoreira e do pessegueiro *Pseudaulacaspis pentagona* (Targ.-Tozz) no estado de São Paulo. A Tabela 2

sintetiza os melhores programas de controle biológico segundo Valadares-Inglis & Fontes (2020) no livro Controle Biológico de Pragas da Agricultura, lançado pela Embrapa.

Tabela 2 - Principais programas de controle biológico que foram relatados pela agricultura brasileira.

Agente de controle	Agente causador	Região	Culturas afetadas	Referências
Quatorze espécies de himenópteros parasitoides e duas espécies de coccinelídeos predadores	Pulgões-do-trigo: <i>Metopolophium dirhodum</i> (Walter) e <i>Sitobion avenae</i> (Fabricius)	Rio Grande do Sul	Trigo	Salvadori e Salles (2002)
Os parasitóides <i>Acerophagus coccois</i> (Smith), <i>Aenasius vexans</i> (Kerrich) e <i>Apoanagyrus</i> (=Epidinocarsis) <i>diversicornis</i> (Howard)	Cochonilha da mandioca, <i>Phenacoccus herreni</i> Cox e Williams (Hemiptera: Pseudococcidae),	Nordeste do Brasil	Mandioca	Bento <i>et al.</i> (2002)
<i>Ageniaspis citricola</i> Logvinoviskaya (Hymenoptera: Encyrtidae)	mosca-minadora-dos-citros <i>Phyllocnistis citrella</i> Stainton (Lepidoptera: Graciliteridae)	São Paulo, Minas Gerais, Paraná, rio Grande do Sul, Piauí, Sergipe, Bahia e Rio de Janeiro	citros	Chagas <i>et al.</i> (2002)
<i>Cordyceps javanica</i>	Bactérias <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> e <i>C. Liberibacter americanus</i> transmitida pelo psílideo <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama	São Paulo, Minas Gerais, Paraná, rio Grande do Sul, Piauí, Sergipe, Bahia e Rio de Janeiro	citros	Parra <i>et al.</i> (2016)
<i>Baculovirus anticarsia</i> (AgNPV)	lagarta da soja, <i>Anticarsia gemmatilis</i> Hübner	Paraná	soja	Moscardi (1999)
<i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i>	<i>Mahanarva posticata</i> e <i>M. fimbriolata</i>	Nordeste e Sudeste	Cana-de-açúcar	Li <i>et al.</i> (2010)

Fonte: Adaptado de Valadares-Inglis & Fontes (2020).

3.5. Fungos entomopatogênicos

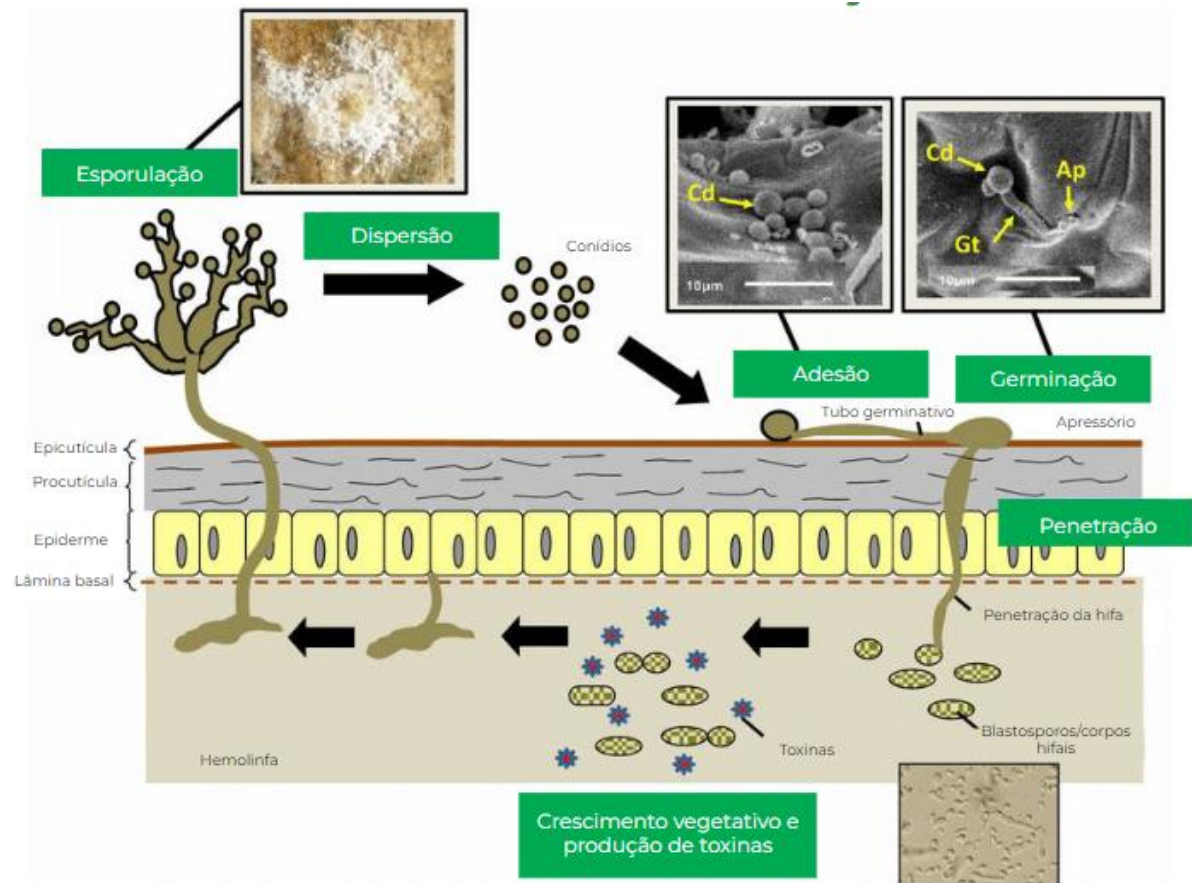
Segundo o MAPA (2019) os agentes biológicos de controle podem ser divididos em dois grandes grupos, sendo os macrobiológicos constituídos por parasitoides como insetos, ácaros e nematoides e os microbiológicos como vírus, bactérias, protozoários e fungos. Estes últimos são denominados de fungos entomopatogênicos pois infectam os insetos por penetração direta na cutícula, ao contrário de bactérias e vírus que precisam ser ingeridos (Bilgo *et al.*, 2018). A grande maioria das espécies de fungos entomopatogênicos pertencem a ordem Hypocreales (filo Ascomycota) e ao filo Entomophthoromycota (Baron *et al.*, 2019; Mora *et al.*, 2017) cuja sobrevivência e propagação dependem da infecção do hospedeiro que o leva a morte. Dessa forma, o ciclo de vida de um fungo entomopatogênicos consiste em uma fase parasitária (infecção do hospedeiro até sua morte) e uma fase sapróbia (após morte do hospedeiro) (Kidanu *et al.*, 2020).

Para entender o processo de infecção é necessário saber que o tegumento dos Arthropoda, filo cujo classe Insecta e Acari se encontram, constitui-se de uma barreira físico-química extremamente eficiente. A cutícula é composta por uma estrutura complexa de nanofibras de quitina cristalina integrada em uma matriz de proteínas, polifenóis, água e pequenas quantidades de lipídios (Vincent & Wegst, 2004). A quitina é um polissacarídeo não ramificado composta por monômeros de N-acetil-D-glicosamina em que estão ligados por β -1,4, sendo divididas em três tipos: α , β e γ . Já as proteínas são glicoproteínas cuja fração glicosilada é formada por manose e galactose (Wessels, 1999). Por fim os lipídios estão presentes na faixa de 1 a 10% do peso seco sendo os ácidos graxos os mais abundantes (Pucheta *et al.*, 2006).

Dessa forma, para um fungo entomopatogênico infectar um hospedeiro é preciso todo um arcabouço bioquímico para adentrar, sobreviver e multiplicar. Isso ocorre principalmente através da germinação dos esporos, todavia os fungos entomopatogênicos são capazes de produzir outras estruturas que também são infectivas como blastóporos (Feng *et al.*, 10994), hifas germinativas (Hajek & Leger, 1994) e conídios (humber, 2008). Esse processo de infecção é observado na Figura 3 e pode ser sintetizado em quatro passos:

- I. Aderência das estruturas infectivas ao corpo do hospedeiro: nesta etapa as estruturas infectivas fúngicas produzem dois tipos de proteínas: as hidrofobinas, cujas camadas se desintegram durante a esporulação e as adesinas (MAD1 e MAD2) que serão responsáveis tanto pela adesão estreita à cutícula do inseto quanto pelo reconhecimento do hospedeiro pelo patógeno fúngico (Wang & Leger 2007; Greenfield *et al.* 2014).
- II. Germinação das estruturas infectivas e produção enzimática: ocorre devido a presença de fontes de carbono e energia da cutícula do inseto, com a umidade certa (varia para cada espécie) e na faixa de temperatura entre 20 a 30°C. Em seguida, surgem estruturas especializadas denominadas de apressórios que possuem dois efeitos: um de pressão mecânica na cutícula e outro que é a produção de enzimas líticas, como lipases, proteases e quitinases que degradam bioquimicamente a cutícula (Skinner *et al.* 2014; Lacey *et al.* 2015).
- III. Colonização do inseto: depois de adentrar a cavidade corporal do artrópode, ou seja, a hemocele os fungos entomopatogênicos começam a produzir hifas, propágulos semelhantes a células leveduriformes chamadas de blastósporos e metabólitos secundários com potencial inseticida que causam paralisia e danificam os processos fisiológicos do hospedeiro, especialmente as respostas imunitárias levando a morte do mesmo (Donzelli & Krasnoff, 2016). Todo esse processo de infecção leva aproximadamente 14 dias após a germinação, todavia os sintomas já começam a aparecer entre 5 a 7 dias após a infecção.
- IV. Esporulação: por fim, após utilizar de toda a nutrição do hospedeiro, as hifas do fungo emergem através de orifícios da carcaça (boca, ânus, entre outros) e por áreas intersegmentares e produz esporos que irão ser espalhados com auxílio do vento para infectar outros artrópodes. (Skinner *et al.* 2014).

Figura 3 – Esquema sintetizando a colonização de fungos entomopatogênicos em artrópodes



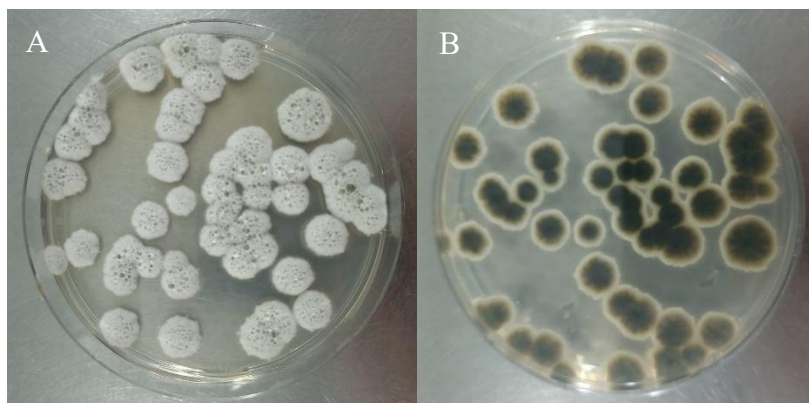
Fonte: modificado de Mascarin & Jaronksi (2016).

3.6. *Hirsutella thompsonii*

Um dos fungos entomopatogênicos que vem ganhando destaque é a *Hirsutella thompsonii* (Ht) (Ophiocordycipitaceae, Hypocreales, Hypocreomycetidae, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota, Fungi.), um fungo parasita principalmente de ácaros, que foi originalmente descrita por Fisher (1950) quando foi encontrada no ácaro da ferrugem dos citros, *Phyllocoptruta oleiuora*, na Flórida. Este gênero, *Hirsutella*, contém mais de 70 espécies que colonizam artrópodes via reprodução assexuada e são distribuídos principalmente dentro da família Ophiocordycipitaceae. (Sung *et al*, 2007).

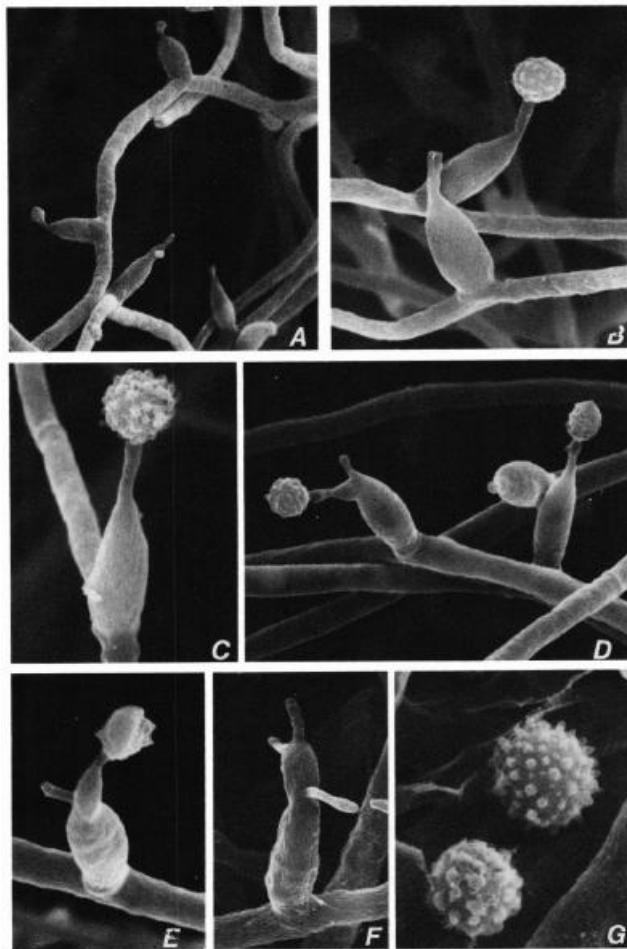
Em batata dextrose ágar (BDA) a *H. thompsonii* cresce lentamente, levando em torno de 7 dias para esporular e apresenta coloração verde acinzentado próximo do cinza oliva pálido como o verso na coloração de cinza escuro a verde escuro, como observado na Figura 4. Não possui odor e seus micélio vegetativos possuem paredes lisas, hialinas a amarelo claro, com tamanho variando de 1,5 a 3,0 μm . Já os conidióforos surgem isoladamente das hifas aéreas e possuem coloração hialina a verde claro, desenvolvendo como protuberâncias globosas e formando um pescoço que se afina. Por fim, os conídios são produzidos individualmente ou em grupos de dois ou três, são hialinos a verdes claros, globosos, inicialmente possuem paredes lisas que depois vão se enverrugando e possuem entre 3-4 μm de diâmetro. São capazes de produzir blastosporos, mas não clamidósporos (Samson *et al.*, 1980). Todas as estruturas podem ser vistas na Figura 5.

Figura 4 – Colônias de *H. thompsonii* cultivadas em meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA). Legenda: (A) foto da vista superior da placa; (B) foto do verso da placa.



Fonte: o autor.

Figura 5 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas conidiogênicas de H. thompsonii A-C. fiálides em hifas aéreas, A. X 1.400, B. X 2.400, C. x 3.800, filiade com conídio rugoso, D-F. proliferação de filiades e conídios (SAMSON *et al.*,1980).



Fonte: Samson *et al.* (1980).

Essa espécie de fungo foi relatada como causadora de epizootias naturais em populações de ácaros do botão de mirtilo (*Acalitus vaccinii*), ácaros da ferrugem cítrica (*P. oleivora*) e ácaros do côco (*Aceria guerreronis*) (Samson *et al.* 1980; Weibelzahl & Liburd, 2009). Dessa forma, ele é um patógeno fúngico específico para determinadas espécies de ácaros que habitam frutas cítricas e demais plantas sendo a maioria de regiões subtropicais e tropicais.

Em relação aos processos de infecção por essa espécie, McCoy & Couch (1978) documentam que os conídios podem aderir em todas as partes do corpo do artrópode e pode germinar quando em contato com a cutícula, seguindo da invasão na hemocèle. A máxima infecção ocorre em alta umidade relativa (90 a 100%) ou na presença de água livre e provoca

alta mortalidade em temperaturas entre 23-30 °C. Já Gerson *et al.* (1979) documenta que em tetraniquídeos os conídios germinam e penetram o tegumento principalmente através da perna e causa a morte em 48 horas.

O controle biológico do fungo *H. thompsonii* emprega, não só conídios, mas também outras estruturas fúngicas como blastosporos, micélio e outras formas resistentes. Estudos indicam que os conídios são eficazes devido à sua capacidade de germinação rápida e propagação eficiente, permitindo a invasão dos tecidos hospedeiros (Padiyath, 2002). Blastosporos, como demonstrado por Majumder *et al.* (2019), são mais resistentes e germinam sob diversas condições ambientais, sendo frequentemente produzidos em fermentações líquidas para facilitar a aplicação em campo. O micélio desempenha um papel crucial na colonização estável e contínua, assegurando a persistência do agente biológico no ambiente (Chandrashekara *et al.*, 2012). Ahmad *et al.* (2019) também destacam a importância de outras estruturas fúngicas, como corpos hifais e esporos sexuais, que contribuem para a resistência e eficácia do controle biológico. Cada uma dessas estruturas oferece vantagens específicas, permitindo uma abordagem integrada e adaptável às necessidades de diferentes sistemas agrícolas. A utilização combinada dessas estruturas potencializa a eficiência do controle biológico, sendo que o conjunto dessas estruturas, juntamente com produção de metabólitos com potencial acaricida e inseticida, ocorre em maior escala quando utilizada a fermentação submersa (Jiang & Wang, 2023).

A morte rápida dos artrópodes-alvo ocorre, pois, espécies de *Hirsutella* são capazes de produzir uma variedade de metabólitos secundários com propriedades inseticidas, como ácido hirsutélico A, hirsutida, hirsutatinas A e B, metabólitos híbridos de poliketídeo sintase-peptídeo não ribossômico (PKS-NRPS), citocalasina Q citostática e os dois melhores conhecidos que são a Hirsutelina A e a enzima quitinase (Molnár *et al.* 2010). A Hirsutelina A é uma proteína inseticida que é ribotóxica, ou seja, atacam diretamente os ribossomos de uma variedade de populações de pragas (Herrero-Galán *et al.* 2008, 2013). Além disso, Agrawal e colaboradores (2015) relatam que os fungos entomopatogênicos possuem vários genes associados à virulência em seu genoma para se adaptarem a diferentes nichos ecológicos o que afeta o potencial de patogenicidade. Os estudos realizados por eles descrevem de 15 a 19 sequências de produção e quitinase em *H. thompsonii*, sendo que uma delas, as quitinases do subgrupo A, participa ativamente de funções fisiológicas gerais relacionadas ao crescimento e desenvolvimento do fungo, indicando uma produção inata dessa enzima pelo fungo.

3.7. Enzimas líticas e o papel das quitinases

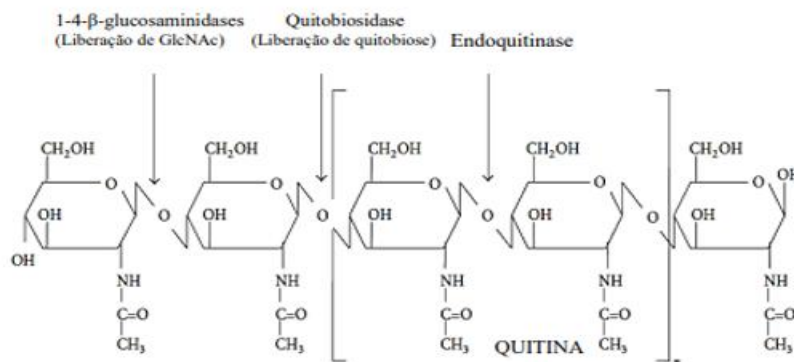
Durante o processo de infecção no artrópode o fungo libera uma série de enzimas líticas que desempenham um importante papel que é a hidrólise dos componentes da cutícula (Santi *et al.* 2010). As lipases são as primeiras a serem produzidas, pois hidrolisam os lipídios e lipoproteínas localizados na epicutícula do artrópode. Tais enzimas atacam as ligações éster dos triacilgliceróis que leva a liberação de ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoglicerois e glicerol (Silva *et al.* 2009, Mondal *et al.* 2016). Um exemplo de lipase é a fosfolipase C produzida pelo fungo *Metarhizium anisopliae* que hidrolisa as ligações fosfodiéster e é responsável pela degradação dos fosfolipídios das membranas celulares dos artrópodes permitindo que o fungo chegue até a hemocele (Santi *et al.*, 2010).

Em seguida, é produzido outro grupo de enzimas, as proteases, que são consideradas um fator chave na virulência devido a sua ação hidrolisante de ligações peptídicas das cutículas que leva as fibrilas de quitina à exposição. Uma das primeiras a serem descritas é a Pr1 chamada de protease subtilisina (serina endoprotease) que degrada ambas as proteínas da cutícula e modifica sua superfície (Donatti *et al.* 2008). Há outras proteases que também participam do processo como a protease Pr2 ácida semelhante à tripsina, a cisteínas Pr4 proteinase e a metaloprotease (Zhao *et al.* 2016). Há estudos que indicam que as proteases possuem dupla função durante o processo que é a hidrólise das proteínas cuticulares e a inativação de proteínas antifúngicas produzidas na epiderme dos insetos (Sotelo-Mundo *et al.* 2007).

Por fim, o último grupo de enzimas são as quitinases (EC 3.2.1.29) que são glicosil hidrolases capazes de clivar especificamente as ligações β -1,4 entre as unidades de N-acetilglicosaminas da quitina (Hamid *et al.*, 2013). A Figura 6 demonstra como elas são classificadas, uma vez que dependem do local de sua ação: endoquitinases (EC 3.2.1.14) que hidrolisam a ligação β -1,4-glicosídica dentro da molécula de quitina liberando N-acetilglicosaminina (GlcNAc) e multímeros de β -1,4-N-acetilglicosamina de baixa massa molecular como quitobiose (N,N'-diacetilquitobiose), quitotriose (N,N',N''-triacetilquitotriose) e quitooligossacarídeos e as exoquitinases que são subdivididas em duas categorias, sendo quitobiasas (EC 3.2.1.29) que atuam na catálise da liberação progressiva de diacetilquitoniose partindo da extremidade não redutora das microfibrilas de quitina e as β -1,4-N-acetilglicosaminidases (NAG) (EC 3.2.1.30) que hidrolisam os produtos oligoméricos

liberados por endoquitinases e quitobiasas, gerando monômeros de GlcNAc (Van Long *et al.*, 2016).

Figura 6 – Modo de ação das diferentes quitinases.



Fonte: Ornela (2022).

As quitinases apresentam massa molecular variando entre 20 kDa e 90 kDa, com funções biológicas variando em decorrência da sua origem (Hamid *et al.*, 2013). Essas enzimas são pertencentes as famílias 18, 19 e 20 glicosil hidrolases (GH), as quais se distinguem na sequência de aminoácidos e características específicas. As enzimas da família GH 18 utilizam um mecanismo de retenção ao hidrolisar o substrato, pois o seu domínio catalítico é em forma de barril, (β/α)₈. Já as pertencentes a família GH 19 utilizam do mecanismo de inversão, uma vez que seu domínio catalítico apresenta alto teor de alfa-hélices (Arakane; Muthukrishnan, 2010). Por fim, as da família GH 20 apresentam dobras em forma de barril em sua estrutura. Todas elas não possuem sequência conservadora de aminoácidos, todavia possuem resíduos aromáticos na região N-terminal e possuem dois resíduos de glutamato no sítio catalítico, sendo um para catálise ácida e outro para catálise básica (Hoell *et al.*, 2010).

Essas enzimas estão presentes nos diferentes reinos, desempenhando funções diversas, como exemplo nas bactérias, as quitinases atuam na digestão de quitina para nutrição, já as plantas utilizam para se proteger de fitopatógenos e os vírus possuem quitinases que auxiliam no processo de virulência (Monteiro-Júnior *et al.*, 2018). Os fungos podem produzir quitinases tanto para fins de nutrição quanto para infecção de outros microrganismos. Dessa forma, os fungos filamentosos apresentam inúmeras vantagens relacionadas a capacidade de crescimento em substratos quitinolíticos, uma vez que possuem a capacidade de crescer em uma variedade de substratos, incluindo fermentação em estado sólido ou submerso, o que minimiza os custos e maximiza a eficiência do processo fermentativo (BARRIOS-GONZÁLEZ, 2017). Além

disso, o modo de crescimento hifal dos fungos filamentosos oferece uma grande vantagem sobre microrganismos unicelulares na colonização de substratos sólidos, permitindo uma maior superfície de contato e, conseqüentemente, uma absorção mais eficiente de nutrientes (Ird, 2021). Eles possuem sistemas enzimáticos complexos que incluem quitinases, permitindo a degradação da quitina presente nos substratos, o que confere uma vantagem competitiva na utilização desses substratos (Moore, 2008). Além disso, a capacidade dos fungos filamentosos de utilizar diferentes fontes de carbono, incluindo aquelas não-carboidratos, como etanol, proporciona uma flexibilidade significativa para o crescimento em diversos tipos de substratos (Gosh *et al.*, 2023). Assim, possuem grande potencial para serem utilizados em fermentação objetivando a produção de quitinases (Tabela 3).

Tabela 3 – Fungos produtores de quitinases em Fermentação Submersa (FSbm) e em Fermentação em Estado Sólido (FES).

Microrganismo	Tipo de Fermentação	Substrato/ Fonte de carbono	Período de cultivo	Referência
isolado <i>Trichoderma</i> sp. UFSMQ40	FES	Quitina coloidal / Farelo de trigo	72 h	Bortoluzzi, 2022
<i>Penicillium janthinellum</i>	FSbm	Farinha de laranja	168h	Pommer <i>et al.</i> , 2019
<i>Aspergillus niveus</i>	FSbm	Casca de camarão-de-sete-barbas	144h	Ornela, 2022
<i>Beauveria bassina</i>	FSbm	Farelo de arroz, sacarose e farelo de soja	72 h	Schmaltz, 2021
<i>Metarhizium anisopliae</i> IBCB 348	FES	Bagaço de cana	168h	Aita, 2019
<i>Thermothelomyces heterothallicus</i> PA2S4T	FSbm	Farinha de casca de laranja	144h	Rother, 2022

Fonte: o autor.

Apesar de sua relevância no contexto agrícola e biotecnológico, a produção de quitinase por *H. thompsonii* ainda não foi amplamente estudada na literatura científica. Entretanto, estudos preliminares sugerem que fungos do gênero *Hirsutella* possuem potencial para produzir essa enzima. Por exemplo, uma pesquisa recente focou na análise do potencial biotecnológico de *Hirsutella minnesotensis*, que demonstrou a presença de genes relacionados à produção de quitinases, indicando que esses fungos podem contribuir para a degradação de quitina e o biocontrole de pragas (Lai *et al.*, 2014). Além disso, análises genômicas têm revelado que *H.*

thompsonii possui um conjunto de genes relacionados à produção de quitinases, enzimas que desempenham um papel crucial na degradação da quitina, um componente essencial da parede celular de insetos (Vidhate, 2022). Um estudo identificou e caracterizou os genes que codificam quitinases em *H. thompsonii*, sugerindo que a expressão dessas enzimas pode ser um fator importante na patogenicidade do fungo e na sua eficiência na decomposição de quitina presente nos hospedeiros (Vidhate, 2022). A possibilidade de utilizar *H. thompsonii* como uma fonte para a produção de quitinase é promissora, especialmente em aplicações agrícolas e biotecnológicas, onde a quitinase pode ser utilizada em processos de biocontrole de pragas e em processos industriais que demandam a degradação da quitina.

3.8. Produção de células viáveis e metabólitos secundários

A produção de células viáveis e de metabólitos secundários, como as enzimas, por fungos filamentosos pode ser obtida através de dois tipos de fermentação: a Fermentação em Estado Sólido (FES) e a Fermentação Submersa (FSbm). A FES é caracterizada pelo crescimento do microrganismo em substrato de matriz sólida e sem água livre. As vantagens dessa fermentação referem-se ao menor espaço requerido, ao menor custo de operação, a menor possibilidade de contaminação e a produção de níveis enzimáticos maiores (Yazid *et al.*, 2017). Porém esse processo possui desvantagens como a dificuldade do controle de variáveis físico-químicas como pH e temperatura, oxigênio dissolvido, transferência de massa e energia, e disponibilidade limitada de água. Esses fatores fazem com que haja dificuldade na ampliação de escala, desencorajando assim, muitas indústrias (Dominguez *et al.*, 2014).

Por outro lado, na FSbm o microrganismo cresce de forma livre e em suspensão em um substrato de matriz líquida, no qual estão presentes, tanto de forma dissolvida quanto suspensa, todos os sais e nutrientes essenciais para o seu crescimento (Gonçalves & Guimarães, 2015). A FSbm tem como vantagens a alta produtividade, o fácil controle dos parâmetros fermentativos e a possibilidade de agitação. Porém suas desvantagens são o alto custo para manter agitação e a aeração do meio, e a possível formação de espuma. Por possuir mais vantagens que desvantagens, a FSbm é o processo mais utilizado nas indústrias, como nas indústrias alimentícias, farmacêuticas, de biocombustíveis, biotecnologia e bioprocessos, uma vez que possui maior facilidade de controle de parâmetros como pH, temperatura e oxigenação, a capacidade de obter produtos de alta pureza e a possibilidade de automação e escalabilidade do processo (Dominguez *et al.*, 2014; Nadeem *et al.*, 2015).

3.9. Parâmetros fermentativos

O processo fermentativo para a produção de bioinsumos pode ser dividido em várias etapas fundamentais. A primeira etapa envolve a preparação do inóculo, onde *H. thompsonii* é cultivado em um meio de cultura apropriado. A escolha do meio é crucial, pois deve fornecer os nutrientes necessários para o crescimento celular e a produção de quitinases (Rossi-Zalaf *et al.*, 2018). Durante a fase de crescimento, o microrganismo é incubado em condições controladas de temperatura, pH, agitação e aeração. É essencial monitorar o crescimento celular, que pode ser avaliado através da densidade óptica ou contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) (Mira *et al.*, 2022).

Após um período de crescimento, as condições podem ser ajustadas para maximizar a produção de quitinases. Isso pode incluir a modificação da concentração de substratos, adição de indutores ou ajuste do pH. A produção de quitinases é monitorada através de métodos como ensaios de atividade enzimática colorimétricos, que medem a capacidade da enzima de degradar quitina e utiliza-se de um espectrofotômetro para quantificar (Wang *et al.*, 2022). Após a produção, as quitinases são recuperadas do meio de cultivo. Essa etapa pode envolver processos de filtração, centrifugação e precipitação. A purificação é necessária para aumentar a atividade específica da enzima e remover contaminantes (Haq *et al.*, 2018). A formulação final do bioinsumo pode envolver a combinação de quitinases purificadas com outros microrganismos, estabilizantes e adjuvantes, dependendo da aplicação desejada (Figueiredo, 2024).

Diversos estudos têm se concentrado na otimização dos parâmetros fermentativos para o cultivo de *H. thompsonii* em fermentação submersa. Um desses estudos investigou a influência do meio de cultura na produção em larga escala de *H. thompsonii*. Os pesquisadores compararam diferentes fontes de carbono e nitrogênio, descobrindo que a glicose, como fonte de carbono, junto a uma fonte de nitrogênio orgânico, como peptona, proporcionou o crescimento mais eficiente e a maior produção de conídios. A composição do meio de cultura mostrou-se crucial para maximizar a biomassa fúngica e a eficiência da fermentação, indicando que a escolha dos nutrientes deve ser cuidadosamente ajustada para cada cepa e objetivo de produção (Jaronski, 2023).

Outro estudo focou nos efeitos da aeração e agitação durante a fermentação submersa de *Hirsutella thompsonii*. Esses parâmetros são fundamentais para garantir a distribuição

uniforme de oxigênio e nutrientes no meio de cultura, promovendo um crescimento homogêneo do micélio. Nesse mesmo estudo, foi observado que níveis adequados de agitação e aeração, cerca de 5L/min, aumentaram significativamente a produção de biomassa e conídios ($5,0E+06 \pm 1,0E+06$ conídios/mL), enquanto a falta de oxigenação levou a um crescimento desigual e uma produção inferior de esporos ($1,2E+03 \pm 2,0E+03$ conídios/mL). Este estudo, também, destacou a importância de controlar precisamente a aeração e a agitação para otimizar a produção fúngica (Mccoy, 1972).

Para otimizar a produção de bioinsumos a partir de *H. thompsonii*, diversos parâmetros fermentativos devem ser monitorados. O pH, por exemplo, influencia a atividade enzimática e a solubilidade dos nutrientes. A otimização do pH durante a fase de produção de quitinases é essencial, uma vez que diferentes pHs podem resultar em diferentes níveis de atividade enzimática (Mishra *et al.*, 2021). A temperatura também afeta a taxa de crescimento e a produção de enzimas., sendo que cada microrganismo possui uma temperatura ótima, e desvios dessa faixa podem reduzir a eficiência do processo (Eslami *et al.*, 2023). A agitação é importante para a homogeneização do meio de cultivo e para garantir a transferência de oxigênio, enquanto a aeração é crucial, especialmente em fermentações aeróbicas, onde a disponibilidade de oxigênio pode afetar a produção de biomassa e enzimas (Zommara *et al.*, 2023).

Além disso, a temperatura e o pH do meio de fermentação foram identificados como fatores críticos no cultivo de *H. thompsonii*. Um estudo demonstrou que, cultivos de fungos em temperaturas entre 24 a 28 °C é uma faixa ótima de temperatura. Em relação pH, a faixa entre 6 a 8 foi essencial para maximizar o crescimento e a produtividade do microrganismo. Temperaturas subótimas e pH inadequado resultaram em crescimento reduzido e menor produção de conídios. Ajustes precisos desses parâmetros mostraram-se necessários para alcançar uma produção máxima de biomassa e esporos (Hirapara, 2023).

Outro parâmetro relevante é a concentração de substratos. O tipo e a concentração de substratos, como fontes de carbono e nitrogênio, influenciam a produção de quitinases. Um equilíbrio deve ser encontrado entre a oferta de nutrientes e a capacidade do microrganismo de utilizá-los (Zhang *et al.*, 2024). O tempo de fermentação também deve ser otimizado, pois um tempo excessivo pode resultar em inibição da produção enzimática devido ao acúmulo de produtos inibitórios ou esgotamento de nutrientes (Ravi *et al.*, 2021). A densidade do inóculo no início do processo fermentativo pode afetar o tempo de latência e a eficiência da produção.

A otimização da quantidade de inóculo é, portanto, uma consideração importante (Saha *et al.*, 2015).

A produção de bioinsumos pode ser realizada por diferentes tipos de fermentação. A fermentação em batelada utiliza um único ciclo de produção, onde todos os ingredientes são adicionados de uma vez. É adequada para a produção em pequena escala e para o desenvolvimento de processos. A fermentação contínua mantém uma cultura em estado contínuo, onde os nutrientes são constantemente adicionados e os produtos removidos. É eficiente para produção em larga escala, mas requer um controle rigoroso das condições. Por sua vez, a fermentação em semicontínua combina elementos das fermentações em batelada e contínua, permitindo a adição de nutrientes em intervalos programados. Essa abordagem pode aumentar a produtividade e a eficiência (Pérez-Corona *et al.*, 2018).

A produção de bioinsumos a partir de *Hirsutella thompsonii* e a produção de quitinases envolvem um conjunto complexo de etapas e parâmetros que devem ser cuidadosamente controlados e otimizados. A compreensão e a aplicação adequadas desses fatores não apenas melhoram a eficiência da produção, mas também garantem a eficácia dos bioinsumos resultantes, promovendo práticas agrícolas mais sustentáveis e eficientes. A pesquisa contínua sobre esses processos e a busca por melhores condições fermentativas são essenciais para o desenvolvimento de produtos de alta qualidade e para a expansão do uso de bioinsumos na agricultura.

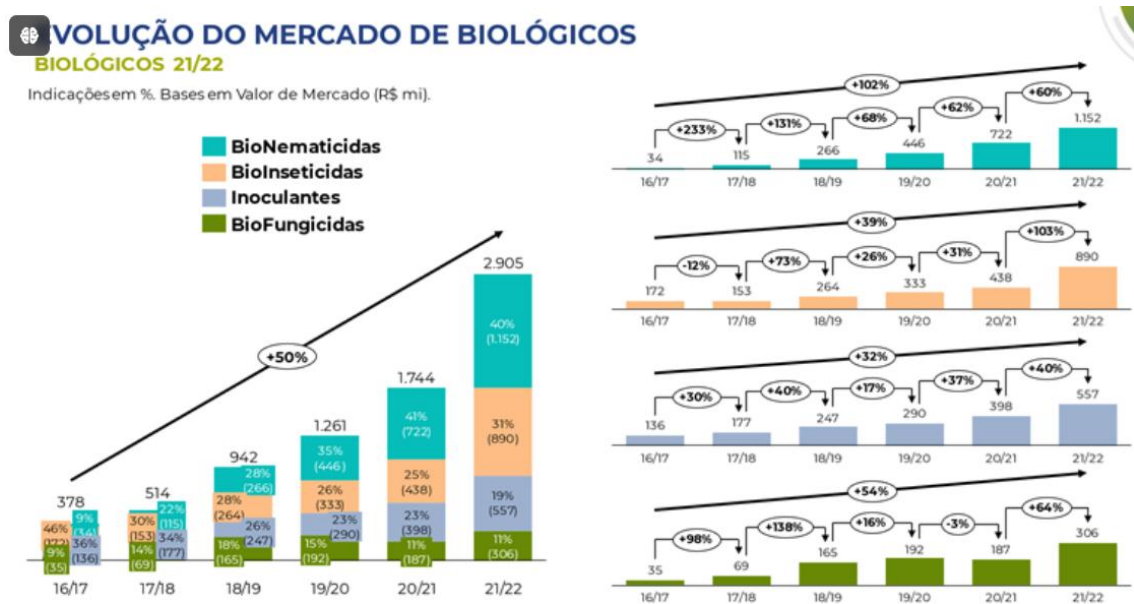
3.10. Mercado de biológicos

No dia 25 de março de 2022 a Forbes Brasil lança a seguinte manchete “*Como o Brasil se tornou líder mundial em bioinsumos*”, o que parecia uma predição se tornou uma realidade, pois no ano seguinte no dia 26 de maio de 2023 o Globo Rural lança uma reportagem com a seguinte capa “*Bioinsumos: Mercado de R\$ 17 bilhões até 2030*”. Esse crescimento de mercado é estimulado devido a uma demanda mundial por uma produção agrícola mais produtiva, saudável e sustentável. Além disso, ele se consolida no Brasil e o faz com que se torne pioneiro em suas tecnologias devido a estimulação do Programa Nacional de Bioinsumos lançado em maio de 2020 (Forbes Brasil, 2022).

Segundo a pesquisa realizado pela empresa americana S&P Global junto com a Crop Life Brasil indica que de 2018 a 2022 o mercado brasileiro de biodefensivos cresceu em mais de

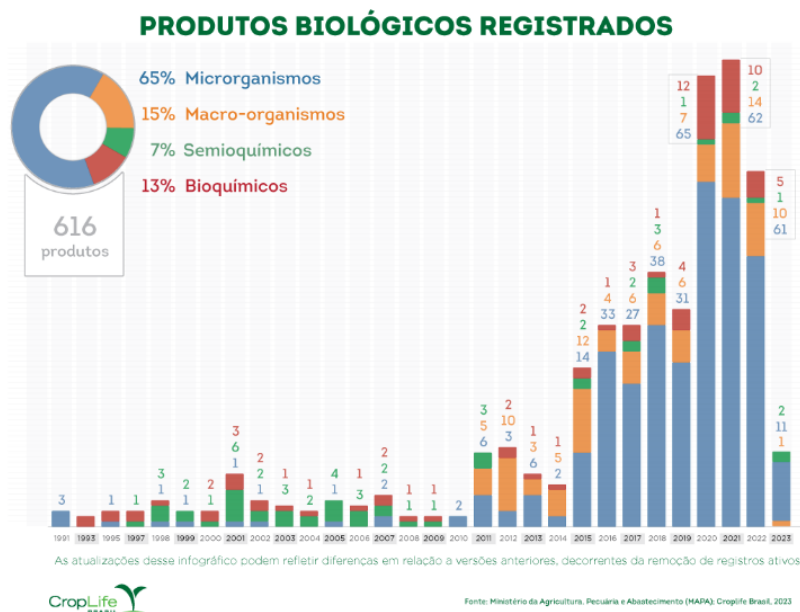
50% em comparação com o aumento de cerca de 16% do mercado global durante o mesmo período (Figura 7). Além disso, entre a safra de 2019/2020 e a de 2021/2022 houve um aumento de 219% acarretando um valor estimado de R\$ 33,3 bilhões para a última safra (Crop Life, 2023). Já o MAPA indica que o uso desses insumos no controle biológico pode gerar uma economia de R\$ 165 milhões por ano ao setor agrícola, isso porque 97% dos insumos biológicos são fabricados no Brasil em contrapartida aos 80% dos insumos químicos que são importados (Neves. 2023).

Figura 7 – Porcentagem do uso de bio defensivos para o ano de 2023



Em termos de área plantadas a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) estima que a adoção do controle biológico atingiu cerca de 28% do total de lavouras brasileiras em 2021/2022, ou seja, 85,7 milhões de hectares. Dentre essas áreas a cultura de soja foi a mais tratada com bio defensivos em um valor de 42%, seguido do algodão com 21%, cana-de-açúcar com 18% e milho também com 18%. Isso faz com que o registro de novos produtos cresce a cada ano, sendo que nos últimos 2 anos cerca de 100 produtos biológicos foram registrados para uso no país (Figura 8).

Figura 8 – Número de produtos biológicos registrados ao decorrer do tempo.



Fonte: Crop life (2023).

Os dados indicam que o mercado de bioinsumos vai se expandir cada vez mais, sendo que a S&P global projeta um valor próximo a R\$ 17 bilhões para o setor agrícola até 2030, considerando uma taxa de crescimento anual entre 2022 e 2023 de 23%. Assim, estudos com microrganismos entomopatogênicos, como o fungo *H. thompsonii* e a produção de metabólitos com potencial inseticida se fazem necessários, uma vez que o mercado está com alta demanda e ainda existe uma lacuna de conhecimento acerca desse tema em específico que possa ser preenchida. A busca por métodos sustentáveis e ecologicamente corretos no combate às pragas agrícolas é uma prioridade, e os estudos nesse campo contribuirão significativamente para o avanço da agricultura sustentável. Portanto, ao promover a pesquisa e o desenvolvimento nessa área, não apenas atendemos às demandas do mercado, mas também enfrentamos desafios ambientais e de segurança alimentar de maneira inovadora e eficiente. A colaboração entre cientistas, empresas e instituições é essencial para impulsionar esses estudos e transformar descobertas em soluções práticas para a agricultura do futuro.

Com base na análise da literatura existente descrita aqui, este estudo tem como objetivo principal avaliar de forma detalhada a propagação do fungo *H. thompsonii*, com ênfase na otimização de sua produção e na investigação das enzimas essenciais envolvidas no processo de controle biológico. Buscamos aprimorar seu potencial como um biopesticida sustentável e eficaz para o controle de pragas agrícolas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram realizados no laboratório de Pesquisa, Desenvolvimento & Inovação da empresa Solatus Biotecnologia e Insumos LTDA, localizada na cidade de Jardinópolis – SP.

4.1. Manutenção da linhagem

O fungo *Hirsutella thompsonii* CBMAI 2832 está depositado no depositado no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da UNICAMP. A linhagem mantida no laboratório da empresa foi preservada em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultivo BDA (Kasvi) sólido, inclinados e previamente autoclavados a 121°C por 15 minutos. Para a confecção dos tubos inclinados, os tubos contendo o meio (BDA) foram inoculados com esporos do fungo, incubados a 30°C por 7 dias para crescimento e armazenados em refrigerador a 4°C até do uso. As cepas foram renovadas a cada 30 dias.

4.2. Obtenção de suspensão de esporos

A suspensão de esporos foi obtida a partir das culturas armazenadas em meio sólido. Com o auxílio de uma alça de platina foi feita a raspagem da superfície das culturas. Em seguida, foi adicionado 10 mL de solução de água mais Tween 80 (Dinâmica) a 4% (m/v) estéril em cada tubo e agitado manualmente. A quantidade de esporos por mL da suspensão foi padronizada utilizando câmara de Neubauer (Olen), sendo a concentração final da suspensão ajustada para 10⁸ esporos/mL para ser utilizadas nas próximas etapas.

4.3. Produção da enzima quitinase e células viáveis em fermentação submersa (FSbm)

O fungo foi cultivado em fermentação submersa, em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio de cultura formulado pela empresa Solatus. Embora a composição exata dos sais, incluindo MgSO₄ (IQP), KCl (BASF) e K₂HPO₄ (Prayphos), seja parte de um segredo industrial, essa formulação foi otimizada para promover o crescimento eficiente do microrganismo. A escolha da fonte de carbono e da fonte de nitrogênio foram avaliadas em testes subsequentes. O pH inicial foi ajustado para 6.0, utilizando um pHmetro portátil (Asko). Os meios foram autoclavados a 121°C por 20 minutos e, após resfriamento, foram inoculados

com 1 mL de suspensão de esporos do fungo *H. thompsonii* CBMAI 2832 e incubados a 30°C, sob agitação orbital de 100 rpm em mesa agitadora CT-155 (Cientec). Com o objetivo de verificar a cinética de crescimento do fungo amostras foram coletadas em 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 240 e 360 horas. Todos os experimentos foram feitos em duplicata biológica o que significa que cada condição experimental foi realizada em duas amostras independentes para garantir a confiabilidade e a precisão dos resultados obtidos.

4.4. Fonte de Carbono

Primeiramente foi avaliada a melhor fonte de carbono para a produção enzimática e produção de células viáveis. Assim adicionou-se ao meio de cultivo as seguintes fontes de carbono na concentração de 2% (m/v) por massa total de meio de cultivo para cada tratamento: Dextrose (Dinâmica), açúcar orgânico (Native), farinha de côco (*Cocos nucifera*) (Terra Vitta), farinha de linhaça (*Linus unitatissimum*) (Terra Vitta), aveia (*Avena sativa*) (Quaker) e fubá (Farinha de *Zea mays*) (Yoki). Todas possuem cerca de 40% de porcentagem de carbono em sua composição.

4.5. Fonte de Nitrogênio

Escolhida as duas melhores fontes de carbono foi avaliado o efeito da adição de 1% (m/v) por massa total de meio de cultivo de diferentes fontes de nitrogênio visando a melhora do crescimento fúngico. Assim, foram testados os seguintes compostos: NaNO₃ (BASF), (NH₄)₃PO₄ (Dinâmica), peptona (Solabia), extrato de levedura (Hilyses) e extrato de soja (*Glycine max*) (Terra Vitta). Como controle foi utilizado um meio de cultivo sem adição de fonte de nitrogênio.

4.6. Influência de um consórcio entre as fontes de carbono e nitrogênio

Com as melhores fontes de carbono e fonte de nitrogênio, realizou-se um teste fazendo diferentes composições com as mesmas, como descrito na Tabela 4. Em todas as composições feitas, a concentração final de fonte de carbono foi de 2% (m/v) e de fonte de nitrogênio foi de 1% (m/v) por massa total de meio de cultivo.

Tabela 4 - Diferentes composições do meio de cultura com as melhores fontes de carbono e nitrogênio selecionada em testes anteriores. Legenda: (+): presente, (-) ausente

Tratamento	Açúcar orgânico	Farinha de côco	Extrato de levedura	Extrato de soja
1	-	+	+	-
2	-	+	-	+
3	-	+	+	+
4	+	+	+	-
5	+	+	-	+
6	+	-	+	+
7	+	-	+	-
8	+	-	-	+
9	+	+	+	+

Fonte: o autor.

4.7. *Influência da composição de sais do meio de cultura utilizando planejamento fatorial completo*

Realizou-se 10 ensaios para o estudo da influência dos sais no meio de cultivo, tratando-se de um planejamento fatorial 2^3 com 2 pontos centrais, onde n é o número de variáveis independentes, conforme metodologia descrita por Dacanal e colaboradores (2009). A Tabela 5 descreve os tratamentos codificados:

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. Legenda: (+1): nível superior, (-1) nível inferior, (0) ponto central.

Tratamento	KCl	MgSO ₄	K ₂ HPO ₄
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1
4	-1	+1	+1
5	1	-1	-1
6	1	-1	+1
7	1	+1	-1
8	1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0

Fonte: o autor.

4.8. Influência do balanço carbono/nitrogênio e do pH inicial no meio de cultura utilizando desenho composto central rotacional

Realizou-se 16 ensaios para o estudo da influência do balanço carbono/nitrogênio e do pH inicial no meio de cultivo, utilizando-se de um desenho composto central rotacional com 2 pontos centrais, conforme metodologia descrita por Dacanal e colaboradores (2009). A Tabela 6 descreve os tratamentos codificados:

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. Legenda: (+1): nível superior, (-1) nível inferior, (0) ponto central

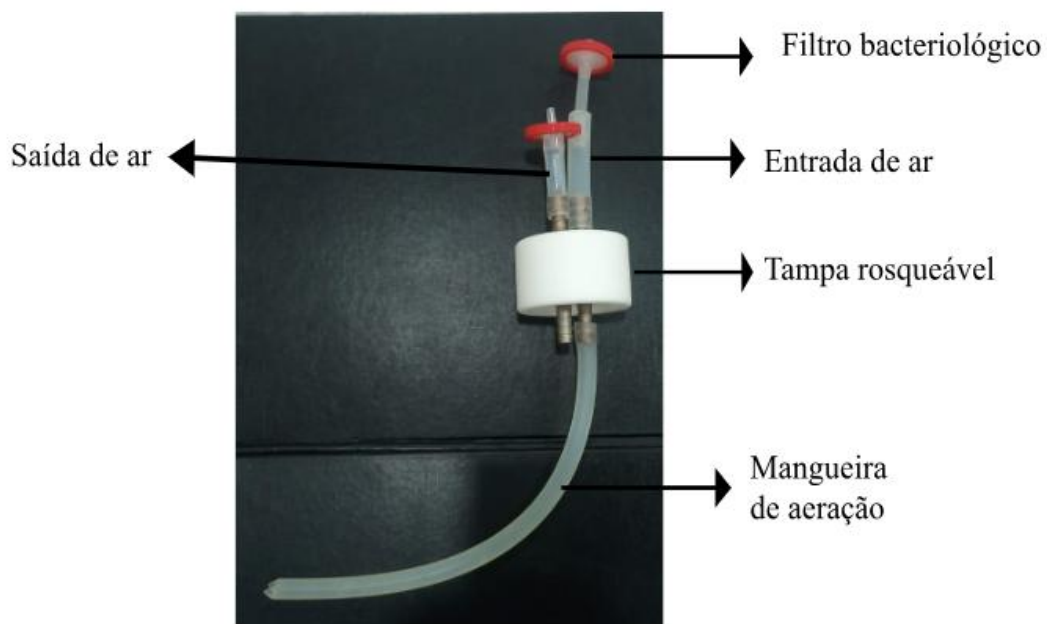
Tratamento	Açúcar	Extrato de Soja	pH inicial
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0

Fonte: o autor.

4.9. Influência da vazão de ar

Para avaliar a influência da vazão de ar no cultivo submerso, foram utilizados frascos reagentes de 5 L acopladas a uma tampa com um aspersor feito de cano de silicone com uma única saída de ar no final, como mostrado na Figura 9. Diferentes taxas de aeração foram ajustadas com o auxílio de um medidor de vazão, sendo avaliadas as vazões de ar de 0, 2, 4 e 8 L/min (0; 0,4, 0,8 e 1,6 vvm) em cultivos realizados em duplicatas com até 10 dias. Amostras foram retiradas em 72, 96, 120, 144, 168 e 240 horas de cultivos. Este cultivo também foi feito em duplicata biológica.

Figura 9 - Aparato do sistema de aeração que acopla nos recipientes com meio de cultura



Fonte: o autor.

4.10. Obtenção das enzimas extracelulares

As amostras obtidas nos cultivos foram filtradas em seringas estéreis utilizando algodão hidrofóbico, obtendo o caldo de cultura livre de micélios, denominado de filtrado bruto extracelular.

4.11. Determinação da atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi avaliada através da quantificação da liberação de tirosina, utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (Êxodo Científica) descrito por Cupp-Enyard (2008). Inicialmente, o método foi padronizado com uma curva padrão de tirosina (Êxodo Científica) (0,1 a 1 mg/mL) para garantir a precisão das medições. A reação foi realizada misturando 1000 µL do substrato proteico com 200 µL da amostra enzimática em tampão fosfato de potássio (Dinâmica) 50 mM pH 7.0, e a mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos. Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de ácido tricloroacético 110 mM (Êxodo Científica). Em seguida a amostra foi filtrada via algodão hidrofóbico. Após a filtração, separou 500 de µL do filtrado e adicionou-se 2,5 mL de carbonato de sódio 500 mM (Dinâmica) e 500 µL de Folin-Ciocalteu e a amostra foi incubada a 37°C por 30 minutos para permitir o desenvolvimento da cor. A absorbância da solução foi medida em um espectrofotômetro Kasvi K32-VIS a 660 nm. A atividade proteolítica foi calculada com base na quantidade de tirosina liberada, utilizando a curva padrão, e expressa em µmol de tirosina liberada por minuto por miligrama de proteína. As medições foram realizadas em triplicata para garantir a precisão e permitir análises estatísticas.

4.12. Determinação da atividade quitinolítica

A atividade da quitinase foi determinada pela quantificação de N-acetil-glicosamina, um açúcar redutor, formado pela ação da enzima sobre a quitina (Sigma-Aldrich) (1%, m/v) em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7.0, utilizando o reagente ácido 3',5'dinitrosalicílico (DNS) (Dinâmica) como descrito por Miller (1959). O método foi previamente padronizado por uma curva analítica de N-acetil-glicosamina (Sigma-Aldrich) (0,1 a 1 mg/mL). A mistura de reação foi composta de 500 µL de substrato e 500 µL de amostra enzimática, e mantida a 37° C por diferentes períodos conforme determinado para cada experimento. A reação foi parada pela adição de 1 mL de DNS e o volume obtido foi fervido por 5 minutos. Após resfriamento, foram adicionados 5 mL de água destilada. As absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro Kasvi K37-VIS com comprimento de onda ajustado para 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de N-acetil-glicosamina por minuto nas condições de ensaio. A atividade

específica foi expressa em U/mg de proteína e as dosagens de atividades foram feitas triplicata para análises estatísticas.

4.13. Quantificação de proteínas

Para quantificar as proteínas totais do extrato extracelular foi utilizado o método descrito por Bradford (1976). Para a determinação da concentração de proteínas, foi utilizada uma curva analítica de albumina de soro bovino – BSA (Sigma-Aldrich) (0,0025 – 0,025 mg/mL). A leitura foi realizada em espectrofotômetro Kasvi K37 – VIS com comprimento de onda ajustado para 595 nm. A concentração proteica foi expressa em µg de proteína por mL de amostra. As dosagens foram feitas em triplicata para cálculo do desvio padrão.

4.15. Análise da concentração de células viáveis

Para avaliação do crescimento do microrganismo foi utilizada a metodologia de plaqueamento utilizando as diluições seriadas adequadas de acordo com o crescimento do fungo e foram quantificadas em termos de UFC/mL (unidade formadora de colônias por mL). Cada amostra coletada foi inicialmente agitada e homogeneizada com o auxílio de um vortex Kasvi Basic K45-2820. Em seguida, 1 mL foi coletado e transferido para outro tubo falcon contendo 9 mL de solução de água + tween 80 (4%, m/v). Repetiu-se essa diluição seriada até a concentração adequada dependendo do dia da análise. Depois, alíquotas de 100 µL foram retirados das diluições e plaqueados em placas de petri contendo o meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA). Então as placas foram com vedadas com plástico filme e incubadas a temperatura ambiente até a contagem das UFC após 5 dias. Plaqueou-se cada amostra em duplicata e em três diluições diferentes para fins estatísticos.

4.18. Análises estatísticas

Os resultados foram analisados com base na média e desvio padrão e os planejamentos experimentais foram realizados utilizando o teste de ANOVA com $p = 0.05$. Foram utilizados programas Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft) e RStudio para a construção os delineamentos experimentais e confecção de tabelas e gráficos com base nos dados obtidos. Tais resultados foram avaliados e comparados com a literatura existente na área do conhecimento específico.

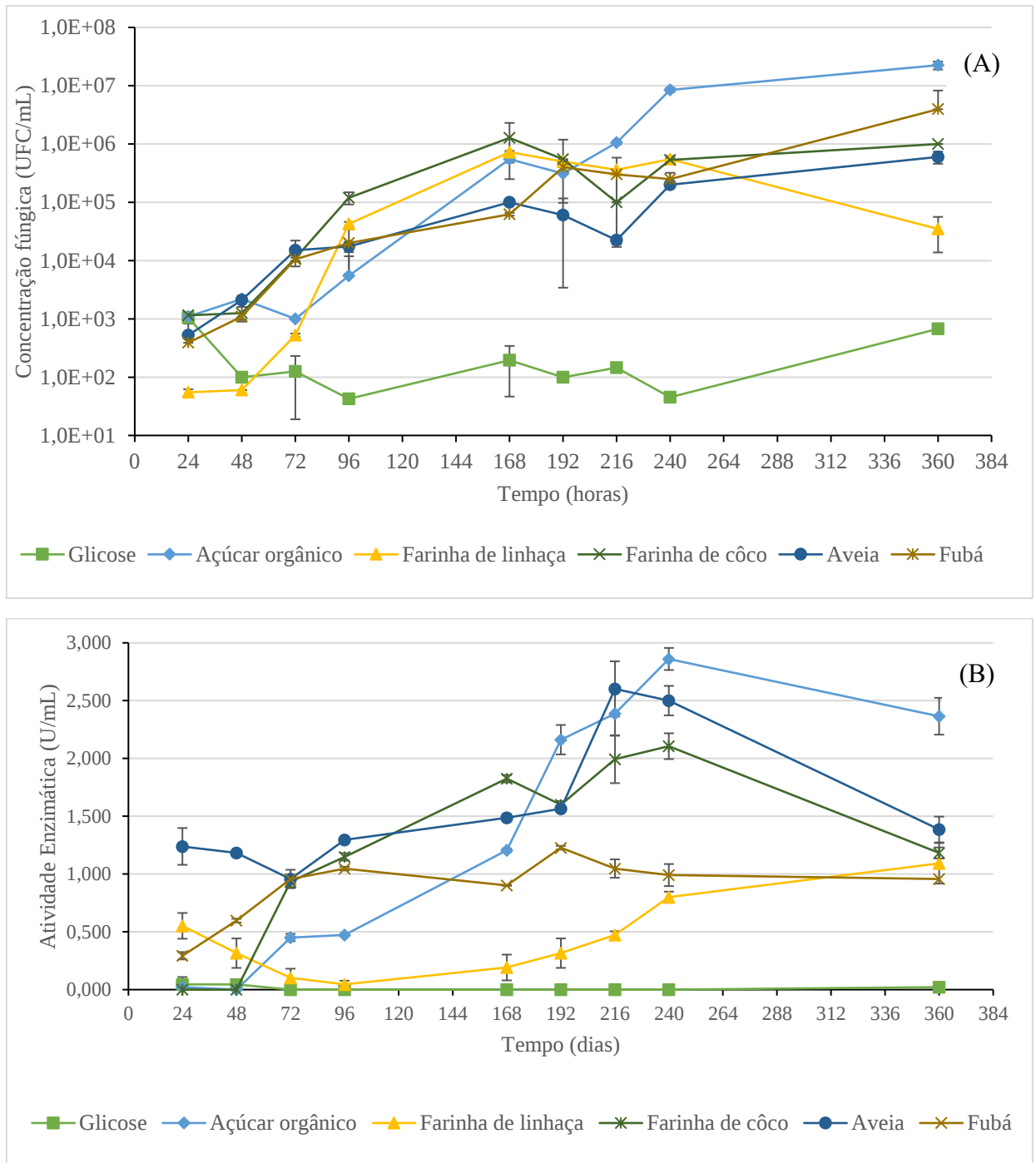
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Influência da fonte de carbono

O carbono é essencial para o desenvolvimento bioquímico do microrganismo, incluindo a síntese de biomoléculas, como carboidratos, proteínas, enzimas, lipídios e ácidos nucleicos que são componentes fundamentais que constituem as células. Dessa forma, quando tratamos de produção de células viáveis em fungos filamentosos, observa-se que a fonte de carbono possui uma função importantíssima, uma vez que o microrganismo utiliza dessa molécula, como fonte de energia e matéria-prima para o seu crescimento e reprodução. Assim, enquanto alguns fungos são especializados em utilizar certos compostos outros já possuem uma gama mais ampla de substratos que podem degradar e utilizar como fonte de carbono. Sendo assim, a escolha dessa fonte influencia diretamente na taxa de crescimento, produção de biomassa, viabilidade celular e produção de enzimas (Madingan *et al.*, 2016).

A seleção das seis diferentes fontes de carbono para este estudo, incluindo a glicose como monossacarídeo, o açúcar orgânico (sacarose) como dissacarídeo, e a aveia, farinha de coco, farinha de linhaça e fubá como fontes de carboidratos mais complexos, foi feita para explorar a influência da complexidade estrutural no crescimento de fungos e na produção de enzimas. Essa variedade permite uma investigação abrangente sobre como diferentes formas de carbono são metabolizadas, refletindo as condições encontradas em aplicações industriais e em sistemas *On Farm*. Além disso, as fontes selecionadas são materiais vegetais amplamente disponíveis e de baixo custo, destacando seu potencial para serem utilizados como substratos alternativos sustentáveis em processos biotecnológicos. Essa abordagem também tem implicações econômicas, dado o uso de produtos agrícolas que podem ser facilmente acessados em diversas regiões, promovendo a sustentabilidade e a eficiência econômica na produção biotecnológica. Assim, a escolha dessas fontes não apenas diversifica a pesquisa, mas também oferece *insights* sobre a otimização de meios de cultivo a partir de materiais renováveis. A Figura 10 mostra os resultados obtidos em cultivos submersos com duração de até 360 horas, ou seja, 15 dias de cultivo tanto para a produção de células viáveis de *H. thompsonii* (Figura 10-A) quanto para a produção de quitinase (Figura 10-B).

Figura 10 - Influência de diferentes fontes de carbono ao decorrer do tempo na produção de células viáveis e da enzima quitinase pelo fungo *H. thompsonii*. Microrganismo cultivado com nitrato de sódio fixado como fonte de nitrogênio, solução de sais Solatus, em agitação orbital a 100 rpm, à 25°C. (A) produção de células viáveis, (B) atividade enzimática da quitinase.



Fonte: o autor.

Na Figura 10-A é possível observar que a maior concentração fúngica foi obtida em 360 horas (15 dias) com o valor de $2,25 \times 10^7 \pm 3,54 \times 10^6$ UFC/mL para o meio que se utilizou açúcar orgânico como fonte de carbono, sendo que o fungo atingiu a fase de estabilidade em 10 dias. Dessa forma, realizou-se uma análise variância (ANOVA) com os dados obtidos em 360 horas (Tabela 7) que indicaram diferenças significativas entre os grupos ($F_{cal} = 4,39$, $p \leq 0,05$), seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas mostrado na Tabela 8 revelando diferenças significativas entre o meio de cultura com açúcar orgânico das demais fontes de carbono, indicando que essa fonte promove uma produção significativamente maior na produção de células viáveis.

Tabela 7 - Análise de variância dos tratamentos com diferentes fontes de carbono para produção de células viáveis em 360 horas.

ANOVA - Produção de células viáveis						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	7,88E+14	5	1,58E+14	45,19	1,10E-04	4,39
Dentro dos grupos	2,09E+13	6	3,49E+12			
Total	8,09E+14	11				

Fonte: o autor.

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. As médias são apresentadas com o desvio padrão ($\pm$ D.P) e os grupos estatísticos são indicados por letras.

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Tratamento	Média ($\pm$ D.P)	Grupo Estatístico
Glicose	$6,75E+02 \pm 3,54E+01$	c
Açúcar orgânico	$2,25E+07 \pm 3,54E+06$	b
Farinha de linhaça	$3,50E+04 \pm 2,12E+04$	a
Farinha de Côco	$1,00E+06 \pm 0$	a
Aveia	$6,00E+05 \pm 1,40E+05$	a
Fubá	$4,00E+06 \pm 4,30E+06$	a

Fonte: o autor.

Isso pode ter ocorrido devido esse açúcar conter principalmente moléculas de sacarose, ou seja, um dissacarídeo não redutor constituído de dois monossacarídeos, a D-glicose e D-frutose, que estão interligados através de seus carbonos anoméricos. Assim a sacarose é a principal fonte de açúcares que atuam diretamente no metabolismo primário do fungo, sendo que a glicose é metabolizada através de vias glicolíticas (glicólise) e do ciclo de Krebs para gerar energia, ou seja, ATP, além de ser uma molécula chave para síntese de inúmeras biomoléculas. Já a frutose é convertida em gliceraldeído que também atua nas mesmas vias glicolíticas. Além disso, quando comparado a outras fontes de carbono testadas, a sacarose possui maior acessibilidade e assimilação, o que pode ter auxiliado a chegar em tais resultados (Lehninger, 2014).

Aqui é importante ressaltar que, apesar da glicose ser uma molécula fundamental para o funcionamento e crescimento celular, na concentração avaliada, ela forneceu um efeito negativo tanto para o crescimento quanto para a produção enzimática, chegando a valores próximos do zero. Isso pode ter ocorrido porque segundo Rolland e colaboradores (2001) a glicose não serve apenas como nutriente, mas exerce sobre as células diversos efeitos regulatórios na expressão de genes que estão envolvidos em diferentes vias metabólicas. Logo, a glicose exerce regulação na produção de enzimas que hidrolisam fontes de carbono alternativas e de transportadores de glicose, entre outros. Sendo assim, é de extrema importância que as células possam ter mecanismos específicos para detectar esse monossacarídeo. Estes mecanismos são, em geral, receptores e transportadores (proteínas HxT) ligados à membrana que geram sinais na célula para que o gene e/ou as atividades enzimáticas ligadas a glicose sejam modulados, ocorrendo diversas vezes a repressão catabólica e conseqüentemente o não crescimento celular (Kig, Turkel & Temizkan, 2005).

Com exceção da glicose, a Figura 10-B mostra que, em cultivos com meios contendo qualquer uma das fontes de carbono avaliadas, o fungo foi capaz de produzir a enzima quitinase, sendo que a maior produção ocorreu após 240 horas (10 dias) utilizando o açúcar orgânico ($2,86 \pm 0,10$ U/mL) como fonte de carbono, seguido da aveia em 216 horas (9 dias) ($2,6 \pm 0,24$ U/mL). Como as análises estatísticas para produção de células viáveis foram realizadas em 360 horas, fez-se o mesmo para a produção de quitinase visando regular a mesma variação de tempo. Dessa forma, a Tabela 9 mostra o teste de ANOVA ($F_{cal} = 4,39$, $p \leq 0,05$) indicando que o valor de p obtido foi de $1,55E-05$, ou seja, ao menos um tratamento difere estatisticamente dos demais, o que corroborado com o valor de F encontrado de 88,46 que é superior ao F crítico. Em seguida, ao realizar o teste de Tukey para comparações múltiplas, mostrado na Tabela 10,

revela que a sacarose também diferente das demais fontes de carbono na produção da enzima, enquanto para as demais fontes de carbono testadas não houve diferença significativa.

Tabela 9 - Análise de variância dos tratamentos com diferentes fontes de carbono para produção de quitinase em 360 horas.

ANOVA - Produção de Quitinase						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	5,684232	5	1,136846	88,46	1,55E-05	4,39
Dentro dos grupos	0,077104	6	0,012851			
Total	5,761336	11				

Fonte: o autor.

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. As médias são apresentadas com o desvio padrão ($\pm$ D.P) e os grupos estatísticos são indicados por letras. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Tratamento	Média ($\pm$ D.P)	Grupo Estatístico
Glicose	0,02 $\pm$ 0	c
Açúcar orgânico	2,37 $\pm$ 0,16	b
Farinha de linhaça	1,09 $\pm$ 0,18	a
Farinha de Côco	1,18 $\pm$ 0,05	a
Aveia	1,39 $\pm$ 0,11	a
Fubá	0,96 $\pm$ 0,08	a

Fonte: o autor.

Tais produções de quitinases são explicados por Agrawal e colaboradores (2015) que ao sequenciarem o genoma da *H. thompsonii* observaram que a produção de quitinases ocorria de forma constitutiva, uma vez que uma parte do ciclo de vida do fungo se passa na colonização do inseto, ou seja, essa enzima é um fator de virulência não sendo necessário a presença de quitina como substrato indutor. Junto a isso, tem-se o fato que a sacarose é uma das fontes de carbono de mais fácil assimilação pelo fungo, ao contrário das outras fontes de carbono aqui testadas, na qual o fungo precisa de um arsenal enzimático maior para acessar as fontes de carbono. Dessa forma, pode ter ocorrido um desvio de energia para a produção de outras

enzimas, enquanto na sacarose a única enzima necessária seria a β -D-frutofuranosidase, ou seja, houve mais recursos para a produção de quitinases inatas.

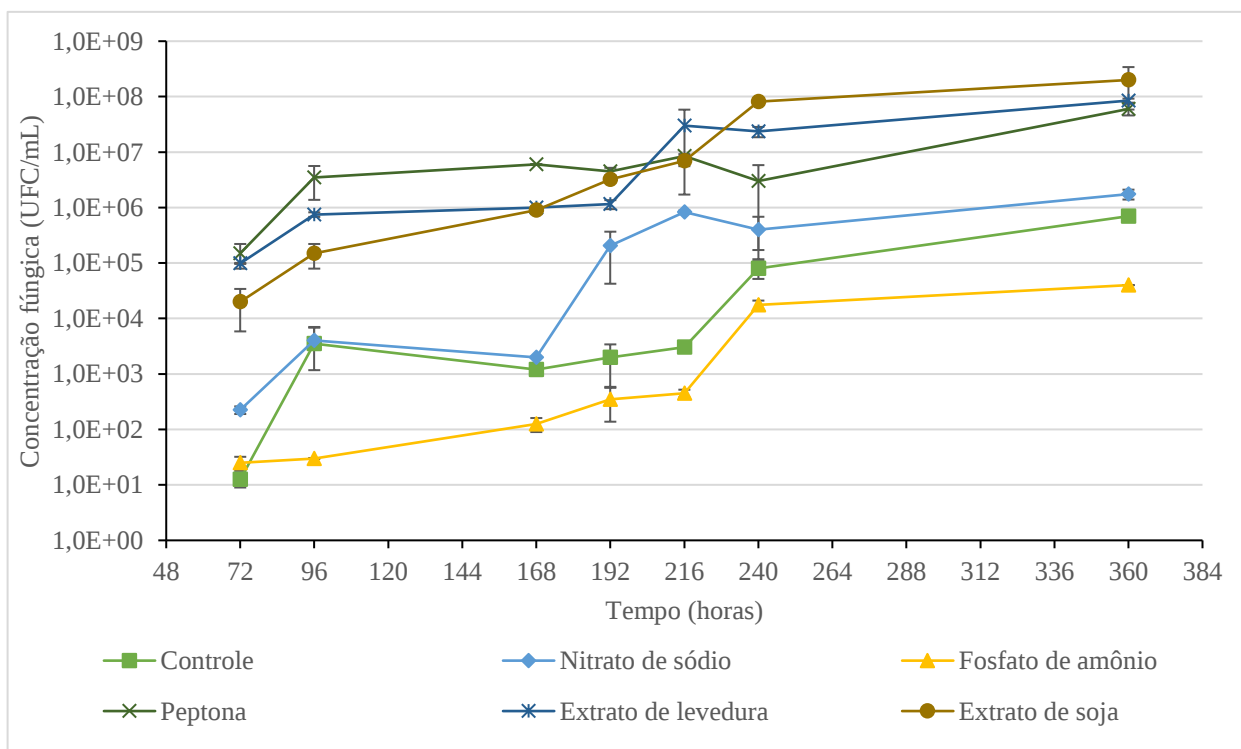
Maganhoto (2020), ao otimizar os parâmetros fermentativos para uma produção líquida do fungo entomopatogênicos *Clonostachys rosea*, observou uma concentração de $7,87 \times 10^8$ UFC/mL ao utilizar a sacarose como fonte de carbono. Além disso Schmaltz (2020), ao produzir células viáveis e enzimas hidrolíticas em fermentação submersa e utilizou-se de ondas ultrassônicas para auxiliar no crescimento do fungo *B. bassiana*, observou um crescimento de $6,7 \times 10^7$ UFC/mL e uma produção de 1,47 U/mL para quitinase ao suplementar o meio de cultivo com sacarose. Já, Coragem (2023) observou que ao suplementar as condições de cultivo com sacarose obteve uma produção quitinásica de 0,55 U/mL no cultivo do fungo *Trichoderma longibrachiatum* (URM 6068).

A escolha da fonte de carbono é um fator crucial na produção microbiana, especialmente considerando não apenas a eficiência de cultivo, mas também os custos associados. Entre as fontes testadas, o açúcar orgânico se destaca como a opção mais vantajosa em termos de custo-benefício. Com um preço que representa cerca de 20% do custo da glicose, variando de R\$ 8,00 a R\$ 20,00 por kg, o açúcar orgânico não apenas é mais econômico, mas também minimiza o risco de repressão catabólica, frequentemente associada ao uso de glicose (Florêncio *et al.*, 2024). Outras fontes de carbono, como a farinha de côco e o fubá, também são alternativas econômicas. O fubá, com preços que variam de R\$ 2,00 a R\$ 4,00 por kg, é uma opção acessível que pode oferecer nutrientes adicionais benéficos para o crescimento microbiano. A aveia, que custa entre R\$ 3,00 e R\$ 5,00 por kg, apresenta um perfil nutricional interessante, contribuindo potencialmente para a performance enzimática (Florêncio *et al.*, 2022). Portanto, a escolha da fonte de carbono deve ser baseada em uma análise abrangente que considere tanto os custos quanto a eficácia na produção desejada. O açúcar orgânico, com seu equilíbrio entre custo acessível e desempenho eficaz, emerge como uma escolha preferencial, corroborada por diversas referências na literatura, assim optou-se por seguir com somente essa fonte de carbono para os testes subsequentes.

5.2. Influência da fonte de nitrogênio

As fontes de nitrogênio têm papel fundamental nos processos de fermentação, uma vez que a fonte adequada é fundamental para garantir que as células possam sintetizar as moléculas essenciais para o seu crescimento, função e replicação (Jana *et al.*, 2013). Isso porque a molécula de nitrogênio está presente em diversas estruturas das células, compondo principalmente as proteínas estruturais, aminoácidos, ácidos nucleicos (DNA e RNA), as enzimas, entre outras biomoléculas (Madingan *et al.*, 2016). Desse modo, utilizando o açúcar orgânico como fonte de carbono e a constituição de sais descrita no item 4.3 do material e métodos, foram testadas cinco fontes de nitrogênio visando tanto a produção de células viáveis quanto a produção de quitinase pelo fungo *H. thompsonii*, dentre elas duas inorgânicas: nitrato de sódio e fosfato de amônio e três orgânicas: peptona, extrato de levedura e extrato de soja. Além disso um meio controle sem a adição de fonte de nitrogênio, sendo os resultados obtidos na Figura 11.

Figura 11 - Influência de diferentes fontes de nitrogênio ao decorrer do tempo na produção de células viáveis pelo fungo *H. thompsonii*. Microrganismo cultivado com *açúcar orgânico* fixado como fonte de carbono, solução de sais Solatus, em agitação orbital a 100 rpm, à 25°C.



Fonte: o autor.

Segundo Cutrim e colaboradores (2006) a disponibilidade da molécula de nitrogênio é maior em fontes orgânicas do que em fontes inorgânicas, o que corrobora quando os resultados aqui obtidos, uma vez que quando olhamos a Figura 11 as maiores concentrações de células viáveis foram encontradas em 360 horas (15 dias) quando utilizado extrato de soja ($2 \times 10^8 \pm 1,41 \times 10^8$ UFC/mL) e extrato de levedura ($8,5 \times 10^7 \pm 7,07 \times 10^6$ UFC/mL) como fonte de nitrogênio. Em contrapartida quando utilizado fontes inorgânicas de nitrogênio, os valores foram mais abaixo, sendo que quando comparamos o valor do controle no mesmo período observamos que as fontes de carbono produziram 286 vezes mais células viáveis. Diante desses resultados, assim como foi feito na fonte de carbono, também se realizou uma análise variância (ANOVA) com os dados obtidos em 360 horas (Tabela 11) que indicaram diferenças significativas entre os grupos ($F_{cal} = 4,39$, $p \leq 0,05$). Em seguida, para verificar a diferença significativas entre os meios de culturas testados, foi realizado o teste de Tukey para comparações múltiplas mostrado na Tabela 12, o que revela que os meios contendo extrato de soja, extrato de levedura e peptona difere estatisticamente dos demais. Dessa forma a adição dessas fontes de nitrogênio orgânicas influenciam positivamente a produção de células viáveis.

Tabela 11 - Análise de variância dos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio para produção de células viáveis em 360 horas.

ANOVA - Produção de células viáveis						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	135,475	5	27,095	3815,28	2,04E-10	4,39
Dentro dos grupos	0,04261	6	0,0071			
Total	135,517	11				

Fonte: o autor.

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. As médias são apresentadas com o desvio padrão ($\pm$ D.P) e os grupos estatísticos são indicados por letras. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

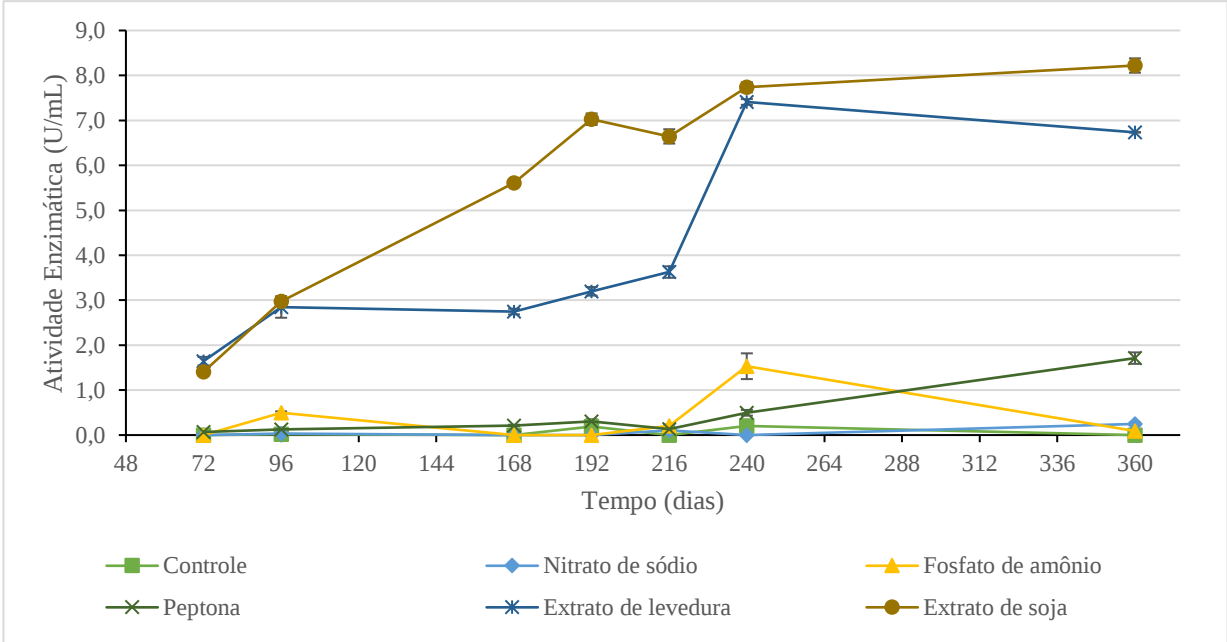
Tratamento	Média ($\pm$ D.P)	Grupo Estatístico
Controle	7,00E+05 $\pm$ 1,41E+05	a
Nitrato de Sódio	1,75E+06 $\pm$ 3,54E+05	a
Fosfato de amônio	4,00E+04 $\pm$ 0	a
Peptona	6,00E+07 $\pm$ 1,41E+07	b
Extrato de levedura	8,50E+07 $\pm$ 7,07E+06	c
Extrato de soja	2,00E+08 $\pm$ 1,41E+08	d

Fonte: o autor.

Para além de fontes de nitrogênio tanto o extrato de soja quanto o extrato de levedura são fontes de outros nutrientes, como vitaminas e sais minerais, o que pode ter contribuído com os resultados aqui obtidos. O extrato de soja, por exemplo, é uma matéria prima que em 100 gramas contém 35,7 g de proteínas, 22,6 g de lipídios, 9,2 mg de vitamina C, 0,4mg de vitamina B6, 0,1 de riboflavina, além de sais como cálcio, manganês, magnésio, fósforo, ferro, potássio, cobre, zinco e sódio (Alencar Filho *et al.*, 2019).

Já a Figura 12 nos mostra que as fontes orgânicas de nitrogênio influenciaram positivamente a produção de quitinase enquanto as inorgânicas influenciaram negativamente. No mesmo período, ou seja, 360 horas foram encontradas as maiores produções de quitinase sendo de $8,22 \pm 0,16$ U/mL quando utilizado o extrato de soja como fonte de nitrogênio e em 240 horas quando utilizado o extrato de levedura ($7,41 \pm 0,06$ U/mL). Ao realizar o teste ANOVA ($F_{cal} = 4,39$, $p \leq 0,05$) (Tabela 13) observamos que o valor de p obtido foi de $2,66E-09$ e o valor de F encontrado foi de 1620,59, ou seja, um valor maior do que o F crítica. Dessa forma, ao menos um dos tratamentos difere estatisticamente dos demais sendo observado na Tabela 14, que mostra o teste de Tukey realizado para esse fim, que os meios de cultura suplementados com extrato de soja e de levedura diferiram dos demais, indicando uma influência positiva na produção da enzima.

Figura 12 - Influência de diferentes fontes de nitrogênio ao decorrer do tempo na produção de quitinase pelo fungo *H. thompsonii*. Microrganismo cultivado com açúcar orgânico fixado como fonte de carbono, solução de sais Solatus, em agitação orbital a 100 rpm, à 25°C.



Fonte: o autor.

Tabela 13 - Análise de variância dos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio para produção de quitinase em 360 horas.

ANOVA - Produção de Quitinase						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	1,35E+17	5	2,70E+16	1620,59	2,66E-09	4,39
Dentro dos grupos	1,00E+14	6	1,67E+13			
Total	1,35E+17	11				

Fonte: o autor.

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. As médias são apresentadas com o desvio padrão ($\pm$ D.P) e os grupos estatísticos são indicados por letras. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Tratamento	Média ($\pm$ D.P)	Grupo Estatístico
Controle	0 ± 0	a
Nitrato de Sódio	$0,25 \pm 0,03$	a
Fosfato de amônio	$0,09 \pm 0$	a
Peptona	$1,71 \pm 0,13$	a
Extrato de levedura	$6,73 \pm 0$	b
Extrato de soja	$8,22 \pm 0,16$	c

Fonte: o autor.

Não há muitos estudos acerca do extrato de soja como fonte de nitrogênio visando a produção de células viáveis, todavia o extrato de levedura é uma das fontes mais testadas para esse objetivo. Abati (2015) ao implementar co extrato de levedura no meio de cultura líquido conseguiu concentrações de $3,6 \times 10^9$ de blastosporos/mL de *Metarhizium rileyi*. Além disso, Maganhoto (2020) conseguiu elevar a produção de conídios de *Chlonostachys rosea* em $7,87 \times 10^8$ conídios/mL ao acrescentar extrato de levedura na composição do meio de cultura. Para além dos fungos, as bactérias *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis*, também utilizadas como bioinsumos, tiveram sua concentração aumentada quando utilizado o farelo de soja no meio de cultivo (Xie *et al.*, 2022; Patel *et al.*, 2019).

É pertinente citar que há uma tendência de queda da produção de quitinase ao decorrer do tempo como observado nos tratamentos que utilizaram extrato de levedura. Isso pode ocorrer, pois as fontes de nitrogênio orgânicas são mais complexas do que as inorgânicas e possuem proteínas, o que leva uma indução da produção de proteases que podem atacar as enzimas produzidas pelo próprio fungo. Mesmo que as proteases possam exibir uma especificidade em relação a uma ligação peptídica única de uma proteína, a maioria dessas enzimas são relativamente inespecíficas para os substratos e podem ter alvos múltiplos no substrato de maneira indiscriminada, podendo até mesmo desfazer proteínas que a própria célula produziu (Otín & Bond, 2008). Ribeiro (2020), ao estudar o melhor meio de cultivo para produção de quitinase pelo fungo *Trichoderma sp.*, observou que a atividade quitinolítica decaiu em 12 horas enquanto a atividade proteásica estava bastante alta, sendo um problema resolvido com ajuste

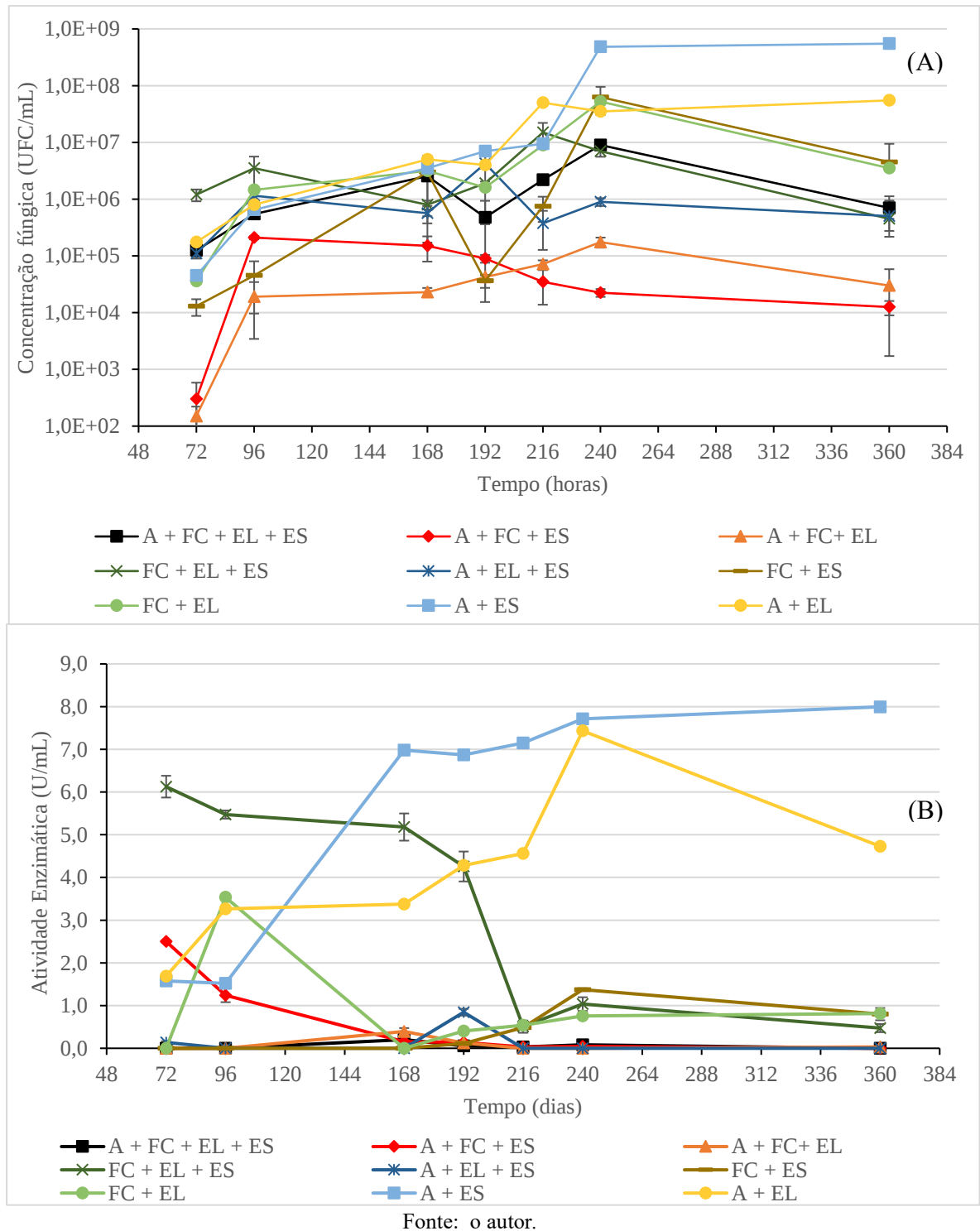
do pH. Esse ajuste pode ter ocorrido pois o pH ótimo para a atividade de uma enzima é fundamental para sua estrutura e funcionalidade. Quando o pH não está dentro da faixa ideal, a quitinase pode ser desnaturada ou degradada, resultando em uma perda de atividade. Por outro lado, a protease pode operar efetivamente em uma faixa de pH que a torna mais ativa, permitindo que ela degrade a quitinase. O ajuste do pH para níveis que favorecem a atividade da quitinase pode inibir a ação da protease, protegendo-a da degradação enzimática e, assim, aumentando sua atividade e produtividade (Nogueira *et al.*, 2021).

Por fim, com base nos preços de 2023 das fontes de nitrogênio, o extrato de soja se destaca com um custo de aproximadamente R\$ 8,70 por kg, oferecendo uma relação custo-benefício favorável. Em comparação, a peptona atinge R\$ 16,00 por kg, o que a torna uma opção menos vantajosa. O extrato de levedura, custando cerca de R\$ 12,30 por kg, também se mostra eficiente, mas ainda mais caro que o extrato de soja. O nitrato de sódio (R\$ 16,99/kg) e o fosfato de amônio (R\$ 8,00 a R\$ 9,00/kg) não superam a eficácia do extrato de soja em relação ao custo (Gottens, 2023). Assim, para os testes subsequentes, a escolha recai sobre o extrato de soja, considerando seus melhores valores e o ótimo custo-benefício.

5.3. Influência da combinação entre fontes de carbono e fonte de nitrogênio

Tendo em vista que a sacarose e a farinha côco foram as fontes de carbono que mais suplementaram o crescimento do fungo *H. thompsonii* e a produção de quitina assim como o extrato de soja e o extrato de levedura foram as melhores fontes de nitrogênio, testou-se diferentes combinações dessas fontes, objetivando encontrar um consórcio entre elas para potencializar as variáveis respostas: produção de células viáveis e da enzima quitinase. Assim, na Figura 14, é possível observar a produção de células viáveis (Figura 13-A) e produção de quitinase (Figura 13-B) para os diferentes experimentos realizados através de acordo com o planejamento experimental.

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 *H. thompsonii*. Microrganismo cultivado com a solução de sais Solatus, em agitação orbital a 100 rpm, à 25°C. (A) produção de células viáveis, (B) produção de quitinases. Legenda: A = açúcar orgânico, FC = farinha de coo, EL = Extrato de levedura, ES = Extrato de soja.



Tanto para a concentração fúngica quanto para a produção da quitinase o melhor resultado foi encontrado quando o meio de cultura foi composto de sacarose e extrato de soja, sendo o pico de concentração em 360 horas (15 dias) com $5,5 \times 10^8 \pm 2,12 \times 10^8$ UFC/mL e a atividade quitinásica de $8,0 \pm 0,16$ U/mL. Em seguida, veio a combinação de açúcar orgânico com extrato de levedura obtendo uma concentração de $5,5 \times 10^7 \pm 2,12 \times 10^7$ UFC/mL e de $4,7 \pm 0,32$ U/mL no mesmo período. Em relação a produção de quitinase, as outras combinações não foram bem-sucedidas, ficando em uma média de 3 vezes abaixo quando comparadas as duas maiores produções (A+ES e A+EL). Já a concentração fúngica variou-se bastante no começo, porém é possível observar uma tendência de que quando se mistura as duas fontes de carbono, há uma influência negativa no crescimento da *H. thompsonii* enquanto as outras misturam obtêm-se um equilíbrio, mesmo não tendo altas concentrações.

Tais dados são corroborados ao realizar o teste de ANOVA ($F_{cal} = 3,23$, $p \leq 0,05$) para o tempo de 360 horas, na qual obteve-se os valores de p de $1,09E-11$ e de $5,69E-12$ para produção de células viáveis e de quitinase, respectivamente, indicado que ao menos um dos tratamentos difere estatisticamente (Tabela 15 e 17). Assim, ao observar o teste de Tukey, sendo os resultados mostrados através da Tabela 16 e 18 pode-se concluir que as melhores misturas visando uma otimização das duas variáveis respostas é quando adicionamos somente uma fonte de carbono, que nesse caso, sacarose demonstrou o melhor desempenho. Já para a fonte de nitrogênio o melhor resultado foi obtido quando não se misturou as duas fontes escolhidas, sendo que para 360 horas as duas fontes influenciam positivamente. Todavia ao olhar os dados obtidos em outros tempos de cultivo, o extrato de soja apresentou produções maiores das variáveis respostas que buscamos.

Tabela 15 - Análise de variância dos tratamentos com diferentes consórcios para produção de células viáveis em 360 horas.

ANOVA - Produção de células viáveis						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	7,93E+17	8	9,91E+16	713,219	1,09E-11	3,23
Dentro dos grupos	1,25E+15	9	1,39E+14			
Total	7,94E+17	17				

Fonte: o autor.

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. As médias são apresentadas com o desvio padrão ($\pm$ D.P) e os grupos estatísticos são indicados por letras. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$). Legenda: A = açúcar orgânico, FC = farinha de coco, EL = Extrato de levedura, ES = Extrato de soja.

Tratamento	Média ($\pm$ D.P)	Grupo Estatístico
A+FC+EL+ES	7,00E+05 $\pm$ 4,24E+05	a
A+FC+ES	1,25E+04 $\pm$ 3,54E+03	a
A+FC+EL	3,00E+04 $\pm$ 2,83E+04	a
FC+EL+ES	4,50E+05 $\pm$ 4,95E+05	a
A+EL+ES	5,00E+05 $\pm$ 2,83E+05	a
FC+ES	4,50E+06 $\pm$ 4,95E+06	a
FC+EL	3,50E+06 $\pm$ 3,54E+06	a
A+ES	5,50E+08 $\pm$ 2,12E+08	b
A+EL	5,50E+07 $\pm$ 2,12E+07	c

Fonte: o autor.

Tabela 17 - Análise de variância dos tratamentos com diferentes consórcios para produção de quitinase em 360 horas.

ANOVA - Produção de Quitinase

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	126,685	8	15,8356	823,929	5,69E-12	3,23
Dentro dos grupos	0,17298	9	0,01922			
Total	126,858	17				

Fonte: o autor.

Tabela 18 - Resultados do teste de Tukey para comparação das médias da produção de quitinases (U/mL) entre as diferentes combinações da fonte de carbono e fonte de nitrogênio produzidas em 360 horas. As médias são apresentadas com o desvio padrão ($\pm$ D.P) e os grupos estatísticos são indicados por letras. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$). Legenda: A = açúcar orgânico, FC = farinha de coco, EL = Extrato de levedura, ES = Extrato de soja.

Tratamento	Média ($\pm$ D.P)	Grupo Estatístico
A+FC+EL+ES	0	a
A+FC+ES	0	a
A+FC+EL	$0,03 \pm 0,02$	a
FC+EL+ES	$0,47 \pm 0,10$	a
A+EL+ES	0	a
FC+ES	$0,80 \pm 0,14$	a
FC+EL	$0,81 \pm 0,13$	a
A+ES	$8,00 \pm 0,16$	b
A+EL	$4,73 \pm 0,32$	c

Fonte: o autor.

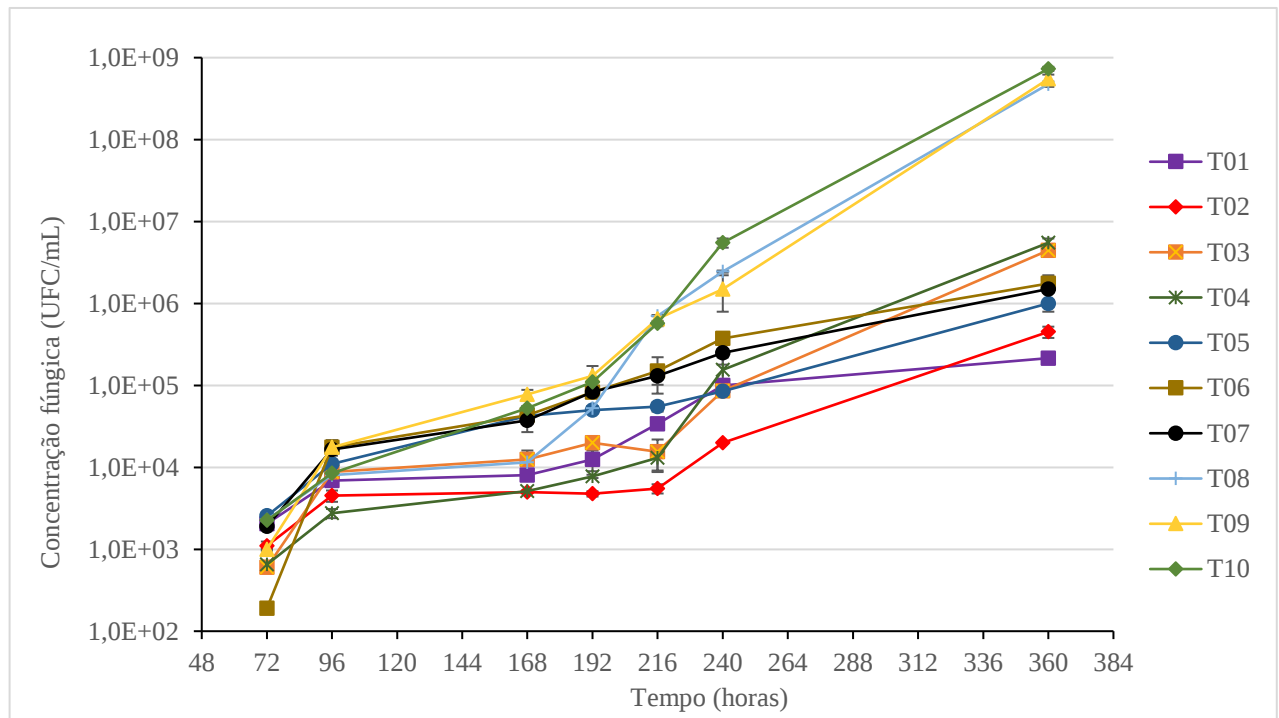
No presente estudo, observou-se que o melhor resultado para a produção de biomassa e atividade enzimática ocorreu quando foram utilizadas apenas fontes de carbono e nitrogênio mais simples, como o açúcar orgânico e o extrato de soja. Esses resultados são consistentes com aqueles relatados na literatura, que apontam a eficiência de fontes de carbono como sacarose e nitrogênio orgânico, como o extrato de levedura, na promoção do crescimento de fungos. Por exemplo, Schmaltz (2020) verificou que o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* atingiu concentrações de $6,7E+08$ esporos/mL e atividades quitinásicas de 1,47 U/mL utilizando um consórcio entre farelo de arroz e sacarose como fontes de carbono. De forma semelhante, McCoy et al. (1972) obtiveram um rendimento de biomassa de *Hirsutella thompsonii* de 2.243,4 mg/100 mL ao suplementarem um meio de cultura com 0,10% (m/v) de peptona e 0,5% (m/v) de extrato de levedura. Nossos achados corroboram esses estudos ao mostrar que o tratamento contendo açúcar e extrato de soja foi superior, seguido pelo tratamento com açúcar e extrato de levedura, destacando o papel fundamental dessas fontes nutricionais na promoção do crescimento fúngico e produção de biomassa.

5.4. Influência da composição de sais

Com o intuito de avaliar qual a influência dos sais presentes no meio de cultura basal (Cloreto de potássio, sulfato de magnésio e fosfato dipotássico) realizou-se um planejamento fatorial $2^3 + 2$ pontos centrais como descrito na Tabela 5. Uma vez que a concentração desses sais é segredo industrial os tratamentos foram codificados para manter a confidencialidade dessa parte do processo. Todavia os meios de cultura testados foram constituídos da solução desses sais, açúcar orgânico e extrato de soja. Assim é possível observar na Figura 14 que os todos os sais influenciaram de maneira positiva no crescimento do fungo, sendo que com 15 dias, verifica-se um incremento na produção de células viáveis, variando de $2,15 \times 10^5$ UFC/mL para o tratamento 01, que é o que não possui nenhum sal em sua composição, até $7,3 \times 10^8$ UFC/mL no tratamento 8, o qual possui todos os sais em composição. Além disso, a Tabela 19 apresenta o efeito das variáveis sobre essa variável resposta e em todas as variáveis independentes avaliada observa-se um efeito positivo na concentração fúngica. Já a Figura 15, mostra graficamente o efeito positivo dos três sais testados.

Isso pode ter ocorrido, pois alguns metais são essenciais para a manutenção das células, uma vez que estão envolvidos em processos como catálise enzimática servindo como cofatores de enzimas, osmorregulação, regulares de pH, entre outros. Tanto o cloreto de potássio quando o fosfato dipotássico são duas fontes de potássio, um composto que está intrinsecamente ligado a regulação do equilíbrio osmótico dentro das células. Além disso, o fosfato dipotássico também é fonte de fosfato, um componente fundamento dos ácidos nucleicos (DNA e RNA), dos fosfolipídeos das membranas celulares e de compostos energéticos como o ATP. Já o sulfato de magnésio é uma fonte tanto de magnésio que serve como cofator para inúmeras enzimas quanto uma fonte de enxofre que está presente em muitos aminoácidos que compõe as proteínas (Madingan *et al.*, 2016). Dessa forma, o aumento observado no tratamento com todas essas fontes em contrapartida ao tratamento que não as contém, sugere-se que o incremento desses sais no meio de cultura serve como fonte desses inúmeros nutrientes, sendo benéfico ao crescimento do fungo.

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 *H. thompsonii*. Microrganismo cultivado com 2% (m/v) de sacarose e 1% (m/v) de extrato de soja sob agitação orbital a 100 rpm à 25°C.



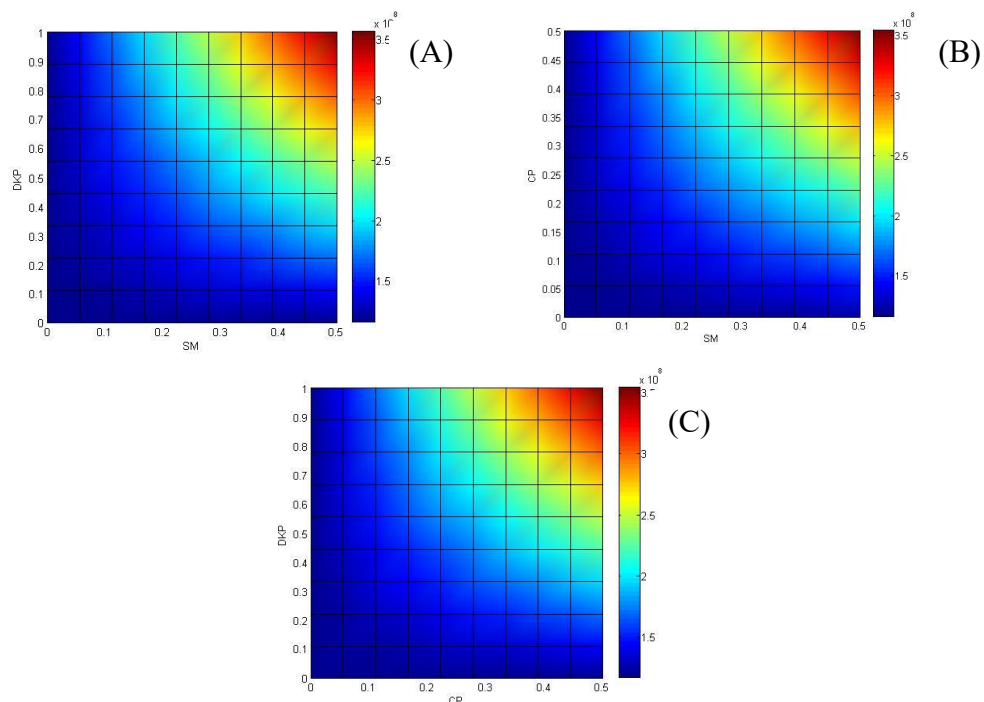
Fonte: o autor.

Tabela 19 - Análise estatística descritiva do fatorial completo 2^3 tendo a produção de células viáveis como variável resposta. Legenda: CP = cloreto de potássio, SM = sulfato de magnésio, DKP = fosfato dipotássico ($p \leq 0,05$).

	Efeito	Erro	t	p
CP(X1)	1,17E+08	3,03E+07	3,8636	0,0026
SM(X2)	1,21E+08	3,03E+07	3,9831	0,0021
DKP(X3)	1,19E+08	3,03E+07	3,9205	0,0024
X1*X2	1,16E+08	3,03E+07	3,8292	0,0028
X1*X3	1,18E+08	3,03E+07	3,9001	0,0025
X2*X3	1,18E+08	3,03E+07	3,9042	0,0025
X1*X2*X3	1,18E+08	3,03E+07	3,8916	0,0025

Fonte: o autor.

Figura 15 - Gráfico de superfície de resposta para produção de células viáveis em 360 horas. (A) influência do fosfato dipotássico e do sulfato de magnésio. (B) influência do sulfato de magnésio junto com cloreto de potássio. (C) influência do fosfato dipotássico e do cloreto de potássio. Legenda: CP = cloreto de potássio, SM = sulfato de magnésio, DKP = fosfato dipotássico.

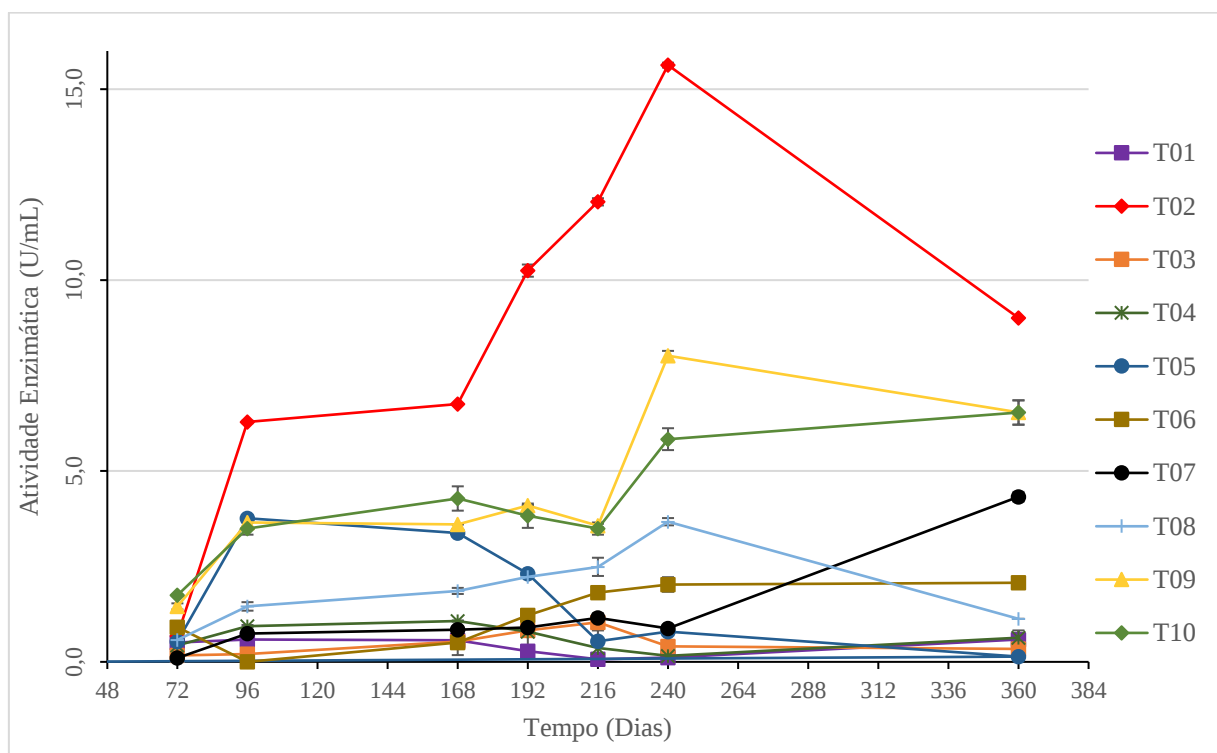


Fonte: o autor.

Em contrapartida quando observamos a Figura 16 é possível notar que a produção máxima de quitinase ocorreu em 10 dias com uma produção de 15,63 U/mL no tratamento 2, o qual possui somente fosfato dipotássico em sua constituição. Um incremento de 138,32% quando comparado ao tratamento 1 cuja composição não apresenta sais e a produção enzimática foi de 0,113 U/mL. Além disso, a Tabela 20 apresenta o efeito das variáveis sobre a produção de quitinase. A implementação de fosfato dipotássico no meio de cultura teve um efeito positivo significativo na atividade enzimática, ou seja, o aumento dos valores deste parâmetro dentro da faixa estudada incrementaria a produção da enzima. Já o cloreto de potássio e o sulfato de magnésio quando utilizados de forma individual ou junto com o fosfato dipotássico, apresentaram um efeito negativo fazendo com que a atividade da enzima decaísse. Em contrapartida, a interação desses dois compostos obteve um efeito positivo significativo. Assim,

a Figura 17 indica que o aumento da concentração de fosfato dipotássico e diminuição do cloreto de potássio e do sulfato de magnésio são favoráveis para a obtenção de altas atividades de quitinase.

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 *H. thompsonii*. Microrganismo cultivado com 2% (m/v) de sacarose e 1% (m/v) de extrato de soja sob agitação orbital a 100 rpm à 25°C.



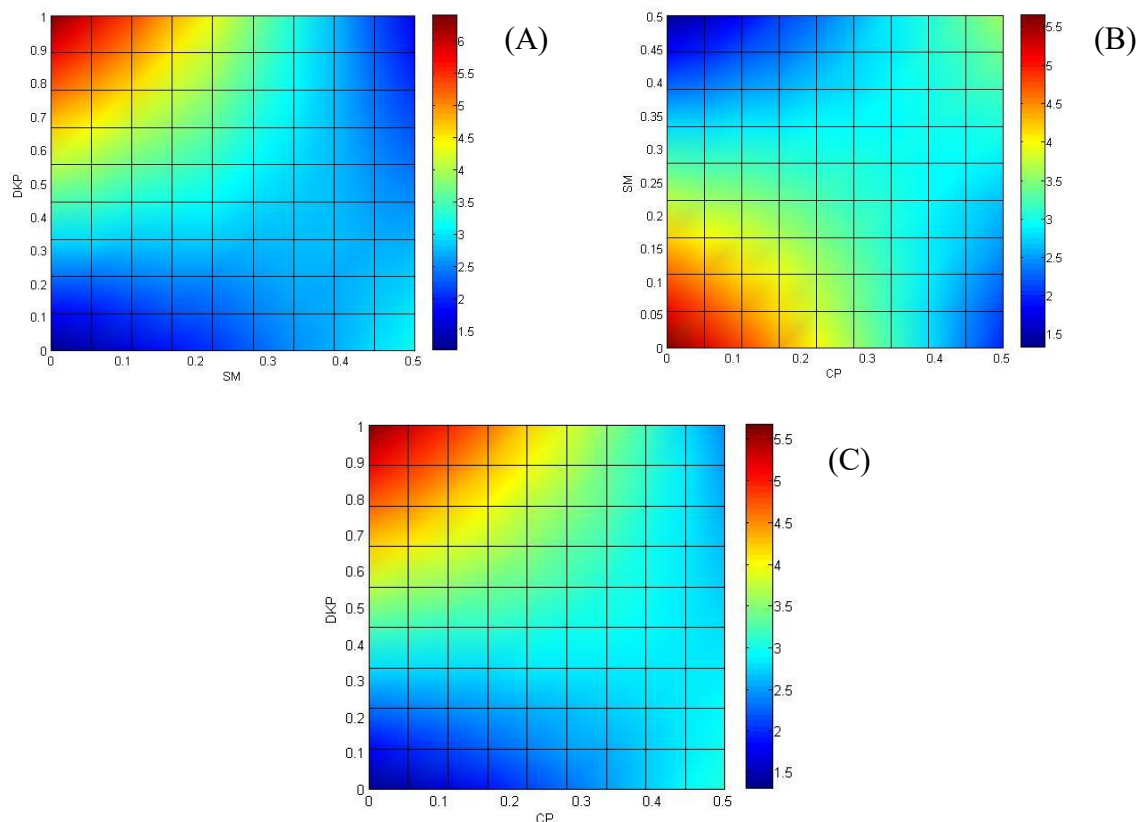
Fonte: o autor.

Tabela 20 - Análise estatística descritiva do fatorial completo 23 tendo a produção de células viáveis como variável resposta. Legenda: CP = cloreto de potássio, SM = sulfato de magnésio, DKP = fosfato dipotássico. ($p \leq 0,05$).

	Efeito	Erro	t	p
CP(X1)	-0,7266	0,0746	-9,7394	9,6195E-07
SM(X2)	-1,3459	0,0746	-18,0395	1,6116E-09
DKP(X3)	1,8639	0,0746	24,9825	4,8587E-11
X1*X2	2,9674	0,0746	39,7734	3,0775E-13
X1*X3	-2,4944	0,0746	-33,4335	2,0486E-12
X2*X3	-3,3161	0,0746	-44,4479	9,1260E-14
X1*X2*X3	0,7486	0,0746	10,0342	7,1447E-07

Fonte: o autor.

Figura 17 - Gráfico de superfície de resposta para produção de células viáveis em 360 horas. (A) influência do fosfato dipotássico e do sulfato de magnésio. (B) influência do sulfato de magnésio junto com cloreto de potássio. (C) influência do fosfato dipotássico e do cloreto de potássio. Legenda: CP = cloreto de potássio, SM = sulfato de magnésio, DKP = fosfato dipotássico.



Fonte: o autor.

Ashour e colaboradores (2016) utilizaram a metodologia de Plackett-Burman e Design Composto Central para otimizar a produção de quitinase por *Brevundimonas diminuta* KT277492 e observaram que o fosfato dipotássico junto com outros componentes auxiliou no aumento da quitinase conseguindo um incremento de 8,77 vezes quando comparado o meio com menor produção. Já Ornela e colaboradores (2022) observaram que tanto o fosfato dipotássico quanto o sulfato de magnésio favoreceram a atividade de quitinase chegando em concentrações de cerca de 7 U/mL de atividade enzimática para o fungo *Aspergillus niveus*.

Neste experimento, foi observado que todos os sais testados influenciaram de maneira positiva o crescimento fúngico, enquanto apenas o fosfato dipotássico apresentou efeito significativo na produção de quitinase. Como o foco do projeto foi a formulação de um meio de cultura destinado à produção de células viáveis para aplicação em campo, e dada a ausência de estudos que correlacionem diretamente a produção de quitinase com a eficácia no controle biológico, a escolha dos componentes do meio de cultura foi orientada principalmente pela produção de biomassa. Assim, optou-se por manter todos os sais na formulação final do meio de cultura, visando maximizar o crescimento e a viabilidade celular.

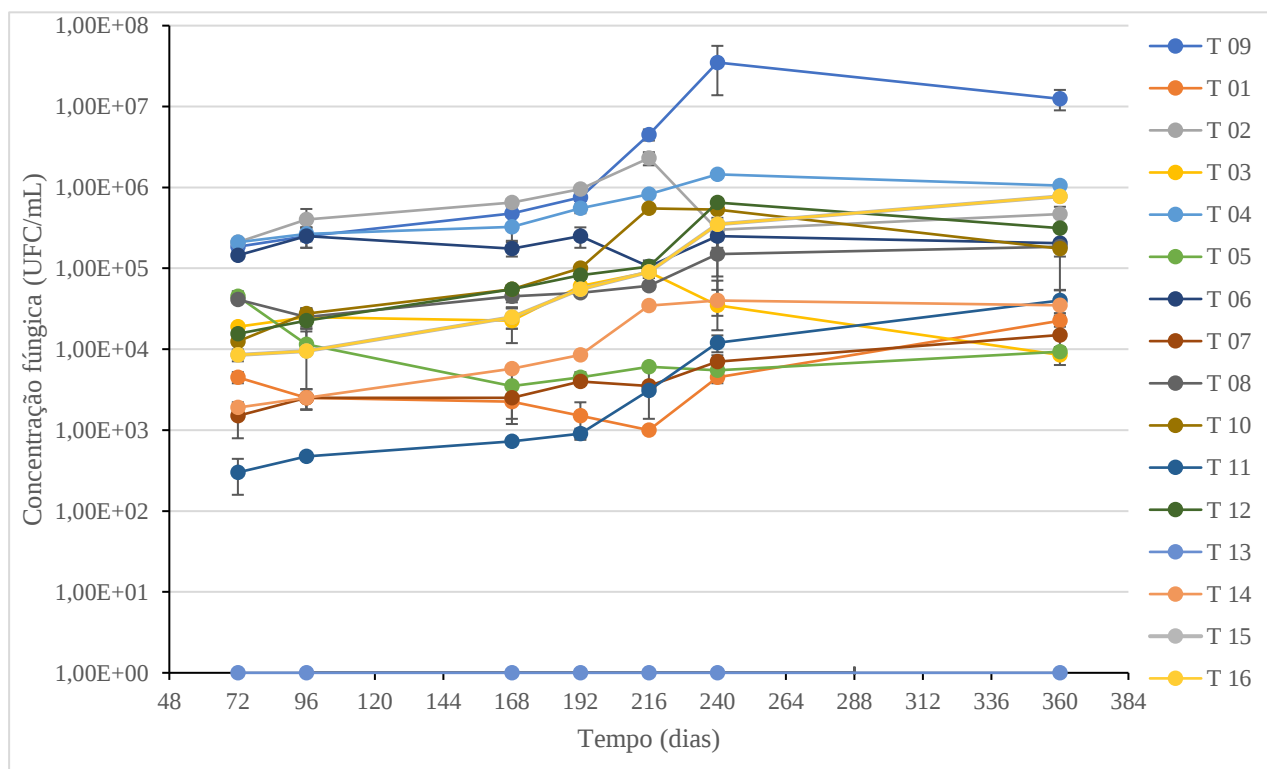
5.5. Influência do balanço C/N e do pH inicial no meio de cultivo utilizando desenho composto central rotacional

H. thompsonii é um fungo entomopatogênico amplamente estudado por sua capacidade de controlar ácaros em diferentes culturas agrícolas. Sua eficiência como agente de biocontrole depende de diversos fatores ambientais e nutricionais, como a quantidade de açúcar disponível, o pH do meio de cultivo e a presença de fontes de nitrogênio, como o extrato de soja. Estudos anteriores, como os de Hirapara e colaboradores (2023), demonstraram que a modulação dessas variáveis pode influenciar significativamente a produção de unidades formadoras de colônia (UFC), ao comparar diferentes composições de meio de cultura de forma líquida e sólida, verificando que a composição equilibrada desses fatores é crucial para a virulência e eficácia do fungo em aplicações comerciais. Neste estudo, utilizou-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para avaliar a influência dessas variáveis no crescimento de *H. thompsonii* e na produção de UFC, quitinase e protease, com o objetivo de otimizar as condições de cultivo. Os resultados serão apresentados em tópicos, discutindo separadamente a produção de UFC, quitinase e protease, e como cada uma dessas respostas foi influenciada pelas variáveis estudadas.

5.5.1. Otimização da produção de unidades formadoras de colônias

A produção de unidades formadoras de colônia por *H. thompsonii* foi monitorada ao longo de 30 dias, com coletas realizadas a cada 24 horas nos primeiros 7 dias, depois em 10, 15 e 30 dias, visando a estabilidade do produto. Como observado nos experimentos anteriores, o crescimento de *H. thompsonii* segue uma curva sigmoide, com um aumento inicial lento, seguido por um crescimento exponencial e, finalmente, uma fase de platô. Nossos resultados confirmaram essa tendência, com a produção máxima de UFC ocorrendo ao final de 10 dias de cultivo. A Figura 18 apresenta a variação da produção de UFC ao longo do tempo para os 16 tratamentos, destacando a fase exponencial de crescimento e a estabilização da produção.

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 *H. thompsonii*. Microrganismo cultivado sob agitação orbital a 100 rpm à 25°C.



Ao observarmos a análise temporal vemos que no tratamento 13 o microrganismo não foi capaz de crescer. Essa inibição pode ter ocorrido devido ao pH de 2,5, que pode ter causado danos ou morte das células em função da alta acidez do meio externo, mesmo que as condições das fontes de carbono e nitrogênio estivessem em seus pontos centrais. Já o maior crescimento

ocorreu no tratamento 09 no qual continha o pH inicial igual a 6, extrato de soja igual a 8 g/L e não continha açúcar. Os dois melhores tratamentos seguidos foram T02 com pH igual a 8, extrato de soja igual a 1 g/L e sacarose igual a 5 g/L e o T04 com pH igual a 8, extrato de soja igual a 15 g/L e sacarose igual a 5g/L, indicando que o fungo tem preferência por pH mais básico, menor quantidade de sacarose e maior quantidade de extrato de soja. Como em 10 dias foi obtido a maior concentração fúngica e foi quando o crescimento do fungo entrou em estabilidade, escolheu-se os resultados desse tempo de cultivo para se fazer a análise estatística e a otimização do meio de cultura.

De acordo com Grimm e colaboradores (2005), o sucesso de modelos de regressão para prever a produção de UFC em fungos filamentosos depende da significância das variáveis estudadas. Por isso, na análise inicial, utilizamos um modelo de regressão linear múltipla para avaliar a influência da quantidade de açúcar, extrato de soja e pH inicial no crescimento de *H. thompsonii*. No entanto, assim como no trabalho de Hirschauer e colaboradores (2022), no qual a significância do modelo foi comprometida por variabilidade experimental, nossos resultados indicaram que o modelo não era estatisticamente significativo, com valores de p acima do nível de significância de 0,05 para as principais variáveis e o modelo, na forma inicial, com R^2 no valor de 0,56, ou seja, não era capaz de explicar adequadamente. A Tabela 21 resume os coeficientes do modelo e os valores de p, sugerindo que para a produção de UFC dentre todos os parâmetros testados, somente a variável X1, que seria a quantidade de açúcar, teria resultado significativo realçando que o aumento da concentração de açúcar no meio de cultura influencia negativamente na produção de células viáveis.

Tabela 21 - Análise estatística descritiva do desenho composto central rotacional tendo a produção de células viáveis como variável resposta ($p \leq 0,05$).

	Efeito	Erro	t	P
Açúcar(X1)	-3,78E+06	1,51E+06	-2,51	0,0201
X1²	4,99E+06	1,83E+06	2,72	0,0124
Extrato de soja(X2)	1,58E+05	1,51E+06	0,10	0,9176
X2²	-1,62E+06	1,83E+06	-0,89	0,3852
pH(X3)	-9,59E+04	1,51E+06	-0,06	0,9499
X2²	-1,73E+06	1,83E+06	-0,95	0,3544
X1*X2	1,27E+05	1,97E+06	0,06	0,9491
X1*X3	-1,65E+05	1,97E+06	-0,084	0,9339
X2*X3	-1,60E+05	1,97E+06	-0,081	0,9361

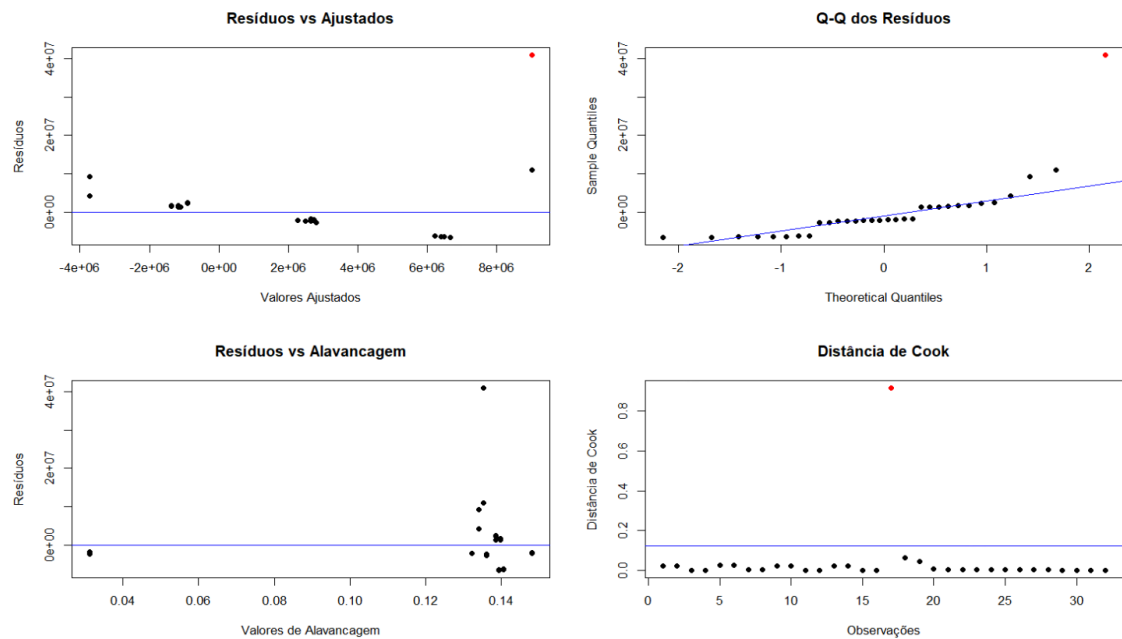
Fonte: o autor.

A falta desse ajuste do modelo pode explicado pela variabilidade do método de quantificação de unidades formadoras de colônias, uma vez que é utilizado o método de diluição seriada para tal. Ao investigar a utilização do método de diluição seriada para a quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC) em fungos filamentosos, Pitt e colaboradores (2022) observaram que a significância do modelo pode ser comprometida devido à variabilidade experimental. Essa variabilidade pode influenciar os valores de p , resultando em uma análise sobre a influência dos parâmetros como estatisticamente não significativo, com valores de p acima do nível de significância de 0,05 para as variáveis principais. Eles destacam que a precisão na contagem de colônias em métodos de diluição seriada depende de vários fatores experimentais, como a correta preparação das diluições, a precisão na pipetagem e principalmente pela presença de pellets fúngicos, uma vez que essas estruturas são difíceis de serem rompidas. Erros nesses processos podem introduzir variabilidade significativa nos dados, afetando a confiabilidade dos resultados obtidos e, conseqüentemente, a significância do modelo estatístico.

Diante disso, buscando minimizar o erro experimental foi realizado a identificação de *outliers*, para garantir a validade dos resultados. Em nossa análise, a inspeção dos resíduos revelou um ponto que se destacou como *outliers* significativos (Figura 19). Este ponto, o T09, foi identificado como o tratamento específico no qual condições de pH e extrato de soja eram médias, porém concentração de açúcar era zero e provavelmente causaram respostas anômalas no crescimento do fungo. A remoção desses *outliers* foi justificada pela necessidade de ajustar o modelo para refletir mais precisamente as tendências gerais observadas na maioria dos tratamentos.

Figura 19 - Diferentes cálculos para identificação de outliers presentes na amostragem de 10 dias do fungo *H. thompsonii* para os diferentes testados no planejamento experimental.

Legenda (●) pontos não *outliers*, (●) *outliers* presentes na amostragem.



Fonte: o autor.

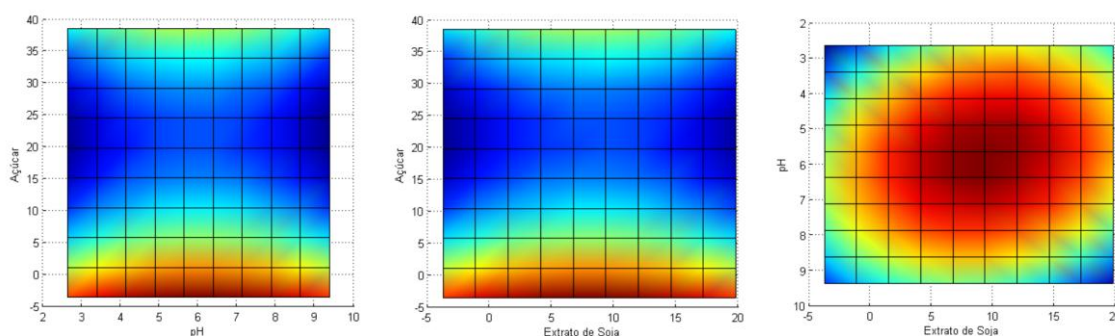
Após a remoção dos *outliers*, o modelo de regressão linear múltipla foi recalculado, resultando em uma melhoria substancial na significância dos coeficientes, sendo observado pelo valor de R^2 que ficou no valor de 0,98. A exclusão de dados atípicos pode revelar relações subjacentes que estavam obscurecidas. Em nosso caso, as variáveis quantidade de extrato de soja e pH inicial passaram a apresentar efeitos estatisticamente significativos na produção de UFC, conforme mostrado na Tabela 22. A Figura 20 ilustra a superfície de resposta resultante do modelo ajustado, destacando as condições ótimas para a maximização da produção de UFC por *H. thompsonii*.

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 ($p \leq 0,05$).

	Efeito	Erro	t	p
Açúcar(X1)	-138353,31	52804,22	-2,62	0,01931
X1²	4248,54	883,441	4,81	0,00023
Extrato de soja(X2)	358039,16	97998,25	-3,65	0,00235
X2²	-2425,85	3011,78	-0,81	0,43314
pH(X3)	1389336,39	368500,61	3,77	0,00185
X2²	-103067,49	26732,63	-3,85	0,00156
X1*X2	12816,48	3860,99	3,32	0,00009
X1*X3	-4792,08	6489,46	-0,73	0,00467
X2*X3	12816,48	94923,39	7,23	0,000003

Fonte: o autor

Figura 20 - Gráfico de superfície de resposta para produção de células viáveis em 10 dias.



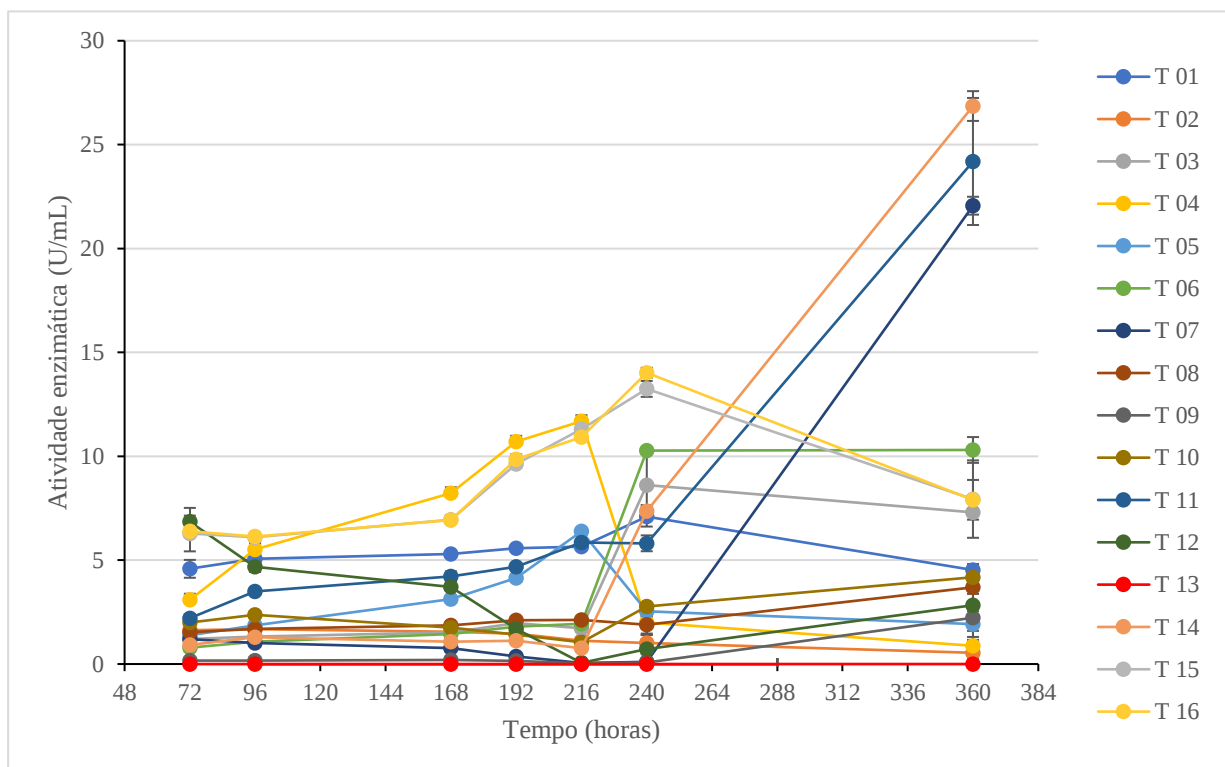
Fonte: o autor.

Assim, a remoção de *outliers* foi fundamental para ajustar o modelo estatístico e assegurar que as condições ótimas identificadas refletissem com precisão a verdadeira capacidade de produção de UFC do fungo. Os resultados deste estudo indicaram que a otimização das condições de cultivo para *H. thompsonii* resultou em uma produção significativamente aumentada de unidades formadoras de colônia (UFC). A análise revelou que as condições ideais para maximizar a produção de UFC foram um pH inicial de 6, uma concentração de extrato de soja de 10 g/L e uma quantidade de açúcar de 1 g/L. Esses parâmetros proporcionaram o ambiente mais favorável para o crescimento e multiplicação do fungo, conforme evidenciado pelos dados coletados.

5.5.2. Otimização da produção de quitinases

A produção de quitinase é uma variável crítica para a eficácia de fungos entomopatogênicos, tal como demonstrado por Leão (2011) que correlacionou a presença do gene de expressão da quitinase com a maior virulência do fungo *M. anisopliae*. Dessa forma, utilizando a metodologia de desenho experimental descrita no item anterior o objetivo foi identificar as condições ótimas para a produção de quitinase e otimizar o meio de cultivo, a fim de maximizar a atividade enzimática e, consequentemente, a eficiência do fungo como agente biocontrole. A produção de quitinase foi monitorada ao longo de 30 dias para todos os 16 tratamentos. A Figura 21 mostra a variação da atividade de quitinase ao longo do tempo, evidenciando como cada tratamento influenciou a produção de quitinase durante o período de incubação.

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 *H. thompsonii*. Microrganismo cultivado sob agitação orbital a 100 rpm à 25°C.



Fonte: o autor.

Como observado na Figura 21 a menor produção de quitinase foi observada no tratamento T13, ou seja, naquele em que o pH inicial foi ajustado para 2,56. Esse pH extremamente ácido é desfavorável para a atividade enzimática de muitos fungos filamentosos, incluindo *H. thompsonii*. Assim a atividade enzimática de quitinase é fortemente influenciada por valores extremos de pH, que afeta a conformação e a atividade da enzima. Um pH muito baixo pode desnaturar a quitinase ou alterar seu estado ativo, resultando em uma produção reduzida. Além disso, pHs ácidos podem inibir o crescimento do fungo, limitando a produção de quitinase. Isso é consistente com estudos que indicam que condições extremas de pH afetam negativamente a produção de enzimas em microrganismos filamentosos, como descrito por Escho (2017). Em contrapartida, a maior produção de quitinase foi observada primeiramente no tratamento T14 (pH inicial 10, 17,5 g/L de açúcar e 8 g/L de extrato de soja) seguido por T11 (pH inicial 6, 17,5 g/L de açúcar e 0 g/L de extrato de soja) e T07 (pH inicial 8, 30 g/L de açúcar e 15 g/L de extrato de soja).

A influência do pH no meio de cultivo é um fator determinante na atividade enzimática, especialmente na produção de quitinase. Observou-se que um pH alcalino, como no tratamento T14, favorece tanto a estabilidade quanto a atividade das enzimas. Este comportamento é suportado por estudos com outros microrganismos como observado por Qi e colaboradores (2024) utilizando *Bacillus licheniformis*, no qual descreve que um pH mais elevado resultou em uma maior produção enzimática. Isso sugere que o fungo utilizado tem preferência por ambientes alcalinos, o que pode ser explicado pela eficiência da catálise das reações enzimáticas nesses ambientes.

Quando analisamos a variável concentração de sacarose observamos que a mesma desempenha um papel crucial na produção enzimática. Nos tratamentos T14 e T07, altos níveis de açúcar forneceram a energia necessária para a biossíntese de quitinase, indicando que *H. thompsonii* pode ter uma necessidade elevada de fontes de carbono para otimizar a produção de quitinase. Além disso, a sacarose pode atuar como indutor na expressão dos genes responsáveis pela produção de quitinase, o que pode ser observado na maior produção enzimática nesses tratamentos. Estudos realizados por Gomaa (2021) indicam que a variação na concentração de açúcar pode modular a expressão enzimática, o que torna essencial a escolha adequada do tipo e quantidade de açúcar utilizado no meio de cultivo.

Por fim, ao analisar os níveis de extrato de soja no meio de cultivo observa-se que o mesmo possui pouca influência na produção de quitinase. O extrato de soja é uma fonte rica de

nutrientes, como aminoácidos e nitrogênio, que são essenciais para o crescimento celular e a produção enzimática. No entanto, a ausência de extrato de soja no tratamento T11 e sua alta eficiência sugerem que, em algumas condições, a produção de quitinase pode ser otimizada mesmo sem uma suplementação adicional de nitrogênio. Isso destaca a importância de um balanço cuidadoso entre os nutrientes fornecidos, considerando as especificidades do fungo e do ambiente de cultivo.

Esses resultados estão alinhados com achados da literatura científica, que indicam que tanto o pH quanto as fontes de carbono e nitrogênio são determinantes na produção de enzimas por fungos como *H. thompsonii*. Estudos recentes também confirmam que condições alcalinas e concentrações adequadas de açúcar podem maximizar a produção de quitinase, refletindo a adaptação do fungo às condições nutricionais e de pH (Gomma, 2021).

Após a análise temporal dos dados, realizou-se uma otimização do meio de cultura com o objetivo de maximizar a produção de quitinase pelo fungo filamentoso *H. thompsonii* para os dados obtidos em 15 dias, uma vez que foi nesse período que se encontrou os maiores valores de produção. Dessa forma, durante essa etapa, constatou-se que, entre as variáveis testadas (pH, açúcar e extrato de soja), apenas o pH apresentou um efeito significativo na produção enzimática. Este resultado é visualmente apresentado na Tabela 23, onde se observa a significância estatística das variáveis, evidenciando a predominância do pH. Estudos prévios já indicam que o pH é um fator determinante na atividade enzimática, influenciando a estabilidade estrutural e a atividade catalítica das enzimas. Além disso, o pH pode afetar a permeabilidade das membranas celulares, modulando a secreção de enzimas (Qi *et al.*, 2024).

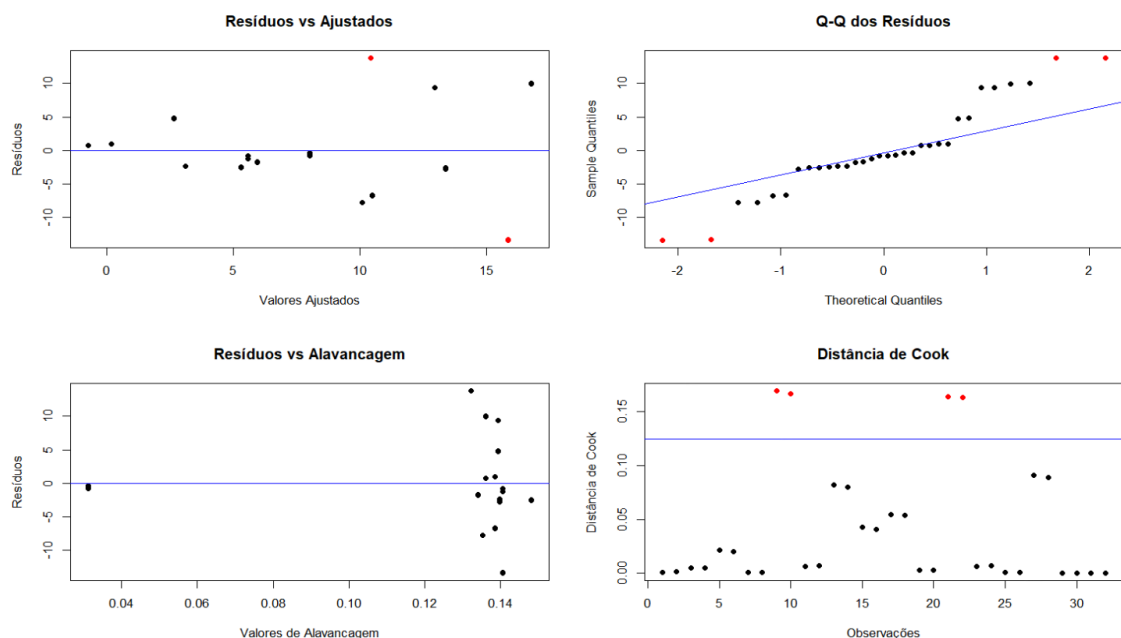
Tabela 23 - Análise estatística descritiva do desenho composto central rotacional tendo a produção de quitinase como variável resposta ($p \leq 0,05$).

	Efeito	Erro	t	p
Açúcar(X1)	-1,24	1,24	-1,00	0,3294
X1²	-2,33	1,51	-1,54	0,1375
Extrato de soja(X2)	-1,44	1,24	-1,15	0,2605
X2²	1,30	1,51	0,86	0,3975
pH(X3)	5,12	1,24	4,11	0,0005
X3²	1,27	1,51	0,84	0,4099
X1*X2	-3,71	1,63	-2,28	0,0327
X1*X3	0,05	1,63	0,03	0,9779
X2*X3	1,29	1,63	0,79	0,4353

Fonte: o autor.

Após essa otimização inicial, foi realizada uma identificação de *outliers* para garantir a precisão da análise estatística. *Outliers* são dados que se desviam significativamente dos outros pontos e podem distorcer a análise, levando a conclusões equivocadas. Além disso, o impacto dos *outliers* sobre a modelagem estatística e a consequente melhoria no ajuste do modelo pode ser observado nos gráficos de resíduos apresentados na Figura 22. A remoção desses dados foi seguida de uma reanálise dos dados, que confirmou que apenas o pH continuou a ter um efeito significativo na produção de quitinase. Além disso o valor do R^2 passou de 0,55 para 0,73 após a remoção desses valores discrepantes. Essa a reanálise dos dados sem *outliers*, detalhada na Tabela 24, destaca a relação direta entre o pH e a produção de quitinase, sugerindo que o ajuste fino do pH é mais relevante do que a modulação das concentrações de açúcar e extrato de soja. Esses achados são sustentados pela literatura científica, que documenta o papel crítico do pH na produção de enzimas em fungos filamentosos (Gomaa, 2021).

Figura 22 - Diferentes cálculos para identificação de outliers presentes na amostragem de 10 dias do fungo *H. thompsonii*. Legenda (●) pontos não *outliers*, (●) *outliers* presentes na amostragem.



Fonte: o autor.

Tabela 24 - Análise estatística descritiva do desenho composto central rotacional tendo a produção de quitinase como variável resposta após retirada dos pontos outliers ($p \leq 0,05$).

	Efeito	Erro	t	p
Açúcar(X1)	-0,10	0,52	-0,20	0,8770
X1²	0,57	0,21	2,72	0,0014
Extrato de soja(X2)	-0,43	0,88	-0,49	0,6276
X2²	-0,03	0,02	-1,52	0,1455
pH(X3)	6,09	3,41	-1,78	0,0093
X3²	-0,01	0,01	-1,46	0,1619
X1*X2	0,30	0,20	1,52	0,0147
X1*X3	0,09	0,10	0,93	0,3653
X2*X3	0,05	0,04	1,29	0,2146

Fonte: o autor.

Após essas análises, foi observado que apenas o pH apresentou um efeito significativo na produção de quitinase, enquanto as fontes de carbono (açúcar) e nitrogênio (extrato de soja) não mostraram a mesma influência. Uma das hipóteses para que isso tenha acontecido é que o pH influencia diretamente na parte bioquímica da enzima, como explicado anteriormente, enquanto fontes de carbono e nitrogênio aqui testadas não são os indutores específicos para a produção de quitinase, uma vez que o verdadeiro substrato para a indução dessa enzima é a quitina. Estudos científicos confirmam que, sem a presença de quitina ou compostos relacionados, a produção de quitinase pode ser significativamente reduzida, independentemente das concentrações de outras fontes de nutrientes. Essas hipóteses são apoiadas por vários estudos que discutem a complexa interação entre nutrientes e fatores ambientais na produção de enzimas por fungos filamentosos (Lima *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2018). Por exemplo, pesquisas com *Aspergillus* spp. demonstram que, sob certas condições, o pH pode ter uma influência mais direta sobre a produção enzimática do que as concentrações de nutrientes disponíveis, destacando a importância de entender as necessidades específicas de cada organismo em relação ao ambiente decultivo (Ghanem *et al.*, 2017; Khosravi-Darani *et al.*, 2019).

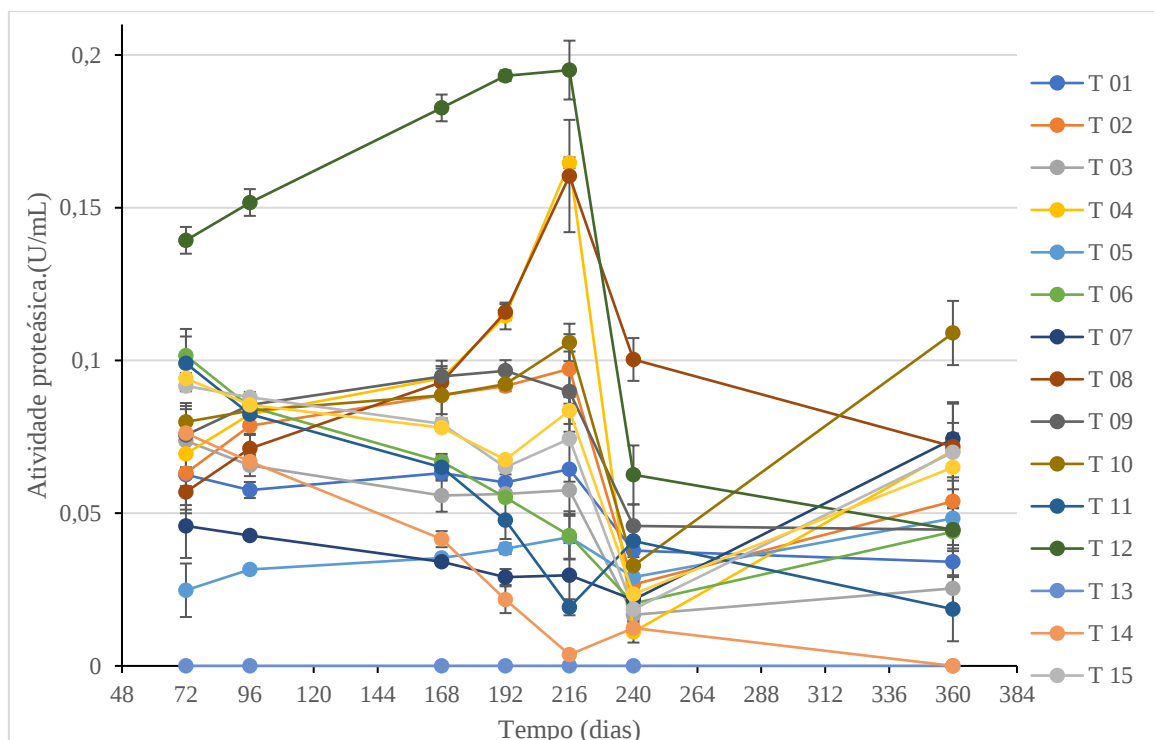
A preferência do fungo por um ambiente mais alcalino para a produção de quitinase, como observado nos melhores tratamentos (T14, T11 e T07), é consistente com a necessidade de otimização enzimática em condições específicas de pH. Entretanto, é importante ressaltar que, conforme discutido anteriormente em relação à produção de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), o fungo demonstrou uma preferência por um pH próximo de 6, indicando que diferentes processos metabólicos podem exigir condições distintas para a otimização. Sendo necessário

uma escolha estratégica para maximizar a produtividade em diferentes aspectos do cultivo, atendendo tanto às necessidades de crescimento do fungo quanto à produção de enzimas específicas.

5.5.2. Otimização da produção de proteases

Na Figura 23 podemos observar os resultados obtidos no experimento de quantificação de protease que a maior produção ocorreu em 7 dias de cultivo, revelando informações importantes sobre a influência das variáveis testadas experimentalmente na produção enzimática. Além disso, os tratamentos T12, T04 e T08 destacaram-se como os melhores em termos de produção de protease. Sendo, o tratamento T12, que continha 20 g/L de extrato de soja, 17,5 g/L de açúcar e pH inicial de 6, apresentou a maior produção de protease, indicando que uma combinação equilibrada de fontes de carbono e nitrogênio, em um pH moderado, é essencial para maximizar a produção dessa enzima.

*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 *H. thompsonii*. Microrganismo cultivado sob agitação orbital a 100 rpm à 25°C.*



Fonte: o autor.

A importância do extrato de soja como fonte de nitrogênio foi corroborada pelos resultados dos tratamentos T04 e T08. No caso de T04, com 5 g/L de açúcar, 15 g/L de extrato de soja e pH inicial de 8, observou-se que, mesmo com uma menor concentração de açúcar, a produção de protease foi significativa, sugerindo que o extrato de soja fornece aminoácidos e peptídeos essenciais para a síntese enzimática, como demonstrado por Zhang e colaboradores. (2021) e Li e colaboradores. (2018). A análise do tratamento T08, que continha 30 g/L de açúcar, 15 g/L de extrato de soja e pH inicial de 8, reforça a hipótese de que, em pH levemente alcalino, altos níveis de fontes de carbono e nitrogênio podem sinergicamente favorecer a produção de protease. Estudos indicam que a concentração de substratos no meio pode atuar como fator limitante ou promotor na síntese de protease, dependendo da disponibilidade de nitrogênio e da atividade dos sistemas regulatórios celulares (Wu *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2019).

Por outro lado, os piores resultados foram observados nos tratamentos T13, T11 e T14, onde os fatores limitantes incluíram pH extremamente ácido, ausência de fonte de nitrogênio, ou uma combinação desfavorável de variáveis. Em T13, onde o pH era 2,5, a produção de protease foi a menor produção, o que pode ser explicado pela inativação enzimática em condições ácidas extremas, um fenômeno bem documentado na literatura (Gupta *et al.*, 2017). No tratamento T11, a ausência de extrato de soja em um pH de 6 também resultou em baixa produção, sugerindo a necessidade crítica de uma fonte de nitrogênio disponível para a síntese de protease, conforme relatado por Wang e colaboradores (2022).

Na Tabela 25 podemos observar que a otimização do meio de cultura revela que as variáveis açúcar e extrato de soja tiveram efeitos significativos na produção de protease, enquanto o pH não apresentou significância. Já na Figura 24, o gráfico de superfície de resposta também ilustra como as concentrações variáveis de açúcar e extrato de soja afetam a produção de protease. Esse padrão contrasta com a produção de quitinase, onde o pH desempenhou um papel determinante, conforme evidenciado na análise estatística e na representação gráfica dos resultados. A diferença de comportamento pode ser atribuída às distintas vias metabólicas e mecanismos regulatórios envolvidos na síntese das duas enzimas.

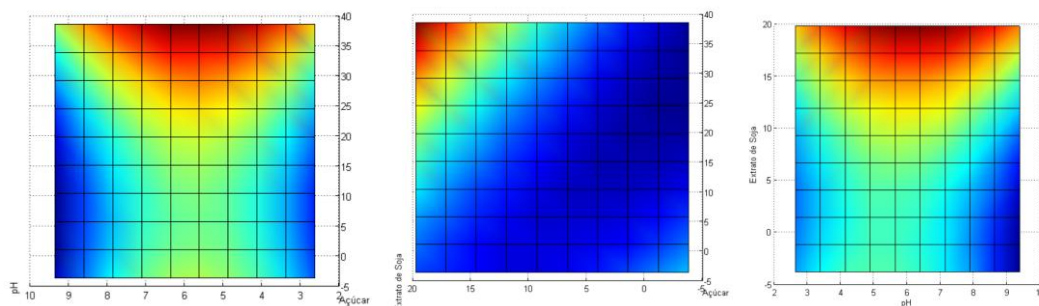
Tabela 25 - Análise estatística descritiva do desenho composto central rotacional tendo a produção de protease como variável resposta ($p \leq 0,05$).

	Efeito	Erro	t	p
Açúcar(X1)	0,02	0,01	4,07	0,0005
X1²	0,01	0,01	1,41	0,0174
Extrato de soja(X2)	0,03	0,01	6,41	0,0000
X2²	0,01	0,01	1,91	0,0069
pH(X3)	-0,01	0,01	-1,41	0,2685
X3²	-0,02	0,01	-3,66	0,0014
X1*X2	0,03	0,01	3,62	0,0015
X1*X3	0,00	0,01	-0,11	0,9104
X2*X3	0,01	0,01	1,08	0,2931

Fonte: o autor.

Figura 24 - Gráfico de superfície de resposta para produção de células proteases em 7 dias.

R^2 : 0,94.

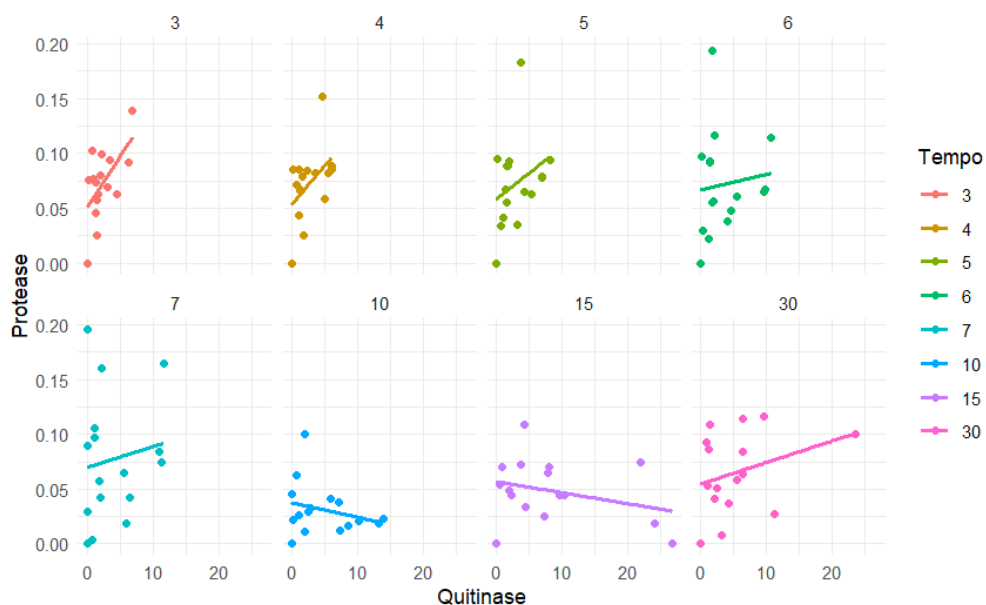


Fonte: o autor.

A partir dos dados analisados anteriormente, é possível notar que a comparação entre os níveis de protease e quitinase revela que, apesar de ambos os experimentos terem utilizado tratamentos semelhantes, as respostas enzimáticas às variáveis do meio foram distintas. A produção de quitinase, por exemplo, foi mais sensível ao pH, enquanto a produção de protease mostrou-se mais dependente das concentrações de açúcar e extrato de soja. Essas diferenças refletem as diferentes condições ótimas para a expressão gênica e a atividade das enzimas, o que é consistente com as observações feitas por Shan e colaboradores. (2020) em estudos sobre regulação enzimática em fungos filamentosos. Além disso, notavelmente, os melhores tratamentos para a produção de protease foram os piores para a produção de quitinase, e vice-versa, sugerindo uma relação inversa entre as duas enzimas, sendo observado na Figura 25 em que se mostra a interação entre a produção de quitinase e a de protease. Nos primeiros 6 dias

observamos uma alta produção de protease em contrapartida a uma baixa produção de quitinase, o que muda depois do 7 dia em que a produção de quitinase aumenta gradualmente enquanto protease diminui. Isso pode estar relacionado às condições ótimas divergentes para a expressão gênica e atividade enzimática, conforme relatado por Shan e colaboradores (2020). Esse comportamento inverso pode ser devido à competição por recursos metabólicos, onde a síntese de uma enzima pode suprimir a produção de outra dependendo das condições do meio.

Figura 25 - Interação entre a produção de protease e a produção de quitinase ao decorrer do tempo de fermentação.



Fonte: o autor.

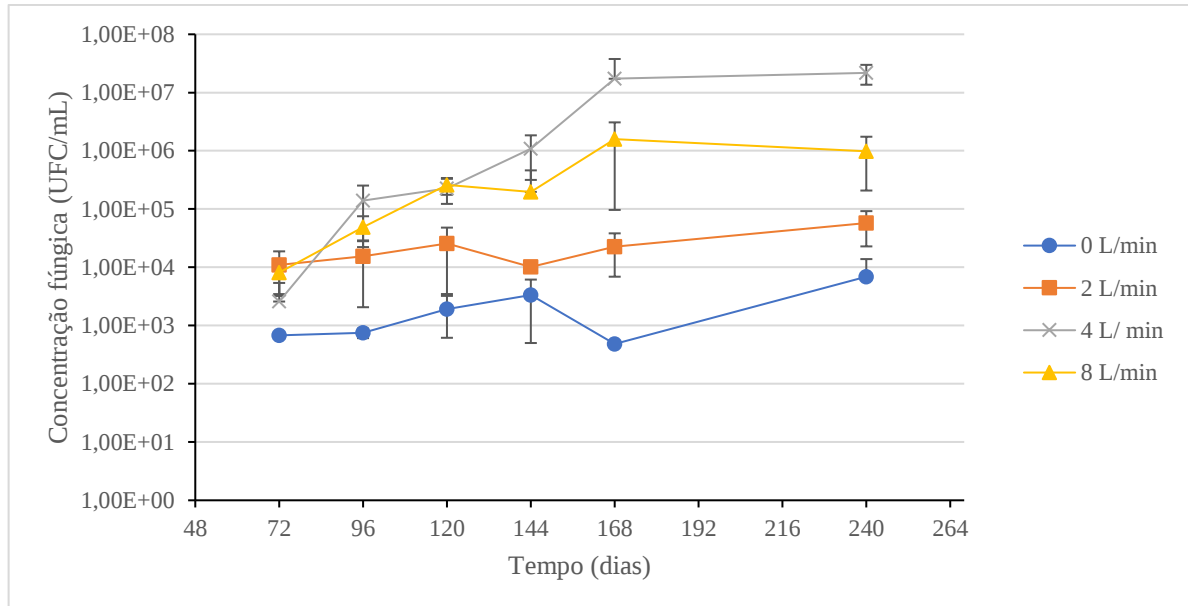
Após analisar os resultados e discutir as influências das variáveis testadas, podemos concluir que o pH do meio de cultivo desempenha um papel crucial na produção de quitinase, enquanto a quantidade de açúcar e extrato de soja influenciam a produção de protease e a produção de células é influenciada por todas as variáveis testadas após tratamento dos dados. Diante disso é necessário uma escolha estratégica para maximizar a produtividade em diferentes aspectos do cultivo, atendendo tanto às necessidades de crescimento do fungo quanto à produção de enzimas específicas. Dessa forma, visando a busca por um equilíbrio entre os diferentes aspectos o modelo nos fornece o meio de cultura contendo pH 6.0, extrato de soja na concentração de 15g/L e açúcar na de 5g/L garantindo a eficiência geral do processo de cultivo, multiplicação do fungo e produção das enzimas de interesse.

5.6. Influência da vazão de ar

A aeração desempenha um papel crucial no cultivo de fungos filamentosos, influenciando diretamente o crescimento celular, a produção de biomassa e a síntese de enzimas como a quitinase. A disponibilidade de oxigênio, garantida pela aeração, é essencial para o metabolismo aeróbico desses microrganismos, afetando processos bioquímicos fundamentais. Estudos demonstram que níveis adequados de aeração podem aumentar significativamente a produção de quitinase, uma enzima importante na degradação de quitina e utilizada em diversas aplicações industriais e agrícolas (El Enshasy, 2007; Khare, 2016). A regulação da aeração é, portanto, uma variável crítica no desenho de processos fermentativos, sendo que a insuficiência ou o excesso de oxigênio pode inibir a produção eficiente da enzima (Papagianni, 2004). Esses aspectos tornam a aeração uma variável chave no controle de processos biotecnológicos envolvendo fungos filamentosos (Finkelstein & Ball, 1992).

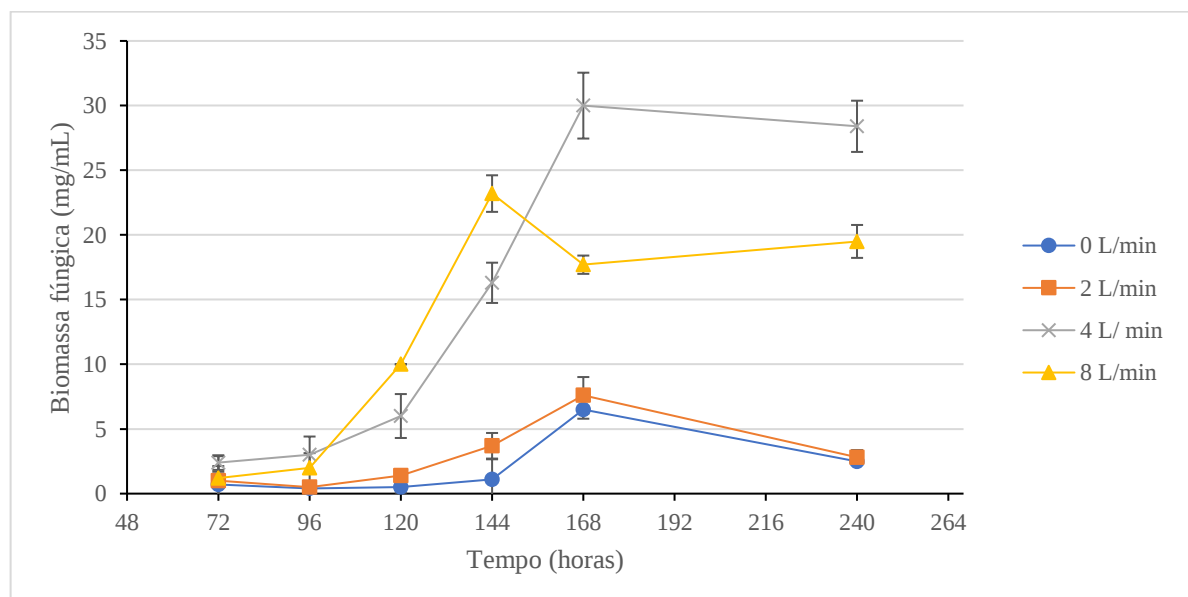
Dessa forma, para a análise da aeração foi utilizado o meio de cultura otimizado nas etapas anteriores constituído da solução de sais, extrato de soja na concentração de 15g/L e açúcar na de 5g/L e o pH inicial de 6.0. Assim, a análise dos resultados demonstrou que a aeração teve um impacto significativo no crescimento do fungo *H. thompsonii* ao longo dos 10 dias de experimento. A maior concentração de unidades formadoras de colônias (UFC), biomassa seca e produção de quitinase foram observadas na vazão de 4 L/min, destacando esta condição de aeração como a mais favorável para o desenvolvimento e a atividade metabólica do fungo (Figura 26, Figura 27 e Figura 28).

Figura 26 - Concentração de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de *H. thompsonii* 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. As barras de erro representam o desvio padrão de três réplicas experimentais.



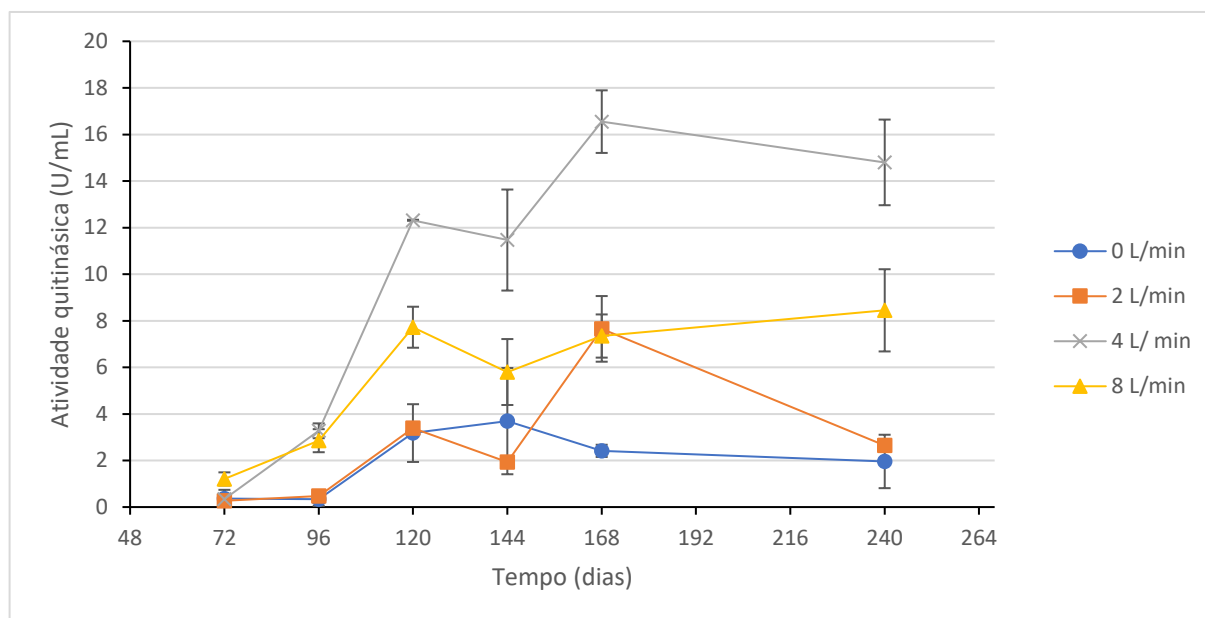
Fonte: o autor.

Figura 27 - Concentração de biomassa fúngica (mg/mL) de *H. thompsonii* 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. As barras de erro representam o desvio padrão de três réplicas experimentais.



Fonte: o autor.

Figura 28 - Concentração de quitinasas (U/mL) de *H. thompsonii* 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. As barras de erro representam o desvio padrão de três réplicas experimentais.



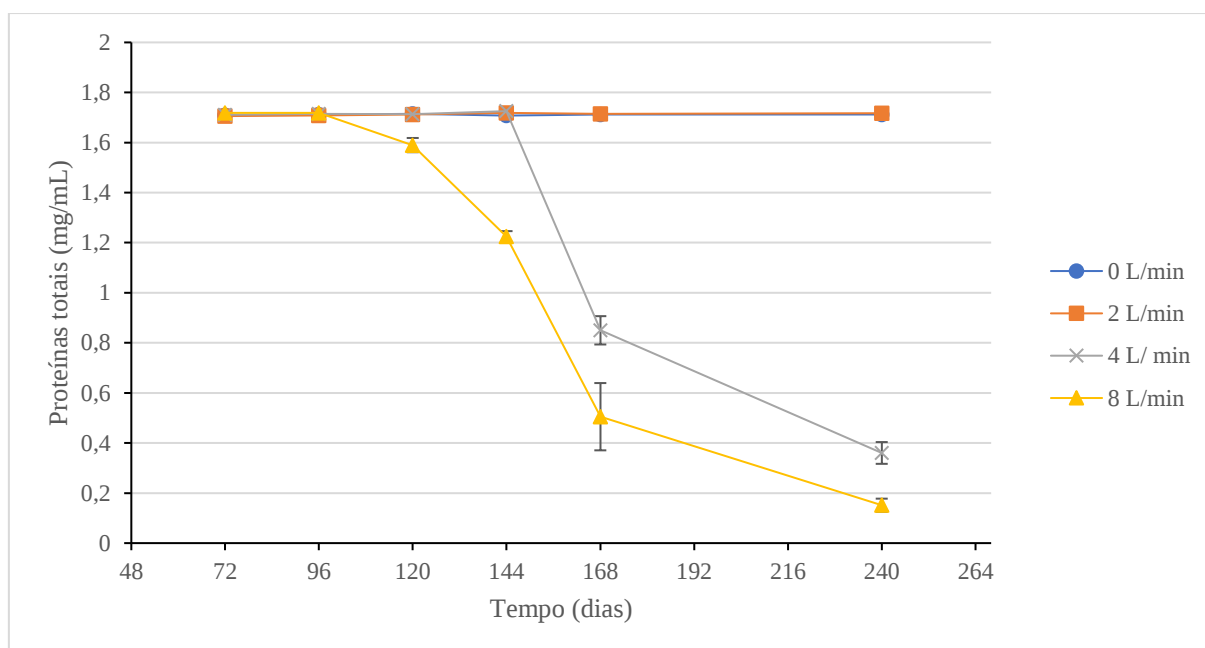
Fonte: o autor.

As Figuras 26, 27 e 28 mostram que o crescimento e a atividade do fungo foram mais pronunciados na vazão de 4 L/min em todos os pontos de coleta, particularmente a partir do 5º dia de cultivo. Essa tendência sugere que a aeração moderada proporcionou uma condição ideal para a respiração aeróbica do fungo, favorecendo tanto o crescimento celular quanto a produção de enzimas hidrolíticas, como a quitinase. Por outro lado, as menores concentrações de UFC e biomassa foram observadas nas vazões de 0 L/min e 2 L/min. A ausência de aeração (0 L/min) resultou em um crescimento limitado, conforme indicado nos gráficos temporais, possivelmente devido à menor disponibilidade de oxigênio, essencial para o metabolismo aeróbico do fungo. Similarmente, a vazão de 2 L/min, embora tenha proporcionado alguma aeração, não foi suficiente para maximizar o crescimento e a atividade enzimática, indicando que a taxa de oxigênio disponível ainda era subótima.

Quanto ao consumo de proteínas, a maior taxa foi observada na vazão de 8 L/min, seguida pela vazão de 4 L/min, conforme mostrado na Figura 29. Este resultado sugere que, sob condições de alta aeração, *H. thompsonii* pode aumentar a utilização de proteínas disponíveis no meio, possivelmente como resposta ao estresse oxidativo induzido pelo excesso de oxigênio. Estudos anteriores, como os de Ascencio. (2016) e Souza *et al.* (2015),

demonstraram que taxas elevadas de aeração podem induzir o consumo de proteínas como fonte energética alternativa em fungos filamentosos, corroborando com os achados deste estudo.

*Figura 29 - Concentração do consumo de proteínas totais de *H. thompsonii* 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. As barras de erro representam o desvio padrão de três réplicas experimentais.*



Fonte: o autor.

A produção otimizada de quitinase na vazão de 4 L/min está em concordância com a literatura que aponta que a aeração moderada favorece a expressão de enzimas hidrolíticas em fungos. Por exemplo, em um estudo conduzido por Monteiro-Júnior (2018), foi observado que fungos filamentosos isolados da caatinga apresenta maior atividade quitinolítica sob condições de aeração intermediária e possuem maior potencial de controle biológico, reforçando os resultados obtidos. Esse comportamento pode ser explicado pelo equilíbrio entre a oferta de oxigênio e a demanda metabólica do fungo, que maximiza a produção enzimática sem induzir estresse excessivo. Dessa forma, está intimamente relacionada à disponibilidade de oxigênio, sendo a atividade enzimática mais baixa em condições de baixa aeração e inibida em condições de hiperoxigenação. Esses resultados reforçam a importância da otimização da aeração para a maximização da produção de enzimas de interesse industrial em fungos filamentosos.

Por fim, os dados obtidos neste estudo fornecem insights valiosos para a produção em larga escala de enzimas e biomassa fúngica, indicando que a vazão de 4 L/min oferece uma condição ideal para o crescimento e a produção enzimática de *H. thompsonii*. Estes achados podem ser aplicados para o aprimoramento de processos biotecnológicos que visam a utilização de fungos filamentosos como agentes de controle biológico ou na produção de enzimas industriais.

5.7. Viabilidade econômica e análise de mercado

O desenvolvimento de um bioacaricida à base de *Hirsutella thompsonii* focado na produção de quitinases e proteases apresenta um grande potencial na agricultura, especialmente para o controle de ácaros-praga em culturas como citros, algodão e vegetais. O mercado de bioacaricidas está em expansão, impulsionado pela crescente demanda por soluções agrícolas sustentáveis e menos dependentes de agroquímicos sintéticos.

Bioacaricidas, como os baseados em *Hirsutella thompsonii*, oferecem uma alternativa ecologicamente correta para o controle de ácaros que afetam a produtividade agrícola. Estimativas indicam que o mercado de biopesticidas, que inclui bioacaricidas, tem uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) entre 15% e 20%, sendo um dos setores mais promissores na agricultura sustentável (Poria, 2021). Em particular, regiões produtoras de citros e soja na América Latina e Ásia têm mostrado crescente adoção de soluções biológicas, reforçando a viabilidade de produtos como esse.

Comparado aos acaricidas químicos tradicionais, o uso de bioacaricidas à base de *Hirsutella thompsonii* apresenta uma série de vantagens competitivas:

- **Baixa toxicidade:** É seguro para seres humanos, animais e organismos benéficos, como polinizadores, o que atende à crescente demanda por produtos com menor impacto ambiental (Poria, 2021).
- **Efeito residual duradouro:** Estudos indicam que *Hirsutella thompsonii* pode permanecer ativo por longos períodos no campo, criando um controle mais eficiente e de longo prazo sobre populações de ácaros (Poria, 2021).
- **Redução de resistência:** O uso contínuo de acaricidas químicos pode levar ao desenvolvimento de resistência nos ácaros, enquanto bioacaricidas apresentam menor

risco desse fenômeno, devido à complexidade biológica do mecanismo de ação (Poria, 2021).

Do ponto de vista econômico, a produção de bioacaricidas à base de microrganismos como *Hirsutella thompsonii* requer um sistema de fermentação eficiente para maximizar a produção de esporos e enzimas, como quitinases e proteases, que atuam diretamente na digestão do exoesqueleto de quitina dos ácaros (Poria, 2021). Apesar de os custos de produção inicial serem mais elevados em comparação aos pesticidas sintéticos, o uso de bioacaricidas pode ser mais economicamente viável a longo prazo, dado que:

- Os bioacaricidas podem ser aplicados em doses menores e com menor frequência, devido ao seu efeito residual mais prolongado.
- A aceitação por parte dos consumidores finais, que preferem produtos livres de resíduos químicos, aumenta a demanda e o valor agregado desses produtos no mercado.

Com a otimização de um meio de cultura, realizado por esse projeto, o qual contém como matérias-primas o açúcar, extrato de soja, KCl, MgSO₄ e Fosfato dipotássico, foi possível maximizar a produção de enzimas (quitinases e proteases), fundamentais para o controle eficaz de ácaros. Esse aprimoramento reduz os custos de produção e melhora a competitividade no mercado de acaricidas biológicos.

Ao calcular o custo de produção desse bioacaricida, os componentes do meio de cultura desempenham um papel crucial. Os principais insumos, como açúcar e extrato de soja, são relativamente acessíveis no mercado global, enquanto sais como KCl e MgSO₄, usados em pequenas quantidades, também apresentam custos baixos. Para uma análise precisa:

- **Açúcar orgânico:** Dependendo da fonte e da localização, o custo de aquisição pode variar entre 0,40 e 0,60 USD/kg (IndexMundi, 2024).
- **Extrato de soja:** Essencial para o crescimento fúngico, esse insumo custa em torno de 0,70 a 1,00 USD/kg (IndexMundi, 2024).
- **Sais inorgânicos (KCl, MgSO₄ e DKP):** Esses componentes, usados em baixas concentrações, têm preços que variam de 0,10 a 0,30 USD/kg (IndexMundi, 2024).

Com esses valores, é possível calcular o custo de produção por litro de meio de cultura. A otimização do meio garante uma produção elevada de biomassa fúngica, reduzindo o custo por

unidade do bioacaricida final. Em comparação com acaricidas químicos, que frequentemente exigem ingredientes de síntese complexos, o custo de um bioacaricida baseado em *Hirsutella thompsonii* pode ser significativamente menor.

O mercado global de biopesticidas está em expansão, com um crescimento anual composto (CAGR) estimado em 13,2%, projetando-se que atinja 9,88 bilhões de USD até 2030 (Deore, 2024). Dentro deste segmento, os bioacaricidas, como o formulado com *Hirsutella thompsonii*, são uma solução promissora devido ao aumento da demanda por práticas agrícolas sustentáveis e à crescente regulamentação contra o uso de pesticidas químicos. Além disso, o controle de ácaros é um problema recorrente em culturas de alto valor, como frutas e vegetais, onde a presença de resíduos químicos pode prejudicar a exportação. Bioacaricidas como o de *Hirsutella thompsonii* são especialmente atraentes por não deixarem resíduos tóxicos, sendo aceitos em mercados rigorosos, como a União Europeia e os Estados Unidos.

Assim, o sucesso financeiro do projeto depende de vários fatores:

- **Escalabilidade:** A produção em larga escala do bioacaricida pode ser alcançada facilmente em biorreatores com o meio de cultura otimizado. Isso garante um preço competitivo no mercado, com margens de lucro interessantes.
- **Demanda do Mercado:** Com o mercado de biopesticidas crescendo, as oportunidades para bioacaricidas estão se expandindo, particularmente em regiões que adotam práticas de agricultura orgânica e sustentável.
- **Concorrência e Posição de Mercado:** Empresas como Bayer, Syngenta e BASF já investem pesadamente no setor de biopesticidas (Deore, 2024). No entanto, o mercado de bioacaricidas ainda apresenta grandes oportunidades para novos entrantes, principalmente em mercados de nicho.

O desenvolvimento de um bioacaricida à base de *Hirsutella thompsonii* é viável tanto economicamente quanto ambientalmente. A otimização do meio de cultura contribui para a redução de custos, tornando o produto competitivo no mercado global de biopesticidas. Além disso, a crescente demanda por produtos sustentáveis na agricultura e o apoio de regulamentações para a redução de produtos químicos asseguram um futuro promissor para esse bioacaricida.

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 (*Emericela 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.; KANAVAL, 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://congressousp.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: Eriophyidae) 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.