



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**Produção de *Metarhizium anisopliae* em biorreator
pneumático de baixo custo**

SAMARA MAYRA SOARES ALVES

Orientador: Brener Magnabosco Marra

Junho, 2017

DEDICATÓRIA

A Deus, por estar presente em todos os momentos
em minha vida e por sempre ser fiel a mim.

A minha família por todo amor e ensinamento no
decorrer desses anos.

Ao meu marido e amigo por me apoiar sempre em
todas minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. e Orientador Brenner Magnabosco Marra pelo incentivo, orientação, ensinamento, apoio, e por sua visão sempre ampla do nosso curso e por confiar em mim pelo desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr Edson Romano Nucci por ser um excelente profissional e pelo incentivo e ajuda no decorrer do meu curso e principalmente no meu período de estágio.

Ao professor Dr. Jose Carlos de Magalhães por todo ensinamento e paciência desde o começo de minha graduação, nas diferentes disciplinas que aprendi na área microbiológica.

A professora Alessandra Costa Vilaça pelo ser humano incrível e por toda ajuda e ensinamento.

A professora Dr. Sandra de Cássia Dias pela paciência e por todo o conhecimento que eu adquiri em suas aulas.

Aos demais professores Isabel Cristina Braga, Antônio Helvécio Tótola, Katialaine Correa de Araújo e a todos os outros que tive a honra de tê-los como mestres.

Ao meu amigo Elielbert Coura Soares por toda a ajuda que tive no decorrer do meu projeto, pelo ser humano simples e humilde e pelo empréstimo do biorreator construído por ele.

Aos meus amigos de faculdade e para toda a vida Edvaldo Meliê Junior e Roxenne Araújo Lara.

A koppert Brasil por gentilmente me fornecer o produto *Metarril*® contendo conídios do *Metarhizium anisopliae* que me permitiu realizar o projeto.

Aos amigos e colegas, pela força e paciência.

A todos que, com boa intenção, colaboraram para a realização e finalização deste trabalho.

**“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.
(Madre Teresa de Calcutá)**

RESUMO

Um dos maiores desafios da agricultura moderna é o aumento da produção agrícola sem comprometer a qualidade de seus produtos, do solo e dos recursos hídricos, e manter a diversidade de plantas, animais e microrganismos. A resistência dos insetos praga a inseticidas é crescente no Brasil e exige o uso integrado de outros métodos que não somente os químicos. O controle biológico com o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* vem se destacando como o principal método de biocontrole de insetos que causam prejuízo econômico quando presente nos cultivos agrícolas como cultivo de milho, soja, cana-de-açúcar dentre outros. Esse fungo pode ser produzido em meio sólido utilizando-se arroz pré-cozido como substrato, mais devido à produção em menor quantidade por esse método faz-se necessário o aprimoramento das técnicas vigentes e o desenvolvimento de novos processos que permitam a produção em larga escala desse fungo, o controle das variáveis do processo de produção como temperatura e pH, de forma a manter a qualidade e reduzir os custos. Este trabalho teve como objetivo testar diferentes meios de cultura para a produção do fungo *M. anisopliae* em fermentação líquida, avaliando qual composição do meio produzia maior quantidade de blastosporos e peso seco de biomassa fúngica. Foram realizados testes em menor escala em frascos Erlenmeyers mantidos sob agitação constante em incubadora refrigerada. O meio que obteve maior crescimento de blastosporos de *Metarhizium anisopliae* foi o meio a base de rapadura, levedo de cerveja e ureia, cuja relação de C:N foi de 11:1. A concentração de blastosporos obtida foi de $9,7 \times 10^6$ blastosporos. mL⁻¹ e 0,7 mg/mL de biomassa fúngica seca. Este meio que mais obteve crescimento de blastosporos de *M. anisopliae* foi selecionado para o experimento de maior escala no biorreator pneumático composto de 63 L de meio e 70 g de conídios do fungo presente no produto *Metarril* WP E9 da fabricante Koppert do Brasil. Neste cultivo a concentração máxima de blastosporos obtida foi de $1,8 \times 10^8$ blastosporos. mL⁻¹ e 0,192 g/mL de biomassa seca. Estes resultados demonstram a viabilidade da produção de blastosporos de *M. anisopliae* em fermentação líquida no biorreator pneumático de baixo custo.

Palavras chaves: *Metarhizium anisopliae*; blastosporos; conídios; fermentação líquida; Fungos entomopatogênicos.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Espécies de artrópodes susceptíveis à infecção por <i>M. anisopliae</i>	7
Tabela 2. Composição de Carbono em 100 g de porção e composição de nitrogênio (em %) dos componentes utilizados nos meios de cultivo	12
Tabela 3. Composição dos 5 meios utilizados nos frascos Erlenmeyers e suas relações de C: N	13

Lista de Figuras

Figura 1– Ciclo biológico de fungos entomopatogênicos	4
Figura 2 – Cadáveres de artrópodes recobertos por conídios de coloração verdes após infecção por <i>M. anisopliae</i>	6
Figura 3– Esquema de biorreatores air lift	10
Figura 4 _ Produto Metarril WP -E9 da Koppert	11
Figura 5 a)– 1º dia de agitação dos Frascos Erlenmeyers contendo os meios de cultura e inóculo com exceção do meio 5 contendo apenas meio de cultura. b) 7º dia de inoculação	16
Figura 6) Concentração de blastosporos ($\times 10^6$) produzidos nos diferentes meios de cultivo.....	17
Figura 7 – Contagem de blastosporos em microscopia óptica	17

Figura 8 a) Biorreator pneumático mostrando o compressor utilizado para injeção do gás. b) Módulo interno mostrando o injetor de ar na parte inferior 18

Figura 9—Concentração de blastosporos ($\times 10^7$) de *M. anisopliae* no decorrer de 7 dias de cultivo..... 19

Figura 10 – 250 mL de meio obtido no 7º dia de cultivo do *M. anisopliae* em biorreator aerado..... 20

Figura 11) - a e b) Placa de cultivo com meio Agar Dextrose Sabouraud 2% e colônia do fungo *Metarhizum anisopliae*..... 20

SUMÁRIO

1.	Introdução	1
2.	Objetivos	2
3.	Revisão da Literatura	3
3.1	Fungos Entomopatogênicos.....	3
3.2	O fungo <i>Metarhizium anisopliae</i>	5
3.3	Produção de Fungos Entomopatogênicos	7
3.4	Biorreator pneumático	9
4.	Metodologia.....	10
4.1	Local.....	10
4.2	Microrganismo utilizado.....	11
4.3	Teste em frascos Erlenmeyers.....	11
4.4	Produção do <i>M. anisopliae</i> em biorreator pneumático de baixo custo	14
5.	Resultados e Discussão	15
6.	Conclusão	22
7.	Referências Bibliográficas	22

1. INTRODUÇÃO

O controle biológico vem sendo utilizado para o combate de pragas e patógenos por meio de inimigos naturais. É um processo que envolve plantas, espécies fitófagas, parasitóides, predadores e entomopatógenos, bem como suas interações, promovendo o equilíbrio entre os organismos que compõem os ecossistemas. Entre os microrganismos patogênicos com aplicação potencial em controle biológico destacam-se os fungos filamentosos. Quando comparados a outros sistemas utilizados em controle biológico, como bactérias produtoras de toxinas, protozoários e vírus, os fungos apresentam como vantagem um mecanismo especializado de infecção, que ocorre pela sua penetração ativa nos hospedeiros, não dependendo, assim, da sua ingestão para que se inicie o processo de infecção. O maior entrave para a utilização de fungos filamentosos no controle biológico é o grande lapso de tempo entre a sua aplicação e a morte dos hospedeiros, se comparados com os métodos de controle químicos (FRANCESCHINI et al, 2001).

Os fungos, para serem utilizados no controle microbiano de pragas como inseticidas biológicos, precisam ser manipulados em laboratório, testados quanto a sua eficiência e viabilidade e estar disponíveis em grandes quantidades (SANTOS et al, 2009). A produção em escala industrial de fungos entomopatogênicos representa uma etapa crítica e limitante no desenvolvimento de um programa de controle microbiano para uma determinada praga. A pesquisa de novas metodologias de sistemas de produção é muito importante para tornar o controle microbiano de pragas economicamente viável para ser aplicado em grandes áreas (TANZINI, 2002).

Os gêneros *Metarhizium* e *Beauveria* são os mais estudados e utilizados no Brasil, devido à ampla gama de insetos que podem ser controlados por estes, e também pela facilidade de produção em laboratório (ALMEIDA & MACHADO, 2006). Estima-se que anualmente são produzidos 5 mil toneladas do fungo *Metarhizium anisopliae*. Nos últimos dois anos foram economizados R\$ 60 milhões pelo setor sucroenergético devido ao uso do controle biológico com esse fungo, além da redução do impacto ambiental. Entre 2014 e 2015 foram tratados cerca de um

milhão de hectares de cana no Brasil. Com essas 5 mil toneladas de fungo produzido é possível fazer o controle biológico da cigarrinha em um milhão de hectares de cana-de-açúcar (ALMEIDA, 2017).

Para a produção de biocontroles a partir de fungos, na maioria deles o ingrediente ativo é a fase conidial, oriundo da reprodução assexuada do microrganismo. Esses podem estar associados a ingredientes inertes ou utilizados isoladamente. Estão disponíveis no mercado nacional formulações granuladas (G), pós-molháveis (WP) e suspensões concentradas em óleo emulsionáveis (SC), (BETTIOL E MORANDI, 2009). O processo industrial atualmente se baseia no cultivo do fungo em meio sólido utilizando-se diversos substratos fontes de carbono e nitrogênio, sendo o arroz o substrato mais utilizado neste cultivo sólido, em que o fungo coloniza esses substratos e produz conídios aéreos. Entretanto, este processo apresenta dificuldades de padronização de diversos fatores, como gradiente de temperatura, pH, umidade, concentração do substrato e tensão de O₂.

A produção em meio líquido permite a produção do fungo em larga escala e é possível realizar o controle de diversas variáveis como pH, temperatura, aeração, de forma a otimizar o processo e reduzir o risco de contaminação. 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. A produção de conídios submersos é geralmente estimulada pelo aumento na proporção C:N (LEITE et al., 2003).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

2.1.1. Produzir o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em biorreator pneumático de baixo custo.

2.2 Objetivos Específicos:

2.2.1 Produzir o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em frascos Erlenmeyers e em biorreator do tipo pneumático de baixo custo.

2.2.2 Testar diferentes fontes de carbono e nitrogênio para avaliar qual meio produz maior quantidade de blastosporos e peso seco de biomassa.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Fungos Entomopatogênicos

O controle biológico com entomopatógenos pode ser definido como o uso de fungos, vírus, bactérias, nematóides e protozoários no controle de insetos-praga. Os fungos entomopatogênicos têm como hospedeiros primários os afídeos, gafanhotos, moscas, besouros, lagartas, tripes e ácaros. Possuem largo espectro de ação, capazes de colonizar diversas espécies de insetos e ácaros e de causar, com frequência, epizootias em condições naturais. Esses patógenos também se diferem de outros grupos por ter a capacidade de infectar todos os estágios de desenvolvimento dos hospedeiros (ALVES et al., 2008).

Os fungos invadem os insetos por diversas vias, principalmente através da cutícula ou pele (tegumento). Uma vez dentro dos insetos, os fungos multiplicam-se rapidamente por todo o corpo. A morte é causada pela destruição dos tecidos e, ocasionalmente, pelas toxinas produzidas pelos fungos. Os fungos entomopatogênicos frequentemente emergem do corpo dos insetos, produzem esporos que, quando espalhados pelo vento, chuva ou contato com outros insetos, podem causar uma epizootia. Os insetos infectados param de alimentar e tomam-se mais lentos. Estes morrem relativamente rápido, às vezes em uma posição ereta, mas ainda presos na folha ou no ramo. O corpo do inseto morto pode ser firme e de consistência emborrachada ou de aparência oca. Por vezes observam-se insetos mortos de cor creme, verde, avermelhada ou marrom, em consequência do crescimento do fungo, quer seja envolvendo o corpo do hospedeiro, quer seja saindo das juntas dos segmentos do corpo (ALVES et al., 2008).

No inseto, o ciclo biológico dos fungos entomopatogênicos apresenta duas fases: uma sapróbia e outra parasitária. Na fase sapróbia, o ciclo pode se iniciar com a germinação de conídios, emitindo um ou mais tubos germinativos, que se diferenciam em hifas, que se conduzem num intrincado sistema de entrelaçamento, constituindo-se em micélio onde surgem os conidióforos. Na extremidade destes, diferenciam-se as fialíades, que produzem no ápice, conídios. Esses conídios germinam e forma os apressórios os quais penetram no hospedeiro por ação mecânica e enzimática.

Os blastosporos são as formas vegetativas do fungo produzidas naturalmente na hemocele do hospedeiro (FANG et al., 2010). Apesar de apresentar vantagens em relação a conídios como rápida germinação e multiplicação, estudos iniciais apontam esses propágulos como menos resistentes a fatores estressantes, como o calor e à radiação UV-B (OTTATI-DE-LIMA et al., 2014). A Figura 1 mostra o ciclo biológico dos fungos entomopatogênicos, onde se observam as formas que este fungo se apresenta.

O sucesso do uso de fungos no controle biológico depende de ter o isolado que seja ativo contra o inseto-alvo, dependendo do estágio de vida deste inseto e da umidade.

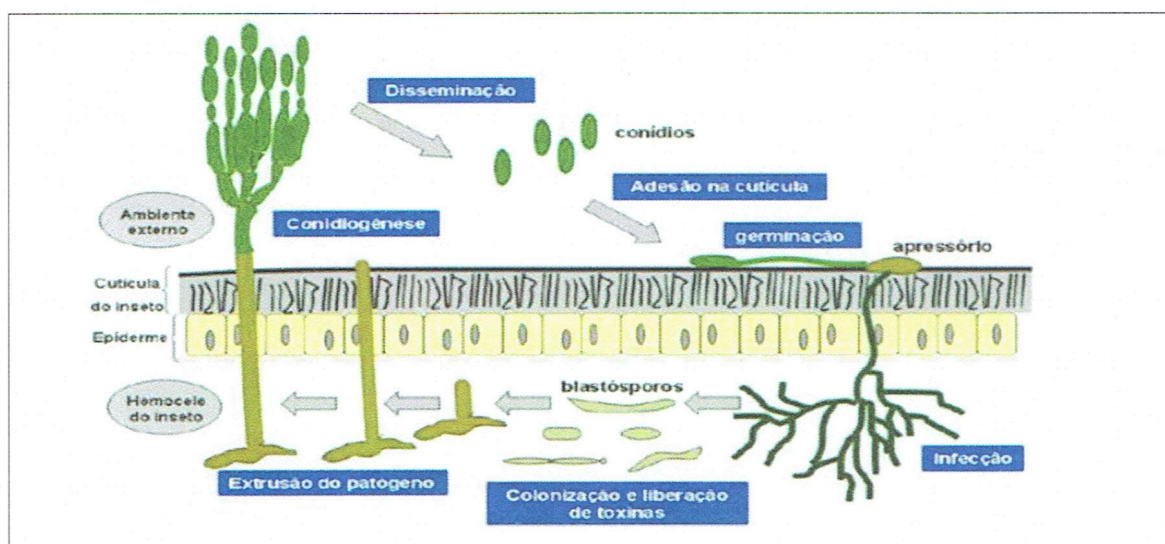


Figura 1 - Ciclo biológico de fungos entomopatogênicos. Fonte: MASCARIN; PAULI, 2010.

As vantagens dos blastosporos em relação aos conídios incluem a germinação que pode ser até quatro vezes mais rápida do que a de conídios, alta

infectividade (VEGA et al., 1999), e a facilidade de produção de elevadas concentrações de blastosporos (JACKSON; JARONSKI, 2009). A menor tolerância à fatores de estresse em relação aos conídios e menor estabilidade podem ser superados com uma adequada formulação dos blastosporos que pode proteger esses propágulos desses efeitos.

3.2 O fungo *Metarhizium anisopliae*

M. anisopliae é um fungo ascomiceto descoberto inicialmente de insetos mortos (*Anisoplia austriaca*) na Ucrânia em 1879 por METSCHNIKOFF. *M. anisopliae* foi o primeiro fungo a ser produzido em larga escala e utilizado no combate de insetos pragas (STEINHAUS, 1975). Desde então já foram relatadas mais de 300 espécies de hospedeiros artrópodes infectadas por este fungo, o qual é um dos entomopatógenos mais comumente isolado a partir de insetos (CHARLEY, 1991). Apresenta distribuição geográfica mundial e é conhecido como o causador da infecção fúngica chamada *green muscardine*, baseada na incrustação dos cadáveres de artrópodes com conídios verdes.

O gênero *Metarhizium* foi considerado um complexo de espécies. Com base em estudos morfológicos e moleculares de filogenia multigênica, chegou-se à conclusão da existência de nove espécies distintas, distribuídas em diferentes continentes, sendo elas as seguintes: *M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. acridum*, *M. lepidiotae*, *M. majus*, *M. globosum*, *M. brunneum* e *M. robertsii* (Bischoff et al., 2009).

Uma das famílias de proteínas que parece estar diretamente envolvida na patogenicidade de *M. anisopliae* são as quitinases. Estas enzimas são responsáveis pela dissolução do exoesqueleto quitinoso dos hospedeiros, além de apresentarem função estrutural, morfológica, autolítica e nutricional em fungos (ADAMS, 2004). A Figura 2 mostra artrópodes como o carrapato bovino e percevejo sendo recobertos por conídios de *M. anisopliae*.

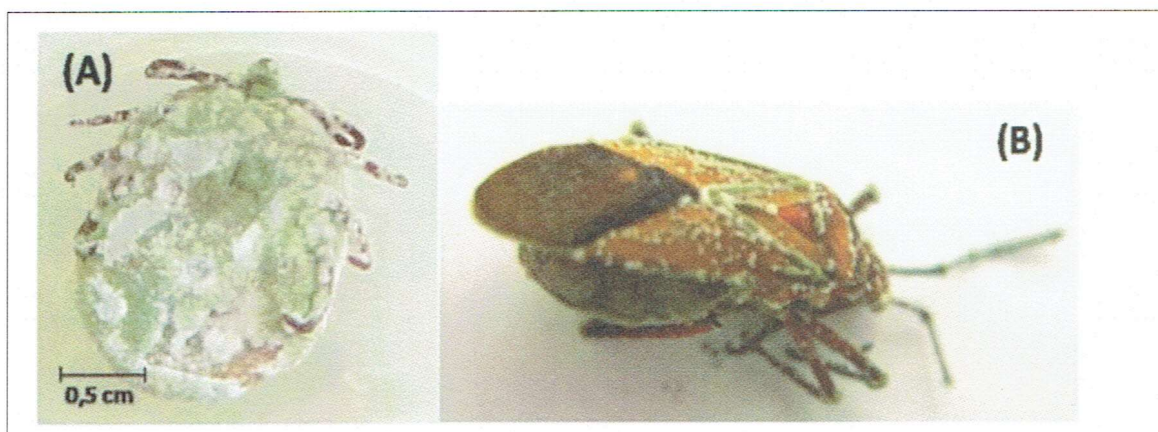


Figura 2. Cadáveres de artrópodes recobertos por conídios de coloração verdes após infecção por *M. anisopliae*. Fêmea do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* (A) e fêmea do percevejo manchador do algodão *Dysdercus peruvianus* (B). **Fonte:** JUNGE, 2010.

Este fungo apresenta a capacidade de infectar uma ampla diversidade de hospedeiros artrópodes utilizando um mecanismo de infecção complexo e eficiente. O mecanismo que caracteriza a interação de *M. anisopliae* com seus hospedeiros tem sido alvo de abordagens experimentais diversas em níveis molecular, celular, bioquímico e fisiológico que visam à elucidação deste processo (ROBERTS e LEGER, 2004).

O desenvolvimento do *Metarhizium anisopliae* ocorre normalmente na faixa de temperatura entre 15 e 32°C e pH entre 2,0 e 8,5, sendo que a temperatura e pH ótimos são entre 24° e 30° e 6,9, respectivamente (ALVES, 2008).

Existe uma infinidade de insetos que são susceptíveis a ação do *M. anisopliae*. A Tabela 1 demonstra algumas da espécie hospedeiras do *Metarhizium anisopliae*.

Tabela 1. Espécies de artrópodes susceptíveis à infecção por *M. anisopliae*, Ordem e família e breve descrição.

Espécie hospedeira	[Ordem: Família]	Descrição
<i>Anopheles gambiae</i>	[Diptera: Culicidae]	Vetor da malária
<i>Culex quinquefasciatus</i>	[Diptera: Culicidae]	Transmissor da filariose
<i>Musca domestica</i>	[Diptera: Muscidae]	Mosca
<i>Glossina spp.</i>	[Diptera: Glossinidae]	Mosca Tse-tsé
<i>Ceratitis capitata</i>	[Diptera: Tephritidae]	Mosca das frutas
<i>Zaprionus indianus</i>	[Diptera: Drosophilidae]	Mosca-do-figo
<i>Anastrepha ludens</i>	[Diptera: Tephritidae]	Mosca das frutas mexicanas
<i>Dysdercus peruvianus</i>	[Hemiptera: Pyrrhocoridae]	Percevejo manchador do algodão
<i>Mahanarva fimbriolata</i>	[Hemiptera: Cercopidae]	Cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar
<i>M. posticata</i>	[Hemiptera: Cercopidae]	Cigarrinha da folha da cana-de-açúcar
<i>Bemisia tabaci</i>	[Hemiptera: Aleyrodidae]	Mosca branca do tabaco
<i>Triatoma infestans</i>	[Hemiptera: Reduviidae]	Transmissor da doença de chagas
<i>Vatiga illudens</i>	[Hemiptera: Tingidae]	Percevejo-da-renda
<i>Deois flavopicta</i>	[Homoptera: Cercopidae]	Cigarrinha das pastagens
<i>Tetranychus evansi</i>	[Acarina: Tetranychidae]	Ácaro vermelho
<i>Hypothenemus hampei</i>	[Coleoptera: Scolytidae]	Broca do café
<i>Diploschema rotundicolle</i>	[Coleoptera: Cerambycidae]	Broca dos citrus
<i>Blatella germanica</i>	[Dyctioptera: Blatellidae]	Barata

Fonte: JUNGE, 2010

3.3 Produção de Fungos Entomopatogênicos

O desenvolvimento de tecnologias de produção em larga escala destes fungos continua sendo um fator criticamente importante, embora as técnicas de fermentação bifásica que provêm altos rendimentos de conídios estáveis já são um grande avanço.

A composição do meio tem uma estreita relação com uso e a qualidade do fungo produzido, pois pode influenciar o tipo, o formato e a quantidade de propágulo produzido. As técnicas de produção de fungos entomopatogênicos devem ser de baixo custo e permitir a obtenção de alta concentração de formas viáveis e virulentas do patógeno que possam ser formuladas e utilizadas para o controle de pragas (Leite et al., 2003). Um meio de cultura deve possuir uma fonte de carbono e de nitrogênio, sais minerais e alguns fatores de crescimento. Assim, dependendo do tipo de propágulo desejado e da espécie a ser produzida, os fungos podem ser produzidos sobre meios artificiais utilizando-se três métodos: a) meios líquidos; b) meios sólidos; c) fermentação bifásica (Alves, 1998).

A diversidade de fontes de C e N tem sido bastante explorada no desenvolvimento de meios de cultura, especialmente de meios complexos a base de produtos naturais. Entretanto, estudos mais recentes têm mostrado que a proporção C: N é também um importante fator a ser considerado no desenvolvimento de meios de cultura, principalmente de meios líquidos que visam à produção de formas submersas (Leite et al., 2003). Um meio balanceado deverá conter cerca de dez vezes mais carbono do que nitrogênio. O primeiro é necessário como fonte de energia, enquanto que o segundo é essencial na síntese de componentes celulares, tais como ácidos nucleicos e quitina. Por sua vez, o fósforo é necessário na síntese de ácidos nucleicos e ATP (CARLILE e WATKINSON, 1994). A fonte de carbono é essencial no meio de cultivo, pois fornece o elemento mais importante para a construção das células, o carbono, que compõe cerca de 50% da biomassa seca, além de suprir a energia necessária para movimentar o metabolismo do microrganismo. As fontes de carbono mais utilizadas são amido, glicose e diversos outros açúcares (Leite et al., 2003).

Entre as fontes de nitrogênio, produtos complexos como milhocina, extrato de levedura, peptonas hidrolisadas ou digeridas de semente de algodão, proteínas de leite e farinha de soja vêm sendo aplicados com sucesso na composição de meios de cultura para produção de blastosporos por fermentação submersa (MASCARIN et al., 2015).

De modo geral, todos esses processos de fermentação têm sido utilizados em escala experimental e industrial para a obtenção de diversos tipos de propágulos fúngicos. No entanto, o processo mais usado para a produção industrial desses microrganismos tem sido o da fermentação sólida (Alves et al., 2008).

Na produção de conídios em meio sólido o fungo é produzido na superfície do meio sólido, dentro de diferentes recipientes conforme o objetivo e escala comercial. Para a produção de conídios em larga escala, têm sido utilizados como fonte de carbono produtos vegetais de baixo custo, especialmente grãos de arroz (Leite et al., 2003).

Na produção de *M. anisopliae* em meio líquido permite-se um melhor controle das condições físicas e nutricionais exigidas pelo organismo. Na produção de blastosporos, corpos hifais e micélio têm sido avaliados como componentes de meio de cultura, além das fontes de C e N, também sais, componentes específicos e aditivos (Leite et al., 2003). As principais dificuldades desse processo são obtenções de meios de cultura adequados que não afetem a virulência; determinações das condições de desenvolvimento e esporulação; e prevenção das contaminações secundárias. A grande vantagem é a obtenção de elevadas quantidades de biomassa em um pequeno espaço físico e em pouco tempo (ALVES, 1998).

3.4 Biorreator Pneumático

Biorreatores pneumáticos são caracterizados pela ausência de partes móveis, tornando desnecessária a presença de trabalho de eixo para promover a mistura do sistema fermentativo. A homogeneização do meio é feita exclusivamente através da injeção de gás, em geral ar ou ar enriquecido com oxigênio em cultivos aeróbios. Essa injeção é realizada por via de um aspersor localizado na base da coluna. Em comparação com o modelo convencional tipo tanque agitado e aerado, esta modalidade de biorreator, é capaz de transferir oxigênio com menor consumo de energia, além de facilitar fatores relacionados à implementação do sistema, como o projeto, construção e aumento de escala.

Enquanto um biorreator pneumático do tipo coluna de bolhas opera exclusivamente com a gaseificação do meio de cultivo, os modelos de circulação interna (airlift) são projetados para que o fluido recircule pelo sistema, facilitando a homogeneização. Verifica-se, então, duas regiões distintas: uma região de escoamento ascendente (riser) e região de escoamento descendente (downcomer) (CHISTI, 1989). A figura 3 abaixo mostra um tipo de biorreator pneumático que é o biorreator do tipo “air lift”:

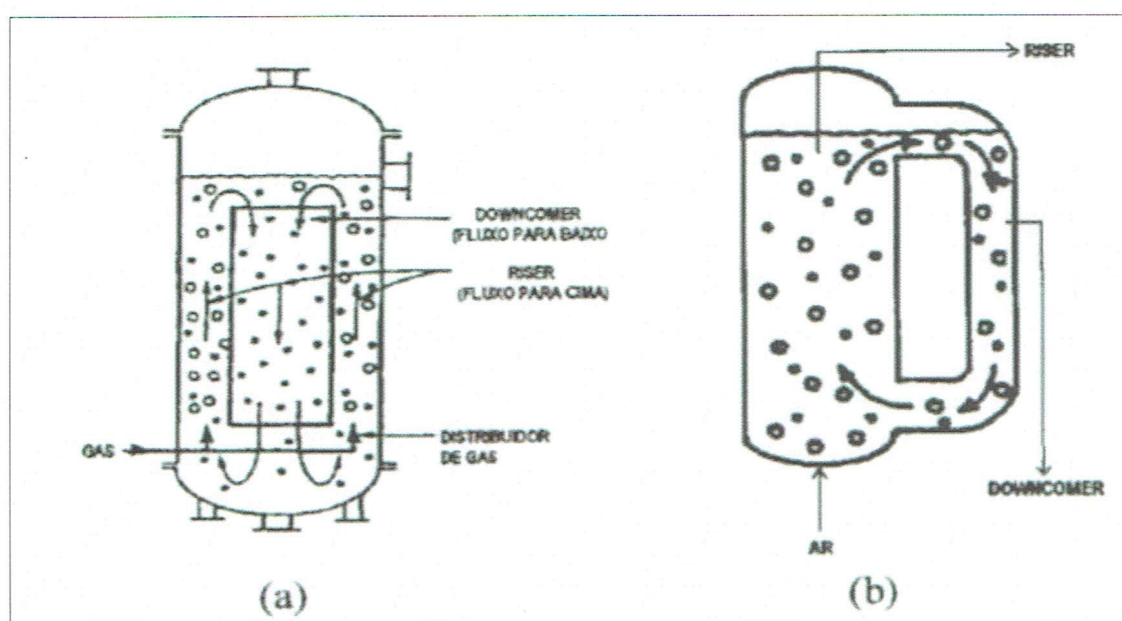


Figura 3. Esquema de biorreatores air lift com recirculação interna (a) e externa (b)

Fonte: Adaptado de Chisti (1989)

4. METODOLOGIA

4.1 Local

Os experimentos foram realizados no Laboratório Biotecnológico; Laboratório de Destilação e Fermentação e de Microbiologia na Universidade Federal de São João del-Rei Campus Alto Paraopeba em Ouro Branco – MG.

4.2 Microrganismo utilizado

Foram utilizados conídios do fungo *Metarhizium anisopliae*, presentes no produto *Metarril* WP E9 que foram gentilmente cedidos pela empresa Koppert do Brasil. O produto se encontrava na forma de pó molhável contendo cerca de $1,38 \times 10^8$ conídios/g.

- Características do produto:

METARRIL® é um inseticida microbiológico composto de linhagem selecionada do fungo *Metarhizium anisopliae*, denominada ESALQ E9. Certificado pelo IBD, foi o primeiro inseticida biológico para controle de cigarrinhas em cana-de-açúcar registrado no Brasil. O produto é ideal para o manejo integrado de pragas, preservando os inimigos naturais e podendo ser associado a outras tecnologias.



Figura 4 - Metarril WP E9. Fonte: KOPPERT: <http://koppert.com.br/produtos/metarril/>

O preparo do inóculo seguiu as recomendações do fabricante: Para 1 Kg do produto utiliza 5 litros de água para suspender o inóculo. Foi utilizado um balão volumétrico contendo 5 mL de água destilada e 1 g do produto. Dessa suspensão obtida 1 mL foi adicionado em cada Erlenmeyer de 250 mL utilizado para os testes e para a amostragem em branco.

4.3 Testes em frascos Erlenmeyers

4.3.1 Meios de cultura

Foram avaliados diferentes fontes de carbono, sais e nitrogênio para o crescimento e desenvolvimento do fungo. As fontes foram analisadas a partir de ensaios isolados em frascos Erlenmeyers antes de realizar o teste em maior escala

no biorreator aerado. Realizou-se o experimento em frascos Erlenmeyers de 250 mL de capacidade. Os meios utilizados foram compostos á base de carbono, nitrogênio, proteínas e sais minerais. As fontes de carbono testadas foram farinha de milho, batata e rapadura. Utilizou-se o levedo de cerveja por ser um componente rico em nutrientes necessários para o desenvolvimento do fungo, e a ureia em todos os meios como fonte de nitrogênio. Após a filtragem dos meios de cultura, em bomba à vácuo acoplada à um funil de Buchner, adicionaram-se 100 mL de cada um dos meios já filtrados nos respectivos Erlenmeyers, (com exceção da uréia que degrada ao ser esterilizada). Em seguida estes Erlenmeyers contendo os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 min. Após a esterilização dos meios de cultivo, adicionou-se em capela de fluxo laminar o inóculo contendo conídios do fungo *M. anisopliae* e a ureia em todos os frascos de Erlenmeyers (com exceção do frasco utilizado como amostragem em branco que não continha o inóculo).

Para manter a relação de carbono e nitrogênio acima de 10: 1 como citado na literatura para obtenção de maior quantidade de blastosporos, quantificou-se com base na literatura e no rótulo dos insumos (rapadura, farinha de milho e levedo de cerveja), o valor de carbono e nitrogênio presentes em cada meio. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 2:

Tabela 2 – Composição de Carbono e Nitrogênio em 100 g de porção dos componentes utilizados nos meios de cultivo

Insumo	Quantidade (em grama) de Carbono em 100 g de porção	Quantidade de Nitrogênio (em grama) em 100 g de porção
Levedo de Cerveja (NATURALLE)	40	6,88
Rapadura (SÃO MIGUEL)	70	—
Farinha de Milho (PACHÁ)	76	1,29
Ureia (FONTE: MACHADO, 2002)	—	45
Batata Inglesa (FONTE: FONSECA et al, 2015)	17	0,19

Com base nesses valores de carbono e nitrogênio presentes em cada insumo foi possível escolher os meios presentes em cada Erlenmeyer para manter a relação C:N de cerca de 10:1. As composições dos meios e a relação C:N estão descritos na Tabela 3:

Tabela 3: Composição dos 5 meios utilizados nos frascos Erlenmeyers e suas relações de C: N

	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4	Meio 5
Água	1L	1L	1L	1L	1L
Rapadura	30 g/L	30 g/L	30 g/L	30 g/L	30 g/L
Farinha de milho			15 g/L	15 g/L	
Levedo de cerveja	10g/L	10g/L	10g/L	10g/L	10g/L
Batata		40 g/L		40 g/L	
Ureia	5 g/L	5 g/L	5 g/L	5 g/L	5 g/L
Quantidade de C	25 g	31,8 g	36,4 g	43,2g	25g
Quantidade de N	2,25g	2,25g	2,25g	2,25g	2,25g
Relação C:N	11:1	14:1	16:1	19:1	11:1

No preparo do inóculo a ser adicionado nos Erlenmeyers utilizou-se um balão volumétrico contendo 5 mL de água destilada e 1 grama do produto *Metarril* contendo conídios do fungo. Cada frasco foi inoculado com 1mL dessa suspensão preparada, contendo $2,4 \times 10^8$ conídios do *M. anisopliae*. Após o processo de inoculação em capela de fluxo laminar os frascos de erlenmeyers foram acondicionados em incubadora refrigerada Shaker (NOVA TÉCNICA), programada para agitação de 200 rpm, por 7 dias a 25°C.

4.3.2 Contagem de esporos

No 7º dia após o processo de inoculação do fungo foi retirado uma amostra de 1 mL de cada um dos meios + fungo (com exceção do meio 5 que não continha o inóculo e foi utilizado para uma amostragem em branco) em condições assépticas e transferidas para 9 mL de solução salina com Tween 1% (NaCl P.A.: 9,0 g; água destilada: 1000 mL e Tween 80: 0,1mL). Foi feita uma diluição em série até 10^{-4} . Essas amostras foram utilizadas para medir a concentração de blastosporos produzidos utilizando-se a Câmara de Neubauer (NEW OPTICS) $0,0025 \text{ mm}^2$, e a contagem de esporos foi realizada com o auxílio de um microscópio óptico (MOTIC) em aumento de 400 vezes.

4.3.3 Peso seco da biomassa

Para a análise do peso seco da biomassa no 7º dia de fermentação os meios contendo a biomassa foram filtrados com o auxílio de um compressor de bomba a vácuo (LIMATEC – LT25) acoplada a um funil de Buchner, forrado com disco de papel filtro qualitativo de 8 cm de diâmetro. O peso seco foi determinado pela secagem do papel filtro previamente pesado, contendo a biomassa em estufa (SOLAB CIENTIFICA) regulada para 50°C por 24°C e depois novamente pesado.

4.4 Produção do *Metarhizium anisopliae* em biorreator pneumático de baixo custo

Para a produção no biorreator pneumático, utilizou-se o meio de cultivo que mais obteve crescimento em menor escala no Erlenmeyer que foi o meio 1 composto a base de levedo de cerveja 10 g/L, rapadura 30 g/L, e ureia 5 g/L. Foram adicionados 63 litros de água potável nesse biorreator e corrigido o pH para 6,5 com o uso de 5 mL ácido fosfórico e 20 g de bicarbonato de sódio.

Aferiu-se a temperatura em que se encontrava o meio no interior do biorreator, com o auxílio de um termômetro de mercúrio. A temperatura durante todo o processo ficou em cerca de 24°C e 26°C com o auxílio de um termostato. Na

composição do meio adicionaram-se a este biorreator 315 g de ureia, 1890 g de Rapadura (que foi fatiada em tamanhos de cerca de 1 cm com o auxílio de um ralador) e em seguida acrescentaram-se 630 g de Levedo de Cerveja. Foi feita uma homogeneização deste meio por meio de um misturador de plástico. Em seguida adicionaram-se 70 g do produto *Metarril* contendo aproximadamente $9,94 \times 10^{10}$ conídios, no biorreator contendo o meio de cultivo. Para manter a aeração do meio foi utilizado um compressor (INALATEC PLUS- NEVONI) presente em aparelhos de nebulização ligados na tomada de 220 V. Todos os dias foram medidos a concentração de blastosporos em Câmara de Neubauer, o pH e a temperatura em que se encontrava os cultivo. No 7º dia do cultivo foi determinado o peso seco da biomassa.

4.5 Cultivo do *Metarhizium anisopliae* em meio Sabouraud Dextrose Agar

Ao 7º dia transcorrido do crescimento do *M. anisopliae* no biorreator pneumático foi retirado uma amostra de 1mL do meio de cultivo. Em uma capela de fluxo laminar espalhou-se com o uso de uma alça de Drigalski 100 µL do meio contendo inóculos do fungo por toda a superfície de placas de Petri contendo o meio Sabouraud Dextrose Agar (dextrose 40 g/L, Agar 15 g/L, Peptona 5,0 g/L, extrato de caseína 5,0 g/L) – Fabricante KASVI, para análise da morfologia da colônia do *M. anisopliae*. Utilizaram-se 6 placas de Petri que permaneceram por 7 dias a temperatura ambiente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Testes em Erlemeyers

O pH da água utilizado foi ajustado para aproximadamente 7,0, que é o ideal para o desenvolvimento desse tipo de fungo. No início o pH da água era de 7,12 foram adicionados 200µL de ácido fosfórico como fonte fósforo, e o pH registrado por meio do Phmetro foi de 2,68. Adicionou-se 1 g de bicarbonato de sódio e o pH registrado foi de 7,08, o ideal para se adicionar os constituintes dos meios e o inóculo. A figura 5 abaixo mostra os frascos de Erlenmeyers com os meios já

filtrados a vácuo e com o inóculo, antes de serem acondicionados na incubadora Shaker e no 7º dia após a inoculação.

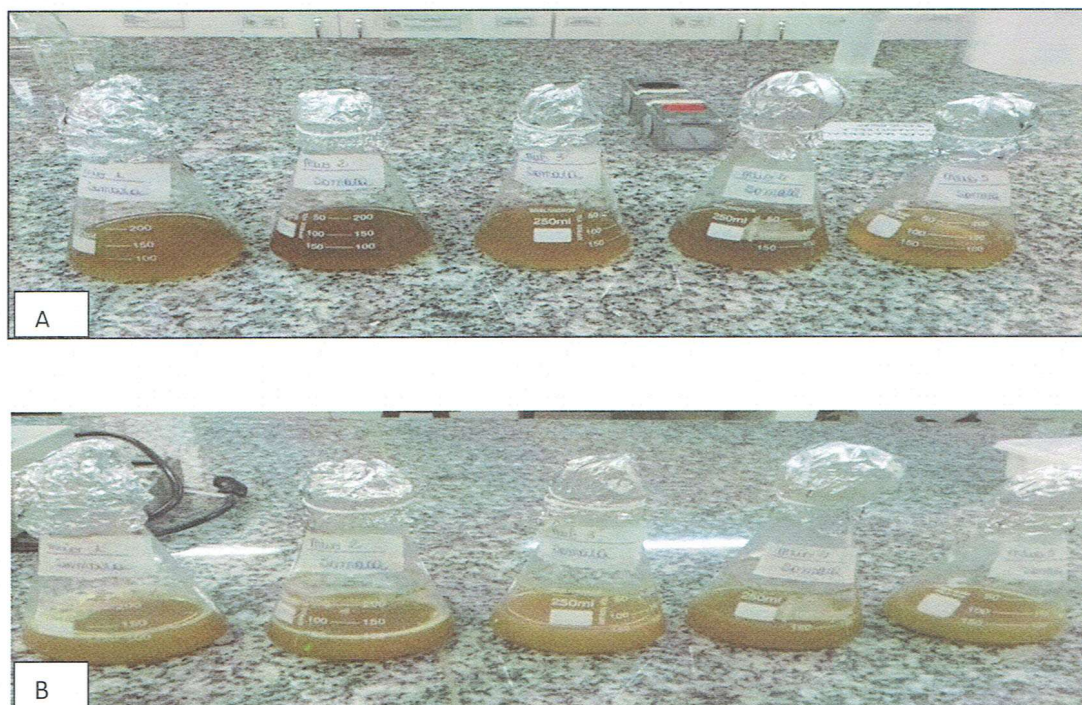


Figura 5 a) 1º dia de agitação dos Frascos Erlenmeyers contendo os meios de cultura e inóculo com exceção do meio 5 contendo apenas meio de cultura. b) 7º dia após a inoculação. Fonte: Autoria própria.

5.1.1 Contagem de blastosporos e Rendimento calculado em Erlenmeyer

A Figura 6 mostra a concentração de blastosporos obtida com uma média das contagens em triplicatas, partindo da concentração de conídios inicial de $2,4 \times 10^6$ conídios/ mL.

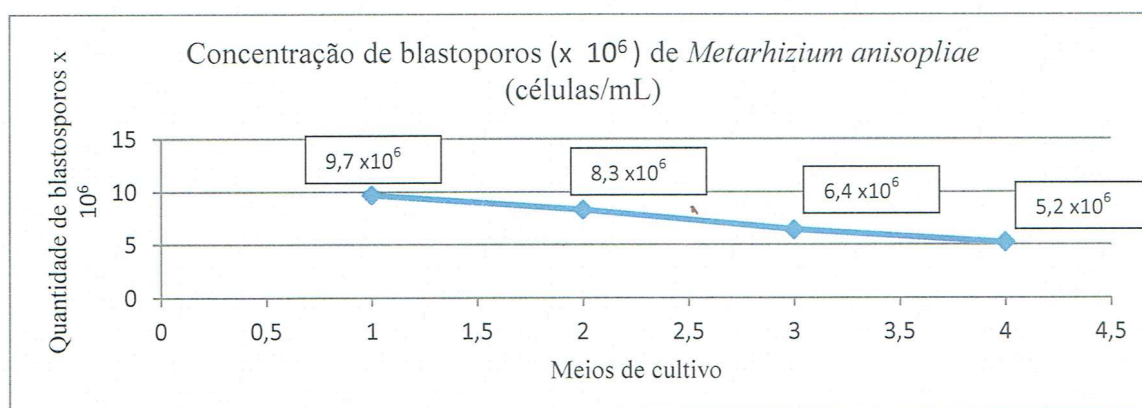


Figura 6) Concentração de blastosporos produzidos nos diferentes meios de cultivo.

O meio que mais obteve o crescimento de blastosporos foi o meio 1 a base de rapadura e ureia como fonte de carbono e nitrogênio. O rendimento obtido para cada um dos meios partindo da concentração inicial de $2,6 \times 10^6$ conídios/mL foram de 4,04; 3,46; 2,60; 2,17 para os meios 1, 2, 3 e 4 respectivamente.

O meio sem a presença de inóculo foi utilizado como uma amostragem em branco devido à indisponibilidade do uso do Shaker para realizar o branco de cada meio e as triplicatas adequadas. Neste meio 5 que não continha o inóculo foi observada a presença de células leveduriformes, devido ao levedo de cerveja, mais não a presença de blastosporos do fungo. A Figura 7 mostra a contagem de blastosporos no 2º dia de inoculação do *M. anisopliae*.

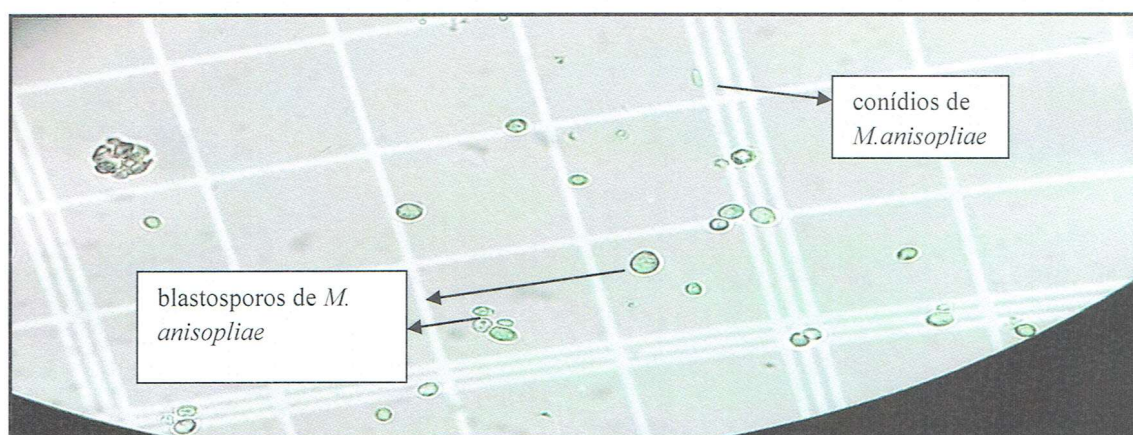


Figura 7 – Contagem de blastosporos em microscopia óptica em aumento de 400 vezes, diluição 10^{-1} em água destilada, NaCl e Tween 1%. Fonte: Autoria própria

5.1.2 Peso Seco da Biomassa

Ao fim do 7º dia de cultivo, os meios foram filtrados a vácuo e dispostos em papel filtro previamente pesado. Acondicionaram-se os papéis filtro contendo os meios, na estufa a 50°C por 24hs. Em seguida mediu-se novamente a massa do papel filtro contendo o meio. O peso seco obtido para cada meio nos frasco Erlenmeyers (1,2,3, e 4) foram: $0,7 \text{ mg.mL}^{-1}$; $0,6 \text{ mg.mL}^{-1}$; $0,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$ g respectivamente.

O meio 1 foi o que mais obteve biomassa seca o que confirma a contagem de blastosporos por microscopia. O meio 1 à base de rapadura continha carbono na forma de dissacarídeos, já os meios à base de batata e farinha de milho, possuíam carbono na forma de polímeros. O que pode ter ocasionado uma menor produção de

biomassa nos meios à base de carbono na forma de polímeros é a preferência dos meios à base de dissacarídeos pelo fungo, devido a uma maior facilidade na quebra dessas moléculas para obtenção de energia. A dificuldade na quebra de moléculas maiores como farinha de milho e batata para obtenção de carbono e o possível excesso de carbono nesses meios podem ter ocasionado o menor crescimento fúngico.

5.2 Procedimento realizado no biorreator pneumático de baixo custo

O meio que mais obteve formação de blastosporos nos testes em Erlenmeyers foi o meio a base de rapadura, levedo de cerveja e ureia. Esta composição do meio foi reproduzida novamente em maior escala no biorreator. A figura 8 abaixo mostra o biorreator utilizado e o módulo interno mostrando o injetor de ar na parte inferior.

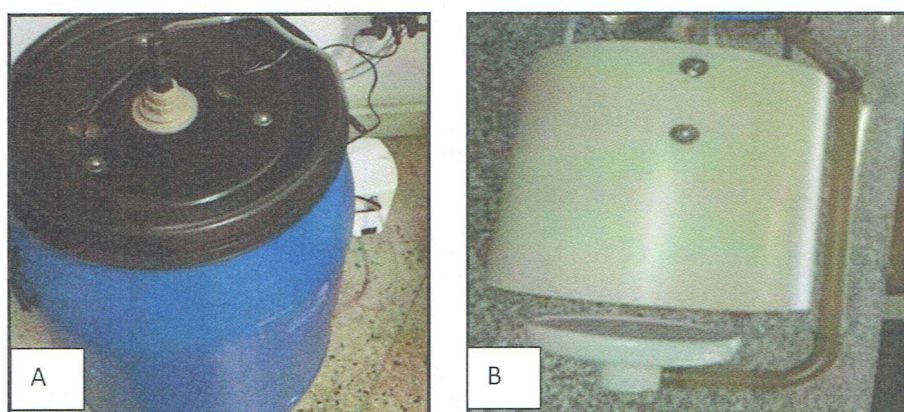


Figura 8a) Biorreator pneumático utilizado para cultivo em meio líquido. Fonte: Autoria própria. b) Módulo interno mostrando o injetor de ar na parte inferior. Fonte: Soares, 2017

5.2.1 Contagem de blastosporos e peso seco da biomassa

A concentração de inóculo inicial no biorreator aerado era de $1,58 \times 10^6$ conídios/mL. No 2º dia de cultivo a concentração de blastosporos foi de $3,38 \times 10^7$. No 3º, 4º, 5º, 6º e 7º dia de cultivo as concentrações de blastosporos foram respectivamente: $4,19 \times 10^7$; $5,2 \times 10^7$; $1,0 \times 10^8$; $1,8 \times 10^8$ e $1,2 \times 10^8$. Foi medido o pH no decorrer dos dias de cultivo que variou entre 6,8 e 7,0 e a temperatura ficou entre 24º e 26ºC. A Figura 9 mostra a concentração de blastosporos no decorrer de uma semana de cultivo no biorreator.

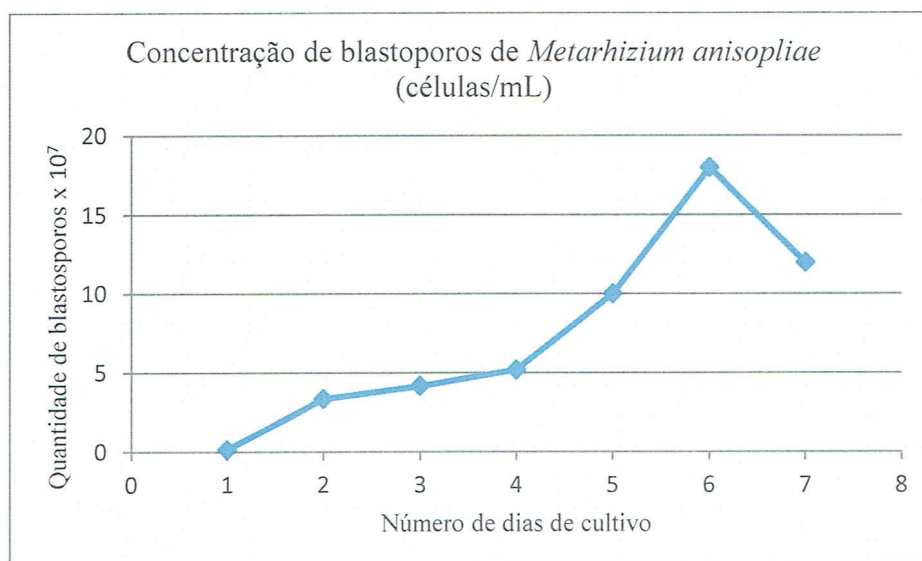


Figura 9. Concentração de blastosporos ($\times 10^7$) de *M. anisopliae* no decorrer de 7 dias de cultivo.

As maiores concentrações de blastosporos de *M. anisopliae* foram observadas no 6º dia de cultivo, na temperatura de 24°C e pH de 6,8. A concentração obtida no 6º dia foi de $1,8 \times 10^8$ blastosporos/mL. A partir do 6º dia houve uma redução do número de blastosporos para $1,2 \times 10^8$. Isto pode ser devido ao início da escassez dos constituintes do meio, consumido pelos blastosporos. Foi observado um cheiro referente à degradação da ureia bem intenso entre os dias 6 e 7 de cultivo. Isto acontece devido a uma concentração em excesso de nitrogênio o que leva à liberação de gás de amônio, podendo ser tóxico para metabolismo do fungo quando em excesso, pois Segundo Leite et al. (2003), o excesso de nitrogênio em um meio de cultura pode inibir o crescimento do fungo devido ao acúmulo de metabólitos.

5.2.2 Peso seco da biomassa

No 7º dia de cultivo, 250 mL de meio de cultivo foram filtrados a vácuo e dispostos em papel filtro presente em estufa a 50°C 24 hs. O peso seco obtido no 7º dia de cultivo foi de $0,192 \text{ g.mL}^{-1}$. A figura 10 abaixo mostra 250 mL de meio retirado do biorreator antes da análise do peso seco



Figura 10) 250 mL de meio obtido no 7º dia de cultivo do *M. anisopliae* em biorreator aerado. Fonte: Autoria própria.

5.2.3 Cultivo de *Metarhizium anisopliae* em meio Sabouraud Dextrose Agar

A Figura abaixo mostra o cultivo dos blastosporos de *Metarhizium anisopliae*, obtidos no 7º dia de cultivo em meio Sabouraud Dextrose Agar (dextrose 40 g/L, Agar 15 g/L, Peptona 5,0 g/L, extrato de caseína 5,0 g/L) – Fabricante KASVI.

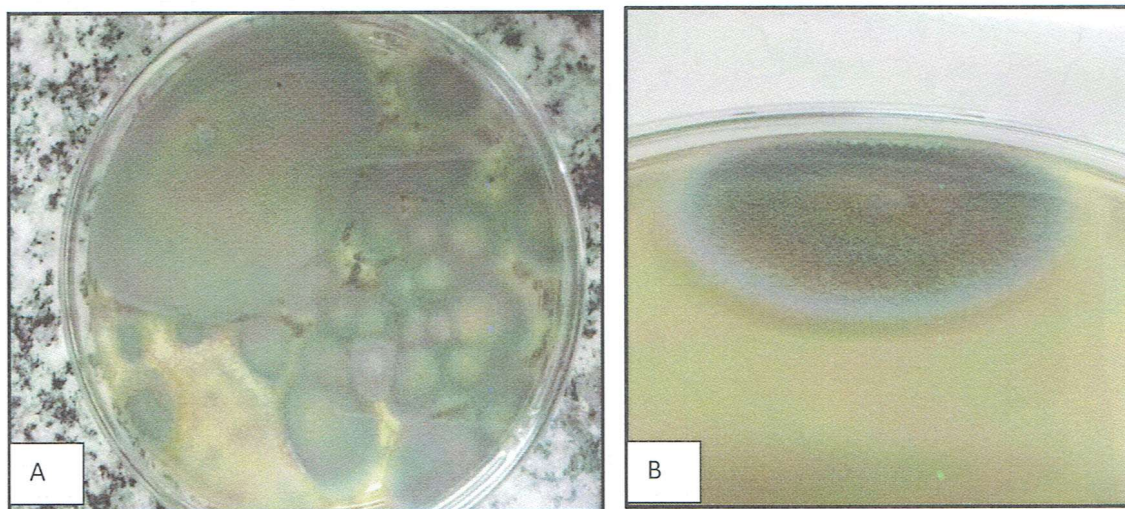


Figura 11 a) e b) Placas de cultivo com meio Agar Dextrose Sabouraud e colônia do fungo *Metarhizium anisopliae*. Fonte: Autoria própria

As colônias de *Metarhizium anisopliae* apresentaram coloração que variou de verde acinzentado até verde escuro (oliva). Estas características foram observadas por Yip et al (1992), que estudaram 204 culturas de *Metarhizium anisopliae*, isolados de solos da pastagem da Tasmânia, onde todos os isolados apresentaram cor variando entre acinzentado, cinza escuro e verde escuro. Os conídios de *M. anisopliae* apresentam parede espessa e lisa, são hialinos quando vistos

isoladamente e a massa conidial apresenta coloração esverdeada e com uma protuberância no interior. A cor da colônia foi observada por ser um caráter estável e é considerada uma característica confiável para separação de isolados (Yip et al, 1992).

5.2.4 Cálculo de área Irrigada pelo Biorreator Pneumático de baixo custo

O produto *Metarril* contém cerca de $1,39 \times 10^8$ conídios viáveis/ g. Seguindo a recomendação do Laboratório Koppert do Brasil, **500 g do produto *Metarril* servem para serem aplicados em 1 hectare = 10.000 m².**

Ou seja necessita-se de $6,95 \times 10^{10}$ conídios para irrigar uma área de 10.000 m².

Produziram-se no 6º dia de cultivo no biorreator pneumático de baixo custo $1,8 \times 10^8$ blastosporos/mL. Em 63.000 mL de meio foram obtidos $1,13 \times 10^{13}$ blastosporos de *Metarhizium anisopliae*. Essa quantidade de blastosporos obteve-se com 70 g de produto utilizado.

Essa quantidade de blastosporos produzida de $1,13 \times 10^{13}$ serve para irrigar uma área equivalente à:

$$\begin{array}{rcl} 6,95 \times 10^{10} & \text{-----} & 1 \text{ hectare} = 10.000 \text{ m}^2 \\ 1,13 \times 10^{13} & \text{-----} & (X) \end{array}$$

$$(X) = 162 \text{ hectares}$$

Ou seja 70 g de produto *Metarril* que foram utilizados para o cultivo de blastosporos de *Metarhizium anisopliae* em biorreator de baixo custo dariam para aplicar em **uma área equivalente a 162 hectares.**

A desvantagem seria em relação ao produto final que seria na forma de blastosporos de *M. anisopliae*, não tão infectivo e resistente quanto os conídios presentes no produto *Metarril*. O próximo passo seria realizar teste de patogenicidade desses blastosporos em insetos.

6. CONCLUSÃO

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, pois o produto já se encontra pronto para ser colocado no pulverizador a ser utilizado, evitando-se com isso os gastos com mão-de-obra para a lavagem do material, como é feito quando produzido em meio sólido de arroz. Neste trabalho, o meio de cultivo que mais favoreceu o crescimento de blastosporos de *Metarhizium anisopliae* foi o meio com balanceamento de carbono e nitrogênio de 11:1 composto de Rapadura 30 g/L, ureia 5 g/L e Levedo de cerveja 10 g/L. O biorreator aerado utilizado mostrou ser útil para a produção de grandes quantidades de biomassa fúngica em um curto período de tempo. Este biorreator permitiu o controle das variáveis do processo como pH e temperatura e obteve uma quantidade satisfatória de blastosporos produzidos de $1,8 \times 10^8$ blastosporos/mL com rendimento de cerca de 110 vezes superior em relação a concentração de inóculo inicial que foi de $1,58 \times 10^6$ conídios/mL. O peso seco obtido foi de 0,192 g/mL o que mostra uma elevada quantidade de biomassa fúngica por mL de meio. A obtenção de meios simples e de baixo custo para o desenvolvimento desse fungo permite que o agricultor possa desenvolver e aperfeiçoar a produção desse fungo em sua própria fazenda, com insumos dos seus próprios cultivos o que o torna bastante viável para ser aplicado nos cultivos agrícolas como método de biocontrole.

7. BIBLIOGRAFIA

ADAMS, J.D. **Quitinases e glucanases da parede celular fúngica**. Disponível em: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/150/7/2029.pdf?expires=1483545473&id=id&accname=guest&checksum=1C1DB2E50D08EC37F8C1E9F2D352DB14>. Acesso em: 04/01/2017

ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A. **Uso de micopesticidas no Brasil: programas e números recentes.** IN: X Simpósio de Controle Biológico, 2007, Brasília – DF. Resumos. Brasília – DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/SEB, 2007a. CD-ROM.

ALMEIDA, J. **Tecnologias para controle biológico em cana, soja, morango e plantas ornamentais.** Disponível em: <https://www.noticiasagricolas.com.br/noticias/agronegocio/190873-ib-apresentara-na-agrishow-2017-tecnologias-para-controle-biologico-em-cana-soja-morango-e-plantas.html#.WVjjrhXyt0w> . Acesso em: 12/06/17

ALVES, S.B. **Controle Microbiano de insetos.** Disponível em: https://books.google.com.br/books/about/Controle_microbiano_de_insetos.html?id=8CH9OwAACAAJ&redir_esc=y. Acesso em: 10/05/2017

BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. **Uma filogenia multilocus do *Metarhizium*.** Disponível em: <http://www.mycologia.org/content/101/4/512.full>. Acesso em 05/01/2017

BETTIOL, W.; MORANDI, M. **Biocontrole de doenças de plantas: Usos e perspectivas.** Disponível em: http://www.cnpma.embrapa.br/download/livro_biocontrole.pdf. Acesso em: 03/01/2017

CARLILE, M.J.; WATKINSON, S.C. **Células fúngicas e crescimento vegetativo.** Disponível em: <https://www.mysciencework.com/publication/show/d4c8b191500d063d1f338eb6aba95f0a>. Acesso em: 09/01/2017

CHARLEY, A.K. **Patógenos microbianos e controle de insetos praga.** Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.1991.tb00528.x/pdf>. Acesso em: 01/03/2017

Chisti, Y.; Moo-Young, M., **Comunicação ao editor sobre o cálculo da taxa de corte e viscosidade aparente em Bioreatores de Colunas de Bombas e Bolhas.**

Disponível em: <http://www.massey.ac.nz/~ychisti/ShearCom.pdf>. Acesso em: 11/01/2017

FANG, W. et al. **Uma lacase expressa exclusivamente por *Metarhizium anisopliae* durante o crescimento isotrópico está envolvida na pigmentação, tolerância ao estresse abiótico e virulência.** Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20382249>. Acesso em: 05/01/2017

FRANCESCHINI et al. **Biotecnologia aplicada a Pesquisa de Controle biológico.** Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio23/biotecnologia.pdf>. Acesso em: 02/01/2017

FONSECA, F. et al. **Manual de Contagem de Hidratos de Carbono na Diabetes Mellitus – para profissionais de saúde.** Disponível em: http://www.apn.org.pt/documentos/manuais/Manual_Contagem_HC.pdf. Acesso em: 10/05/2017

JACKSON, M. A; JARONSKI, S. T. **Produção de microsclerotia do entomopatógeno fúngico *Metarhizium anisopliae* e seu potencial de uso como agente de controle biológico para insetos que habitam o solo.** Disponível em: <https://naldc.nal.usda.gov/download/33311/PDF>>. Acesso em: 09/01/2017

JUNGES, A. ***Metarhizium anisopliae*: Expressão de proteína tóxica de origem vegetal e análise genômica de quitinases.** Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/26609/000754402.pdf?sequence=1>. Acesso em: 04/01/2017

KOPPERT. <http://koppert.com.br/produtos/metarril>. Acesso em: 02/01/2017

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

MACHADO, L. **Adubação nitrogenada**. Disponível em: <http://www.dpv24.iciag.ufu.br/new/dpv24/Apostilas/Monitor%20Leonardo%20-%20Apostila%20Adub.%20Nitrogenada%2002.pdf>. Acesso em: 10/05/2017

MASCARIN, G.M.; JACKSON, M.A.; KOBORI, N.N.; BEHLE, R.W.; DELALIBERA, I.Jr. **Fermentação de cultura líquida para produção rápida de blastoporos de cepas de *Beauveria bassiana* e *Isaria fumorosea***. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201114001797>. Acesso em 09/01/2017

OTATI-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**. Disponível em: http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/105406/ottatidelima_el_dr_botfca.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 05/01/2017

PAULI, G. MASCARIN, G. **Bioprodutos à base de fungos entomopatogênicos**. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/274374886_Bioprodutos_a_base_de_fungos_entomopatogenticos_Fungal_biopesticides_in_portuguese. Acesso em: 05/01/2017

ROBERTS, D. W. ST LEGER, R.J. *Metharizium* spp., **Fungos cosmopolitas insetos-patogênicos: aspectos micológicos.** Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15251275>. Acesso em: 05/01/2017

SANTOS, F. et al. **Protocolo para Produção Massal de Fungos Entomopatogênicos II - *Hirsutella thompsonii* (Fischer).** Disponível em: http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2009/bp_43.pdf. Acesso em: 03/01/2017

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. **Biorreatores e Processos Fermentativos.** Cap. 8. Engenharia Bioquímica (Biotecnologia Industrial), Ed. Edgard Blucher Ltda, vol. 2, São Paulo, 2001.

SOARES, E. C. **Construção de um biorreator de baixo custo para produção de bactérias fixadoras biológicas de nitrogênio.** Disponível na UFSJ

STEINHAUS, E. A. **Doença em Corda Menor.** Disponível em: <https://kb.osu.edu/dspace/handle/1811/29317>. Acesso em: 21/06/2017

TANZINI, M.R. **Controle do percevejo-de-renda-da-seringueira (*Leptopharsa heveae*) com fungos entomopatogênicos.** Disponível em: www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/111146/tde-17092002-161221/.../marcel.pdf. Acesso em: 05/01/2017

VEGA, F. E.; JACKSON, M. A; MCGUIRE, M. R. **Germinação de conídios e blastosporos de *Paecilomyces fumosoroseus* na cutícula da mosca branca Silverleaf, *Bemisia argentifolii*.** Disponível em: <https://naldc.nal.usda.gov/download/11032/PDF>. Acesso em: 09/01/2017

Yip et al. **Caracterização de isolados de *Metarhizium anisopliae* a partir de solos de pastagens da Tasmânia e sua patogenicidade para o cockchafer ruivo (Coleoptera: Scarabaeidae: *Adoryphorus coultoni*).** Disponível em: