



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE SÃO PAULO

CAMPUS AVARÉ

CURSO DE BACHARELADO EM ENGENHARIA DE BIOCISTEMAS

ANNA BEATRIZ DE QUEIROZ AGUIAR

**FERMENTAÇÃO DE MATERIAL QUITINOSO RESIDUAL DA CRIAÇÃO DE LARVAS
DE *Tenebrio molitor* PARA OBTENÇÃO DE BIOINSUMOS COM ATIVIDADE
PROTEOLÍTICA E QUITINOLÍTICA.**

**AVARÉ
2025**

ANNA BEATRIZ DE QUEIROZ AGUIAR

**FERMENTAÇÃO DE MATERIAL QUITINOSO RESIDUAL DA CRIAÇÃO DE LARVAS
DE *Tenebrio molitor* PARA OBTENÇÃO DE BIOINSUMOS COM ATIVIDADE
PROTEOLÍTICA E QUITINOLÍTICA.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Engenharia de Biosistemas do Instituto
Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia de São Paulo - *Campus Avaré*,
como requisito parcial à obtenção do título
de Engenheiro de Biosistemas.

Orientadora: Profa. Dra. Marcela Pavan
Bagagli

AVARÉ
2025

Catálogo na fonte
Instituto Federal de São Paulo – *Campus Avaré*

Aguiar, Anna Beatriz de Queiroz

Fermentação de material quitinoso residual da criação de larvas de *Tenebrio molitor* para obtenção de bioinsumos com atividade proteolítica e quitinolítica/ Anna Beatriz de Queiroz Aguiar. - Avaré, 2025.

69 p.

Orientador: Prof.^a Dra. Marcela Pavan Bagagli

Monografia (Graduação – Engenharia de Biossistemas) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – *Campus Avaré*, Avaré, 2025.

1. Quitina, 2. Bioinsumos, 3. Fermentação, 4. *Tenebrio molitor*. I. Bagagli, Marcela Pavan. II. Título.

ATA N.º 5/2025 - CBEB-AVR/DAE-AVR/DRG/AVR/IFSP

Ata de Defesa de Trabalho de Conclusão de Curso - Graduação

Na presente data realizou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "Fermentação de material quitinoso residual da criação de larvas de *Tenebrio molitor* para obtenção de bioinsumos com atividade proteolítica e quitinolítica." apresentado(a) pelo(a) aluno(a) **Anna Beatriz de Quiroz Aguiar (AV3019896)** do Curso **SUPERIOR EM Engenharia de Biosistemas**, Campus Avaré. Os trabalhos foram iniciados às 20:00 pelo(a) Professor(a) presidente da banca examinadora, constituída pelos seguintes membros:

Membros	IES	Presença (Sim/Não)	Aprovação/Conceito (Quando Exigido)
Marcela Pavan Bagagli (Presidente/Orientador)	IFSP - Avaré	Sim	Aprovado
Maria Cristina Marques (Examinador 1)	IFSP - Avaré	Sim	Aprovado
Meliane Akemi Koike (Examinador 2)	IFSP - Avaré	Sim	Aprovado

Observações:

A banca examinadora, tendo terminado a apresentação do conteúdo da monografia, passou à arguição do(a) candidato(a). Em seguida, os examinadores reuniram-se para avaliação e deram o parecer final sobre o trabalho apresentado pelo(a) aluno(a), tendo sido atribuído o seguinte resultado:

☒ Aprovado(a) ☐ Reprovado(a) Nota (quando exigido): 10,0

Proclamados os resultados pelo(a) presidente(a) da banca examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, eu lavrei a presente ata que assino juntamente com os demais membros da banca examinadora.

Campus Avaré, 27 de outubro de 2025

Avaliador externo: ☐ Sim ☒ Não

Assinatura:

ATA N.º 5/2025 - CBEB-AVR/DAE-AVR/DRG/AVR/IFSP / pg. 1

Documento assinado eletronicamente por:

- Marcela Pavan Bagagli, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 27/10/2025 13:31:47.
- Maria Cristina Marques, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 27/10/2025 13:57:37.
- Meliane Akemi Koike, TECNICO DE LABORATORIO AREA, em 27/10/2025 15:46:29.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 27/10/2025. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse https://suap.ifsp.edu.br/autenticar_documento/ e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 1053216
Código de Autenticação: 5160008a20



ATA N.º 5/2025 - CBEB-AVR/DAE-AVR/DRG/AVR/IFSP / pg. 2

Dedico aos meus pais e avós, em
especial ao meu eterno avô Eduardo

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder força, sabedoria e fé em todos os momentos desta jornada.

Aos meus pais, Alexandre Bemfica Aguiar e Ana Aparecida de Queiroz Aguiar, e ao meu irmão, por todo o amor, incentivo e apoio ao longo de toda a minha vida, e por nunca medirem esforços para me ajudar a realizar os meus sonhos. Agradeço também aos meus avós, pelas palavras de carinho e sabedoria. Em especial, ao meu eterno avô Eduardo, cuja lembrança e ensinamentos seguem vivos em meu coração e me inspiram diariamente.

Ao meu namorado Matheus, por estar sempre ao meu lado com amor, respeito e paciência. Obrigada por acreditar em mim, mesmo nos momentos mais difíceis, e por me apoiar ao longo de toda essa caminhada.

Aos amigos que fiz ao longo do percurso e aqueles que sempre estiveram presentes em minha vida, sou profundamente grata por dividirem comigo o peso dessa jornada. O apoio, a escuta e o companheirismo de vocês tornaram os momentos desafiadores mais leves e significativos.

À minha orientadora, professora Marcela Pavan Bagagli, por sua dedicação, sensibilidade e competência. Mais do que uma mentora, foi uma amiga, sempre pronta a oferecer conselhos, apoio e a acreditar no meu potencial. Minha gratidão por sua presença constante e generosa.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – *Campus Avaré*, por oferecer um ambiente de aprendizado, acolhimento e crescimento pessoal e profissional, fundamentais para a construção deste trabalho.

E, por fim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para que essa etapa fosse concluída com êxito, o meu mais sincero e profundo agradecimento.

Aprender é a única coisa que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

A crescente demanda por fontes sustentáveis de proteínas impulsionou o interesse na criação de insetos, como o *Tenebrio molitor*. Este estudo explora o uso de exúvias de larvas de *T. molitor*, ricas em quitina, como substrato para o cultivo de microrganismos produtores de enzimas com potencial aplicação agrícola. A quitina, segundo polissacarídeo mais abundante na Terra, possui aplicações em diversas áreas, incluindo a agricultura, onde pode promover mecanismos de defesa das plantas e aumentar o rendimento das culturas. Neste trabalho, o material quitinoso foi utilizado para cultivar os fungos entomopatogênicos como a *Beauveria bassiana* e a bactéria *Bacillus subtilis* por fermentação em estado sólido. O objetivo principal foi obter bioinsumos com alta atividade de quitinase e protease e quantificar a viabilidade microbiana para aplicações no feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). A fermentação dos microrganismos resultou em uma contagem média de $2,20 \times 10^9$ UFC/mL para *B. subtilis* e $2,95 \times 10^8$ UFC/mL para *B. bassiana*. As análises de microscopia e coloração confirmaram a presença de células vegetativas e esporos característicos dos microrganismos. Em conclusão os testes de germinação e desenvolvimento das plantas não mostraram diferença significativa entre os extratos fermentados, indicando que ambos métodos têm desempenho similar.

Palavras-chave: Quitina; Bioinsumos; Fermentação; *Tenebrio molitor*.

ABSTRACT

The growing demand for sustainable protein sources has driven interest in insect farming, such as *Tenebrio molitor*. This study explores the use of exuviae from *T. molitor* larvae, which are rich in chitin, as a substrate for the cultivation of enzyme-producing microorganisms with potential agricultural applications. Chitin, the second most abundant polysaccharide on Earth, has applications in various fields, including agriculture, where it can enhance plant defense mechanisms and improve crop yields. In this work, chitinous material was used to cultivate entomopathogenic fungi such as *Beauveria bassiana* and the bacterium *Bacillus subtilis* through solid-state fermentation. The main goal was to obtain bio-inputs with high chitinase and protease activity and to quantify microbial viability for applications in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Fermentation resulted in an average microbial count of 2.20×10^9 CFU/mL for *B. subtilis* and 2.95×10^8 CFU/mL for *B. bassiana*. Microscopy and staining analyses confirmed the presence of vegetative cells and characteristic spores of the microorganisms. In conclusion, germination and plant development tests showed no significant difference between the fermented extracts, indicating that both methods perform similarly.

Keywords: Chitin; Bio-inputs; Fermentation; *Tenebrio molitor*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- Ilustração dos processos envolvidos na rizosfera das plantas	23
FIGURA 2- Esquema de estrias para recobrimento da superfície do ágar para preparo do inóculo	36
FIGURA 3- Material quitinoso (a) seco e (b) umedecido.....	37
FIGURA 4- Placa de <i>Beauveria bassiana</i> com cilindros de ágar, de 0,6 cm de diâmetro, cortados	38
FIGURA 5- Frascos inoculados com <i>Beauveria bassiana</i>	38
FIGURA 6- Extrato filtrado utilizando funil e gaze estéril	39
FIGURA 7- Fluxograma da obtenção do extrato fermentado bruto (EFB)	40
FIGURA 8- Sacos utilizados para os tratamentos das sementes	44
FIGURA 9- Sementes espalhadas na bandeja para secar	44
FIGURA 10- Preparo do substrato e plantio das sementes, respectivamente	45
FIGURA 11- Medição do (a) volume das raízes e do (b) comprimento das plantas	46
FIGURA 12- Processo de pulverização em campo com pulverizador manual	47
FIGURA 13- Medição da capacidade de retenção de água do material quitinoso	49
FIGURA 14- Crescimento do <i>Beauveria bassiana</i> após 240h de incubação	50
FIGURA 15- Crescimento do <i>Bacillus subtilis</i> após 240h de incubação	50
FIGURA 16- Coloração de (a) esporos e (b) coloração de Gram para o EFB de <i>Beauveria bassiana</i> . Aumento de 1000x.....	51

Figura 17- Coloração de (a) esporos e (b) Gram para o EFB de <i>Bacillus subtilis</i> . Aumento de 1000x	51
FIGURA 18- Porcentagem de emergência das sementes ao longo de 15 dias de cultivo	54
FIGURA 19- Ilustração da diversidade de plantas obtidas após 30 dias de cultivo nas réplicas experimentais de sementes tratadas com (a)EFB Bb, (b) EFB C e (c) água... 58	
FIGURA 20- Colonização das raízes por <i>Beauveria bassiana</i> no cultivo nas réplicas experimentais de sementes tratadas com (a)EFB Q Bb, (b) EFB C e (c) água	60
FIGURA 21- Síntese dos resultados experimentais obtidos para os diferentes parâmetros avaliados.	61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Contagem média de esporos dos diferentes tratamentos com EFBs 49

TABELA 2- Atividade proteolítica dos EFBs. Letras sobrescritas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as amostras pelo teste Tukey com 95% de confiança. As comparações foram realizadas por atividade enzimática..... 52

TABELA 3 - Volumes das raízes, comprimentos das raízes e comprimento da parte aérea, dos EFBs e água como comparação. Letras sobrescritas diferentes indicam que houve diferença significativa entre as amostras Tukey, com 95% de confiança. As análises foram realizadas por variável resposta. 54

TABELA 4 - Índice de germinação, volumes das raízes, comprimentos das raízes e comprimento da parte aérea para os tratamentos EFB Q Bb, EFB A Bb e água (controle), avaliados no campo. Letras sobrescritas diferentes indicam diferença significativa entre as amostras, conforme o teste Qui-quadrado para o índice de emergência e o teste de Tukey para as demais variáveis, ambos com 95% de confiança. 57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CR	Capacidade de retenção de água
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
EFB	Extrato fermentado bruto
EFB A Bb	Fermentado de arroz com <i>Beauveria bassiana</i>
EFB C	Quitina sem microrganismo.
EFB Q Bb	Fermentado de quitina com <i>Beauveria bassiana</i>
EFB Q Bs	Fermentado de quitina com <i>Bacillus subtilis</i>
FAO	Food and Agriculture Organization
FES	Fermentação em estado sólido
g	Gramma
GRAS	Generally Regarded As Safe
mL	Mililitros
MPCPs	Microrganismos promotores de crescimento de plantas
NA	Ágar nutriente
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
ONU	Organização das Nações Unidas
PDA	Ágar batata dextrose

PFB	Produto fermentado bruto
rpm	Rotação por minuto
UFC	Unidades formadoras de colônia
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
μL	Microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivo específicos	20
3 REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1 Bioinsumos	21
3.1.1 Microrganismos promotores de crescimento de plantas.....	22
3.1.2 Controle biológico de pragas	24
3.2 Multiplicação de microrganismos por fermentação em estado sólido	27
3.3 Uso de quitina como meio de cultivo para microrganismos	29
3.4 Cultivo de <i>Beauveria bassiana</i> por fermentação em estado sólido	31
3.5 Cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> por fermentação em estado sólido	33
4 METODOLOGIA	35
4.1 Manutenção dos microrganismos	35
4.2 Preparo do material quitinoso	35
4.3 Preparo dos inóculos para as fermentações.....	36
4.4 Cultivo dos microrganismos no material quitinoso por fermentação em estado sólido	37
4.5 Extração de enzimas extracelulares e microrganismos.....	38
4.6 Quantificação dos microrganismos	40
4.6.1 Quantificação de esporos de bactérias nos EFBs.....	40
4.6.2 Quantificação de propágulos de fungos nos EFBs.....	41

4.7 Quantificação da atividade proteolítica nos EFBs	42
4.8 Quantificação da atividade quitinolítica nos EFBs	42
4.9 Análises do efeito dos EFBs no tratamento de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	43
4.9.1 Germinação na estufa em bandejas para Mudas.....	43
4.10 Análise do efeito dos EFB na pulverização e tratamentos de sementes de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) no campo.....	46
4.10.1 Preparo dos canteiros e procedimento de pulverização.....	46
4.10.2 Verificação da colonização de raízes por <i>B. bassiana</i>	48
4.11 Análises estatísticas	48
5 ANÁLISE DOS RESULTADOS	48
5.1 Capacidade de retenção de água do material quitinoso	48
5.2 Avaliação das fermentações	49
5.3 Avaliação da atividade proteolítica e quitinolítica nos EFB	52
5.4 Ensaio em bandejas para mudas.....	53
5.5 Análises no campo	56
5.6 Verificação da colonização de raízes por <i>B. bassiana</i>	59
5.7 Síntese dos resultados obtidos	61
6 CONCLUSÃO	62
7 REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2015) tem apresentado como alternativas sustentável para o fornecimento de proteína para a população mundial crescente, o consumo de insetos. A criação em massa de insetos para alimentação humana e animal ainda gera subprodutos que podem ser aplicados na obtenção de biocombustíveis e bioinsumos para a agricultura (Schluter, 2016; Castro *et al.*, 2018; Heyes, 2018; Fialho *et al.*, 2021; Poveda, 2021).

As larvas de *Tenebrio molitor* foram as primeiras a serem aprovadas para consumo humano na União Europeia (Efsa Nda Panel, 2021). Em sua criação massal há o potencial de aproveitamento de resíduos sólidos orgânicos que podem ser convertidos em proteínas e lipídios para alimentação humana e animal, para obtenção de biocombustíveis, fertilizantes, entre outros (Surendra *et al.*, 2020; Karthikeyan *et al.*, 2020; Ravi *et al.*, 2020). Ainda, a produção de insetos forma exúvias ao longo do desenvolvimento das larvas, constituindo resíduos da criação. Esses materiais são constituídos majoritariamente por proteínas, quitina e minerais (Finke, 2007; Kim *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2021).

A quitina é um polímero formado por unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranos e 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranos unidas por ligações glicosídicas β -1,4, constituindo o segundo polissacarídeo natural mais abundante na terra, estando atrás apenas da celulose (Lin *et al.*, 2021). Este polissacarídeo pode ser encontrado em insetos, crustáceos e na parede celular de fungos, é insolúvel em água, ácidos e solventes orgânicos e apresenta aplicações em diversas áreas, entre elas a indústria de alimentos, farmacêutica, cosmética e a agricultura (Azevedo *et al.*, 2007; Poveda, 2021).

Na agricultura este polissacarídeo está associado ao estímulo de mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de insetos e fungos fitopatogênicos (Iriti; Faoro, 2009; Ramírez *et al.*, 2010), uma vez que esse polímero, insolúvel em água, ácidos e solventes orgânicos, confere à parede celular de fungos e ao exoesqueleto de insetos uma estrutura rígida protetora contra o ataque de agentes de controle (Fontes; Valadares-Inlis, 2020). Ainda, a quitina e seus derivados também são associados ao crescimento

das plantas e ao aumento de rendimento das culturas (Chakraborty *et al.*, 2020; Poveda, 2021).

Neste contexto, enzimas quitinolíticas e proteolíticas podem ser de grande utilidade para a inibição do desenvolvimento de fungos e insetos em culturas agrícolas (Ramírez *et al.*, 2010; Fontes; Valadares-Inlis, 2020; Wang *et al.*, 2021). As quitinases ainda modificam a estrutura polimérica da quitina produzindo quito-oligossacarídeos solúveis com propriedade interessantes para estimular o crescimento de plantas e inibir o crescimento de fungos (Liaqat; Eltem, 2018; Liu *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2021). O mesmo se observa para a ação de proteases, que liberam peptídeos bioativos com atividades antimicrobianas de interesse para a agricultura (Quah *et al.*, 2023).

Algumas bactérias e fungos filamentosos podem produzir quitinases e proteases extracelulares que atuam na cutícula do exoesqueleto de insetos, em ovos de nematoides, ou ainda na parede celular de fungos, facilitando a colonização de todo o fitopatógeno ou mesmo, o acesso de substâncias de controle (Halfeld *et al.*, 2016; Fontes; Valadares-Inlis, 2020; Boldoni *et al.*, 2020). Outras aplicações são encontradas para estas enzimas, como no caso da obtenção de compostos com atividade biológica, como oligossacarídeos e peptídeos (Azevedo *et al.*, 2007; de Castro *et al.*, 2018).

A produção de quitinases e proteases por microrganismos tem sido associada e aprimorada pela presença de indutores nos meios de cultivo, tanto em fermentações em estado sólido quanto em fermentações submersas (Fleuri, 2014; Boldoni *et al.*, 2020), sendo em geral utilizado quitina (hidrolisada, ou não) e fontes de proteínas específicas, respectivamente (Smith; Grula, 1983; de Castro; Pinto, 2009).

Beauveria bassiana, um fungo entomopatogênico, é capaz de produzir quitinases e proteases em fermentações em estado sólido (Suresh; Chandrasekaran, 1999; Sala *et al.*, 2022), da mesma forma, os *Bacillus subtilis*, uma bactéria amplamente utilizada no controle biológico de doenças em produções agrícolas também são produtores das enzimas por fermentação (Wang *et al.*, 2018; Monnerat *et al.*, 2020).

Desta forma, este trabalho almeja aplicar o material quitinoso proveniente de exúvias de larvas de *Tenebrio molitor* como substrato para o cultivo em estado sólido de *Beauveria bassiana* e *Bacillus subtilis*, a fim de se obter bioinsumo com atividade quitinolítica, proteolítica e quantidade de microrganismos viáveis com possível aplicação como agentes de controle de fitopatógenos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste projeto foi o de multiplicar microrganismos de interesse na agricultura usando como substrato material quitinoso proveniente da criação de larvas de *Tenebrio molitor* para obter bioinsumos com contagem de microrganismos e atividade quitinolítica e proteolítica significativas, contribuindo com os objetivos de desenvolvimento sustentáveis (ODS) da Organização das Nações Unidas (ONU), em especial o ODS 2 (Fome zero e agricultura sustentável).

2.2 Objetivo específicos

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- Preparar o material quitinoso proveniente da cultura massal de larvas de *Tenebrio molitor*;
- Cultivo e manutenção dos microrganismos (*Bacillus subtilis* e *Beauveria bassiana*) em meios de cultura específicos;
- Cultivo dos microrganismos por fermentação em estado sólido, nas condições ótimas de crescimento de cada microrganismo, utilizando como substrato o material quitinoso de *Tenebrio molitor*;
- Quantificar as atividades enzimáticas de quitinase e protease;
- Quantificar o número de microrganismos viáveis nos extratos das fermentações;
- Aplicar o extrato no cultivo de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e avaliar a influência no desenvolvimento das plantas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Bioinsumos

O setor agropecuário brasileiro passou por uma transformação e crescimento evidentes nas últimas décadas. O país, que antes dependia da importação de alimentos, consolidou-se como um dos maiores produtores e exportadores de commodities agrícolas. Vários fatores contribuíram para essa mudança, entre os quais podemos citar, o investimento em pesquisa, o desenvolvimento da infraestrutura e os fatores climáticos e ambientais favoráveis (Xavier, 2022).

De acordo com a FAO, o Brasil está entre os maiores consumidores de agrotóxicos no mundo. Realidade essa que representa um grande desafio tanto para os agricultores quanto para os consumidores brasileiros, devido ao alto custo financeiro, aos impactos negativos à saúde e aos danos ambientais (Ribeiro, 2021).

Considerando a necessidade de garantir alimentos seguros para a população e o papel do Brasil como um dos maiores produtores mundiais, torna-se fundamental promover uma agricultura que reduza progressivamente o uso de insumos químicos, adotando cada vez mais alternativas sustentáveis e de base biológica. Essa abordagem está alinhada com a estratégia global que visa eliminar a fome, reduzir a pobreza, proteger o meio ambiente e estimular o desenvolvimento econômico sustentável (Vidal; Saldanha; Verissimo, 2020).

Nesse sentido, o Governo Federal instituiu, por meio do Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020, o Programa Nacional de Bioinsumos (PNB). O conceito de bioinsumos é abrangente e, conforme definido no Decreto, compreende produtos, processos ou tecnologias de origem vegetal, animal ou microbiana, destinados ao uso na produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agropecuários (Brasil, 2020).

O estudo e a aplicação dos bioinsumos têm se intensificado em diversas culturas agrícolas, com o desenvolvimento de insumos biológicos que englobam desde bactérias promotoras do crescimento vegetal até fungos, com diferentes opções de aplicação, tais

como inoculação de sementes, tratamento de mudas, aplicação no solo e pulverização foliar (Botelho, 2023; Brasil, 2022).

3.1.1 Microrganismos promotores de crescimento de plantas

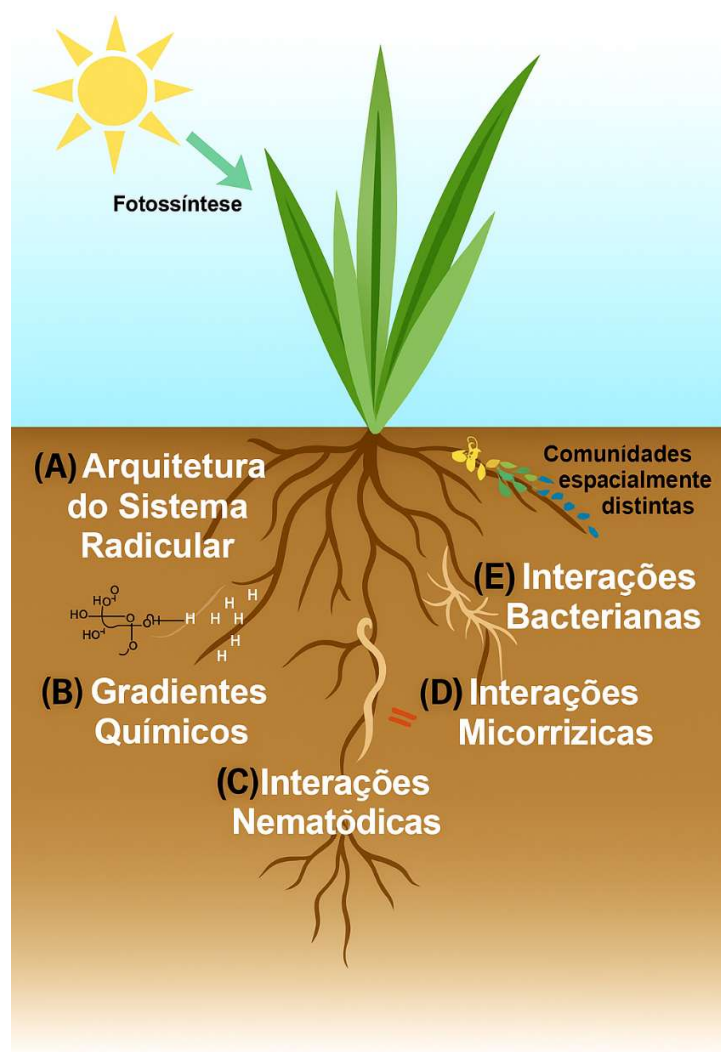
Dentre os bioinsumos mais utilizados na agricultura sustentável, destacam-se os microrganismos promotores de crescimento de plantas (MPCPs), um grupo diversificado de bactérias e fungos que interagem de forma benéfica com as culturas agrícolas. Esses microrganismos contribuem para o aumento da produtividade vegetal por meio de diferentes mecanismos fisiológicos, bioquímicos e ecológicos (Hungria *et al.*, 2010).

Esses microrganismos possuem a capacidade de colonizar tanto o interior quanto a superfície das plantas, formando associações simbióticas ou epifíticas que estimulam o desenvolvimento vegetal e auxiliam na inibição de doenças e ataque de pragas (Mariano *et al.*, 2013).

A rizosfera, área de contato entre raízes e solo. É o ambiente onde ocorre intensa interação entre as plantas e esses microrganismos, favorecida pela liberação de exsudatos radiculares, que servem como fonte de carbono e sinalizadores químicos, conforme ilustrado na figura 1 (Berg *et al.*, 2020; Yee *et al.*, 2021).

Dentre os MPCPs, destaca-se o gênero *Bacillus*, cuja algumas espécies solubilizam fosfatos, produzem sideróforos e fitormônios, auxiliando na absorção de nutrientes essenciais, como nitrogênio, fósforo, potássio e ferro, promovendo maior vigor e produtividade das plantas (Sansinenea, 2019; Radhakrishnan *et al.*, 2017). Em especial, as espécies de *Bacillus subtilis* tem sido amplamente estudada e utilizada devido à sua capacidade de promover o crescimento vegetal e induzir resistência sistêmica nas plantas contra diversos patógenos (Kloepper; Ryu; Zhang, 2004; Kumar; Singh; Singh, 2017).

FIGURA 1- Ilustração dos processos envolvidos na rizosfera das plantas



Fonte: Adaptado de Yee *et al.*, 2021.

Além das bactérias promotoras de crescimento, fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* também têm ganhado destaque na agricultura sustentável. Esse fungo é conhecido principalmente por sua capacidade de atuar como agente de controle biológico (Sanchez-Rodriguez *et al.*, 2018). Além do controle de pragas, estudos recentes demonstram que *Beauveria bassiana* pode colonizar as plantas (endófitos), estabelecendo uma relação benéfica que estimula o crescimento vegetal, aumenta a resistência a estresses bióticos e abióticos e melhora a absorção de nutrientes (Jang *et*

al., 2017; Jiang *et al.*, 2020). Essa dupla funcionalidade faz da *B. bassiana* uma ferramenta valiosa para práticas agrícolas integradas.

Pensando em técnicas de aplicação, a inoculação de sementes é eficiente para garantir a colonização precoce desses microrganismos benéficos. Consiste na aplicação direta de bactérias ou fungos promotores de crescimento sobre a superfície das sementes, facilitando a fixação biológica de nitrogênio, a solubilização de nutrientes e a produção de fitormônios logo no início do desenvolvimento das plantas (Hungria *et al.*, 2010; Singh; Varma, 2020). Essa prática também contribui para a proteção contra patógenos do solo, devido à competição e à síntese de compostos antimicrobianos (Kim *et al.*, 2012). Culturas como soja, milho e feijão têm demonstrado respostas positivas à inoculação com cepas de *Bacillus subtilis*, *Rhizobium* spp., fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* e fungos como *Trichoderma* spp. (Jiang *et al.*, 2020; Pereira *et al.*, 2020).

3.1.2 Controle biológico de pragas

De acordo com a Lei nº 14.785/2023, os agrotóxicos e seus componentes são definidos como produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso na produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agrícolas, com a finalidade de modificar a composição da flora ou da fauna para protegê-las da ação de organismos nocivos (BRASIL, 2023).

Posteriormente, a Lei nº 15.070/2024, conhecida como a lei dos bioinsumos, estabeleceu tratamento jurídico diferenciado para esses produtos biológicos, criando categorias específicas e separando-os do regime de agrotóxicos, reconhecendo sua relevância para a agricultura sustentável e estimulando a pesquisa, o desenvolvimento e a aplicação de tecnologias baseadas em organismos vivos ou substâncias de origem biológica no manejo agrícola, e alterando a Lei nº 14.785/2023 (BRASIL, 2024).

Essa evolução normativa reflete não apenas uma mudança legal, mas também um redirecionamento do modelo de desenvolvimento agrícola brasileiro. Historicamente, a agricultura nacional foi estruturada com base no modelo intensivo de produção disseminado pela Revolução Verde, durante a segunda metade do século XX. Esse modelo priorizou o uso massivo de fertilizantes sintéticos e defensivos químicos, gerando, além da alta produtividade, significativos impactos ambientais (Almeida *et al.*, 1985; Oliveira *et al.*, 2014).

A intensa utilização de defensivos químicos tem promovido sérias consequências ambientais, onde seus efeitos colaterais incluem a contaminação do solo e da água, intoxicação de trabalhadores rurais, bioacumulação nos alimentos, impacto em organismos não alvo e seleção de populações resistentes de insetos, patógenos e plantas invasoras. Resultando na escassez de nutrientes essenciais para o desenvolvimento das plantas e, conseqüentemente, na dependência crescente dos produtores por insumos químicos, reforçando a necessidade de aplicação de doses cada vez maiores dos mesmos princípios ativos (Meena *et al.*, 2017; Hurtado *et al.*, 2019; BRASIL, 2019).

Diante disso, práticas sustentáveis ganham espaço na tentativa de mitigar os impactos ambientais sem comprometer a produtividade agrícola. Entre essas práticas, destaca-se o controle biológico, uma alternativa promissora que compreende o uso de produtos naturais de diferentes naturezas, incluindo agentes bioquímicos, semioquímicos, macrorganismos e microrganismos. Entre os agentes bioquímicos, destacam-se enzimas e hormônios; como semioquímicos os feromônios; macrorganismos, os seres vivos inimigos naturais da praga-alvo, como insetos, ácaros e nematóides. Já os microrganismos incluem fungos, bactérias e vírus entomopatogênicos, capazes de infectar e controlar populações de pragas de forma específica e sustentável (Croplife, 2021; Oliveira *et al.*, 2014).

Dentre essas possibilidades, o controle biológico a partir do uso de entomopatógenos, onde microrganismos infectam insetos deixando-os doentes posteriormente levando-os à morte, é uma técnica sadia e racional, inofensiva à saúde

da população, animais e ambiente (Abcbio, 2019). Uma vez que para a seleção de um microrganismo viável na formulação de bioinseticidas, é essencial que ele apresente não apenas alta eficácia no controle da praga-alvo, mas também baixa virulência sobre organismos não alvo, garantindo a segurança ambiental e a seletividade do produto (Hernández; Martínez; Padilla, 2019).

Os fungos entomopatogênicos são apontados como a classe de microrganismos com maior potencial no controle de insetos-praga, pois praticamente todas as espécies são suscetíveis às doenças por eles causadas. Dentre os fungos de maior relevância, se destacam *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, pois apresentam capacidade de infectar uma ampla variedade de pragas-alvo (Hernández; Martínez; Padilla, 2019). Essa infecção inicia-se, geralmente, com a adesão dos esporos ou conídios à cutícula do inseto hospedeiro. Após a fixação, os esporos germinam, penetram o exoesqueleto e atingem os tecidos internos. A presença do entomopatogênicos desencadeia respostas imunológicas que exigem elevado consumo energético, comprometendo funções metabólicas essenciais do hospedeiro. À medida que o fungo se dissemina pelo organismo, libera toxinas e utiliza os nutrientes do inseto para seu próprio desenvolvimento. Durante esse processo, o inseto infectado apresenta redução na mobilidade, perda de apetite e, geralmente, morre entre sete e dez dias após a infecção, em decorrência de exaustão nutricional e falência sistêmica (Alves, 2002; Sharma, 2000; Oliveira *et al.*, 2014).

O uso desses organismos tem ganhado destaque devido à sua aplicação prática, sustentabilidade, viabilidade econômica e alta eficácia no controle de pragas. Um exemplo expressivo é a aplicação de *Beauveria bassiana* em uma área de 144 hectares para o controle da broca-do-café (*Hypothenemus hampei*), apresentando 100% de eficácia no controle da praga (Gerónimo *et al.*, 2016).

Nesse contexto, o mercado de biodefensivos, anteriormente considerado um segmento restrito e de baixa relevância comercial, vem se consolidando como uma alternativa estratégica e promissora. O setor tem despertado crescente interesse de empresas multinacionais, acompanhado de investimentos significativos em pesquisa e

inovação voltados ao desenvolvimento de novos produtos (Zem; Azevedo, 2020). No Brasil, esse avanço é evidenciado pela presença de mais de 80 biofábricas e pelo aumento de 77% no comércio de produtos biológicos entre 2017 e 2018. Até os dias atuais, a utilização de defensivos biológicos no país já ultrapassa 23 milhões de hectares, com estimativa de crescimento de 20% para o ano em curso (Croplife, 2020).

3.2 Multiplicação de microrganismos por fermentação em estado sólido

O crescente interesse do setor industrial e econômico na produção de bioinsumos tem se refletido na expansão do número de biofábricas, impulsionando práticas que conciliam a segurança alimentar com a preservação ambiental e favorecem um modelo de produção agrícola mais sustentável e equilibrado.

Nos últimos anos, a técnica de fermentação em estado sólido tem despertado crescente interesse da comunidade científica, por demonstrar potencial para gerar produtos com maior produtividade ou produtos com melhores características do que a fermentação submersa (Robinson; Nigam, 2003).

A fermentação em estado sólido (FES) é caracterizada pelo crescimento de microrganismos em substratos sólidos na ausência de água livre circulante (Rahardjo *et al.*, 2006; Farinas *et al.*, 2014). Essa técnica tem se destacado por suas múltiplas vantagens, entre as quais se incluem a capacidade de simular o ambiente natural de fungos filamentosos (Hölker *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2015; Hansen *et al.*, 2015; Pandey, 2003; Mattedi *et al.*, 2023). Além disso, a FES promove maior produtividade de enzimas, reduz a suscetibilidade à contaminação microbiana e oferece maior estabilidade enzimática frente a variações de temperatura e pH (Singhania *et al.*, 2010; Rodríguez Zúñiga *et al.*, 2011). Também favorece uma maior concentração dos produtos finais, menor repressão catabólica, e permite o cultivo de microrganismos especializados em substratos insolúveis em água ou até mesmo de consórcios de fungos (Singhania *et al.*, 2009). Outro aspecto relevante da FES é a produção de esporos fúngicos com maior

estabilidade, resistência e taxas de germinação superiores em comparação àqueles obtidos por fermentação submersa (Hölker; Lenz, 2005).

Esse processo biotecnológico requer controle tanto do meio quanto das condições de cultivo. Diversas variáveis biológicas, físico-químicas e ambientais podem influenciar o desempenho da fermentação em estado sólido, sendo seus efeitos dependentes do tipo de substrato e do microrganismo empregado. Entre os principais fatores que impactam diretamente na produção de metabólitos extracelulares, como enzimas, destacam-se o tempo de fermentação, a temperatura, o pH, a umidade, a granulometria do substrato, o arejamento e os aspectos nutricionais do meio (Krishna, 2005).

Os substratos sólidos comumente utilizados na FES incluem, principalmente, grãos e seus derivados (Alves; Pereira, 1998), além de resíduos lignocelulósicos como bagaço de cana-de-açúcar, palha e farelo de trigo, entre outros. Muitas vezes, torna-se necessário fazer um pré-tratamento para adequar o substrato às condições adequadas de cultivo, como por exemplo, redução do tamanho das partículas por quebra física ou química dos polímeros de açúcar, hidrólise enzimática, adição de nutrientes, adequação do pH e umidade e cozimento com vapor para eliminar contaminantes (Eduardo, 2009).

Por operar sob baixa quantidade de água circulante, a FES apresenta vantagens ambientais significativas, como a redução do consumo de água e a diminuição na geração de efluentes líquidos. Outro benefício relevante é a possibilidade de utilização de substratos de baixo custo e abundância, o que contribui diretamente para a redução dos custos de produção (Robinson; Nigam, 2003). Nesse cenário de viabilidade econômica e sustentabilidade, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas no Brasil com o objetivo de identificar novas alternativas de substratos, promovendo o reaproveitamento de subprodutos agroindustriais e contribuindo para a mitigação dos impactos ambientais associados ao descarte inadequado desses resíduos (Pandey *et al.*, 2001; Singhania *et al.*, 2009).

3.3 Uso de quitina como meio de cultivo para microrganismos

Pensando no reaproveitamento de subprodutos agroindustriais, além dos resíduos lignocelulósicos tradicionalmente utilizados, outros subprodutos biológicos vêm ganhando destaque como fontes valiosas de compostos funcionais para a agricultura. Entre esses, destaca-se a quitina, um polissacarídeo estrutural encontrado no exoesqueleto de diversos organismos, como insetos, crustáceos e fungos (Muthukrishnan *et al.*, 2012).

A quitina é um polissacarídeo linear composto por resíduos de N-acetil-D-glicosamina ligados por ligações $\beta(1\rightarrow4)$, sendo considerada um dos biopolímeros mais abundantes na natureza. Estima-se que aproximadamente 10 gigatoneladas de quitina sejam sintetizadas e degradadas anualmente na biosfera, valor apenas uma ordem de grandeza inferior ao da celulose (Rocha, 2024). Devido às suas propriedades físico-químicas e bioativas, a quitina apresenta uma ampla gama de aplicações, abrangendo os setores alimentício, cosmético, agrícola e farmacêutico (Azevedo *et al.*, 2007).

Esse biopolímero está presente principalmente no exoesqueleto de artrópodes, na parede celular de fungos e em nematóides. Atualmente, a principal fonte comercial de quitina provém dos resíduos da indústria de alimentos marinhos, como lagostas, caranguejos e cascas de camarão. No entanto, os insetos têm emergido como uma fonte confiável e promissora para a produção de quitina (Khayrova; Lopatin; Varlamov, 2019).

A quitina é amplamente difundida nos insetos, onde constitui um componente estrutural essencial em diversas partes do organismo. As duas principais estruturas extracelulares em que ocorre a deposição de quitina são a cutícula que reveste a epiderme e a membrana peritrófica que recobre o intestino médio (Muthukrishnan *et al.*, 2012).

Entre as vantagens da produção de quitina a partir de insetos destacam-se a logística simplificada e o fornecimento contínuo, decorrentes da capacidade desses organismos de se adaptarem a diferentes regiões geográficas e variações sazonais (Tan; Lee; Chen, 2020).

Dentre os insetos com potencial para aproveitamento, o *Tenebrio molitor*, conhecido como larva-de-farinha, tem se destacado como uma fonte alternativa promissora de quitina. Esse destaque se deve, principalmente, à sua ampla utilização na produção de proteína animal e ao volume significativo de resíduos gerados após o processamento (Vieira *et al.*, 2019). Além disso, o *T. molitor* foi o primeiro inseto aprovado para consumo humano na União Europeia (Efsa NDA Panel, 2021), o que favorece sua criação em larga escala e, conseqüentemente, a geração de subprodutos como as exúvias que são os fragmentos quitinosos liberados durante a muda, que apresentam grande potencial de aproveitamento (Ravi *et al.*, 2020).

Esses materiais são constituídos majoritariamente por proteínas, quitina e minerais, características que os tornam resíduos de elevado interesse biotecnológico (Finke, 2007; Kim *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2021). Devido a esse perfil, eles podem ser utilizados como substrato para a produção de metabólitos de valor agregado. Nesse contexto, enzimas quitinolíticas e proteolíticas assumem papel central, não apenas na valorização desses resíduos, mas também na promoção do controle de fungos e insetos em culturas agrícolas (Ramírez *et al.*, 2010; Fontes; Valadares-Ingles, 2020; Wang *et al.*, 2021).

As quitinases modificam a estrutura polimérica da quitina, liberando quitooligossacarídeos solúveis com propriedades bioativas que estimulam o crescimento vegetal e inibem o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos (Liaqat; Eltem, 2018; Wang *et al.*, 2021). De forma complementar, as proteases degradam proteínas associadas à quitina, gerando peptídeos bioativos com efeito antimicrobiano de interesse agrícola (Quah *et al.*, 2023). Em ambientes naturais, fungos entomopatogênicos utilizam esses mecanismos enzimáticos durante a colonização do hospedeiro, ao reconhecerem quitina e proteínas do exoesqueleto de insetos, desencadeiam uma cascata bioquímica que culmina na produção de quitinases e proteases, essenciais para a penetração e infecção (Wiermann, 2022).

O potencial dessas enzimas é evidenciado em diversos estudos aplicados. Lee *et al.* (2021) demonstraram que *Paenibacillus elgii* TKU051 produz proteases em

subprodutos quitinosos da pesca, valorizando resíduos via conversão microbiana. Em outro estudo, Ghorbel-Bellaaj *et al.* (2011) otimizaram a produção conjunta de proteases (8.445,8 U/mL) e quitinases (82,8 mU/mL) por *Bacillus cereus* SV1 a partir de resíduos de camarão. Além disso, Bhattacharya *et al.* (2016) caracterizaram quitinases termoestáveis e alcalino-tolerantes produzidas por *Bacillus pumilus* JUBCH08, com 45% de antagonismo contra *Fusarium oxysporum*. Resultados similares foram obtidos por Aguiar (2020), que avaliou diferentes fontes de quitina em fermentações submersas por *Trichoderma asperellum*, observando produção significativa de quitinases e N-acetilglucosaminidases, com variações relacionadas à origem da quitina.

A aplicação desses resíduos biológicos em processos fermentativos representa, portanto, uma alternativa eficiente para a redução do desperdício e a valorização de materiais subutilizados, contribuindo para tornar a criação em larga escala de insetos ainda mais sustentável (Maciel, 2023).

3.4 Cultivo de *Beauveria bassiana* por fermentação em estado sólido

Entre os microrganismos que se adaptam bem à FES, estão os fungos filamentosos, uma vez que a técnica simula seu habitat natural, possibilitando a sintetização de quantidades consideráveis de enzimas e seus metabólitos (Farinas, 2015). A biotecnologia envolvendo esses fungos possui ampla relevância industrial, sendo aplicada em setores como nutrição animal, indústria farmacêutica, papel e celulose, produção de detergentes, têxteis, biocombustíveis e também na agricultura (Teixeira, 2023).

O cultivo de fungos e leveduras é frequentemente empregado nesse tipo de fermentação. Como esses microrganismos necessitam de níveis mais baixos de atividade de água (a_w) para crescer, acabam sendo apropriados para esse sistema. Além disso, os fungos filamentosos possuem propriedades estruturais e fisiológicas que facilitam o crescimento em substratos sólidos e, como principal característica deste crescimento, tem-se a secreção de enzimas (Gomes *et al.*, 2018). A morfologia dos

fungos filamentosos possibilita a colonização eficiente da superfície do substrato e da matriz em busca de nutrientes, o que resulta na secreção elevada de metabólitos e enzimas (Barrios-González, 2012).

No caso dos fungos entomopatogênicos, que atuam por meio do contato direto com o hospedeiro, utilizando seus conídios ou esporos como unidades infectantes, que correspondem ao princípio ativo dos bioinseticidas, a infecção bem-sucedida depende da atuação de enzimas capazes de degradar os componentes do tecido do inseto, como proteínas, quitina e lipídios (Pereira; Martins, 2016; Feng; Poprawski; Khachtourians, 1994).

Entre os diversos fungos entomopatogênicos estudados, destaca-se *Beauveria bassiana*, agente de biocontrole mais utilizado contra artrópodes, devido à sua capacidade de produzir estruturas de infecção e sintetizar um coquetel de proteínas, enzimas, ácidos orgânicos (principalmente ácido oxálico, que enfraquece a integridade da cutícula de insetos) e metabólitos secundários bioativos, responsáveis pela atividade patogênica e pela virulência (Garcia-Estrada; Cat; Santamarta, 2016).

Um estudo conduzido por Santa *et al.* (2005) avaliou diferentes resíduos, incluindo batatas rejeitadas, cascas de café e bagaço de cana-de-açúcar, sob condições controladas de temperatura, pH e umidade, com inóculo inicial de 10^7 conídios/g de matéria seca. A produção máxima de conídios alcançou $1,07 \times 10^{10}$ conídios/g de matéria seca no 10º dia de fermentação, evidenciando o potencial para a formulação de bioinseticidas e o aproveitamento de resíduos agroindustriais.

Outro estudo, realizado por Guimarães (2016), investigou a produção de conídios e enzimas hidrolíticas, como β -1,3-glucanase e quitinase, pelo fungo *B. bassiana* em fermentação sólida utilizando diferentes substratos, como arroz, malte A, malte B e fibra de algaroba. Após 10 dias de incubação, o fungo apresentou concentrações de conídios de $2,00 \times 10^6$ conídios/g em arroz, $1,22 \times 10^6$ conídios/g em malte A, $1,75 \times 10^6$ conídios/g em malte B e $2,36 \times 10^6$ conídios/g em fibra de algaroba, com taxas de germinação variando de 90,04 % a 99,96 %. A atividade enzimática foi mais expressiva nos substratos malte A e malte B, com valores de $1,178 \pm 0,021$ U/g e $1,161 \pm 0,019$ U/g,

respectivamente, evidenciando a correlação entre a atividade metabólica do fungo e a síntese enzimática.

Esses resultados demonstram que a fermentação em estado sólido é uma estratégia eficiente para maximizar tanto a produção de conídios quanto a síntese enzimática de *Beauveria bassiana*. Tal abordagem assegura sua eficácia biológica e reforça seu potencial de aplicação no desenvolvimento de bioinseticidas sustentáveis e em processos biotecnológicos.

3.5 Cultivo de *Bacillus subtilis* por fermentação em estado sólido

Existem algumas espécies de bactérias que foram descritas como capazes de produzir, com sucesso, enzimas em cultivo em estado sólido, como por exemplo, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* e *Lactobacillus* sp. (Singhania *et al.*, 2009). Outros microrganismos, como as actinobactérias são indicadas para o processo, uma vez que apresentam como característica a abundante colonização de resíduos sólidos.

A espécie *Bacillus subtilis*, pertencente ao gênero *Bacillus* e família Bacillaceae, é uma bactéria Gram-positiva, não patogênica, que recebeu o status GRAS (Generally Regarded As Safe) pela US Food and Drug Administration (FDA), o que significa ser segura para os seres humanos e animais, por isso já vem sendo amplamente utilizada para a produção de enzimas extracelulares (Alves *et al.*, 2018). A aplicação desta bactéria com finalidades industriais data de mais de mil anos, uma vez que a produção de natto por fermentação no estado sólido da soja foi realizada pela primeira vez em 1982 no Japão (Schallmey *et al.*, 2004).

O *B. subtilis*, quando submetido a um ambiente escasso em nutrientes, produz uma estrutura distinta chamada esporo (Wang; Wang; Yang, 2017). Esses esporos possuem grande resistência, podendo sobreviver a extremos de temperatura, sendo amplamente utilizados como agentes de biocontrole contra pragas e doenças agrícolas (Kloepper; Ryu; Zhang, 2004; Pereira *et al.*, 2017).

Estudos demonstram, por exemplo, que a aplicação de *B. subtilis* em campos de arroz foi eficaz no controle do inseto-praga *Cnaphalocrocis medinalis*, promovendo redução na taxa de sobrevivência larval e aumento da germinação das sementes (Zhang *et al.*, 2021). Além do efeito sobre pragas e doenças, *B. subtilis* também contribui diretamente para o crescimento vegetal por meio da produção de ácido indol-3-acético (AIA), sideróforos e enzimas que solubilizam nutrientes do solo, favorecendo processos fisiológicos como enraizamento e absorção de nutrientes (Prado *et al.*, 2016; Tamezzo *et al.*, 2016). Dessa forma, esse microrganismo representa uma alternativa sustentável e eficaz tanto no manejo integrado de pragas quanto na promoção do desenvolvimento vegetal.

Diversos estudos evidenciam a eficácia da fermentação em estado sólido (FES) para a produção de enzimas por *Bacillus subtilis* utilizando substratos agroindustriais. Ornela *et al.* (2020) investigaram a produção de quitinases por *B. subtilis* em FES, empregando resíduos da indústria pesqueira, como cascas de camarão, como substrato. Os resultados indicaram a viabilidade do uso desses resíduos para a produção de enzimas com potencial antifúngico.

De forma complementar, Soares *et al.* (2005) demonstraram que *B. subtilis* isolado foi capaz de produzir protease extracelular em FES utilizando torta de soja como meio de cultivo. A concentração ótima de inóculo foi de 0,7–2,0 mg/g, com atividade máxima de 960 U/g e produtividade de 15,4 U/g·h, evidenciando a eficiência do substrato para a produção enzimática.

Além disso, Prado *et al.* (2016) analisaram diferentes microrganismos em FES e observaram que as cepas de *B. subtilis* se destacaram na produção de auxinas indolacéticas (AIA) utilizando substratos como bagaço de mandioca, farelo de soja e trigo, demonstrando o potencial desse microrganismo em favorecer o crescimento vegetal e reforçando sua relevância em bioprocessos sustentáveis.

4 METODOLOGIA

4.1 Manutenção dos microrganismos

A cepa de *Bacillus subtilis* 93 (Bs) foi gentilmente disponibilizada pelo Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). A linhagem de *Beauveria bassiana* (Bb) foi isolada a partir de produto comercializado pela empresa de bioinsumos AGRINOR Fertilizantes.

Os microrganismos foram preservados no Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal de São Paulo, *Campus Avaré*. As culturas foram mantidas em *slants* de ágar nutriente (NA), no caso de *Bacillus subtilis*, e ágar batata dextrose (PDA), no caso de *Beauveria bassiana*, ambas foram recobertas com vaselina líquida e armazenadas sob refrigeração a 5 °C. Para assegurar a viabilidade das culturas, os *slants* foram repicados semestralmente.

4.2 Preparo do material quitinoso

Os materiais quitinosos provenientes do cultivo de larvas de *Tenebrio molitor* foram fornecidos pela empresa AGRIN – Criação e Comércio de Insetos. Após a coleta, o material foi submetido à secagem em estufa com circulação forçada de ar, à temperatura de 70 °C, até a obtenção de peso constante. Em seguida, foi triturado em moinho de uso geral, peneirado em malha com abertura de 600 µm e acondicionado em embalagens plásticas, sendo posteriormente armazenado a -18 °C até o momento de sua utilização.

A capacidade de retenção de água (CR) do material quitinoso foi determinada utilizando 1 g do material, previamente acondicionado em tubos Falcon de 15 mL com fundo cônico previamente perfurado. Os tubos foram acoplados individualmente a provetas de 10 mL, sendo o ensaio conduzido em triplicata. Em seguida, foram adicionados 7,5 mL de água destilada a cada tubo, e o líquido percolado foi coletado nas provetas ao longo de 24 horas (adaptado de Müller, 1964).

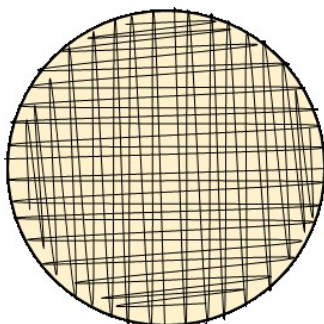
Após esse período, determinou-se a quantidade de água retida pelo material, expressa como volume de água absorvida por unidade de massa do material seco. A CR foi então calculada com base na Equação 1

$$CR(\%) = \frac{\text{água retida (mL)} \times 100\%}{\text{massa de material (g)}} \quad \text{eq.1}$$

4.3 Preparo dos inóculos para as fermentações

Para a obtenção dos inóculos de *Bacillus subtilis*, foram utilizadas placas de Petri contendo ágar nutriente, nas quais o microrganismo foi inoculado por meio da técnica de recobrimento, com o objetivo de obter crescimento confluyente, conforme ilustrado na figura 2. O processo de estriamento foi realizado utilizando um swab estéril, em seguida as placas foram incubadas a 28 °C por 48 horas, a fim de garantir o desenvolvimento adequado do microrganismo.

FIGURA 2 - Esquema de estrias para recobrimento da superfície do ágar para preparo do inóculo



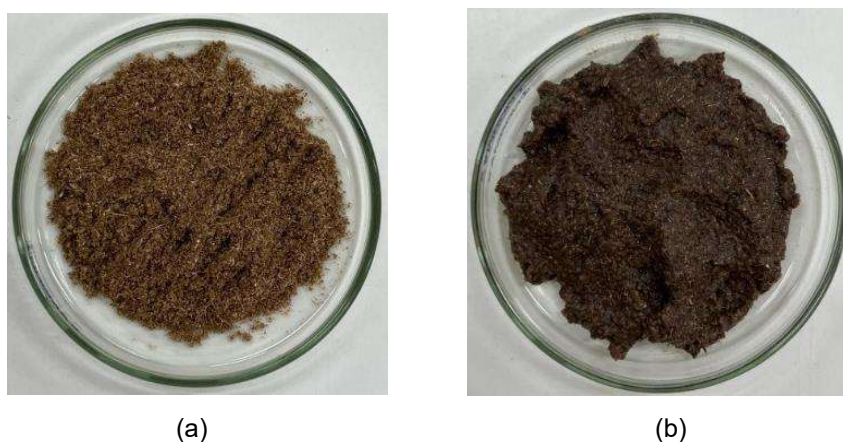
Fonte: Autoria própria, 2024

Para a *Beauveria bassiana*, foram utilizadas placas de Petri contendo ágar PDA, aplicando-se a mesma técnica de recobrimento utilizada para o microrganismo anterior, com o objetivo de se obter crescimento confluyente. As placas foram incubadas a 28 °C por 96 horas.

4.4 Cultivo dos microrganismos no material quitinoso por fermentação em estado sólido

Para a realização da fermentação, o material quitinoso foi umedecido com água destilada, na proporção indicada pela CR. Em seguida, 18 g do material úmido foram transferidos para frascos erlenmeyer de 250 mL. Os frascos foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos. A figura 3 apresenta o material antes e após a umidificação.

FIGURA 3- Material quitinoso (a) seco e (b) umedecido



Fonte: Autoria própria, 2024.

Após o resfriamento, os frascos foram inoculados com três cilindros de ágar (0,6 cm de diâmetro), cujas superfícies estavam completamente recobertas pelo microrganismo de interesse, como pode ser observado na figura 4. Em seguida, foram incubados a 28 °C por 240 horas. Os ensaios foram realizados em triplicata. A figura 5 apresenta os frascos recém-inoculados com *Beauveria bassiana*.

FIGURA 4- Placa de *Beauveria bassiana* com cilindros de ágar, de 0,6 cm de diâmetro, cortados



Fonte: Autoria própria, 2024.

FIGURA 5- Frascos inoculados com *Beauveria bassiana*



Fonte: Autoria própria, 2024.

4.5 Extração de enzimas extracelulares e microrganismos

Após o período de incubação, foi realizada a extração dos microrganismos e das enzimas extracelulares produzidas. Para isso, adicionaram-se 50 mL de água destilada aos meios de cultivo, que foram homogeneizados com bastão de vidro e mantidos sob agitação a 200 rpm, por 40 minutos, a 28 °C. O extrato foi então filtrado utilizando funil e gaze estéril para remoção de sólidos e microrganismos. O filtrado resultante foi

denominado extrato fermentado bruto (EFB), o qual foi mantido a -18°C até o momento da análise. A figura 6 apresenta o processo de extração.

FIGURA 6 - Extrato filtrado utilizando funil e gaze estéril

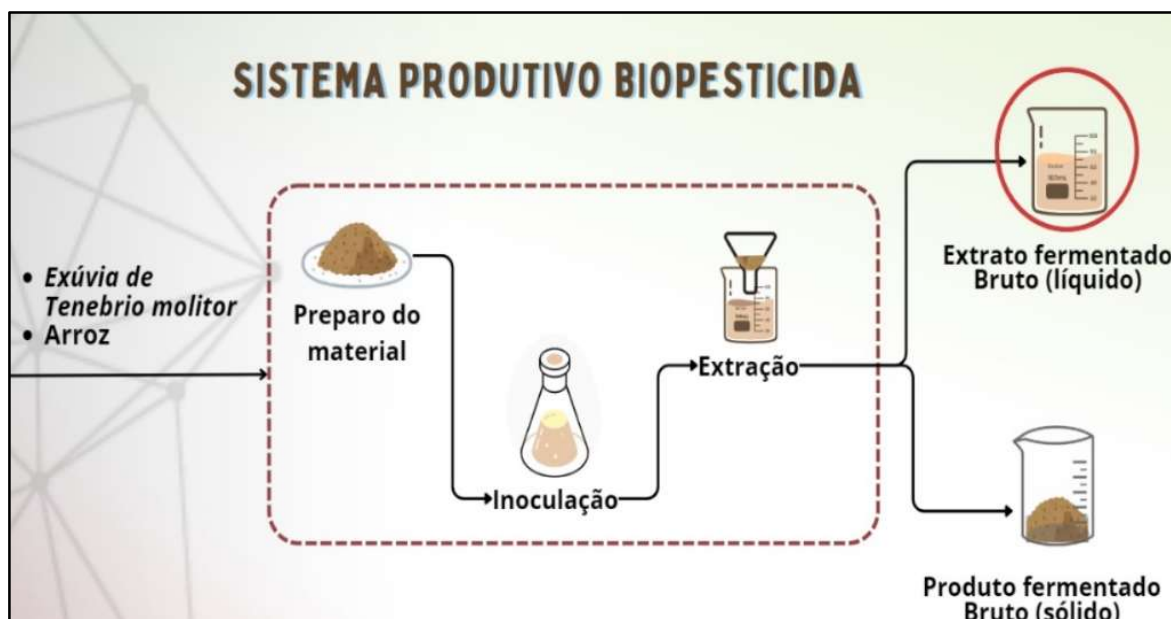


Fonte: Autoria própria, 2024.

O extrato fermentado bruto de quitina com *Beauveria bassiana* foi denominado EFB Q Bb. O extrato obtido a partir da fermentação de quitina com *Bacillus subtilis* foi denominado EFB Q Bs. Além disso, foi realizado o mesmo procedimento experimental, substituindo-se o material quitinoso por arroz tipo 1, na proporção 1:1, por se tratar de um substrato comumente utilizado no cultivo de microrganismos devido ao seu baixo custo e à sua composição favorável ao crescimento microbiano, o extrato resultante da fermentação com *Beauveria bassiana* recebeu a denominação EFB A Bb. Por fim, o extrato obtido apenas do material quitinoso, sem a inoculação de microrganismos, foi denominado EFB C, sendo utilizado como branco.

Os extratos enzimáticos foram avaliados quanto à atividade de proteases e quitinases, além da realização da contagem de esporos viáveis de *Bacillus* e de propágulos de fungos presentes. A parte sólida denominada Produto fermentado bruto (PFB), foi utilizada para outro projeto de pesquisa. A figura 7 ilustra o fluxograma simplificado da metodologia de obtenção dos extratos fermentados brutos e do produto fermentado bruto.

FIGURA 7- Fluxograma da obtenção do extrato fermentado bruto (EFB)



Fonte: Autoria própria, 2024.

4.6 Quantificação dos microrganismos

4.6.1 Quantificação de esporos de bactérias nos EFBs

A contagem de esporos de *Bacillus subtilis* foi realizada conforme metodologia adaptada de Monnerat *et al.* (2020). Uma alíquota de 1,5 mL da amostra, sem diluição, foi transferida para um tubo tipo Eppendorf e submetida a choque térmico em banho-maria a 80 °C por 12 minutos, seguido de resfriamento em congelador por 5 minutos, com o objetivo de eliminar células vegetativas e preservar apenas os esporos.

Após esse processo, foram realizadas diluições decimais seriadas das amostras em tubos contendo solução salina estéril (0,85% m/v), acrescida de 0,05% (m/v) de polisorbato 80. Em seguida, 100 µL da diluição desejada foram semeados, em duplicata, na superfície de placas de Petri contendo ágar nutriente suplementado com sais (0,1% extrato de levedura, 0,1% KH_2PO_4 , 2% ágar nutritivo e 10 mL/L de uma solução salina composta por 1% CaCO_3 , 1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 0,1% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

As placas foram incubadas em estufa a 28 °C por 48 horas, sendo então realizada a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). O número de UFC por mililitro (UFC/mL) da amostra foi determinado conforme a equação 2.

$$E_{\text{sporos}} \left(\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{número médio de colônias nas placas} \times \text{fator de diluição}}{\text{volume de amostra semeado (mL)}} \quad \text{eq.2}$$

4.6.2 Quantificação de propágulos de fungos nos EFBs

Foi realizada a diluição decimal seriada da amostra em tubos contendo solução salina estéril (0,85% m/v), acrescida de 0,05% (m/v) de polisorbato 80. Em seguida, foram semeados 100 µL da diluição desejada em duplicata em placas de Petri contendo ágar PDA. Após o espalhamento com alça de Drigalsky, as placas foram incubadas em estufa a 28 °C por 96 horas.

Após o período de incubação, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). A quantificação das UFC por mililitro (UFC/mL) da amostra seguiu a mesma equação utilizada na análise anterior (equação 2).

Além das análises quantitativas utilizadas para determinar o número de microrganismos viáveis nos extratos da fermentação, foram realizadas análises qualitativas de coloração de Gram e esporos, seguindo as metodologias descritas na sequência.

Para coloração de Gram, primeiramente foi feito um esfregaço da amostra em lâmina para microscopia limpa. O esfregaço foi fixado utilizando um bico de Bunsen e, após o resfriamento das lâminas, foi feita a coloração. Primeiramente as lâminas foram recobertas por 1 min como solução de cristal violeta (1%), sendo este removido por lavagem com água corrente. Na sequência, as lâminas foram recobertas por 1 min com solução de lugol fraco (0,3%). Após a remoção do lugol com água corrente, foi feita a lavagem das lâminas com solução alcoólica de acetona (30%). Por fim, as lâminas foram

recobertas por 30 segundos com solução de fucsina fenicada e novamente lavadas em água corrente. Após secas naturalmente, foram levadas ao microscópio óptico para observação.

A coloração de esporos de *Bacillus* spp. foi realizada conforme descrito por Ammons e Rampersad (2002), sendo utilizada solução 0,133% (m:v) de azul de Coomassie em ácido acético 50% (v:v) para recobrir as lâminas, já fixadas, por um minuto. Na sequência o corante foi removido com água corrente e após secas naturalmente, foram levadas ao microscópio óptico para observação.

4.7 Quantificação da atividade proteolítica nos EFBs

A atividade de proteases foi determinada utilizando como substrato da reação enzimática a azocaseína, de acordo com Charney e Tomarelli (1947), com modificações. A mistura reacional contendo 0,5 mL de azocasein (Sigma) 0,5% (m:v), pH 7,0, e 0,5 mL de solução enzimática, previamente diluída, foi incubada por 40 min a 50°C. A reação foi, então, paralisada com a adição de 0,5 mL de TCA 10% (m:v) e a mistura centrifugada a 10000 rpm por 15 min, 20 °C. Uma alíquota de 1,0 mL do sobrenadante foi, então, neutralizado com 1,0 mL de KOH 5 M.

Uma unidade de atividade enzimática (U) será definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância a 428 nm de 0,01 nas condições experimentais.

4.8 Quantificação da atividade quitinolítica nos EFBs

A quantificação da atividade quitinolítica foi realizada conforme Schmaltz (2020). A quitina coloidal foi preparada a partir de 20 g de quitina de crustáceo dissolvida em 200 mL de HCl concentrado, sob agitação por 15 minutos a 40 °C. Em seguida, foram adicionados lentamente 2 L de água gelada para promover a precipitação da quitina, que

foi recolhida por filtração a vácuo em papel filtro qualitativo. O material foi lavado com água destilada até atingir pH 5,0 e, posteriormente, liofilizado.

A reação enzimática foi conduzida em tubos plásticos de 5 mL contendo 500 µL de solução de quitina coloidal a 1% (m/v) em tampão acetato 50 mM, pH 7,0, e solução enzimática (EFB), incubados a 40 °C por 1 hora. Em seguida, foi realizada a quantificação dos açúcares redutores liberados pelo método de DNS (Miller, 1959), utilizando N-acetilglucosamina como padrão. Um controle negativo foi preparado interrompendo a reação com o reagente DNS logo no início da incubação.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de N-acetilglucosamina por mililitro por minuto de reação.

4.9 Análises do efeito dos EFBs no tratamento de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)

4.9.1 Germinação na estufa em bandejas para Mudas

As sementes foram acondicionadas em sacos plásticos com capacidade para 1 kg, sendo que cada saco recebeu 2,0 mL de um EFB específico para cada 300 g de sementes, conforme figura 8. Os sacos foram fechados e agitados vigorosamente por aproximadamente 2 minutos para assegurar a homogeneização. Em seguida, as sementes foram espalhadas em bandejas plásticas e secas à temperatura ambiente por 2 horas dentro do fluxo laminar, ilustrado na figura 9. Água destilada foi utilizada como controle.

FIGURA 8- Sacos utilizados para os tratamentos das sementes



Fonte: Autoria própria, 2024.

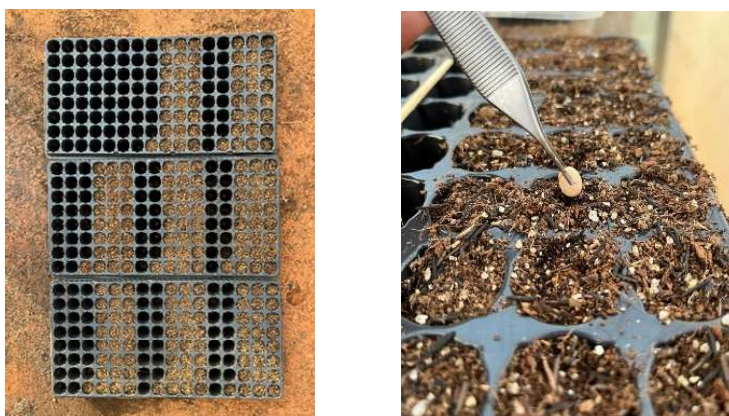
FIGURA 9- Sementes espalhadas na bandeja para secar



Fonte: Autoria própria, 2024.

Os ensaios foram montados em bandejas com substrato úmido, nas quais foram plantadas 25 sementes a 3 cm de profundidade, sendo o experimento realizado em duplicata para cada tratamento, conforme ilustrado na figura 10. Nesta etapa, foram considerados os extratos de quitina fermentada com *Beauveria bassiana* (EFB Q Bb), a quitina fermentada com *Bacillus subtilis* (EFB Q Bs), o arroz fermentado com *Beauveria bassiana* (EFB A Bb) e o material quitinoso sem inoculação, utilizado como controle (EFB C). As bandejas foram mantidas na estufa do IFSP – *Campus Avaré* e irrigadas três vezes ao dia durante 15 dias.

FIGURA 10 - Preparo do substrato e plantio das sementes, respectivamente



Fonte: Autoria própria, 2024.

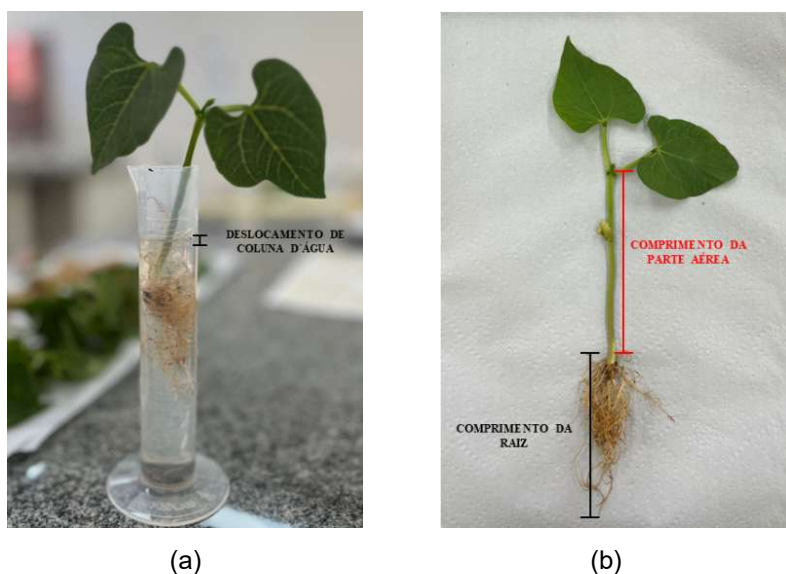
Para as análises, foram avaliados o índice de emergência e as características de crescimento das plântulas. O índice de emergência foi calculado pela razão entre o número de plântulas emergidas e o número total de sementes semeadas, multiplicado por 100, conforme a equação:

$$\text{Índice de emergência (\%)} = \frac{N_e}{N_t} \times 100 \quad \text{eq.3}$$

Onde N_e é o número de plântulas emergidas e N_t é o número total de sementes semeadas.

Considerou-se como planta emergida aquela cuja parte aérea se tornou visível acima da superfície do substrato. Além disso, foram medidos o comprimento da parte aérea, o comprimento da raiz e o volume radicular, sendo este último determinado pelo deslocamento da coluna d'água. A figura 11 ilustra os procedimentos adotados para essas medições.

FIGURA 11- Medição do (a) volume das raízes e do (b) comprimento das plantas



Fonte: Autoria própria, 2024.

4.10 Análise do efeito dos EFB na pulverização e tratamentos de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) no campo.

4.10.1 Preparo dos canteiros e procedimento de pulverização.

Foram avaliados o cultivo de feijões em canteiros com solo preparado no sistema convencional, considerando os efeitos dos EFBs aplicados tanto nas sementes quanto na pulverização das plantas.

Durante o desenvolvimento da cultura, foi feita uma avaliação semanal da incidência de insetos-pragas nos canteiros, bem como uma análise do índice de germinação, do comprimento da parte aérea e da raiz, e do volume das raízes, medido por deslocamento de coluna d'água, ao final do processo.

O preparo do canteiro foi realizado em uma área experimental do próprio *campus*, onde inicialmente, a área foi demarcada com dimensões de 1,0 m de largura por 2,0 m de comprimento. O solo foi preparado manualmente, começando com a capina para remover a vegetação existente e resíduos superficiais e, em seguida, foi nivelado visando garantir uma superfície uniforme e adequada para o plantio.

O experimento foi conduzido em um delineamento totalmente casualizado, com 3 tratamentos em triplicata, totalizando nove parcelas. Os extratos utilizados foram aqueles que apresentaram melhor desempenho nas germinações em bandejas, utilizando o mesmo modo de tratamento de sementes. Cada parcela foi composta por duas linhas, onde em cada linha, foram plantadas 20 sementes, a uma profundidade de 5 cm. As plantas foram irrigadas duas vezes ao dia, durante 30 dias.

A pulverização foi realizada com o EFB Q Bb, duas vezes durante a fase vegetativa (logo após a emergência das plântulas e após o surgimento da primeira folha tripla) com pulverizador manual, sempre ao final da tarde, quando os níveis de radiação solar apresentavam menor intensidade, conforme figura 12. A área foi submetida a uma carga microbiana de 1×10^{12} unidades formadoras de colônia (UFC) por hectare cultivado.

Para este experimento, foram adotadas as mesmas metodologias descritas anteriormente, mantendo os critérios para a definição de planta emergida, bem como para a avaliação do comprimento da parte aérea, do comprimento da raiz e do volume radicular.

FIGURA 12 - Processo de pulverização em campo com pulverizador manual



Fonte: Autoria própria, 2024.

4.10.2 Verificação da colonização de raízes por *B. bassiana*

Amostras aleatórias simples de raízes de quatro plantas de cada tratamento foram submetidas ao ensaio de recuperação do fungo em seus tecidos, de acordo com Liu, Yang e Wang (2022). As raízes foram cortadas em pedaços de 0,5 cm de comprimento, esterilizadas em solução de 1% de hipoclorito de sódio por 5 minutos e, em seguida, imersas em etanol a 75% por 1 minuto. Após esse processo, os pedaços foram lavados três vezes com água destilada estéril e inoculados em meio de cultivo PDA a 28°C. As placas foram observadas diariamente para verificar o crescimento característico de *Beauveria bassiana*, até 15 dias.

4.11 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através da ANOVA de um fator com auxílio do software R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) versão 4.1.0, sendo realizadas comparação de médias pelo teste Tukey com 95% de confiança. A quantidade de plantas emergidas ou a germinação foi avaliada pelo teste Qui-quadrado com o mesmo nível de confiança.

5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

5.1 Capacidade de retenção de água do material quitinoso

A capacidade de retenção de água pelo material quitinoso foi, em média, de $2,9 \pm 1,2 \text{ mL.g}^{-1}$. Desta forma, para cada 1 g de material quitinoso, foram adicionados 2,9 mL de água, conforme figura 13.

FIGURA 13- Medição da capacidade de retenção de água do material quitinoso

Fonte: Autoria própria, 2024.

5.2 Avaliação das fermentações

A tabela 1 apresenta as contagens de esporos obtidas nos diferentes extratos. O EFB Bs apresentou resultados satisfatórios, com média de $2,35 \times 10^{10}$ UFC/g de material seco. As contagens de EFB Q Bb e EFB A Bb foram de $3,12 \times 10^9$ e $7,40 \times 10^8$ UFC/g, respectivamente, também indicando boa viabilidade. Já o EFB C não apresentou crescimento microbiano, o que indica ausência de contaminação e confirmando a eficácia do processo de esterilização.

TABELA 1- Contagem média de esporos dos diferentes tratamentos com EFBs

Tratamento	Concentração de esporos (UFC g ⁻¹ de substrato seco)
EFB Q Bs	$2,35 \times 10^{10}$
EFB Q Bb	$3,12 \times 10^9$
EFB A Bb	$7,40 \times 10^8$
EFB C	0

Fonte: Autoria própria, 2024.

As figuras 14 e 15 apresentam o crescimento dos microrganismos após 240 horas de incubação. Observa-se o desenvolvimento de *Beauveria bassiana* e de *Bacillus subtilis*, evidenciando as diferenças morfológicas características de cada microrganismo ao final do período de cultivo.

FIGURA 14 - Crescimento do *Beauveria bassiana* após 240h de incubação



Fonte: Autoria própria, 2024.

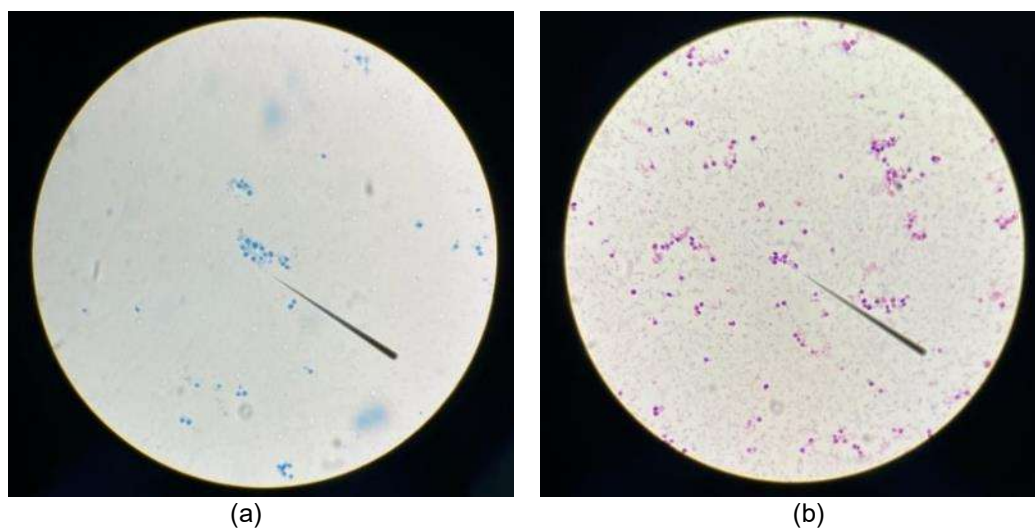
FIGURA 15- Crescimento do *Bacillus subtilis* após 240h de incubação



Fonte: Autoria própria, 2024.

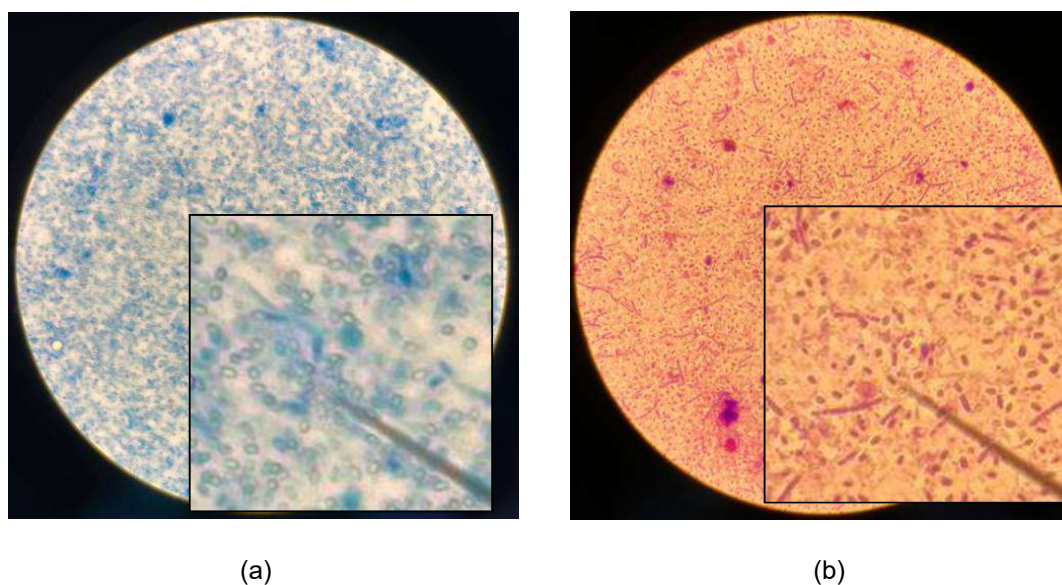
As figuras 16 e 17 apresentam as microscopias ópticas para as colorações de Gram e esporos feita com os extratos fermentados brutos de *B. subtilis* e *B. bassiana* cultivada em material quitinoso, onde observa-se a presença de células vegetativas e esporos característicos dos microrganismos de interesse.

FIGURA 16- Coloração de (a) esporos e (b) coloração de Gram para o EFB de *Beauveria bassiana*. Aumento de 1000x



Fonte: Autoria própria, 2024.

Figura 17- Coloração de (a) esporos e (b) Gram para o EFB de *Bacillus subtilis*. Aumento de 1000x



Fonte: Autoria própria, 2024.

5.3 Avaliação da atividade proteolítica e quitinolítica nos EFB

A tabela 2 apresenta os resultados obtidos na atividade proteolítica e quitinolítica, para todos os EFBs.

TABELA 2- Atividade proteolítica dos EFBs. Letras sobrescritas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as amostras pelo teste Tukey com 95% de confiança. As comparações foram realizadas por atividade enzimática

Extrato Enzimático Bruto	Atividade Proteolítica (U g ⁻¹)	Atividade Quitinolítica (U Kg ⁻¹)
EFB Q Bb	34,75 ± 2,84 ^a	11,64 ± 0,90 ^B
EFB A Bb	5,73 ± 0,58 ^d	2,55 ± 1,74 ^C
EFB Q Bs	29,70 ± 0,28 ^b	24,88 ± 3,54 ^A
EFB C	16,64 ± 1,61 ^c	1,44 ± 0,82 ^C

Fonte: Autoria própria, 2024.

O EFB Q Bb apresentou a maior atividade proteolítica, seguido pelo EFB Q Bs, enquanto o EFB A Bb apresentou a menor atividade, evidenciando a influência do tipo de substrato na produção enzimática.

Quanto à atividade quitinolítica, o EFB Q Bs apresentou o valor mais elevado, indicando que *Bacillus subtilis* é eficiente na degradação de quitina, sobretudo em substratos ricos nesse polímero, no entanto EFB A Bb e EFB C apresentaram as menores atividades. As diferenças observadas entre os extratos foram estatisticamente significativas, conforme o teste de Tukey ($p < 0,05$).

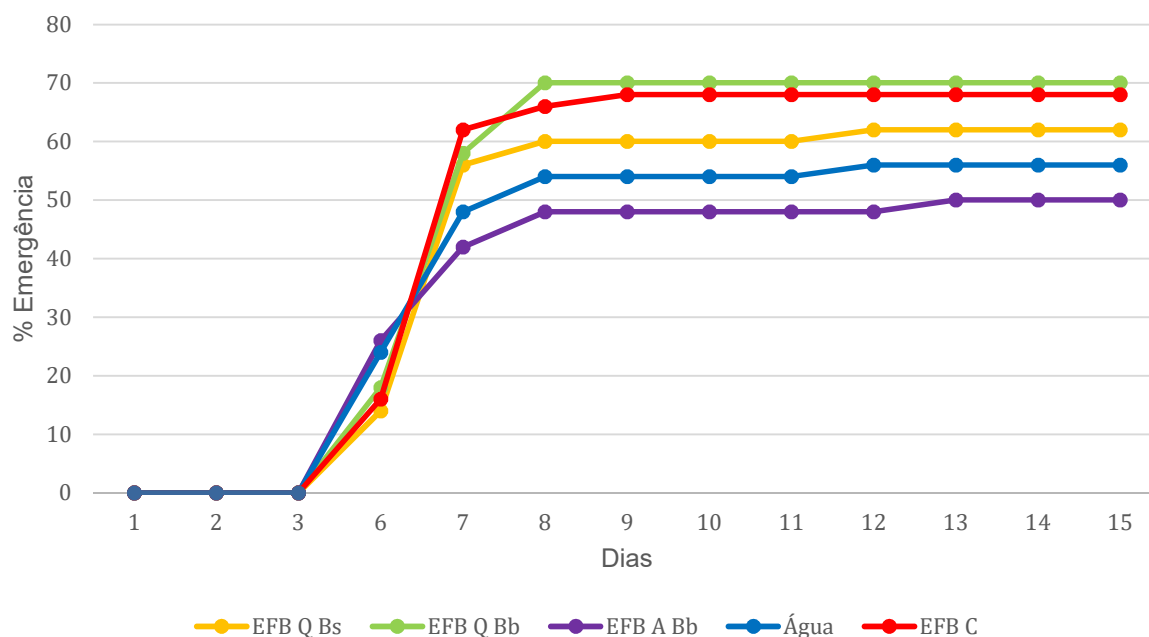
Os resultados indicam que a escolha do microrganismo e do substrato é determinante para direcionar a produção enzimática. Observou-se que a atividade

proteolítica de *B. bassiana* cultivada em material quitinoso superou a de *B. subtilis* 93, enquanto o contrário ocorreu para a produção de quitinases. Esses achados estão em concordância com Wang *et al.* (2018), que relataram elevada produção de quitinase por *Bacillus subtilis*, e são reforçados pelos estudos de Ribeiro (2006) e Sturmer (2003), que destacam a influência do substrato na indução de enzimas hidrolíticas por *Beauveria bassiana*.

Quando comparado ao estudo de Maciel (2023), que obteve atividade proteolítica de 100 U g⁻¹ de substrato seco após 168 horas de fermentação de material quitinoso de larvas de *Hermetia illucens* utilizando *Beauveria bassiana*, observa-se que os valores deste trabalho são inferiores. No entanto, o autor não detectou atividade quitinolítica no material fermentado, contrastando com os resultados deste estudo, que mostraram produção expressiva de quitinases em EFBs de *Bacillus subtilis*.

5.4 Ensaio em bandejas para mudas

A figura 18 apresenta a porcentagem de emergência das sementes de feijão ao longo dos 15 dias de observação. A tabela 3 mostra os valores de volume e comprimento das raízes, bem como o comprimento da parte aérea das plântulas.

FIGURA 18 - Porcentagem de emergência das sementes ao longo de 15 dias de cultivo

Fonte: Autoria própria, 2024.

A emergência das plântulas iniciou por volta do quarto dia em todos os tratamentos, com o maior incremento observado entre o sexto e o oitavo dia. Entre os extratos, destacaram-se o EFB Q Bb e o EFB C, que atingiram aproximadamente 70% de emergência, superando o controle com água. O EFB Bs apresentou desempenho intermediário, em torno de 60%, enquanto o EFB A Bb resultou na menor taxa de emergência, próxima de 50%.

Esses resultados indicam que o EFB Q Bb e o EFB C favoreceram a emergência das plântulas em relação à água, sugerindo um efeito positivo dos microrganismos e metabólitos presentes nos bioinsumos sobre a germinação e o desenvolvimento inicial do feijoeiro. Esse efeito pode estar relacionado à presença de quitina e seus derivados, compostos reconhecidamente associados à promoção do crescimento vegetal e ao aumento do rendimento das culturas (Chakraborty et al., 2020; Poveda, 2021), bem como à ação endofítica e bioestimulante de *Beauveria bassiana*, capaz de favorecer a emergência e o vigor das plântulas (Lima et al., 2022).

TABELA 3 - Volumes das raízes, comprimentos das raízes e comprimento da parte aérea, dos EFBs e água como comparação. Letras sobrescritas diferentes indicam que houve diferença significativa entre as amostras Tukey, com 95% de confiança. As análises foram realizadas por variável resposta.

Ensaio	Volume da raiz (mL)	Comprimento da raiz (cm)	Comprimento parte aérea (cm)
EFB Q Bb	2,07 ± 0,73 ^a	14,59 ± 4,78 ^a	9,53 ± 1,48 ^A
EFB A Bb	1,72 ± 0,68 ^a	14,54 ± 5,39 ^a	7,72 ± 1,45 ^{BC}
EFB Q Bs	1,76 ± 0,62 ^a	15,02 ± 4,46 ^a	8,61 ± 1,30 ^{AB}
EFB C	1,69 ± 0,52 ^a	14,29 ± 3,29 ^a	8,53 ± 1,47 ^B
ÁGUA	1,79 ± 0,63 ^a	15,73 ± 5,58 ^a	6,82 ± 1,22 ^C

Fonte: Autoria própria, 2024.

Nos resultados obtidos, o comprimento da raiz não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, indicando comportamento semelhante em todos os casos. Situação semelhante foi descrita por Oliveira (2024), em que o comprimento da raiz dos feijoeiros não variou significativamente entre os tratamentos, enquanto o volume radicular apresentou incremento com os resíduos fermentados por *Bacillus subtilis* 93. Assim, embora em ambos os trabalhos o comprimento da raiz não tenha sido sensível à aplicação dos EFBs, observa-se que o volume radicular pode ser estimulado pela presença de resíduos fermentados, conforme reportado por Oliveira (2024).

Por outro lado, a variável que apresentou diferenças significativas no presente estudo foi o comprimento da parte aérea, com destaque para os tratamentos EFB Q Bb e EFB Q Bs, que obtiveram as maiores médias, enquanto o controle com água apresentou o menor desempenho. Esse resultado sugere que o material quitinoso

fermentado pode atuar como promotor de crescimento vegetal. Resultados semelhantes foram relatados por Oliveira *et al.* (2016), que observaram aumento da massa seca da parte aérea e radicular de sementes de feijão inoculadas com *B. subtilis*, e por Lima *et al.* (2022), que verificaram que a inoculação do microrganismo mitigou o estresse térmico, promovendo incremento da biomassa da parte aérea.

Adicionalmente, estudos com *Beauveria bassiana* demonstram que este fungo entomopatogênico pode atuar como endófito em feijão, promovendo crescimento tanto da parte aérea quanto do sistema radicular, dependendo da cepa, do método de aplicação e do substrato utilizado (Liberada, 2022). Embora os efeitos radiculares sejam variáveis, o aumento do comprimento da parte aérea observado neste estudo é consistente com os efeitos bioestimulantes relatados para *B. bassiana*, reforçando a hipótese de que resíduos fermentados contendo microrganismos e metabólitos extracelulares podem favorecer o desenvolvimento inicial do feijoeiro.

Dessa forma, embora não tenham sido verificadas diferenças no sistema radicular, os incrementos observados na parte aérea indicam o potencial de aplicação dos EFBs como estimulantes do crescimento inicial, corroborando os achados de Oliveira (2024) e de outros autores que estudaram a inoculação de *B. subtilis* e de *Beauveria bassiana* em feijão, os quais também relataram aumento da biomassa da parte aérea em condições similares.

5.5 Análises no campo

Para a aplicação em campo, foi utilizado EFB Q Bb e EFB C, uma vez que apresentaram o melhor desenvolvimento nas bandejas de germinação. Foi utilizada água como controle. Os resultados estão apresentados na tabela 4.

Durante o experimento, foram encontrados alguns insetos característicos do feijão. No entanto, foi possível controlá-los com a aplicação de EFB Q Bb, o que ajudou a reduzir os impactos da praga.

TABELA 4 - Índice de germinação, volumes das raízes, comprimentos das raízes e comprimento da parte aérea para os tratamentos EFB Q Bb, EFB A Bb e água (controle), avaliados no campo. Letras sobrescritas diferentes indicam diferença significativa entre as amostras, conforme o teste Qui-quadrado para o índice de emergência e o teste de Tukey para as demais variáveis, ambos com 95% de confiança.

Ensaio	Emergência (%)	Volume da raiz (mL)	Comprimento da raiz (cm)	Comprimento da parte aérea (cm)
EFB Q Bb	64 ^a	0,67 ± 0,43 ^c	11,74 ± 4,59 ^a	7,11 ± 1,49 ^a
EFB C	54 ^a	1,23 ± 0,47 ^a	11,01 ± 4,04 ^a	7,26 ± 1,41 ^a
ÁGUA	61 ^a	0,96 ± 0,39 ^b	6,82 ± 1,22 ^a	7,06 ± 1,47 ^a

Fonte: Autoria própria, 2024.

Pelo teste do Qui-quadrado com 95% de confiança, não houve diferença significativa entre os ensaios para o índice de emergência.

Os volumes radiculares foram, em média, maiores nas plantas cujas sementes foram tratadas com o EFB C, correspondente ao extrato do material quitinoso. A fermentação com *B. bassiana* reduziu o volume médio das raízes em relação ao tratamento com água. Os demais parâmetros avaliados não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, conforme ilustrado na figura 19.

FIGURA 19- Ilustração da diversidade de plantas obtidas após 30 dias de cultivo nas réplicas experimentais de sementes tratadas com (a)EFB Bb, (b) EFB C e (c) água.



(a)



(b)



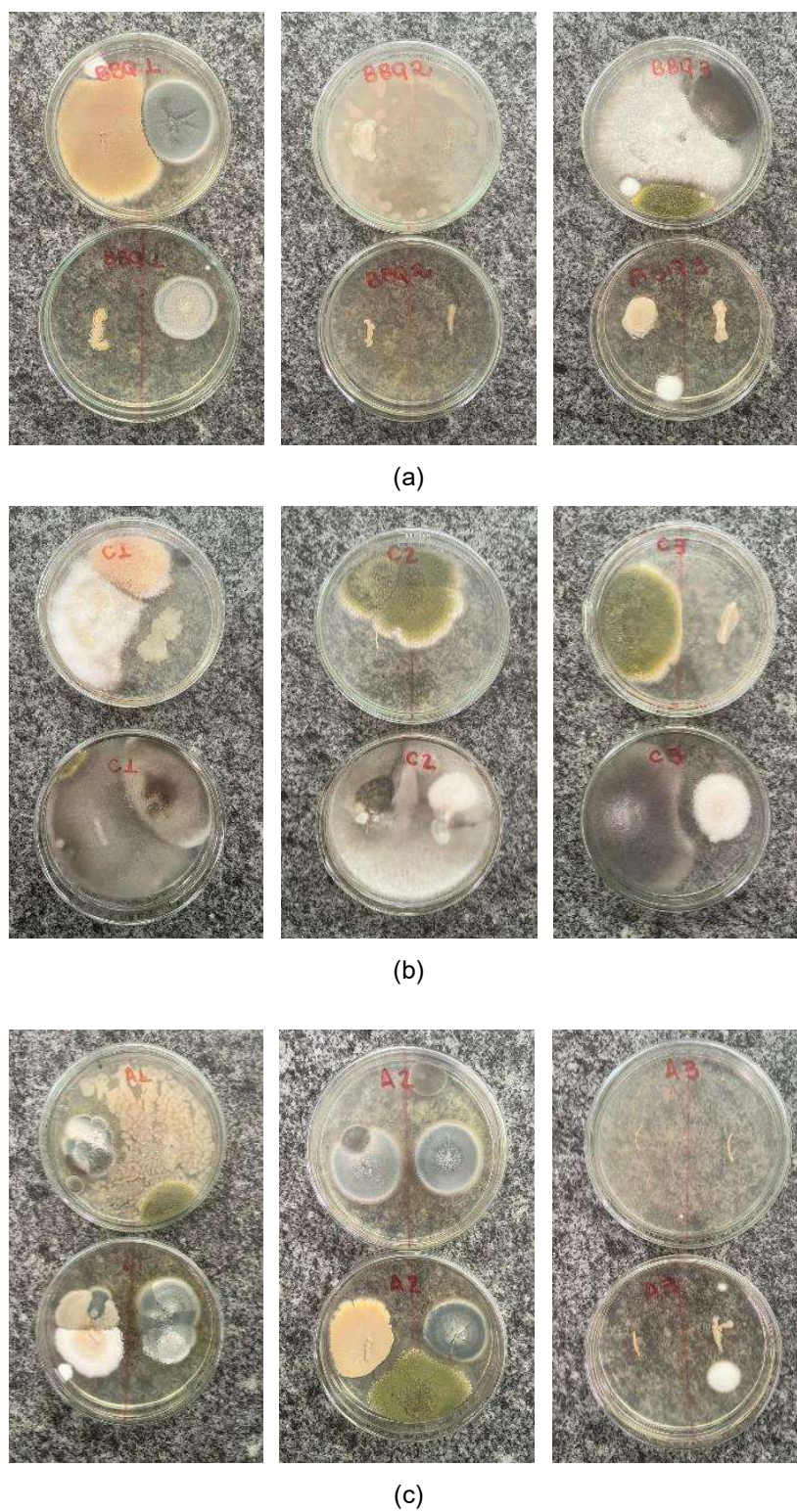
(c)

Fonte: Autoria própria, 2024.

5.6 Verificação da colonização de raízes por *B. bassiana*

A colonização das raízes por *Beauveria bassiana* apresentou colônias características do microrganismo de interesse, mas a presença de outros microrganismos também foi observada. Dessa forma, não foi possível verificar diferenças entre os tratamentos. A figura 20 ilustra o crescimento microbiano ao redor das raízes.

FIGURA 20- Colonização das raízes por *Beauveria bassiana* no cultivo nas réplicas experimentais de sementes tratadas com (a) EFB Q Bb, (b) EFB C e (c) água



Fonte: Autoria própria, 2024.

5.7 Síntese dos resultados obtidos

A figura 21 apresenta uma síntese geral dos resultados obtidos nas diferentes etapas experimentais. Nela, estão destacados os principais parâmetros analisados e o desempenho dos tratamentos avaliados.

FIGURA 21- Síntese dos resultados experimentais obtidos para os diferentes parâmetros avaliados.

	Parâmetro		Síntese
	Desenvolvimento microbiano	✓	Contagens satisfatórias em todos os EFBs
	Atividade proteolítica	✓	Maior produção de protease por <i>Beauveria bassiana</i> .
	Atividade quitinolítica	✓	Maior produção de quitinases por <i>Bacillus subtilis</i> .
Bandeja	Índice de emergência	✓	Fermentados EFB Q Bb e EFB C, superando o controle com água.
	Parte aérea	✓	Maior crescimento em EFB Q Bb e EFB Q Bs.
	Sistema radicular	✗	Sem diferença entre os tratamentos.
Campo	Índice de emergência	✗	Sem diferença entre os tratamentos.
	Parte aérea	✗	Sem diferença entre os tratamentos.
	Sistema radicular	✗	Maior volume em EFB C, fermentação com <i>B. bassiana</i> reduziu o volume comparado com água.
	Colonização radicular	✗	Sem diferença entre os tratamentos.
	Controle de pragas	✓	Ausência de pragas após aplicação (qualitativo).

Fonte: Autoria própria, 2024.

De modo geral, foi observado desenvolvimento microbiano satisfatório em todos os EFBs. Os microrganismos avaliados apresentaram boa produção enzimática, com destaque para o EFB Q Bs, que exibiu a maior atividade quitinolítica. Esses resultados indicam que essa cepa, ainda pouco explorada no contexto agrícola, possui potencial promissor, ampliando as perspectivas para novas pesquisas na área.

Os ensaios realizados em bandejas apresentaram efeito positivo na emergência das plântulas e no crescimento da parte aérea em condições controladas. Por outro lado, nos ensaios de campo, os efeitos foram menos expressivos, não havendo diferenças significativas para a maioria das variáveis avaliadas. Entretanto, observou-se a ausência de pragas após a aplicação, sugerindo um possível efeito bioinseticida associado à presença de *Beauveria bassiana*.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou o potencial biotecnológico dos EFBs, obtidos a partir do reaproveitamento de material quitinoso residual da criação de *Tenebrio molitor*, evidenciando sua viabilidade como base para a produção de bioinsumos agrícolas sustentáveis. O material quitinoso mostrou-se promissor para fermentação em estado sólido, permitindo o desenvolvimento satisfatório dos microrganismos de interesse, uma vez que todos os EFBs apresentaram crescimento microbiano adequado e boa produção enzimática. Destacaram-se o EFB Q Bs, com elevada atividade quitinolítica, e o EFB Q Bb, com maior atividade proteolítica, reforçando a importância da escolha do microrganismo e do substrato para direcionar a produção enzimática.

Nos ensaios em bandejas, os tratamentos com EFB Q Bb e EFB C promoveram maior emergência de plântulas, enquanto EFB Q Bb e EFB Q Bs favoreceram significativamente o crescimento da parte aérea, evidenciando efeitos bioestimulantes atribuíveis tanto aos microrganismos quanto aos metabólitos extracelulares presentes nos EFBs. Nos ensaios em campo, embora não tenham sido observadas diferenças significativas no desenvolvimento das plantas, a pulverização evidenciou efeito positivo no controle de insetos-praga típicos da cultura, demonstrando o potencial bioinseticida da aplicação de *Beauveria bassiana*.

De forma geral, conclui-se que os objetivos do estudo foram alcançados, uma vez que os EFBs demonstraram potencial bioestimulante para o crescimento inicial do feijoeiro e ação protetora frente a pragas, especialmente em condições controladas. Esses achados reforçam a viabilidade do reaproveitamento de resíduos quitinosos como substrato para a produção de bioinsumos agrícolas, alinhados aos ODS, e abrem perspectivas para novas pesquisas sobre manejo sustentável e aplicação de microrganismos benéficos na agricultura.

7 REFERÊNCIAS

- ABCBIO, Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico. **A biodefesa na agricultura brasileira**. 2019.
- AGUIAR, J. P. S. A. de. **Produção e caracterização de enzimas quitinolíticas produzidas pelo fungo *Trichoderma asperellum* e sua aplicação no biocontrole do carrapato *Rhipicephalus microplus* e do inseto *Aedes aegypti***. 2020. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2020.
- ALMEIDA, F. A. B.; SCHENKEL, E.; SACHS, I. **A modernização da agricultura no Brasil: impactos e desafios**. Revista Brasileira de Política Internacional, v. 28, n. 1, p. 1–15, 1985.
- ALVES, M. J. T. *et al.* **Produção de enzimas por *Bacillus subtilis* em fermentação em estado sólido**. Revista Brasileira de Biotecnologia, v. 15, n. 3, p. 231–241, 2018.
- ALVES, M. J. T.; PEREIRA, G. A. G. **Produção de enzimas em fermentação sólida: fundamentos e aplicações**. Revista Brasileira de Microbiologia, v. 29, n. 3, p. 181–189, 1998.
- ALVES, S. B. **Fungos entomopatogênicos: aplicabilidade no controle biológico de insetos**. Viçosa: UFV, 2002.
- AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V. L.; COSTA, A. C. F. M. **Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais**. Revista Eletrônica de Materiais e Processos, v. 2, n. 3, p. 27–34, 2007.
- BALDONI, D. B.; ANTONIOLLI, Z. I.; MAZUTTI, M. A. *et al.* **Chitinase production by *Trichoderma koningiopsis* UFSMQ40 using solid state fermentation**. Brazilian Journal of Microbiology, v. 51, p. 1897–1908, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00334-w>
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J. **Solid-state fermentation**. Microbial Biotechnology: Fermentation Technology and Applications, v. 3, p. 121–142, 2012.
- BERG, G. *et al.* **Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges**. Microbiome, v. 8, n. 1, p. 1–22, 2020.
- BHATTACHARYA, S.; DAS, A.; SAMADDER, S. *et al.* **Biosynthesis and characterization of a thermostable, alkali-tolerant chitinase from *Bacillus pumilus* JUBCH08 displaying antagonism against phytopathogenic *Fusarium oxysporum***. 3 Biotech, v. 6, n. 1, p. 87, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0406-x>
- BOTELHO, G. R.; BRASIL, M. S. **Rizobactérias: uma visão geral da importância para plantas e agrossistemas**. Ambientes em Movimento, v. 1, n. 3, p. 22–46, 2023.

BRASIL. Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020. Institui o Programa Nacional de Bioinsumos e o Conselho Estratégico do Programa Nacional de Bioinsumos. Diário Oficial da União: Seção 1, Brasília, DF, p. 105, maio de 2020.

BRASIL. Lei nº 14.785, de 27 de dezembro de 2023. Dispõe sobre a pesquisa, experimentação, produção, embalagem, rotulagem, transporte, armazenamento, comercialização, uso, fiscalização e controle de agrotóxicos, seus componentes e afins. Diário Oficial da União: Seção 1, Brasília, DF, p. 1, 27 dez. 2023.

BRASIL. Lei nº 15.070, de 23 de dezembro de 2024. Institui a Política Nacional de Bioinsumos e dispõe sobre a produção, importação, exportação, registro, comercialização, uso, inspeção, fiscalização, pesquisa, desenvolvimento e incentivo ao uso de bioinsumos na agricultura. Diário Oficial da União: Seção 1, Brasília, DF, p. 1, 23 dez. 2024.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA: relatório anual 2019**. Brasília, DF: MAPA, 2019.

CASTRO, R. J. S. de; OHARA, A.; AGUILAR, J. G. S.; DOMINGUES, M. A. F. **Nutritional, functional and biological properties of insect proteins: processes for obtaining, consumption and future challenges**. Trends in Food Science & Technology, v. 76, p. 82–89, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.04.006>

CHAIHARN, M.; LUMYONG, S.; HASAN, N. *et al.* **Solid-state cultivation of *Bacillus thuringiensis* R 176 with shrimp shells and rice straw as a substrate for chitinase production**. Annals of Microbiology, v. 63, p. 443–450, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0488-6>

CHAKRABORTY, M. *et al.* **Mechanism of plant growth promotion and disease suppression by chitosan biopolymer**. Agriculture, v. 10, n. 624, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/agriculture10120624>

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. **A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice**. Journal of Biological Chemistry, v. 170, p. 501–505, 1947.

CROPLIFE BRASIL. **Como são produzidos os bio defensivos de base microbiológica**. Home. Notícias, 2020.

DE CASTRO, R. J. S.; PINTO, G. A. S. **Estudo comparativo da produção de protease por *Aspergillus oryzae* em fermentação semi sólida utilizando tortas de girassol**. In: Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Natal, RN, 2009.

EDUARDO, S. **Estudo comparativo de tecnologias de pré-tratamento para produção de etanol: ácidos e líquidos iônicos**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens). **Scientific opinion on the safety of dried yellow mealworm (*Tenebrio molitor* larva) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283**. EFSA Journal, v. 19, n. 1, p. 6343–6372, 2021.

EMBRAPA. **Cultivo do feijão**. 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/agencia-deinformacaotecnologica/cultivos/feijao/producao/semeadura>. Acesso em: 30 set. 2025.

ERG, G. *et al.* **The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria**. Environmental Microbiology, v. 16, n. 6, p. 1662–1671, 2014.

FAO. **A contribuição dos insetos para a segurança alimentar, subsistência e meio ambiente**. 2015. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/018/i3264e/i3264e00.pdf>. Acesso em: 22 set. 2025.

FARINAS, C. S. **Fungos filamentosos na fermentação em estado sólido: aplicação biotecnológica**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 51, n. 1, p. 45–53, 2015.

FARINAS, C. S.; BUZON, R. D. P.; FONSECA, R. F.; BERTUCCI, V. N. **Desenvolvimento em fermentação em estado sólido para produção de enzimas de interesse agroindustrial**. Brasília, DF: Embrapa Publicações, 2014.

FENG, M. G.; POPRAWSKI, T.; KHACHTOURIANS, G. **Enzymatic degradation of insect cuticle by entomopathogenic fungi**. Journal of Invertebrate Pathology, v. 63, n. 3, p. 191–199, 1994.

FIALHO, A. T. S. *et al.* **Nutritional composition of larvae of mealworm (*Tenebrio molitor* L.) and crickets (*Gryllus assimilis*) with potential usage in feed**. Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 73, n. 2, p. 539–542, 2021.

FINKE, M. D. **Estimate of chitin in raw whole insects**. Zoo Biology, v. 26, n. 2, p. 105–115, 2017.

FLEURI, L. F.; DE OLIVEIRA, M. C.; DE LARA CAMPOS ARCURI, M.; CAPOVILLE, B. L.; PEREIRA, M. S.; DELGADO, C. H. O.; NOVELLI, P. K. **Production of fungal lipases using wheat bran and soybean bran and incorporation of sugarcane bagasse as a co-substrate in solid-state fermentation**. Food Science and Biotechnology, v. 23, n. 4, p. 1199–1205, 2014.

FONTES, E. M. G.; VALADARES INGLIS, M. C. **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2020. 510 p.

GARCIA ESTRADA, C.; CAT, J.; SANTAMARTA, G. **Bioactive metabolites and virulence factors from *Beauveria bassiana***. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 100, n. 3, p. 1131–1144, 2016.

GERÓNIMO-TORRES, J. D. C.; TORRES-DE LA CRUZ, M.; PÉREZ-DE, M.; CAPPELLO GARCÍA, S. **Caracterización de aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* y su patogenicidad hacia *Hypothenemus hampei*, en Tabasco, México.** Revista Colombiana de Entomología, v. 42, n. 1, p. 28–35, 2016.

GHORBEL-BELAAJ, O.; MANNI, L.; JELLOULI, K.; HMIDET, N.; NASRI, M. **Optimization of protease and chitinase production by *Bacillus cereus* SV1 on shrimp shell waste using statistical experimental design.** Annals of Microbiology, v. 62, n. 4, p. 1255–1268, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0371-x>

GOMES, E. *et al.* **Características estruturais e fisiológicas de fungos filamentosos em fermentação sólida.** Journal of Microbial Biotechnology, v. 7, n. 2, p. 99–110, 2018.

GUIMARÃES, A. G. L. P. **Produção de conídios e enzimas hidrolíticas por *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) em diferentes substratos.** 2016. 117 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016. Disponível em: Repositório UFPB.

HALFELD VIEIRA, B. A. *et al.* **Defensivos agrícolas naturais: uso e perspectivas.** Brasília, DF: Embrapa, 2016.

HANSEN, G. H. *et al.* **Comparison of solid state and submerged fermentation.** Biochemical Engineering Journal, v. 93, p. 1–10, 2015.

HERNÁNDEZ, M.; MARTÍNEZ, M.; PADILLA, M. **Fungos entomopatogênicos: uma alternativa sustentável para o controle biológico de pragas agrícolas.** Revista Brasileira de Biotecnologia, v. 21, n. 1, p. 45–58, 2019.

HEYES, M. **Food proteins and bioactive peptides: new and novel sources, characterisation strategies and applications.** Foods, v. 7, n. 38, 2018.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. **Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 64, n. 2, p. 175–186, 2004.

HUNGRIA, M. *et al.* **Inoculação com bactérias diazotróficas em culturas agrícolas: a importância do processo para a agricultura brasileira.** Embrapa Soja – Documentos, n. 327, Londrina, 2010. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/880199>

HURTADO, M. A.; GARCÍA, J.; RAMOS, M. J. **Estudo de impacto de pesticidas na área periurbana de Gran La Plata, Argentina.** Revista Brasileira de Ciências Ambientais, v. 45, p. 123–135, 2019.

IRITÌ, M.; FAORO, F. **Chitosan as a MAMP, searching for a PRR.** Plant Signaling & Behavior, v. 4, n. 1, p. 66–68, 2009. DOI: <https://doi.org/10.4161/psb.4.1.7408>

JANG, S. W. *et al.* **Endophytic colonization by *Beauveria bassiana* enhances plant growth and induces resistance to pathogens.** Plant and Soil, v. 445, p. 55–66, 2017.

JIANG, Y. *et al.* **Endophytic *Beauveria bassiana* improves plant growth and protects against insects.** Biological Control, v. 144, art. 104235, 2020.

KHAYROVA, A.; LOPATIN, S.; VARLAMOV, V. **Black Soldier Fly *Hermetia illucens* as a novel source of chitin and chitosan.** International Journal of Sciences, v. 8, n. 04, p. 81–86, 2019. DOI: <https://doi.org/10.18483/ijSci.2015>

KIM, H. *et al.* **Microbial inoculants for sustainable agriculture.** Journal of Applied Microbiology, v. 113, n. 2, p. 239–255, 2012.

KIM, S. G. *et al.* **Feed supplementation of yellow mealworms (*Tenebrio molitor* L.) improves blood characteristics and meat quality in broiler.** Journal of Agricultural Science & Technology, v. 49, n. 9, p. 18, 2014. DOI: <https://doi.org/10.29335/tals.2014.49.9>

KLOEPPER, J. W.; RYU, C. M.; ZHANG, S. **Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus subtilis*.** Phytopathology, v. 94, n. 11, p. 1259–1266, 2004.

KRISHNA, C. **Solid-state fermentation systems—an overview.** Critical Reviews in Biotechnology, 25(1–2), 1–30, 2005.

KUMAR, A.; SINGH, N.; SINGH, H. B. **Potential of *Bacillus subtilis* as a biofertilizer for sustainable agriculture: an overview.** Frontiers in Microbiology, v. 8, art. 2152, 2017.

LEE, D.-H.; DOAN, C. T.; TRAN, T. N.; NGUYEN, V. B. *et al.* **Proteases production and chitin preparation from the liquid fermentation of chitinous fishery by-products by *Paenibacillus elgii*.** Marine Drugs, v. 19, n. 9, p. 477, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/md19090477>

LIAQAT, F.; ELTEM, R. **Chitooligosaccharides and their biological activities: a comprehensive review.** Carbohydrate Polymer, v. 184, p. 243–259, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.067>

LIBERADA, R. **Utilização de *Beauveria bassiana* e *Escovopsis spp.* no controle de formigas cortadeiras em *Eucalyptus grandis*.** 2022. Disponível em: <https://uenf.br/posgraduacao/producao-vegetal/wp-content/uploads/sites/10/2022/09/RAYMYSON-LIBERADA.pdf>

LIMA, B. C. *et al.* ***Bacillus subtilis* rhizobacteria ameliorate heat stress in the common bean.** Rhizosphere, v. 21, 100472, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100472>

LIN, Y. S. *et al.* **Sustainable extraction of chitin from spent pupal shell of black soldier fly.** *Processes*, v. 9, n. 6, 976, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr9060976>

MACIEL, G. L. **Fermentação em material quitinoso residual da criação de larvas de BSF (*Hermetia illucens*) para obtenção de enzimas quitinolíticas e proteolíticas.** Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Biosistemas) – Instituto Federal de São Paulo, Avaré, SP, 2023.

MARIANO, R. L. R. *et al.* **Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável.** *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica*, v. 1, p. 89–111, 2013.

MARTÍNEZ ZAVALA, S. A. A. *et al.* **Chitinases of *Bacillus thuringiensis*: phylogeny, modular structure, and applied potentials.** *Frontiers in Microbiology*, v. 10, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03032>

MATTEDI, A. *et al.* **Solid-state fermentation: applications and future perspectives for biostimulant and biopesticides production.** *Microorganisms*, v. 11, n. 1408, p. 22, 2023.

MEENA, R. S.; MISHRA, J.; SINGH, B. R. **Efeitos dos pesticidas no meio ambiente.** In: **BIO-Pesticidas para Agricultura e Sustentabilidade Ambiental.** Editora Elsevier, 2017. p. 45–67.

MONNERAT, R. *et al.* **Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2020.

MÜLLER, L. E. **Manual de laboratorio de fisiología vegetal.** Turrialba: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), 1964. 165 p.

MUTHUKRISHNAN, S.; BHAKYA, S.; KUMAR, T. S.; RAO, M. V. **Biosynthesis, characterization and antibacterial effect of plant-mediated silver nanoparticles using *Ceropegia thwaitesii* – An endemic species.** *Industrial Crops and Products*, v. 63, p. 119–124, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.022>

OLIVEIRA, G. R. F. *et al.* **Crescimento inicial do feijoeiro em função do vigor de sementes e inoculação com *Bacillus subtilis*.** *Brazilian Journal of Biosystems Engineering*, v. 10, n. 4, p. 439–448, 2016.

OLIVEIRA, M. M. C. de. **Aplicação do produto sólido residual do fermentado de exúvias de larva de *Tenebrio molitor* por *Bacillus subtilis* como estimulante do desenvolvimento inicial de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.).** 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Biosistemas) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, Campus Avaré, Avaré, 2024.

OLIVEIRA, R. P.; MOREIRA, M. R. S.; JAIME, P. C. **Sistemas de produção agrícola no Brasil: uma análise crítica.** Embrapa Clima Temperado, 2014.

ORNELA, P. H. O. *et al.* **Utilização de resíduos da indústria pesqueira na produção de quitinases por *Bacillus subtilis* em fermentação em estado sólido.** Revista Brasileira de Engenharia e Biotecnologia, v. 10, n. 2, p. 1–10, 2022.

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

PEREIRA, C. A.; MARTINS, M. **Caracterização de enzimas produzidas por fungos entomopatogênicos.** Revista Brasileira de Biotecnologia, v. 12, n. 4, p. 423–430, 2016.

PEREIRA, G. *et al.* **Aplicação de *Bacillus subtilis* no manejo integrado de pragas agrícolas.** Revista Ciência Agronômica, v. 51, n. 2, p. 210–222, 2017.

PEREIRA, G. *et al.* **Aplicação de bioinsumos na agricultura: uma revisão.** Revista Ciência Agronômica, v. 51, n. 2, p. 210–222, 2020.

POVEDA, J. **Insect frass in the development of sustainable agriculture: a review.** Agronomy for Sustainable Development, v. 41, n. 5, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13593-020-00656-x>

PRADO, D. Z. *et al.* ***Bacillus subtilis*: um potencial produtor de auxina.** 1º Encontro Internacional de Ciências Agrárias e Tecnológicas - Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP, 2016.

PRADO, R. M. *et al.* **Produção de ácido indol-3-acético e sideróforos por *Bacillus subtilis*: impacto na promoção do crescimento vegetal.** Revista Brasileira de Microbiologia, v. 47, n. 3, p. 710–719, 2016.

QUAH, Y. *et al.* **Bioactive peptide discovery from edible insects for potential application in human health and agriculture.** Molecules, v. 28, 1233, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28031233>

QUINTELA, E. D. **Manejo integrado de pragas do feijoeiro.** Circular Técnica, n. 46. Embrapa, Santo Antônio de Goiás, GO, 2001. ISSN 1678–9636.

RADHAKRISHNAN, R.; HASHEM, A.; ABD_ALLAH, E. F. ***Bacillus*: a biological tool for crop improvement through biomolecular changes in adverse environments.** Frontiers in Physiology, v. 8, art. 667, 2017.

RAHARDJO, Y.; KIM, S. W.; LEE, S. M.; KIM, H. J.; CHOI, Y. H.; LEE, K. H.; KIM, J. H.; KIM, Y. H. **Solid-state fermentation of agricultural residues for the production of enzymes.** Bioresource Technology, v. 97, n. 3, p. 436–441, 2006.

RAMÍREZ, M. Á. *et al.* **Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications.** Biotecnología Aplicada, v. 27, p. 270–276, 2010.

RAVI, H. K. *et al.* **Larvae mediated valorization of industrial, agriculture and food wastes: biorefinery concept through bioconversion, processes, procedures, and products.** Processes, v. 8, n. 7, 857, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr8070857>

RIBEIRO, J. S. **Cenário de uso, consumo e classificação de risco dos agrotóxicos na nova fronteira agrícola do Oeste do Pará,** 2021.

RIBEIRO, T. S. **Análise comparativa da secreção de proteases e quitinases por diferentes cepas de *Beauveria bassiana*.** 2006. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

ROBERTS, W. K.; SELITRENNIKOFF, C. P. **Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity.** Journal of General Microbiology, v. 134, p. 169–176, 1988.

ROBINSON, T.; NIGAM, P. **Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation.** Biochemical Engineering Journal, 13(2), 197–203, 2003.

ROCHA, P. M. C. **Produção e caracterização de quitinase fúngica: aplicações na biodegradação de resíduos de quitina da indústria pesqueira,** 2024.

ROSA, M. F. *et al.* **Valorização de resíduos da agroindústria.** In: II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais, v. 1 (palestras), 2011.

SALA, A. *et al.* **Insights on fungal solid state fermentation for waste valorization: conidia and chitinase production in different reactor configurations.** Sustainable Chemistry and Pharmacy, v. 26, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100624>

SANCHEZ RODRIGUEZ, A. R. *et al.* **Use of *Beauveria bassiana* in biological control.** Microbial Biotechnology, v. 11, n. 4, p. 580–598, 2018.

SANSINENEA, E. ***Bacillus spp.*: as plant growth promoting bacteria.** Springer, 2019.

SANTA, H. S. D.; SANTA, O. R. D.; BRAND, D.; VANDENBERGHE, L. P. D. S.; SOCCOL, C. R. **Spore production of *Beauveria bassiana* from agro-industrial residues by solid-state fermentation.** Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 48, n. 3, p. 451–456, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000300003>

SCHALLMEY, A.; SINGH, A.; COVY, O. **Developments in the use of *Bacillus subtilis* for industrial enzyme production.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 65, n. 2, p. 127–141, 2004.

SCHMALTZ, S. **Produção de enzimas hidrolíticas por *Beauveria bassiana* em fermentação submersa assistida por ultrassom.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2020.

SHARMA, H. C.; RAO, M. S. **Entomopathogenic fungi in integrated pest management**. Journal of Biological Control, 2000.

SINGH, R.; VARMA, A. **Seed inoculation techniques for enhancing rhizobial symbiosis**. Advances in Microbial Research, v. 5, n. 2, p. 1–25, 2020.

SINGHANIA, R. R. *et al.* **Solid-state fermentation for production of microbial enzymes: advances and prospects**. Critical Reviews in Biotechnology, v. 29, n. 1, p. 1–16, 2009.

SMITH, J. R.; GRULA, E. A. **Chitinase is an inducible enzyme in *Beauveria bassiana***. Journal of Invertebrate Pathology, v. 42, n. 3, p. 319–326, 1983. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(83\)90170-2](https://doi.org/10.1016/0022-2011(83)90170-2)

SOARES, M. A. *et al.* **Produção de protease extracelular por *Bacillus subtilis* em fermentação em estado sólido utilizando torta de soja**. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 22, n. 4, p. 439–446, 2005.

STURMER, M. *et al.* **Quitinases de *Beauveria bassiana*: produção e propriedades**. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2003. Disponível em: <https://repositorio.uel.br/items/b26329a6-35fc-4a4d-b417-87d6514ef239>

SURESH, P. V.; CHANDRASEKARAN, M. **Impact of process parameters on chitinase production by an alkalophilic marine *Beauveria bassiana* in solid state fermentation**. Process Biochemistry, v. 34, p. 257–267, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)00092-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00092-2)

TAMEZZO, A. *et al.* **Efeitos promotores de crescimento vegetal por *Bacillus subtilis* em cultivos agrícolas**. Journal of Agricultural Science, v. 8, n. 6, p. 101–109, 2016.

TAN, C. H.; LEE, Y. L.; CHEN, Y. L. **Production of chitin from edible insects: a sustainable and scalable approach**. Sustainability, v. 12, n. 6, p. 1864, 2020.

TEIXEIRA, M. F. N. P. **Atividade xilanásica de fungos associados ao trato digestório de insetos: potencial para obtenção de xilooligossacarídeos a partir de farelo de trigo**. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal) – Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2023.

VERÍSSIMO, M. A. A. (Org.). **Sanidade vegetal: uma estratégia global para eliminar a fome, reduzir a pobreza, proteger o meio ambiente e estimular o desenvolvimento econômico sustentável**. 1. ed. Florianópolis: CIDASC, 2020. p. 382–409.

VIDAL, M. C.; SALDANHA, R.; VERÍSSIMO, M. A. A. **Bioinsumos: o programa nacional e a sua relação com a produção sustentável**. In: GINDRI, D. M.; MOREIRA, P. A. B. (Org.).

VIEIRA, E. L. **Ação de bioestimulante na germinação de sementes, vigor de plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**,

feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e arroz (*Oryza sativa* L.). Tese (Doutorado em Agronomia, área de concentração Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

VIEIRA, F. N.; FRACALOSSO, D. M.; SAMUELS, R. I.; PRUDÊNCIO, E. S.; SILVA, C. P. **Potencial do *Tenebrio molitor* como fonte alternativa de proteína e quitina.** Revista Brasileira de Zootecnia, 48, e20180056, 2019.

WANG, D. *et al.* **A potent chitinase from *Bacillus subtilis* for the efficient bioconversion of chitin-containing wastes.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 116, p. 863–868, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.122>

WANG, D.; WANG, L.; YANG, Y. **Spore formation and resistance in *Bacillus subtilis*.** Journal of Bacteriology, v. 199, n. 4, e00744–16, 2017.

WANG, S.; LIU, Y.; ZHANG, X. **Characterization and application of a potent chitinase from *Bacillus subtilis* BsChi.** Carbohydrate Polymers, v. 197, p. 547–556, 2018.

WANG, Y. *et al.* **Preparation of active chitooligosaccharides with a novel chitosanase aqCoA and their application in fungal disease protection.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 69, p. 3351–3361, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07802>

WIERMANN, I. S. de M. **Metabólitos com atividade inseticidas produzidas por fungos entomopatogênicos.** 32 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Biotecnologia, Universidade Federal de São João del-Rei, São João del Rei, 2022.

XAVIER, V. L. **Programa Nacional de Bioinsumos: proposição de um sistema de monitoramento de biofábricas,** 2022.

YEE, M. O.; KIM, P.; LI, Y.; SINGH, A. K.; NORTHERN, T. R.; CHAKRABORTY, R. **Specialized plant growth chamber designs to study complex rhizosphere interactions.** Frontiers in Microbiology, v. 12, e625752, 2021.

ZEM, F.; AZEVEDO, V. V. C. **Biodefensivos: mercado, tendências e perspectivas para o controle biológico na agricultura.** Revista Brasileira de Ciências Agrárias, v. 15, n. 4, p. 1–12, 2020.

ZHANG, L. *et al.* **Controle biológico de *Cnaphalocrocis medinalis* com aplicação de *Bacillus subtilis*.** Pest Management Science, v. 77, n. 5, p. 2295–2302, 2021.