



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

LUCAS MOREIRA DOS SANTOS

**OTIMIZAÇÃO DE MEIOS DE CULTIVO DE *Bacillus
velezensis* CMRP6330 (LABIM 41) PARA CONTROLE DE
Sclerotinia sclerotiorum e *Colletotrichum truncatum***

Londrina – Paraná
2025

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

LUCAS MOREIRA DOS SANTOS

**OTIMIZAÇÃO DE MEIOS DE CULTIVO DE *Bacillus*
velezensis CMRP6330 (LABIM 41) PARA CONTROLE DE
Sclerotinia sclerotiorum e *Colletotrichum truncatum***

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: Daniel Vieira da Silva

**Londrina – Paraná
2025**

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

S237o Santos, Lucas.
OTIMIZAÇÃO DE MEIOS DE CULTIVO DE *Bacillus velezensis* CMRP6330 (LABIM 41) PARA CONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* e *Colletotrichum truncatum* / Lucas Santos. - Londrina, 2025.
74 f.: il.

Orientador: Admilton Gonçalves de Oliveira Junior.

Coorientador: Daniel Vieira da Silva.

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. Bacillus - TCC. 2. Fermentação - TCC. 3. PCCR - TCC. 4. Meio de Cultura - TCC. I. Gonçalves de Oliveira Junior, Admilton. II. Vieira da Silva, Daniel. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU 579

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior

Prof. Dr. João Paulo de Oliveira

Profa. Dra. Nicole Caldas Pan

Prof. Dr. Gerson Nakazato

Londrina, 01 de abril de 2025

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente aos meus pais Ronaldo, Giane e irmão Alexandre, por todo o suporte e incentivo que me fizeram chegar até onde estou. Se sou a pessoa que me tornei, é totalmente por conta deles.

Aos meus amigos, e ao mesmo tempo colegas de trabalho, do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LABIM), que me ajudaram e me incentivaram nos dias mais difíceis do meu desenvolvimento científico, Angelo, Beatriz, Paula, Eduardo, Fauzze, Guilherme, Malu, Daniel, Sandi, Roberto, João Paulo, Helena, Gabriel, Nathan e Júlia.

À minha namorada Isabela por estar ao meu lado o tempo todo, dando suporte e apoio, mesmo com os períodos de “sumiço” por estar ocupado escrevendo este trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Admilton por ter auxiliado na construção do meu caminho para a pesquisa científica, me recepcionando no laboratório e dando todo suporte e apoio necessário.

Aos meus amigos de Ensino Médio Madu, Alexandre, João, Vinícius e Takata, aos meus amigos de graduação Rian, Alice, Manu, Nadrienn, Pole, Leo Facco e psicóloga Geovana por terem me dado todo o apoio e suporte nos momentos mais difíceis, não só no período de escrita do trabalho, mas também na vida.

*“Be curious, not judgmental”
- Ted Lasso*

SANTOS, L.M. **Otimização de meios de cultivo de *Bacillus velezensis* CMRP6030 (LABIM 41) para controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Colletotrichum truncatum***. 2025. 74 fls. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2025.

RESUMO

O estudo investigou o potencial da linhagem *Bacillus velezensis* CMRP6330 (LABIM 41) como agente de biocontrole contra fungos fitopatogênicos, como *Sclerotinia sclerotiorum* e *Colletotrichum truncatum* através da otimização do meio de cultura. Para a otimização dos processos fermentativos utilizaram-se métodos de otimização dos meios de cultivo através da matriz experimental de Plackett-Burman, onde foi testado diferentes fontes de carbono e nitrogênio, e Planejamento de Composto Central Rotacional (PCCR) para a formulação do meio de cultivo. Assim avaliadas nos planejamentos estatísticos o raio de inibição do crescimento micelial dos fungos, biomassa via absorbância (600nm) e densidade celular de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). O meio de cultura CM2 utilizado como controle apresenta em sua composição glicose e triptona, ao qual demonstrou eficácia na produção de metabólitos antifúngicos, com inibição significativa do crescimento dos fungos. No entanto, o meio de cultura por meio do PCCR resultou em formulações com maior produção de biomassa, mas com menor eficácia na produção de metabólitos antifúngicos em comparação ao CM2. A validação em biorreator de bancada confirmou a viabilidade do processo fermentativo, com esporulação observada após 60 horas de fermentação, indicando a potencial aplicação de *B. velezensis* na formulação de bioinsumos. Concluiu-se que a concentração e proporção de nutrientes foram críticas para a produção de metabólitos antifúngicos e biomassa bacteriana. O estudo destaca o potencial de *B. velezensis* como agente de biocontrole e a importância da otimização de processos fermentativos para a produção sustentável de bioinsumos, contribuindo para a redução do uso de produtos químicos na agricultura.

Palavras-chave: Metabólitos. Fermentação. Antibiose. Bioprocessos. PCCR.

Plackett-Burman.

SANTOS, L.M. **Optimization of culture media for *Bacillus velezensis* CMRP6030 (LABIM 41) for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Colletotrichum truncatum***. 2024. 4 pgs. Final Dissertation (Biological Sciences Undergraduation) – Londrina State University. Londrina. 2024.

ABSTRACT

The study investigated the potential of the *Bacillus velezensis* CMRP6330 (LABIM 41) strain as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi, such as *Sclerotinia sclerotiorum* and *Colletotrichum truncatum*, through culture medium optimization. For the optimization of fermentation processes, culture media optimization methods were applied using the Plackett-Burman experimental matrix, in which different carbon and nitrogen sources were tested, and the Central Composite Rotational Design (CCRD) for culture medium formulation. In the statistical designs, the inhibition radius of fungal mycelial growth, biomass via absorbance (600 nm), and cell density in colony-forming units per milliliter (CFU/mL) were evaluated. The CM2 culture medium, used as a control, contains glucose and tryptone in its composition and demonstrated effectiveness in producing antifungal metabolites, significantly inhibiting fungal growth. However, the culture medium formulated through CCRD resulted in higher biomass production but lower effectiveness in antifungal metabolite production compared to CM2. Validation in a bench-scale bioreactor confirmed the feasibility of the fermentation process, with sporulation observed after 60 hours of fermentation, indicating the potential application of *B. velezensis* in bio-input formulation. It was concluded that the concentration and proportion of nutrients were critical factors for the production of antifungal metabolites and bacterial biomass. The study highlights the potential of *B. velezensis* as a biocontrol agent and the importance of optimizing fermentation processes for the sustainable production of bio-inputs, contributing to the reduction of chemical product use in agriculture.

Keywords: Metabolites. Fermentation. Antibiosis. Bioprocesses. CCRD. Plackett-Burman

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida do fungo <i>S. sclerotiorum</i>	19
Figura 2 – Semente de soja com acérvulos de <i>C. truncatum</i>	20
Figura 3 – Ciclo de vida generalizado de <i>Colletotrichum</i> sp.	21
Figura 4 - Zonas de inibição formados pelo fermentado utilizando o meio de cultura CM2 (BAPTISTA, 2022) em contato com fungos fitopatogênicos	37
Figura 5 - Resultado do teste de difusão em ágar das formulações na etapa de screening.....	40
Figura 6 - Gráfico de Pareto representativo do nível de significância ($\alpha=10\%$) das variáveis em função da resposta de produção de metabólitos antifúngicos.....	41
Figura 7 - Gráfico de Pareto representativo do nível de significância ($\alpha=10\%$) das variáveis em função da resposta de biomassa em UFC/mL	42
Figura 8 - Gráfico de Pareto representativo do nível de significância ($\alpha=10\%$) das variáveis em função da resposta de biomassa por absorbância (600nm).....	42
Figura 9 - Resultado do teste de difusão em ágar das formulações geradas pela matriz da PCCR, ao qual a placa de letra “C” representa a placa controle, e as demais respectivas formulações	45
Figura 10 – Gráfico de Pareto da análise estatística do diâmetro do halo de inibição de crescimento micelial do fungo fitopatogênico alvo do PCCR	46
Figura 11 – Correlação entre valores preditos e experimentais da análise estatística de diâmetro do halo de inibição de crescimento micelial do fungo fitopatogênico alvo do PCCR	47
Figura 12 – Superfícies de resposta e Curva de Contorno da interação entre as fontes de nutrientes Colágeno hidrolisado de galinha e Glicose da análise estatística de tamanho máximo do raio do halo de inibição micelial contra <i>S. sclerotiorum</i> do PCCR	48
Figura 13 – Gráfico de Pareto da análise estatística da contagem de UFC/mL do PCCR	49
Figura 14 – Correlação entre valores preditos e experimentais da análise estatística da contagem de UFC/mL do PCCR	51
Figura 15 – Superfícies de resposta e Curva de Contorno da interação entre as fontes de nutrientes Peptona e Glicose (A), Colágeno hidrolisado de galinha e	

Glicose (B), Peptona e Colágeno hidrolisado de galinha (C) da análise estatística de contagem máxima de UFC/mL do PCCR.....	52
Figura 16 - Gráfico de Pareto da análise estatística da contagem de UFC/mL do PCCR	53
Figura 17 – Correlação entre valores preditos e experimentais da análise estatística da biomassa via absorvância do PCCR.....	54
Figura 18 – Superfícies de resposta e Curva de Contorno da interação entre as fontes de nutrientes Peptona e Glicose (A), Colágeno hidrolisado de galinha e Glicose (B), Peptona e Colágeno hidrolisado de galinha (C) da análise estatística de biomassa máxima por absorvância (600nm) do PCCR	55
Figura 19 – Resultado do teste de difusão em ágar contra <i>C. truncatum</i> , com as formulações premeditadas na PCCR como ótimo em atividade antifúngica (A) e densidade de UFC/mL (B), seguido dos controles (C) e meios de cultura CM2	58
Figura 20 – Resultado do teste de difusão em ágar contra <i>S. sclerotiorum</i> , com as formulações premeditadas na PCCR como ótimo em atividade antifúngica (A) e densidade de UFC/mL (B), seguido dos controles (C) e meio de cultura controle CM2	60
Figura 21 – Microscopia de contraste de fase do fermentado em seus respectivos pontos de coleta em objetiva de 100x.....	63
Figura 22 – Testes de difusão em ágar e observação da inibição do crescimento micelial contra <i>S. sclerotiorum</i> com as amostras dos respectivos pontos de coleta .	65
Figura 23 – Testes de difusão em ágar e observação da inibição do crescimento micelial contra <i>C. truncatum</i> com as amostras dos respectivos pontos de coleta.....	67
Figura 24 – Gráfico da curva de crescimento da biomassa microbiana por densidade óptica (D.O) e tamanho do raio de inibição micelial contra o fungo <i>C. truncatum</i> (CT) em função dos tempos de coleta estabelecidos.....	68
Figura 25 – Gráfico da curva de crescimento da biomassa microbiana por densidade óptica (D.O) e tamanho do raio de inibição micelial contra o fungo <i>S. sclerotiorum</i> (SS) em função dos tempos de coleta estabelecidos.....	69

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 1 – Valores dos insumos utilizados para a matriz de Plackett-Burman e suas respectivas proporções (g/L)	31
Tabela 2 - Matriz experimental de Plackett-Burman e suas respectivas proporções de insumos considerados fontes de carbono e nitrogênio de cada amostra estabelecida e o total destes insumos utilizados (sem incluir os sais utilizados)	32
Tabela 3 - Valores dos insumos utilizados para a matriz de Planejamento Composto Central Rotacional e suas respectivas proporções (g/L)	33
Tabela 4 - Total de amostras do Planejamento Composto Central Rotacional, suas respectivas proporções e total de insumo utilizado para cada formulação	34
Tabela 5 - Composição do meio de cultura para produção de metabólitos antifúngicos	35
Tabela 6 - Composição do meio de cultura para otimização na concentração de UFC/mL	35
Tabela 7 - Biomassa e atividade fungicida do sobrenadante de LABIM 41 a partir das formulações sugeridas pelo método de Plackett-Burman	39
Tabela 4 - Total de amostras do Planejamento Composto Central Rotacional, suas respectivas proporções e total de insumo utilizado para cada formulação	43
Tabela 8 - Resultados do Planejamento Composto Central Rotacional com as 19 formulações geradas a partir das variáveis selecionadas na etapa de screening	44
Tabela 9 – Análise de variância (ANOVA) da regressão para o diâmetro do halo de inibição de crescimento micelial do fungo fitopatogênico alvo do PCCR	48
Tabela 10 – Análise de variância (ANOVA) da regressão para a concentração de UFC/mL do PCCR	51
Tabela 11 – Análise de variância (ANOVA) da regressão para a concentração de UFC/mL do PCCR	55
Tabela 12 – Formulações previstas como ótimas pelo aplicativo de análise estatística, seguida dos insumos necessários em g/L e o total de ingredientes utilizados	57
Tabela 13 – Teste de t-Student para avaliar diferença significativa entre o meio de cultura controle CM2 e formulação para otimização de metabólitos antifúngicos e concentração de UFC/mL	60

- Tabela 14** – Densidade óptica (600nm) do meio de cultura utilizado (ML) e das alíquotas de fermentado, medidas em triplicata (L) para cada tempo de coleta (T), seguido das suas respectivas médias e leitura real (X_{DO}) 62
- Tabela 15** – UFC/mL no fermentado coletado para cada tempo de coleta, seu desvio padrão (Desv. Pad) e validação para formação de endósporos para o tempo T48, 60 e 72 acompanhado de seus respectivos valores de desvio padrão 63
- Tabela 16** – Valores dos raios de inibição do crescimento micelial no sentido horizontal (H) e vertical (V) em relação ao poço tratamento contra *S. sclerotiorum* 66
- Tabela 17** – Valores do raio de inibição do crescimento micelial com o tratamento contra *C. truncatum* 66
- Tabela 18** – Valores obtidos no teste estatístico de comparações múltiplas (Tukey, R Project) entre os valores obtidos de D.O dos respectivos tempos utilizados 70

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Produção agrícola no Brasil	17
2.2 Fungos fitopatogênicos	17
2.2.1 Fungo fitopatogênico <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	18
2.2.2 Fungo fitopatogênico <i>Colletotrichum truncatum</i>	20
2.3 Métodos de controle biológico.....	21
2.4 Bioinsumos para controle de fungos	23
2.5 <i>Bacillus spp.</i> em controle biológico	23
2.5.1 Mecanismos de controle biológico de <i>Bacillus spp.</i>	24
2.6 Metodologias de Delineamento de Experimentos (DOE)	25
2.6.1 Planejamento de Composto Central Rotacional (PCCR)	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 Microrganismos	28
3.2 Fermentação Líquida para produção de antifúngicos e validação	28
3.2.1 Preparação para fermentação do meio CM2.....	28
3.2.2 Metodologia de avaliação de inibição do crescimento micelial e biomassa	29
3.3 <i>Screening</i> de fontes de nutrientes.....	30
3.4 Definição dos meios de cultura	33
3.5 Validação da formulação	35
3.5.1 Validação da formulação em shaker	35
3.5.2 Validação da formulação para otimização de moléculas antifúngicas em biorreator de bancada	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1 Fermentação líquida com meio CM2 (BAPTISTA, 2022)	37

4.2 <i>Screening</i> de fonte de nutrientes.....	38
4.3 PCCR entre as variáveis significativas selecionadas no <i>screening</i> de nutrientes 43	
4.3.1 Modelos de predição, análises estatísticas e superfícies de respostas do PCCR: Atividade antifúngica	45
4.3.2 Modelos de predição, análises estatísticas e superfícies de respostas do PCCR: Concentração de UFC/mL.....	49
4.3.3 Modelos de predição, análises estatísticas e superfícies de respostas do PCCR: Biomassa por absorvância (600nm).....	53
4.5 Validação das formulações previstas como ótimas	56
4.5.1 Validação das formulações em shaker.....	57
4.5.2 Validação da formulação para otimização de moléculas antifúngicas em biorreator de bancada	61
5. CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS.....	71

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país com condições climáticas favoráveis de desenvolvimento agrícola, apresentando disponibilidade de fontes de água, abundância da biodiversidade e distribuição de nutrientes no solo. O mesmo foi o quarto maior produtor agrícola no mundo em 2020, seguido da China, Estados Unidos e Índia (EMBRAPA), assim sendo um país mundialmente relevante em questões de produção e exportação de produtos agrícolas, tais como a soja, café e cana-de-açúcar. Entretanto, constantemente enfrenta-se desafios de origens bióticas e abióticas associados ao aumento da demanda da produção destes insumos que anualmente causam prejuízos de forma que a redução acumulada na produção de soja devido a esses estresses foi de aproximadamente 14,8 milhões de toneladas, resultando em uma perda econômica total de R\$ 19,3 bilhões (HIRAKURI, 2021). Isso equivale a uma média anual de R\$ 3,86 bilhões. Dentre os fatores bióticos estão a constante exposição das plantas na agricultura à fitopatógenos, que causam danos às culturas, influenciando direta e indiretamente na rentabilidade e produção do empreendimento agrícola (MICHEREFF, 2001), microrganismos estes que eventualmente podem ocasionar em suas plantas hospedeiras sintomas como podridões de sementes e raízes, tombamento de mudas, podridões de colo, tubérculo e rizoma e podridões moles em frutos. Os sintomas não são a doença em si, mas são provocados por ela, assim indicando sua existência e ajudam no seu diagnóstico (CHAVES; ZAMBOLIM, 1985).

O controle destes microrganismos fitopatogênicos muitas vezes é feito por meio do uso de produtos químico sintéticos, que podem trazer uma série de consequências, como não só danos ao próprio meio ambiente onde encontra-se a plantação, mas também trazem riscos à saúde humana e à biodiversidade alheia. Na busca por opções mais sustentáveis os produtos de origem biológica despertam interesse no setor, para uso no manejo integrado de pragas e doenças, atendendo uma gama de demandas sociais, ambientais e econômicas (KLEIN; LUNA, 2020; STABILE et al., 2020), produtos estes chamados de bioinsumos, cujas tecnologias baseiam-se na interação dos microrganismos agentes de biocontrole com a planta e com o patógeno. As bactérias do gênero *Bacillus* destacam-se entre os microrganismos para a utilização como princípio ativo em produtos biológicos, devido à viabilidade de cultivo com alta produtividade, como a sua aplicação direta tanto foliar

quanto a solo anexos às raízes de plantas, o que muitas vezes resulta em benefícios como produção de hormônios e antibióticos que auxiliam no controle biológico do vegetal (FIGUEIREDO et al., 2008). Hormônios estes que atuam de diversas formas, como as auxinas e citocininas, que possuem a capacidade de modular a arquitetura da planta de forma a influenciar a sua capacidade de suportar ataques de pragas sem comprometer seu crescimento (WANG, et al., 2017) Dentre as versatilidades trabalhadas em cima deste gênero bacteriano também existem a produção de metabólitos de interesse comercial, tal como lipopeptídeos, surfactinas, fengicinas e iturinas de natureza anfifílica, com atividade contra diferentes fungos fitopatogênicos (CAULIER et al., 2019).

O desenvolvimento de bioprocessos eficientes para a produção de insumos microbiológicos é um dos pilares da biotecnologia aplicada à agricultura sustentável. A otimização dos processos fermentativos é essencial para maximizar a produção de metabólitos secundários com atividade antifúngica e a biomassa microbiana, garantindo maior eficácia dos produtos formulados. A produção de metabólitos antifúngicos, como lipopeptídeos, sideróforos e enzimas hidrolíticas, está relacionada à ativação de vias metabólicas específicas, as quais podem ser induzidas por ajustes nutricionais e fisiológicos no meio de cultura (ZHANG et al., 2021). Além disso, a biomassa produzida deve apresentar alta viabilidade celular e estabilidade (como o processo de esporulação) para garantir eficiência após a aplicação no campo (SANTOS et al., 2022). Dito isso, a composição do meio deve ser ajustada para fornecer os precursores metabólicos necessários para a biossíntese dos antifúngicos e promover o crescimento adequado da biomassa microbiana (SILVA et al., 2021). Sendo assim sendo requerido a utilização de metodologias que visem otimizar a produção destes metabólitos de interesse econômico e humanitário para uma agricultura mais eficiente e ecológica.

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é um dos patógenos mais destrutivos na agricultura mundial, causando a doença conhecida como mofo branco em diversas culturas de importância econômica, como soja, feijão, girassol e canola. Esse fitopatógeno apresenta alta capacidade de sobrevivência no solo devido à produção de escleródios, estruturas de resistência que permanecem viáveis por vários anos, tornando seu controle um grande desafio agrônomo (BOLTON et al., 2006). Os sintomas típicos da infecção por *S. sclerotiorum* incluem lesões necróticas úmidas em folhas, hastes e vagens, seguidas pelo desenvolvimento de micélio branco

algodonoso e, em estágios avançados, a formação de escleródios no interior e na superfície dos tecidos afetados (WILLETTS; WONG, 1980). Além das perdas diretas na produtividade, a doença compromete a qualidade dos grãos e reduz o vigor das sementes, impactando significativamente a rentabilidade agrícola. O manejo integrado da doença envolve práticas como rotação de culturas, controle biológico com microrganismos antagonistas, uso de cultivares resistentes e aplicação de fungicidas em condições favoráveis ao desenvolvimento do patógeno (DEL RÍO et al., 2020).

O fungo *Colletotrichum truncatum* não só é responsável pela doença antracnose em mudas de soja quanto também pelo surgimento de doenças de finais de ciclos (DFCs) em colheitas de soja, sendo de interesse econômico e comercial o desenvolvimento de tecnologias capazes de suprimir ou atenuar as consequências fisiológicas das infecções destes microrganismos. O isolado *Bacillus velezensis* CMRP6330 (LABIM 41) está em processo de licenciamento e registro pela empresa Vitales, pertencente ao grupo UbyAgro. O isolamento do microrganismo foi realizado pelo Laboratório de Biotecnologia Microbiana da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e é originário da fazenda escola da mesma. Este isolado apresentou capacidade antagonista contra fungos fitopatogênicos *in vitro*, além de produzir moléculas com atividade antifúngica em fermentação líquida (FLS) (TEIXEIRA et al., 2024).

Com isso pode-se afirmar que o isolado *B. velezensis* CMRP6330 torna-se um possível candidato para a fabricação de novos produtos de origem biológica para o combate de infecções por *C. truncatum* e *S. sclerotiorum*. Sendo assim, necessária a aplicação de metodologias estatísticas e biotecnológicas para a formulação de um fermentado com altas concentrações de metabólitos para a supressão dos dois fungos citados anteriormente. Dessa forma um dos métodos de otimização de processos fermentativos é a metodologia de superfície de resposta (MSR) em Planejamento Composto Central Rotacional (PCCR), que oferece a realização de um número de experimentos viáveis, fornece dados robustos para inferir as condições ótimas de fermentação, além da economia de tempo e recursos (ZALILA-KOLSI et al., 2022).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO AGRÍCOLA NO BRASIL

O ramo agrícola no Brasil tem se mostrado uma linha comercial significativamente importante para a economia brasileira, onde estima-se que o PIB do agronegócio brasileiro foi de R\$ 2,45 trilhões em 2024, sendo R\$ 1,65 trilhão no ramo agrícola e R\$ 801 bilhões no ramo pecuário, tendo participação próxima de 21,5% do setor econômico brasileiro (CEPEA, 2024). O país apresenta enorme potencial agrônômico devida à vasta área disponível para o plantio, disponibilidade de recursos naturais, biodiversidade com potencial para prospecção, condições climáticas favoráveis, e potencial para desenvolvimento e aplicação de novos produtos (KLEIN; LUNA, 2020; STABILE et al., 2020). Além disso, as exportações agrícolas foram fundamentais para o superávit da balança comercial brasileira, com os produtos agropecuários respondendo por cerca de 50% das exportações totais do país, segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Dentro do cenário agrícola brasileiro, a soja se destaca como a principal cultura em termos de produção e exportação. Em 2023, o Brasil manteve-se como o maior produtor e exportador mundial de soja, com uma produção estimada em 154 milhões de toneladas, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). A soja é apenas um produto de extrema importância econômica, mas também possui um papel de extrema importância no papel na cadeia produtiva de alimentos, rações e biocombustíveis. A soja brasileira é exportada principalmente para países como China, Estados Unidos e outros países da União Europeia, consolidando-se como um dos pilares da economia agrícola do país.

A alta demanda no aumento na produção e produtividade das culturas agrícolas, as quais visam suprir o aumento populacional e aumentar os retornos econômicos, fazem com que novos métodos de otimização na produção sejam desenvolvidos. Neste cenário destaca-se o setor biotecnológico, ao qual exerce importante papel no fornecimento de novas soluções para o mercado (BATISTA; SINGH, 2021)

2.2 FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Os microrganismos que causam doenças em plantas são responsáveis por prejuízos significativos sobre as plantações de importância econômica nacional. Em culturas de soja, o patógeno responsável pela doença do mofo branco ou podridão branca da haste exibe registros de infecções em 27% do total da área de produção de soja no Brasil, com potencial a reduzir a produtividade de grãos em até 70% no ano de 2021 (MEYER, 2022). As associações entre os patógenos e pragas com as sementes é um fenômeno amplamente estudado e reconhecido em todo o mundo, ao qual tem sido responsável por uma série de consequências danosas, tais como a redução do poder germinativo de sementes, introdução de formas precoces e aleatórias de focos de infecção nas áreas de plantio, aumento de custos de combate e acúmulo de inóculos (MACHADO; POZZA, 2005).

Assim como no ambiente de plantio, o inóculo destes microrganismos podem ser disseminados no processo pós-colheita, isso ocorre através da contaminação de máquinas e equipamentos de beneficiamento de sementes, o que acarreta a disseminação dos patógenos a longas distâncias, deterioração de sementes durante o período de armazenamento, acarretando a perpetuação do inóculo em função do tempo (MACHADO; POZZA, 2005). Dentre os mecanismos de infecção destes organismos, destaca-se a secreção de enzimas que realizam a lise da parede celular das plantas ou acesso por estruturas específicas de infecção (MORALES-CEDEÑO et al., 2021).

2.2.1 FUNGO FITOPATOGÊNICO *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é um dos mais devastadores fitopatógenos de importância econômica global, sendo o agente etiológico da podridão branca em mais de 400 culturas (BOLTON et al., 2006). Sua ampla distribuição geográfica e sua versatilidade adaptativa derivam de sua capacidade de produzir escleródios, estruturas de resistência que permitem sua sobrevivência em condições adversas por mais de 10 anos (WILLETS; WONG, 1980). No contexto agrícola, sua erradicação é desafiadora devido à ampla gama de hospedeiros e às limitações de métodos convencionais de controle (PURDY, 1979). A sintomatologia da podridão branca varia conforme a espécie hospedeira, sendo caracterizada por lesões necróticas, murcha e a presença de micélio algodinoso sobre os tecidos afetados. A

2.2.2 FUNGO FITOPATOGÊNICO *COLLETOTRICHUM TRUNCATUM*

O fungo *C. truncatum* é um importante fitopatógeno pertencente ao complexo *Colletotrichum*, sendo o agente etiológico da antracnose em diversas culturas agrícolas, como soja, feijão e lentilha (PRASANNA et al., 2017). A antracnose causada por *C. truncatum* está amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais, onde as condições de alta umidade e temperatura favorecem sua disseminação (DANG et al., 2015). A infecção por *C. truncatum* inicia-se com a adesão do conídio à superfície da planta, seguido pela germinação e formação de apressórios, estruturas especializadas na penetração dos tecidos hospedeiros (PERES et al., 2005). O fungo utiliza um conjunto de enzimas degradativas, como cutinases, pectinases e celulases, que auxiliam na degradação da parede celular vegetal e promovem a colonização intercelular e necrosante (DIAZ et al., 2017). O ciclo de infecção envolve ainda um estágio hemibiotrófico, onde inicialmente o patógeno cresce de maneira assintomática nos tecidos hospedeiros, antes de ativar uma fase necrótica destrutiva (BARRETO et al., 2018). Os sintomas típicos da antracnose causada por *C. truncatum* incluem lesões necróticas deprimidas em folhas, hastes e vagens, muitas vezes com a presença de acérvulos, estruturas reprodutivas assexuadas contendo massas de conídios de coloração escura (DIAZ et al., 2017), como demonstra a **Figura 2**.

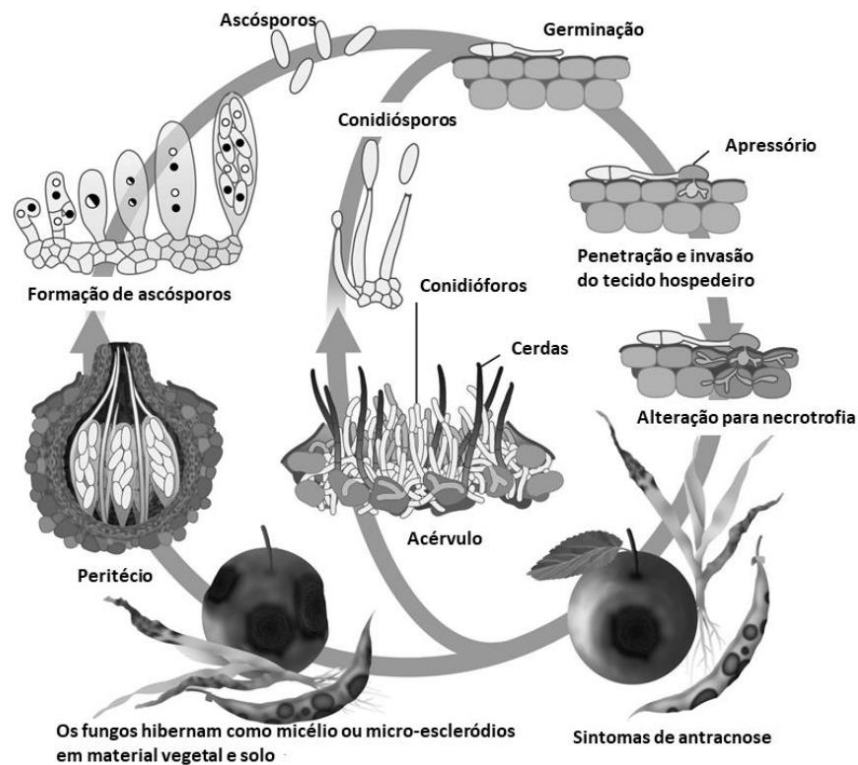
Figura 2 – Semente de soja com acérvulos de *C. truncatum*



Fonte: Elevagro (2014)

Normalmente a disseminação de *C. truncatum* é feita a partir de sementes, folhas infectadas ou pelos esporos, mas esse fungo também é capaz de formar microescleródios, similares aos encontrados em *Sclerotiniaceae*, que são estruturas de resistência, podendo ficar no solo por longos períodos de tempo até ter condições favoráveis para germinação (TIKAMI et al., 2021). O ciclo de vida generalizado das espécies de *Colletotrichum* é esquematizado na **Figura 3**.

Figura 3 – Ciclo de vida generalizado de *Colletotrichum* sp.



Fonte: Adaptado de SILVA (2017)

No Brasil, a antracose causada por *C. truncatum* representa um desafio crescente para a produção de leguminosas, especialmente soja e feijão, podendo resultar em perdas superiores a 40% da produção em condições favoráveis ao patógeno (PERES et al., 2005).

2.3 MÉTODOS DE CONTROLE BIOLÓGICO

As culturas agrícolas ao redor do globo estão constantemente submetidas a riscos de danos e possíveis perdas econômicas por conta da redução da produtividade causadas por doenças encontradas nestes ambientes de produção. A ocorrência de perdas se torna ainda mais frequente conforme o aumento da produção de alimentos em função do crescimento populacional a nível mundial, assim aumentando a demanda pelo desenvolvimento de produtos e soluções com eficiência no controle destas pragas e doenças as quais a complexidade do agroecossistema requer uma abordagem multidisciplinar dos problemas a serem resolvidos (BETTIOL, 1991). Por mais que seja um produto que garanta com eficácia a defesa e desenvolvimento das culturas de soja, o seu uso excessivo gera controvérsias quanto aos seus impactos, tanto do ponto de vista maléfico à saúde humana quanto aos danos ambientais e prejuízos à biodiversidade alheia. Estudos demonstram que pesticidas organoclorados, como DDT e HCH, são frequentemente encontrados no leite materno, evidenciando o alto potencial de bioacumulação desses compostos no organismo humano e sua transmissão para lactentes. A exposição a esses resíduos tem sido associada a diversas consequências adversas à saúde, incluindo mutações genéticas, desenvolvimento de câncer, alterações no sistema nervoso central e disfunções reprodutivas, como infertilidade e malformações fetais (SOUZA et al., 2015)

Devido a estes impactos na saúde humana causados pelo uso de defensivos agrícolas de origem química deve-se investir na utilização e desenvolvimento de métodos com menor número de efeitos colaterais possíveis. O manejo integrado de pragas (MIP) e o manejo integrado de doenças (MID), mais especificamente por métodos biológicos, conferem alternativas a este cenário em específico, ao qual tem potencial benéfico com sustentabilidade ecológica e econômica (ABBAS et al., 2022). Para que ambos os manejos tenham maior eficiência devem ser adotados procedimentos como uso de múltiplas técnicas de controle para o manejo simultâneo de diferentes pragas, monitoramento frequente do controle do patógeno, predadores e antagonistas e a busca por limitações de volumes de aplicação principalmente em relação ao uso de produtos químicos (STENBERG, 2017).

2.4 BIOINSUMOS PARA CONTROLE DE FUNGOS

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o termo bioinsumo classifica-se como “o produto, o processo ou a tecnologia de origem vegetal, animal ou microbiana, destinado ao uso na produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agropecuários, nos sistemas de produção aquáticos ou de florestas plantadas, que interfiram positivamente no crescimento, no desenvolvimento e no mecanismo de resposta de animais, de plantas, de microrganismos e de substâncias derivadas que interajam com os produtos e os processos físico-químicos e biológicos” (MAPA, 2021). A necessidade da integração de um método de proteção aos insumos da agricultura fez com que a busca pelo uso de bioinsumos crescesse ao decorrer dos anos, justificando o crescimento de 20% ao ano do mercado nacional de insumos biológicos no Brasil, movendo cerca de 3,6 bilhões de reais na safra de 2021/2022 e com previsão de chegar a 6 bilhões de reais até 2025 (SNA, 2022). Os produtos biológicos surgem como uma opção para uso na produção de alimentos no próprio MID, visando reduzir o impacto ambiental e a geração de resíduos por meio do uso de princípios ativos presentes na natureza (DEGUINE et al., 2021).

Na produção dos bioinsumos caracterizam-se na possibilidade da utilização de microrganismos como fungos, bactérias ou vírus, usados no manejo de insetos-praga ou de fitopatógenos. No caso de fungos e bactérias, podem ainda trazer benefícios para as plantas pelo estabelecimento de relações simbióticas, já os produtos à base de vírus têm sido destinados exclusivamente ao controle de insetos. Além de alguns fungos e bactérias poderem atuar também tanto no controle indireto de pragas pela ativação do sistema de defesa da planta, quanto também podem promover crescimento da parte aérea e radicular e disponibilizar nutrientes para a planta, como a solubilização de fósforo e a fixação de nitrogênio (MEYER et al., 2022).

2.5 *BACILLUS SPP.* EM CONTROLE BIOLÓGICO

O gênero *Bacillus* é classificado ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Bacillales e da família Bacillaceae. São bactérias que apresentam uma camada espessa de peptidoglicano em suas paredes celulares, sendo classificada Gram-

positiva, as mesmas apresentam formato de bastonete e são formadoras de endósporos, estruturas de resistência com capacidade de viabilidade longa, formadas quando em escassez de nutrientes, umidade, alterações na temperatura, pH e outras condições inóspitas do ambiente. Em condições favoráveis de crescimento, estes endósporos germinam, gerando novas células vegetativas (BUTALA; DRAGOS, 2022). Dentre as espécies mais conhecidas e empregadas na agricultura brasileira estão *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefasciens*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus methylotrophicus* e *Bacillus velezensis* (MAPA, 2022). Tornando o isolado *Bacillus velezensis* CMRP6330 (LABIM 41) um ótimo candidato para a formulação de produtos para controle biológico, assumindo que em testes prévios de cultura dupla, o mesmo já demonstrou a capacidade na produção de metabólitos de controle biológico contra fungos fitopatogênicos (TEIXEIRA et al., 2024). Ademais, dentre os integrantes do gênero *Bacillus*, a espécie *B. velezensis* é descrita como promotora de crescimento vegetal e com alta capacidade de supressão de diferentes fungos fitopatogênicos, bactérias e nematóides, com presença de cluster relacionados à biossíntese de metabólitos secundários de ação no crescimento e na indução de resistência sistêmica em plantas por síntese de VOCs (Compostos Orgânicos Voláteis), e no controle de fitopatógenos através da produção de lipopeptídeos cíclicos surfactina e fengicina, sideróforo bacilibactina, bacilomicina, e policetídeos bacteriocinas macrolactina, difficidina e bacilina (FAN et al., 2018; RABBEE et al., 2019).

2.5.1 MECANISMOS DE CONTROLE BIOLÓGICO DE *BACILLUS* SPP.

Uma das principais estratégias de *Bacillus* spp. para o controle de fitopatógenos é a produção de metabólitos antimicrobianos, incluindo antibióticos, lipopeptídeos e enzimas hidrolíticas (STEIN, 2005). Os lipopeptídeos, como surfactinas, iturinas e fengicinas, possuem atividade antifúngica significativa e mecanismos de ação antimicrobiana diversificados. As surfactinas são lipopeptídeos cíclicos caracterizados por sua forte atividade surfactante e propriedades antimicrobianas indiretas. Elas são compostas por um heptapeptídeo ligado a uma cadeia lipídica de β -hidroxiácidos, conferindo-lhes uma estrutura anfifílica que permite a interação com membranas biológicas (FÁBRI et al., 2021), e a capacidade de

perturbação da bicamada lipídica das células-alvo, reduzindo a tensão superficial e promovendo a lise celular. As iturinas possuem uma estrutura composta por um heptapeptídeo acilado por uma cadeia lipídica hidrofóbica, permitindo sua interação direta com membranas celulares fúngicas (DE BRUIN et al., 2021), promovendo a formação de poros e a perda de íons essenciais para a sobrevivência dos patógenos. As fengicinas possuem o mecanismo de ação associado à interação com esteróis da membrana plasmática de fungos, alterando sua permeabilidade e estrutura. Diferentemente das iturinas, que promovem a lise celular direta, as fengicinas atuam inibindo o crescimento fúngico por interferência na organização da membrana e na regulação de processos metabólicos essenciais (ZHANG et al., 2022). Essas características fazem com que os lipopeptídeos sejam de grande importância biotecnológica na agricultura, tanto que existem diversos estudos e patentes sobre essas moléculas (PENHA et al., 2020).

Além da ação direta sobre os patógenos, *Bacillus* spp. também induzem resistência sistêmica nas plantas, ativando mecanismos de defesa fisiológicos e bioquímicos (KLOEPPER et al., 2004). Esse processo envolve a ativação de vias de sinalização mediadas por ácido jasmônico e etileno, resultando no aumento da expressão de genes de defesa e na produção de compostos como fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (PR) (VAN LOON et al., 1998).

2.6 METODOLOGIAS DE DELINEAMENTO DE EXPERIMENTOS (DOE)

O processo de otimização e desenvolvimento de um produto biológico é fundamental para garantir a eficácia e segurança de novos tratamentos e tecnologias. Um método amplamente utilizado para essa finalidade é o *Design of Experiments* (DOE). DOE é uma abordagem estatística que permite planejar, conduzir e analisar experimentos de maneira eficiente, maximizando a quantidade de informação obtida a partir de um número limitado de ensaios experimentais (MONTGOMERY, 2017). Esse método é especialmente valioso na biotecnologia, onde os experimentos podem ser caros e demorados. Ao utilizar DOE, é possível identificar rapidamente as condições ótimas para o desenvolvimento de um produto biológico, reduzindo o tempo e os custos associados ao processo. O funcionamento do DOE envolve a manipulação sistemática de múltiplas variáveis de processo para

avaliar seus efeitos sobre a resposta de interesse. Isso é feito através de um planejamento experimental que define quais combinações de variáveis serão testadas. As análises resultantes ajudam a identificar interações entre variáveis e a determinar quais fatores têm maior impacto no desempenho do produto (SINGH et al., 2020).

Essa abordagem é essencial para a otimização de processos biológicos, pois permite explorar de forma abrangente o espaço experimental e identificar condições ideais que poderiam ser negligenciadas em experimentos não planejados. Existem diferentes abordagens dentro do DOE, sendo que duas técnicas populares são o *screening* e as matrizes do tipo Plackett-Burman. O *screening* é utilizado na fase inicial do desenvolvimento para identificar quais fatores são mais influentes. Esse método permite testar muitas variáveis com um número reduzido de experimentos, facilitando a identificação dos fatores críticos (MONTGOMERY, 2017). As matrizes de Plackett-Burman, por outro lado, são designs fracionários que permitem avaliar o efeito de muitas variáveis com um número mínimo de experimentos. Essas matrizes são particularmente úteis para estudos exploratórios onde o objetivo é identificar rapidamente os fatores mais importantes para um processo (SINGH et al., 2020). O uso do experimento de Plackett-Burman se torna tão eficaz de forma que com apenas 10% dos ensaios (PB 12 ou fatorial fracionado 2^{7-3}) de um fatorial completo 2^7 , com 128 ensaios, é possível a mesma informação estatística (RODRIGUES, 2014) Os benefícios do DOE na produção de novas tecnologias biológicas são significativos, ao qual a aplicação dessa metodologia pode levar a uma compreensão mais profunda dos processos biotecnológicos, resultando em produtos mais eficientes e seguros. Além disso, a capacidade de otimizar processos de forma rápida e eficaz contribui para a aceleração do desenvolvimento de novos produtos, proporcionando uma vantagem competitiva no mercado. Estudos recentes têm demonstrado a eficácia do DOE em várias áreas da biotecnologia, desde a produção de biofármacos até o desenvolvimento de bioprocessos sustentáveis (SINGH et al., 2020).

2.6.1 PLANEJAMENTO DE COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (PCCR)

O desenvolvimento de processos biotecnológicos eficientes requer uma abordagem estatística adequada para otimizar variáveis experimentais. O Planejamento de Composto Central Rotacional (PCCR) é uma metodologia amplamente empregada em estudos que envolvem fermentações e a produção de bioinsumos, permitindo a modelagem e otimização de variáveis de processo de maneira sistemática. O PCCR é um dos principais planejamentos utilizados em planejamento experimental para ajustar modelos matemáticos e prever respostas de sistemas complexos (MONTGOMERY, 2019). Esse planejamento permite gerar respostas por meio da superfície de resposta (MSR) e é amplamente utilizado para otimização de processos. O planejamento consiste em três componentes principais: pontos fatoriais, pontos axiais e pontos centrais. Os pontos fatoriais definem o espaço experimental básico, enquanto os pontos axiais permitem a exploração de curvatura na resposta do sistema. Os pontos centrais ajudam a estimar a reprodutibilidade do experimento e a validar o modelo matemático (BOX; WILSON, 1951).

Os bioinsumos microbiológicos são produtos biotecnológicos, que contêm microrganismos vivos ou seus metabólitos, utilizados para melhorar processos industriais, agrícolas ou ambientais. Esses insumos incluem biofertilizantes, biodefensivos, bioestimulantes e outros agentes biológicos aplicados para promover o crescimento de plantas, aumentar a produtividade agrícola, proteger contra pragas e doenças ou otimizar processos fermentativos. Um exemplo é a aplicação do PCCR para otimizar a produção de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp., organismos amplamente utilizados como agentes de controle biológico. Estudos demonstram que fatores como a composição do meio de cultura, a temperatura de incubação e a taxa de aeração podem ser ajustados para maximizar a viabilidade e eficácia desses bioinsumos (SILVA et al., 2022).

Estudos recentes demonstram a eficácia do PCCR na otimização da produção de lipopeptídeos com atividade antifúngica por *Bacillus velezensis*, ao qual utilizaram-se o PCCR para avaliar o efeito de variáveis como concentração de farelo de soja, açúcar cristal, pH e temperatura na produção de lipopeptídeos. Os resultados indicaram um aumento significativo na eficiência de produção, com ganhos de até 59 vezes para determinados isolados, evidenciando a importância do ajuste preciso das condições de cultivo para a maximização da produção de metabólitos de interesse (FÉLIX, 2023). Tornando assim o uso do método de planejamento experimental do PCCR uma ótima estratégia para a otimização de bioprocessos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMOS

O agente de biocontrole utilizado no desenvolvimento dos experimentos *in vitro* foi a linhagem *Bacillus velezensis* CMRP6330 (LABIM 41), previamente isolada a partir de amostra ambiental e bioprospecção de solo da Universidade Estadual de Londrina. A linhagem foi armazenada na coleção de microrganismos do Laboratório de Biotecnologia Microbiana da Universidade Estadual de Londrina (LABIM - UEL) e nas Coleções Microbiológicas da Rede Paranaense (CMRP), com o genoma disponível no Genbank sob número de acesso PRJNA866538.

Os fitopatógenos alvos utilizados nos experimentos *in vitro* foram *S. sclerotiorum*, utilizada nos experimentos como fungo marcador, e *C. truncatum*, cujas linhagens estão depositadas na coleção de microrganismos do Laboratório de Biotecnologia Microbiana da Universidade Estadual de Londrina (LABIM - UEL). Ambos os fungos foram utilizados no processo de validação das tecnologias desenvolvidas.

3.2 FERMENTAÇÃO LÍQUIDA PARA PRODUÇÃO DE ANTIFÚNGICOS E VALIDAÇÃO

3.2.1 PREPARAÇÃO PARA FERMENTAÇÃO DO MEIO CM2

Para a ativação da linhagem proveniente do banco de células, uma alíquota de 100 µL de um tubo criopreservado foi depositada ao meio Ágar Triptona de Soja agar (*Tryptic soy agar* - TSA). O meio foi incubado em estufa a 28°C *overnight*. Após o período de incubação foram suspendidas em solução salina em concentração 0,85% de NaCl e ajustada para uma densidade celular de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, de acordo com a escala 0,5 de McFarland.

Para preparo do inóculo de fermentação, um frasco Erlenmeyer contendo 20% (v/v) de sua capacidade total preenchida com meio de cultura

previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos, foi transferido um volume de 1% do volume do meio de cultura uma suspensão em solução salina preparada anteriormente em relação ao volume do meio de cultura. O frasco inoculado foi cultivado em incubadora com agitação orbital, a 28°C e agitação de 150 rpm por 18 horas e, em seguida, uma alíquota de 1% (v/v) do fermentado foi transferida a um novo Erlenmeyer aletado contendo o mesmo meio de cultura e novamente incubado com agitação orbital a 150 rpm, a 28°C por 72 horas. O meio de cultura utilizado para a fermentação na incubadora será o meio CM2 (BAPTISTA, 2022) contendo as seguintes concentrações de nutrientes para cada litro de meio: Glicose: 20g, NaCl: 5g, MnSO₄.4H₂O: 0.04g, MgCl₂.6H₂O: 1.44g, K₂HPO₄: 1.5g, Triptona: 12.4g, FeSO₄.7H₂O: 1.67g e emulsão antiespumante (Xiameter AFE-1520): 0.1% do volume total de meio de cultura. A fermentação foi utilizada como controle para comparação dos demais processos fermentativos do trabalho.

3.2.2 METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL E BIOMASSA

A atividade antifúngica contra *S. sclerotiorum* e *C. truncatum* foi determinada pelo método de difusão em ágar. Placas de petri de 90 mm de diâmetro com meio batata dextrose ágar (BDA) foram suplementados com 100 mg/L de cloranfenicol e, ao lado do inóculo fúngico, poços com 9 mm de diâmetro foram perfurados no meio de cultura solidificado, aos poços foram transferidas alíquotas de 200 µL de fermentado e as placas foram incubadas em incubadora do tipo BOD com fotoperíodo de 12 horas a 25°C, durante 3 a 5 dias. Foi realizado um experimento independente com cada fungo fitopatogênico escolhido como alvo com 6 réplicas cada. O cálculo de inibição do crescimento micelial dos fungos foi realizado a partir da relação proporcional entre a área total do fungo crescido nas placas sem tratamento (controle) e a área total do fungo crescido contendo o tratamento. Para o cálculo da área de crescimento fúngico foi utilizado o aplicativo processador de imagens ImageJ, para o cálculo da área total de crescimento do fungo, e assim aplicado à equação:

$$ICM\% = \left(1 - \left(\frac{at}{af}\right)\right) \times 100$$

Onde “ a_t ” representa a área total ocupada pelos micélios do fungo na placa de petri com a presença do tratamento e “ a_f ” representa a área total ocupada pelos micélios do fungo na ausência de tratamento e “ $ICM\%$ ” representa a porcentagem de inibição do crescimento micelial. A contagem de UFC/mL do fermentado foi validada através de diluições de fator 10 em salina 0,85%. As diluições foram depositadas e espalhadas sobre a superfície do meio de cultura solidificado TSA (Neogen) em placas de petri de 90 mm em triplicata utilizando uma alça Drigalski. Ademais a biomassa foi medida também pela análise de densidade óptica (DO) através da leitura de absorbância em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 600nm. Para manter a faixa linear de trabalho do equipamento, as amostras foram diluídas em água deionizada de modo a manter os valores de leitura entre 0,2 e 0,8, onde a concentração celular por densidade óptica (OD) foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$X_{DO} = DO_{ad} \times (V_d + V_a) \div V_a$$

A “ DO_{ad} ” representa a leitura da amostra de meio fermentado diluída, “ V_d ” representa o volume do diluente (água deionizada), “ V_a ” representa o volume de amostra de meio fermentado e “ X_{DO} ” representando a leitura real da amostra. As análises foram realizadas em triplicatas, ademais utilizou-se o método de diluição seriada e plaqueamento em meio de cultura TSA para contagem de concentração de Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL).

3.3 SCREENING DE FONTES DE NUTRIENTES

A etapa de desenvolvimento de *screening* de fontes de nutrientes foi realizada utilizando metodologia de esquema fatorial de Plackett-Burman com o auxílio do *software* Protimiza Experimental Design (PROTIMIZA, 2025). A partir do *software* foi gerada uma matriz experimental com as seguintes fontes de carbono: Sacarose (Alto Alegre), Glicose e Amido. As fontes de nitrogênio foram utilizadas para a formulação da matriz os seguintes insumos: extrato de levedura (Angel), peptona de soja (Angel), colágeno hidrolisado de galinha (Brf ingredientes), proteína isolada de

soja (Relva Verde, 50g de proteína em 100g). Assim formando a seguinte matriz com os insumos que oscilam entre +1, 0 e -1 como segue a **Tabela 1**:

Tabela 1 – Valores dos insumos utilizados para a matriz de Plackett-Burman e suas respectivas proporções (g/L)

Insumo	-1	0	1
Peptona	5	7,5	10
Extrato de levedura	5	7,5	10
Colágeno	5	10	15
Farinha	5	7,5	10
Sacarose	5	7,5	10
Glicose	5	7,5	10
Amido	5	7,5	10

Assim obtendo uma matriz com o total de 12 formulações de meios de cultura diferentes e 3 pontos centrais (F13, F14 e F15), totalizando 15 fermentações independentes como segue a **Tabela 2**.

Tabela 2 - Matriz experimental de Plackett-Burman e suas respectivas proporções de insumos considerados fontes de carbono e nitrogênio de cada amostra estabelecida e o total destes insumos utilizados (sem incluir os sais utilizados)

Formulações	Pep. (g/L)	E.L (g/L)	Col. (g/L)	Far. (g/L)	Sac. (g/L)	Gli. (g/L)	Ami. (g/L)	Total (g/L)
F1	10	5	15	5	5	5	10	55
F2	10	10	5	10	5	5	5	50
F3	5	10	15	5	10	5	5	55
F4	10	5	15	10	5	10	5	60
F5	10	10	5	10	10	5	10	60
F6	10	10	15	5	10	10	5	65
F7	5	10	15	10	5	10	10	65
F8	5	5	15	10	10	5	10	60
F9	5	5	5	10	10	10	5	50
F10	10	5	5	5	10	10	10	55
F11	5	10	5	5	5	10	10	50
F12	5	5	5	5	5	5	5	35
F13	7,5	7,5	10	7,5	7,5	7,5	7,5	55
F14	7,5	7,5	10	7,5	7,5	7,5	7,5	55
F15	7,5	7,5	10	7,5	7,5	7,5	7,5	55

Legenda: Pep – Peptona; E.L – Extrato de Levedura; Col – Colágeno Hidrolisado de Galinha; Far – Farinha de soja; Sac – Sacarose; Ami – Amido de Milho.

Para preparo do inóculo de fermentação, um frasco Erlenmeyer contendo 20% (v/v) de sua capacidade total preenchida com meio de cultura previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos, foi transferido um volume de 1% (v/v) da suspensão em solução salina preparada anteriormente em relação ao volume do meio de cultura. O frasco inoculado foi cultivado em incubadora com agitação orbital, a 28°C e agitação de 150 rpm por 18 horas e, em seguida, uma alíquota do fermentado foi transferida a um novo Erlenmeyer aletado de 250 mL contendo 20% (v/v) com o mesmo meio de cultura e novamente incubado com agitação orbital a 150 rpm, a 28°C por 72 horas. Todas as 15 amostras foram

suplementadas, além das fontes de carbono e nitrogênio designadas pela matriz, os mesmos sais que compõem o meio de cultura CM2 (BAPTISTA, 2022) e Xiameter (AFE-1520): 0,1% do volume total do meio de cultura.

Para a análise e avaliação dos resultados foram validadas três respostas: biomassa via densidade ótica avaliada partir de espectrofotometria (600nm), Concentração UFC/mL e Atividade antifúngica por método de difusão em ágar e medição do raio do halo de inibição de crescimento micelial com *S. sclerotiorum* como fungo marcador para *C. truncatum*. Todos os dados e diferenças possivelmente significativas entre as médias dos grupos utilizados para comparação foram utilizadas o software de análise estatística R Project (R CORE TEAM, 2024) e aplicadas ao teste de T-student para a comparação da média dos resultados com o resultado obtido pelo meio de cultura controle (nível de significância de 0,05).

3.4 DEFINIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

Para a etapa de desenvolvimento de definições dos meios de cultura foi executada outra metodologia de *Design Of Experiments* (DOE). Onde as influências das variáveis independentes sobre as variáveis de resposta foram avaliadas de acordo com os conceitos de estatística descritiva e multivariada. Para isso utilizou-se do planejamento experimental de PCCR, onde as variáveis julgadas como significativas na etapa de *screening* foram selecionadas para o planejamento multifatorial, sendo elas: Glicose, Peptona e Colágeno hidrolisado de galinha. As proporções dos insumos para a composição da matriz foram estabelecidas como mostra a **Tabela 3**:

Tabela 3 - Valores dos insumos utilizados para a matriz de Planejamento Composto Central Rotacional e suas respectivas proporções (g/L)

Insumo	-1,68	-1	0	1	1,68
Glicose	0,01	2,55	6,275	10	12,54
Peptona	0,01	2,55	6,275	10	12,54
Colágeno	0,01	3,82	9,41	15	18,81

Assim obtendo uma matriz com 8 pontos fatoriais (F1 a F8), 6 pontos axiais (F9 a F14) e 5 pontos centrais (F15 a F19), totalizando 19 fermentações independentes como segue a tabela 4:

Tabela 4 - Total de amostras do Planejamento Composto Central Rotacional, suas respectivas proporções e total de insumo utilizado para cada formulação

Formulação	Glicose (g/L)	Peptona (g/L)	Colágeno (g/L)	Total (g/L)
F1	2,55	2,55	3,82	8,92
F2	10	2,55	3,82	16,37
F3	2,55	10	3,82	16,37
F4	10	10	3,82	23,82
F5	2,55	2,55	15	20,1
F6	10	2,55	15	27,55
F7	2,55	10	15	27,55
F8	10	10	15	35
F9	0	6,275	9,41	15,69
F10	12,54	6,275	9,41	28,22
F11	6,28	0	9,41	15,69
F12	6,28	12,54	9,41	28,22
F13	6,28	6,28	0	12,55
F14	6,28	6,28	18,81	31,36
F15	6,28	6,28	9,41	21,96
F16	6,28	6,28	9,41	21,96
F17	6,28	6,28	9,41	21,96
F18	6,28	6,28	9,41	21,96
F19	6,28	6,28	9,41	21,96

Todas as amostras formadas na matriz da PCCR foram suplementadas, além das fontes de carbono e nitrogênio designadas pela matriz, os mesmos sais que compõem o meio de cultura CM2 (BAPTISTA, 2022) e Xiameter (AFE-1520): 0,1% do volume total do meio de cultura.

Para a análise e avaliação dos resultados foram validadas três respostas: Biomassa via densidade ótica validada a partir de espectrofotometria

(600nm), concentração de UFC/mL e Atividade antifúngica avaliada pelo método de difusão em ágar e inibição do crescimento micelial com *S. sclerotiorum*, assim utilizada como marcador para o fungo *C. truncatum*, dada sua relevância e alta velocidade de crescimento em meio solidificado.

3.5 VALIDAÇÃO DA FORMULAÇÃO

Após a avaliação dos resultados da PCCR foram definidas, de forma quantitativas, as composições de um meio de cultura otimizado na faixa de valores estudada. As formulações de otimização da concentração de UFC/mL e produção de metabólitos antifúngicos, representadas respectivamente pelas tabelas 5 e 6, foram validadas em incubadoras de agitação orbital, enquanto para biorreator de bancada foi validada apenas a formulação de metabólitos e montada uma curva de crescimento em função da DO.

Tabela 5 - Composição do meio de cultura para produção de metabólitos antifúngicos

Insumos	Proporções (g/L)
Glicose	12,95
Peptona	6,28
Colágeno	0,1

Tabela 6 - Composição do meio de cultura para otimização na concentração de UFC/mL

Insumos	Proporções (g/L)
Glicose	6,28
Peptona	13,95
Colágeno	19,9

3.5.1 VALIDAÇÃO DA FORMULAÇÃO EM SHAKER

O processo de validação da formulação em shaker seguiu os mesmos padrões fermentativos do tópico “3.2.1 Preparação para fermentação”, porém utilizando o meio de cultura descrito das **Tabelas 5 e 6**. Ademais dos processos de validação que seguiram os mesmos padrões do tópico “3.2.2 Metodologia de avaliação de inibição do crescimento micelial e biomassa”.

Todos os dados e diferenças possivelmente significativas entre as médias dos grupos utilizados para comparação foram utilizadas o software de análise estatística R Project (R CORE TEAM, 2024).

3.5.2 VALIDAÇÃO DA FORMULAÇÃO PARA OTIMIZAÇÃO DE MOLÉCULAS ANTIFÚNGICAS EM BIORREATOR DE BANCADA

O processo de validação seguiu as mesmas etapas citadas no tópico “3.2.1 Preparação para fermentação do meio CM2”, exceto que para os processos de fermentação líquida foram utilizadas o meio de cultura para produção de metabólitos (tabela 5), previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos e inoculado com 1% v/v da suspensão celular preparada. O frasco inoculado foi cultivado em incubadora com agitação orbital, a 28°C e 150 rpm, por 18h.

Uma alíquota de 20 mL do inóculo foi transferida para o vaso de 3000 mL contendo 2000 mL de meio de cultivo formulado para produção de metabólitos antifúngicos (**Tabela 5**). Após inoculado, o vaso foi acoplado ao biorreator Applikon (Ez-Control- Holanda) onde foi monitorado a variação de pH e controlado o oxigênio dissolvido e nível de espuma com bombeamento de Xiameter (AFE-1520). Para a fermentação, o Biorreator Applikon seguia as seguintes configurações: entrada de ar 0,5 vvm; agitação acionada para 500 rpm com aumento para até 1700 rpm quando oxigênio dissolvido (OD) ficar abaixo de 30%; temperatura 28°C.

Para a montagem da curva de DO foram validadas a morfologia celular por microscopia óptica e densidade óptica com 0h, 3h, 6h, 9h, 12h, 18h, 24h, 30h, 36h, 48h, 60h, 72h de fermentação. Para validar a atividade fungicida, o fermentado foi testado quanto seu efeito de controle de *S. sclerotiorum*, *C. truncatum* e *in vitro* pelo método de difusão de ágar com 0h, 12h, 24h, 48h, 60h e 72h de fermentação. A contagem de UFC/mL do fermentado proveniente do biorreator foi validado através de diluições de fator 10 em salina 0.85%. A validação quanto à

concentração celular foi validada pelo método de espalhamento, realizada em duplicatas tanto para validar o número de células vegetativas quanto o número endósporo nos tempos 0h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h e 72h de fermentação. Para a validação de endósporos as salinas utilizadas no processo de espalhamento foram aquecidas a 80°C por 15 minutos, assim selecionando apenas células que se encontram esporuladas, dadas que as células vegetativas morreriam em decorrência da alta temperatura.

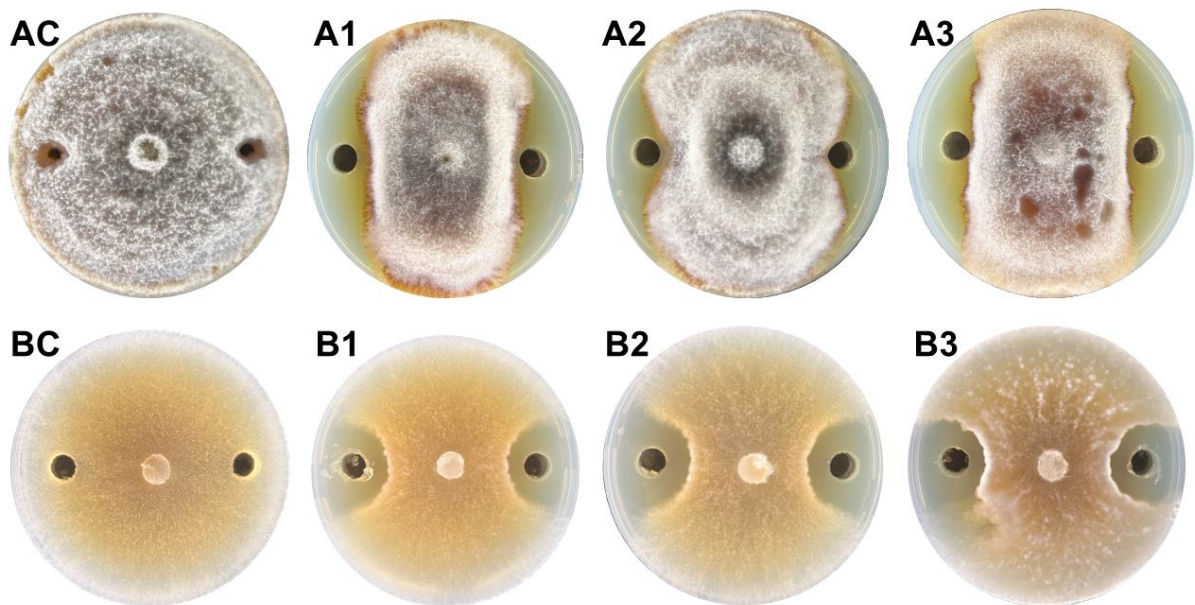
Todos os dados e diferenças possivelmente significativas entre as médias dos grupos utilizados para comparação foram utilizadas o software de análise estatística R Project.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 FERMENTAÇÃO LÍQUIDA COM MEIO CM2

Após os processos fermentativos do meio de cultura CM2 (BAPTISTA, 2022) foi possível a formação de zonas de inibição em todos os fungos utilizados no experimento, como mostra a **Figura 4**. A partir do experimento o fermentado demonstrou uma inibição do crescimento micelial de 19,51% e formação de halos com raios de aproximadamente 15,66mm com *S. sclerotiorum* e ICM de 32,08% com *C. truncatum*. Ademais o fermentado apresentou uma densidade celular de $1,2 \times 10^9$ UFC/mL e DO de 2,389 Abs (600nm). Ao qual considera-se um bom resultado, levando em conta que concentração esperada de UFC/mL em bioinsumos, como inoculantes microbianos, geralmente varia entre 10^8 a 10^{10} UFC/mL, conforme as normativas do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA).

Figura 4 - Zonas de inibição formados pelo fermentado utilizando o meio de cultura CM2 (BAPTISTA, 2022) em contato com fungos fitopatogênicos



Legenda: "AC" representando a placa controle de C. truncatum e seu respectivo tratamento em triplicata "A 1, 2 e 3" e "BC" representando a placa controle de S. sclerotiorum e seu respectivo tratamento em triplicata "B1, 2 e 3"

4.2 SCREENING DE FONTE DE NUTRIENTES

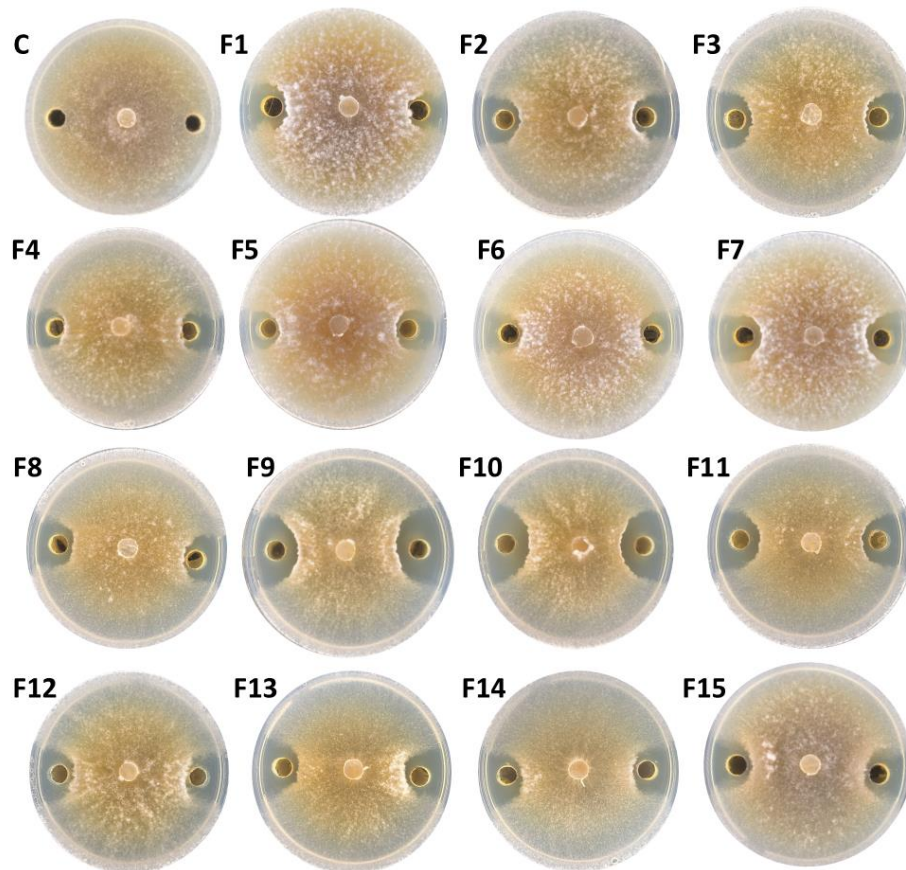
Cerca de 73% dos meios de cultura testados obtiveram biomassa via UFC/mL maior que o meio CM2, obtendo assim meios com biomassa de $1,593 \times 10^9 \pm 1,155 \times 10^7$ (F1, aumento de 32,75%), $1,577 \times 10^9 \pm 1,804 \times 10^8$ (F8, aumento de 31,41%) e $1,523 \times 10^9 \pm 3,842 \times 10^8$ (F7, aumento de 26,91%), como é mostrado na **Tabela 7**. Sendo este um resultado esperado, sabendo que o meio CM2 é formulado com o enfoque na produção de moléculas (BAPTISTA, 2022).

Tabela 7 - Biomassa e atividade fungicida do sobrenadante de LABIM 41 a partir das formulações sugeridas pelo método de Plackett-Burman

Formulações	Biomassa (Abs)	Biomassa (UFC/mL)	Atividade A.F (mm)
F1	2,03	$1,593 \times 10^9 \pm 1,155 \times 10^7$	8,292
F2	2,25	$1,317 \times 10^9 \pm 1,115 \times 10^8$	7,133
F3	2,9	$1,410 \times 10^9 \pm 7,000 \times 10^7$	12,300
F4	1,48	$1,383 \times 10^9 \pm 2,991 \times 10^8$	7,800
F5	3,51	$9,467 \times 10^8 \pm 1,290 \times 10^8$	8,958
F6	2,71	$4,000 \times 10^8 \pm 3,606 \times 10^7$	8,800
F7	2,25	$1,523 \times 10^9 \pm 3,842 \times 10^8$	15,225
F8	1,72	$1,577 \times 10^9 \pm 1,804 \times 10^8$	11,333
F9	1,81	$1,010 \times 10^9 \pm 7,071 \times 10^7$	18,533
F10	2,18	$1,467 \times 10^9 \pm 1,457 \times 10^8$	19,183
F11	1,6	$1,253 \times 10^9 \pm 5,686 \times 10^7$	15,033
F12	3,33	$1,333 \times 10^9 \pm 5,774 \times 10^7$	11,600
F13	1,63	$1,120 \times 10^9 \pm 4,101 \times 10^8$	11,925
F14	1,1	$1,260 \times 10^9 \pm 1,179 \times 10^8$	9,358
F15	1,89	$1,363 \times 10^9 \pm 2,371 \times 10^8$	9,750

Ademais foi possível a formação de halos de inibição maiores que os formados a partir do meio CM2 (15,66mm), sugerindo assim que há uma possibilidade de otimizar o meio de cultivo para a produção destes metabólitos antifúngicos, como mostra a **Figura 5**. As formulações F10 e F9 que obtiveram respectivamente a formação de halos com raios de 19,18mm e 18,53mm, aos quais possuem uma diferença estatisticamente significativa entre os valores do controle escolhido (t-cal: -2,53 e p-valor: 0,0229 para os halos de F9 e t-cal: -3,24 e p-valor: 0,0053 para os halos de F10, nível de significância de 0,05 para ambos).

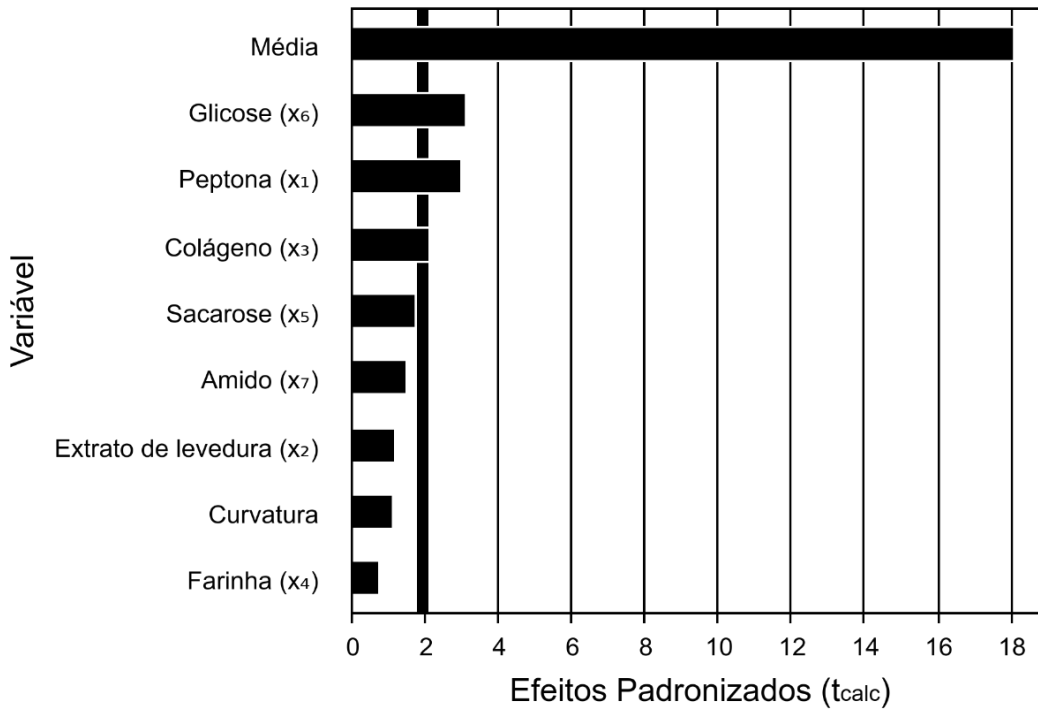
Figura 5 - Resultado do teste de difusão em ágar das formulações na etapa de screening



Legenda – Letra “C” representado a placa controle de S. sclerotiorum e letra “F” representando sua respectiva formulação da etapa de screening

Baseado nas respostas obtidas para cada uma das formulações e com o uso do websoftware de *design* experimental Protimiza, foi possível obter o nível de significância das variáveis (Glicose, Extrato de levedura, Sacarose, Farinha de soja, Colágeno hidrolisado de galinha, Amido de milho e Peptona) que constituíram as formulações em função das respostas escolhidas (Biomassa por absorbância (600nm), Biomassa por UFC/mL e Produção de metabólitos antifúngicos). Dentre as respostas escolhidas para a etapa de *screening* apenas na resposta de produção de metabólitos houve a presença de variáveis que realmente tinham impacto o suficiente para serem consideradas significativas, com o nível de significância no valor de 10% ($\alpha=0,1$), como mostra a **Figura 6**, sendo estas Glicose, Peptona e Colágeno hidrolisado de galinha.

Figura 6 - Gráfico de Pareto representativo do nível de significância ($\alpha=10\%$) das variáveis em função da resposta de produção de metabólitos antifúngicos



Enquanto nas demais respostas escolhidas as variáveis não apresentaram impacto o suficiente para serem classificadas como estatisticamente significativas, como é possível observar nas **Figuras 7 e 8**. Entretanto para a resposta de biomassa por absorvância é possível observar a presença da curvatura, onde essa propriedade é identificada por meio da inclusão de pontos centrais no planejamento experimental, os quais permitem detectar desvios em relação à linearidade assumida na modelagem inicial dos fatores estudados (MONTGOMERY, 2020). O alto grau de significância da curvatura sugere que, neste cenário, a relação entre as variáveis independentes (insumos) e variáveis dependentes (respostas) estejam sob efeitos de funções quadráticas ou interações não lineares significativas (MONTGOMERY, 2020). As formulações geradas na etapa de *screening* apresentaram concentrações e proporções diferentes de fontes de carbono e nitrogênio entre elas, as quais este modelo pode impactar na produção de metabólitos de forma não linear (GUJARATI et al., 2020), ao qual foi necessário o uso de um delineamento que permitiu avaliar tanto o efeito linear quanto quadrático, além de explorar as interações de segunda ordem entre os nutrientes julgados como estatisticamente significativos.

Figura 7 - Gráfico de Pareto representativo do nível de significância ($\alpha=10\%$) das variáveis em função da resposta de biomassa em UFC/mL

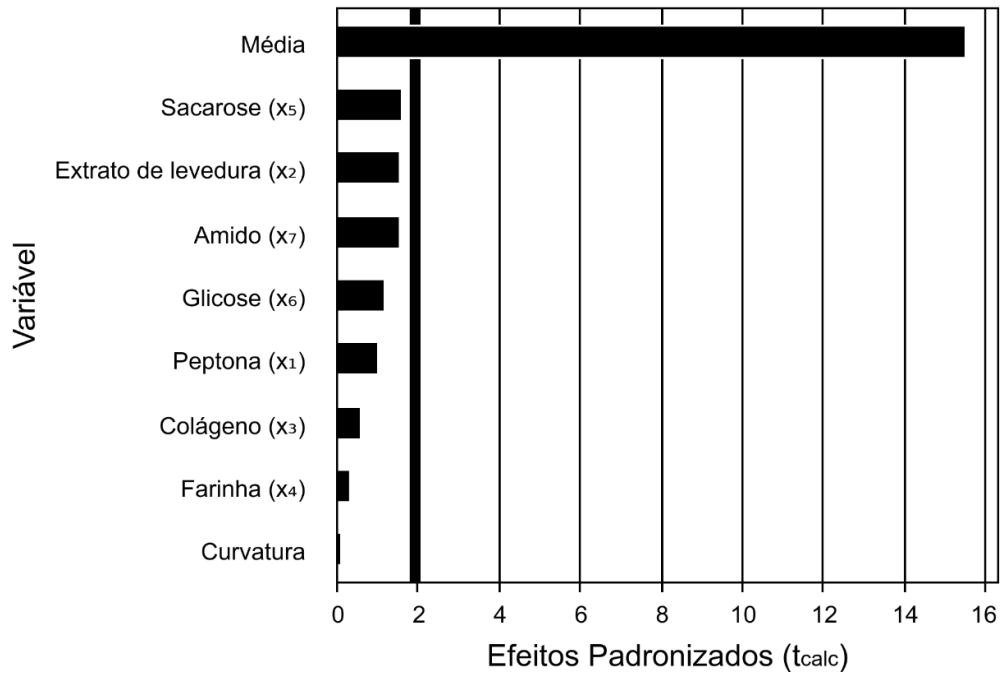
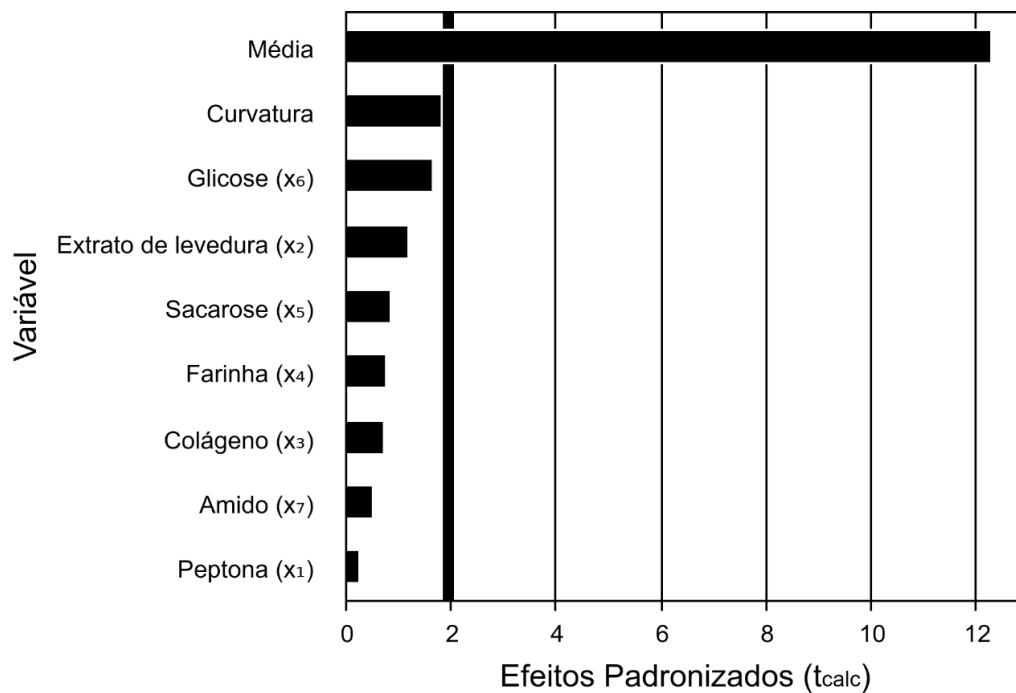


Figura 8 - Gráfico de Pareto representativo do nível de significância ($\alpha=10\%$) das variáveis em função da resposta de biomassa por absorbância (600nm)



4.3 PCCR ENTRE AS VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS SELECIONADAS NO SCREENING DE NUTRIENTES

Os 19 meios de cultura formulados registrados pela **Tabela 4** para a PCCR foram fermentados seguindo os padrões descritos na metodologia (Tópico 3.3) e obtendo os resultados descritos.

Tabela 8 - Total de amostras do Planejamento Composto Central Rotacional, suas respectivas proporções e total de insumo utilizado para cada formulação

Formulação	Glicose (g/L)	Peptona (g/L)	Colágeno (g/L)	Total (g/L)
F1	2,55	2,55	3,82	8,92
F2	10	2,55	3,82	16,37
F3	2,55	10	3,82	16,37
F4	10	10	3,82	23,82
F5	2,55	2,55	15	20,1
F6	10	2,55	15	27,55
F7	2,55	10	15	27,55
F8	10	10	15	35
F9	0	6,275	9,41	15,69
F10	12,54	6,275	9,41	28,22
F11	6,28	0	9,41	15,69
F12	6,28	12,54	9,41	28,22
F13	6,28	6,28	0	12,55
F14	6,28	6,28	18,81	31,36
F15	6,28	6,28	9,41	21,96
F16	6,28	6,28	9,41	21,96
F17	6,28	6,28	9,41	21,96
F18	6,28	6,28	9,41	21,96
F19	6,28	6,28	9,41	21,96

Onde apenas 4 formulações apresentaram o surgimento de zonas de inibição, sendo que F4 apresentou maior raio de inibição com 10,26mm, como mostra a **Figura 9**. Porém 42,10% das fermentações apresentaram contagem de UFC/mL 4

vezes maior que o meio de cultura utilizado como controle (meio CM2), como o meio F7 com $5,300 \times 10^9 \pm 3,650 \times 10^8$ UFC/mL. Além de 57,89% das formulações apresentarem maior biomassa por espectrofotometria (600nm), como mostra a **Tabela 8**.

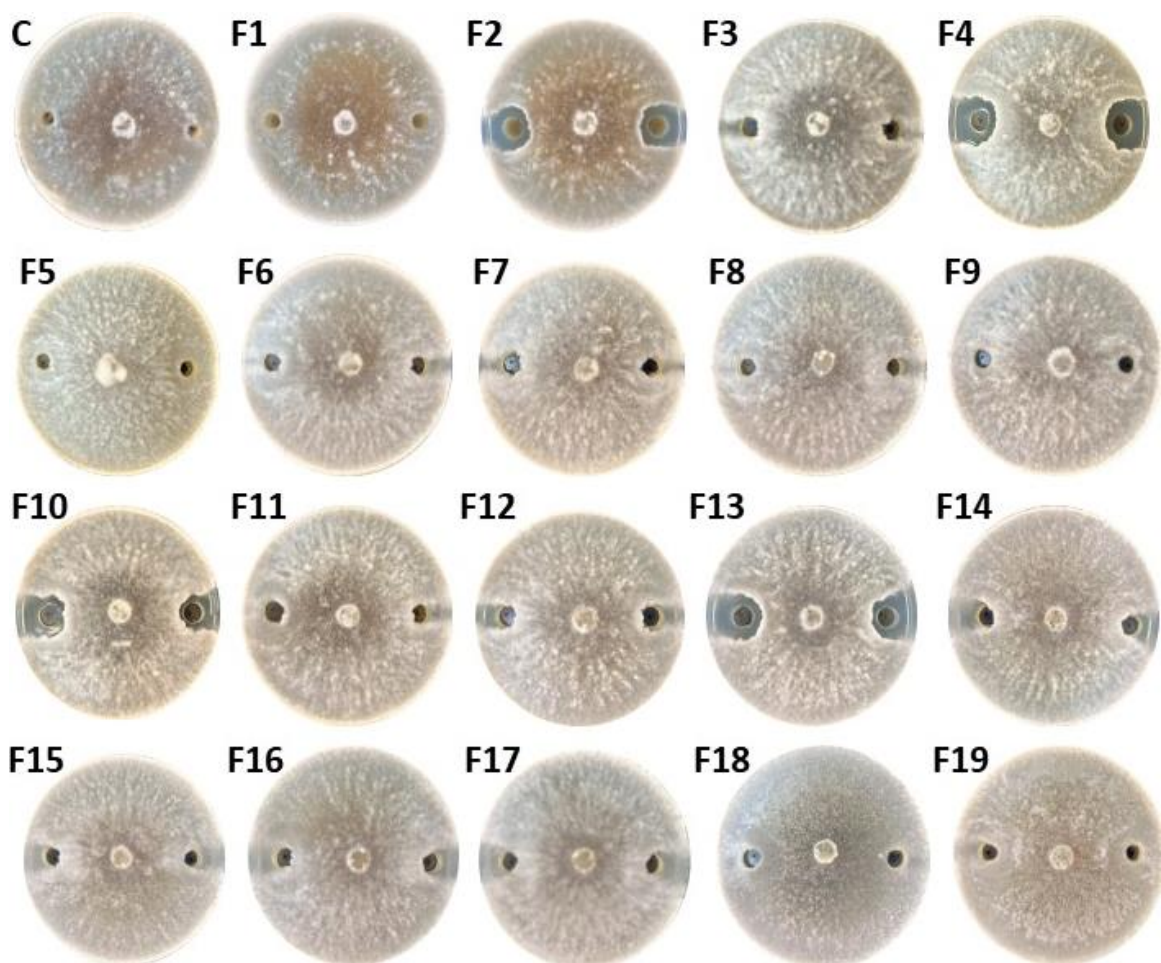
Tabela 9 - Resultados do Planejamento Composto Central Rotacional com as 19 formulações geradas a partir das variáveis selecionadas na etapa de screening

Formulação	Biomassa (Abs)	Biomassa (UFC/mL)	Atividade A.F (mm)
F1	2,01	$4,230 \times 10^8 \pm 7,767 \times 10^7$	0
F2	2,13	$3,000 \times 10^8 \pm 9,539 \times 10^7$	9,70
F3	2,08	$3,130 \times 10^8 \pm 1,617 \times 10^8$	0
F4	3,32	$1,126 \times 10^9 \pm 2,902 \times 10^8$	10,26
F5	3,24	$1,433 \times 10^9 \pm 2,950 \times 10^8$	0
F6	2,84	$1,246 \times 10^9 \pm 1,570 \times 10^8$	0
F7	5,08	$5,300 \times 10^9 \pm 3,650 \times 10^8$	0
F8	4,83	$1,596 \times 10^9 \pm 1,966 \times 10^8$	0
F9	3,36	$8,030 \times 10^8 \pm 1,193 \times 10^8$	0
F10	5,87	$1,630 \times 10^9 \pm 1,732 \times 10^8$	7,93
F11	3,54	$1,350 \times 10^9 \pm 3,100 \times 10^8$	0
F12	4,61	$4,450 \times 10^9 \pm 5,575 \times 10^8$	0
F13	3,62	$3,800 \times 10^8 \pm 3,439 \times 10^8$	8,01
F14	2,59	$2,740 \times 10^9 \pm 6,589 \times 10^8$	0
F15	2,25	$9,833 \times 10^8 \pm 2,309 \times 10^7$	0
F16	1,78	$9,366 \times 10^8 \pm 1,115 \times 10^8$	0
F17	2,03	$8,600 \times 10^8 \pm 1,054 \times 10^8$	0
F18	2,09	$8,233 \times 10^8 \pm 1,528 \times 10^7$	0
F19	2,35	$8,833 \times 10^8 \pm 3,055 \times 10^7$	0

A redução na formação de halos de inibição, e conseqüentemente da produção de metabólitos antifúngicos, pode estar relacionada tanto na proporção quanto na própria fonte de carbono e nitrogênio utilizada para as formulações, onde fontes de carbono desempenham um papel central nos processos fermentativos de bactérias, sendo o principal substrato para geração de energia e síntese de

biomoléculas. A proporção dessas fontes no meio de cultura pode impactar diretamente na eficiência do crescimento bacteriano, a formação de metabólitos e a produtividade geral do processo. A escolha da fonte de nitrogênio pode afetar não apenas a taxa de crescimento, mas também a produção de metabólitos secundários, sendo crucial para processos industriais (ANOOP et al., 2019).

Figura 9 - Resultado do teste de difusão em ágar das formulações geradas pela matriz da PCCR, ao qual a placa de letra “C” representa a placa controle, e as demais respectivas formulações



4.3.1 MODELOS DE PREDIÇÃO, ANÁLISES ESTATÍSTICAS E SUPERFÍCIES DE RESPOSTAS DO PCCR: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

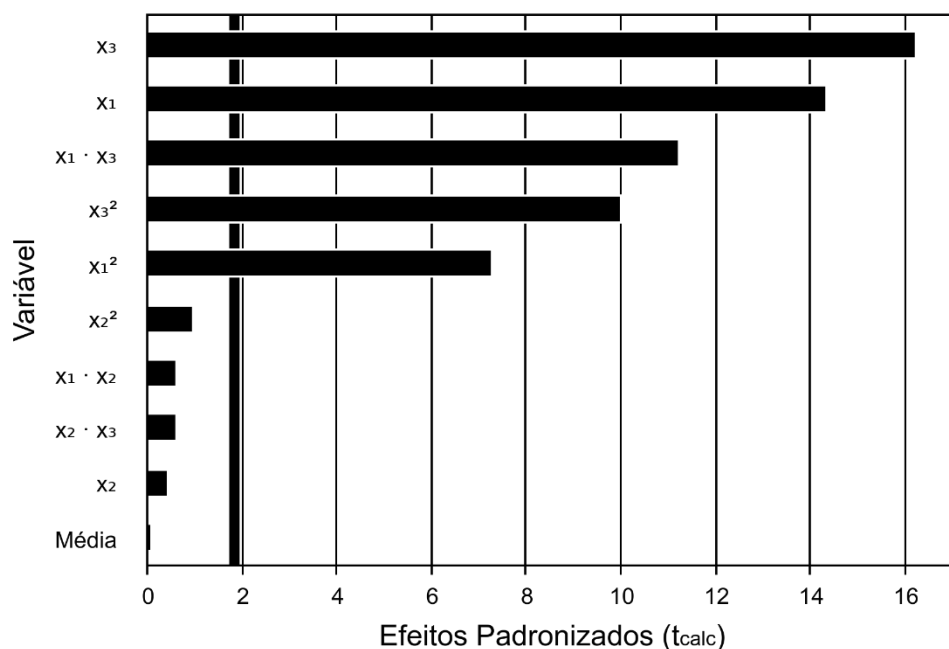
A análise das respostas cedidas ao aplicativo de estatística gerou

uma função quadrática que representa a relação entre as variáveis independentes para cada resposta avaliada. Neste caso, foi gerado o seguinte modelo matemático de predição, a partir dos coeficientes, efeitos correspondentes e significâncias da regressão, que descreve o diâmetro máximo do halo de inibição de crescimento micelial do fungo fitopatogênico (*S. sclerotiorum*) em função das variáveis codificadas. Sendo X_1 , X_2 e X_3 representados por Glicose, Peptona e Colágeno hidrolisado de galinha, respectivamente. O modelo matemático foi parametrizado ao nível de significância de 10%

$$Y_1 = -0,02 + 0,48 x_1 + 0,25 x_1^2 - 0,55 x_3 + 0,34 x_3^2 - 0,49 x_1 x_3$$

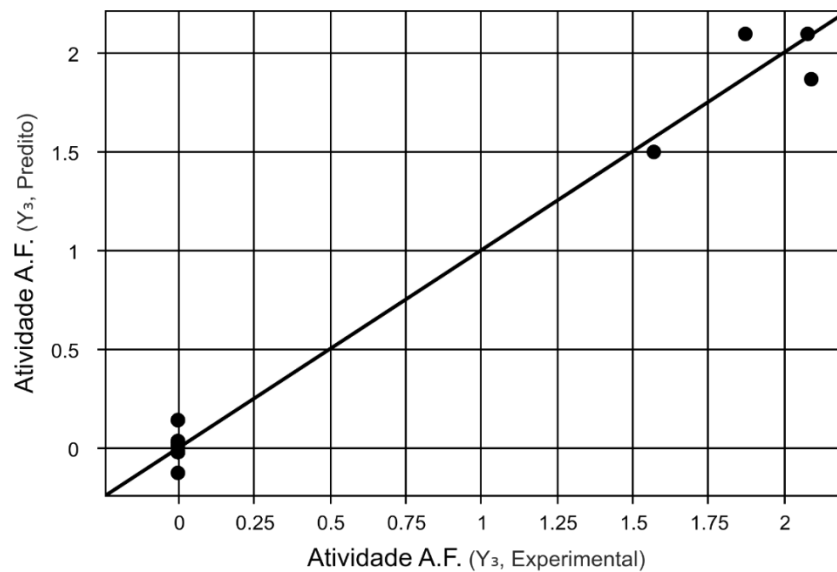
Na **Figura 10** o gráfico de Pareto, os comprimentos de cada barra foram apresentados o efeito do respectivo coeficiente, com a linha vertical delimitando à direita os coeficientes com significância estatística ao nível de 10%. Ao qual tanto no gráfico quanto no modelo matemático os coeficientes que não foram julgados como estatisticamente significativos foram excluídos para reparametrizar o modelo ao nível de significância escolhido.

Figura 10 – Gráfico de Pareto da análise estatística do diâmetro do halo de inibição de crescimento micelial do fungo fitopatogênico alvo do PCCR



A **Figura 11** descreve a correlação entre os valores experimentais obtidos com o teste e valores preditos pelo modelo gerado na análise estatística de diâmetro do halo de inibição do crescimento micelial do fungo fitopatogênico.

Figura 11 – Correlação entre valores preditos e experimentais da análise estatística de diâmetro do halo de inibição de crescimento micelial do fungo fitopatogênico alvo do PCCR



A **Tabela 9** apresenta a análise de variância e significância estatística da regressão para o diâmetro do halo de inibição de crescimento micelial do fungo fitopatogênico alvo. A análise de variância (ANOVA) para o diâmetro do halo de inibição de crescimento micelial de *S. sclerotiorum* revela que o modelo ajustado apresenta excelente desempenho estatístico. O teste F para a regressão resultou em um valor extremamente elevado (177,07), com um p-valor de $1,76 \times 10^{-11}$, indicando que o modelo é altamente significativo ao nível de significância de 0,1.

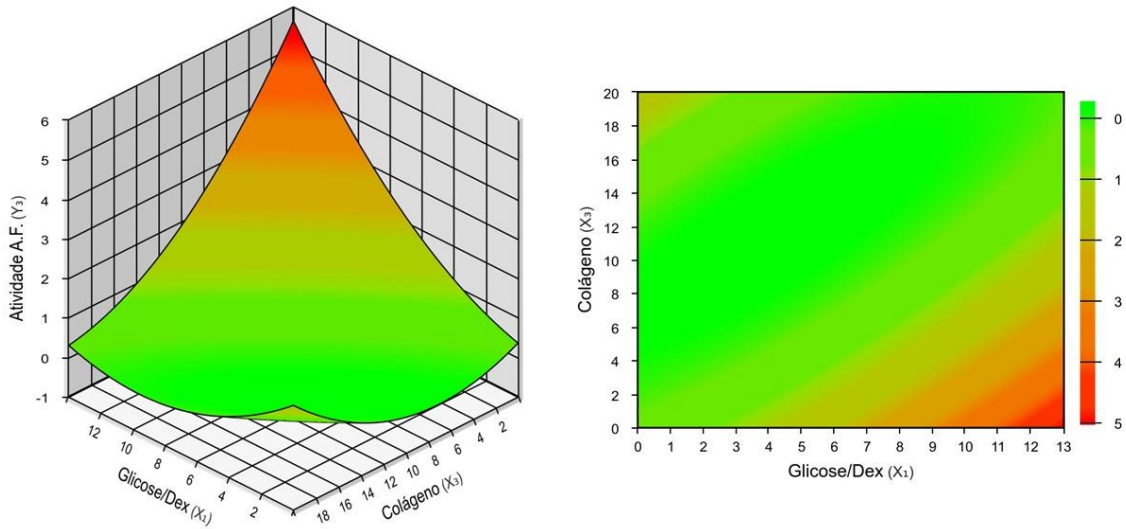
Tabela 10 – Análise de variância (ANOVA) da regressão para o diâmetro do halo de inibição de crescimento micelial do fungo fitopatogênico alvo do PCCR

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc}	p-valor
Regressão	11,440	5	2,288	177,0727	1,76E-11
Falta de Ajuste	0,167	9	0,018	Infinity	NaN
Erro Puro	0	4	0		
Total	11,608	18			
R ² = 98,55%					
R ² ajustado = 98,26					

Portanto, embora o modelo seja estatisticamente robusto e apresente um ajuste quase perfeito ($R^2 = 98,55\%$ e R^2 ajustado = 98,26), é essencial avaliar a metodologia experimental. A ausência de erro puro real indica que a variabilidade das repetições experimentais deve ser reconsiderada, garantindo maior confiabilidade nos resultados e na validade do modelo ajustado.

A **Figura 12** apresenta o gráfico de superfície de resposta respectivo ao modelo matemático de predição do raio do halo de inibição contra o fungo fitopatogênico marcador, gerados assim na análise estatística do PCCR. O gráfico indica as regiões ótimas para a variável X_1 – Glicose nas regiões de 12,95g/L; para a variável X_2 – Peptona nas regiões de 6,28g/L e para a variável X_3 – Colágeno hidrolisado de galinha nas regiões de 0,1g/L. Assim, baseado no modelo matemático, esperando uma resposta de: 4,96mm \pm 0,20mm.

Figura 12 – Superfícies de resposta e Curva de Contorno da interação entre as fontes de nutrientes Colágeno hidrolisado de galinha e Glicose da análise estatística de tamanho máximo do raio do halo de inibição micelial contra *S. sclerotiorum* do PCCR



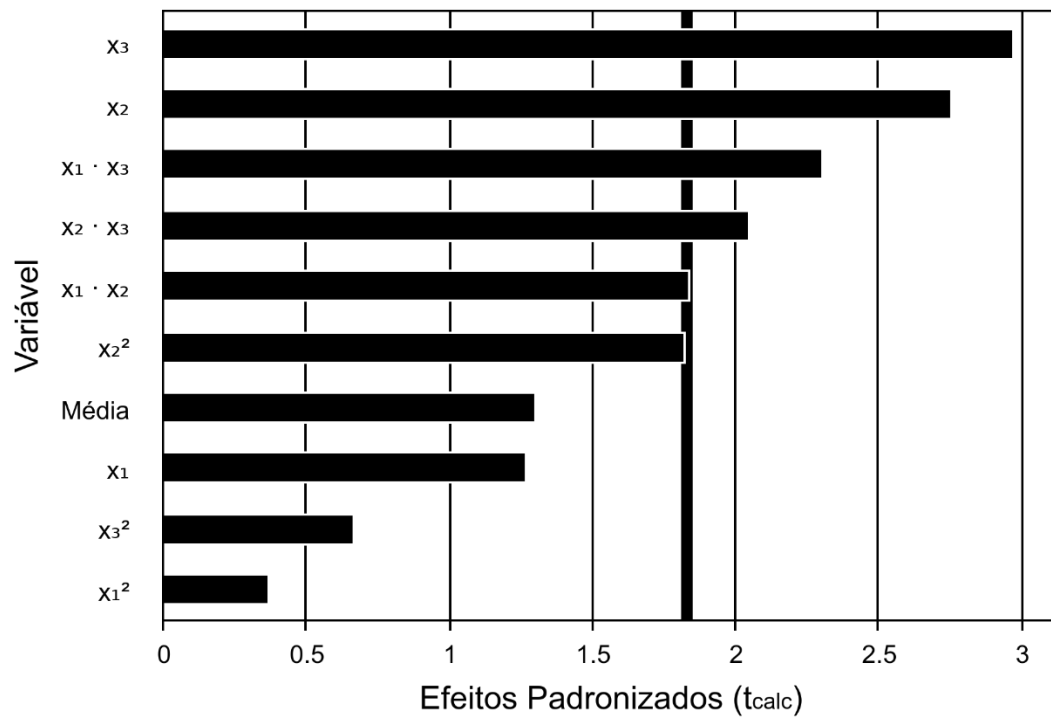
4.3.2 MODELOS DE PREDIÇÃO, ANÁLISES ESTATÍSTICAS E SUPERFÍCIES DE RESPOSTAS DO PCCR: CONCENTRAÇÃO DE UFC/ML

Neste segundo caso, foi gerado o seguinte modelo matemático de predição, a partir dos coeficientes, efeitos correspondentes e significâncias da regressão, que descreve a concentração máxima de UFC/mL em função das variáveis codificadas. Sendo X_1 , X_2 e X_3 representados por Glicose, Peptona e Colágeno hidrolisado de galinha, respectivamente. O modelo matemático foi parametrizado ao nível de significância de 10%

$$Y_2 = 123,02 + 113,10 x_2 + 69,34 x_2^2 + 122,15 x_3 - 98,51 x_1 x_2 - 123,51 x_1 x_3 + 110,01 x_2 x_3$$

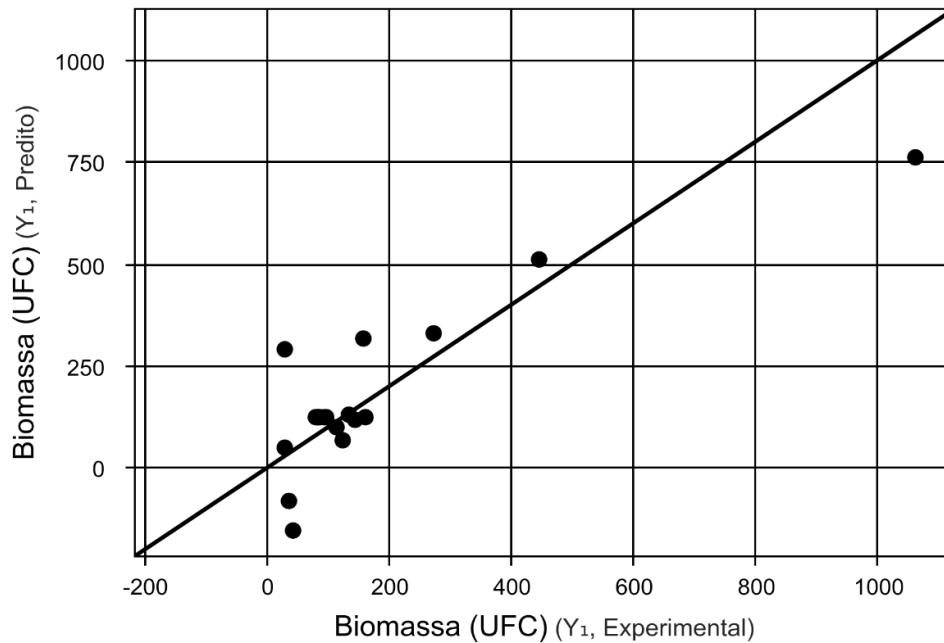
Na **Figura 13**, o gráfico de Pareto, foi possível de observar os coeficientes que foram julgados como estatisticamente significativos de acordo com o grau de significância estatística em 10%. Onde torna-se impreciso a comparação entre estes resultados com o anterior, dada a elevada variação de dados no experimento de atividade antimicrobiana. Ademais ressalta-se a falta de ajuste em ambos os experimentos, sugerindo assim mudanças na metodologia aplicada.

Figura 13 – Gráfico de Pareto da análise estatística da contagem de UFC/mL do PCCR



A **Figura 14** descreve a correlação entre os valores experimentais obtidos com o teste e valores preditos pelo modelo gerado na análise estatística da concentração de UFC/mL.

Figura 14 – Correlação entre valores preditos e experimentais da análise estatística da contagem de UFC/mL do PCCR



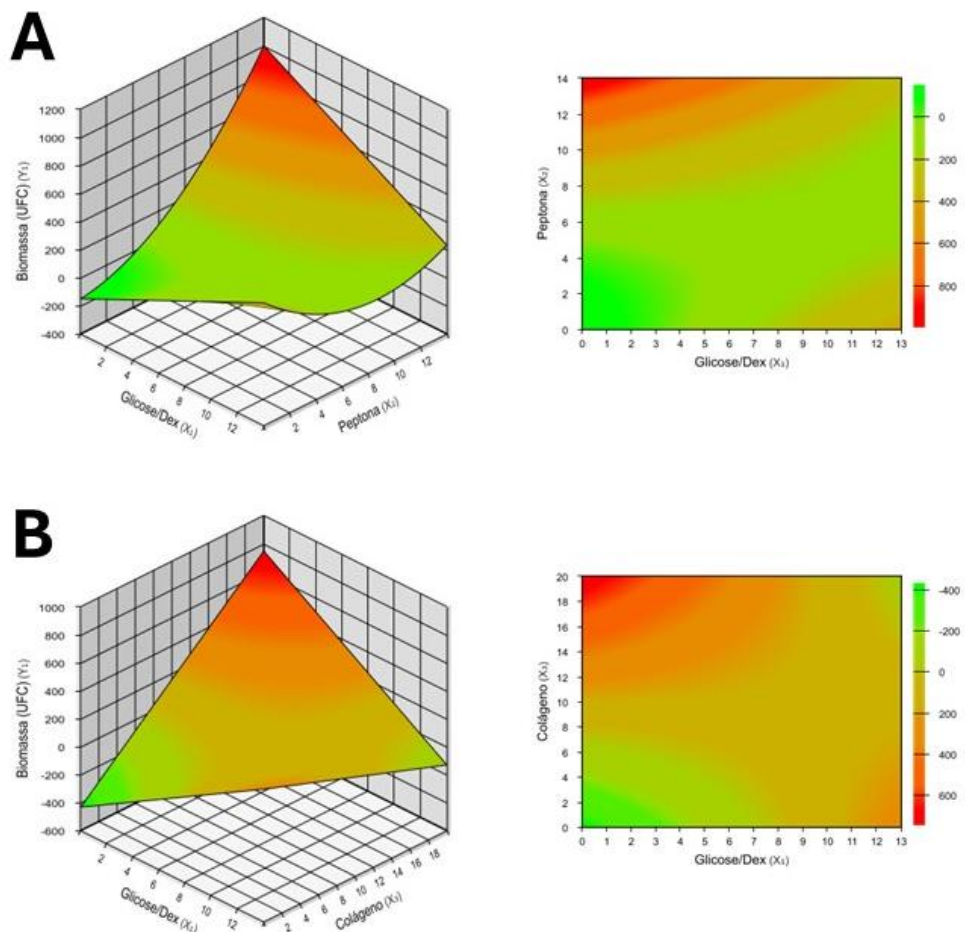
A **Tabela 10** O coeficiente de determinação ($R^2 = 74,36\%$ e R^2 ajustado = $69,23\%$) demonstra que aproximadamente $69,23\%$ da variabilidade da variável resposta pode ser explicada pelo modelo ajustado, o que sugere um ajuste razoável. Entretanto, a decomposição dos resíduos revela p-valor extremamente baixo ($4,83 \times 10^{-6}$). Isso significa que a variação não explicada pelo modelo não pode ser atribuída apenas ao erro puro, mas sugere possivelmente ausência de variáveis importantes ou necessidade de transformações nos dados.

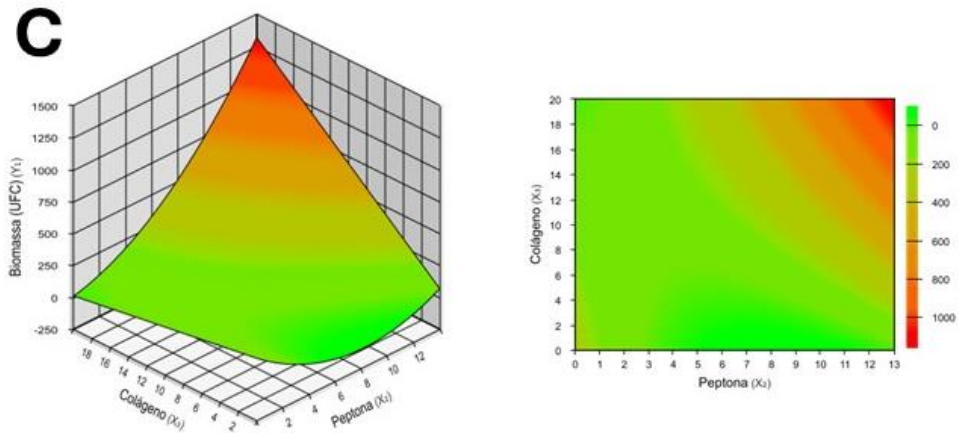
Tabela 11 – Análise de variância (ANOVA) da regressão para a concentração de UFC/mL do PCCR

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Fcalc	p-valor
Regressão	743176,665	6	123862,777	5,801	4,85E-03
Falta de Ajuste	256028,256	8	32003,532	718,240	4,83E-06
Erro Puro	178,232	4	44,558		
Total	999383,155	18			
$R^2 = 74,36\%$					
R^2 ajustado = $69,23\%$					

Assim, apesar da significância do modelo, a elevada falta de ajuste sugere que mudanças na metodologia são necessários para melhorar a qualidade da predição, como a inclusão de novas variáveis, transformações nos dados ou a consideração de interações entre os fatores. A **Figura 15** apresenta o gráfico de superfície de resposta respectivo ao modelo matemático de predição para a concentração de UFC/mL, gerados assim na análise estatística do PCCR. O gráfico indica as regiões ótimas para a variável X_1 – Glicose nas regiões de 6,28g/L; para a variável X_2 – Peptona nas regiões de 13,95g/L e para a variável X_3 – Colágeno hidrolisado de galinha nas regiões de 19,90/L. Assim, baseado no modelo matemático, esperando uma resposta de: $1,674 \times 10^{10} \pm 2,994 \times 10^9$ UFC/mL.

Figura 15 – Superfícies de resposta e Curva de Contorno da interação entre as fontes de nutrientes Peptona e Glicose (A), Colágeno hidrolisado de galinha e Glicose (B), Peptona e Colágeno hidrolisado de galinha (C) da análise estatística de contagem máxima de UFC/mL do PCCR





4.3.3 MODELOS DE PREDIÇÃO, ANÁLISES ESTATÍSTICAS E SUPERFÍCIES DE RESPOSTAS DO PCCR: BIOMASSA POR ABSORBÂNCIA (600NM)

No terceiro caso, foi gerado o seguinte modelo matemático de predição, a partir dos coeficientes, efeitos correspondentes e significâncias da regressão, que descreve a biomassa máxima via absorvância em função das variáveis codificadas. Sendo X_1 , X_2 e X_3 representados por Glicose, Peptona e Colágeno hidrolisado de galinha, respectivamente. O modelo matemático foi parametrizado ao nível de significância de 10%

$$Y_3 = 0,40 + 0,04 x_1^2 + 0,04 x_2 - 0,05 x_3^2 - 0,09 x_1 x_3 - 0,05 x_2 x_3$$

Na **Figura 16** o gráfico de Pareto foi possível de observar os coeficientes que foram julgados como estatisticamente significativos de acordo com o grau de significância de 10%, sendo possível também reparar que a interação entre X_1 e X_3 apresenta maior significância. Reforçando o fato de que os insumos dentro de um processo fermentativo apresentam comportamentos não lineares, onde os ingredientes não geram respostas de forma totalmente independente.

Figura 16 - Gráfico de Pareto da análise estatística da contagem de UFC/mL do PCCR

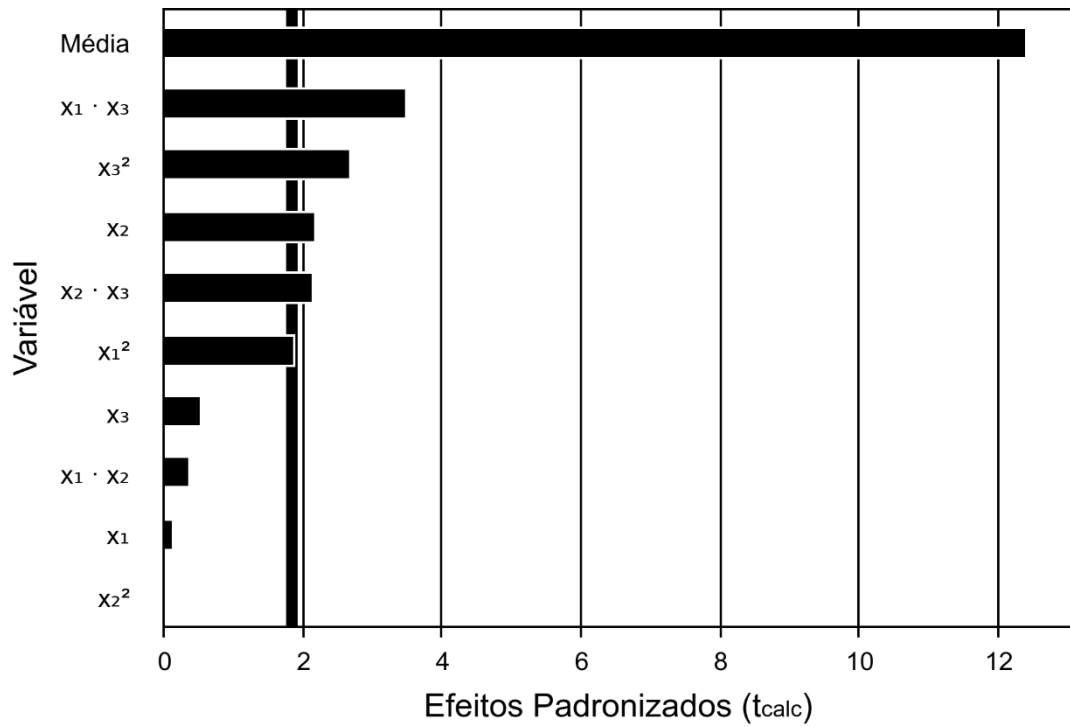
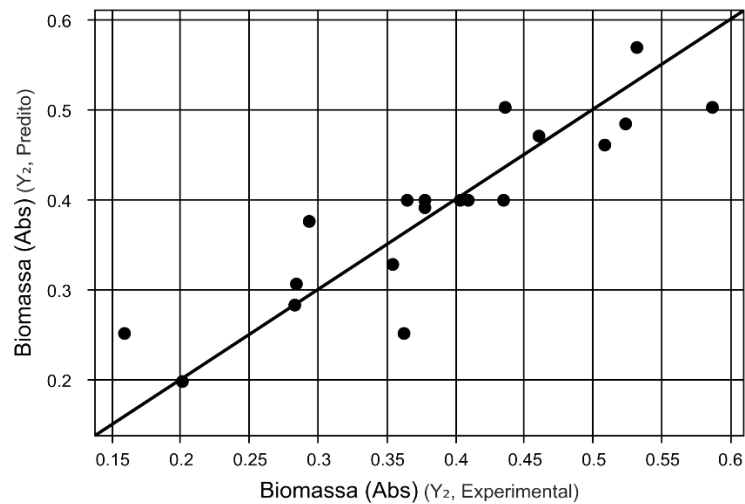


Figura 17 – Correlação entre valores preditos e experimentais da análise estatística da biomassa via absorbância do PCCR



Com base nos dados obtidos a partir da análise de variância das respostas obtidas foi possível analisar alguns comportamentos: valor de F calculado para a regressão foi 9,355, com um p-valor de 0,0005, indicando que os fatores incluídos no modelo explicam uma parte substancial da variação nos dados. O erro puro, com um quadrado médio de 0,0007, indica alta consistência nos dados das replicações experimentais. Isso reforça a confiabilidade das medições, mas também

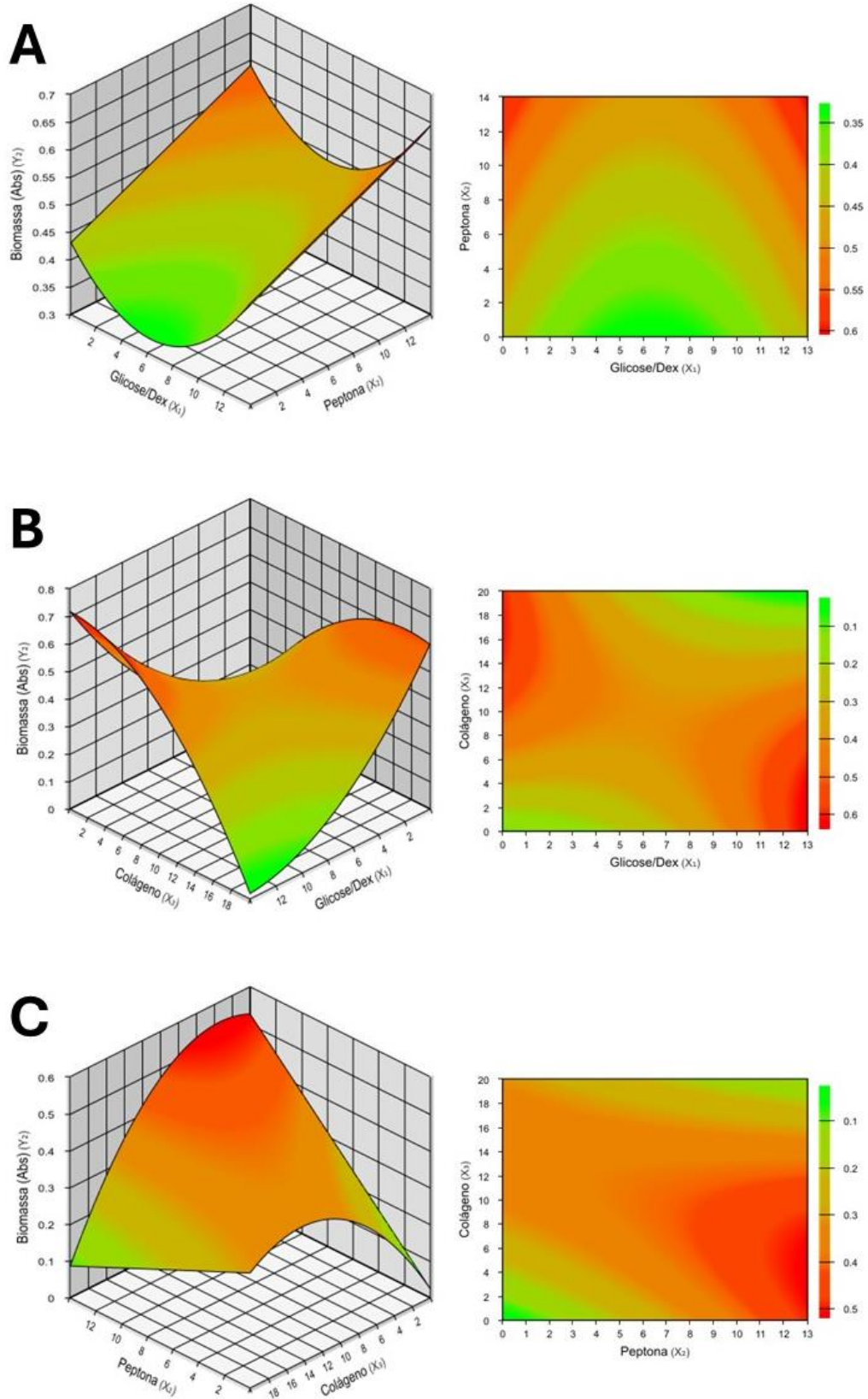
destaca a necessidade de refinar o modelo para melhorar a precisão das previsões e reduzir a falta de ajuste.

Tabela 12 – Análise de variância (ANOVA) da regressão para a concentração de UFC/mL do PCCR

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc}	p-valor
Regressão	0,175	5	0,035	9,355	0,0005
Falta de Ajuste	0,045	9	0,005	6,780	0,040
Erro Puro	0,003	4	0,0007		
Total	0,224	18			
R ² = 78,25%					
R ² ajustado = 73,9%					

Portanto, apesar da significância estatística do modelo na previsão do comportamento fermentativo, a falta de ajuste de sugere que melhorias são necessárias. A **Figura 11** apresenta o gráfico de superfície de resposta respectivo ao modelo matemático de predição para a biomassa medida via absorbância, gerados assim na análise estatística do PCCR. O gráfico indica as regiões ótimas para a variável X₁ – Glicose nas regiões de 13,95g/L; para a variável X₂ – Peptona nas regiões de 6,28g/L e para a variável X₃ – Colágeno hidrolisado de galinha nas regiões de 0,1g/L. Assim, baseado no modelo matemático, esperando uma resposta de: 7,100 Abs ± 1,100 Abs.

Figura 18 – Superfícies de resposta e Curva de Contorno da interação entre as fontes de nutrientes Peptona e Glicose (A), Colágeno hidrolisado de galinha e Glicose (B), Peptona e Colágeno hidrolisado de galinha (C) da análise estatística de biomassa máxima por absorbância (600nm) do PCCR



4.5 VALIDAÇÃO DAS FORMULAÇÕES PREVISTAS COMO ÓTIMAS

A partir das respostas e análises dos dados estatísticos, foi possível obter as três condições que predizem maiores atividades e crescimento microbiano, como mostra a **Tabela 12**. Onde é possível observar que o valor total de insumos utilizados para a formulação de otimização da concentração de UFC/mL apresenta quase o dobro de insumos que as demais, sendo ele o meio mais concentrado.

Tabela 13 – Formulações previstas como ótimas pelo aplicativo de análise estatística, seguida dos insumos necessários em g/L e o total de ingredientes utilizados

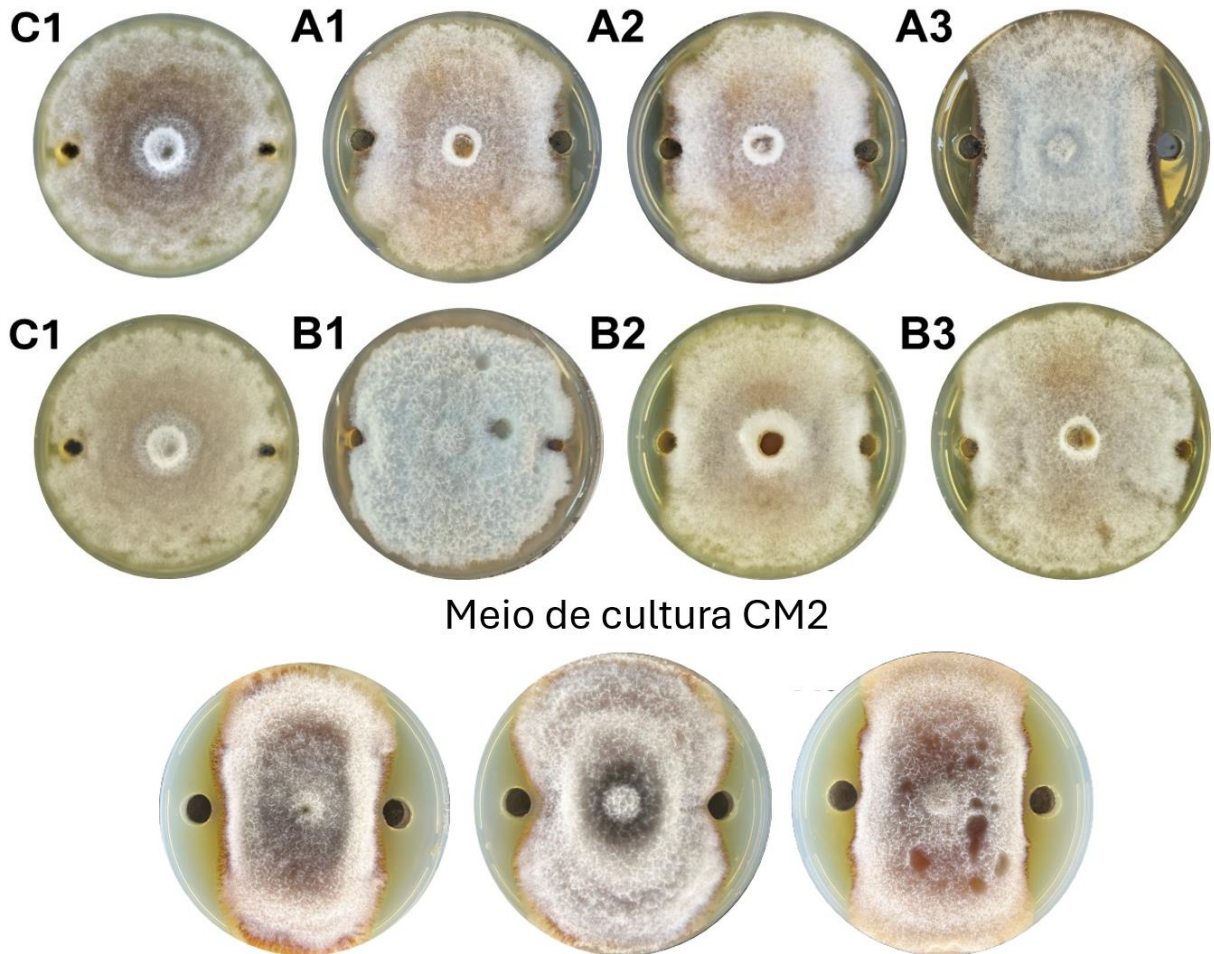
Formulação ótima	Insumos			TOTAL g/L
	Glicose g/L	Peptona g/L	Colágeno g/L	
Biomassa (Abs)	13,95	6,28	0,1	20,33
Atividade A. F	12,95	6,28	0,1	19,33
Concentração UFC/mL	6,28	13,95	19,9	40,13

4.5.1 VALIDAÇÃO DAS FORMULAÇÕES EM SHAKER

A técnica de espectrofotometria é amplamente utilizada para medir biomassa de fermentados, que mede a densidade óptica (DO) da cultura microbiana. No entanto, essa abordagem apresenta uma limitação significativa: a incapacidade de distinguir entre células viáveis e não viáveis, uma vez que ambas contribuem igualmente para a turbidez da amostra, embora seja uma metodologia rápida e fornece uma estimativa de crescimento. Portanto para a etapa de validação, foram utilizadas apenas as formulações de Atividade antifúngica e Concentração de UFC/mL por ser uma técnica mais robusta e precisa. As fermentações ocorreram seguindo os padrões descritos anteriormente no tópico de metodologia e obtendo os resultados obtidos nas **Figuras 19** e **20**. Onde é possível observar na **Figura 19** a formação de zonas de inibição contra o fungo *C. truncatum*, tanto com a formulação de otimização na concentração de UFC/mL quanto na atividade antifúngica. Porém, em comparação com o meio de cultura escolhido como controle (CM2) as zonas de inibição foram menores, tendo inibição de crescimento micelial de $13,7\% \pm 1,85\%$ com a formulação

para otimização na produção de moléculas antifúngicas e $3,07\% \pm 0,15\%$ com a formulação para otimização na concentração de UFC/mL.

Figura 19 – Resultado do teste de difusão em ágar contra *C. truncatum*, com as formulações premeditadas na PCCR como ótimo em atividade antifúngica (A) e densidade de UFC/mL (B), seguido dos controles (C) e meios de cultura CM2



Não apenas na validação atividade antifúngica *in vitro* contra *C. truncatum*, mas também contra o fungo marcador *S. sclerotiorum* a inibição de crescimento micelial também foi reduzida, apresentando resultados da formulação para otimização na produção de moléculas antifúngicas de apenas $6,55\% \pm 2,85\%$ e a formulação de otimização na concentração de UFC/mL apresentou uma inibição de $2,32\% \pm 0,76\%$. Ambos os fermentados apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre o meio CM2, como sugere a **Tabela 13**. Os resultados obtidos a partir da validação das formulações se encontraram fora do intervalo previsto pelo

websoftware estatístico e menores que o meio de cultura utilizado como controle (CM2).

As causas na redução da produção metabólica podem estar diretamente relacionadas à menor concentração e proporção de insumos presentes no meio formulado pelo aplicativo de planejamento estatístico. Ao qual nota-se que o meio de cultura CM2 apresenta uma concentração muito maior de fonte de carbono e nitrogênio, em contraste aos 12,95g/L de glicose e 6,38g/L de fontes de nitrogênio (Peptona e Colágeno hidrolisado de galinha). Além de que para a confecção do meio de cultura CM2 utilizou-se insumos de qualidade laboratorial, que por si apresentam um grau de pureza maior, tanto para as fontes de nitrogênio quanto para carbono. Enquanto para os meios de cultura testados no PCCR apresentaram insumos de nível técnico industrial, contando com um grau de pureza menor que os insumos laboratoriais. Esta dependência nutricional fica mais evidente quando exposta a formulação do meio de cultura na etapa de *screening* que apresentou maior produção de moléculas antifúngicas (F9), ao qual apresenta como fontes de Nitrogênio: Peptona 10g/L, Extrato de levedura 5g/L, Colágeno hidrolisado de galinha 5g/L e Farinha proteica de Soja 5g/L (total de 25g/L) e fontes de Carbono: Sacarose 10g/L, Glicose 10g/L, Amido de milho 10g/L, Extrato de levedura 5g/L e Farinha proteica de soja 5g/L (total de 40g/L de fontes de carbono).

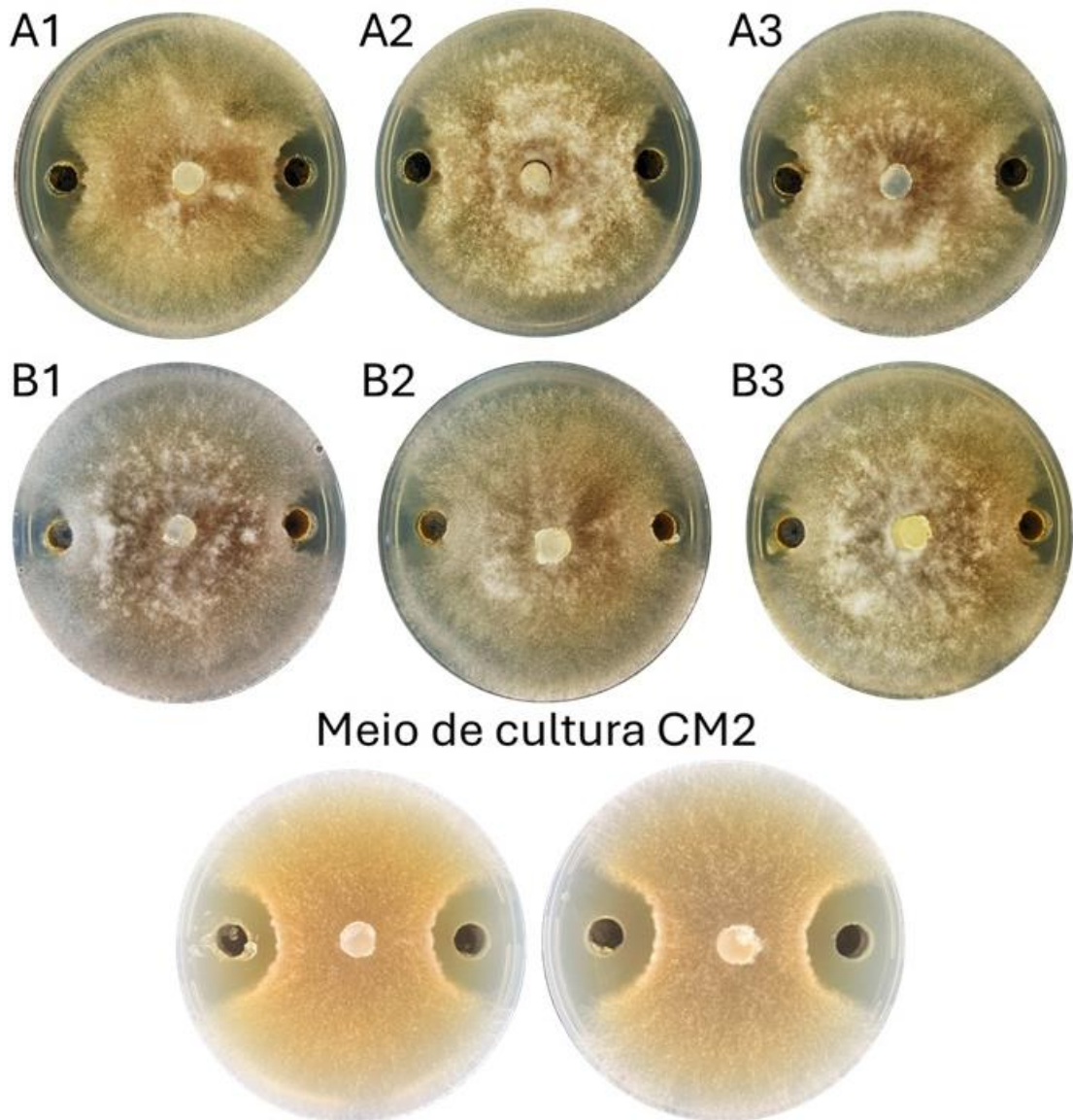
Assim evidenciando a necessidade nutricional do microrganismo *B. velezensis* CMRP6330 (LABIM 41) de maiores fontes de carbono e nitrogênio para maior produção de metabólitos antifúngicos com ação de inibição do crescimento micelial contra *S. sclerotiorum* e *C. truncatum*.

Tabela 14 – Teste de t-Student para avaliar diferença significativa entre o meio de cultura controle CM2 e formulação para otimização de metabólitos antifúngicos e concentração de UFC/mL

Formulação	Amostras (cm ²)			
	1	2	3	4
Atividade A. F	53,361	54,018	56,742	53,147
CM2	45,004	45,449	49,026	47,675
valor de t	-5,98			
p-valor	9,80E-04			

Formulação	Amostras (cm ²)			
	1	2	3	4
UFC/mL	56,53	57,335	56,924	56,334
CM2	45,004	45,449	49,026	47,675
valor de t	10,27			
p-valor	4,98E-05			

Figura 20 – Resultado do teste de difusão em ágar contra *S. sclerotiorum*, com as formulações premeditadas na PCCR como ótimo em atividade antifúngica (A) e densidade de UFC/mL (B), seguido dos controles (C) e meio de cultura controle CM2



Após os processos fermentativos a formulação para otimização na atividade antifúngica apresentou uma média de $8,333 \times 10^8 \pm 5,777 \times 10^7$ UFC/mL, enquanto a formulação para otimização na densidade de UFC/mL apresentou uma média de $2,347 \times 10^9 \pm 3,786 \times 10^7$ UFC/mL estando fora do intervalo previsto pelo modelo matemático de $1,674 \times 10^{10} \pm 2,994 \times 10^9$ UFC/mL, porém demonstrou maior concentração de unidades formadoras de colônia por mL que o meio CM2.

4.5.2 VALIDAÇÃO DA FORMULAÇÃO PARA OTIMIZAÇÃO DE MOLÉCULAS ANTIFÚNGICAS EM BIORREATOR DE BANCADA

A leitura de densidade óptica da formulação expressa pela **Tabela 5** foi realizada tanto com o meio de cultura estéril antes da fermentação quanto nos pontos de coleta estabelecidos anteriormente, em seguida os dados foram agrupados de forma a acompanhar o crescimento da biomassa microbiana em função do tempo de fermentação, como mostra a **Tabela 14**.

Tabela 5 – Composição do meio de cultivo para produção de metabólitos antifúngicos

Insumos	Proporções (g/L)
Glicose	12,95
Peptona	6,28
Colágeno	0,1

Tabela 15 – Densidade óptica (600nm) do meio de cultura utilizado (ML) e das alíquotas de fermentado, medidas em triplicata (L) para cada tempo de coleta (T), seguido das suas respectivas médias e leitura real (X_{Do})

TEMPO	L1	L2	L3	MÉDIA	X_{Do}
ML	0,441	0,45	0,415	0,435	2,176
T0	0,792	0,784	0,788	0,788	3,940
T3	0,881	0,873	0,894	0,882	4,413
T6	0,812	0,833	0,848	0,831	7,479
T9	0,484	0,492	0,491	0,489	12,714
T12	0,414	0,423	0,395	0,410	9,308
T18	0,394	0,384	0,374	0,384	9,984
T24	0,515	0,499	0,500	0,504	13,121
T30	0,385	0,383	0,376	0,381	9,914
T36	0,386	0,392	0,389	0,389	10,114
T48	0,452	0,463	0,445	0,453	11,786
T60	0,479	0,487	0,470	0,478	12,445
T72	0,411	0,400	0,389	0,400	10,400

Além dos dados de densidade óptica, os respectivos pontos de coleta descritos na metodologia para validação de UFC/mL e quantificação de esporulação foram coletados e agrupados os dados como mostra a **Tabela 15**. O que possibilitou perceber que o fermentado após 60 horas de fermentação passou a apresentar

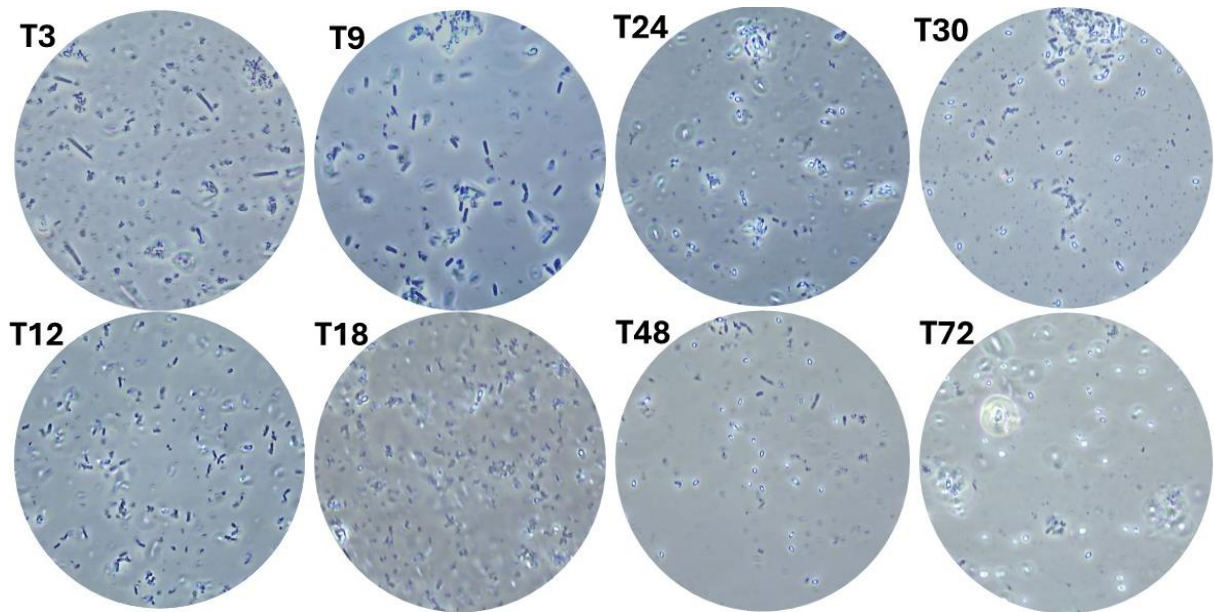
esporulação de quase 100%, ao qual este valor persistiu até o final da fermentação. Sendo este um dado de extrema importância, dado que o processo de esporulação contribui diretamente para a eficiência dos processos de produção de insumos microbiológicos, em contrapartida dos microrganismos esporulados não contribuirão para a produção de metabólitos antifúngicos por conta do seu metabolismo inerte. Os esporos apresentam resistência a condições ambientais adversas, como temperaturas extremas, radiação UV e desidratação, garantindo a viabilidade dos microrganismos durante o armazenamento e após a aplicação no campo. Essa resistência é crucial para manter a eficácia dos insumos microbiológicos em diferentes condições ambientais (SILVA et al., 2022). Essa capacidade é particularmente vantajosa na produção de inoculantes microbianos, pois assegura que as bactérias mantenham sua viabilidade e eficácia após os processos industriais de secagem e armazenamento (ARAÚJO et al., 2021).

Tabela 16 – UFC/mL no fermentado coletado para cada tempo de coleta, seu desvio padrão (Desv. Pad) e validação para formação de endósporos para o tempo T48, 60 e 72 acompanhado de seus respectivos valores de desvio padrão

Tempo	UFC/mL	Desv. Pad	UFC/mL (Endósporo)	Desv. Pad
T0	$1,50 \times 10^7$	$1,57 \times 10^6$	-	-
T12	$3,30 \times 10^9$	$7,55 \times 10^8$	-	-
T24	$7,33 \times 10^8$	$1,15 \times 10^8$	-	-
T36	$1,70 \times 10^9$	$3,46 \times 10^8$	-	-
T48	$1,80 \times 10^9$	$4,00 \times 10^8$	$9,97 \times 10^8$	$4,51 \times 10^7$
T60	$1,39 \times 10^9$	$1,67 \times 10^8$	$1,03 \times 10^9$	$1,07 \times 10^8$
T72	$1,19 \times 10^9$	$1,76 \times 10^8$	$1,16 \times 10^9$	$1,55 \times 10^8$

Foi possível também observar, através dos pontos de coletas e microscopia óptica, o processo de esporulação com o decorrer do tempo de fermentação, como é possível observar através da **Figura 21**.

Figura 21 – Microscopia de contraste de fase do fermentado em seus respectivos pontos de coleta em objetiva de 100x



As amostras de fermentado retiradas nos tempos T0, T12, T24, T48, T60 e T72 foram qualificadas quanto à produção de moléculas antifúngicas e assim obtendo os resultados da **Figura 22**, contra *S. sclerotiorum* e **Figura 23**, contra *C. truncatum*. Onde a formulação apresentou produção de metabólitos antifúngicos de forma que, em 24 horas de fermentação o fermentado apresentou o pico mais alto na produção destas moléculas. Os dados referentes à dimensão dos halos foram representadas seguindo a **Tabela 16** para o tratamento contra *S. sclerotiorum* e **Tabela 17** para *C. truncatum*.

Figura 22 – Testes de difusão em ágar e observação da inibição do crescimento micelial contra *S. sclerotiorum* com as amostras dos respectivos pontos de coleta



Tabela 17 – Valores dos raios de inibição do crescimento micelial no sentido horizontal (H) e vertical (V) em relação ao poço tratamento contra *S. sclerotiorum*

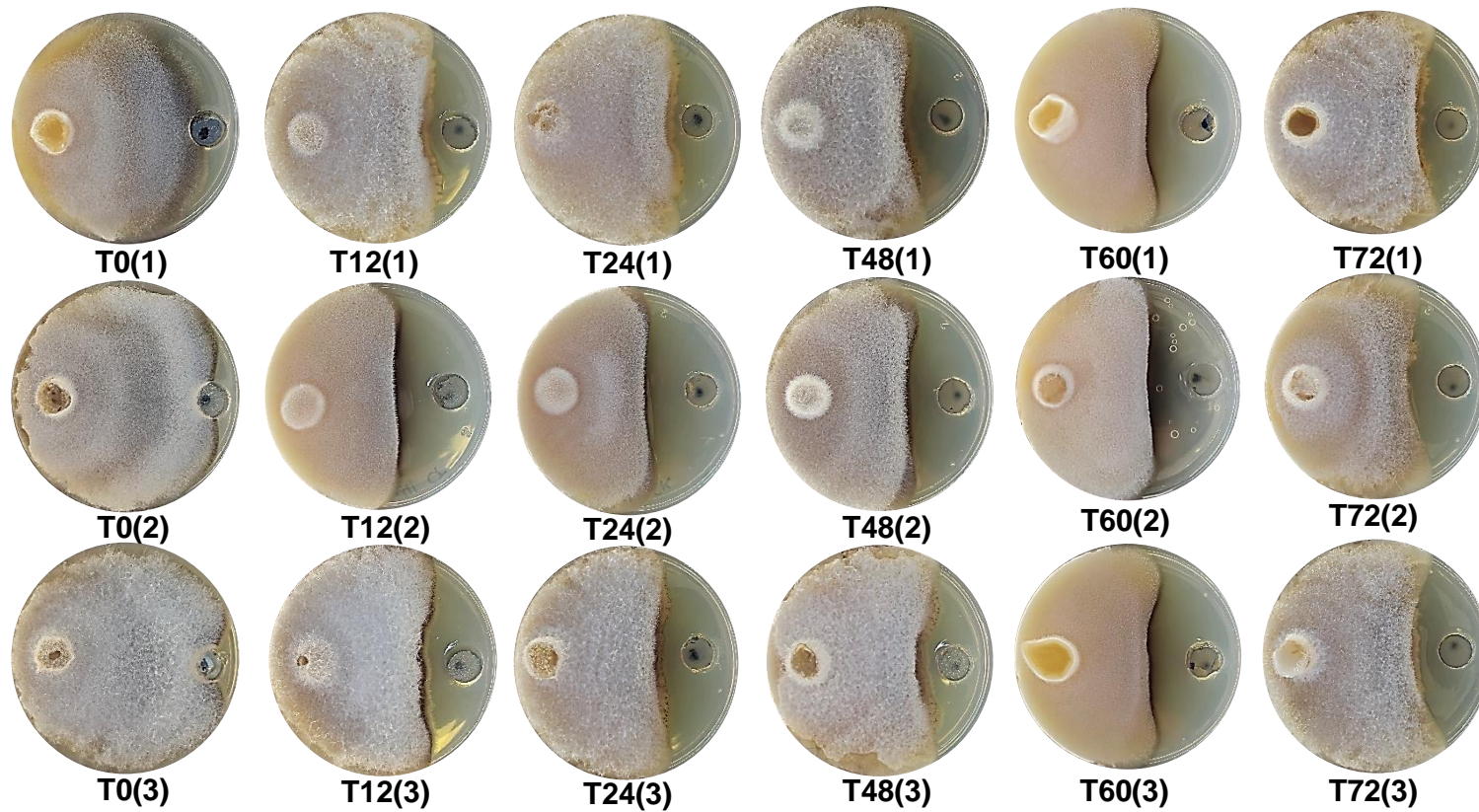
Tempo	1V	1H	2V	2H	3V	3H	4V	4H	5V	5H	6V	6H	Média
T12	1,461	4,022	1,447	1,832	1,435	1,546	1,874	1,981	1,568	1,956	1,366	1,288	1,814
T24	1,947	2,208	1,848	2,043	1,859	2,286	1,741	2,745	1,871	2,286	1,804	2,214	2,071
T48	1,856	2,238	1,81	2,096	1,637	1,672	1,832	1,854	1,716	2,096	1,839	2,211	1,904
T60	1,625	2,208	1,703	1,975	1,627	2,016	1,717	1,84	1,632	2,018	1,522	2,218	1,841
T72	1,677	1,826	1,721	1,736	1,823	1,703	1,602	1,883	1,703	1,799	1,788	1,988	1,770

Tanto os valores dos halos para *S. sclerotiorum* e *C. truncatum* foram submetidos a análise estatísticas para validar possíveis diferenças estatísticas entre as médias dos tempos (ANOVA). Onde para os halos contra *S. sclerotiorum*, como representa a **Tabela 16**, foi obtido $F_{cal} = 1,077$ e $p\text{-valor} = 0,377$ ($p\text{-valor} > 0,05$), assim não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos halos, indicando que as médias entre os halos mantiveram-se homogêneas com o decorrer da fermentação. Para os halos contra *C. truncatum*, representados pela **Tabela 17**, pela foi obtido $F_{cal} = 0,876$ e $p\text{-valor} = 0,493$ ($p\text{-valor} > 0,05$), assim não houve diferença estatisticamente significativas entre as médias dos halos, indicando que as médias entre os halos mantiveram-se homogêneas com o decorrer da fermentação. Descartando a possibilidade da concentração de metabólitos antifúngicos ter diminuído significativamente com o decorrer da fermentação.

Tabela 18 – Valores do raio de inibição do crescimento micelial com o tratamento contra *C. truncatum*

Tempo	CT1	CT2	CT3	CT4	CT5	CT6	Média
T12	1,747	2,149	1,817	2,510	2,337	1,596	2,026
T24	1,800	1,906	2,323	-	2,472	2,432	2,186
T48	1,705	2,413	1,664	1,237	2,212	2,047	1,879
T60	2,290	1,786	2,525	2,237	1,841	2,315	2,165
T72	1,914	1,980	1,928	2,140	2,180	1,990	2,022

Figura 23 – Testes de difusão em ágar e observação da inibição do crescimento micelial contra *C. truncatum* com as amostras dos respectivos pontos de coleta



A partir dos dados obtidos de densidade óptica e de inibição de crescimento micelial com ambos os fungos, foi possível montar duas curvas de crescimento microbiano e produção de metabólitos antifúngicos para os respectivos fungos, como mostra a **Figura 24** e **Figura 25**.

Figura 24 – Gráfico da curva de crescimento da biomassa microbiana por densidade óptica (D.O) e tamanho do raio de inibição micelial contra o fungo *C. truncatum* (CT) em função dos tempos de coleta estabelecidos

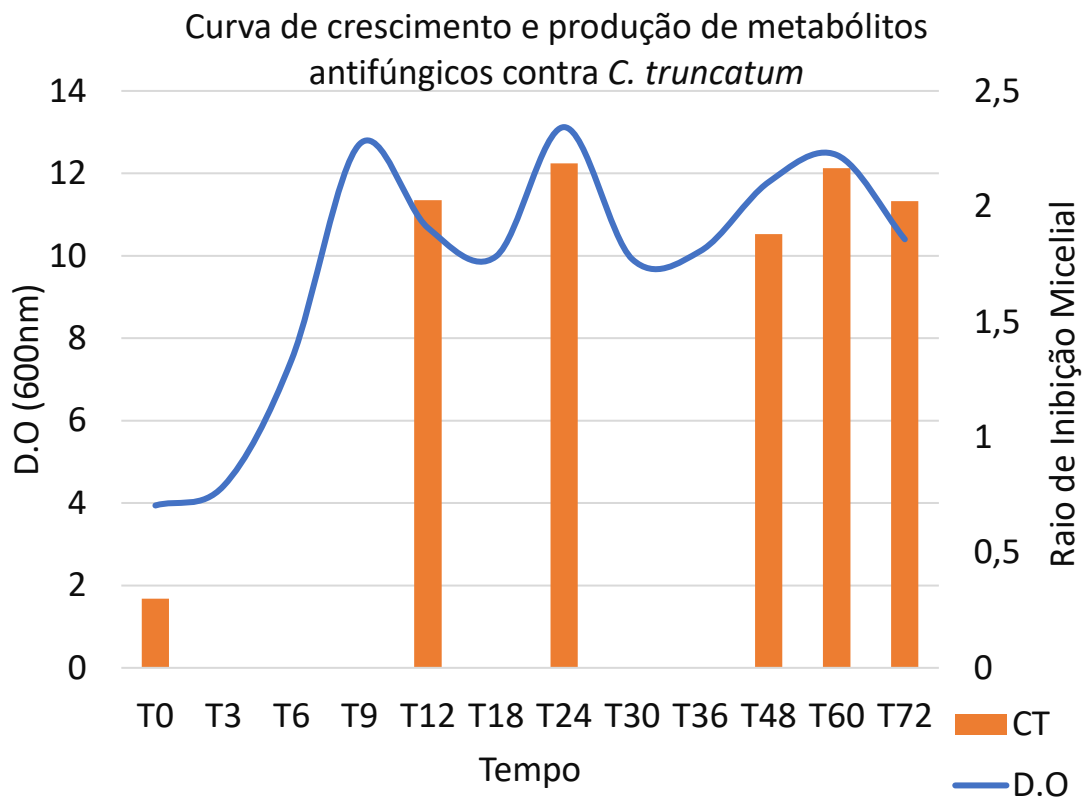
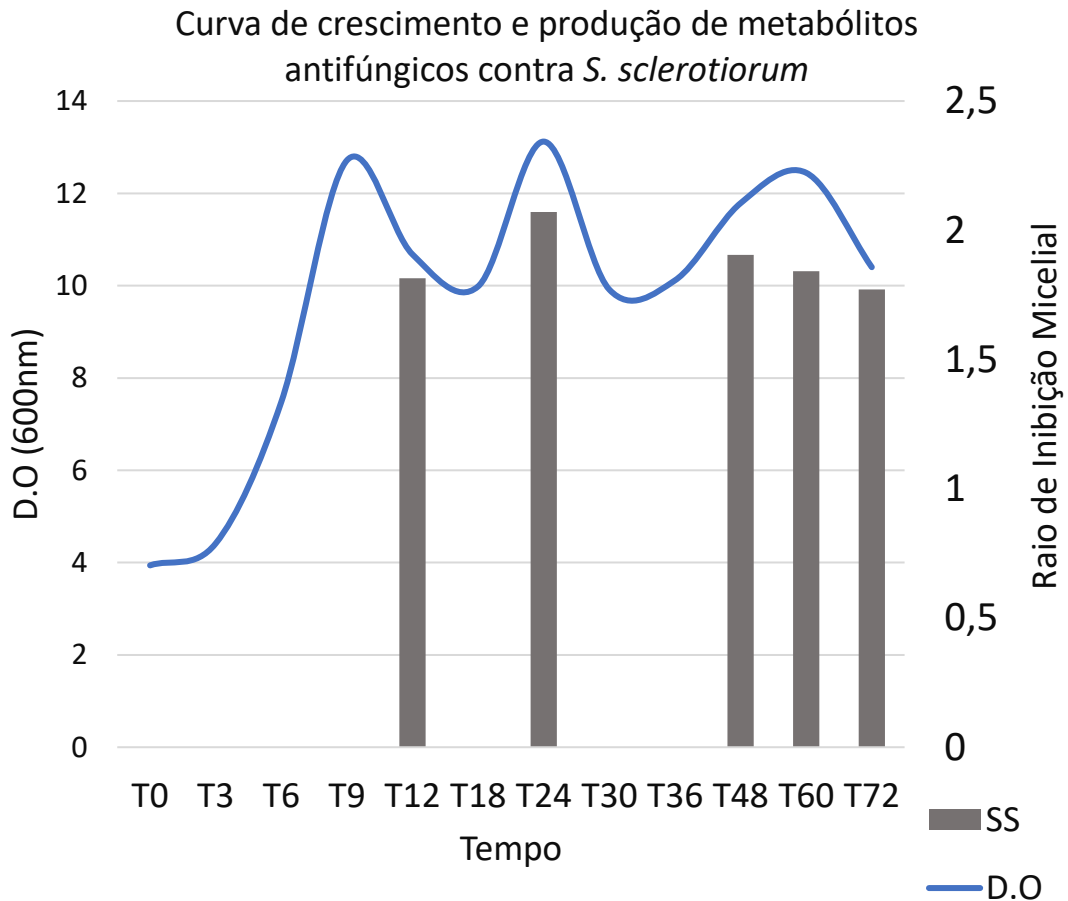


Figura 25 – Gráfico da curva de crescimento da biomassa microbiana por densidade óptica (D.O) e tamanho do raio de inibição micelial contra o fungo *S. sclerotiorum* (SS) em função dos tempos de coleta estabelecidos



Por meio dos gráficos de crescimento é possível observar um crescimento exponencial na biomassa microbiana a partir das 3 horas de fermentação e terminando em aproximadamente 9 horas. Logo após, a densidade óptica passa por um período de oscilação entre altas e baixas concentrações de biomassa, sendo também impossível inferir um período de crescimento estacionário, dado que os valores da DO a partir do tempo 12 diferem-se entre si estatisticamente através de um teste estatístico de comparações múltiplas (Tukey, R Project), como mostra a **Tabela 18**.

Tabela 19 – Valores obtidos no teste estatístico de comparações múltiplas (Tukey, R Project) entre os valores obtidos de D.O dos respectivos tempos utilizados

Tempo	Valor	Grupos
T24	0,50466	a
T60	0,47866	ab
T48	0,45333	b
T12	0,41066	c
T72	0,4	c
T36	0,389	c

5. CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que o meio de cultura CM2, utilizado como controle, apresentou uma boa produção de metabólitos antifúngicos, com inibição do crescimento micelial. No entanto, a tentativa de otimização do meio de cultura por meio do PCCR permitiu identificar formulações com maior potencial para a produção de biomassa, embora a produção de metabólitos antifúngicos tenha sido inferior ao esperado. Isso sugere que a concentração e proporção de nutrientes no meio de cultura são fatores críticos para a produção de metabólitos antifúngicos, e que o meio CM2, com maior concentração de fontes de carbono e nitrogênio, pode ser mais adequado para essa finalidade. Novos ensaios devem ser conduzidos para confirmar se as fontes sugeridas pelo modelo podem ser utilizadas, com a possibilidade de aumentar a concentração de cada insumo

A validação da formulação otimizada em biorreator de bancada confirmou a viabilidade do processo fermentativo, além disso, a esporulação do microrganismo foi observada a partir de 60 horas de fermentação, indicando a viabilidade do uso de *B. velezensis* LABIM41 na formulação de bioinsumos, dada a resistência dos esporos a condições adversas. Além de que, pelo fato de o fermento apresentar uma taxa de esporulação de aproximadamente 100% nesta mesma faixa de tempo, sugere que o processo fermentativo possa terminar neste mesmo momento, dado que os endósporos não contribuem mais para a produção de metabólitos e não havendo razões pelas quais finalizar as 12 horas de fermentação restantes.

A partir dos resultados obtidos dos processos fermentativos e controle contra ambos os fungos apresentados no trabalho, ressalta-se o maior potencial de antibiose contra o fungo *C. truncatum*, mostrando um potencial maior da linhagem bacteriana *B. velezensis* LABIM41 contra fungos fitopatogênicos característicos de fim de ciclo e possibilitando a formulação de um produto biológico de aplicação foliar.

Em conclusão, este trabalho demonstra o potencial da bactéria utilizada no trabalho como agente de biocontrole de fungos fitopatogênicos, destacando a importância da otimização de processos fermentativos para a produção de bioinsumos. Apesar dos desafios encontrados na otimização da produção de metabólitos antifúngicos, os resultados obtidos abrem caminho para futuras pesquisas visando o aprimoramento das formulações e a aplicação em escala industrial. A utilização de bioinsumos representa uma alternativa sustentável e eficaz para o controle de doenças agrícolas, contribuindo para a redução do uso de produtos químicos e para a promoção de uma agricultura mais sustentável.

REFERÊNCIAS

ABBAS, M. et al. Review on integrated disease and pest management of field crops. *International Journal of Tropical Insect Science*, v. 42, p. 3235, 1 out. 2022.

ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; YORINORI, J.T.; SILVA, J.F.V.; HENNING, A.A. Doenças da soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. *Manual de Fitopatologia v. 2: Doenças das plantas cultivadas*. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p. 642 - 664.

ARAÚJO, J. M. et al. Avanços na produção e formulação de inoculantes microbianos: uma revisão. *Química Nova*, v. 44, n. 4, p. 439-453, 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/y3NDqQQZ3NRgXyStGvqfLKHS/>.

BAPTISTA, J. P. et al. Antifungal activity and genomic characterization of the biocontrol agent *Bacillus velezensis* CMRP 4489. *Scientific Reports*, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2022.

BARRETO, R. W.; PEREIRA, O. L.; DIAS, T. A. Caracterização molecular e diversidade genética de *Colletotrichum truncatum* em leguminosas no Brasil. *Tropical Plant Pathology*, v. 43, n. 3, p. 255-263, 2018.

BATISTA, B. D.; SINGH, B. K. Realities and hopes in the application of microbial tools in agriculture. *Microbial Biotechnology*, v. 14, n. 4, p. 1258–1268, 1 jul. 2021.

BETTIOL, W., org. *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991.

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology*, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.

BOX, G. E. P.; WILSON, K. B. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of the Royal Statistical Society*, v. 13, n. 1, p. 1-45, 1951.

BUTALA, M.; DRAGOŠ, A. Unique relationships between phages and endospore-forming hosts. *Trends in Microbiology*. v. p. 2174, 2022.

CAULIER, S. et al. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in Microbiology*. v. 10, p. 302, 2019.

CHAVES, G. M.; ZAMBOLIM, L. Conceito de doenças em plantas. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, 1985.

DANG, T.; CHEN, J.; ZHANG, Y.; GAO, H. Mechanisms of pathogenicity in *Colletotrichum truncatum*: a hemibiotrophic fungal pathogen. *Journal of Plant Pathology*, v. 97, n. 2, p. 301-312, 2015.

DE BRUIN, M. C. et al. Iturin family lipopeptides as potent antifungal agents: Molecular mechanisms and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 105, p. 3451-3462, 2021.

DEGUINE, J. P. et al. Integrated pest management: good intentions, hard realities. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, v. 41, p. 38, mar. 2021.

DEL RÍO, C. L. et al. Advances in the management of *Sclerotinia sclerotiorum*: Integrated approaches and future perspectives. *Plant Pathology Journal*, v. 36, n. 5, p. 385-398, 2020.

DIAZ, R. E.; SANTOS, J. C.; ALVES, J. S. Produção de enzimas degradativas e agressividade de isolados de *Colletotrichum truncatum* em soja. *Fitopatologia Brasileira*, v. 42, p. 499-507, 2017.

FÁBRI, T. et al. Surfactin production and its biotechnological potential in antimicrobial applications. *Biotechnology Advances*, v. 51, p. 107710, 2021.

FAN, B. et al. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in Microbiology* v. 9, p. 2491, 16 out. 2018.

FERNÁNDEZ, L. G. et al. Optimization of Biofertilizer Production Using Response Surface Methodology. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 44, p. 1115-1128, 2021.

FÉLIX, J. S. *Otimização da produção de lipopeptídeos por Bacillus velezensis visando ao controle de fungos fitopatogênicos*. 2023. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2023. Disponível em: <https://locus.ufv.br/items/8d168441-79d0-49b5-960f-932f6cde0fbf>. Acesso em: 4 fev. 2025.

FIGUEIREDO, M.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E.R.S. *Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura*. Guaíba: Agrolivros, 568p, 2008.

FRANÇA NETO, J.B.; HENNING, A.A. *Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja*. Londrina: Embrapa CNPSo, 1984. n.9, 39p.

GUJARATI, P. P.; DESAI, R. S.; PATEL, N. P. Application of response surface methodology for optimization of microbial medium. *Journal of Applied Microbiology*, v. 129, n. 4, p. 873–884, 2020.

HIRAKURI, M. H. Perdas econômicas geradas por estresses bióticos e abióticos na produção brasileira de soja no período 2016-2020. Londrina: Embrapa Soja, 2021. 7 p. (Circular Técnica, 169).

KLEIN, H. S.; VIDAL LUNA, F. The growth of the soybean frontier in south america: The case of brazil and argentina. *Revista de Historia Económica - Journal of Iberian and Latin American Economic History*, v. 39, n. 3, p. 427–468, 12 dez. 2021.

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

MACHADO, J; POZZA, E.A. Razões e procedimentos para o estabelecimento de padrões de tolerância a patógenos em sementes. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). *Sementes: qualidade fitos sanitária*. Viçosa, MG: UFV, 2005. p.375-398.

MAPA – Ministério da Agricultura e Pecuária. *Conceitos, conheça a base conceitual do Programa Nacional de Bioinsumos*. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/ptbr/assuntos/inovacao/bioinsumos/o-programa/conceitos>. Acesso em: 04 ago. 2024.

MAPA. *Agrofit: consulta aberta*. 2022. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agro-fit_cons>. Acesso em: 04 ago. 2024.

MEYER, M. C. et al. *Bioinsumos na Cultura da Soja*. 1ª edição. Brasília: Embrapa Soja, 2022.

MEYER, M. C.; CAMARGO, R. L.; COSTA, R. V.; JULIATTI, F. C. Ocorrência de *Sclerotinia sclerotiorum* em cultivos de girassol no Brasil. *Summa Phytopathologica*, v. 43, n. 4, p. 291-297, 2017.

MICHEREFF, S. J. *Fundamentos de Fitopatologia*. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, 2001.

MONTGOMERY, D. C. *Design and Analysis of Experiments*. 9. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2017.

MONTGOMERY, Douglas C. *Design and analysis of experiments*. 10th ed. Hoboken: Wiley, 2020.

MORALES-CEDEÑO, L. R. et al. Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre- and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives. *Microbiological Research* v. 242, p. 126612, 1 jan. 2021.

MUKHERJEE, A.; JONES, C.; MARZEC, M. Antifungal lipopeptides from *Bacillus* spp.: Mode of action and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 104, p. 5217-5232, 2020.

NOOP, K. R.; MEENA, R.; PRADEEP, C. Optimization of fermentation media for microbial biopolymer production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 103, p. 1023-1032, 2019.

PERES, N. A.; KIMATI, H.; MICHEREFF, S. J. Epidemiologia e manejo da antracnose em leguminosas. *Revista Brasileira de Fitopatologia*, v. 30, n. 4, p. 314-322, 2005.

PRASANNA, V. K.; BHAT, R. G.; MANJUNATH, M. Genetic diversity of *Colletotrichum truncatum* in pulse crops from India. *Plant Pathology Journal*, v. 33, p. 89-97, 2017.

PROTIMIZA. Jaboticabal: Protimiza Software, 2025. Disponível em: <http://www.protimiza.com.br>. Acesso em: 20 jan. 2025.

PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology*, v. 69, p. 875-880, 1979.

RABBEE, M. F. et al. *Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules*. v. 24, p. 1046, 16 mar. 2019.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2024. Disponível em: <https://www.r-project.org/>.

RODRIGUES, M. I. LEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos. – 3a. Ed. – Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2014.

LUCIANA, P, S. et al. *Bacillus* lipopeptides as powerful pest control agents for a more sustainable and healthy agriculture: recent studies and innovations. *Planta*, [S. l.], v. 251, n. 3, p. 1–15, 2020. ISSN: 14322048. ISBN: 0123456789. DOI: 10.1007/s00425-020-03357-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00425-020-3703357-7>.

SILVA, R. A. et al. *Bioinsumos na cultura da soja*. Londrina: Embrapa Soja, 2022. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1144414/1/Cap-29-Bioinsumos-na-cultura-da-soja.pdf>. Acesso em: 31 jan. 2025.

SOUZA, K. R.; MENEGHETTI, B. A.; SILVA, A. M. da; et al. Resíduos de agrotóxicos no leite humano e seus impactos na saúde materno-infantil: resultados de estudos brasileiros. *Segurança Alimentar e Nutricional*, v. 22, n. 2, p. 608-617, 2015.

SINGH, B.; KUMAR, R.; AHUJA, N.; KOHLI, K. *Optimization Techniques in Pharmaceutical Formulation and Processing*. 1. ed. San Diego: Academic Press, 2020.

SIQUEIRA, S. L. , KRUSE, M. H. L. (2008). Agrotóxicos e saúde humana: contribuição dos profissionais do campo da saúde. *Revista Da Escola De Enfermagem Da USP*.

SNA – Sociedade Nacional de Agricultura. *Mercado de insumos biológicos no Brasil poderá alcançar R\$ 6.2 bilhões até 2025*. Disponível em: <https://www.sna.agr.br/mercado-brasileiro-de-insumos-biologicos-devera-atingir-r-6-2-milhoes-ate-2025/>. Acesso em: 28 dez 2022.

STABILE, M. C. C. et al. Solving Brazil's land use puzzle: Increasing production and slowing Amazon deforestation. *Land Use Policy*, v. 91, p. 362, 1 fev. 2020.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. *Principles of Fermentation Technology*. 2ª edição. Oxford, 2013.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, v. 56, p. 845-857, 2005.

STENBERG, J. A. A Conceptual Framework for Integrated Pest Management. *Trends in Plant Science*. v. 22, n. 9, 1 set. 2017.

TEIXEIRA, G.M. et al; . Draft genome of *Bacillus velezensis* CMRP6330, a suitable biocontrol agent for disease management in crops. *Microbiol Resour Announc* 13:e00657-24. 2024.

<https://doi.org/10.1128/mra.00657-24>

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. Induced resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology*, v. 36, p. 453-483, 1998.

WANG, W., et al. (2017). Hormonal interactions in plant defense responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(1), 5–20.

WILLETS, H. J.; WONG, J. A. L. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor*, and *S. trifoliorum*. *Phytopathology*, v. 70, p. 1343-1349, 1980.

WILLETS, H. J.; WONG, J. A. L. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor* and *S. trifoliorum*: with emphasis on specific nomenclature. *Botanical Review*, v. 46, n. 2, p. 101-165, 1980.

XIA, Shitou; XU, Yan; HOY, Ryan; ZHANG, Julia; QIN, Lei; LI, Xin. The notorious soilborne pathogenic fungus *sclerotinia sclerotiorum*: An update on genes studied with

mutant analysis. *Pathogens*, [S. l.], v. 9, n. 1, 2020. ISSN: 20760817. DOI: 10.3390/pathogens9010027.

ZHANG, L. et al. The interaction of fengycin lipopeptides with fungal cell membranes: A biophysical perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1864, p. 183842, 2022.