



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**Ciências
Biológicas**
UEL

TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BEATRIZ MILANI DOS SANTOS

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE *Trichoderma sp.* POR
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E PROTOTIPAGEM
DE UM PRODUTO PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE
*Fusarium solani***

Londrina – Paraná
2025

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

BEATRIZ MILANI DOS SANTOS

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE *Trichoderma sp.* POR
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E PROTOTIPAGEM
DE UM PRODUTO PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE
*Fusarium solani***

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Orientador: Admilton Gonçalves de Oliveira Junior
Coorientador: Guilherme Fonseca Reis**

**Londrina – Paraná
2025**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

D762e Dos Santos, BEATRIZ Milani.

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE *Trichoderma sp.* POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E PROTOTIPAGEM DE UM PRODUTO PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE *Fusarium solani* / BEATRIZ Milani Dos Santos. - Londrina, 2025. 48 f. : il.

Orientador: Admilton Gonçalves de Oliveira Junior . Coorientador: Guilherme Fonseca Reis. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, 2025. Inclui bibliografia.

1. Ciências Biológicas - TCC. 2. Biocontrole - TCC. 3. DCCR - TCC. 4. Fermentação sólida - TCC. I. Gonçalves de Oliveira Junior , Admilton . II. Fonseca Reis, Guilherme. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU 574

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior (orientador)

Dr. Guilherme Fonseca Reis (coorientador)

Prof. Dr. Luciano Aparecido Panagio

Dra. Sandriele Aparecida Nohriler

Prof. Dr. Gerson Nakazato (suplente)

Londrina, 18 de fevereiro de 2025

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais e a minha irmã, que com muita luta e saudade me mantiveram em Londrina-PR por todo o tempo de graduação, agradeço também pelo apoio e incentivo em seguir a carreira acadêmica;

Agradeço ao restante da minha família, que sempre se mostraram preocupados comigo;

Agradeço ao meu orientador Admilton, pela concessão de vaga no laboratório, orientação, conselhos acadêmicos, sobre a vida pessoal e pela confiança em meu trabalho quando eu mesma desconfiei;

Agradeço à Sandrielle Noriler, membra da banca e colega de laboratório, a qual também tive o prazer de viajar para um congresso e conhecer a mulher grandiosa que ela é, também foi essencial para que eu tomasse decisões sobre o meu futuro acadêmico;

Agradeço ao meu coorientador Guilherme Fonseca, pelo apoio à pesquisa, pelos conselhos, pelas risadas, conversar com ele também foi decisivo para que eu tomasse atitudes certas em relação aos passos seguintes da minha formação;

Agradeço ao Fauzze, Eduardo e Roberto que mesmo aos seus compromissos, me auxiliaram na última etapa de experimentos e correções desse trabalho;

Agradeço ao Lucas Moreira, colega de sala e de laboratório com quem eu tive as conversas mais aleatórias, apoio e companheirismo dentro do ambiente de pesquisa;

Agradeço aos pós-graduandos da equipe do LABIM, pela disponibilidade em ajudar e sanar dúvidas; aos IC's pelo companheirismo e risadas;

Agradeço as minhas amigas Ana Olivetti, Laura Maldonado e Ana Godoy, pelo companheirismo, pelas risadas, reclamações, noites de meninas, vocês foram essenciais na minha trajetória como bióloga, foram colo sempre que eu precisei e são pessoas que levarei para o resto de minha vida;

Agradeço à Keila, Naíma e Sufian, meus colegas de casa, que felizmente eu tive muita sorte em conhecer suas histórias, vocês também se fizeram presentes nos momentos mais difíceis que passei e carregarei vocês para sempre comigo;

Agradeço à Ana Vizotto, Bruno Henrique e Guilherme Borges pelos memes nas redes sociais, pelas conversas breves, mas na maioria das vezes com muito conteúdo;

Agradeço ao meu namorado Daniel Altair e sua mãe Alessandra, pelo acolhimento, companheirismo, hospedagem e tanto carinho a partir de dezembro de 2024.

DOS SANTOS, Beatriz Milani. **Estudo da produção de *Trichoderma sp.* por fermentação em estado sólido e prototipagem de um produto para controle biológico de *Fusarium solani*** 2025. 48 fls. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2025.

RESUMO

O Brasil é um grande exportador de commodities agrícolas como a soja. Associado a esse tipo de cultivo de produtos primários, existe uma ampla utilização de agrotóxicos para o controle de pragas e microrganismos, sendo que, a maioria desses produtos é de origem química. Em contraponto, a produção de insumos microbiológicos para o manejo dessas doenças fitopatogênicas tem seu espaço garantido na pesquisa e no mercado, pela necessidade de diminuir os problemas relacionados ao uso de defensivos agrícolas químicos. Dentre os diferentes gêneros que são usados para formular biofungicidas, o gênero *Trichoderma* se destaca por possuir uma ampla distribuição geográfica e alguns mecanismos de ação para controlar o crescimento de patógenos, como o micoparasitismo, antibiose, antagonismo, competição e ainda podem ser promotores de crescimento vegetal. Neste cenário, o objetivo desse trabalho foi testar a capacidade antifúngica da linhagem B3F008, para controle do agente causador da murcha vermelha das raízes *Fusarium solani*. Através da DCCR, as variáveis avaliadas foram, quantidade de propágulos/ml de inóculo, gramas de arroz, volume de água e volume de inóculo. Obtivemos propágulos da linhagem de *Trichoderma* B3F008 na condição de 200g de arroz, 1×10^7 UFC/ml, 30 ml de volume de inóculo e 11% de água, onde cerca de $1,35 \times 10^9$ desses propágulos se mostram viáveis, para a formulação de um protótipo de produto em suspensão concentrada, para o tratamento de sementes de soja.

Palavras-chave: Biocontrole, DCCR, Protótipo, Micoparasitismo.

DOS SANTOS, Beatriz Milani. **Estudo da produção de *Trichoderma sp.* por fermentação em estado sólido e prototipagem de um produto para controle biológico de *Fusarium solani*** 2025. 48 pgs. Final Dissertation (Biological Sciences Undergraduation) – Londrina State University. Londrina. 2025.

ABSTRACT

Brazil is a major exporter of agricultural commodities such as soybeans. Associated with this type of primary product cultivation, there is a wide use of pesticides to control pests and microorganisms, and most of these products are of chemical origin. In contrast, the production of microbiological inputs for the management of these phytopathogenic diseases has been gaining ground in research and in the market, due to the need to reduce problems related to the use of chemical agricultural pesticides. Among the different genera that are used to formulate biofungicides, the genus *Trichoderma* stands out for having a wide geographic distribution and some mechanisms of action to control pathogens, such as mycoparasitism, antibiosis, antagonism, competition also as plant growth promoters. In this scenario, the objective of this study was to test the antifungal capacity of the B3F008 strain to control the causative agent of red root wilt *F. solani*. Through DCCR, the variables evaluated were quantity of propagules/ml of inoculum, grams of rice, volume of water and volume of inoculum. We obtained propagules of the *Trichoderma* B3F008 lineage under the condition of 200g of rice, 1×10^7 UFC/ml, 30 ml of inoculum volume and 11% of water, where approximately 1.35×10^9 UFC/ml of these propagules are viable, for the formulation of a prototype of a product in concentrated suspension, for the treatment of soybean seeds infected by *Fusarium solani*.

Keywords: Biocontrol, DCCR, Solid fermentation, Mycoparasitism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspecto geral das folhas e raízes infectadas por F.solani	16
Figura 2 - Esquema exemplificando os mecanismos de ação do gênero Trichoderma.....	20
Figura 3 - Cultura pareada entre F.solani e Trichoderma B3f008	27
Figura 4 - Fermentações sólidas feitas através do ensaio experimental do DCCR	30
Figura 5 - Gráfico sobre os Valores experimentais X preditos	32
Figura 6 - Gráfico de Pareto	33
Figura 7 - Gráficos de superfície de resposta em gradientes de cores relacionados ao resultado do DCCR	34
Figura 8 - Comparação entre as consistências dos produtos (Padrão comercial X LABIM-B3F008)	37
Figura 9 - Comparação em relação a sedimentação entre Padrão comercial x protótipo LABIM-B3F008	38
Figura 10 - Validação do protótipo com 32h de crescimento das hifas.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Níveis reais das variáveis independentes	24
Tabela 2 - Quadro de ensaios do planejamento composto central rotacional.....	25
Tabela 3 - Composição da formulação em suspensão concentrada	26
Tabela 4 - Área de crescimento micelial de <i>F. solani</i> e Porcentagem de inibição do B3f008	28
Tabela 5 - Rendimento de propágulos (g) e conídios/ml em relação a DCCR	29
Tabela 6 - ANOVA	36

LISTA DE ABREVIATURAS

BCAs – Agentes de biocontrole

BDA – Batata Dextrose Ágar

F. solani – *Fusarium solani*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 A agricultura no Brasil.....	14
2.2 Fungos fitopatogênicos	15
2.2.1 <i>Fusarium solani</i>	15
2.2.2 Importância e controle biológico	16
2.2.3 Mecanismos de ação de fungos do gênero <i>Trichoderma</i>	17
2.2.4 Micoparasitismo	18
2.2.5 Antibiose	18
2.2.6 Competição.....	19
2.2.7 Promoção de crescimento vegetal.....	19
2.2.8 Antagonismo	20
2.2.9 DCCR – Delineamento do Composto Central Rotacional.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Microrganismos.....	23
3.2 Identificação dos isolados	23
3.3 Teste de cultura pareada.....	24
3.4 DCCR – Delineamento do Composto Central Rotacional.....	24
3.5 Fermentação em estado sólido.....	26
3.6 Formulação de um protótipo de um bioproduto em suspensão concentrada	26
3.7 Análise estatística	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	27
4.1 Teste de Cultura Pareada.....	27
4.2 DCCR	29
4.3 Formulação do protótipo do produto.....	37
4.3.2 Validação do Protótipo.....	39
5. CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

No contexto de globalização, o Brasil se afirmou como um grande exportador de *commodities* agrícolas, sendo o terceiro país que mais exporta essas mercadorias primárias, ficando atrás somente dos países pertencentes a União Europeia e Estados Unidos (FAO, 2018). Com isso, o consumo de agrotóxicos é majoritariamente associado às *commodities* de exportação, como a soja, o milho e a cana-de-açúcar, juntos esses produtos consomem mais de 70% do total de agrotóxicos utilizados no país todo (PAZ, et al, 2023). Agroquímicos são produtos químicos sintéticos empregados na agropecuária com diversas finalidades de uso, mas principalmente para controle de doenças que afetam a produção vegetal (NOGUEIRA, et al, 2020). Compreendem adubos químicos ou fertilizantes, produtos veterinários, hormônios sintéticos, agrotóxicos dentre outros; eles possuem o objetivo de repelir, destruir, controlar pragas ou regular o crescimento da planta, podendo ser classificados segundo a finalidade como inseticidas, fungicidas, rodenticidas e herbicidas, entre outros (NOGUEIRA, 2020). No entanto, por possuírem toxicidade, são reconhecidos como agentes tóxicos à saúde humana e ambiental. Em 2020 dados revelaram que o Brasil é o segundo maior comprador de agrotóxicos fabricados em solo europeu, mas que são proibidos para uso tanto na União Europeia quanto na Inglaterra (FÁBIO, et al, 2020).

Em 2023, o Brasil continuou na liderança como o país que mais produziu soja no mundo, logo em seguida temos Estados Unidos e Argentina (Companhia Nacional de Abastecimento, Conab, 2023). Apesar da alta produtividade, é uma monocultura suscetível a diversas pragas e microrganismos patogênicos que acometem esses cultivares ameaçando o seu rendimento e rentabilidade (SPELTRI,

2021). Entre esses fitopatógenos, podemos citar a espécie de fungo de solo *Fusarium solani*, que destrói o sistema radicular das plantas (dependendo da quantidade de inóculo) e formam folhas chamadas de carijó (manchas amarronzadas e esbranquiçadas) (RISSI, 2022). Além disso, a agricultura enfrenta desafios para fornecer alimentos de forma sustentável para uma população mundial que está cada vez maior. Como resultado, há uma demanda crescente por soluções ecologicamente justas e que podem ajudar no desenvolvimento da planta (ABBAS, et al, 2022).

Sendo assim, como antagonista a esse patógeno, utilizaremos um fungo do gênero *Trichoderma*. Esses, são conhecidos por apresentarem alta capacidade de colonizar a rizosfera das plantas e estão amplamente distribuídos em todo tipo de ambiente, como exemplo a Antártida, a Amazônia e desertos (MONTE; BETTIOL; HERMOSA, 2019). Contudo, analisando os biofungicidas à base de fungos do gênero *Trichoderma*, no ano 2019, foram registrados no Mapa cerca de 21 produtos (MEYER, et al, 2020) em comparação aos agroquímicos, foram registrados 63, (Diário Oficial da União, 2019). Devido a esse cenário, surge a necessidade de inovação tecnológica no desenvolvimento de bioprodutos, que são menos nocivos à saúde ambiental e humana, e que promovam uma melhor eficácia no controle de microrganismos fitopatogênicos, visto que esses podem tornar-se resistentes aos químicos (HARMAN, 2000). Por fim, esse trabalho visa também a prototipagem de um biofungicida a partir da metodologia de fermentação em estado sólido e produção de um protótipo em suspensão concentrada, para futura comercialização e tratamento de *Fusarium solani* na soja.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A agricultura no Brasil

A agricultura brasileira é uma das principais atividades econômicas do país, gera empregos, riquezas, recursos para a produção de bioenergia, fortalece o comércio internacional, entre outros benefícios. Sendo que, o PIB do agronegócio brasileiro no primeiro trimestre de 2024, foi de R\$ 2,45 trilhões, sendo 1,65 trilhão no ramo agrícola e 801 bilhões no ramo pecuário (Cepea/Esalq/USP-CNA, 2024). Com base nesses resultados e no desempenho do PIB brasileiro ao longo do período, estima-se que a contribuição do setor econômico alcance aproximadamente 21,5% em 2024, uma redução em relação aos 24,0% observados em 2023 (Cepea/Esalq/USP-CNA, 2024).

Além disso, anualmente as perdas agrícolas globais ocorrem com determinada frequência, devido à vulnerabilidade das culturas à doenças provocadas por patógenos que comprometem a produtividade e diminuí o valor comercial dos produtos. Ademais, o método mais utilizado para o controle desses patógenos consiste na aplicação de agroquímicos (SILVA, 2019). Sendo a soja, a monocultura que mais utilizou agrotóxicos no Brasil, seguida do milho e da cana-de-açúcar, em porcentagem 63 %, 13% e 5% respectivamente (PIGNATI, et al, 2017). Nas áreas dedicadas às monoculturas, é comum a aplicação de agrotóxicos por meio de pulverização. No entanto, durante esse processo, as plantações, os ambientes naturais, os trabalhadores, os moradores das áreas próximas as plantações e outros animais acabam sendo afetados também (PIGNATI, et al, 2017).

2.2 Fungos fitopatogênicos

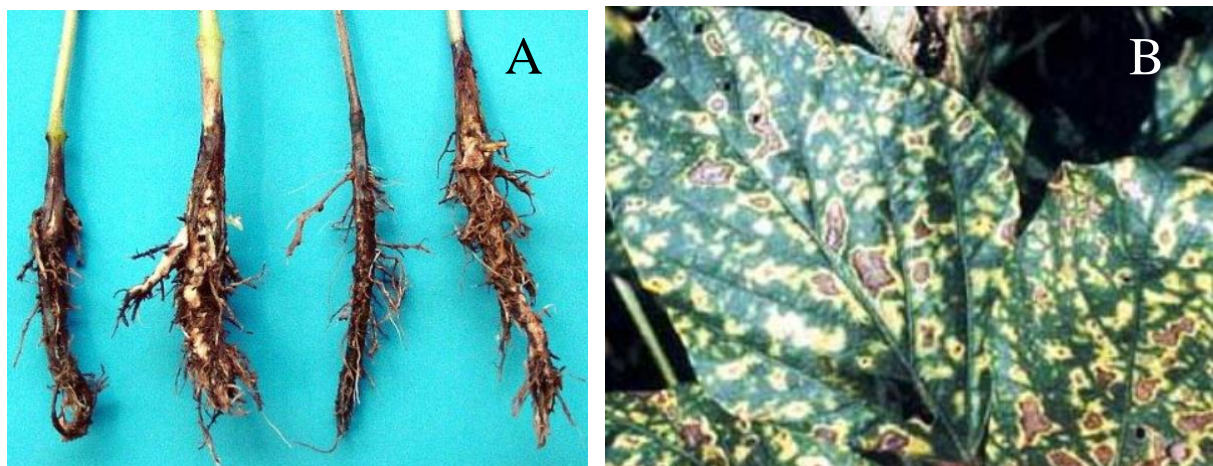
Fitopatógenos abrangem organismos e microrganismos que provocam doenças em espécies de vegetais (BRIOSO, 2015). Também são responsáveis por causar baixa produtividade dos cultivares e grande perda econômica (DINESH, et. al, 2022). Compreendem: bactérias, vírus, fungos, nematóides, protozoários, *plasmodiophorídios*, entre outros (BRIOSO, 2015). Dentre eles, podemos citar os principais fungos causadores de doenças em sementes de soja, são eles: *Diaporthe sojae*, *Colletotrichum truncatum*, *Fusarium semitectum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Cercospora kikuchii*, *Corynespora cassicola*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium sp*, *Alternaria alternata*, *Chaetomium sp*, *Cladosporium sp*, *Curvularia luneta*, *Epicoccum sp*, *Rhizopus stolonifer*, *Macrophomina phaseolina* *Nigrospora sp* (ALMEIDA, 2014; GOULART, 2018). Além desses, temos *Fusarium solani* como causador da doença fusariose ou podridão vermelha das raízes de soja (RISSI, 2022).

2.2.1 *Fusarium solani*

Fusarium solani é um fitopatógeno habitante de solos, responsável por causar a podridão vermelha das raízes (PVR), afetando a maior parte das áreas de cultivo em diversos países (HARTMAN, et al, 1999). Os sintomas iniciais dessa doença são estrias longitudinais avermelhadas, no hypocótilo e na raiz de plântulas ou plantas jovens. Posteriormente, surgem lesões irregulares sem bordas definidas, avermelhadas que podem se escurecer tornando-se marrons com o desenvolvimento da doença. As raízes primárias geralmente são destruídas, o que prejudica a absorção de água e nutrientes e impacta diretamente no crescimento vegetal, assim como a fixação biológica de nitrogênio (LOBO, 2021).

Em casos severos, o patógeno pode destruir todo o sistema radicular. Nas áreas mais infestadas, o resultado é formado por plantas com crescimento irregular, pouco desenvolvidas e baixa produtividade (LOBO, 2021). Para o manejo e prevenção dessa doença, recomenda-se o uso de cultivares resistentes, rotação de cultura e o uso de biofungicidas no tratamento de sementes e solo, pois os agentes desses produtos permanecem no ambiente protegendo de um próximo ciclo de infecção (LOBO, 2021).

Figura 1 - Aspecto geral das folhas e raízes infectadas por *F.solani*



Legenda: A) Sistema radicular reduzido, causado pela infecção de *F.solani*; B) Folhas com lesões ocasionadas por *F.solani*. Autor: Agrolink.

2.2.2 Importância e controle biológico

Em ambientes agrícolas, quando o crescimento das populações de plantas, animais ou fitopatógenos atinge níveis economicamente indesejáveis e se tornam pragas, é possível manejar ou introduzir seus inimigos naturais no sistema. Essa estratégia contribui para a supressão dessa população indesejada e oferece uma alternativa ao uso de agrotóxicos de amplo espectro, promovendo uma produção de alimentos mais sustentável e auxiliando na conservação dos habitats naturais (FONTES; VALADARES-INGLIS, 2020). Ultimamente, um grande número de

fungicidas sintéticos foram banidos por causa de substâncias e efeitos indesejáveis, como toxicidade alta e aguda (NEGA, 2014). Sendo assim, existe uma demanda por novos produtos economicamente viáveis e mais sustentáveis (REIS JUNIOR e NOGUEIRA, 2021).

Em contraponto, o controle biológico refere-se à utilização proposital de organismos ou microrganismos vivos introduzidos ou residentes, além da utilização de cultivares resistentes a doenças, para suprimir o crescimento e disseminação de um ou mais patógenos vegetais (PAL, et al, 2006). Sendo assim, os fungos do gênero *Trichoderma* possuem grande importância econômica para a agricultura, pois são capazes de atuarem como agentes controladores de doenças de várias espécies de plantas, além de promoverem o crescimento e serem indutores de resistência em plantas (MOHAMED, et al, 2006).

2.2.3 Mecanismos de ação de fungos do gênero *Trichoderma*

Estes microrganismos são conhecidos e pesquisados por suas capacidades de biocontrole de patógenos vegetais e promoção no crescimento de vegetais, em razão dos seus vários mecanismos de ação, como micoparasitismo, antibiose e competição (MACHADO, et al, 2012). Além disso, uma variedade de linhagens de *T. virens*, *T. asperellum*, *T. atroviride* e *T. harzianum* induzem mudanças no metabolismo de plantas, que as tornam resistentes a diversos tipos de microrganismos patogênicos (HARMAN, et al, 2004). O isolamento contínuo de linhagens com maior eficácia e a expansão de seu uso em diferentes culturas agrícolas contra diversos fitopatógenos,

são ações promissoras para o desenvolvimento de bioprodutos, cujo objetivo é um futuro de agricultura sustentável (LOPES, 2009).

2.2.4 Micoparasitismo

Espécies de *Trichoderma spp.* parasitam outro fungo, estabelecendo uma interação que pode resultar na inibição do crescimento ou destruição do fungo (HARMAN, 2004). Essas linhagens invadem ou danificam diretamente as hifas dos patógenos comprometendo as células, levando a uma quebra da parede celular e consequentemente causando a diminuição ou morte do patógeno, esse fenômeno ocorre através da secreção de enzimas degradadoras de quitina (um importante componente da parede celular de fungos) (YAO, et al, 2023). O micélio de *Trichoderma spp* se fixa no fungo alvo e se enrola em torno dele formando apressorio, órgãos de pressão especializados dos quais um minúsculo agente infeccioso pode crescer e infectar uma célula, entrelaçamento, interpenetração (HARMAN, 2004; TIAN, et al, 2018).

2.2.5 Antibiose

Linhagens que agem por meio de antibiose produzem substâncias antagônicas que inibem o crescimento de fungos fitopatogênicos (HARMAN, 2004; YAO, 2022). Esse processo é caracterizado pela diminuição do crescimento ou morte do fungo patogênico, através da liberação de compostos que podemos chamar de antibióticos (BAPTISTA, et al. 2011). As espécies do gênero *Trichoderma*, podem produzir diversos antimicrobianos, como: tricomicina, gelatinomicina, clorotricomicina e peptídeos antibacterianos (MARUYAMA, et al, 2020). Esses metabólitos

secundários podem ser utilizados no desenvolvimento de produtos agrícolas (MANGANIELLO, et al, 2018)

2.2.6 Competição

Fungos filamentosos assim como outros microrganismos possuem vias metabólicas para defender-se de condições adversas ou outros organismos. No mesmo ambiente, existe a demanda por determinados recursos que mais de uma espécie necessita (SANTOS NETO, 2018). Quando duas espécies precisam de um nutriente para sua sobrevivência e este está limitado no ambiente, há a competição intraespecífica, onde uma espécie se sobressairá frente a outra (WICKLOW, 2005).

2.2.7 Promoção de crescimento vegetal

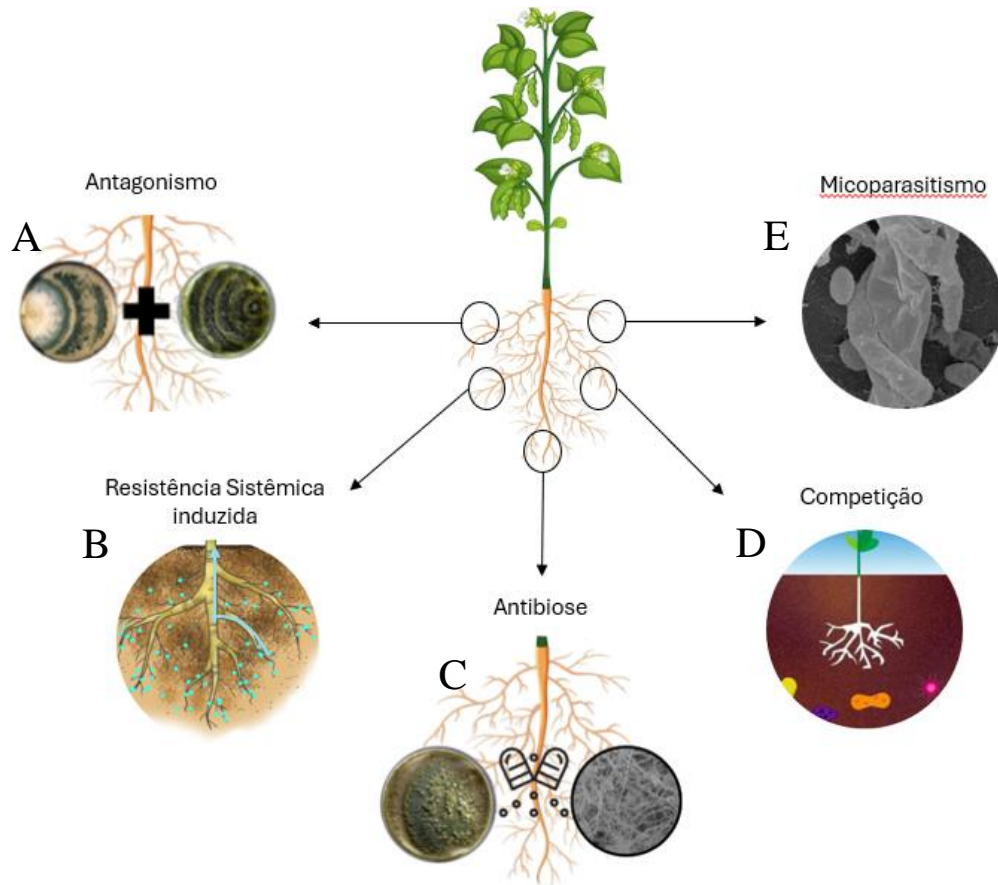
Microrganismos podem influenciar benéficamente na germinação das sementes, no surgimento das plântulas, no crescimento e produtividade de cultivar (CHAGAS, et al, 2017). *Trichoderma spp*, são capazes de colonizar a zona das sementes (espermosfera) e a zona das raízes (rizosfera), o que dificulta o estabelecimento de patógenos (PRASUN et al, 2022). É comum em vegetais que rizobactérias promovam a resistência sistêmica induzida frente a patógenos, danos físicos e ataque de insetos, porém, fungos do gênero *Trichoderma* também possuem essa capacidade (HARMAN et al, 2004). Em relação a resistência sistêmica induzida de *Trichoderma* ela ocorre por meio de duas opções: uma induz a resistência através da regulação de elicitores (proteínas, enzimas e peptídeos) ou efetores e a segunda, a enzima de degradação da parede celular do *Trichoderma spp* secreta oligossacarídeos que induz a resistência em plantas (GOMES et al., 2015 apud YAO, 2023).

Em um experimento, foi utilizado *T. asperellum* (tratamento 1) e *T. harzianum* (controle) para avaliar a eficiência de inoculação de *Trichoderma* como promotor de crescimento vegetal. Para a cultura de soja, foi obtido um aumento de 128% em relação a testemunha e 77% em relação ao controle (*T. harzianum*) CHAGAS, et al, 2017).

2.2.8 Antagonismo

Trichoderma spp são conhecidos por produzirem BCAs - Agentes de controle biológico, que são substâncias antagônicas a diversos microrganismos como bactérias e fungos patogênicos e invertebrados como nematoides (VERMA, 2007; YAO,2023). Podemos considerar o antagonismo como a junção de dois outros mecanismos, onde diferentes linhagens de *Trichoderma spp* utilizam diferentes mecanismos de biocontrole (DE ZOTTI et al., 2020 ; CAI et al., 2021 ; JI et al., 2021 ; RUANGWONG et al., 2021b apud YAO, 2023). Um exemplo é a utilização de dois fungicidas com princípios ativos diferentes. Jogaiyah et al, 2018, utilizou *T. harzianum* associado a outro fungicida em mofo cinzento do tomateiro e constatou que a taxa de inibição foi maior quando foram utilizados juntos se comparado a cada tratamento isolado (JOGAIAH, et al, 2018 apud YAO, 2023).

Figura 2 - Esquema exemplificando os mecanismos de ação do gênero *Trichoderma*



Legenda: A) Antagonismo, duas linhagens de *Trichoderma spp* antagonistas, proporcionando juntos mecanismos diferentes de defesa para a planta. Fonte: Google imagens e a própria autora; B) Resistência sistêmica induzida, onde colônias de *Trichoderma spp* simbolizadas pelos pontos azuis, emitem sinais químicos, que são percebidos pelas plantas e a resposta se dá na produção de ácido jasmônico e etileno por exemplo. Fonte: Google imagens e própria autora; C) Antibiose: Secreção de metabólitos secundários por *Trichoderma spp* como antifúngicos e antibióticos, para conter o patógeno *Macrophomina phaseolina*. Fonte: Beatriz Milani Dos Santos; D) Competição: Mais de uma espécie de microorganismo competindo pelos mesmos nutrientes presentes no solo. Fonte: google imagens e E) Micoparasitismo: Imagem de um fungo do gênero *Talaromyces* micoparasitando *Macrophomina phaseolina*. Fonte: Google imagens, canva, Beatriz Milani Dos Santos e Marcos Letaif Gaeta.

2.2.9 DCCR – Delineamento do Composto Central Rotacional

O presente estudo baseou-se em um delineamento composto central rotacional (DCCR) para análise de melhores condições para a produção de propágulos viáveis do fungo B3F008. Esse delineamento foi escolhido para avaliar a influência de variáveis pré-estabelecidas como a quantidade de arroz, a quantidade de propágulos por ml de inóculo, o volume de inóculo e volume de água. Logo, foi executado um planejamento experimental do tipo delineamento do composto central rotacional (DCCR). O desenvolvimento de processos biotecnológicos eficientes como fermentações, exige uma abordagem com modelos estatísticos compatíveis para a otimização de resultados. O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) é uma metodologia amplamente utilizada em estudos relacionados a fermentações e à produção de bioinsumos, possibilitando a modelagem e otimização de processos, através de modelos matemáticos, que conseguem prever respostas do experimento (MONTGOMERY, 2019).

O DCCR integra a metodologia de superfície de resposta (MSR) e é amplamente aplicado na otimização de processos. Ele é composto por três elementos principais: pontos fatoriais, pontos axiais e pontos centrais. Os pontos fatoriais definem o espaço experimental, enquanto os pontos axiais permitem a exploração da curvatura na resposta do sistema. Já os pontos centrais são essenciais para estimar a reprodutibilidade do experimento e validar o modelo matemático (BOX; WILSON, 1951).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

O fitopatógeno utilizado será o *Fusarium solani*. O isolado está mantido no banco de microrganismos do Laboratório de Biotecnologia Microbiana da Universidade Estadual de Londrina - UEL, Paraná, Brasil.

Como agente antagonista foi utilizado uma linhagem de fungo do gênero *Trichoderma*, previamente selecionada e cedida pela empresa BIO3. Os microrganismos presentes foram cultivados em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) e conservados em tubos de criopreservação contendo meio BDB (calda batata dextrose) acrescido com 20% de glicerol a -80°C com 20% de glicerol.

3.2 Identificação dos isolados

O isolado B3F008 foi cultivado em meio BDA (batata, dextrose e ágar) pH 5.8 e a extração do DNA genômico foi realizada de acordo com o protocolo otimizado de Raeder e Broda (1995). Para a identificação da linhagem foi utilizado o marcador universal ITS (internal transcribed spacer region), para sequenciamento da região parcial do gene ITS 5.8. A amplificação e sequenciamento foram realizadas utilizando os primers ITS5 e ITS4 (White et al. 1990). A obtenção das sequências e o sequenciamento tipo Sanger foi realizada pela empresa GoGenetics. As sequências obtidas foram analisadas através dos softwares Mega 6.0 e BioEdit, onde foram obtidas as sequências consensos, estas foram comparadas com sequências disponíveis em bancos de dados, NCBI/GenBank (National Center for Biotechnology Information), através da ferramenta Blast contra espécies tipo do gênero (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

3.3 Teste de cultura pareada

O antagonismo do B3F008 contra ambos os patógenos foram avaliados pelo método de culturas pareadas, conforme descrito por Mello et al. 2007. Discos de ágar contendo micélio de *F. solani* e *R. solani* e do antagonista (5 mm de diâmetro) serão retirados de colônias com cinco dias de cultivo e depositados, simultaneamente, em extremidades opostas das placas de Petri, contendo meio BDA solidificado. O mesmo procedimento foi adotado para os testes com *F. solani*, exceto que o tempo de repicagem do patógeno foi de dois dias antes do antagonista. As placas foram incubadas em incubadora com fotoperíodo de 12h a 28 °C para favorecimento do patógeno *F. solani*, respectivamente (Bardin & Huang 2001). Em seguida, foram feitas a aferição de área do crescimento micelial (cm) para calcular o Índice de crescimento micelial em porcentagem (MCI%).

$$\text{Fórmula 1: MCI\%} = (dc - dt / dc) \times 100 \text{ (YAHYAZADEH, M. et al. 2008).}$$

3.4 DCCR – Delineamento do Composto Central Rotacional

Utilizando o software Protimiza Experimental Design para analisar a melhor produção de propágulos utilizando a linhagem de *Trichoderma* B3F008. Foram analisadas quatro variáveis independentes, utilizando a produção de propágulos como resposta, em um total de 29 ensaios, dos quais, cinco eram referentes às condições determinadas pelos pontos centrais.

$$r \cdot (2^k + 2 \cdot k) + cp = 1 \cdot (2^4 + 2 \cdot 4) + 5 = 29$$

Para fins de validação, essa condição foi repetida com 10 réplicas experimentais (dez sacos de arroz), para a condição das variáveis estabelecida pelo Protimiza.

Tabela 1 - Níveis reais das variáveis independentes

Variáveis independentes	Níveis reais das variáveis independentes
-------------------------	--

	-1	0	1
Arroz (g) (X1)	100	200	300
Água (%) (X2)	30	45	60
Inóculo 1×10^7 /ml (X3)	0,50	1	1,5
Volume do inóculo (ml) (X4)	15	30	45

Tabela 2 - Quadro de ensaios do planejamento composto central rotacional

	Arroz (g)	Água (%)	Inóculo	Volume de inóculo (ml)
F1	100	30	0,5	15
F2	300	30	0,5	15
F3	100	60	0,5	15
F4	300	60	0,5	15
F5	100	30	1,5	15
F6	300	30	1,5	15
F7	100	60	1,5	15
F8	300	60	1,5	15
F9	100	30	0,5	45
F10	300	30	0,5	45
F11	100	60	0,5	45
F12	300	60	0,5	45
F13	100	30	1,5	45
F14	300	30	1,5	45
F15	100	60	1,5	45
F16	300	60	1,5	45
F17	0	45	1	30
F18	400	45	1	30
F19	200	15	1	30
F20	200	75	1	30
F21	200	45	0	30
F22	200	45	2	30
F23	200	45	1	0
F24	200	45	1	60
F25	200	45	1	30
F26	200	45	1	30
F27	200	45	1	30
F28	200	45	1	30
F29	200	45	1	30

3.5 Fermentação em estado sólido

A partir do resultado da DCCR, em um saco de polipropileno 24x33x0,12 foram adicionados 200g de arroz tipo I - classe fino longo, com 22ml (cerca de 11% da massa do arroz) de água deionizada. Os sacos foram fechados e autoclavados a 121°C por 20 minutos. Após o ciclo de esterilização e resfriamento do arroz, foi realizado o inóculo de uma solução de conídios da linhagem B3F008 em placa de BDA, em uma concentração de 1×10^7 propágulos/ml, com 30ml de água deionizada esterilizada (volume de inóculo), o volume total de água utilizado foi de 52 ml. Após, foi realizada a incubação a 28°C durante 7 dias para observação de crescimento fúngico. Após 7 dias, o saco foi aberto e acondicionado em estufa a 25°C por 7 dias, para secagem. Após a secagem, o arroz foi peneirado utilizando uma sequência de tamises de abertura de 0,250 mm, 0,05 mm. Os conídios foram armazenados em um tubo de fundo cônico esterilizado e será avaliada viabilidade, estimativa de quantidade de conídios/g e atividade biológica.

3.6 Formulação de um protótipo de um bioproduto em suspensão concentrada

Para a formulação de suspensão concentrada, os conídios oriundos da fermentação em estado sólido, após a validação de sua produção, viabilidade e atividade biológica, foram utilizados no desenvolvimento de um protótipo. O protocolo utilizado foi desenvolvido pelo LABIM/UJEL (Tabela 3):

Tabela 3 - Composição da formulação em suspensão concentrada

Ainda neste trabalho manteremos o sigilo e proteção da inovação para o processo de patenteamento da formulação. A publicação do TCC com os resultados pode comprometer esse requisito. Além disso, possuímos legalmente normas que permitem restringir a divulgação de dados sensíveis, para proteger a propriedade intelectual e os interesses comerciais dos envolvidos. Outro fator é a confidencialidade

pois o produto envolveu parceria com empresa, que impede a divulgação antecipada de detalhes técnicos para a preservação de cópias ou aprimoramento do produto, que prejudiquem os direitos do inventor. Cada componente desta formulação foi pensado de acordo com a sua função. O volume final do produto foi 10ml.

3.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de ANOVA, utilizando um nível de significância de 5%. Todas as análises foram conduzidas no software R (v 4.2.2).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

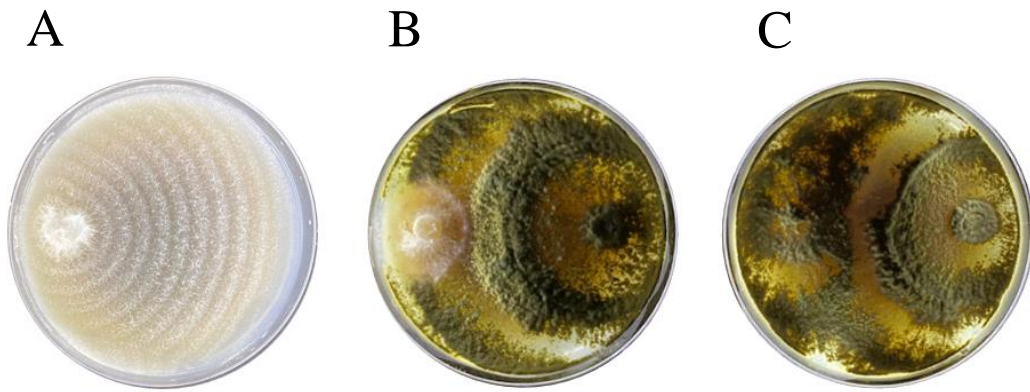
4.1 Teste de Cultura Pareada

Foram feitas três repetições do teste de cultura pareada, com três réplicas experimentais cada, após 7 dias, foi realizada a aferição de crescimento micelial (mm) para calcular o índice de crescimento micelial em porcentagem (MCI%) conforme a equação descrita abaixo:

$$\text{MCI\%} = (dc - dt / dc) \times 100 \text{ (YAHYAZADEH, M. et al. 2008).}$$

Através desse valor, conseguimos também calcular a porcentagem de inibição sobre o fitopatógeno, que foi cerca de 91% de controle sobre *F.solani*. Esses valores estão amostrados na tabela 4 desse tópico.

Figura 3 - Cultura pareada entre *F.solani* e *Trichoderma* B3f008



Legenda: A) Crescimento micelial a partir de um *spot* do patógeno *Fusarium solani*; B) Cultura pareada entre *F.solani* e *Trichoderma spp.* C) Controle da linhagem de *Trichoderma* B3F008.

Tabela 4 - Área de crescimento micelial de *F. solani* e Porcentagem de inibição do B3F008

B3F008	Média comprimento Vertical (cm)	Média comprimento Horizontal (cm)	Porcentagem de crescimento de <i>F.solani</i> (%)	Porcentagem de inibição (%)
Experimento 1	2,91	2,38	9,58	90,42
Experimento 2	2,97	2,47	10,13	89,87
Experimento 3	2,57	2,07	7,38	92,62
Média total	2,82	2,31	9,03%	90,97%

Através do resultado do teste de cultura pareada (Figura 3), observamos que existe uma relação íntima entre as hifas do fungo da linhagem *Trichoderma sp.* (B3F008) contra o fitopatógeno *F. solani*, essa proximidade evidencia a ação de micoparasitismo, que é observada em várias outras espécies desse mesmo gênero. Esse resultado está em concordância com Benitez (2004), VERMA (2007) e YAO (2023) os quais dizem que o biocontrole também pode resultar de uma interação direta entre o patógeno e o BCAs (agentes de controle biológico), como no micoparasitismo, que envolve contato físico e pode ocorrer a síntese de compostos tóxicos, antifúngicos e/ou antibióticos que atuam sinergicamente com enzimas Kumar (2023).

4.2 DCCR

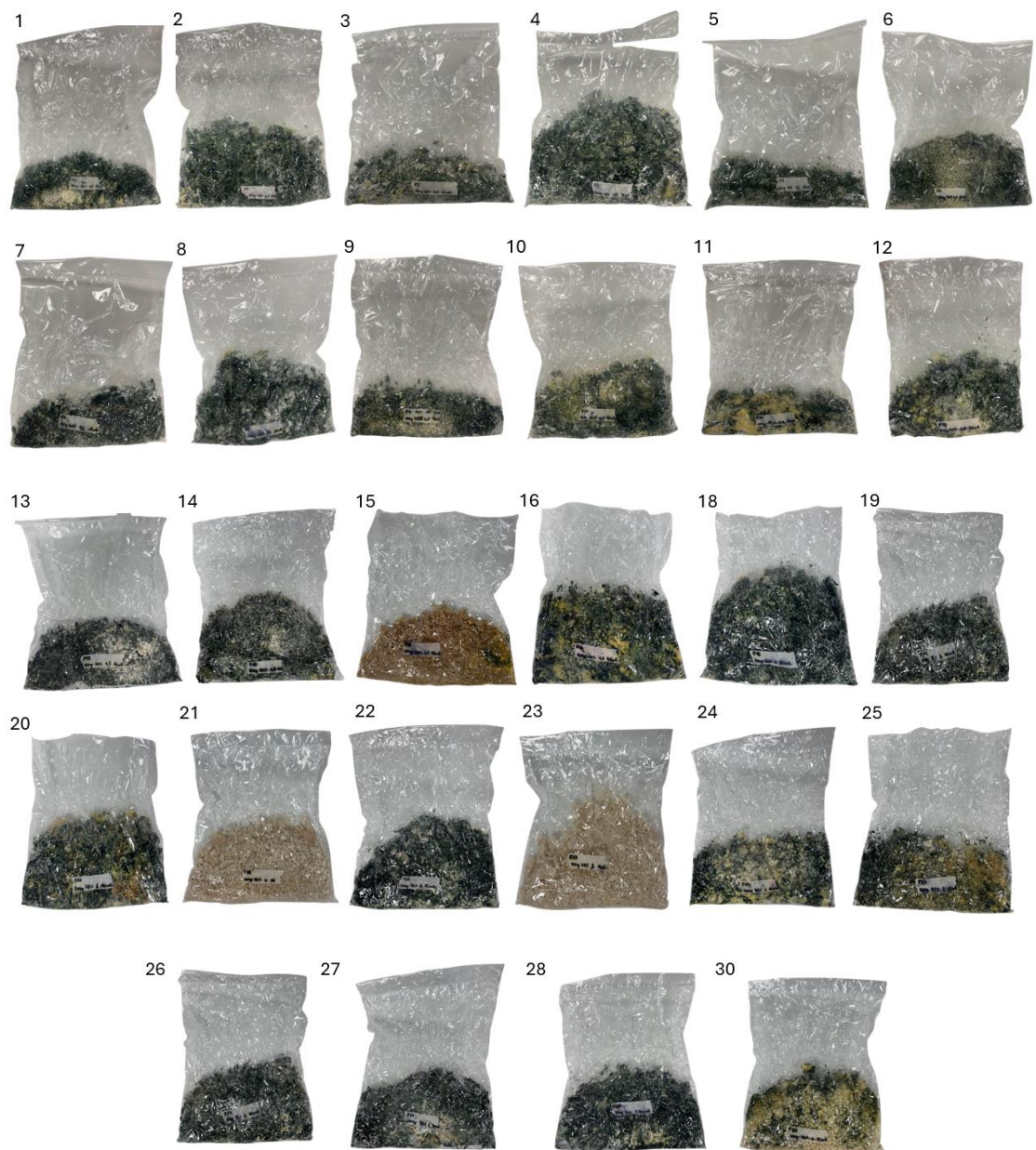
Tabela 5 - Rendimento de propágulos (g) e conídios/ml em relação a DCCR

Amostra	Rendimento de propágulos (g)	Quantidade de conídios/ml
F1	0,301	1,68x10 ⁸
F2	0,859	6,5x10 ⁸
F3	0,871	4,42x10 ⁸
F4	0,208	3,85x10 ⁸
F5	1,438	3,18x10 ⁸
F6	0,531	6x10 ⁸
F7	0,424	4,13x10 ⁸
F8	0,191	1,7x10 ⁸
F9	0,409	5,8x10 ⁸
F10	0,179	1,83x10 ⁸
F11	0,602	3,93x10 ⁸
F12	0,057	2,12x10 ⁸
F13	1,73	3,7x10 ⁸
F14	1,733	1,76x10 ⁸
F15	1,166	8,5x10 ⁸
F16	0,609	2,85x10 ⁸
F17	0	0
F18	0,841	6,8x10 ⁸
F19	1,013	1,27x10 ⁹
F20	0,139	3,38x10 ⁸
F21	0	0
F22	0,67	4,55x10 ⁸
F23	0	0
F24	0,301	4x10 ⁸
F25	3,203	3,2x10 ⁸
F26	0,874	1,09x10 ⁹
F27	1,137	9,4x10 ⁸
F28	1,079	7,8x10 ⁸
F30	2,422	8x10 ⁸
Rendimento total	22,987	X

A partir do modelo de regressão quadrática construído, foi possível chegar nas seguintes condições ótimas de: 200g de arroz, 11% de água (30ml), 1x10⁷ propágulos/ml de inóculo e volume de inóculo igual a 30ml. Após a extração através de

peneira, a contagem de propágulos totais foi feita com auxílio da câmara de *Neubauer*, utilizando a 4 diluição, resultando em 5×10^{10} conídios/ml. A validação de conídios viáveis foi realizada através de micro diluição seriada de 0,1ml de uma solução de propágulos do B3F008 retirados da fermentação sólida e plaqueados 100 μ L em placa de BDA, das diluições -4,-5,-6 e -7.

Figura 4 - Fermentações sólidas feitas através do ensaio experimental do DCCR



Legenda: Fermentação sólida em arroz, testando as variáveis de quantidade de arroz, porcentagem de água, inóculo (UFC/ml) e volume de inóculo (ml). 1) 100g de arroz, 30 % de água, 0,5 UFC/ml, 15ml; 2) 300g de arroz, 30 % de água, 0,5 UFC/ml, 15ml; 3) 100g de arroz, 60 % de água, 0,5 UFC/ml, 15ml; 4) 300g de arroz, 60 % de água, 0,5 UFC/ml, 15ml; 5) 100g de arroz, 30 % de água, 1,5 UFC/ml, 15ml; 6) 300g de arroz, 30 % de água, 1,5 UFC/ml, 15ml; 7) 100g de arroz, 60 % de água, 1,5 UFC/ml, 15ml; 8) 300g de arroz, 60 % de água, 1,5 UFC/ml, 15ml; 9) 100g de arroz, 30 % de água, 0,5 UFC/ml, 15ml; 10) 300g de arroz, 30 % de água, 0,5 UFC/ml, 45ml; 11) 100g de arroz, 60 % de água, 0,5 UFC/ml, 45ml; 12) 300g de arroz, 60 % de água, 0,5 UFC/ml, 45ml; 13) 100g de arroz, 30 % de água, 1,5 UFC/ml, 45ml; 14) 300g de arroz, 30 % de água, 1,5 UFC/ml, 45ml; 15) 100g de arroz, 60 % de água, 1,5 UFC/ml, 45ml; 16) 300g de arroz, 60 % de água, 1,5 UFC/ml, 45ml; 17) 0g de arroz, 45 % de água, 1 UFC/ml, 30ml; 18) 400g de arroz, 30 % de água, 1 UFC/ml, 15ml; 19) 200g de arroz, 15 % de água, 1 UFC/ml, 30ml; 20) 200g de arroz, 75 % de água, 1 UFC/ml, 15ml; 21) 200g de arroz, 45 % de água, 0 UFC/ml, 30ml; 22) 200g de arroz, 45 % de água, 2 UFC/ml, 30ml; 23) 200g de arroz, 45 % de água, 1 UFC/ml, 0 ml; 24) 200g de arroz, 45 % de água, 1 UFC/ml, 60ml; 25) 200g de arroz, 45 % de água, 1 UFC/ml, 30ml; 26)) 200g de arroz, 45 % de água, 1 UFC/ml, 30ml; 27)) 200g de arroz, 45 % de água, 1 UFC/ml, 30ml; 28)) 200g de arroz, 45 % de água, 1 UFC/ml, 30ml E 30)) 200g de arroz, 45 % de água, 1 UFC/ml, 30ml.

Em relação ao DCCR os sacos de números 19 e 26 foram os que atingiram 10^9 UFC/g, as condições utilizadas mais próximas ao modelo foram de 200g de arroz, 11% de água, 1×10^7 UFC/ml de inóculo e 30ml de volume de inóculo (19) e 200g de arroz, 45% de água, 1×10^7 UFC/ml de inóculo e 30ml de volume inóculo (26), respectivamente. No que se refere a essas duas condições, a primeira é o resultado que mais se aproximou da sugestão dada pelo websoftware de design experimental *Protimiza*, como melhor receita para a produção de propágulos do fungo em estudo. Ademais, a produção de propágulos da linhagem B3F008 em cultura sólida em arroz atingiu a concentração total dos propágulos de 5×10^{10} UFC/g e $1,35 \times 10^9$ UFC/ml de conídios viáveis, o que indica um resultado promissor quando comparado ao produto comercial (2×10^9 UFC/ml de produto). Conseguimos equiparar o protótipo a

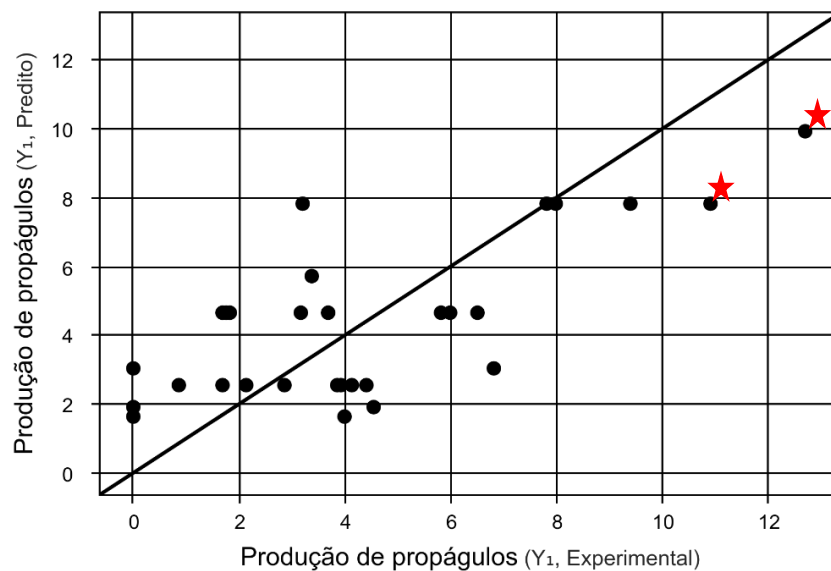
mesma UFC/ml desse produto comercial.

Figuras 5, 6 e 7 - Resultados das fermentações em estado sólido e produção de propágulos da linhagem B3F008, recomendados pelo websoftware Protimiza.

Ainda sobre a DCCR, o gráfico acima (Valores reais x Valores preditos), demonstra os valores reais para os valores predictos.

Ainda sobre a DCCR, o gráfico abaixo (Valores reais x Valores preditos), demonstra os valores reais para os valores preditos. Nesse experimento testamos a melhor entre essas duas opções. O valor de $1,27 \times 10^9$ produzidos em 200g de arroz, 11% de água, 1×10^7 /ml de inóculo e 30ml de volume de inóculo.

Figura 5 - Gráfico sobre os Valores experimentais X preditos



Legenda: Os pontos dispersos em volta da linha diagonal, representam diferenças na produção de propágulos. A linha em si, indica uma relação esperada entre as condições testadas. O valor indicado pela segunda estrela ($1,27 \times 10^9$) representa a produção na condição de: 200g de arroz, 11% de umidade e inóculo de 1×10^7 /ml com um volume de 30ml.

O gráfico de Pareto faz parte de uma das repostas dadas pelo *websoftware Protimiza*. Ele representa qual foi a variável mais relevante para obtermos esses resultados, ou seja, todas as variáveis que ultrapassam a linha acumulada e estão elevadas ao quadrado, tiveram relevâncias dentro do experimento.

Figura 6 – Gráfico de Pareto representativo do nível de significância ($\alpha = 10\%$)

O gráfico de Pareto ajuda a visualizar quais coeficientes são significativos para a construção do modelo de regressão. Este primeiro gráfico (figura 6) demonstra todas as variáveis existentes no modelo experimental. A partir dele foram selecionadas apenas as variáveis significativas: Arroz = X_1^2 , Água = X_2^2 , Inóculo = X_3^2 e Volume de inóculo = X_4^2 e o gráfico foi reparametrizado (figura 7).

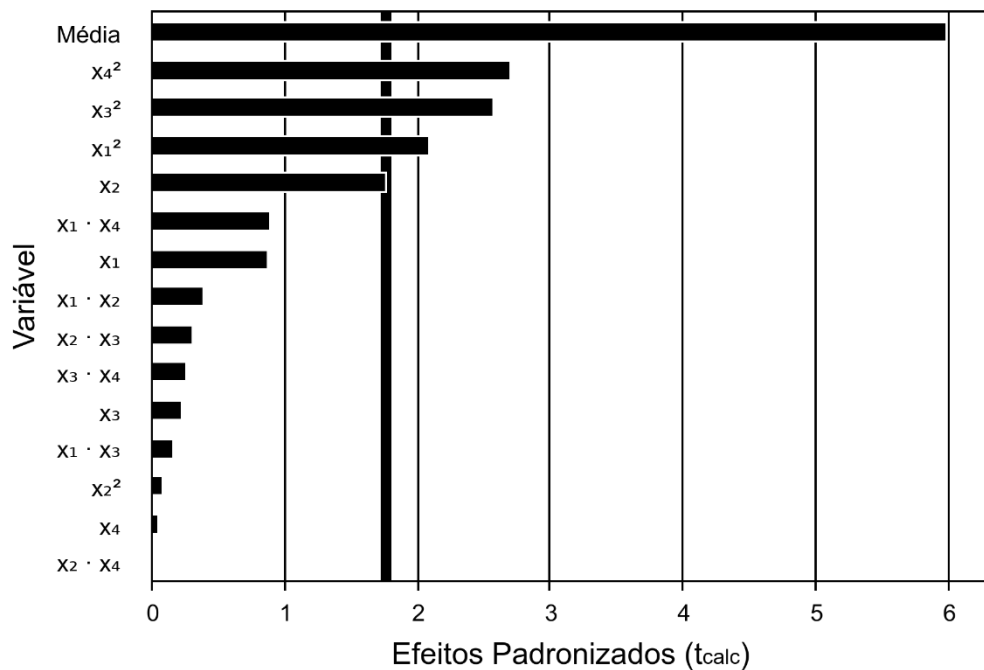
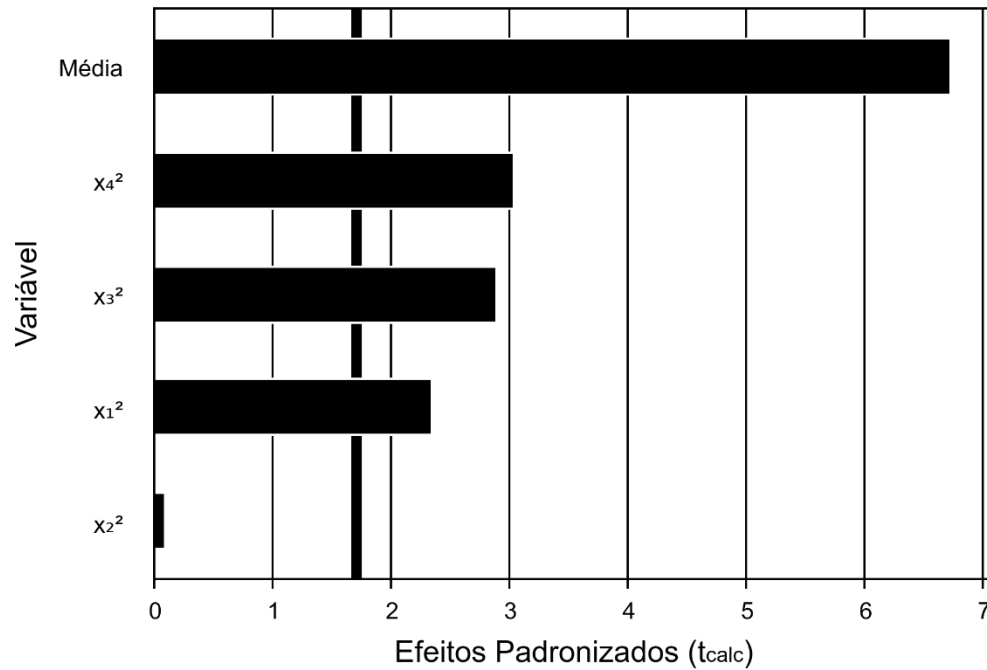


Figura 7 – Gráfico de Pareto representativo com as variáveis significativas no nível de significância ($\alpha = 10\%$)

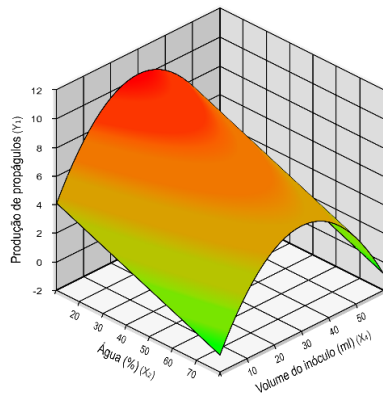


Legenda: O eixo Y, representa as variáveis do experimento (Arroz = X_1^2 , Água = X_2^2 , Inóculo = X_3^2 e Volume de inóculo = X_4^2), dá mais significativa para a menos significativa, enquanto o eixo X (numeral), indica o percentual acumulado das ocorrências quando comparado a linha acumulada (entre 1 e 2), auxiliando no entendimento da variável que foi mais relevante.

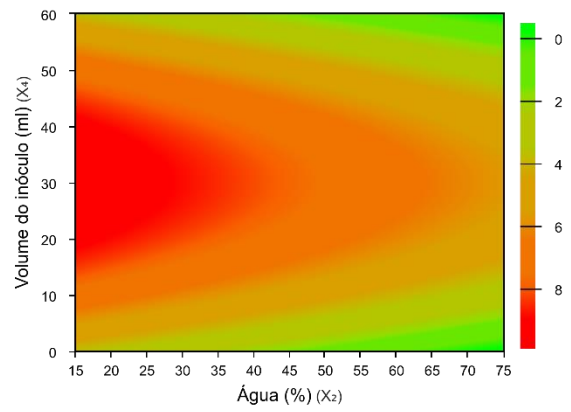
Os gráficos abaixo demonstram as maiores produções de propágulos do fungo B3F008, de acordo com as variáveis água e volume de inóculo (A e B), água e inóculo (C e D) e arroz e inóculo (D e E), sendo que os gráficos A e B, foram as condições adotadas para a validação do experimento.

Figura 8 - Gráficos de superfície de resposta em gradientes de cores relacionados ao resultado do DCCR

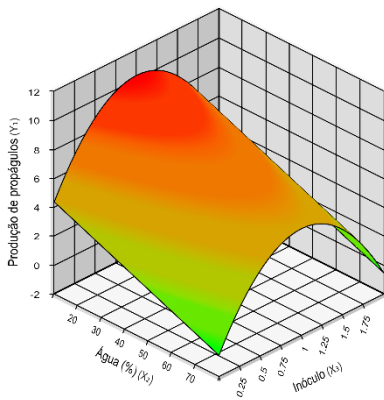
A



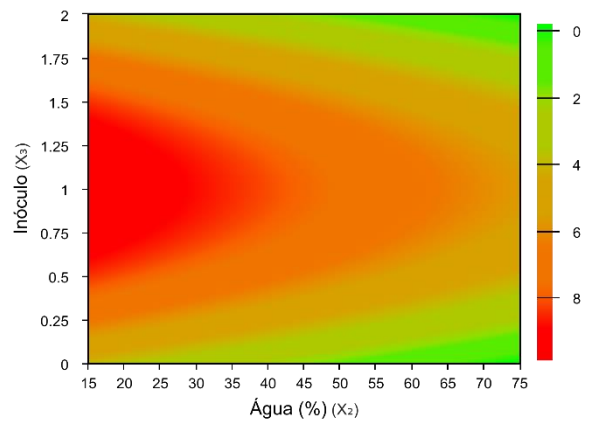
B



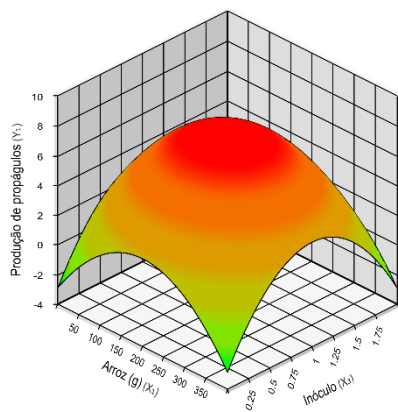
C



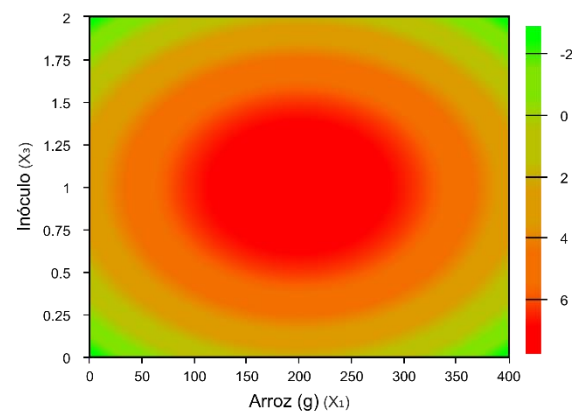
D



E



F



Legenda: A) e B) Mostram a produção de propágulos ($1,27 \times 10^9$ UFC/ml) em relação a interação entre água (11%) e volume de inóculo (30ml); C) e D) Produção de propágulos ($1,23 \times 10^9$ UFC/ml) em relação a interação de água (15%) e inóculo (1ml) e E) e F) Produção de propágulos ($7,8 \times 10^8$ UFC/ml) em relação a interação de arroz (200g) e inóculo (1ml).

Tabela 6 - ANOVA

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	F _{calc}	p-valor
Regressão	149,8	4	37,5	6,6	0,00103
Resíduos	137,1	24	5,7		
Falta de Ajuste	103,7	20	5,2	0,6	0,78879
Erro Puro	33,4	4	8,3		
Total	286,9	28			
R ²					52,23

Os resultados do experimento demonstraram que o modelo previsto pelo websoftware Protimiza previu uma resposta que não só foi alcançada, mas também superada, visto que chegamos a um log a mais na validação. Uma análise de variância (ANOVA) indicou que o modelo de regressão é estatisticamente significativo, com um p-valor de 0,00103, explicando parte da variabilidade dos dados, com destaque relacionado ao valor de $1,27 \times 10^9$ propágulos/g nas condições de 200g de arroz com 11% de umidade e 30ml de inóculo (1×10^7 /ml) como um dos pontos mais eficientes, demonstrando que essa pode ser considerada a condição ideal do experimento. Sobre os valores preditos e experimentais observam-se uma dispersão ao redor da linha diagonal, possivelmente devido a variações específicas do processo. Além disso, o coeficiente de determinação ($R^2 = 52,23\%$) revelou que apenas 52,23% da variação total é explicado pelo modelo, indicando que outros fatores podem estar

influenciando os resultados como heterogeneidade no meio de cultivo e o método de extração manual utilizado para retirar os propágulos.

Futuras otimizações no processo poderiam incluir ajustes no teor de umidade da câmara de germinação e luminosidade. Para Hanada (2006), a produção conidial do isolado ALF247 de *Trichoderma viride* utilizando-se arroz como substrato de crescimento, obteve variações de acordo com a suplementação com diferentes nutrientes. Observaram eficácia do crescimento do isolado quando se utilizou discos de micélio e conídios em substrato de arroz enriquecido com CaCO_3 , ou seja, o enriquecimento do meio de cultivo com nutrientes poder ser um próximo passo para esta pesquisa, visando a possibilidade de aumentar ainda mais a eficiência da produção de propágulos. Assim, são necessários estudos adicionais para melhorar esse coeficiente de determinação e aproximá-lo de 100%.

4.3 Formulação do protótipo do produto

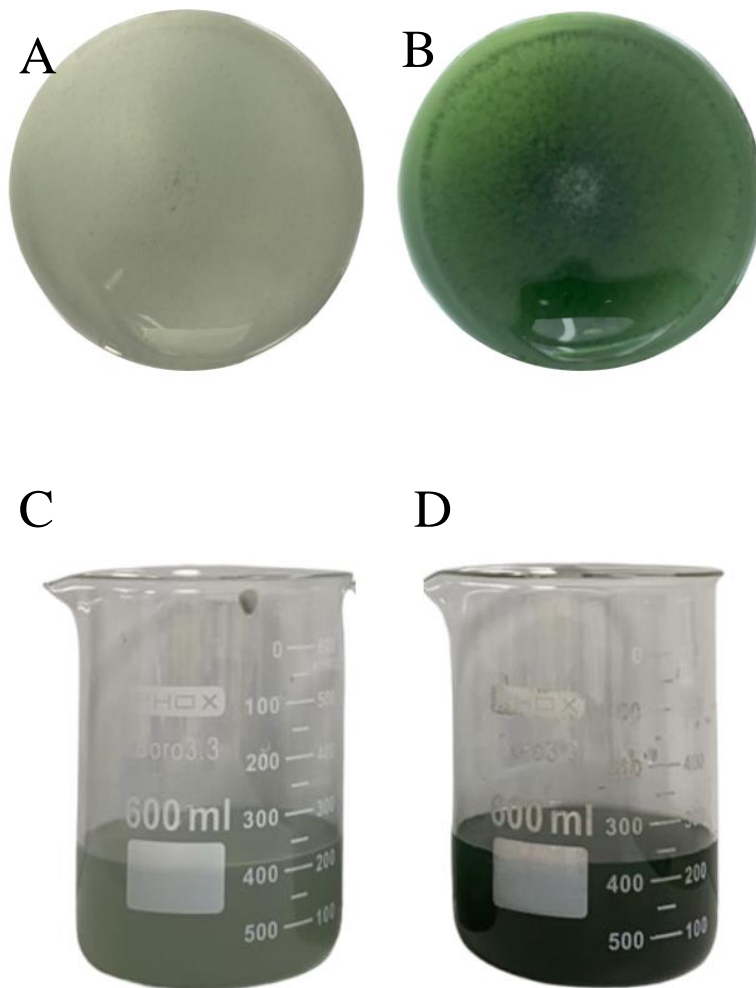
Após a formulação, foi inoculado 500 μl de cada produto em um guardanapo para observamos a consistência. Em questão de minutos forma-se um halo em ambas, porém em diferentes quantidades. Não necessariamente no produto comercial existe a adição de um óleo mineral, porém essa consistência e a formação do halo, mostra indícios de que foi utilizado, diferentemente do protótipo.

Figura 9 - Comparação entre as consistências dos produtos (Padrão comercial X LABIM-B3F008)



Legenda: A) 500 μ l do Produto Padrão Comercial e B) 500 μ l do protótipo LABIM-B3F008.

Figura 10 - Comparação em relação a sedimentação entre Padrão comercial x protótipo LABIM-B3F008



Legenda: A) e C) Produto Padrão Comercial diluído em água deionizada, 1ml de produto para 200 ml de água; B) e D) Protótipo de suspensão concentrada LABIM dissolvido em água deionizada nas mesmas concentrações que o produto comercial. Fonte: Beatriz Milani Dos Santos.

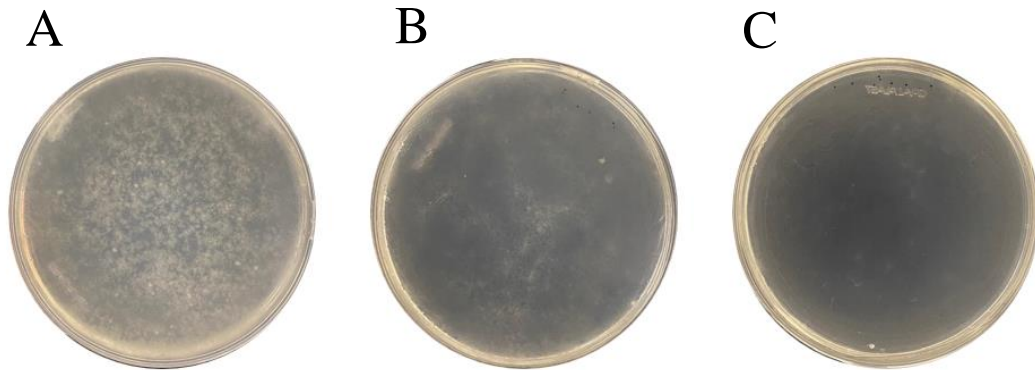
O protótipo formulado de B3F008 foi comparado com um produto de padrão comercial, esse produto foi escolhido pois é utilizado no tratamento da cultura do feijão infectada com *Fusarium solani*, apesar de termos testado na soja, escolhemos um produto que tem eficácia contra este fungo fitopatogênico e aplicamos a calda de acordo com as descrições da embalagem. Através das imagens podemos notar três diferenças nítidas em relação ao protótipo, a primeira é a coloração que não é um fator significativo, pois mostra o padrão de coloração das linhagens de *Trichoderma* que são diferentes, porém, a segunda é a composição do produto comercial que leva alguma substância oleosa, a qual não utilizamos no nosso formulado e a terceira é a diferença na sedimentação dos sólidos com o passar do tempo, o nosso formulado apresenta um sedimento branco que acreditamos ser resíduos de arroz advindos da extração manual, os verdes são os propágulos do fungo B3F008. Outra diferença entre os produtos (não visível nas imagens) é a dispersão em água, acreditamos que por conta da consistência oleosa do produto comercial, ele não dispersa com rapidez e homogeneidade, além de que, foi observado que ele necessita de maior agitação e com o passar do tempo foi formada duas fases na solução, diferentemente do protótipo LABIM-B3F008.

4.3.2 Validação do Protótipo

Após 32 horas de crescimento, não foi possível contar a diluição de 10^{-5} , porém, obtivemos uma média de 120 colônias por placa na diluição 10^{-6} , totalizando $1,2 \times 10^9$ de propágulos/ml e 22 colônias por placa na diluição 10^{-7} , totalizando $2,2 \times 10^9$ de

propágulos/ml. O objetivo desse teste é avaliar a viabilidade dos propágulos em UFC/ml no produto.

Figura 11 - Validação do protótipo com 32h de crescimento das hifas



Legenda: A validação do produto foi feita através da micro-diluição seriada do protótipo B3F008, para avaliar a viabilidade dos propágulos de B3F008 dentro do produto. A) Plaqueamento de 100 μ l da diluição 10^{-5} ; B) Plaqueamento de 100 μ l da diluição 10^{-6} ; C) Plaqueamento de 100 μ l da diluição 10^{-7} .

Através das imagens percebemos que a formulação não inibiu ou matou os propágulos do fungo B3F008, o que permitiu o crescimento e manutenção da UFC/ml com o passar do tempo. Com esses dados ainda será feito um *Shelf life* para verificarmos o período que esse protótipo pode ser armazenado, sem diminuir a UFC/ml ou resultados do produto.

5. CONCLUSÕES

Mediante a este estudo ressaltamos a importância de se buscar alternativas mais sustentáveis para o controle de fitopatógenos na agricultura, especialmente em um cenário de alta dependência de agroquímicos. Várias pesquisas evidenciam que o uso de fungos do gênero *Trichoderma* como base de bioprodutos, representa uma estratégia eficaz para o manejo de diversos microrganismos patogênicos, em especial o *Fusarium solani*, fitopatógeno utilizado nesta pesquisa

onde a linhagem B3F008 inibiu o crescimento em cerca de 91%. Em relação ao protótipo de produto LABIM-B3F008 os resultados prévios de formulação são promissores, cabe agora um teste de tratamento de sementes para observamos a eficácia do produto.

Embora o modelo estatístico aplicado tenha explicado 52,23% da variabilidade dos dados, aumentando a influência de fatores adicionais no processo, os resultados obtidos validam o potencial do biofungicida e sugerem que ajustes futuros como otimizar a extração desses propágulos e ajustar a posição dos sacos de arroz em relação a luminosidade da câmara de germinação, para aprimorar ainda mais a produção desses propágulos viáveis. Essa abordagem inovadora não só contribui para a redução do uso de agrotóxicos, com seus impactos negativos à saúde humana e ambiental, mas também reforça a previsão econômica e a eficácia do controle biológico, promovendo uma agricultura mais sustentável e menos nociva. Portanto, o presente trabalho abre caminho para estudos futuros que possam consolidar e ampliar o uso de biofungicidas, contribuindo para a modernização e a sustentabilidade da agricultura brasileira e mundial.

REFERÊNCIAS

ABBAS, Aqleem et al. *Trichoderma* spp. genes involved in the biocontrol activity against *Rhizoctonia solani*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 884469, 2022.

ALMEIDA, Álvaro Manuel Rodrigues; SEIXAS, Claudine Dinali Santos; FARIAS, José Renato Bouças; OLIVEIRA, Maria Cristina Neves de; FRANCHINI, Júlio Cezar; DEBIASI, Henrique; COSTA, Joaquim Mariano da; GAUDÊNCIO, Celso de Almeida. EMBRAPA, 2014. **Doenças fúngicas do solo**.

Disponível em:

<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/989352/1/Documento.346OL.pdf>.

BAPTISTA, P. et al. A importância das interações entre fungos do solo em agroecologia. 2011. Disponível em:

https://repositorium.uminho.pt/bitstream/1822/15835/3/001_Actas%20Workshop%20-%20Agroecologia.pdf

BRIOSO, P. S. T. Fitopatologia. Créditos. Criada em 2005.

Disponível em: <http://www.fito2009.com/fitop/fitopcreditos.htm>.

CEPEA - ESALQ, USP. **PIB do agronegócio brasileiro**. Disponível em: <https://w.cepea.esalq.usp.br/br/pi-do-agronegocio-brasileiro.aspx>. Acesso em: 14/12/2024.

CHAGAS, Lillian França Borges et al. Trichoderma na promoção do crescimento vegetal. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 4, n. 3, p. 97-102, 2017

CONAB. **Último levantamento da safra 2023/2024 estima produção de grãos em 298,41 milhões de toneladas**. Publicado em: 12 set. 2024. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/5728-ultimo-levantamento-da-safra-2023-2024-estima-producao-de-graos-em-298-41-milhoes-de-toneladas#:~:text=e%20Promo%C3%A7%C3%A3o%20Institucional,%C3%9Altimo%20levantamento%20da%20safra%202023%2F2024%20estima%20produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20gr%C3%A3os,298%2C41%20milh%C3%B5es%20de%20toneladas&text=A%20produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20gr%C3%A3os%20na,volume%20obtido%20no%20ciclo%20anterior>. Acesso em: 11/02/2025.

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. Órgão: Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Diretoria Colegiada. *RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 428, DE 7 DE OUTUBRO DE 2020*. Disponível em: <https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/202010/08094708-rdc-n-428-07-de-outubro-de-2020-uso-de-paraquate-pelo-agricultor.pdf>.

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. Órgão: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária/Departamento de Sanidade Vegetal e Insumos Agrícolas/Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins, Edição: 18, Seção: 1, Página: 4, 17/09/2019. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/ato-n-62-de-13-de-setembro-de-2019-216556339>

DINESH Prasad, NARESH Kumar Mani, DEV MANI Pandey, CRISPR/Cas technology: Opportunities for phytopathogenic viruses detection, Journal of Biotechnology, Volume 360, 2022, Pages 211-217, ISSN 0168-1656, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.11.010>.

FÁBIO, André Cabette; FREITAS, Hélen. *Brasil é o 2º Maior Comprador De Agrotóxicos Proibidos Na Europa, Que Importa Alimentos Produzidos Com Estes Químicos*. Agência Pública, 10 de setembro de 2020. Disponível em: <https://apublica.org/2020/09/brasil-e-2o-maior-comprador-de-agrotoxicos-proibidos-na-europa-que-importa-alimentos-produzidos-com-estes-quimicos/>

FAO. The State of Agricultural Commodity Markets 2018. Agricultural trade, climate change and food security. Rome, 2018.4

FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. *Controle Biológico de Pragas na Agricultura*. 2020.

GOULART, Augusto César Pereira. **Fungos em sementes de soja: detecção, importância e controle**. 2. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa, 2018).

HARMAN, G., HOWELL, C., VITERBO, A. *et al.* *Espécies de Trichoderma* — simbiontes vegetais oportunistas e avirulentos. *Nat Rev Microbiol* **2** , 43–56 (2004). <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>.

KUMAR, S., STECHER, G., e TAMURA, K. (2015). MEGA7: Análise genética evolutiva molecular versão 7 para conjuntos de dados maiores. *Mol. Biol. Evol.* **33**, 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054 . Acesso em: 04/01/2025.

LOBO, Murilo Junior. *Doenças fúngicas do solo*. Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias, Parque Estação Biológica - PqEB, s/nº, Brasília, DF, 07/10/2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/feijao/producao/doencas/doencas-fungicas/doencas-fungicas-do-solo>. Acesso em: 04/01/2025.

LOPES, R.B. (2009) - A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microrganismos no Brasil. In: Bettiol, W. e Morandi, M.A.B. (Ed.) - Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, p. 15–28.

MACHADO, Daniele Franco Martins et al. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias** , v. 1, pág. 274-288, 2012.

MANGANIELLO, G., SACCO, A., ERCOLANO, MR, Vinale, F., LANZUISE, S., PASCALE, A., et al. (2018). Modulação da resposta do tomateiro à *Rhizoctonia solani* por *Trichoderma harzianum* e seu metabólito secundário ácido harziânico. *Frente. Microbiol.* **9**:1966. doi: 10.3389/fmicb.2018.01966

MARUYAMA, CR, BILESKY-JOSÉ, N., de Lima, R., E FRACETO, LF (2020). Encapsulamento de *Trichoderma harzianum* preserva atividade enzimática e aumenta o potencial para controle biológico. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8:225. doi: 10.3389/fbioe.2020.00225

MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. *Trichoderma: uso na agricultura*. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2020. Disponível em: file:///C:/Users/beatr/Downloads/livro-trichoderma-online-06.01.20.pdf

MOHAMED, Hassan Abdel-Latif A.; HAGGAG, Wafaa Mohamed. *Potencial de biocontrole de mutantes tolerantes à salinidade de Trichoderma harzianum contra Fusarium oxysporum*. Revista Brasileira de Microbiologia, v. 37, p. 181-191, 2006.

MONTE, E.; BETTIOL, W.; HERMOSA, R. Trichoderma e seus mecanismos de ação para o controle de doenças de plantas. Embrapa Meio Ambiente, 2019.

NEGA, Alemu. *Revisão sobre conceitos em controle biológico de patógenos de plantas*. Journal of Biology, Agriculture and Healthcare, v. 4, n. 27, p. 33-54, 2014.

NOGUEIRA, Fernanda de Albuquerque Melo; SZWARCOWALD, Celia Landmann; DAMACENA, Gisele Nogueira. *Exposição a agrotóxicos e agravos à saúde em trabalhadores agrícolas: o que revela a literatura?*. Revista Brasileira de Saúde Ocupacional, v. 45, p. e36, 2020.

PAL, Kamal Krishna et al. *Biological control of plant pathogens*. The plant health instructor, v. 2, n. 5, p. 1117-1142, 2006.

PAZ, Juliana Vieira; REZENDE, Vanessa Theodoro; GAMEIRO, Augusto; e outros. *Agrotóxicos no Brasil: entre a produção e a segurança alimentar*. USP, Laboratório de Análise Socioeconômica e Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 13/12/2023. Disponível em: <https://jornal.usp.br/artigos/agrotoxicos-no-brasil-entre-a-producao-e-a-seguranca-alimentar/#:~:text=Em%202021%2C%20o%20consumo%20atingiu,mais%20do%20que%20em%202003>. Acesso em: 20/11/2024

PIGNATI, Wanderlei Antonio et al. *Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde*. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 22, p. 3281-3293, 2017.

REIS JUNIOR, Fabio Bueno dos; NOGUEIRA, Marco Antonio.

Insumos biológicos. Brasília, DF: Embrapa, 2021. Disponível em: <file:///C:/Users/beatr/Downloads/Portfolio-Insumos-biologicos.pdf> Acesso em: 22/02/2025.

RISSI, Yuri Rafael. **PET Agronomia na Universidade Federal de Santa Maria — UFSM: Fusarium solani na cultura da soja**. 10 de maio de 2022. Acesso em: <https://www.ufsm.br/pet/agronomia/2022/05/10/fusarium-solani-na-cultura-da-soja>

SANTOS NETO, Alvaro dos. *Competição por recursos pelo parasita fúngico Escovopsis*. 2018.

SILVA, M.M.; DOMINGUES, S.; BONADIMAN, A. Avaliação de Intoxicação por agrotóxicos e práticas de uso de trabalhadores rurais na Serra Catarinense. *Revista Brasileira de Desenvolvimento*, v.5, n.9, p.15190-15204. 2019.

SPELTRI, Natália Ferraz Bertachini. Revelando o potencial de biocontrole de fitopatógenos da soja (*Glycine max. L*) por seus endofíticos. 2021.

TIAN, Y., TAN, Y., YAN, Z., LIAO, Y., CHEN, J., De BOEVRE, M., et al. (2018). Potenciais antagonistas e de desintoxicação de isolados de *Trichoderma* para controle de *Fusarium graminearum* produtor de zearalenona (ZEN) . *Frente. Microbiol.* 8:2710. doi: 10.3389/fmicb.2017.02710

VERMA, Mausam et al. Fungos antagonistas, *Trichoderma* spp.: panóplia de controle biológico. **Biochemical Engineering Journal** , v. 37, n. 1, p. 1-20, 2007.

WICKLOW, D. T. Interference Competition. In: CARROLL, G. C.; WICKLOW, D. T. *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem*. 2. ed. Nova Iorque: Marcel Dekker, 2005. p. 265-274.

YAHYAZADEH, M. et al. Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, n. 8, p. 1445-1450, 2008.

YAO, Xin et al. *Trichoderma* e seu papel no controle biológico de doenças fúngicas e nematoides de plantas. **Frontiers in microbiology** , v. 14, p. 1160551, 2023.