



DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE

*Metarhizium anisopliae* (MESTSH.) SOROK

POR FERMENTAÇÃO LÍQUIDA

ISABELLA ALICE GOTTI

SÃO PAULO

2016

# **INSTITUTO BIOLÓGICO**

## **PÓS-GRADUAÇÃO**

DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE

*Metarhizium anisopliae* (MESTSH.) SOROK

POR FERMENTAÇÃO LÍQUIDA

**ISABELLA ALICE GOTTI**

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.  
Orientador: Prof. Dr. Antonio Batista Filho

**SÃO PAULO**

**2016**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo**  
**Núcleo de Informação e Documentação – IB**

---

Gotti, Isabella Alice.

Desenvolvimento de meio de cultura para produção de *Metarhizium anisopliae* (MESTSH.). Sorok. por fermentação líquida.  
/ Isabella Alice Gotti. – São Paulo, 2016.  
57 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de PósGraduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Antonio Batista Filho.

Versão do título para o inglês: Development of culture medium for *Metarhizium anisopliae* (MESTSH.) Sorok. in liquid fermentation.

1. Blastosporos 2. Cultivo submerso 3. Custos de produção 4. Fungos entomopatogênicos I. Gotti, Isabella Alice II. Batista Filho, Antonio III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título

*IB/Bibl./2016/011*

---



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
**INSTITUTO BIOLÓGICO**

**Pós-Graduação**  
Av. Cons. Rodrigues Alves 1252  
CEP 04014-002 - São Paulo - SP  
secretariapg@biologico.sp.gov.br



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Isabella Alice Gotti**

**Título: Desenvolvimento de meio de cultura para produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. por fermentação líquida**

**Orientador(a): Dr. Antonio Batista Filho.**

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.  
Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

\*Prof. (a) Dr.(a): **Antonio Batista Filho**

\*Instituição: **Instituto Biológico**

Assinatura:

\*Prof. (a) Dr.(a): **Luis Garrigós Leite**

\*Instituição: **Instituto Biológico**

Assinatura:

\*Prof. (a) Dr.(a): **Dinalva Mochi**

\*Instituição: **UNESP Jaboticabal**

*Aos meus pais, Juan Gotti e Elza Helena Pereira Gotti,*

*Pelo carinho e amor em nossa querida família.*

*Por serem eternos exemplos de caráter e garra a serem seguidos.*

*Pela dedicação e rigidez em minha formação pessoal e profissional.*

*Por sempre incentivarem e apoiarem meus sonhos.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Ao querido orientador, **Dr. Antônio Batista Filho**, pela oportunidade e confiança; pelo acolhimento no Instituto Biológico de São Paulo, bem como no Centro Experimental Central em Campinas; pela sua orientação na pós-graduação e principalmente, pelo incentivo, dedicação, exemplo e colaboração em meu enriquecimento profissional.

Ao **Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida**, pela calma e serenidade que transmite a todos que o cercam; pela orientação e disponibilidade no Laboratório de Controle Biológico desde o meu primeiro contato com o controle microbiano de insetos no ano de 2007 e pela sua paciência em minhas mais variadas dúvidas.

À empresa **BioSoja** pela liberdade de trabalho e bolsa de estudos concedida e aos **seus colaboradores** pela experiência proporcionada, pelo apoio em meus ensaios e pela paciência com minhas interferências em suas rotinas.

Aos meus pais, **Ivan e Elza**, pela confiança e apoio incondicional em todas as minhas decisões, proporcionando sempre com que eu pudesse viabilizar e concretizar todos os meus sonhos.

Ao meu irmão, **Ivan Jr**, pela presença, apoio, conselhos e exemplo pessoal e profissional sempre muito válidos, além da influência para o meu bom gosto musical, que foi imprescindível para os momentos de tensão nessa trajetória.

Ao amado e atencioso namorado, **José Augusto**, pela dedicação e apoio incondicional, além de ter trabalhado comigo tantas noites e finais de semana para que não me sentisse sozinha.

Aos **amigos do CEIB**, pelo companheirismo, ajuda na montagem e avaliação dos ensaios e pelos almoços sempre divertidíssimos e calóricos.

Aos **amigos da Kroton Educacional**, por me fazerem acreditar na educação para um mundo melhor; pelo exemplo profissional de perseverança e resiliência e por compartilhar comigo tantos sonhos e anseios.

Vocês são demais!

*Do what you love  
Love what you do*

GOTTI, I.A. DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* (MESTSH.) SOROK. POR FERMENTAÇÃO LÍQUIDA. São Paulo. 2016. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

## RESUMO

A produção de *Metarhizium anisopliae* vem crescendo nos últimos anos, pois é o fungo entomopatogênico mais utilizado em São Paulo para controle da cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* devido ao aumento dos danos causados por esta praga. Este fungo é atualmente produzido em meio sólido utilizando-se arroz pré-cozido como substrato, entretanto é necessário o aprimoramento das técnicas vigentes e o desenvolvimento de novos processos que permitam melhora na qualidade, aumento de seu potencial de controle além da relação custo-benefício dos produtos microbianos. Esta pesquisa teve como objetivo desenvolver um novo meio de cultura para a produção do fungo *M. anisopliae* em fermentação líquida, avaliando a eficiência desta produção e a patogenicidade do fungo produzido em meios de cultura complexos comparados à produção convencional em meio sólido com arroz, inclusive quando se trata de custo-benefício de uma metodologia em relação à outra. O isolado IBCB 425 do fungo foi inoculado inicialmente em meios de cultura contendo fontes de Nitrogênio, Carbono e Sais durante oito dias, avaliando-se cada 48 horas o pH, a concentração de blastosporos e o peso da biomassa. Após as avaliações, as melhores fontes foram selecionadas para inoculação em um meio complexo. O desenvolvimento do fungo foi acompanhado durante 14 dias, também com avaliação dos mesmos parâmetros anteriores, a cada 48 horas. Os dados foram tabelados e a curva de crescimento no meio complexo foi traçada. Os meios contendo Levedo de Cerveja, Albumina, Glicose de Milho, Sacarose, NaNO<sub>3</sub> e KCl se destacaram para produção em fontes isoladas. O meio de cultura complexo contendo Albumina, Sacarose, NaNO<sub>3</sub> e KCl foi eficiente para o desenvolvimento de *M. anisopliae* e não interferiu em sua patogenicidade. O Custo operacional e preço de venda do fungo produzido por fermentação líquida foi superior em relação ao fungo produzido pelo método convencional em meio sólido, entretanto a margem de compensação justifica o investimento nesta metodologia de produção. Os resultados apresentados permitem concluir que o fungo se desenvolve em diferentes meios de cultura líquidos e o projeto de implantação de biofábrica e a produção de *M. anisopliae* por fermentação líquida é economicamente viável e vantajosa em relação à produção convencional em arroz.

Palavras-chave: Blastosporos, cultivo submerso, custos de produção, fungos entomopatogênicos



GOTTI, I.A. DEVELOPMENT OF CULTURE MEDIUM FOR *Metarhizium anisopliae* (MESTSH.) SOROK. IN LIQUID FERMENTATION. São Paulo. 2016. Dissertation (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

### ABSTRACT

The production of *Metarhizium anisopliae* has grown in recent years. It is the entomopathogenic fungus most commonly used in São Paulo to control leafhopper root of sugarcane *Mahanarva fimbriolata*, because of the damage caused by this pest. This fungus is currently produced in solid medium using pre-cooked rice as a substrate, however it is necessary to improve the existing techniques and the development of new processes that enable improved quality, increased their control potential beyond the cost-benefit ratio microbial products. This research aimed to develop a new culture medium for the production of the fungus *M. anisopliae* in liquid fermentation, evaluating the efficiency of production in complex culture media compared to conventional production on solid medium with rice, even when it comes to cost- benefit of a methodology in relation to each other. The isolated IBCB 425 was initially inoculated in culture medium containing sources of nitrogen, carbon and salts for eight days, evaluating every 48 hours the pH, the concentration of blastospores and weight of the biomass. After the evaluations, the best sources were selected for inoculation in a complex medium. The development of the fungus was monitored for 14 days, also with evaluation of the same previous parameters, every 48 hours. The data were tabulated and the growth curve was drawn from complex media. Means containing Beer Yeast, Albumin, Corn Glucose, Sucrose, NaNO<sub>3</sub> and KCl stood out for production in isolated sources. The complex culture medium containing Albumin, Sucrose, NaNO<sub>3</sub> and KCl was efficient for the development of *M. anisopliae* and not interfered with its pathogenicity. Operating cost and selling price of the fungus produced by liquid fermentation was higher than the fungus produced by the conventional method in solid medium, however the compensation margin justifies the investment in this production methodology. The results allow the conclusion that the fungus develops in different liquid culture media and biofactory deployment design, production of *M. anisopliae* by liquid fermentation is economically feasible, and advantageous compared to conventional rice production.

Keywords: Blastospores, entomopatogenic fungus, production cost, submerged cultivation

**LISTA DE FIGURAS:**

- Figura 1.** Frascos erlenmeyers em agitação. Fonte: Arquivo pessoal Isabella Gotti..... 18
- Figura 2.** Diferentes metodologias de produção de *Metarhizium anisopliae*. (A) Fermentação líquida em garrafões. (B) Método convencional em meio de cultura sólido. Fonte: Arquivo pessoal Isabella Gotti..... 21
- Figura 3.** Avaliações de produção: A; concentração de blastosporos observado em microscópico (aumento 400x). B; medição de pH em potenciômetro. C; pesagem da biomassa. Fonte: Arquivo pessoal Isabella Gotti ..... 23
- Figura 4.** Teste de patogenicidade: Aplicação dos tratamentos em Torre de Potter. .... 25
- Figura 5.** Média de pH por tratamento ao 8º dia de desenvolvimento de *Metarhizium anisopliae*..... 35
- Figura 6.** Curva de crescimento do fungo *Metarhizium anisopliae* submetido à fermentação líquida em Meio de Cultura complexo a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  e UR de  $70 \pm 5\%$ , por 14 dias. .... 42
- Figura 7.** Teste de Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae*, produzido por fermentação líquida e meio sólido, a lagartas de *Galleria mellonella*. A; lagartas mortas após infecção por blastosporos provenientes de fermentação líquida. B; lagartas mortas após infecção por conídios provenientes de produção em meio sólido. C; lagartas vivas (testemunha). Fonte: Arquivo pessoal Isabella Gotti..... 45

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Quantificação de substratos fontes de nitrogênio, carbono e sais por ensaio realizado para a produção de *Metarhizium anisopliae* por fermentação líquida..... 17
- Tabela 2.** Maquinário/equipamentos e utensílios considerados no investimento fixo, e seus respectivos valores para instalação de Biofábrica para produção de fungos entomopatogênicos em meios sólido e líquido..... 27
- Tabela 3.** Tipos de investimentos para a produção de fungos entomopatogênicos e os respectivos índices considerados no cálculo das depreciações dos mesmos..... 28
- Tabela 4.** Equipamentos e utilitários empregados na produção de fungos tanto pelo processo em meio sólido, quanto pelo processo em fermentação líquida e índices considerados no cálculo das depreciações dos mesmos. .... 29
- Tabela 5.** Despesas fixas mensais para a produção de fungos entomopatogênicos pelo processo em meio sólido..... 30
- Tabela 6.** Despesas fixas mensais para a produção de fungos entomopatogênicos pelo processo proposto em fermentação líquida ..... 30
- Tabela 7.** Mão-de-obra contratada para a produção de fungos entomopatogênicos pelo processo em meio sólido: Piso salarial e encargos considerados para cada categoria..... 31
- Tabela 8.** Mão-de-obra contratada para a produção de fungos entomopatogênicos pelo processo proposto em fermentação líquida: Piso salarial e encargos considerados para cada categoria. .... 31
- Tabela 9.** Detalhamento das despesas com comercialização (%). .... 33
- Tabela 10.** Concentração de blastosporos e corpos hifais ( $\times 10^7$ ) de *Metarhizium anisopliae* produzido em fermentação líquida sob fontes de nitrogênio a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  e UR de  $70 \pm 5\%$  ... 36
- Tabela 11.** Peso da biomassa de *Metarhizium anisopliae* produzido em fermentação líquida sob fontes de nitrogênio a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  e UR de  $70 \pm 5\%$ ..... 37
- Tabela 12.** Concentração de blastosporos de corpos hifais ( $\times 10^7$ ) de *Metarhizium anisopliae* produzido em fermentação líquida sob fontes de carbono a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  e UR de  $70 \pm 5\%$  ..... 38

<b>Tabela 13.</b> Peso da biomassa de <i>Metarhizium anisopliae</i> produzido em fermentação líquida sob fontes de carbono a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR de $70 \pm 5\%$ .....	38
<b>Tabela 14.</b> Concentração de blastosporos de corpos hifais ( $\times 10^7$ ) de <i>Metarhizium anisopliae</i> produzido em fermentação líquida sob fontes de carbono - dissacarídeos a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR de $70 \pm 5\%$ .....	40
<b>Tabela 15.</b> Peso da biomassa (g) de <i>Metarhizium anisopliae</i> produzido em fermentação líquida sob fontes de carbono - polímeros a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR de $70 \pm 5\%$ .....	40
<b>Tabela 16.</b> Concentração de blastosporos e corpos hifais ( $\times 10^7$ ) de <i>Metarhizium anisopliae</i> produzido em fermentação líquida sob fontes de Sais a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR de $70 \pm 5\%$ .....	41
<b>Tabela 17.</b> Peso da biomassa de <i>Metarhizium anisopliae</i> produzido em fermentação líquida sob fontes de Sais a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR de $70 \pm 5\%$ .....	41
<b>Tabela 18.</b> Mortalidade média de lagartas de <i>Galleria mellonella</i> após serem tratadas com <i>Metarhizium anisopliae</i> produzido por fermentação líquida e meio sólido.....	44
<b>Tabela 19.</b> Custo de aquisição de materiais diretos, utilizados para a produção de 1kg de produto acabado, pelo processo em meio sólido.....	46
<b>Tabela 20.</b> Custo de aquisição de materiais diretos, utilizados para a produção de 1L de produto acabado, pelo processo em fermentação líquida.....	46
<b>Tabela 21.</b> Preço de venda para os produtos fabricados.....	48
<b>Tabela 22.</b> Margem de contribuição para <i>Metarhizium anisopliae</i> produzido pelas diferentes metodologias.....	49

## SUMÁRIO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	X
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1 Impacto dos insetos-praga para as culturas comerciais .....	4
2.2 Fungos entomopatogênicos .....	5
2.3 <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	7
2.4 Produção de fungos entomopatogênicos.....	8
2.5 Produção de fungos entomopatogênicos em meio sólido .....	10
2.6 Produção de fungos entomopatogênicos em meio líquido.....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	15
3.1 Isolado e inóculo .....	15
3.2 Meios de cultura .....	15
3.2.1 Produção em fontes de nitrogênio – Proteínas .....	18
3.2.2 Produção em fontes de carbono –Dissacarídeos .....	18
3.2.3 Produção em fontes de carbono - Polímeros.....	19
3.2.4 Produção em fontes de sais .....	19
3.2.5 Produção em meio complexo .....	20
3.2.6 Produção em meio sólido .....	20
3.3 Parâmetros de análise para produção do fungo .....	22
3.3.1 Análise de pH.....	22
3.3.2 Análise de Concentração de blastosporos.....	22
3.3.3 Análise do peso da biomassa.....	22
3.4 Patogenicidade.....	23
3.5 Delineamento experimental e análise estatística .....	25
3.6 Análise de custos de produção.....	25
3.6.1 Investimento fixo .....	26
3.6.2 Depreciação .....	28
3.6.3 Despesas fixas .....	30
3.6.4 Mão-de-obra.....	31
3.6.5 Custo de aquisição de materiais diretos .....	32
3.6.6 Custo operacional .....	32
3.6.7 Preço de venda .....	32
3.6.8 Margem de Contribuição .....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
4.1 pH. ....	35
4.2 Produção em fontes de Nitrogênio – Proteínas .....	36
4.3 Produção em fontes de Carbono – Dissacarídeos.....	37
4.4 Produção em fontes Carbono – Polímeros .....	39
4.5 Produção em fontes de Sais.....	40

4.6	Produção em Meio de Cultura Complexo .....	42
4.7	Produção em meio sólido .....	43
4.8	Patogenicidade.....	43
4.9	Análise de custos da produção por meio sólido e/ou fermentação líquida .....	45
4.9.1	Custo de aquisição de materiais diretos .....	45
4.9.2	Custo operacional .....	47
4.9.3	Preço de venda .....	48
4.9.4	Margem de Contribuição .....	48
5	ANÁLISE DE VIABILIDADE ECONÔMICA.....	50
6	CONCLUSÃO.....	51
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

## 1 INTRODUÇÃO

Os fungos entomopatogênicos, causadores de doenças em insetos e ácaros, são os principais agentes etiológicos de doenças em insetos-praga das plantas cultivadas, com mais de 700 espécies descritas em todo mundo (ALVES, 1986). Contudo, poucas têm sido estudadas e desenvolvidas para uso como produtos de controle de insetos-pragas. Destas, *Metarhizium* spp., *Beauveria* spp., *Lecanicillium* spp. e *Isaria* spp. são os gêneros mais pesquisados.

Esses fungos podem ser desenvolvidos como produtos microbianos usando-se alguns dos diferentes estágios de seu ciclo de desenvolvimento, tais como conídios, blastósporos e micélio. Com exceção do conídio, as demais estruturas são produzidas de forma submersa, utilizando-se meios de cultura líquidos. Desse modo, a produção (em meio sólido ou líquido) e formulação (pós, grânulos, óleos emulsionáveis entre outros) desses entomopatógenos devem ser feitas de forma adequada à bioecologia das pragas-alvo e às características da cultura e do agroecossistema em que são utilizados (BATISTA FILHO et al., 1998).

Geralmente, quanto maior sua capacidade de reduzir a população de uma praga no campo, maior é a sua especificidade ao hospedeiro e maior é a dificuldade de cultivo “in vitro” e formulação desse organismo (LEITE et al., 1992). Isso dificulta o desenvolvimento de bioinseticidas, pois as técnicas de produção e formulação dificilmente possibilitam a obtenção do patógeno com qualidade e quantidade demandadas para controle da praga.

É importante destacar que os danos causados por insetos às culturas são variáveis, podendo ser observados em todos os órgãos vegetais (GALLO et al., 2002). Ainda segundo Gallo et al. (2002), espécie, densidade populacional da praga e estágio de desenvolvimento da estrutura vegetal são fatores importantes para se parametrizar maior ou menor prejuízo quantitativo e qualitativo destes às plantas.

Em se tratando de programas de controle para a cigarrinha da raiz da cana (*Mahanarva fimbriolata*), a pesquisa e o desenvolvimento do controle biológico com o fungo *Metarhizium anisopliae* (Mestsh.) Sorok são de grande importância para a economia do setor, uma vez que o custo deste método de controle é mais baixo do que o controle químico. Outro fator importante é que por meio de programas de controle biológico, novas empresas e laboratórios de usinas têm surgido para aumentar a oferta de bioinseticida no mercado, estimulando o uso do fungo. Há ainda o ganho para o meio ambiente, já que o produto a base do fungo não é tóxico para a fauna e a flora, bem como para o homem (ALMEIDA, 2003).

*M. anisopliae* vem sendo utilizado no Brasil na forma de conídios aplicados como suspensões aquosas com os mesmos equipamentos empregados para produtos químicos ou com pequenas adaptações. Devido à simplicidade da produção deste patógeno em arroz pré-cozido (ALVES, 1998), esse método passou a ser amplamente utilizado no Brasil e também em diversos países da América Latina, África e Austrália (JENKINS et al., 1998).

Segundo Alves e Pereira (1998), o uso de meios sólidos representa a forma mais comum de produção de fungos entomopatogênicos, por não necessitar de tecnologia aprimorada e permitir a produção direta de unidades infectivas. A utilização deste tipo de meio de cultura é uma das grandes vantagens da maioria dos fungos em relação a outros entomopatógenos obrigatórios, como vírus e protozoários, além da obtenção econômica de grandes quantidades de propágulos em tempos relativamente curtos (ALVES, 1998).

Neste método de produção, o crescimento e a conidiogênese do fungo ocorrem sobre o substrato solidificado, sendo que uma produção em pequena escala pode ser feita sobre ágar ou outro agente solidificante (MOINO Jr., 2000). No entanto, para uma produção em grande escala a utilização desses meios de cultura torna-se inviável devido ao elevado custo. Assim, para a produção de conídios em larga escala, têm sido utilizados produtos vegetais de baixo custo, especialmente grãos de arroz (LEITE et al., 2003).

Apesar do crescimento de áreas aplicadas e da popularização do uso de bioinseticidas, a produção de fungos entomopatogênicos está entre as etapas que ainda necessitam de estudos, especialmente aqueles que envolvem a produção em meio líquido. O aprimoramento das técnicas vigentes e o desenvolvimento de novos processos produtivos permitirá melhorar a qualidade, aumentando seu potencial de controle de insetos-praga e também a relação custo-benefício dos produtos microbianos. Além disso, a otimização de técnicas de produção de fungos entomopatogênicos deve tornar possível o desenvolvimento de novas formulações microbianas no Brasil, que sejam de produção e aplicação em campo simplificadas.

Diversos pesquisadores têm procurado outros meios sólidos que sejam mais viáveis economicamente e mais produtivos bem como meios líquidos onde o fungo se desenvolva em um tempo menor e com melhor qualidade. Muitos outros trabalhos vêm sendo desenvolvidos nesta área, principalmente em relação à composição do meio líquido. Entretanto ainda são poucos os resultados conclusivos em relação a estes meios para o desenvolvimento de *M. anisopliae* (PEREIRA E EIRA, 1999; OTTATI-DE LIMA, 2007; QIU et al., 2012; KAMPEN, 2014).



Dado o contexto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um novo meio de cultura para a produção do fungo *M. anisopliae* em fermentação líquida, avaliando a eficiência desta produção em meios de cultura complexos comparados à produção convencional em meio sólido com arroz, inclusive quando se trata de custo-benefício de uma metodologia em relação à outra.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Impacto dos insetos-praga para as culturas comerciais

Segundo Gallo et al. (2002) os insetos podem ser considerados nossos mais sérios competidores pela hegemonia do planeta, entretanto o foco principal de nossas preocupações deve ser o impacto negativo dos mesmos como pragas em culturas. Neste sentido, para o controle destas pragas é preciso que exista uma razão de ordem econômica (NAKANO, 2011), que seria, por exemplo, prejuízo financeiro pela redução da produtividade da cultura.

No caso da cigarrinha da raiz da cana (*Mahanarva fimbriolata*), esta passou a adotar a condição de praga com a mudança do sistema de produção da cana-de-açúcar, quando a colheita passou de cana queimada para cana mecanizada em todo país (VEIGA FILHO, 1998). Nesta época, levantamentos realizados no Brasil indicaram que as pragas em geral poderiam ser responsáveis por perdas de 2,2 bilhões de dólares para as principais culturas brasileiras (BENTO, 1999).

Dinardo-Miranda (2003) estudou as perdas causadas pela cigarrinha da raiz na cana de açúcar e relatou que o dano causado pode chegar a 40% de perda de produtividade no campo, pois cada inseto encontrado por metro de sulco seria responsável pela redução de 0,7 t ATR/ha. Dados como estes enfatizam a necessidade de melhoria no manejo e controle da praga.

Para Zanetti (2006) do ponto de vista do Manejo Integrado de pragas (MIP), os insetos fitófagos, como a cigarrinha, ao se alimentarem de uma planta cultivada, provocam nela uma injúria decorrente de sua ação. O vegetal injuriado perde produção, que pode ser caracterizada Dano Econômico (DE). Este, é definido como qualquer perda econômica decorrente de uma injúria (ZANETTI, 2006)

Uma produção agrícola só será máxima quando a população da praga estiver sob controle. Segundo Nakano (2011), para obter esses resultados, é necessário investir em recursos que reduzam a densidade populacional destes insetos. Quanto maior o investimento em controle de pragas, menor é a população da mesma e maior será a produção da cultura.

Para Nakano (2011), para garantir a produção necessária aos diversos segmentos da sociedade, torna-se imprescindível o controle eficiente das pragas com os olhos voltados para a natureza. Neste sentido, o controle biológico, pode ser considerado, como um componente de programas inter e multidisciplinares de Manejo Integrado de pragas (MIP), ao lado de outras medidas de controle de insetos (GALLO et al., 2002)

Comparando-se os métodos de controle biológico e químico para a cultura da Cana de açúcar, espera-se que ambos mantenham a mesma produtividade da cana em toneladas por hectare. No entanto, os custos e os sistemas de manejo são bem diferentes um do outro, resultando em retornos distintos (FRONZAGLIA, 2006).

Neste sentido, segundo Nakano (2011) a preocupação da Entomologia Econômica é exatamente essa, a de analisar cada caso e cada situação, procurando estabelecer recomendações que permitam tirar o máximo de proveito de um bioagroecossistema.

Assim, quando for preciso executar medidas de controle de pragas, uma série de conhecimentos é desejável para saber quando e onde aplicar os defensivos, com um mínimo de efeitos negativos (NAKANO, 2011)

## **2.2 Fungos entomopatogênicos**

Segundo Alves (1998), há cerca de 70 anos surgiu a patologia de insetos como principal meta do controle microbiano. Este tipo de controle, por sua vez, vem ganhando cada vez mais importância por visar a manutenção da população de pragas abaixo do nível de dano econômico além de sua comprovada eficiência, custo e menor risco ambiental.

Alves (1998) afirmou ainda que aproximadamente 80% das doenças de insetos conhecidas tinham como agente etiológico os fungos. De acordo com Almeida & Batista Filho (2006), este fato se deve principalmente às características de ação desses patógenos, uma vez que atuam por contato e ingestão, estão presentes em grande quantidade na natureza, sendo o solo o seu maior reservatório, e por serem mais difícil dos insetos tornarem-se resistentes pela sua grande variabilidade genética.

As diferentes estruturas do fungo a serem utilizadas no controle de pragas e suas funções no ciclo natural do patógeno são os conídios, blastosporos, micélio ou esporos de resistência (LEITE et al., 2003). Segundo Leite et al. (2003), os conídios, possuem a função de reprodução e de disseminação no ambiente; os blastosporos possuem função de disseminação na hemolinfa do hospedeiro; o micélio, por sua vez irá migrar para fora do hospedeiro e permitir a conidiogênese do fungo e os esporos de resistência, por fim, irão também permitir a sobrevivência do fungo no solo.

Grande parte dos fungos mitospóricos pertencentes à classe-forma Hifomicetes pode ser utilizada na forma de conídios, blastosporos e micélio, sendo as duas primeiras formas geralmente preferidas uma vez que ambas são infectivas ao hospedeiro. A

escolha da forma a ser utilizada do fungo vai depender da espécie e isolado do patógeno, da dificuldade na sua produção, do ambiente onde será aplicado e do método de aplicação (LEITE et al., 2003a; ALMEIDA & BATISTA FILHO, 2006).

De acordo com Almeida & Batista Filho (2006), o ciclo das relações fungo-hospedeiro depende de condições ambientais como temperatura, luz, umidade, radiação solar, condições nutricionais e suscetibilidade do hospedeiro. Segundo Vega & Kaya (2012), este ciclo pode ser dividido nas fases de adesão à cutícula, germinação do esporo, penetração na cutícula e resposta do inseto à infecção.

Ainda segundo Vega & Kaya, em um modelo genérico para o processo de infecção dos fungos entomopatogênicos, o conídio adere à cutícula do inseto, onde germina formando o tubo germinativo e o apressório. A hifa de penetração rompe a cutícula rumo a hemocele onde os blastosporos ou corpos hifais são formados. O crescimento do fungo continua pela hemocele do inseto, invadindo órgãos, rompendo processos metabólicos e possibilitando a produção de metabólitos tóxicos, causando a morte do inseto.

Evidências obtidas por microscopia eletrônica e histoquímica sugerem que a etapa de penetração ocorre por uma combinação de degradação enzimática e pressão mecânica. Enzimas, como proteases, lípases e quitinases, facilitam a penetração mecânica do fungo e o metabolismo do tubo germinativo. Na área de procutícula, ao redor do local de penetração, aparecem sintomas de histólise (decomposição do tecido por ação enzimática). Algumas enzimas podem estar correlacionadas com a agressividade de certos fungos para determinados hospedeiros, porém, a morte do inseto é ocasionada por uma série de eventos (ALVES, 1998).

A morte do inseto ocorre em média oito dias após o a inoculação dos fungos, por causa da produção de micotoxinas, mudanças patológicas na hemocele, ação histolítica, bloqueio do aparelho digestivo, em razão do crescimento vegetativo e de outros danos físicos, em decorrência do crescimento do micélio e do início do processo de esporulação do fungo e rápida disseminação pelo vento (ALVES, 1998)

Almeida & Batista Filho (2006), descreveram que os sintomas de insetos doentes com fungos são: manchas escuras pelo corpo, paralisação da alimentação, paralisia geral, perda de coordenação de movimentos. Posteriormente o tegumento torna-se róseo, para depois assumir coloração esbranquiçada, devido crescimento do micélio e a partir da esporulação o inseto assume a coloração da espécie do fungo. Todas essas fases ocorrem entre 4 e 10 dias, dependendo do hospedeiro e da espécie do fungo.

O maior exemplo de uso de fungos entomopatogênicos para controle de pragas é o uso de *M. anisopliae* no Brasil, para o controle de diferentes espécies de cigarrinhas em cana-de-açúcar e pastagens (VEGA & KAYA, 2012). Entretanto é importante lembrar

que este desenvolvimento não aconteceu sozinho, mas sim é resultado de um trabalho árduo de cientistas do mundo todo que estudam doenças em insetos (VEIGA & KAYA, 2012).

### **2.3 *Metarhizium anisopliae***

O primeiro estudo de controle microbiano utilizando um fungo entomopatogênico foi realizado por meio do pesquisador russo Ilya Mestchnikoff, que juntamente com Krassiltschic aplicou *M. anisopliae* sobre *Cleonus puctventris*, praga da beterraba. (LATCH, 1965).

O fungo *M. anisopliae* é, sem dúvida, é um dos fungos mais estudados em programas de manejo de pragas, uma vez que representa grande potencialidade como entomopatógeno (DESTÉFANO, 2003; ONOFRE et al., 2002). Esse fungo apresenta patogenicidade para mais de 204 espécies de insetos pertencentes a 43 famílias dentre as ordens Orthoptera, Dermaptera, Hemiptera, Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Coleoptera, Homoptera e outras (DESTÉFANO, 2003).

Este fungo encontra-se distribuído de forma ampla na natureza, sendo encontrado nos solos sobrevivendo por longos períodos. Vega & Kaya (2012) descrevem que a capacidade de sobrevivência de seus esporos é variável em função do ambiente onde foi aplicado, da temperatura, umidade e da radiação solar.

No Brasil, este fungo é produzido basicamente por um processo conhecido como fermentação sólida-estática. Neste caso, objetiva-se produzir os propágulos infectivos do fungo, denominado conídios, mediante o uso de substratos sólidos à base de cereais, os quais fornecem condições nutricionais e físicas necessárias ao crescimento do micro-organismo (MASCARIN & QUINTELA, 2013).

Este processo de produção por meio sólido é muito oneroso já que necessita de grande número de pessoas para a manipulação dos materiais nas suas diferentes fases de desenvolvimento. Em relação à comercialização, vem sendo comercializado principalmente em quatro formas: Arroz inteiro, arroz triturado, em conídios puros e em formulação oleosa.

Como agente patogênico, os insetos atacados por *M. anisopliae* tornam-se mumificados e o cadáver pode apresentar coloração que varia de verde claro a escuro, acinzentados ou ainda esbranquiçados com pontos verdes. Esta doença é conhecida como muscardine verde (ALVES, 1998). Ainda segundo Alves, 1998, os conídios deste

fungo podem apresentar-se elipsóides ou ovóides e sua coloração pode variar de verde pálida a verde oliva, cor esta que confere o nome à doença.

*M. anisopliae* ataca inúmeras espécies de insetos e está amplamente distribuído na natureza. Acredita-se que este entomopatógeno ocorra naturalmente em mais de 300 espécies de insetos das diferentes ordens, incluindo pragas importantes como larvas de curculionídeo, *Mahanarva posticata* (cigarrinha-de-folhas da cana-de-açúcar) e *M. fimbriolata* (cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar) (ALVES, 1998).

No Brasil, *M. anisopliae* é produzido e utilizado no Nordeste do Brasil desde 1969, visando o controle das cigarrinhas da cana-de-açúcar. Também em outras regiões do país este fungo é utilizado para o controle de cercopídeos das pastagens. No Estado de São Paulo tem sido usado com sucesso no controle da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *M. fimbriolata* (MACEDO et al., 1997; MENDONÇA FILHO et al., 2001; ALMEIDA & BATISTA FILHO, 2003).

As estruturas mais produzidas e comercializadas de *M. anisopliae* são os conídios, utilizando-se meio de cultura sólido. Esse processo tem sido usado para a manutenção rotineira de isolados e produção em pequena escala de conídios visando estudos de laboratório, bem como a produção em grande escala visando testes de campo e comercialização. O fungo é produzido na superfície de meio sólido, dentro de diferentes recipientes conforme o objetivo e escala de produção (ALMEIDA & BATISTA FILHO, 2006).

Os isolados de *M. anisopliae* IBCB 348 e IBCB 425 são hoje utilizados pela maioria das empresas produtoras de fungos entomopatogênicos do Brasil. A transferência do conhecimento foi realizada por meio de projetos de implantação de seis biofábricas no Estado de SP e o treinamento de 85 profissionais, inclusive de outros Estados da federação (ALMEIDA & BATISTA FILHO, 2006).

## **2.4 Produção de fungos entomopatogênicos**

A produção dos fungos entomopatogênicos em geral pode ser obtida através de vários processos e substratos, dependendo do objetivo que se pretende alcançar. No caso da produção massal de patógenos, com vistas ao controle microbiano de insetos e ácaros, muitos métodos têm sido descritos. Os principais problemas encontrados no processo de produção estavam relacionados ao desenvolvimento de metodologia simples, recipientes adequados e eliminação de contaminações (MARTIGNONI, 1964).

Estes fungos, possuem destaque no controle microbiano de insetos justamente por sua eficiência, compatibilidade com outros métodos e principalmente pela segurança ambiental que proporcionam. Porém, falhas no processo de produção e limitações para aplicação podem se tornar fatores decisivos no sucesso de um programa de controle microbiano. Um dos maiores exemplos de risco no processo e conseqüentemente um desafio é manter a conservação desses micro-organismos de forma que mantenham sua patogenicidade e virulência pelo menos por dois anos, em condições de fácil armazenamento e aplicação (BATISTA et al., 1998).

A produção de *M. anisopliae*, por ser o fungo entomopatogênico mais utilizado em São Paulo para controle, principalmente, da cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar *M. fimbriolata*, vem crescendo nos últimos anos, devido ao aumento dos danos causados por esta praga, conforme constatado por Almeida et al. (2002b) e Miranda et al. (2003). De acordo com os mesmos autores, na cultura de cana-de-açúcar, o fungo *M. anisopliae* manteve a população da cigarrinha da raiz abaixo do nível de controle, nos trabalhos realizados em campo.

Ressalta-se que esta cultura ocupa hoje uma área que ultrapassa quatro milhões de hectares no Estado de São Paulo, tornando-o o maior produtor nacional e sendo responsável por 53,5% da produção do país (IBGE, 2013). Da área total cultivada neste, cerca de 350 mil já foi tratada com o patógeno no Estado de São Paulo, chegando a 1 milhão de hectares tratados no Brasil (ALMEIDA, 2014).

As técnicas de produção de fungos para controle de pragas devem ter baixo custo e permitir obtenção de alta concentração de formas viáveis e virulentas do patógeno, que possam ser formuladas e utilizadas. Segundo Leite et al., 2003, a escolha da forma a ser utilizada do fungo irá depender da espécie e isolado do patógeno, da dificuldade na sua produção, do ambiente onde será aplicado e do método de aplicação. Todos estes fatores devem ser levados em consideração antes da escolha do método de produção, que deve ser com base na estrutura do fungo que se pretende obter (LEITE et al., 2003)

Atualmente, a produção de alguns fungos entomopatogênicos, dentre eles *M. anisopliae* e *B. bassiana*, tem sido realizadas no Brasil por algumas indústrias privadas além de organizações oficiais. Segundo Ottati-de-Lima (2007), estes fungos apresentam uma grande variabilidade natural e as organizações produtoras não tem dado a esse fato a importância que merecem. Normalmente, a produção inicia-se através do isolamento do fungo de um inseto atacado.

## 2.5 Produção de fungos entomopatogênicos em meio sólido

A produção de fungos em meios sólidos é a forma mais comum e permite a produção direta de unidades infectivas. Geralmente utiliza-se arroz pré-cozido, e o crescimento se dá sobre este substrato. Diversos pesquisadores têm procurado outros meios sólidos que sejam mais baratos e mais produtivos.

Estes estudos podem ser justificados principalmente devido ao elevado preço do arroz no comércio. O custeio do substrato para o fungo pode acarretar despesas crescentes aos fabricantes, o que levou alguns pesquisadores a realizar sucessivos trabalhos de laboratório com o objetivo de averiguar a eficiência de outros produtos naturais que possam vir a substituí-lo (OTTATI-DE-LIMA, 2007). No ano de 1974, Guagliumi et al. (1974), já relatavam que diversos autores divulgavam o resultado de suas pesquisas, que sempre acabavam por confirmar a superioridade do arroz como substrato sólido para o cultivo de *M. anisopliae*. Ainda não existem pesquisas que comprovem e justifiquem a substituição de tal substrato para produção em meio sólido.

A superioridade do meio de arroz, em relação ao de amido e batata – dextrose no desenvolvimento e esporulação do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* já foi comprovada por Marques & Vilas Boas (1973), Aquino (1974) e Valle et al. (1980). Moura-Costa & Magalhães (1974) e Villacorta (1978) utilizaram esse meio de cultivo para produção de conídios de *M. anisopliae*.

Aquino (1974) apresentou o meio sólido natural constituído por grãos de arroz autoclavados, como sendo o substrato mais indicado para o cultivo de *M. anisopliae* em grande quantidade.

Vários outros substratos naturais foram testados por Aquino (1974) e Guagliumi et al. (1974), comparados com o arroz, tais como, amido (goma de mandioca), fubá de milho, arroz em pó, arroz quebrado, farinha de mandioca, farelo de trigo, batata doce, batata inglesa, farelo de soja, torta de algodão e gérmen de trigo. Entre estes, a batata demonstrou ser excelente meio de cultura, com ótima esporulação, ainda que apenas na superfície do substrato. Porém, foi ela inferior ao meio de arroz inteiro cozido, que produziu grande quantidade de esporos, não só na superfície, como também, nos interstícios entre os grãos. O meio de arroz oferece, portanto, maior área de desenvolvimento ao fungo, havendo, conseqüentemente, formação de maior quantidade de esporos.

Moura-Costa & Magalhães (1974), utilizaram também a farinha de arroz, obtida com auxílio de um moinho e posteriormente passada em peneira de malhas finas, verificando bom crescimento e esporulação em meio com concentração de 5% de



farinha de arroz, 1% de ágar em pó e água destilada. Daoust & Roberts (1983) utilizando seis diferentes tipos de meios de cultura e três tipos de arroz concluíram que, para produção de conídios, o meio de arroz foi o que produziu resultados melhores e mais econômicos mesmo comparado aos meios micológicos complexos.

Outro estudo foi feito por Villas-Boas et al. (1996), que observaram diferentes meios sólidos para produção de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin e *M. anisopliae*, e verificaram que entre caupi, feijão, fava, sorgo e arroz, este último é o meio de cultura mais econômico e de maior produção de conídios, sem alterar sua patogenicidade. Este resultado permite diversificação no meio de cultura.

Procurando compreender qual o tipo de arroz era mais eficiente para a produção de fungos entomopatogênicos, Neves et al. (2001), testaram a produção de *B. bassiana* em seis tipos de arroz (quirera, tipo II, extra, casca amarela, integral e parboilizado), utilizando várias quantidades de água e três métodos de preparo, e verificaram que quirera, integral e parboilizado foram os mais produtivos.

No ano de 1985, a seleção de um meio padrão e o conhecimento das condições de cultivo mais adequadas para uma espécie ou linhagem já eram preocupação e foram relatadas por Khalil et al (1985), como dois dos fatores mais importantes na produção massal de fungos entomopatogênicos para garantir bom crescimento com alta esporulação. Segundo Verhaar & Hijwegen (1993), a produção de esporos pode variar consideravelmente dependendo do meio de cultura e metodologia de produção, causando problemas na obtenção de conídios.

O arroz ainda é um dos substratos mais utilizados, e conforme observado, muitos estudos foram realizados com o objetivo de avaliar substratos alternativos e mais baratos. De acordo com Jenkins et al. 1998, o sucesso do arroz como meio de cultura sólido se deve, provavelmente, à combinação de fatores como balanço nutricional, custo, ampla disponibilidade mundial, características físicas como tamanho e forma do grão, propriedades de hidratação e integridade estrutural mesmo após a colonização pelo fungo.

## **2.6 Produção de fungos entomopatogênicos em meio líquido**

Os meios de cultura líquidos incluem, basicamente, uma fonte de carbono, outra de nitrogênio, sais inorgânicos ou substâncias orgânicas contendo macro e micro nutrientes e possivelmente outras fontes de crescimento. A relação entre carbono e

nitrogênio é considerada de grande importância no balanço do meio de cultura líquido (SOPER & WARD, 1981).

A produção em meios naturais líquidos permite o aumento na produção e diminui o tempo para a conidiogênese dos fungos entomopatogênicos, conforme citaram os trabalhos de Batista Filho et al. (1985) para *B. bassiana*, e o de Winkelhoff & McCoy (1984), para produção de *Hirsutella thompsonii* (Fisher) em meio líquido à base de xarope de milho.

Neste sentido, Batista Filho et al. (1985) estudaram o crescimento de *Beauveria* sp. em diferentes meios de cultura líquidos, à base de macerados de feijão, arroz e batata, e verificaram que o caldo de feijão ofereceu as melhores perspectivas de uso, face à elevada concentração de esporos produzidos, quando comparado aos demais meios.

Novamente, testando meios de cultura com base em grãos, Alvarenga et al. (1998) testaram o desenvolvimento e esporulação de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Hansfordia pulvinata* (Berkeley & MA Curtis), em meios de cultura líquidos obtidos por maceração de quatro variedades de feijão, de soja e de grão de bico, e verificaram que o feijão Guandu é o melhor substrato para os três fungos.

Já Pereira & Eira (1999), descreveram um meio líquido para produção de *M. anisopliae* à base de macerado de percevejo *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) mais 0,2% de sacarose, a qual produz o dobro de conídios por grama de substrato a um custo 51 vezes inferior, em relação ao processo convencional de produção em meio sólido, entretanto, assim como acontece com o caldo de feijão, o processo de produção de meios de cultura com macerados de percevejo talvez seriam inviáveis devido à complexidade do processo, necessitando assim melhores estudos de custo-benefício.

Há mais de 20 anos o Instituto Biológico vem desenvolvendo ensaios com padronização de substâncias fontes de Carbono e Nitrogênio para produção de fungos entomopatogênicos em fermentação líquida, buscando resultados que sejam conclusivos para um meio de cultura eficiente e barato. Este fato é possível ser verificado em trabalhos como o de Tanzini & Batista Filho (1992), que produziram *Paecilomyces fumosoroseus* (Wise) (Brawn & Smith) nos meios de culturas líquidos: feijão 20%, feijão 20% + sacarose 3%; extrato de levedura 1%; extrato de levedura 1% + sacarose 3%; leite de soja 10%; e leite de soja 10% + sacarose 3%, e verificaram que o melhor foi o macerado de feijão 20%, com 97% de viabilidade e  $1,41 \times 10^8$  con./mL.

Já em relação à produção de *M. anisopliae*, OTTATI-DE-LIMA (2007), relatou que em relação aos meios estudados, os melhores foram aqueles que apresentaram D-glicose anidra em sua composição e para *B. bassiana* os tratamentos que continham sacarose se mostraram mais eficientes.

Qiu et al. (2012) trabalharam com otimização para os meios de cultura bifásicos para *Aschersonia placenta* testando separadamente fontes de carbono (glicose, frutose, galactose, sucrose, lactose, maltose, manitol, sorbitol, xarope de milho, xarope de algodão, milhete e batata) e nitrogênio (peptona, triptona, extrato de soja, extrato de carne, caseína, uréia, e sulfato de amônio). Em sequência foram realizadas combinações com sulfatos de zinco, cobre, manganês e vitaminas C e complexo B.

Quando tratamos de produção de fungos entomopatogênicos em fermentação líquida, é importante ressaltar que neste método de produção obtém-se principalmente uma massa micelial, sendo necessária uma fase seguinte, visando a formação do estágio infectivo, que pode ser no próprio meio ou sobre o micélio formulado e aplicado no campo (LEITE et al., 2003).

As principais dificuldades do processo são obtenções de meios de culturas adequados que não afetem a patogenicidade; determinações das condições de desenvolvimento e esporulação; e prevenção das contaminações secundárias. A grande vantagem desse processo é a obtenção de elevadas quantidades de biomassa em um pequeno espaço físico e em pouco tempo (ALVES, 1998).

Neste sentido, identificar fatores ambientais e nutricionais que incrementem a produção de blastosporos é um pré-requisito para o desenvolvimento de um processo de produção economicamente viável (MASCARIN et al., 2015a; 2015b). Dentre estes fatores, nutrição, pH, tamanho do inóculo e disponibilidade de oxigênio têm se mostrado como parâmetros cruciais para a otimização de processos de fermentação industrial, pois afetam seu metabolismo e capacidade produtiva (DURAN; CARY; CALVO, 2011; LI et al., 2011).

A produção de conídios submersos é geralmente estimulada pelo aumento na proporção C:N. Assim, muitos fungos são inicialmente produzidos na forma de blastósporos e micélio e, em seguida, o meio é substituído por outro mais rico em carbono e deficiente em nitrogênio (LEITE et al., 2003).

Segundo Kampen (2014), a fonte de carbono deve ser o principal componente de um meio de cultura, pois fornece o elemento mais importante para construção das células, o carbono, que compõe cerca de 50% da biomassa seca, além de suprir a energia necessária para movimentar o metabolismo do micro-organismo. Connors (2002), relatou que as fontes de carbono podem ser utilizadas por meio de açúcares simples como glicose e frutose; dissacarídeos como maltose, lactose e sacarose; polímeros como amidos ou dextrinas; polióis como glicerol e manitol; ou ainda óleos como soja e canola, por exemplo. As fontes de carbono mais utilizadas são: amido, glicose, sacarose e diversos outros açúcares (LEITE et al., 2003).

Já entre as fontes de nitrogênio, produtos complexos como extrato de levedura, proteínas de leite e farinha de soja vêm sendo aplicados com sucesso na composição de meios de cultura para produção de blastoporos por fermentação líquida (JACKSON, 1997; MASCARIN; ALVES; LOPES, 2010; KAMPEN, 2014; MASCARIN et al., 2015a). A vantagem desses produtos, em relação a fontes puras, é que fornecem muitos outros nutrientes, como vitaminas e minerais, e costumam ter menor custo (KAMPEN, 2014; MASCARIN et al., 2015a).

Neste sentido, Mascarin, Alves e Lopes (2010) ressaltaram a importância de se determinar esta relação em substratos alternativos para produção de fungos, pois esses produtos têm composição nutricional variável, o que pode afetar grandemente os parâmetros de produção do fungo.

Jaronski e Jackson (2012) relataram ainda que o ajuste adequado da proporção C:N é de vital importância para que uma determinada forma do fungo seja produzida mais profusamente em detrimento das demais, que não são desejáveis, permitindo se alinhar o processo de formulação do meio com os objetivos da produção.

Muitos outros trabalhos têm sido publicados nesta área, principalmente em relação à composição do meio líquido. Entretanto poucos são os estudos atuais em relação a estes meios para o desenvolvimento de *Metarhizium anisopliae*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico, localizado em Campinas, SP.

#### 3.1 Isolado e inóculo

Para realização do trabalho, foi utilizado o isolado IBCB 425 de *M. anisopliae*, proveniente da Coleção de Fungos Entomopatogênicos “Oldemar Cardim Abreu”. Esta coleção é credenciada pelo IBAMA como fiel depositária e está sediada no Laboratório de Controle Biológico do Centro Experimental do Instituto Biológico, em Campinas, SP. O isolado foi obtido de amostra de solo coletado em Iporanga, SP. Atualmente é produzido por biofábricas do estado de São Paulo, onde é utilizado para controle da cigarrinha da raiz da cana de açúcar, devido à sua eficiência (LOUREIRO, 2003)

O isolado foi repicado em placas de Petri com Meio Batata Dextrose Agar (BDA) (ALVES, 1998) para obtenção de quantidade suficiente de conídios para o preparo de uma suspensão aquosa. As placas com fungo foram mantidas em câmara BOD, a  $25 \pm 1$  °C, UR  $70 \pm 5\%$  e fotofase de 14h, durante dez dias para o desenvolvimento de colônias. Após o décimo dia os conídios produzidos foram removidos da superfície do meio de cultura, com auxílio de espátula de metal, para o preparo da suspensão em água estéril com tensoativo (Tween 80<sup>®</sup> - 0,1mL/L), contendo aproximadamente  $1,0 \times 10^8$  con./mL. Esta suspensão, chamada de inóculo, foi preparada de acordo com a necessidade dos diferentes ensaios.

#### 3.2 Meios de cultura

Foram avaliadas substâncias fontes de proteína, carboidratos – dissacarídeos, polímeros e de sais. As fontes foram analisadas a partir de ensaios isolados antes que fossem combinadas entre si em um meio de cultura complexo.

O experimento foi conduzido com cinco ensaios em frascos Erlenmeyer de 150 mL, contendo 100 mL dos meios de cultura estéril. No total foram preparados 24

tratamentos de fontes isoladas com 5 repetições cada e um tratamento com meio complexo (Tabela 1). Foi utilizado o balanceamento C:N de 10:1.

Cada frasco foi inoculado com 1mL de suspensão de  $1 \times 10^8$  conídios/mL de uma cultura pura do fungo *M. anisopliae* produzida em meio de cultura BDA ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e 12 horas de fotofase), em seguida submetidos à agitação de 200 rpm, por 8 dias a  $25^\circ\text{C}$  (Figura 1). Os ensaios incluíram, também, um tratamento padrão, com produção do fungo em meio sólido, que é usualmente utilizado pelas biofábricas.

**Tabela 1.** Quantificação de substratos fontes de nitrogênio, carbono e sais por ensaio realizado para a produção de *Metarhizium anisopliae* por fermentação líquida.

Substratos	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5
	Fonte de Nitrogênio	Fonte de Carbono Dissacarídeos	Fonte de Carbono Polímeros	Fonte de Sais	Meio Complexo
1 Extrato de Levedura	41,7 g/l				
2 Gema de ovo em pó	50,4 g/l				
3 Clara de ovo em pó	30,6 g/l				30,6 g/l
4 Proteína de Soja em pó	55,2 g/l				
5 Levedura de cerveja	54,7 g/l				
6 D - Glicose Anidra		55 g/l			
7 Sacarose		52,2 g/l		52,2 g/l	52,2 g/l
8 Glicerina		49,2 ml/l			
9 Glicose de Milho		56,4 ml/l			
10 Frutose		55 g/l			
11 Maltose		55 g/l			
12 Polvilho Azedo			20 g/l		
13 Polvilho Doce			20 g/l		
14 Amido de Milho - Maisena			20 g/l		
15 Amido de Arroz			20 g/l		
16 Fécula de Batata			20 g/l		
17 Fubá			20 g/l		
18 Zn SO <sub>4</sub>				0,014 g/l	
19 Fe SO <sub>4</sub>				0,05 g/l	
20 Mg SO <sub>4</sub>				0,6 g/l	
21 Na <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub>				1,04 g/l	
22 K H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>				0,36 g/l	
23 KCl				1 g/l	1 g/l
24 Na NO <sub>3</sub>				1,58 g/l	1,58 g/l



**Figura 1:** Frascos erlenmeyers em agitação. **Fonte:** Arquivo pessoal Isabella Gotti

### 3.2.1 *Produção em fontes de nitrogênio – Proteínas*

O isolado IBCB 425 do fungo foi submetido a diferentes meios de cultura contendo apenas fonte de Nitrogênio, desta forma padronizando-se alternativas para produção de blastosporos e conídios submersos. O isolado do fungo foi preparado conforme descrito na etapa 3.1 e inoculado em meios contendo Extrato de Levedura, Albumina, Gema de Ovo em pó, Proteína de Soja em pó ou Levedura de Cerveja. Os meios de cultura foram preparados conforme procedimento descrito na etapa 3.2. e nas quantidades descritas na Tabela 1. Tanto a seleção das fontes quanto a concentração a ser utilizada, foi baseada em trabalhos anteriores como de WENZEL (2002), SANO (2005) e OTATTI-DE-LIMA (2007). Seu desenvolvimento foi acompanhado durante oito dias, avaliando-se cada 48 horas o pH, a concentração dos corpos hifais e o peso da biomassa em cada tratamento.

### 3.2.2 *Produção em fontes de carbono – Dissacarídeos*

O isolado IBCB 425 do fungo também foi submetido a diferentes meios de cultura contendo apenas fonte de Carbono, dissacarídeos, desta forma padronizando-se alternativas para produção de blastosporos e conídios submersos. O isolado do fungo



também foi preparado conforme descrito na etapa 3.1 e inoculado em meios contendo D-Glicose Anidra, Sacarose, Frutose, Maltose, Glicerina ou Glicose de Milho, preparados conforme procedimento descrito na etapa 3.2. nas quantidades descritas na Tabela 1. Tanto a seleção das fontes quanto a concentração a ser utilizada, foi baseada em trabalhos anteriores como de WENZEL (2002), SANO (2005) e OTATTI-DE-LIMA (2007). Seu desenvolvimento foi acompanhado também durante oito dias, avaliando-se cada 48 horas o pH, a concentração dos corpos hifais e o peso da biomassa em cada tratamento.

### *3.2.3 Produção em fontes de carbono - Polímeros*

Assim como nos ensaios anteriores, o isolado IBCB 425 do fungo foi submetido a diferentes meios de cultura, entretanto contendo apenas diferentes fontes de carbono, do tipo polímeros, a fim de padronizar-se novas fontes para produção de blastosporos e conídios submersos. O isolado do fungo também foi preparado conforme descrito na etapa 3.1 e inoculado em meios contendo Polvilho azedo, Polvilho doce, Amido de Milho, Amido de Arroz, Fécula de Batata ou Fubá, preparados conforme procedimento descrito na etapa 3.2. nas quantidades descritas na Tabela 1. Tanto a seleção das fontes quanto a concentração a ser utilizada, foi realizada à partir de pequenos ensaios realizados no próprio Laboratório de Controle Biológico do Centro Experimental do Instituto Biológico. Seu desenvolvimento também foi acompanhado como nos ensaios anteriores durante oito dias, avaliando-se cada 48 horas o pH, a concentração dos corpos hifais e o peso da biomassa em cada tratamento.

### *3.2.4 Produção em fontes de sais*

No último ensaio para avaliação de fontes independentes, o mesmo isolado do fungo foi submetido a diferentes meios de cultura, entretanto contendo diferentes fontes de sais juntamente com sacarose. A sacarose foi acrescentada em todos os tratamentos como uma fonte padrão de energia, para que o fungo se desenvolvesse nos diferentes sais. O isolado do fungo também foi preparado conforme descrito na seção 3.1 e inoculado em meios contendo sacarose e  $Zn SO_4$ ,  $Fe SO_4$ ,  $Mg SO_4$ ,  $Na_2 HPO_4$ ,  $K H_2$

PO<sub>4</sub>, KCl ou NaNO<sub>3</sub>, também preparados conforme descritos na seção 3.2. nas quantidades descritas na Tabela 1. Seu desenvolvimento também foi acompanhado como nos ensaios anteriores durante oito dias, avaliando-se cada 48 horas o pH, a concentração dos corpos hifais e o peso da biomassa em cada tratamento.

### 3.2.5 *Produção em meio complexo*

Após a definição das melhores fontes de Nitrogênio, Carbono, Amidos e Sais, o isolado IBCB 425 do fungo foi inoculado em meio de cultura complexo contendo os ingredientes que se destacaram nos ensaios anteriores, com exceção dos polímeros, que foram descartados pelo baixo rendimento de produção. Albumina, Sacarose, KCl e NaNO<sub>3</sub> foram misturados em um único meio de cultura, autoclavado e inoculado conforme as seções 3.1 e 3.2. Seu desenvolvimento foi acompanhado durante quatorze dias, avaliando-se cada 48 horas o pH, a concentração de blastosporos e o peso da biomassa em cada dia. Ao final do 14º dia de avaliação os dados foram tabelados e a curva de crescimento foi traçada.

Definida a curva de crescimento o mesmo Meio de Cultura Complexo foi preparado conforme procedimento descrito na seção 3.2 e inoculado em fermentadores do tipo garrações de vidro, contendo 6 litros cada repetição. Foram inoculados conforme seção 3.1 em 4 repetições que ficaram em sala de desenvolvimento por 8 dias a 26±1°C e aeração de 1 kgf/ cm<sup>2</sup> de pressão (Figura 2A).

### 3.2.6 *Produção em meio sólido*

O arroz utilizado como substrato da cultura foi inicialmente mergulhado em água fria e deixado de molho por cerca de 40 minutos até obter consistência emborrachada. Em seguida foi escorrido da água e distribuído em sacos de polipropileno fechados com auxílio de grampeador. Cada saco de polipropileno recebeu aproximadamente 250g de arroz hidratado e foi considerado uma repetição. Foram consideradas 5 repetições para o tratamento. Estes foram autoclavados por 30 minutos a 121°C, resfriados à temperatura ambiente e inoculados com 1mL de suspensão de  $1 \times 10^8$  conídios/mL de

uma cultura pura do fungo *M. anisopliae*. Em seguida, os sacos de polipropileno foram incubados em sala de crescimento por 8 dias a  $26\pm 1^\circ\text{C}$  (Figura 2B).



**Figura 2.** Diferentes metodologias de produção de *Metarhizium anisopliae*. (A) Fermentação líquida em garrações. (B) Método convencional em meio de cultura sólido.  
**Fonte:** Arquivo pessoal Isabella Gotti

### **3.3 Parâmetros de análise para produção do fungo**

#### *3.3.1 Análise de pH*

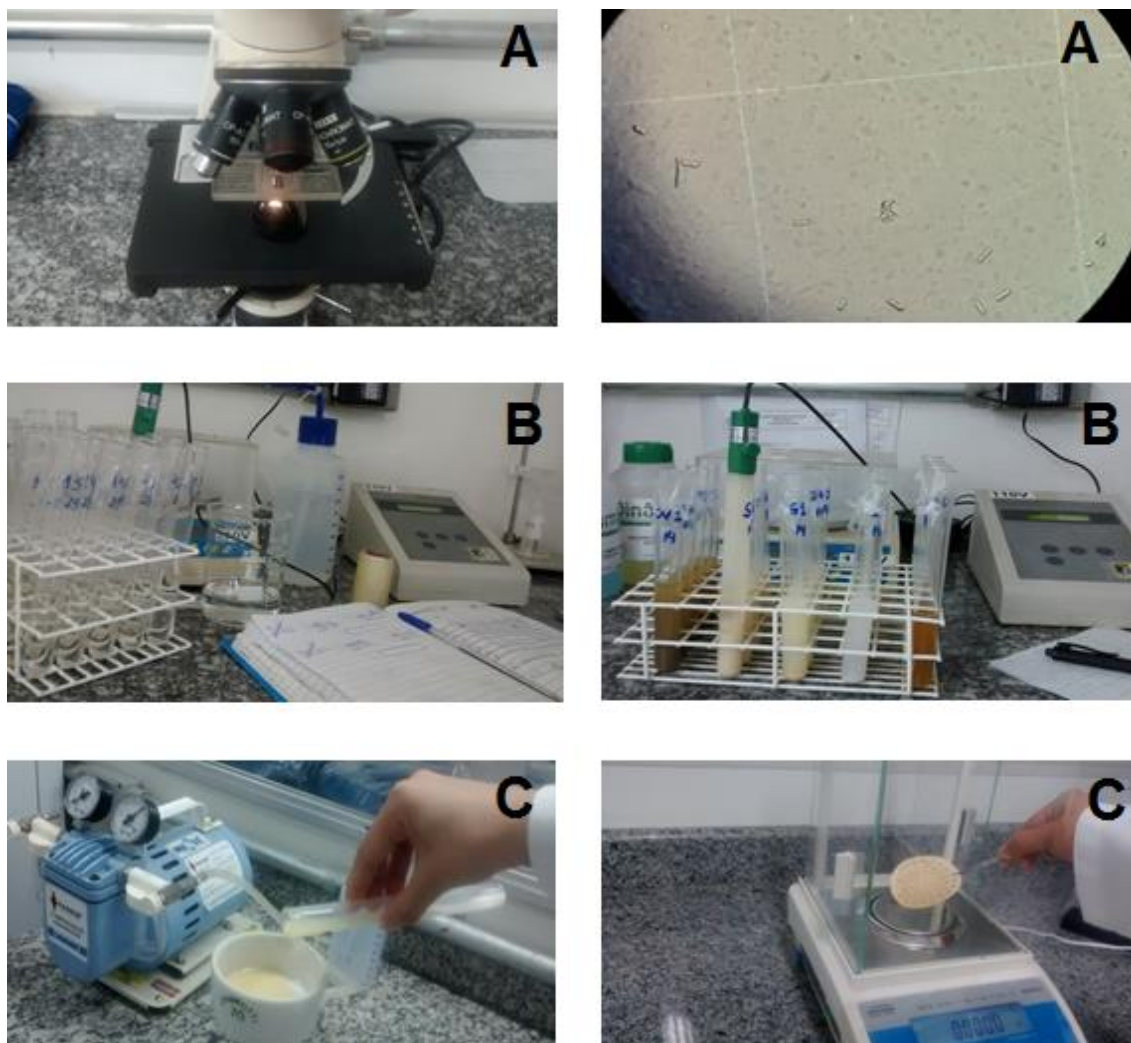
Após a realização das análises de concentração de blastosporos e análises de viabilidades, 9 ml de cada amostra foram submetidas à análise de pH em potenciômetro. O eletrodo foi lavado com água destilada e enxugado com papel toalha antes e depois da análise de cada amostra.

#### *3.3.2 Análise de Concentração de blastosporos*

As quantificações de blastosporos foram realizadas com 2, 4, 6 e 8 dias após a inoculação, retirando-se, em condições assépticas, uma amostra de 10 mL/frasco para contagem de blastosporos. Dessa amostra, 1 mL foi adicionada a 9 mL de água estéril + espalhante adesivo (Tween 80®). Foram realizadas diluições em série para obtenção de uma suspensão que permitiu a contagem de blastosporos em câmara de Neubauer sob microscópio no aumento de 400x.

#### *3.3.3 Análise do peso da biomassa*

Para determinação da biomassa fúngica formada nos meios líquidos, 9 mL de amostra de meio de cultura com massa micelial foi filtrada em funil de Büchner sob vácuo, em seguida mantida em estufa a 60°C até peso constante, obtido em 24 horas, e então pesada em balança analítica. O peso do filtro de papel e o peso do meio de cultura foram descontados, resultando somente o peso seco da massa micelial.



**Figura 3.** Avaliações de produção: **A;** concentração de blastosporos observado em microscópico (aumento 400x). **B;** medição de pH em potenciômetro. **C;** pesagem da biomassa. **Fonte:** Arquivo pessoal Isabella Gotti

### 3.4 Patogenicidade

Foi avaliada a patogenicidade das diferentes estruturas do fungo *M. anisopliae* produzidos em meio líquido complexo e conídios produzidos em arroz sobre lagartas do inseto-teste, *Galleria mellonella*.

O Meio Complexo obtido na etapa anterior foi novamente preparado, inoculado e deixado em desenvolvimento em fermentador do tipo garrafão de vidro por 8 dias a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  e aeração de  $1 \text{ kgf/cm}^2$  de pressão. Os blastosporos e conídios submersos foram obtidos no oitavo dia após a inoculação, respectivamente, e as suspensões

preparadas na concentração aproximada de  $1 \times 10^8$  estruturas/mL. A análise de concentração da suspensão inoculante foi realizada conforme método descrito em 3.3.2.

A produção de conídios em meio sólido foi utilizada como padrão e os conídios foram respectivamente obtidos da produção em arroz do Laboratório de Controle Biológico – Centro Experimental Central do Instituto Biológico, em Campinas, SP. A suspensão foi preparada em água estéril com espalhante adesivo (Tween 80® – 0,1mL/L), contendo  $1 \times 10^8$  con./mL.

Os insetos-teste também foram devidamente obtidos da criação do Laboratório de Controle Biológico do Centro Experimental do Instituto Biológico, em Campinas.

O bioensaio foi composto por 3 tratamentos, sendo: Fungo Desenvolvido em Meio Complexo, Meio Complexo Puro e Conídios provenientes de produção em arroz) com cinco repetições cada, e cada repetição com 10 insetos. O bioensaio com conídio será utilizado como padrão.

Foi realizada a aplicação de 1mL das suspensões de cada tratamento de *M. anisopliae* sobre placas de Petri contendo lagartas do inseto teste, com auxílio de Torre de Potter adaptada, com pressão de 15 libras/pol<sup>2</sup> (Figura 4). Após a aplicação os insetos foram mantidos em sala climatizada à temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , UR de  $60 \pm 5\%$  e fotofase de 12 horas.

A mortalidade foi avaliada do terceiro até o décimo dia após a pulverização. Cada inseto morto foi lavado em álcool 70% e água destilada esterilizada para desinfecção superficial e em seguida transferidos para câmara úmida composta por placas plásticas (4,5cm de diâmetro) esterilizadas, com algodão umedecido.

Estas placas foram mantidas em câmara BOD à temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , UR de  $70 \pm 5\%$  e fotofase de 12 horas. Este procedimento é realizado a fim de se confirmar a mortalidade causada pelo patógeno, sendo possível observar o crescimento micelial e conidiogênese do patógeno sobre o cadáver.



**Figura 4.** Teste de patogenicidade: Aplicação dos tratamentos em Torre de Potter.  
**Fonte:** Arquivo pessoal Isabella Gotti

### 3.5 Delineamento experimental e análise estatística

O Delineamento foi o inteiramente casualizado (DIC). A análise de variância foi realizada pelo teste F e as médias da produtividade de blastosporos e os pesos de massa seca dos tratamentos foram comparados pelo teste Duncan a 5% de probabilidade. Para a execução da análise estatística utilizou-se o programa ASSISTAT.

### 3.6 Análise de custos de produção

Esse item foi incluído com o objetivo de demonstrar o procedimento para a realização de um levantamento de custos visando a formação de preços na produção de fungos. O estudo foi baseado na unidade de produção de fungos do Laboratório de Controle Biológico do Centro Experimental do Instituto Biológico.

Foi utilizado o método de Custeio por Absorção, conforme análise desenvolvida pelo SEBRAE – Campinas, SP, para Leite et al. (2003). Tal metodologia refere-se apropriação de todos os custos incorridos no processo de fabricação. Trabalhou-se com alguns valores médios (valores de aquisição de equipamentos, consumo de energia,

etc.), os quais podem ser alterados significativamente dependendo da contingência em que a estrutura produtiva for instalada.

No cálculo final do custo operacional, foram consideradas as despesas fixas (estrutura produtiva) relacionadas somente ao período de demanda do bioinseticida. Os valores estão apresentados em reais. Para efeito de transformação em dólar, a moeda norte americana valia, durante o período do levantamento, R\$ 3,70.

### 3.6.1 *Investimento fixo*

O investimento fixo necessário, para a implantação da estrutura para produção de fungos entomopatogênicos tanto em meio sólido, pelo método convencional, quanto em meio líquido, pelo método em fermentação líquida proposto, é condicionado ao padrão de negócio que se deseja estabelecer, bem como o volume de material a ser produzido e o capital disponível para se investir.

Neste caso, para a avaliação dos custos de produção de uma biofábrica, considerou-se como referência para cada processo de produção, os seguintes rendimentos diários: Meio Sólido - 600 kg; Fermentação - 600 Litros

A Tabela 2 refere-se ao maquinário/equipamentos e utensílios considerados no investimento fixo, e seus respectivos valores.



**Tabela 2.** Maquinário/equipamentos e utensílios considerados no investimento fixo, e seus respectivos valores para instalação de Biofábrica para produção de fungos entomopatogênicos em meios sólido e líquido.

Especificação	QT	Valor Unit. - R\$	Custo total - R\$
Agitador de frascos com movimento orbital	1	R\$ 4.800,00	R\$ 4.800,00
Agitador para tubos Vortex	1	R\$ 750,00	R\$ 750,00
Ar condicionado q/f 7500BTU	5	R\$ 1.600,00	R\$ 8.000,00
Autoclave vertical 300 litros	2	R\$ 20.000,00	R\$ 40.000,00
Jalecos	9	R\$ 30,00	R\$ 270,00
Balança Digital	1	R\$ 1.190,00	R\$ 1.190,00
Bancada Ardosia	2	R\$ 50,00	R\$ 100,00
Botijão de gás 13 kg	2	R\$ 180,00	R\$ 360,00
Cadeiras	4	R\$ 150,00	R\$ 600,00
Calculadora	1	R\$ 20,00	R\$ 20,00
Câmara Fluxo Unidirecional	1	R\$ 20.000,00	R\$ 20.000,00
Sala de Secagem	1	R\$ 85.000,00	R\$ 85.000,00
Estuda de Esterilização e Secagem 110 L	1	R\$ 2.990,00	R\$ 2.990,00
Aparelho de Osmose Reversa	1	R\$ 3.990,00	R\$ 3.990,00
Frascos Erlenmeyer 250ml	100	R\$ 14,00	R\$ 1.400,00
Câma Fria	1	R\$ 80.000,00	R\$ 80.000,00
Fermentador Industrial 500L	2	R\$ 300.000,00	R\$ 600.000,00
Sistema de envase/embalagem	1	R\$ 100.000,00	R\$ 100.000,00
Mesa de escritório	1	R\$ 220,00	R\$ 220,00
Mesa de manipulação	1	R\$ 800,00	R\$ 800,00
Microscópio	1	R\$ 8.890,00	R\$ 8.890,00
Macropipetas	4	R\$ 108,00	R\$ 432,00
Termo-Higrômetro digital	3	R\$ 78,90	R\$ 236,70
Prateleiras	6	R\$ 120,00	R\$ 720,00
Refrigerador duplex 360L	1	R\$ 1.400,00	R\$ 1.400,00
Freezer horizontal	1	R\$ 1.800,00	R\$ 1.800,00
Telefone	1	R\$ 300,00	R\$ 300,00
<b>Total</b>			<b>R\$ 959.468,70</b>

### 3.6.2 Depreciação

A depreciação mensal foi calculada pelo método linear, considerando todos os investimentos fixos. Foram demonstrados os tipos de investimentos bem como o cálculo de depreciação a serem realizados, na instalação da biofábrica para a produção de fungos entomopatogênicos tanto em meio sólido quanto em meio líquido, bem como os índices considerados no cálculo das depreciações dos mesmos.

Na tabela 3, são demonstrados os tipos de investimentos a serem realizados, na instalação da biofábrica para a produção de fungos entomopatogênicos tanto em meio sólido quanto em meio líquido, bem como os índices considerados no cálculo das depreciações dos mesmos.

**Tabela 3.** Tipos de investimentos para a produção de fungos entomopatogênicos e os respectivos índices considerados no cálculo das depreciações dos mesmos.

Tipo de investimento	Prazo em anos	Taxa ao ano - %
Equipamentos eletrônicos	5	20
Máquinas e equipamentos diversos	10	10
Móveis e utensílios	10	10
Ferramentas	10	10

Já na tabela 4, pode-se observar o cálculo de depreciação de cada equipamento e utilitário empregado na implantação de uma biofábrica para a produção de fungos entomopatogênicos, nos métodos de produção convencional, em meio sólido e método de produção proposto em fermentação líquida.

**Tabela 4.** Equipamentos e utilitários empregados na produção de fungos tanto pelo processo em meio sólido, quanto pelo processo em fermentação líquida e índices considerados no cálculo das depreciações dos mesmos.

Especificação	QT	Vida útil	Deprec. Mensal	Valor unitário	Deprec Total
		Anos	%	R\$	R\$
Agitador de frascos com movimento orbital	1	10	0,00833	4.800,00	40,00
Agitador para tubos Vortex	1	10	0,00833	750,00	6,25
Ar condicionado q/f 7500BTU	5	10	0,00833	1.600,00	66,67
Autoclave vertical 300 litros	2	10	0,00833	20.000,00	333,33
Jalecos	9	10	0,00833	30,00	2,25
Balança Digital	1	5	0,00833	1.190,00	9,92
Bancada Ardosia	2	10	0,00833	50,00	0,83
Botijão de gás 13 kg	2	5	0,00833	180,00	6,00
Cadeiras	4	10	0,00833	150,00	10,00
Calculadora	1	5	0,00833	20,00	0,17
Câmara Fluxo Unidirecional	1	10	0,00833	20.000,00	166,67
Sala de Secagem	1	5	0,00833	85.000,00	1.416,67
Estuda de Esterilização e Secagem 110 L	1	10	0,00833	2.990,00	24,92
Aparelho de Osmose Reversa	1	10	0,00833	3.990,00	33,25
Frascos Erlenmeyer 250ml	100	10	0,00833	14,00	11,67
Câma Fria	1	5	0,00833	80.000,00	1.333,33
Fermentador Industrial 500L	2	10	0,00833	300.000,00	5.000,00
Sistema de envase/embalagem	1	5	0,00833	100.000,00	1.666,67
Mesa de escritório	1	5	0,00833	220,00	1,83
Mesa de manipulação	1	10	0,00833	800,00	6,67
Microscópio	1	10	0,00833	8.890,00	74,08
Macropipetas	4	10	0,00833	108,00	3,60
Termo-Higrômetro digital	3	5	0,00833	78,90	3,95
Prateleiras	6	5	0,00833	120,00	12,00
Refrigerador duplex 360L	1	10	0,00833	1.400,00	11,67
Freezer horizontal	1	10	0,00833	1.800,00	15,00
Telefone	1	5	0,00833	300,00	5,00
<b>Depreciação Total:</b>					<b>R\$ 10.262,38</b>

### 3.6.3 Despesas fixas

O cálculo das despesas fixas tratou-se do levantamento dos gastos fabris. Estes, estão intimamente relacionados ao período do mês, não oscilando proporcionalmente com volume de produção dentro da faixa de capacidade instalada. As Tabelas 5 e 6 identificam as despesas fixas relacionadas a cada processo de produção.

**Tabela 5.** Despesas fixas mensais para a produção de fungos entomopatogênicos pelo processo em meio sólido

Discriminação	Valor (R\$)	
Aluguel do imóvel (espaço de 250 m <sup>2</sup> )	R\$	5.000,00
Conta de telefone	R\$	100,00
Depreciações	R\$	3.529,05
Energia	R\$	1.500,00
Honorários do contador	R\$	900,00
Manutenção dos equipamentos	R\$	500,00
Materiais de escritório	R\$	80,00
Material de limpeza	R\$	500,00
<b>Total</b>		<b>12.109,05</b>

**Tabela 6.** Despesas fixas mensais para a produção de fungos entomopatogênicos pelo processo proposto em fermentação líquida

Discriminação	Valor (R\$)	
Aluguel do imóvel (espaço de 250 m <sup>2</sup> )	R\$	5.000,00
Conta de telefone	R\$	100,00
Depreciações	R\$	7.500,38
Energia	R\$	1.500,00
Honorários do contador	R\$	900,00
Manutenção dos equipamentos	R\$	500,00
Materiais de escritório	R\$	80,00
Material de limpeza	R\$	500,00
<b>Total</b>		<b>16.080,38</b>

### 3.6.4 Mão-de-obra

Considerou-se, para esta análise, a contratação de mão de obra separadamente para cada metodologia de produção, sendo: Engenheiro Agrônomo; Técnico de Laboratório e Auxiliares conforme a demanda de produção de cada método. Os pisos salariais de cada categoria e os encargos utilizados aqui são médias de mercado do ano de 2014. A descrição das despesas com mão de obra direta, para cada processo de produção estão descritas nas tabelas 7 e 8.

**Tabela 7.** Mão-de-obra contratada para a produção de fungos entomopatogênicos pelo processo em meio sólido: Piso salarial e encargos considerados para cada categoria.

Especificação	QT	Unit	Valor (R\$)
Eng. Agrônomo ou Bióloga	1	R\$ 6.500,00	R\$ 6.500,00
Técnico de laboratório	1	R\$ 1.600,00	R\$ 1.600,00
Auxiliares de laboratório	4	R\$ 1.200,00	R\$ 4.800,00
<b>Subtotal</b>			R\$ 12.900,00
Encargos sociais (80%)			R\$ 10.320,00
<b>Total</b>			R\$ 23.220,00

**Tabela 8.** Mão-de-obra contratada para a produção de fungos entomopatogênicos pelo processo proposto em fermentação líquida: Piso salarial e encargos considerados para cada categoria.

Especificação	QT	Unit	Valor (R\$)
Eng. Agrônomo ou Biólogo	1	R\$ 6.500,00	R\$ 6.500,00
Técnico de laboratório	1	R\$ 1.600,00	R\$ 1.600,00
Auxiliares de laboratório	2	R\$ 1.200,00	R\$ 2.400,00
<b>Subtotal</b>			R\$ 10.500,00
Encargos sociais (80%)			R\$ 8.400,00
<b>Total</b>			R\$ 18.900,00

### 3.6.5 *Custo de aquisição de materiais diretos*

Para se realizar o custo com a aquisição de materiais diretos foram levados em consideração os insumos a serem utilizados em cada metodologia de produção bem como seu preço de mercado no ano de 2016. Os valores foram pesquisados via internet e caso houvesse uma pesquisa e negociação com fornecedores de forma mais intensa, estes poderiam melhorar.

### 3.6.6 *Custo operacional*

Após a apresentação dos elementos para apropriação dos custos, foi necessário proceder o cálculo do custo operacional por unidade produzida mensalmente. Este foi calculado, segundo metodologia do SEBRAE Campinas – SP para Leite et al. (2003), por meio da fórmula:

$$\text{Custo Operacional} = \frac{\text{Despesa Fixa}^* + \text{Mão-de-obra}^* + \text{Matéria Prima}}{\text{Quantidade Produzida}}$$

Os valores inseridos na fórmula foram padronizados por cada mês de produção durante todo o ano (12 meses).

### 3.6.7 *Preço de venda*

Em sequência ao cálculo do custo operacional, foi necessário proceder o cálculo do preço de venda por quilo (Kg) ou Litro (L), dependendo da forma de produção do fungo *Metarhizium anisopliae* mensalmente. Este também foi calculado, segundo metodologia do SEBRAE Campinas – SP para Leite et al. (2003).

Para as despesas de comercialização, considerou-se os percentuais de despesas de vendas e das despesas administrativas, sendo ICMS, COFINS, Contribuição Sindical, PIS e Lucro Presumido estimados para Biofábrica no Estado de São Paulo. A Título de simulação de preço de venda, não foram considerados fatores

como compensação de ICMS e limitação na capacidade produtiva. Utilizou-se faturamento condizente à lucro presumido. O detalhamento das despesas com comercialização para cálculo do preço de venda pode ser observado na tabela 9.

**Tabela 9.** Detalhamento das despesas com comercialização (%).

Item de Despesa	%
I.C.M.S	18
COFINS	3
Contribuição Social	0,96
P.I.S	0,65
I.R.P.J (Lucro Presumido)	1,2
<b>Total</b>	<b>23,81</b>

À partir do cálculo do percentual de despesas, procedeu-se com a formação do preço de venda. A título de sugestão, o SEBRAE utilizou para Leite et al. (2003) um percentual de 10% do Lucro Líquido, podendo ser alterado para efeito de testes, bastando alterar a fórmula descrita abaixo:

$$\text{Preço de venda} = \frac{\text{Custo Operacional}}{1 - (\% \text{ Despesas Comercialização} + \% \text{ Lucro Líquido})}$$

### 3.6.8 Margem de Contribuição

Os produtos fabricados geram custos variáveis. Ao serem comercializados, estes geram também custos e despesas que decorrem da produção e da venda. Neste custeio, os produtos geram uma margem denominada Margem de Contribuição, que é o montante que resta do preço de venda de um produto depois da dedução de seus custos e despesas variáveis (MEGLIORINI, 2012).

Na metodologia de custos de produção de *M. anisopliae* proposta pelo SEBRAE para Leite et al. (2003), o estudo do mesmo encerra-se com a formação do preço de

venda dos produtos, entretanto, tal estudo não contempla a margem de contribuição dos produtos fabricados quanto à cobertura dos custos e despesas fixas e ao lucro.

Sendo assim, utilizou-se também o cálculo da Margem de produção conforme proposto por Megliorini (2012), a partir da fórmula:

$$\text{Margem de Contribuição} = \text{PV} - (\text{CV} + \text{DV})$$

Onde:

PV = Preço de Venda

CV = Custos Variáveis

DV = Despesas Variáveis

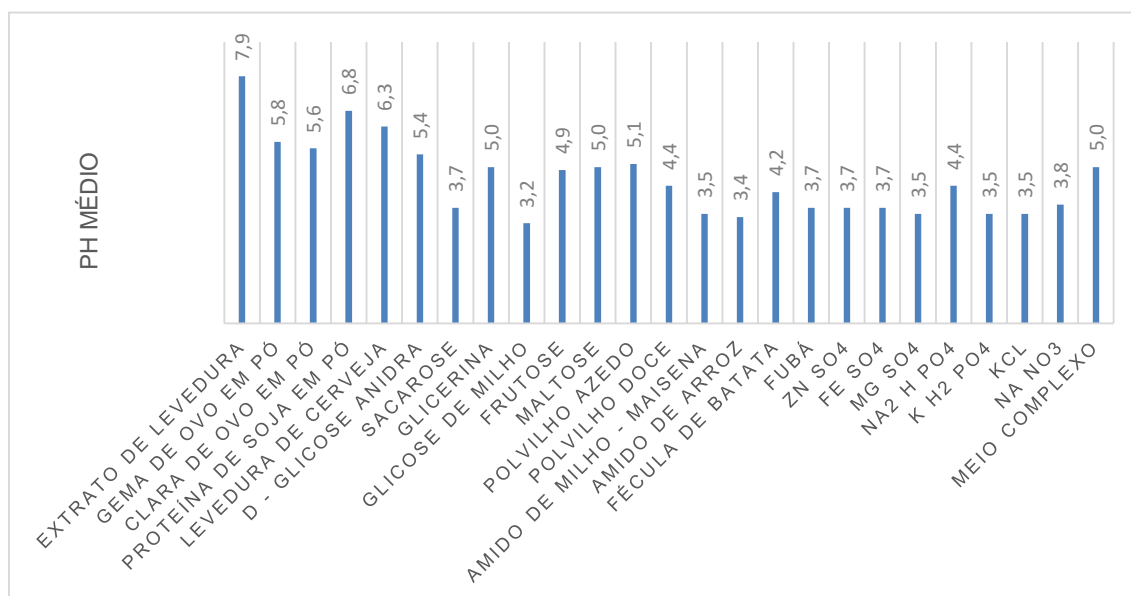


## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 pH.

O pH aumentou com o decorrer dos dias conforme o desenvolvimento do fungo em todos os tratamentos, iniciando com média 3,0 e atingindo média 7,9 no último dia de avaliação (Figura 5).

Segundo St Lager et al. (1999) muitas pesquisas têm examinado a relação entre produção e virulência de fungos entomopatogênicos com resultados contrastantes. O pH do ambiente pode regular a expressão da virulência de genes de *M. anisopliae*, bem como *M. anisopliae* pode regular o pH do ambiente. Além deste fator, podemos inferir que este também trata-se de um importante fator a ser avaliado a fim de se tornar um parâmetro de avaliação de produção do fungo em biofábricas.



**Figura 5.** Média de pH por tratamento ao 8º dia de desenvolvimento de *Metarhizium anisopliae*.

Costa et al. (2011) afirmaram que a concentração dos substratos estudados e o pH do meio influenciaram na atividade proteolítica do fungo. Neste mesmo estudo foram verificadas maiores atividades proteolíticas em caseína nos pH 8,0 e 9,0.

Já Rustiguel (2014) avaliou o pH ótimo para a produção de quitinases de isolados de *M. anisopliae* e concluiu que para o isolado IBCB 425, este seria entre 5,0 e 5,5. Conforme já citado anteriormente por St Lager et al. (1999), as quitinases estão relacionadas à patogenicidade e virulência dos fungos entomopatogênicos, levando a confirmar também a eficiência do meio de cultura complexo avaliado neste trabalho, que manteve seu pH com média 5,0 no decorrer do desenvolvimento do fungo.

## 4.2 Produção em fontes de Nitrogênio – Proteínas

Ao final do 8º dia de avaliação das fontes isoladas, considerando os parâmetros de concentração de blastosporos e corpos hifais e peso da biomassa, verificou-se o melhor desenvolvimento nos meios que contiveram Albumina e levedura de cerveja como fontes de nitrogênio (Tabelas 10 e 11). Albumina foi selecionada para desenvolvimento de meio de cultura complexo.

**Tabela 10.** Concentração de blastosporos e corpos hifais ( $\times 10^7$ ) de *Metarhizium anisopliae* produzido em fermentação líquida sob fontes de nitrogênio a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  e UR de  $70 \pm 5\%$

Tratamento	Concentração ( $\times 10^7$ )							
	2 dias		4 dias		6 dias		8 dias	
Extrato de Levedura	2,68 $\pm$ 0,79	b	3,12 $\pm$ 0,98	c	3,70 $\pm$ 1,00	b	3,36 $\pm$ 1,16	d
Gema de ovo em pó	0,30 $\pm$ 0,08	b	0,27 $\pm$ 0,74	c	0,96 $\pm$ 0,20	c	5,76 $\pm$ 1,00	d
Proteína de soja em pó	0,84 $\pm$ 0,12	b	1,32 $\pm$ 0,13	c	5,14 $\pm$ 0,62	b	11,14 $\pm$ 2,13	c
Levedura de Cerveja	32,20 $\pm$ 8,60	a	32,00 $\pm$ 6,10	a	58,80 $\pm$ 4,89	a	87,60 $\pm$ 4,39	a
Albumina	22,20 $\pm$ 3,81	a	16,80 $\pm$ 1,59	b	56,00 $\pm$ 6,32	a	62,80 $\pm$ 9,15	b
CV (%)	21,69		19,90		25,75		24,78	

Médias originais seguidas de mesmas letras na coluna não diferem significativamente pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados por  $\sqrt{x+0,5}$  na análise. C.V. (%) dos dados transformados.

**Tabela 11.** Peso da biomassa de *Metarhizium anisopliae* produzido em fermentação líquida sob fontes de nitrogênio a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  e UR de  $70 \pm 5\%$

Tratamento	Peso da Biomassa (g)			
	2 dias	4 dias	6 dias	8 dias
Extrato de Levedura	0,124 $\pm$ 0,120 a	0,000 $\pm$ 0,000 a	0,000 $\pm$ 0,000 b	0,000 $\pm$ 0,000 b
Gema de ovo em pó	0,000 $\pm$ 0,000 a	0,000 $\pm$ 0,000 a	0,039 $\pm$ 0,058 a	0,120 $\pm$ 0,055 a
Proteína de soja em pó	0,000 $\pm$ 0,000 a	0,000 $\pm$ 0,000 a	0,000 $\pm$ 0,000 b	0,000 $\pm$ 0,000 b
Levedura de Cerveja	0,004 $\pm$ 0,004 a	0,005 $\pm$ 0,005 a	0,000 $\pm$ 0,000 b	0,021 $\pm$ 0,022 b
Albumina	0,000 $\pm$ 0,000 a	0,000 $\pm$ 0,000 a	0,000 $\pm$ 0,000 b	0,000 $\pm$ 0,000 b
CV (%)	0,50	0,00	0,20	0,30

Médias originais seguidas de mesmas letras na coluna não diferem significativamente pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados por  $\sqrt{x+0,5}$  na análise. C.V. (%) dos dados transformados.

Em relação às fontes de Nitrogênio para produção de fungos entomopatogênicos, Sano (2005) aponta que os meios de cultura líquidos com baixas quantidades de extrato de levedura apresentam menor custo de produção, uma vez que as fontes de nitrogênio são mais caras que as fontes Carbono. Ainda segundo este autor, o custo dos componentes dos meios de cultura pode ser diminuído com pesquisas para se determinar produtos mais baratos que possam substituir a D-glicose anidra e o extrato de levedura, como fez o presente trabalho. Neste sentido, o presente trabalho utilizou albumina como fonte de N, diferenciando-se de Sano (2005) que utilizou extrato de levedura e Ottati-de-Lima (2007) que utilizou levedo de cerveja.

Ottati-de-lima (2007) também observou que os melhores meios para a produção de blastosporos são aqueles constituídos por uma menor concentração de nitrogênio e maior concentração de carbono. Esse fato também foi observado por Oliveira (2000) e Sano (2005), que acrescentaram diferentes concentrações de extrato de levedura aos meios líquidos para produção de *S. insectorum*, e *M. anisopliae*, respectivamente, e obtiveram as melhores produtividades com as menores concentrações de nitrogênio, motivo pelo qual o presente trabalho o fez, também quantificando esta fonte de proteína, entretanto sem muito sucesso comparado à produção deste fungo em Albumina.

### 4.3 Produção em fontes de Carbono – Dissacarídeos

Já em relação à avaliação das fontes isoladas de carbono, ao final do 8º dia de avaliação, considerando os parâmetros de concentração de blastosporos e corpos hifais e peso da biomassa, verificou-se o melhor desenvolvimento nos meios que contiveram Glicose de Milho, Maltose e sacarose (Tabelas 12 e 13). Sendo a Sacarose selecionada para a etapa de produção de meio de cultura complexo em virtude de seu menor custo e maior facilidade de aquisição em larga escala no mercado.

**Tabela 12.** Concentração de blastosporos de corpos hifais ( $\times 10^7$ ) de *Metarhizium anisopliae* produzido em fermentação líquida sob fontes de carbono a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  e UR de  $70 \pm 5\%$

Tratamento	Concentração ( $\times 10^7$ )			
	2 dias	4 dias	6 dias	8 dias
D-Glicose Anidra	0,17 $\pm$ 0,02 c	0,35 $\pm$ 0,04 c	1,35 $\pm$ 0,37 c	1,60 $\pm$ 0,50 cd
Sacarose	0,19 $\pm$ 0,03 c	0,34 $\pm$ 0,07 c	1,58 $\pm$ 0,20 c	12,60 $\pm$ 2,77 b
Glicerina	0,41 $\pm$ 0,06 c	0,14 $\pm$ 0,02 c	0,62 $\pm$ 0,13 cd	0,85 $\pm$ 0,20 d
Glicose de Milho	20,00 $\pm$ 5,47 a	494,00 $\pm$ 34,15 a	526,00 $\pm$ 28,91 a	436,00 $\pm$ 14,70 a
Frutose	0,26 $\pm$ 0,03 c	0,37 $\pm$ 0,80 c	0,29 $\pm$ 0,90 d	0,42 $\pm$ 0,10 d
Maltose	1,67 $\pm$ 0,17 b	2,96 $\pm$ 0,20 b	3,08 $\pm$ 0,21 b	3,44 $\pm$ 0,20 c
CV (%)	15,86	48,24	47,64	43,25

Médias originais seguidas de mesmas letras na coluna não diferem significativamente pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados por  $\sqrt{x+0,5}$  na análise. C.V. (%) dos dados transformados.

**Tabela 13.** Peso da biomassa de *Metarhizium anisopliae* produzido em fermentação líquida sob fontes de carbono a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  e UR de  $70 \pm 5\%$

Tratamento	Peso da Biomassa (g)			
	2 dias	4 dias	6 dias	8 dias
D-Glicose Anidra	0,001 $\pm$ 0,001 a	0,000 $\pm$ 0,000 b	0,000 $\pm$ 0,000 a	0,000 $\pm$ 0,000 c
Sacarose	0,001 $\pm$ 0,000 a	0,000 $\pm$ 0,000 b	0,000 $\pm$ 0,000 a	0,001 $\pm$ 0,000 a
Glicerina	0,001 $\pm$ 0,000 a	0,000 $\pm$ 0,000 b	0,000 $\pm$ 0,000 a	0,000 $\pm$ 0,000 a b
Glicose de Milho	0,002 $\pm$ 0,000 a	0,001 $\pm$ 0,000 b	0,001 $\pm$ 0,000 a	0,000 $\pm$ 0,000 b c
Frutose	0,000 $\pm$ 0,000 a	0,000 $\pm$ 0,000 b	0,000 $\pm$ 0,000 a	0,000 $\pm$ 0,000 b c
Maltose	0,000 $\pm$ 0,000 a	0,003 $\pm$ 0,001 a	0,000 $\pm$ 0,000 a	0,001 $\pm$ 0,000 a
CV (%)	0,00	0,00	0,00	0,00

Médias originais seguidas de mesmas letras na coluna não diferem significativamente pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados por  $\sqrt{x+0,5}$  na análise. C.V. (%) dos dados transformados.

Quando avaliou-se fonte de Carbono, foi possível observar em trabalhos como o de Wenzel et al. (2005), que as maiores produções de conídios foram obtidas nos meios com maiores quantidades de dextrose e à medida que foi aumentando o tempo de cultivo a exigência em carbono foi aumentando também. Os meios líquidos com as maiores concentrações de dextrose foram aqueles que obtiveram maior massa micelial (WENZEL et al., 2005).

Já Ottati-de-lima (2007) avaliou a produção de *M. anisopliae* em D-Glicose anidra e sacarose somadas a extrato de levedura e concluiu que os melhores meios de cultura foram aqueles que apresentaram D-glicose anidra como fonte de Carbono.

Em estudos mais recentes, Maldonado-Blanc et al. (2011) relataram o crescimento de *B. bassiana* em meios líquidos contendo casaminoácidos, licor de milho macerado e peptona, já Latifian et al. (2014) testaram fontes de carbono para produção deste fungo em meio líquido e constatou que o melado de cana proporcionou significativa produção de blastosporos, entretanto esta não foi uma fonte de C testada no presente trabalho, nos abrindo novas possibilidades para avaliação e alternativas de menor custo.

#### **4.4 Produção em fontes Carbono – Polímeros**

Ao final do 8º dia de avaliação das fontes de carbono - polímeros, considerando os parâmetros de concentração de blastosporos e corpos hifais e peso da biomassa, verificou-se o melhor desenvolvimento nos meios que contiveram Polvilho Doce e Amido de Arroz, respectivamente (Tabelas 14 e 15). Entretanto estes dados foram descartados devido à baixa concentração e alta viscosidade em relação às demais fontes de carbono.

**Tabela 14.** Concentração de blastosporos de corpos hifais ( $\times 10^7$ ) de *Metarhizium anisopliae* produzido em fermentação líquida sob fontes de carbono - dissacarídeos a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  e UR de  $70 \pm 5\%$ .

Tratamentos	Concentração ( $\times 10^7/\text{mL}$ )			
	2 dias	4 dias	6 dias	8 dias
Polvilho azedo	0,10 $\pm$ 0,03 a	0,12 $\pm$ 0,01 b	0,52 $\pm$ 0,02 bc	0,45 $\pm$ 0,04 b
Polvilho doce	0,02 $\pm$ 0,01 b	4,06 $\pm$ 0,64 a	1,01 $\pm$ 0,25 a	0,80 $\pm$ 0,02 a
Amido milho	0,08 $\pm$ 0,02 a	0,11 $\pm$ 0,01 b	0,10 $\pm$ 0,01 d	0,10 $\pm$ 0,00 d
Amido arroz	0,01 $\pm$ 0,00 b	0,03 $\pm$ 0,00 b	0,67 $\pm$ 0,06 b	0,80 $\pm$ 0,02 a
Fécula batata	0,02 $\pm$ 0,00 b	0,02 $\pm$ 0,01 b	0,05 $\pm$ 0,04 d	0,10 $\pm$ 0,03 d
Fubá milho	0,10 $\pm$ 0,01 a	0,17 $\pm$ 0,01 b	0,30 $\pm$ 0,02 cd	0,18 $\pm$ 0,01 c
CV (%)	0,13	0,32	0,38	0,05

Médias originais seguidas de mesmas letras na coluna não diferem significativamente pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados por  $\sqrt{x+0,5}$  na análise. C.V. (%) dos dados transformados.

**Tabela 15.** Peso da biomassa (g) de *Metarhizium anisopliae* produzido em fermentação líquida sob fontes de carbono - polímeros a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  e UR de  $70 \pm 5\%$

Tratamento <sup>1</sup>	Peso da Biomassa (g)			
	2 dias	4 dias	6 dias	8 dias
Polvilho azedo	0,03 $\pm$ 0,01 ab	0,01 $\pm$ 0,00 ab	0,01 $\pm$ 0,01 b	0,02 $\pm$ 0,00 b
Polvilho doce	0,06 $\pm$ 0,02 a	0,01 $\pm$ 0,00 a	0,02 $\pm$ 0,00 a	0,03 $\pm$ 0,01 a
Amido milho	0,01 $\pm$ 0,01 b	0,01 $\pm$ 0,00 bc	0,00 $\pm$ 0,00 c	0,00 $\pm$ 0,00 c
Amido arroz	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 c	0,00 $\pm$ 0,00 c	0,00 $\pm$ 0,00 c
Fécula batata	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 c	0,00 $\pm$ 0,00 c	0,00 $\pm$ 0,00 c
Fubá milho	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 c	0,00 $\pm$ 0,00 c	0,00 $\pm$ 0,00 c
CV (%)	0,13	0,32	0,38	0,05

Médias originais seguidas de mesmas letras na coluna não diferem significativamente pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados por  $\sqrt{x+0,5}$  na análise. C.V. (%) dos dados transformados.

#### 4.5 Produção em fontes de Sais

Por fim, quando tratamos da avaliação das fontes isoladas de sais, ao final do 8º dia de avaliação e também considerando os parâmetros de concentração de

blastosporos e corpos hifais, verificou-se o melhor desenvolvimento nos meios que contiveram Mg SO<sub>4</sub>, KCl e NaNO<sub>3</sub> (Tabela 16). Entretanto, ao analisarmos os dados de peso de biomassa, se observou que KCl e NaNO<sub>3</sub> apresentaram os maiores valores (Tabela 17), sendo estes selecionados para a etapa de produção de meio de cultura complexo

**Tabela 16.** Concentração de blastosporos e corpos hifais ( $\times 10^7$ ) de *Metarhizium anisopliae* produzido em fermentação líquida sob fontes de Sais a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  e UR de  $70 \pm 5\%$

Tratamento	Concentração ( $\times 10^7$ )							
	2 dias		4 dias		6 dias		8 dias	
Zn SO <sub>4</sub>	0,77 $\pm$ 0,08	c	3,86 $\pm$ 0,94	b c	2,50 $\pm$ 1,10	c	0,84 $\pm$ 0,11	c
Fe SO <sub>4</sub>	1,29 $\pm$ 0,10	c	1,38 $\pm$ 0,10	c	1,72 $\pm$ 0,10	c	0,86 $\pm$ 0,76	c
Mg SO <sub>4</sub>	0,84 $\pm$ 0,21	c	11,74 $\pm$ 2,29	a b	12,12 $\pm$ 1,70	a	10,68 $\pm$ 2,38	a b
Na <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub>	1,47 $\pm$ 0,58	c	2,68 $\pm$ 0,65	c	8,20 $\pm$ 1,40	b	7,64 $\pm$ 0,73	b
K H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,55 $\pm$ 0,45	c	4,50 $\pm$ 0,65	b c	6,62 $\pm$ 1,13	b	10,46 $\pm$ 1,43	a b
KCl	4,86 $\pm$ 0,46	b	5,62 $\pm$ 0,83	b c	7,54 $\pm$ 0,93	b	8,44 $\pm$ 1,70	a b
Na NO <sub>3</sub>	12,20 $\pm$ 2,19	a	30,06 $\pm$ 20,51	a	9,22 $\pm$ 0,90	a b	13,42 $\pm$ 2,74	a
CV (%)	10,18		15,46		8,82		11,48	

Médias originais seguidas de mesmas letras na coluna não diferem significativamente pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados por  $\sqrt{x+0,5}$  na análise. C.V. (%) dos dados transformados.

**Tabela 17.** Peso da biomassa de *Metarhizium anisopliae* produzido em fermentação líquida sob fontes de Sais a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  e UR de  $70 \pm 5\%$

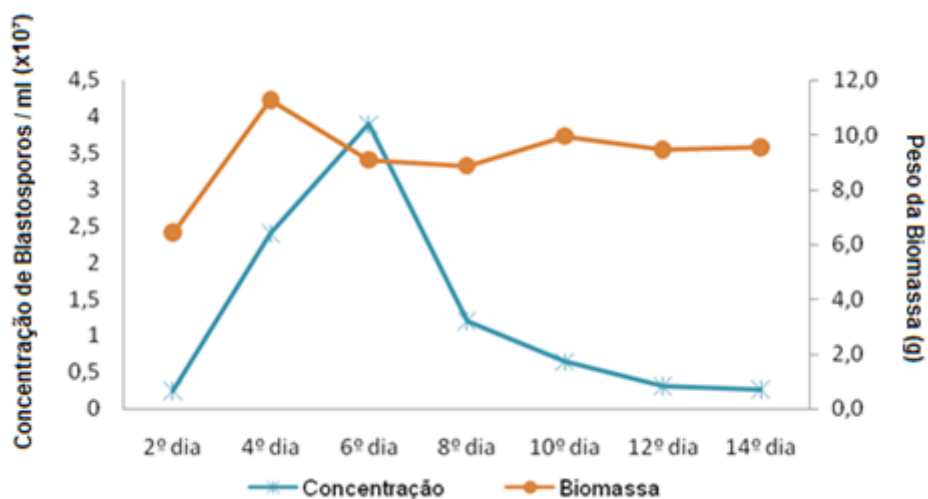
Tratamento	Peso da Biomassa (g)							
	2 dias		4 dias		6 dias		8 dias	
Zn SO <sub>4</sub>	0,000 $\pm$ 0,000	b	0,000 $\pm$ 0,000	d	0,001 $\pm$ 0,000	d	0,005 $\pm$ 0,003	a b
Fe SO <sub>4</sub>	0,000 $\pm$ 0,000	b	0,003 $\pm$ 0,000	b c	0,004 $\pm$ 0,000	a b	0,004 $\pm$ 0,000	b
Mg SO <sub>4</sub>	0,000 $\pm$ 0,000	b	0,001 $\pm$ 0,000	c	0,002 $\pm$ 0,000	cd	0,003 $\pm$ 0,000	b
Na <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub>	0,000 $\pm$ 0,000	b	0,001 $\pm$ 0,000	c	0,003 $\pm$ 0,000	b c	0,005 $\pm$ 0,001	a b
K H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,001 $\pm$ 0,000	b	0,001 $\pm$ 0,000	c	0,002 $\pm$ 0,000	cd	0,002 $\pm$ 0,000	b
KCl	0,003 $\pm$ 0,000	a	0,004 $\pm$ 0,000	a b	0,006 $\pm$ 0,000	a	0,008 $\pm$ 0,000	a
Na NO <sub>3</sub>	0,002 $\pm$ 0,000	a	0,005 $\pm$ 0,000	a	0,003 $\pm$ 0,000	cd	0,008 $\pm$ 0,000	a
CV (%)	0,00		0,00		0,00		0,00	

Médias originais seguidas de mesmas letras na coluna não diferem significativamente pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados por  $\sqrt{x+0,5}$  na análise. C.V. (%) dos dados transformados.

Ao avaliar a adição de sais à produção de *M. anisopliae*, Schamne (2010) e Schamne et al. (2012) constataram que a adição de KCl ao meio sólido proporciona o aumento na produção do fungo. Tal resultado, mesmo em se tratando de diferentes substratos, leva a verificar a eficiência da adição deste sal para a produção de *M. anisopliae*, conforme constatado também pelo presente trabalho.

#### 4.6 Produção em Meio de Cultura Complexo

Quando submetido à produção em fermentação líquida com Meio de Cultura Complexo contendo Albumina, Sacarose, KCl e  $\text{NaNO}_3$ , o fungo *M. anisopliae* apresentou, em laboratório, seu pico de produção de blastosporos com concentração de  $4 \cdot 10^7$  com/mL no 6º dia de desenvolvimento. A estabilização do peso de biomassa pôde ser observada no 10º dia de desenvolvimento, conforme observado na figura 6. Tais resultados permitem inferir, que a partir do 4º dia de desenvolvimento, o fungo diminuiu sua produção de biomassa, voltando-se para a produção de blastosporos. Tais resultados nos permitem, ainda, conhecer o comportamento do fungo sob este meio de cultura.



**Figura 6.** Curva de crescimento do fungo *Metarhizium anisopliae* submetido à fermentação líquida em Meio de Cultura complexo a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  e UR de  $70 \pm 5\%$ , por 14 dias.



Entretanto, ao se observar o desenvolvimento do mesmo meio complexo em fermentador industrial, observou-se que o mesmo pode alcançar a concentração de  $1.10^9$  com/mL no 2º dia de fermentação. Tais resultados aplicados à produção em larga escala ainda precisam ser melhor estudados, padronizando-se tanto a metodologia quanto a estabilidade de tal produção.

De acordo com Ottati-de-lima (2007), apesar de existirem algumas dificuldades práticas para a produção de fungos em meios líquidos, esse método tem grandes vantagens no que se refere à facilidade de aplicação em condições de campo, uma vez o produto já se encontrará pronto para ser utilizado, diminuindo-se os gastos com mão-de-obra para a lavagem do material como é feito quando produzido em meio sólido de arroz.

Oliveira (2000), estudou meios de cultura líquidos para o desenvolvimento de *S. insectorum*, observando que os meios compostos por extrato de farelo de trigo proporcionaram ao fungo esporulação superior àquela verificada nos meios sólidos à base de arroz pré-cozido, com  $1,03 \times 10^9$  conídios/mL.

#### **4.7 Produção em meio sólido**

Avaliando-se a produção em meio sólido, pela metodologia tradicional de inoculação do fundo em saquinhos de arroz, contatou-se uma média de concentração de  $3 \times 10^9$  conídios/g.

Ottati-de-lima (2007), em seu estudo ainda complementou que o sucesso desta metodologia de produção de *M. anisopliae* por tantos anos se deve, grandemente, ao fato de que, quando se usam grãos inteiros de arroz para preparar o meio de cultura, formam-se interstícios que multiplicam notavelmente a superfície do meio, o que permite ao fungo penetrar totalmente na massa do substrato. Esse detalhe não se verifica com a maioria dos meios de cultura, onde o *M. anisopliae* cresce, exclusivamente, na superfície exposta à oxigenação direta.

#### **4.8 Patogenicidade**

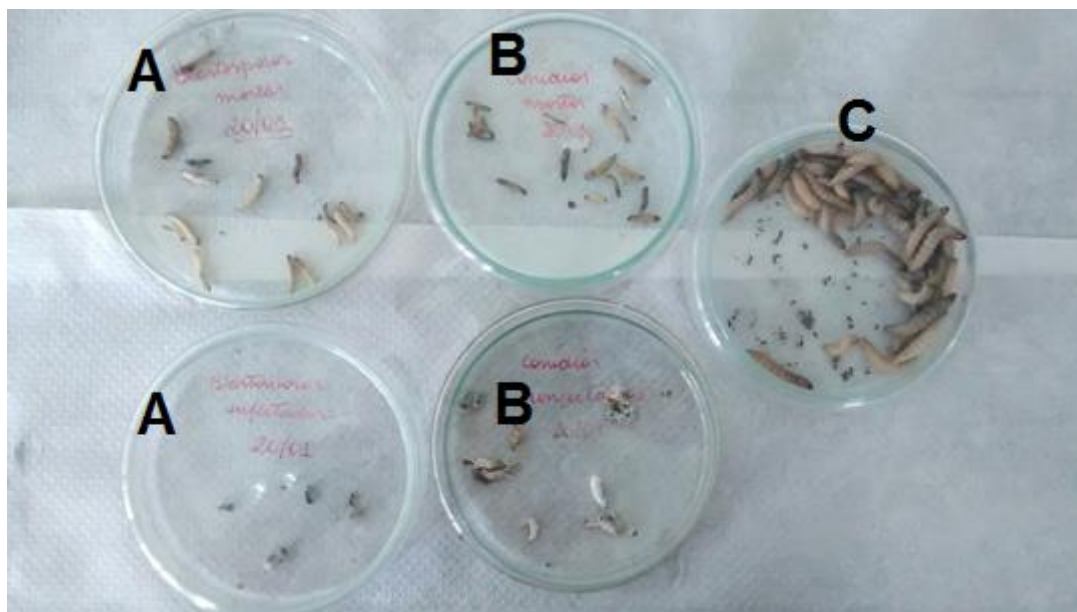
Ao final da avaliação de patogenicidade, os tratamentos com conídios e com blastosporos não diferiram estatisticamente entre si. O tratamento com blastosporos produzidos sob fermentação líquida, com o meio complexo estudado, ocasionou 78% de mortalidade enquanto o tratamento com conídios apresentou 80% de mortalidade das lagartas (Tabela 18 e Figura 7).

**Tabela 18.** Mortalidade média de lagartas de *Galleria mellonella* após serem tratadas com *Metarhizium anisopliae* produzido por fermentação líquida e meio sólido

Tratamento	Média de mortas	Mortalidade (%)
Blastosporos	7,857 ± 0,459 a	78,57
Conídios	8,000 ± 0,436 a	80
Testemunha	0,2857 ± 0,184 b	2,86

Médias originais seguidas de mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados por  $\sqrt{x+0,5}$  na análise. CV= 45%

Avaliando a patogenicidade de *M. anisopliae* em diferentes processos de produção, Ottati-de-lima (2007) constatou, que o fungo produzido nos substratos sólidos mostrou-se mais virulento (acima de 70%) quando comparado com os meios líquidos (abaixo de 30%).



**Figura 7.** Teste de Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae*, produzido por fermentação líquida e meio sólido, a lagartas de *Galleria mellonella*. **A**; lagartas mortas após infecção por blastosporos provenientes de fermentação líquida. **B**; lagartas mortas após infecção por conídios provenientes de produção em meio sólido. **C**; lagartas vivas (testemunha). **Fonte:** Arquivo pessoal Isabella Gotti

#### 4.9 Análise de custos da produção por meio sólido e/ou fermentação líquida

##### 4.9.1 Custo de aquisição de materiais diretos

Os resultados de custos de materiais diretos para a produção de fungos entomopatogênicos em meio sólido e líquido estão apresentados nas Tabelas 19 e 20, respectivamente.

**Tabela 19.** Custo de aquisição de materiais diretos, utilizados para a produção de 1kg de produto acabado, pelo processo em meio sólido.

Especificação	Quantidade (g)	Valor (R\$)
<b>Inóculo</b>		
Meio de Cultura BDA	0,005	R\$ 1,00
Total / L		R\$ 1,00
<b>Produção Massal</b>		
Arroz	1	R\$ 3,00
Embalagem plástica para Autoclave	0,01	R\$ 0,70
Água	2	R\$ 12,00
Embalagem do produto acabado	0,01	R\$ 0,70
Total / Kg		R\$ 16,40

**Tabela 20.** Custo de aquisição de materiais diretos, utilizados para a produção de 1L de produto acabado, pelo processo em fermentação líquida.

Especificação	Quantidade (L)	Valor (R\$)
<b>Inóculo Inicial</b>		
Meio de Cultura BDA	0,005	R\$ 1,00
Albumina	0,31	R\$ 9,30
Açúcar comum	0,53	R\$ 1,86
NaNO <sub>3</sub>	0,016	R\$ 1,60
KCl	0,01	R\$ 1,00
Pentabiótico	0,01	R\$ 0,10
Água	1,5	R\$ 9,00
Total / L		R\$ 23,86
<b>Cultivo final</b>		
Albumina	0,31	R\$ 9,30
Açúcar comum	0,53	R\$ 1,86
NaNO <sub>3</sub>	0,016	R\$ 1,60
KCl	0,01	R\$ 1,00
Água	1,5	R\$ 9,00
Antiespumante	0,01	R\$ 0,15
Pentabiótico	0,01	R\$ 0,10
Embalagem final	1	R\$ 4,00
Total / L		R\$ 27,01

#### 4.9.2 Custo operacional

Após a apresentação dos elementos para apropriação dos custos, tem-se os seguintes resultados de custo operacional, aplicados a cada processo de produção:

##### A) Meio Sólido:

Despesa Fixa / mês	R\$	12.109,05
Mão-de-obra Direta / mês	R\$	23.220,00
Quantidade Produzida kg / mês		13.200,00
Matéria-prima / mês	R\$	216.480,00

Custo operacional (kg) =  $\frac{\text{Despesa Fixa} + \text{Mão de Obra} + \text{Matéria Prima}}{\text{Quantidade Produzida}}$

Custo operacional (kg) = R\$ 19,08

##### B) Meio Líquido:

Despesa Fixa / mês	R\$	16.080,38
Mão-de-obra Direta / mês	R\$	18.900,00
Quantidade Produzida L / mês		13.200,00
Matéria-prima / mês	R\$	356.466,00

Custo operacional (L) =  $\frac{\text{Despesa Fixa} + \text{Mão de Obra} + \text{Matéria Prima}}{\text{Quantidade Produzida}}$

Custo operacional (L) = R\$ 29,66

A fórmula utilizada para o cálculo dos custos operacionais foi aplicada conforme descrição no tópico 3.6.6 do presente trabalho, considerando valores de despesas fixas, mão de obra e matéria prima gastos no mês para produção diária de 600 Kg de fungo por meio sólido e 600 L de fungo por meio líquido.

#### 4.9.3 Preço de venda

Seguindo a metodologia de custos utilizada por Leite et al (2003), a título de sugestão, foi utilizado um percentual de 10% de Lucro Líquido, podendo ser alterado para efeito de testes, bastando alterar na fórmula descrita no item 3.6.7 do presente trabalho.

Sendo assim, com base nas despesas de comercialização e lucro líquido estimados, os resultados calculados para o preço de venda de cada produto são de R\$ 28,82 o quilo de *M. anisopliae* sólido, em arroz e R\$ 44,80 para o litro de *M. anisopliae* líquido, sem formulação, conforme descrito na tabela 21.

**Tabela 21.** Preço de venda para os produtos fabricados

<b>Tipo de produto por metodologia de produção</b>	<b>Preço de venda</b>	
Produto Sólido	R\$	28,82
Produto Líquido	R\$	44,80

O preço de venda do produto líquido ter se apresentado maior do que o produto sólido, impacta também em um maior custo de tratamento por hectare ao produtor rural. Entretanto a relação custo-benefício do produto líquido deve ser levada em consideração, visto os motivos elencados como objeto do presente trabalho, que é possibilitar a facilidade operacional e logística dos fungos entomopatogênicos produzidos por fermentação líquida em relação ao produto convencional produzido em arroz.

#### 4.9.4 Margem de Contribuição

Já quando calculada a margem de contribuição, demonstrada na Tabela 22, é possível verificar que *M. anisopliae* produzido por fermentação líquida, proporciona uma margem de contribuição de R\$ 15,15 por litro, enquanto o mesmo fungo produzido pelo método convencional sólido, proporciona uma margem de contribuição de R\$ 9,74.

**Tabela 22.** Margem de contribuição para *Metarhizium anisopliae* produzido pelas diferentes metodologias.

	<b>Produto Sólido</b>		<b>Produto Líquido</b>	
Preço de Venda	R\$	28,82	R\$	44,80
Custo Operacional	R\$	19,08	R\$	29,66
Margem de Contribuição	R\$	9,74	R\$	15,15

Segundo Megliorini (2012), uma empresa só começa a ter lucro quando a margem de contribuição dos produtos vendidos supera os custos e as despesas fixas do exercício, motivo pelo qual foi calculada no presente trabalho; confirmando a viabilidade econômica do negócio.

## 5 ANÁLISE DE VIABILIDADE ECONÔMICA

Uma das características mais desejáveis de um meio de cultura para produção de conídios infectivos a determinado inseto é a produção do maior número possível de conídios por grama de substrato a um menor custo (ADAMEK, 1965; GOETTEL, 1984). Este fator também deve ser aplicado à realidade da produção por fermentação líquida, que deve proporcionar um bom rendimento de blastosporos por litro de produto, para que seu custo de aplicação por hectare se torne menor. Entretanto, caso o meio desenvolvido tenha custo elevado, a última etapa do trabalho seria substituir os componentes nutricionais por um substrato complexo, barato e acessível (JACKSON et al., 1996; JACKSON, 1997).

É possível notar que os estudos sobre produção de fungos entomopatogênicos tem avançado bastante, demonstrando que a quantidade e qualidade do material produzido podem ser dependentes de diferentes fatores como isolado de fungo utilizado, dos nutrientes utilizados e proporção dos mesmos no preparo do meio de cultura, do manejo nutricional, do manejo ambiental, dentre outros (LEITE et al., 2003).

De acordo Leite et al. (2003) e com os resultados apresentados no presente trabalho, é possível inferir que o custo de implantação dos equipamentos da biofábrica *versus* o rendimento e o custo operacional devem ser levados em conta, além do rendimento por hectare aplicado, principalmente para o cálculo do custo-benefício pelo consumidor final. O presente trabalho mostrou ainda que a margem de contribuição também é um importante fator a ser considerado para a decisão sobre o método de produção.

Neste sentido, o cultivo submerso em meio líquido dos fungos entomopatogênicos poderá se apresentar como uma das principais alternativas de produção de fungos em um futuro próximo, uma vez que tem se conseguido bons resultados em diferentes meios de cultura, por diferentes trabalhos.

Por fim, é importante considerar que o controle microbiano de pragas ainda trata-se de um campo pouco explorado, principalmente pela escassez de biofábricas e produtos no mercado. Este fato pode ser explicado pela deficiência em pesquisas que visem o desenvolvimento de produtos e processos e ao pequeno investimento feito pelo setor privado no desenvolvimento dos mesmos, quando comparados aos inseticidas químicos.



## 6 CONCLUSÃO

- O meio de cultura contendo Albumina, Sacarose,  $\text{NaNO}_3$  e KCl foi eficiente para o desenvolvimento de *Metarhizium anisopliae* e não interferiu em sua patogenicidade;
- A produção de *Metarhizium anisopliae* é economicamente viável tanto por fermentação líquida quanto pelo método convencional sólido em arroz.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMEK, L. Submerse cultivation of the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.). **Folia Microbiologic**, Prague, n. 10, p. 255-267, 1965.
- ALMEIDA, J. E. M. Resultados do controle biológico da cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar com *Metarhizium anisopliae*. In: Reunião itinerante de fitossanidade do Instituto Biológico – RIFIB, 9, 2003, Catanduva, SP, **Anais...**, 2003, p.32-41.
- ALMEIDA, J. E. M. Como controlar. **Revista Cultivar – Grandes culturas**. n. 177, Ano XV, Pelotas, Fevereiro. p. 30-31, 2014.
- ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A. Controle biológico da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar com o fungo *Metarhizium anisopliae*. **Boletim Técnico do Instituto Biológico**, São Paulo, 19pp., 2006.
- ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A.; LEITE, L. G. Controle da cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* em cana cultivada no sistema orgânico. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS E ALCOOLEIROS DO BRASIL, 8, 2002, Recife. **Anais...** Recife: STAB, 2002<sup>a</sup>, v.21, n.1, p.79 – 83.
- ALMEIDA, J. E. M.; COSTA, V. A.; BATISTA FILHO, A.; LEITE, L. G.; MACHADO, L. A.; SANO, A. H. Programas de controle biológico da cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* no estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 19, 2002, Manaus. **Resumos...** Manaus: 2002b, p.71.
- ALVARENGA, A. R. M.; CRUZ, B. P. B.; OLIVEIRA, D. A.; SILVEIRA, A. P.; BULISANI, E. A. Novos testes de cultivo de fungos utilizados em controle biológico usando meios de cultura naturais e líquidos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.55, n.1, p.31 – 35, 1988.
- ALVES, S. B. Agentes entomopatogênicos no controle microbiano. In: ALVES, S. B. (Coord.). **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole, 1986. p. 73-126.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B (ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2. Ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap 11, p.289 – 381.
- ALVES, S. B.; ALMEIDA, J. E. M. Controle biológico das pragas das pastagens. In: SIMPÓSIO SOBRE ECOSSISTEMA DE PASTAGENS, 3, 1997, Jaboticabal. **Resumos...** Jaboticabal, 1997, p.318 – 341.
- ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2<sup>a</sup> ed. Piracicaba: FEALQ, 1998, Cap. 27, p. 845 -869.
- AQUINO, M. L. N. O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, no Estado de Pernambuco. **Boletim Técnico do Instituto de Pesquisas Agrônomicas**, Recife, v.72, p.1-26, 1974.
- BATISTA FILHO, A.; ALVES, S. B.; ALVES, L. F. A.; PEREIRA, R. M.; AUGUSTO, N. T. Formulações de entomopatogênos. In: ALVES, S.B (ed.). **Controle Microbiano de insetos**. 2<sup>a</sup> ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap. 31, p. 917 -965.
- BATISTA FILHO, A.; CRUZ, B. P. B.; CAMARGO, L. M. P. C.; OLIVEIRA, D. A. Crescimento de *Beauveria sp.*, isolado de bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman), em meios de cultura naturais líquidos. **Arquivos do Instituto Biológico**,

São Paulo, v51, n.1, p. 17-21, 1985.

BENTO, J. M. S. Perdas por insetos na agricultura. *Ação Ambiental II*, v4, p.19-21, 1999.

CONNORS, N. C. Culture medium optimization and scale-up for microbial fermentations. In: VINCI, V. A.; PAREKH, S. R. **Handbook of industrial cell culture: mammalian, microbial, and plant cells**. New Delhi: Humana Press, 2002. p. 171-193.

COSTA, M. D. M. & MAGALHÃES, C. D. Um novo meio de cultura para o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metch) Sorok., parasito da cigarrinha das pastagens. **IBB Salvador**, Salvador, v.13, n.1, p.57-60, 1974.

COSTA, P. M. O; TIAGO, P. V. NASCIMENTO, T. L. Influência de diferentes pH e concentrações de substrato cuticular e não-cuticular na atividade proteolítica de isolados de *Metarhizium anisopliae*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.78, n.3, p.465-469, 2011

DAOUST, R. A; ROBERTS, D. W. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: effect of temperature and relative humidity on conidia viability and virulence against mosquitos. **Journal of Invertebrate Pathology**. 40, 228-36, 1986.

DESTÉFANO, R. H. R. **Detecção e identificação de *Metarhizium anisopliae* em larvas de *Diatraea Saccharalis* por primers específicos**. 2003. 87 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2003.

DINARDO-MIRANDA, L. L. **Cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar**. Campinas : Instituto Agrônômico, 2003. 72p.

DURAN, R.; CARY, J. W.; CALVO, A. M. Role of the osmotic stress regulatory pathway in morphogenesis and secondary metabolism in filamentous fungi. **Toxins**, Basel, v. 2, n. 4, p. 367-381, 2011.

ESPINOSA-BECERRIL, A.; CARRILLO-SANCHEZ, J. L. El hongo *Hirsutella thompsonii* Fisher em el control del eriódido del cocotero *Eriophyes guerreronis* (Keifer). **Agricultura Técnica**, 12: 319-323, 1986

FRONZAGLIA, T. Avaliação e projeção do impacto econômico do controle biológico da Cigarrinha da raiz na Cana-de-açúcar (2000 – 2005). In: Simpósio de Gestão da Inovação Tecnológica. XXIV, 2006, Gramado. **Anais...Gramado: Associação Nacional de Pós-Graduação e Pesquisa em Administração**, 2006. p.3.

GALLO, D. et al. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: Fealq, 2002. 920 p.

GOETTEL, M. S. A simple method for mass culturing entomopathogenic hyphomycete fungi. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 3, n. 1, p. 15-20, 1984.

GUAGLIUMI, P.; MARQUES, E. J.; VILAS BOAS, A.M. Contribuição ao estudo da cultura e aplicação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. no controle da cigarrinha da folha *Mahanarva posticata* (Stal) no Nordeste do Brasil. **Boletim Técnico da CODECAP**, Recife, v.3, 54pp., 1974.

IBGE. **Indicadores IBGE**: Estatística da Produção Agrícola. Setembro 2013. Disponível em:

<[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr\\_201309.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201309.pdf)> Acesso em 12. Mar. 2016.

JARONSKI, S. T.; JACKSON, M. A. Mass production of entomopathogenic Hypocreales. In: LACEY, L. A. **Manual of techniques in invertebrate pathology**. 2nd ed.

Amsterdam: Elsevier, 2012. p. 255-284.

JACKSON, M. A. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 19, n. 3, p. 180-87, 1997.

JENKINS, N. E.; HEVIEFO, G.; LANGEWALD, J.; CHERRY, A. J.; LOMER, C. J. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. **Biocontrol News and Information**, v.19, n.1, 1998.

KAMPEN, W. H. Nutritional requirements in fermentation. In: TODARO, C. C.; VOGEL, H. C. **Fermentation and biochemical engineering handbook: principles, process design, and equipment**. 3rd ed. Oxford: William Andrew, 2014. p. 37-57.

KHALIL, S. K. et al. Laboratory studies on the compatibility of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* with certain pesticides. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.13, p.329-334, 1985.

LATIFIAN, M.; RAD, B.; AMANI, M. Mass production of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* by using agricultural products based on liquid- solid diphasic method for date palm pest control. **International Journal of Farming and Allied Sciences**. Pakistan, Vol., 3 (4): 368-372, 2014

LEITE, L. G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; ALVES, S. B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: Oesp, 2003. 92p.

LEITE, L. G.; BATISTA FILHO, A.; CRUZ, B. P. B.; MACHADO, L. A. Produção de fungos entomopatogênicos para o controle biológico de pragas, p. 79-92. In: CRUZ, B.P.B.; BATISTA FILHO, A.; LEITE, L.G. (Coord.), **Ciclo de palestras sobre controle biológico de pragas**, Campinas, Fundação Cargil, 1992. 125 p .

LI, Q.; BAI, Z.; O'DONNELL, A.; HARVEY, L. M.; HOSKISSON, P. A.; McNEIL, B. Oxidative stress in fungal fermentation processes: the roles of alternative respiration. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 33, n. 3, p. 457-467, 2011.

LOUREIRO, E. S. **Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* para o controle de cigarrinha da raiz *Mahanarva fimbriolata***. Piracicaba: 2003. 64 f. (Tese de Doutorado) – Departamento de Fitossanidade, Universidade Estadual Paulista.

MACEDO, N.; CAMPOS, M. B. S.; ARAÚJO, J. R. Insetos nas raízes e colo da planta, perfilhamento e produtividade em canaviais colhidos com e sem queima. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.15, n.3, p.18-21, 1997.

MARQUES, E.J.; VILLAS BOAS, A.M. Contribuição ao estudo da cultura e aplicação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) no controle da cigarrinha da folha (*Mahanarva posticata*) no Nordeste do Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE ENTOMOLÓGICA DO BRASIL, 1, 1973, Viçosa. **Livro de Resumos...** Viçosa: 1973. p.70.

MARTIGNONI, M. E. Mass production of insect pathogens, p. 570-609. In: De BACH, P. (ed.), **Biological control of insect pests and weeds**, New York, Reinhold Publishing Corporatin. 1964.

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

MASCARIN, G. M.; JACKSON, M. A.; KOBORI, N. N.; BEHLE, R. W.; DELALIBERA, I. Jr. Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 127, p. 11–20, 2015a.

MASCARIN, G. M.; JACKSON, M. A.; KOBORI, N. N.; BEHLE, R. W.; DUNLAP, C. A.; DELALIBERA Jr., I. Jr. Glucose concentration alters dissolved oxygen levels in liquid cultures of *Beauveria bassiana* and affects formation and bioefficacy of blastospores. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 99, n. 16, p. 6653-6665, 2015b.

MASCARIN, G. M.; QUINTELA, E. D. **Técnica de produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* para uso em controle biológico.** Embrapa Arroz e Feijão, 2013. 17 p.

MEGLIORINI, E **Custos**:. Análise e Gestão. 3. Ed. Pearson Prentice Hall. São Paulo: 2012.

MENDONÇA FILHO, A.; WILLIAM, R.; SILVA, M. et al. Controle Biológico da cigarrinha da raiz *Mahanarva fimbriolata* (Hem.: Cercopidade) em áreas de corte mecanizado de cana crua. In: Simpósio de Controle Biológico, 7, Poços de Caldas, 2001. **Resumos.** Poços de Caldas: SICOMBIOL, 2001. p.131.

MOINO Jr, A. Produção de vírus, fungos e bactérias entomopatogênicas. In: BUENO, V. H. P; **Controle Biológico de Pragas:** produção massal e controle de qualidade. Lavras: UFLA, 2000

MOURA-COSTA, M. D.; MAGALHÃES, C. D., 1974. Um novo meio de cultura para o fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, parasito da “cigarrinha” das pastagens. **Boletim do Instituto Biológico da Bahia**, Salvador, v.13, p.57-60, 1974.

NAKANO, O. **Entomologia Econômica.** 1ª ed. Piracicaba: Editora independente, 2011. 464p.

NEVES, P. M. O. J.; SANTORO, P. H., BELEIA, A. Produção de *Beauveria bassiana* (Bals.) VUILL. Em diferentes tipos de arroz e técnicas de preparo. In: SIMPOSIO DE CONTROLE BIOÓGICO, 7, 2001, Poços de Caldas. **Resumos...** Poços de Caldas, p.388.

OLIVEIRA, S. M. C. **Exigências físicas e nutricionais para produção de *Sporothrix insectorum* em meios de cultura líquidos.** Jaboticabal, 2000. 45 f. (Dissertação de Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade estadual Paulista.

ONOFRE, S. B. et al. Controle biológico de pragas na agropecuária por meio de fungos entomopatogênicos. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Biotecnologia – avanços na agricultura e na agroindústria.** Caxias do Sul: EDUCS, 2002. p. 295-328.

OTTATI-DE-LIMA, E. L. **Produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre estruturas infectivas desses entomopatógenos.** 2007. 92 p. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2007.

PEREIRA, S. R. M & EIRA, A. F. Metodologia para produção de *Metarhizium anisopliae*

(Metsch.) Sorokin em cultivo submerso: esporulação da biomassa, efeito da concentração de açúcar e custo do inoculante. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.3, p.389-394, 1999.

QIU, J.; QIU, F. S. Y.; LI, X.; GUAN, X. Optimization of the medium composition of a biphasic production system for mycelial growth and spore production of *Aschersonia placenta* using response surface methodology. **Journal of Invertebrate Pathology**, n. 112, p.108–115, 2013.

ROMBACH, M. C. Production of *Beauveria bassiana* (Deutemycotina: Hypomycetes) sympoduloconidia in submerged culture. **Entomolophaga**, Paris, v.1, n.34, p.45-52, 1989.

RUSTIGUEL, C. B.; **Comparação das propriedades bioquímicas das quitinases produzidas por diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae***. Ribeirão Preto: 2014. [Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.]

SANO, A. H. **Dosagens de extrato de levedura e glicose para a produção de *Metarhizium anisopliae* em meio líquido**. Jaboticabal: 2005. 42p. [Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Univ. Estadual Paulista].

SCHAMNE, P. A. **Efeito de aditivos e Fishfertilquitosana em meios sólidos na produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin**. Guarapuava: 2010. [Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Centro Oeste]

SCHAMNE, P. A.; ROHDE, C.; HIROSE, E.; RATUCHNE, L. C. **Efeito de aditivos em substrato de arroz para a produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Mestch) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 24., 2012, Curitiba. SEB-40 anos de avanços da Ciência Entomológica Brasileira: anais. [Curitiba]: SEB, 2012.

SOPER, R. S.; WARD, M. G. Production, formulation and application of fungi for insect control. In: PAPAIVIZAS, G.C. **Biological control in crop production**. New York: Allanhed & Osmun, 1981. P. 161-180.

ST LEGER, R. J.; NELSON, J. O.; SCREEN, S. E. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. **Microbiology**, v.145, 2691–2699, 1999

TANZINI, M. R.; BATISTA FILHO, A. Produção de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wise) Brown e Smith, em diferentes meios de cultura líquidos. **Ecossistema**, São Paulo, v.18, p.149-155, 1992.

VALLE, T. L.; FRIGO, S. M.; AZEVEDO, J. L.; MESSIAS, C. L. Variabilidade em linhagens haplóides e diplóides de *Metarhizium anisopliae*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 7, 1980, Campinas. **Livro de Resumos...** Campinas: 1980. p. 347.

VEGA, F. E. & KAYA, H. K. 2012. **Insect Pathology**. Academic Press, London, 490p. 2ª Ed.

VEIGA FILHO, A. A. **Mecanização da colheita de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo**: uma fronteira de modernização tecnológica da lavoura. Dissertação (Mestrado) 1998. Instituto de Geociências – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1998. 127p.

VERHAAR, M. A.; HIJWEGEN, T. Efficient production of phialoconidia of *Verticillium lecanii* for biocontrol of cucumber powdery mildew, *Sphaerotheca fuliginea*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.99, p.101-103, 1993.

VILAS-BOAS, A. M.; ANDRADE, R. M.; OLIVEIRA, J. V. Diversificação de meio de cultura para produção de fungos entomopatogênicos. **Arquivos Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.39, n.1, p. 123-128, 1996.

VILLACORTA, A. Efeito da temperatura e nutrição sobre o desenvolvimento de vários isolados de *Metarhizium anisopliae* Sorokin. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE ENTOMOLOGIA, 3 e CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 5, 1978, Bahia. **Livro de Resumos...** Bahia: 1978. p.70.

WENZEL, I. M. **Fatores nutricionais e produção em massa de *Verticillium lecanii* em meios naturais sólidos e líquidos**. Jaboticabal: 2002. 79p. [Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Univ. Estadual Paulista].

WINKELHOFF, A. J.; MCCOY, C. W. Conidiation of *Hirsutella thompsonii* var. *synematososa* in submerged culture. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, n.43, p.59-68, 1984.

ZANETTI, R. **Notas de aula de ENT-115 – Manejo Integrado de Pragas Florestais**. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 9p.



SECRETARIA DE  
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO



GOVERNO DO ESTADO DE  
**SÃO PAULO**  
TRABALHANDO POR VOCÊ