



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO
AMBIENTE – PPGSHMA**

ALLYSON RODRIGO DE OLIVEIRA LOPES

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E VIABILIDADE DE *Trichoderma
asperellum* T356 em CÁPSULAS DE ALGINATO**

**Vitória de Santo Antão
2018**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE

ALLYSON RODRIGO DE OLIVEIRA LOPES

PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E VIABILIDADE DE *Trichoderma*
asperellum T356 em CÁPSULAS DE ALGINATO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Christine Lamenha Luna
Finkler

Coorientador: Dr. Gabriel Moura Mascarin

Vitória de Santo Antão

2018

Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Jaciane Freire Santana, CRB4-2018

L864p Lopes, Allyson Rodrigo de Oliveira.
Preparação, caracterização e viabilidade de trichoderma asperellum t356 em cápsulas de alginato / Allyson Rodrigo de Oliveira Lopes. - Vitória de Santo Antão, 2018.
65 folhas; il.: color.

Orientadora: Christine Lamenha Luna Finkler.
Coorientador: Gabriel Moura Mascarin
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, 2018.
Inclui referências.

1. Fungos. 2. Biocontrole. 3. Encapsulação. I. Finkler, Christine Lamenha Luna (Orientadora). II. Mascarin. Gabriel Moura (Coorientador). III. Título.

579.5 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-13/2019

ALLYSON RODRIGO DE OLIVEIRA LOPES

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E VIABILIDADE DE *TRICHODERMA*
ASPERELLUM T356 EM CÁPSULAS DE ALGINATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Saúde Humana e Meio Ambiente.

Aprovado em: **28/08/2018**.

Prof^o. Dra. Christine Lamenha Luna Finkler
Universidade Federal de Pernambuco

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Gustavo Rubens de Castro Torres
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dra. Idjane Santana de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho a Deus por me dar o dom da vida. Aos meus pais, Nelson Ferreira Lopes e Maria do Carmo Oliveira Lopes e à minha esposa, Anayres Silva de Lima, por todo carinho, amor e incentivo. Às minhas filhas, Lavínia de Lima Lopes e Luísa de Lima Lopes, por serem tudo para mim.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof. Dra. Christine Lamenha Luna Finkler, que me ajudou muito no desenvolvimento deste trabalho, por toda paciência e serenidade para me mostrar os melhores caminhos a seguir. Uma excelente profissional, de grande conhecimento, competência, humildade e de um grande coração. Obrigado por todo conhecimento compartilhado, pela oportunidade de fazer parte da equipe, pela confiança no trabalho e por todo apoio e atenção durante todo o tempo. Levarei para toda a vida o aprendizado adquirido.

Ao meu co-orientador, Gabriel Moura Mascarin, por todo apoio nos experimentos e também por todo o conhecimento compartilhado.

Ao Laboratório de Bioprocessos que me acolheu e principalmente a Liany F. de A. Melo, por compartilhar conhecimentos, tirar as dúvidas e me ajudar nos experimentos, e ao amigo Gabriel Olivo Locatelli, por todo apoio, conhecimentos compartilhados, amizade e também por sempre estar presente para ensinar os experimentos e tirar todas as dúvidas.

Ao meu amigo, Izaías Felizardo, pelo compartilhamento de conhecimentos na escrita e pelo apoio de sempre.

Aos amigos de turma do mestrado, pela amizade e por toda ajuda e apoio.

A todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, pelos conhecimentos adquiridos.

RESUMO

O controle biológico constitui uma estratégia de grande interesse e importância para viabilizar a redução ou substituição do uso de pesticidas químicos sintéticos no controle de pragas na agricultura. Um organismo amplamente utilizado no biocontrole de doenças de plantas e de grande interesse para a indústria de biopesticidas é o fungo *Trichoderma*. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a viabilidade de propágulos de *Trichoderma asperellum* T356, sendo estes microescleródios (MS) e conídios submersos, em cápsulas de alginato íntegras e liofilizadas. O fungo foi produzido por fermentação submersa em frascos agitados e, após a recuperação dos propágulos por filtração, estes foram encapsulados em matriz de alginato pelo método de extrusão. Foi avaliada a cinética de produção de microescleródios, enquanto a concentração e a viabilidade de conídios e de microescleródios nas cápsulas íntegras e liofilizadas foi monitorada ao longo de 120 dias de armazenamento sob diferentes temperaturas. As cápsulas íntegras e liofilizadas foram caracterizadas em termos de tamanho, umidade, rendimento e espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR. As cápsulas íntegras foram ainda analisadas em termos do seu peso médio, número médio e densidade aparente, enquanto que as cápsulas liofilizadas foram submetidas à análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Em relação à viabilidade dos propágulos, foi observada uma diminuição gradativa ao longo do tempo para ambas as formulações. Os espectros FTIR são sugestivos de interações entre o polímero alginato e o microrganismo. Os resultados obtidos demonstram que foi possível obter cápsulas de alginato contendo *T. asperellum* T356, com manutenção da viabilidade do fungo após o processo de encapsulação e liofilização, constituindo um grande potencial para uso em controle biológico.

Palavras-chaves: Alginato. Biocontrole. Fungos. Encapsulação.

ABSTRACT

Biological control is a strategy of great interest and importance to enable the reduction or substitution of the use of synthetic chemical pesticides in pest control in agriculture. An organism widely used in the biocontrol of plant diseases and of great interest to the biopesticides industry is the fungus *Trichoderma*. The present work had the objective of evaluating the viability of *Trichoderma asperellum* T356 propagules, being these microsclerodes (MS) and conidia submerged in intact and lyophilized alginate capsules. The fungus was produced by submerged fermentation in shaken flasks and, after recovery of the propagules by filtration, they were encapsulated in the alginate matrix by the extrusion method. Microsclerotia production kinetics were evaluated, while concentration and viability of conidia and microsclerodes in the intact and lyophilized capsules were monitored for 120 days of storage under different temperatures. The intact and lyophilized capsules were characterized in terms of size, moisture, yield and Fourier Transform Infrared - FTIR spectroscopy. The intact capsules were further analyzed in terms of their mean weight, mean number and apparent density, while the lyophilized capsules were submitted to scanning electron microscopy (SEM) analysis. In relation to the viability of the propagules, a gradual decrease over time was observed for both formulations. FTIR spectra are suggestive of interactions between the polymer alginate and the microorganism. The results obtained show that it was possible to obtain alginate capsules containing *T. asperellum* T356, with maintenance of the viability of the fungus after the process of encapsulation and lyophilization, constituting a great potential for use in biological control.

Keywords: Alginate. Biocontrol. Fungi. Encapsulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspecto morfológico da cultura de <i>Trichoderma asperellum</i> T356 crescida em meio BDA após 21 dias a 28 oC.	33
Figura 2 – Frascos contendo a cultura liofilizada de <i>Trichoderma asperellum</i> T356.	34
Figura 3 – Frascos contendo a cultura de <i>Trichoderma asperellum</i> T356 após 7 dias de cultivo a 28°C.	35
Figura 4 – Etapa de filtração das células de <i>Trichoderma asperellum</i> T356.	35
Figura 5– Sistema de microencapsulação utilizado para a obtenção de cápsulas de alginato contendo <i>Trichoderma asperellum</i> T356.	36
Figura 6 – Microcápsulas de <i>Trichoderma asperellum</i> T356 em repouso após a extrusão	37
Figura 7– Microcápsulas de <i>Trichoderma asperellum</i> T356 (íntegras e liofilizadas) armazenadas nas temperaturas de 25 °C (A), 35 °C (B) e 8° C (C).	37
Figura 8– Fotomicrografia de microescleródio de <i>T. asperellum</i> T356 após 4 dias de crescimento em meio de cultura líquido.	38
Figura 9– Produção de microescleródios por <i>Trichoderma asperellum</i> T356 em frascos agitados a 300 rpm por 7 dias a 28 oC.	41
Figura 10 – Concentração de conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> T356 em cápsulas íntegras (A) e liofilizadas (B) durante 120 dias de armazenamento a 8, 25 e 35 oC.	43
Figura 11 – Concentração de microescleródios de <i>Trichoderma asperellum</i> T356 em cápsulas íntegras (A) e liofilizadas (B) durante 120 dias de armazenamento a 8, 25 e 35 oC.	45
Figura 12 – Concentração de células viáveis (UFC/g) de <i>Trichoderma asperellum</i> T356 em cápsulas íntegras e liofilizadas de acordo com a temperatura de armazenamento ao longo de 120 dias	46
Figura 13 – Imagens fotográficas das cápsulas íntegras de alginato armazenadas a temperatura ambiente (25 oC) sem o microrganismo (A) e com <i>Trichoderma asperellum</i> T356 (B).	47
Figura 14 – Imagens fotográficas das cápsulas liofilizadas de alginato armazenadas a temperatura ambiente (25 oC) sem o microrganismo (A) e com <i>Trichoderma asperellum</i> T356 (B).	47

Figura 15 – Micrografias obtidas por MEV para microcápsulasde alginato “vazias” secas por liofilização	50
Figura 16 – Micrografias obtidas por MEV para microcápsulas de alginato contendo Trichoderma asperellum T356 secas por liofilização	51
Figura 17 – Espectro infravermelho das amostras de alginato (A) e Trichoderma asperellum T356 (microrganismo liofilizado) (B).....	53
Figura 18 – Espectro infravermelho das cápsulas íntegras e liofilizadas de alginato, vazias ou contendo Trichoderma asperellum T356	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações de microescleródios e de conídios de <i>Trichoderma asperellum</i> T356 antes e após o preparo de cápsulas íntegras de alginato	42
Tabela 2 – Parâmetros avaliados para cápsulas de alginato “vazias” e contendo <i>Trichoderma asperellum</i> T356	48
Tabela 3– Umidade e rendimento de cápsulas íntegras em cápsulas liofilizadas para cápsulas de alginato “vazias” e contendo <i>Trichoderma asperellum</i> T356	49

LISTA DE SÍMBOLOS

M	Massa
V	Volume
D_{ap}	Densidade aparente

LISTA DE ABREVIATURAS

AGROFIT	Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários
BDA	Batata, Dextrose, Ágar
CAV	Centro Acadêmico de Vitória
DEMat	Departamento de Engenharia de Materiais
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MS	Microescleródios
TTM	Termo de Transferência de Material
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
USDA	U.S. Department of Agriculture

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 Controle químico	19
3.2 Controle biológico	21
3.3 <i>Trichoderma</i>	23
3.4 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	26
3.5 <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (Feijoeiro comum)	27
3.6 Formulações em alginato	28
4 CAPÍTULO 1: ARTIGO	30
PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E VIABILIDADE DE <i>Trichoderma asperellum</i> T356 em CÁPSULAS DE ALGINATO	30
5 DISCUSSÃO GERAL	57
6 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

O emprego de compostos químicos sintéticos tem sido a estratégia de controle de pragas mais utilizada ao longo dos últimos anos. Entretanto, o uso intensivo e indiscriminado favoreceu o aparecimento de pragas secundárias sem eliminar de fato os problemas existentes. Devido à sua toxicidade, causam prejuízos ao ambiente e à saúde humana (MARQUES *et al.*, 2004). Os impactos causados pelo uso dos agrotóxicos na agricultura têm preocupado a sociedade de maneira crescente, motivando o interesse pelo emprego de estratégias de controle biológico em consonância com o desenvolvimento de sistemas de cultivo mais sustentáveis e menos dependentes do uso de produtos químicos (MORANDI; BETTIOL, 2009).

O controle biológico possui definição abrangente e compreende todos os métodos que têm como objetivo biológico principal limitar o desenvolvimento de pragas. Pode ser obtido pela manipulação do ambiente de forma a favorecer a população dos microrganismos benéficos presentes, ou pela introdução massal de antagonistas previamente selecionados, e pesquisas na área vêm se tornando um frutífero campo de estudo. De acordo com Mascarin *et al.* (2018), existem atualmente 82 produtos biopesticidas registrados no Brasil, conforme consta no AGROFIT (Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários) do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) (AGROFIT, 2018). O sistema compreende um banco de informações sobre os produtos agroquímicos e afins registrados no Ministério da Agricultura. Ainda de acordo com Mascarin *et al.* (2018), os produtos estão distribuídos entre fungos (60%), bactérias (29%), baculovírus (10%) e nematóides (1%).

A aplicação de microrganismos vivos ou de metabólitos tem sido estudada com o objetivo de promover a germinação e o crescimento de sementes, bem como para o controle de certos patógenos (JUNGES, *et al.*, 2016). Uma estratégia empregada é o uso de fungos para o controle de patógenos de plantas em solos manipulados, embora não haja eliminação completa. Para que sejam mantidos níveis aceitáveis ao meio ambiente, assim como meios de produção economicamente viáveis, é necessário que as técnicas de utilização de fungos como agentes de biocontrole sejam aprimoradas (GRIGOLETTI JÚNIOR; SANTOS; AUER, 2000).

Dentre os fungos usados como controle de patógenos em campo, as espécies do gênero *Trichoderma*, Persoon, 1794, estão entre as mais utilizadas mundialmente para uso em controle de fitopatógenos, pois não são patogênicas aos seres humanos e a outros animais e estão presentes em praticamente todos os tipos de solo e associados à matéria orgânica, são facilmente isolados, cultivados e multiplicados e colonizam com eficiência o sistema radicular de diversas plantas (HARMAN, 2006; VERMA *et al.*, 2007). Tais fungos são os mais usados no controle biológico de fitopatógenos devido ao fácil desenvolvimento e à facilidade de serem cultivados em uma gama de substratos.

Um recente artigo publicado pelo grupo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) em colaboração com pesquisadores norte-americanos (KOBORI *et al.*, 2015) relata a produção de microescleródios por *T. harzianum*, sendo os microescleródios estruturas de resistência, formada até então exclusivamente em condições de cultivo líquido submerso, mais interessante para o desenvolvimento de formulações persistentes no campo e com maior estabilidade durante o armazenamento. Os microescleródios apresentam maior persistência no ambiente em relação aos conídios aéreos, e a produção de estruturas em um processo fermentativo submerso é de relevada importância biotecnológica e econômica. O presente artigo trabalhou com *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg 1999, em cultivo submerso para obtenção de microescleródios e conídios para utilizar em formulações encapsuladas como controle biológico.

Para o preparo de formulados com micélio e/ou conídios de fungos, tem-se utilizado o alginato de sódio como a principal matriz inerte da formulação em cápsulas esféricas. Segundo estudos, o alginato tem produzido formulações úteis no controle de patógenos na agricultura. O polissacarídeo não é tóxico ao microrganismo formulado nem ao homem, por isso tem sido utilizado também como aditivo em alguns alimentos industrializados e como materiais de moldagem em Odontologia. O alginato é utilizado junto com íons metálicos no preparo de um gel. Dependendo do tipo de alginato e do íon metálico utilizado na formulação, o gel torna-se inerte e com certa porosidade, o que auxilia na aplicabilidade do produto (MORETINI; MELO, 2007).

No contexto, o presente trabalho focou no preparo, caracterização e avaliação da viabilidade de propágulos de *Trichoderma asperellum* isolado T356 em cápsulas

de alginato. Trata-se do primeiro relato comparativo em relação ao encapsulamento da cepa considerando o emprego de cápsulas de alginato íntegras e liofilizadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Formular e caracterizar cápsulas de alginato contendo microescleródios e conídios submersos de *Trichoderma asperellum* T356.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a manutenção da cepa de *Trichoderma asperellum* T356;
- Cultivar o microrganismo e avaliar a cinética de produção de microescleródios;
- Desenvolver uma formulação sólida microencapsulada à base de alginato na forma de cápsulas frescas íntegras e de cápsulas liofilizadas;
- Avaliar a viabilidade dos propágulos ao longo do tempo sob condições de armazenamento;
- Caracterizar as formulações de acordo com propriedades físico-químicas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Controle químico

O controle químico é compreendido como o uso de substâncias ou misturas de substâncias químicas para prevenção, destruição e inibição dos efeitos prejudiciais causados por microrganismos. O uso do termo defensivo agrícola tem como base a disponibilidade de produtos utilizados por agricultores nas lavouras. Entretanto, tal termo não menciona os riscos ao meio ambiente e à saúde dos agricultores (BELLEI, 2017).

O uso de agrotóxicos para proteção de plantas se torna atrativo pela simplicidade, previsibilidade e necessidade de pouco entendimento para aplicação. É preciso ter conhecimento de como aplicar tal produto para se obter sucesso no tratamento de patógenos. Para isso, deve-se estudar a ecologia dos sistemas, interações biológicas, informações sobre ecologia e fisiologia da espécie, dentre outros (MORANDI; BETTIOL, 2009).

A utilização de agroquímicos que atingem plantas, em alguns casos, pode trazer mais desvantagens do que benefícios. Cresceram informações sobre possíveis impactos no uso de produtos no ambiente, tanto na saúde humana como na agricultura. Conseqüentemente, têm sido realizadas nas últimas décadas pesquisas para o desenvolvimento de produtos químicos eficientes e menos tóxicos a organismos não-alvos para uso em campo. A eficácia do controle químico, mesmo em baixas concentrações, a ausência de toxicidade frente aos mamíferos e animais superiores, a fácil obtenção, a viabilidade econômica, a não acumulação no tecido adiposo humano e de animais domésticos, dentre outros fatores, devem estar associadas à atividade dos produtos.

Os agentes químicos empregados no controle de microrganismos fitopatogênicos são classificados em dois grupos, os desinfetantes e os agentes quimioterápicos. Os primeiros causam a morte do patógeno, pois agem diretamente sobre estruturas de propagação. Já os quimioterápicos são substâncias que interferem nas vias metabólicas dos microrganismos. Podem ser sintéticos ou naturais (antibióticos). Nos dois casos, o agente químico pode impedir a proliferação ou causar a morte do microrganismo. No entanto, essa distinção é pouco nítida em muitos casos,

pois dependendo do tempo de contato e da dosagem aplicada, a mesma substância poderá agir de uma ou outra forma (BORZANI *et al.*, 2001).

As práticas agrícolas, nas últimas décadas, foram guiadas para o uso indiscriminado de recursos e produtos químicos a fim de produzir volumes maciços de alimentos, devido a maior competição por recursos, mudanças climáticas e outros fatores. Tais práticas desencadearam enorme poluição em diferentes ambientes, além de contaminações ao solo e à água, o que afetaram o bem-estar humano (ANTONACCI *et al.*, 2018).

Para o uso eficiente de produtos químicos em campo, devem ser levados em consideração fatores como o número, o intervalo e o tempo de aplicação, a estabilidade do produto e a ausência de toxicidade. Por outro lado, o seu uso intensivo pode levar ao surgimento de pragas secundárias e à seleção de patógenos resistentes. Outras desvantagens são o impacto ao ambiente, por serem tóxicos e poluentes; o comprometimento da saúde de produtores agrícolas e dos consumidores, além da sua inespecificidade, podendo eliminar microrganismos benéficos à planta (DIAS, 2011).

A análise histórica do uso de agrotóxicos é importante para se examinar os embates negativos do controle químico sobre o ambiente e à saúde de agricultores. Vários estudos têm por objetivo comparar a visibilidade do uso de agrotóxicos e neoplasias entre a população diretamente ou indiretamente exposta a esses produtos químicos (BELLEI, 2017).

Como controle alternativo para o uso de defensivos agrícolas, tem-se usado a associação de defensivos e extratos vegetais com propriedades antifúngicas no manejo integrado de doenças vegetais, principalmente na agricultura orgânica e familiar. Alguns extratos, como o etanólico de *Beauprea crassifolia* Brongn, 1871, possuem compostos fenólicos e derivados de triterpenos com potencial atividade inibitória de crescimento sobre fungos da espécie *Fusarium solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, 1884 (ANDRADE, *et al.* 2018).

Do total de vendas de agrotóxicos no Brasil, estima-se que apenas 1 a 2 % desse mercado seja representado por biopesticidas. Enquanto até 2011 existiam 1352 agroquímicos registrados no Brasil, somente 26 produtos eram à base de agentes biológicos e apenas três produtos à base do gênero *Trichoderma* (BETTIOL, 2011).

Dessa forma, a substituição parcial ou completa do controle químico pelo controle biológico constitui uma estratégia de interesse e importância para viabilizar agricultura mais sustentável e uso racional dos agrotóxicos nas lavouras, gerando alimentos mais saudáveis e sem resíduos químicos.

3.2 Controle biológico

A crescente preocupação da sociedade com os impactos causados pelo uso dos agrotóxicos na agricultura abre caminhos para estimular o emprego de estratégias de controle biológico no desenvolvimento de sistemas de cultivo mais sustentáveis e menos dependentes do uso de produtos químicos (MORANDI; BETTIOL, 2009).

Uma alternativa viável para restaurar a biodiversidade funcional em ecossistemas agrícolas é o uso de controle biológico, pois na natureza existem inimigos naturais contra insetos ou outras pragas que causam prejuízos na agricultura. O uso de fungos como controle biológico, quando bem administrados, podem determinar, em um agroecossistema específico, a regulação de populações de pragas e evitar prejuízos ao meio ambiente (MEDEIROS *et al.*, 2018).

Desde a antiguidade, uma prática de controle biológico que persiste até hoje é realizada através do uso de extratos de plantas conhecidas por propriedades inseticidas (aquelas que contêm piretrinas, rotenoides e alcaloides). Poucas são de interesse comercial em outros países, como nos Estados Unidos da América. O uso de alcaloides rotenoides naturais vem desde o século XVI. A partir da metade do século XIX atingiram 2,5 mil toneladas. Atualmente a produção anual vem sofrendo um declínio, chegando hoje a cerca de 1250 toneladas, em virtude do alto custo de produção, extrema toxicidade a mamíferos, odor desagradável, entre outros (SBRAVATTI JÚNIOR, 2003).

Nos últimos anos, algumas tecnologias de controle biológico ganharam impulso no equilíbrio de doenças de plantas cultivadas. Tecnologias de controle biológico não só minimizam ou substituem o uso de pesticidas prejudiciais ao meio ambiente, como também o uso pode ser mais acessível financeiramente e eficiente em alguns programas de controle das doenças (RAMANUJAM *et al.*, 2010).

Uma variedade de organismos e a técnica para a incorporação de esporos nas sementes são estudadas com o objetivo de se conseguir um eficiente sistema de controle de patógenos. A aplicação de microrganismos vivos ou de metabólitos é um método utilizado na promoção de germinação de sementes e crescimento de plântulas vigorosas e também no controle de certos patógenos (JUNGES *et al.*, 2016).

Para controle alternativo de doenças no cultivo de viveiros florestais, utilizam-se microrganismos endofíticos, que são agentes que não causam doença, mas impedem o avanço de patógenos, por serem capazes de penetrar na planta e se disseminar sistematicamente no hospedeiro (SBRAVATTI JÚNIOR, 2013).

Uma estratégia muito empregada é o uso de fungos para o controle de patógenos de plantas em solos manipulados, embora não haja eliminação completa. Segundo Jaber e Ownley (2017), fungos entomopatogênicos, por exemplo, podem ser usados como controle biológico ocasionando promoção do crescimento das plantas e a colonização da rizosfera. Entretanto, papéis biológicos ainda não estão totalmente compreendidos, mas proporcionam oportunidades para o uso múltiplo de fungos em estratégias de manejo integrado de pragas.

Para que sejam mantidos níveis aceitáveis ao meio ambiente, ou seja, concentrações dos produtos que sejam capazes de manter o biocontrole de pragas, assim como meios de produção economicamente viáveis, é necessário o aprimoramento de novas técnicas na utilização de fungos como agentes de biocontrole (GRIGOLETTI JÚNIOR; SANTOS; AUER, 2000). De acordo com CARVALHO *et al.* (2011), tratamentos com fungicidas ou agentes de biocontrole em sementes ajudam a reduzir a disseminação de bactérias. Tais tratamentos protegem contra doenças e eliminam os patógenos, o que é fundamental para o estabelecimento da cultura. Dentre os fungos que apresentam excelentes resultados de controle de patógenos em campo, destacam-se os do gênero *Trichoderma*.

Um dos fatores da baixa aplicabilidade das formulações no Brasil é o fato de haver poucos registros legais no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) de produtos que poderiam ser comercializados para aplicação em campo. O limitado conhecimento dos consumidores a respeito das consequências à saúde pública e ambiental, devido ao uso dos agrotóxicos, também dificulta a difusão de conceitos e vantagens no uso de bioprodutos na substituição dos produtos químicos.

Pesquisas para o esclarecimento dos mecanismos de interação entre os agentes de biocontrole e os patógenos de plantas e um maior incentivo na introdução de bioformulações podem ser alternativas viáveis para expandir a aplicabilidade desses bioprodutos (MACHADO *et al.*, 2012).

3.3 *Trichoderma*

Trichoderma spp. são fungos naturais de solos de clima temperado e tropical e que podem viver de forma saprofítica de vida livre ou parasitando outros fungos (HARMAN *et al.*, 2004). São agentes biológicos que têm sido utilizados tanto para controle de patógenos radiculares como da parte aérea (GRIGOLETTI JUNIOR; SANTOS; AUER, 2000), sendo reconhecidos como antagonistas de numerosos fungos patógenos na agricultura (HARMAN, 2006), além de promoverem o crescimento vegetal.

Trichoderma spp. pertencem ao filo Ascomycota, ordem Hypocreales e família Hypocreaceae. São caracterizados por produzirem conídios, a partir de conidiógenos, presentes ou não em estruturas especializadas ou por fragmentação do talo micelial (MACHADO *et al.*, 2012).

Estão entre os microrganismos mais utilizados mundialmente para uso em controle de fitopatógenos, pois não são patogênicos aos seres humanos e a outros animais; estão presentes em praticamente todos os tipos de solos e associados à matéria orgânica; são facilmente isolados, cultivados e multiplicados e colonizam com eficiência o sistema radicular de diversas plantas, sendo reconhecidos como antagonistas de numerosos fungos patógenos na agricultura, além de promoverem o crescimento vegetal (HARMAN, 2006; VERMA *et al.*, 2007). São os fungos mais usados no controle biológico de fitopatógenos devido ao seu fácil desenvolvimento e à facilidade de serem cultivados em uma grande gama de substratos.

Isolados de *Trichoderma* spp. podem ser aplicados separadamente, em combinação com outros antagonistas, ou ainda com fungicidas químicos compatíveis já comumente empregados no controle de fitopatógenos no solo. Podem ser empregados no tratamento de sementes, substratos de crescimento de plântulas ou diretamente no solo para controlar patógenos como *Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp.

e *Fusarium* spp., que atacam tecidos juvenis, causando inúmeros problemas em viveiros ou na fase de implantação de mudas no campo (VERMA *et al.*, 2007).

Espécies de *Trichoderma* também podem ser usadas como biomarcadores para controle biológico em patógenos de batatas, como o nematoide *Globodera pallida*. A modificação do solo por *Trichoderma harzianum* causou uma redução significativa da infecção por *G. pallida* em raízes de batata. A redução dos cistos no solo e a taxa de reprodução do nematoide foram de 49% e 60%, respectivamente (CONTINA; DANDURAND; KNUDSEN, 2017).

A competição por espaços e recursos, antibiose e micoparasitismo são os mecanismos principais no controle de doenças por *Trichoderma* spp. (HARMAN, 2006). Uma característica do estágio assexual (anamórfico) destes ascomicetos é a produção de conídios, formados a partir de células conidiogênicas, presentes ou não em estruturas especializadas ou por fragmentação do micélio (MACHADO *et al.*, 2012). As estirpes de *Trichoderma* produzem enzimas extracelulares e antibióticos com efeitos antifúngicos, sendo por isso usadas como agentes de biocontrole (KOBORI *et al.*, 2015).

Devido à eficiência reprodutiva, metabolismo diverso e capacidade altamente competitiva das cepas na natureza, há uma maior sobrevivência do gênero *Trichoderma* em diferentes habitats. Espécies de *Trichoderma* possuem um comportamento antagonista devido ao seu hiperparasitismo. Entretanto, algumas espécies também conseguem produzir potenciais metabólitos bioativos capazes de melhorar o potencial antagonista. Há uma extensa investigação no uso de suas proteases para biorremediação (SHARMA *et al.*, 2017).

Os efeitos do uso de *Trichoderma* em cultivo de plantas, incluindo a resistência sistêmica ou localizada, são mostrados em estudos recentes. Estes fungos produzem uma mistura rica de enzimas antifúngicas, como quitinases e β -glucanases 1,3, que apresentam ação sinérgica com outras enzimas antifúngicas e com outros materiais (HARMAN, 2006). São eficientes antagonistas de fitopatógenos, produzem hifas que podem colonizar plantas como milho e feijão e são economicamente mais viáveis na produção de agentes de biocontrole (RESENDE *et al.*, 2004).

Dependendo das condições ambientais e da severidade da doença, pode trazer benefícios sociais, ambientais e econômicos ao eliminar, eventualmente, o número de

aplicações de fungicidas químicos (CARVALHO *et al.*, 2011). A ação por micoparasitismo juntamente com a produção de antibióticos parecem ser os prováveis mecanismos subjacentes ao seu uso como agentes de controle biológico (SHARMA *et al.*, 2017).

Em virtude da sua versatilidade de ação, além de agirem como indutores de resistência das plantas contra doenças, algumas linhagens de *Trichoderma* são utilizadas no controle de fitopatógenos e na promoção do crescimento vegetal, tornando-se um dos fungos mais pesquisados em condições de laboratório, casa de vegetação e campo. Entretanto, a sua ação como estimulador de crescimento é complexa e precisa ser realizada com a produção de diversas enzimas e compostos benéficos, bem como com interações de fatores bioquímicos (MACHADO *et al.*, 2012).

O método mais empregado para a produção de bioinseticidas à base de *Trichoderma* é a obtenção de esporos a partir de cultivo em substrato sólido, normalmente na forma de grãos umedecidos (BETTIOL, 2011; WOO *et al.*, 2014), a exemplo do emprego de grãos de arroz. Este processo apresenta algumas desvantagens, como falta de controle de qualidade, longos tempos de fermentação e dificuldades no escalonamento do processo (KOBORI *et al.*, 2015).

Para que o processo seja viável economicamente e possa ser competitivo comercialmente quando comparado aos produtos químicos, é necessário que o fungo seja produzido em larga escala, de forma eficiente, em intervalos de tempo reduzidos e empregando substratos de baixo custo. Dessa forma, os propágulos podem ser produzidos em biorreatores com cultivo submerso, tipo *air-lift* ou com agitação mecânica. Neste último caso, o desafio é a redução da formação de micélio na cultura líquida de forma a evitar a limitação de oxigênio e minimizar as dificuldades de agitação da cultura.

Considerando que no Brasil ainda não foram desenvolvidas formulações de propágulos de *Trichoderma* spp. mais estáveis ao armazenamento e de maior persistência no ambiente em relação aos conídios aéreos, o emprego de microescleródios em formulações para aplicação em campo é vantajoso, pois irá conferir uma maior persistência e habilidade de sobrevivência sob condições ambientais adversas. Isto porque os microescleródios são aglomerados quitinizados de hifas formando uma estrutura de resistência do microrganismo que tem se

mostrado mais eficazes do que produtos à base de conídios quando aplicados diretamente ao solo (JACKSON; JARONSKI, 2009). Estes propágulos permanecem viáveis por longos períodos no solo (KOBORI *et al.*, 2015) e são mais resistentes a fatores bióticos e abióticos, o que sugere a necessidade de aplicação de doses menores por hectare (MASCARIN *et al.*, 2014).

O sucesso dos fungos do gênero *Trichoderma* como controle biológico deve-se ao fato de serem oportunistas simbiossintetizantes de plantas, além de fortes competidores no solo e produtores de antibióticos contra fungos fitopatogênicos (Auler *et al.*, 2013). Segundo Lorito e colaboradores, 1993, essas características são fundamentais para tal sucesso.

A cepa de *T. asperellum* T356 é nova e foi isolada por pesquisadores da EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, pelo pesquisador Murilo. Já foram realizados testes da cepa contra patógenos causadores da doença do feijoeiro comum e obtiveram resultado positivo na ação antagonista desta cepa em relação a doença.

3.4 *Sclerotinia sclerotiorum*

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é o causador da doença mofo branco, que causa a podridão úmida coberta por um micélio branco algodinoso na superfície do solo e/ou tecido hospedeiro, podendo causar a queda de estruturas da planta e perda total na produção (ETHUR *et al.*, 2001).

É o patógeno de muitas plantas na agricultura, como o feijoeiro comum, *Phaseolus vulgaris* L. e do girassol, *Helianthus annuus*, sendo presente em todas as regiões produtoras. A produção de estruturas de resistências, como os escleródios, permite ao fungo persistir no solo por longos anos (LEITE *et al.*, 2000). Os escleródios viáveis no solo e a falta de controle químico eficaz ou poucas formulações de controle biológico dificultam o controle da doença. Para o controle efetivo da doença, faz-se necessário a inclusão de práticas culturais, como o uso de sementes saudáveis, escolha de melhor época para o cultivo e a rotação de culturas (LEITE *et al.*, 2000).

O número de hospedeiros do *S. sclerotiorum* chega, pelo menos, a 408 espécies e 278 gêneros de plantas. Possui uma vasta distribuição geográfica. Em alguns estados do Brasil, como Goiás e no Distrito Federal, está relacionado a perdas

significativas de rendimento das lavouras comerciais, chegando a 50% na cultura do feijoeiro comum e 18,7% na cultura da soja (CHARCHAR *et al.*, 1999).

O controle do fungo é necessário para evitar perdas na agricultura. Estudos recentes demonstram alternativas de controle do patógeno, com o uso de *Trichoderma* spp. como antagonistas, em substituição de produtos químicos.

O controle da patologia em plantas necessita de medidas mais eficientes e mais saudáveis para planta e para o ser humano. Microrganismos antagonistas do fungo *S. sclerotiorum* são alternativas viáveis para o controle, pois são capazes de se estabelecer, colonizar e dispersar no ecossistema. Os agentes biológicos também não causam danos ao meio ambiente.

Nos últimos anos, aumentou o uso de óleos extraídos de plantas objetivando o controle alternativo de *S. sclerotiorum*. Valadares e colaboradores, 2018, mencionaram em seu trabalho que no futuro, produtores agrícolas poderão usar os óleos essenciais como importantes potenciais fungicidas, diante disso se faz necessário aumentar os estudos nessa área.

As características antifúngicas de alguns óleos essenciais de plantas já foram bem descritas na literatura. No trabalho de Valadares e colaboradores foi observado que os principais constituintes químicos dos óleos essenciais extraídos de plantas como a *Piperaceae aduncum*, Linnaeus, 1753, foram promissores como *anti-Sclerotinia*. Doses acima de 10 μ L, do óleo de *P. aduncum* mostraram efeito antifúngico parecidos com fungicidas comerciais (VALADARES *et al.*, 2018).

3.5 *Phaseolus vulgaris* L. (Feijoeiro comum)

O feijão como alimento básico propicia fonte de nutrientes na alimentação humana. É um dos alimentos mais consumidos diariamente. O feijão como alimento básico propicia conteúdo calórico, proteico, mineral, e vitamínico importantes para nutrição. É a principal fonte de proteínas de populações de baixa renda, além de ser um alimento tradicional na dieta alimentar (MESQUITA *et al.*, 2005).

Para atender ao mercado consumidor, algumas características do feijoeiro comum necessitam ser atendidas, como sensibilidade aos estresses bióticos e abióticos e um maior controle de organismos patogênicos. No Brasil, há vários

cultivares do feijoeiro comum. O cultivo se baseia em três safras, praticamente em todo o território nacional, durante o ano todo, sujeito as condições ambientais.

O sistema de produção do feijoeiro teve importantes mudanças. Passou a ser cultivado em sistemas altamente tecnificados e os programas passaram por alta produtividade e resistência a pragas agrícolas. As características promoveram uma melhor aceitação de mercado (CARBONELL *et al.*, 2010).

Dentre as pragas que afetam o feijoeiro comum, pode citar o bruquídeo *Zabrotes subfasciatus* (Boh.), que provoca danos como a perda de peso, redução do poder germinativo, dentre outras. O uso de cultivares mais resistentes tem sido alternativa de controle contra o patógeno causador do bruquídeo, no Brasil (WANDERLEY; OLIVEIRA, 1997).

A podridão radicular é outra praga que atinge o feijoeiro comum. Provocada por fungo *Rhizoctonia solani* Kühn, a doença inviabiliza o plantio do feijoeiro. O controle da doença é difícil e não é economicamente viável (RODRIGUES *et al.*, 2002). Fungos como *Sclerotinia sclerotiorum* causam a doença do mofo branco no feijoeiro comum e pode ser evitada com o uso de biocontrole a base de *Trichoderma asperellum*.

A redução dos impactos causados por microrganismos patogênicos do feijoeiro comum está sendo conseguida pelo emprego de *Trichoderma asperellum* como controle biológico. Os estudos focam nos efeitos diretos dos antagonistas sobre fitopatógenos e estão sendo benéficas no controle de doenças do feijoeiro comum (PEDRO *et al.*, 2012).

3.6 Formulações em alginato

O alginato é um polissacarídeo presente em algas marinhas marrons (Phaeophyceae), como um componente estrutural, e em algumas bactérias do solo, como cobertura extracelular (FIGUEIRA *et al.*, 2014). A capacidade de reter água e também as propriedades estabilizantes, espessantes e gelificantes permitem ampla utilização em aplicações inovadoras na Medicina, na área farmacêutica, na produção de formulações para controle biológico e em outras aplicações industriais.

Os alginatos são usados em técnicas de microencapsulação devido às características de biodegradabilidade e biocompatibilidade. O encapsulamento de

princípios ativos pode ser potencializado pela associação de alginato com argila mineral e bentonita sódica. A associação é promissora por resultar na formação de um material nanocomposto com propriedades orgânicas e inorgânicas (BATISTA *et al.*, 2013).

Segundo Batista *et al.* (2013), o uso de biopolímeros, particularmente os alginatos, justifica-se por serem de fácil degradação hidrolítica e enzimática, biocompatíveis e não tóxicos ao meio ambiente. O alginato tem a capacidade de formar géis insolúveis em água, embora os géis apresentem alta porosidade, o que eleva os níveis de difusão do princípio ativo contido no gel, sem que haja dissolução.

Em se tratando do emprego de cápsulas de alginato em formulações para controle biológico em campo, o maior desafio é a produção massal de formulados. A obtenção de formulações em alginato pode ser otimizada com o uso de bomba peristáltica, o que pode aumentar a produção de cápsulas por minuto e uniformizar o diâmetro das partículas (MAFIA *et al.*, 2003).

Formulações à base de alginato vêm se mostrando uma opção na produção massal de formulados de *Trichoderma* spp. para fins de controle biológico. Alguns estudos têm demonstrado maior número de atividades antagonistas quando há aplicação em substratos que servem como base nutricional em espécies de fungos. Tal aplicação permite um acelerado crescimento e maior colonização do substrato, podendo inclusive estabelecer um hiperparasitismo (MAFIA *et al.*, 2003). No entanto, é importante identificar os fatores que afetam o metabolismo microbiano e a eficiência do sistema, tais como a transferência de oxigênio, propriedades físicas e químicas do gel de alginato, difusão de nutrientes essenciais e procedimentos de imobilização das células aprisionadas no gel (DIAS; RESENDE; LINARDI, 2001).

Locatelli *et al.* (2018) estudaram o desenvolvimento de formulações de *Trichoderma* sp. em grânulos encapsulados contendo alginato de sódio modificado com diferentes polímeros e avaliaram a viabilidade de conídios durante a estocagem. Os autores verificaram que, partindo de uma concentração inicial de 10^{10} UFC/g, foi possível manter a viabilidade dos conídios armazenados a 28 °C por até 14 meses em concentrações celulares acima de 10^6 UFC/g para grânulos contendo alginato, polifosfato de sódio, pectina e glicerol.

4 ARTIGO

PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E VIABILIDADE DE *Trichoderma asperellum* T356 em CÁPSULAS DE ALGINATO

A.R.O. LOPES¹, LOCATELLI, G.O.², LOBO Jr, M.³, BARBOSA, R.M.⁴, G.M. MASCARIN⁵;
C.L.L. FINKLER⁶

¹*Discente da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente.*

²*Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Doutorando da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO)*

³*Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO*

⁴*Docente da Faculdade UNINASSAU, RN*

⁵*Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP*

⁶*Docente da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória.*

Resumo

O controle biológico constitui uma estratégia de grande interesse e importância para viabilizar a redução ou substituição do uso de pesticidas químicos sintéticos no controle de pragas na agricultura. Um organismo amplamente utilizado no biocontrole de doenças de plantas e de grande interesse para a indústria de biopesticidas é o fungo *Trichoderma asperellum* T356, sendo estes microescleródios (MS) e conídios submersos, em cápsulas de alginato íntegras e liofilizadas. O fungo foi produzido por fermentação submersa em frascos agitados e, após a recuperação dos propágulos por filtração, estes foram encapsulados em matriz de alginato pelo método de extrusão. Foi avaliada a cinética de produção de microescleródios, enquanto a concentração e a viabilidade de conídios e de microescleródios nas cápsulas íntegras e liofilizadas foi monitorada ao longo de 120 dias de armazenamento sob diferentes temperaturas. As cápsulas íntegras e liofilizadas foram caracterizadas em termos de tamanho, umidade, rendimento e espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR. As cápsulas íntegras foram ainda analisadas em termos do seu peso médio, número médio e densidade aparente, enquanto que as cápsulas liofilizadas foram submetidas à análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Em relação à viabilidade dos propágulos, foi observada uma diminuição gradativa ao longo do tempo para ambas as formulações. Os espectros FTIR são sugestivos de interações entre o polímero alginato e o microrganismo. Os resultados obtidos demonstram que foi possível obter

cápsulas de alginato contendo *T. asperellum* T356, com manutenção da viabilidade do fungo após o processo de encapsulação e liofilização, constituindo um grande potencial para uso em controle biológico.

Palavras-chave: Alginato, biocontrole, fungos, encapsulação.

*Autor para correspondência: Christine Lamenha Luna Finkler, *Rua Alto do Reservatório, s/n, Bela Vista, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil, 55608-680. E-mail: chrislluna@yahoo.com.br*

Abstract

Biological control is a strategy of great interest and importance to enable the reduction or substitution of the use of synthetic chemical pesticides in pest control in agriculture. An organism widely used in the biocontrol of plant diseases and of great interest to the biopesticides industry is the fungus *Trichoderma*. The present work had the objective of evaluating the viability of *Trichoderma asperellum* T356 propagules, being these microsclerodes (MS) and conidia submerged in intact and lyophilized alginate capsules. The fungus was produced by submerged fermentation in shaken flasks and, after recovery of the propagules by filtration, they were encapsulated in the alginate matrix by the extrusion method. Microsclerotia production kinetics were evaluated, while concentration and viability of conidia and microsclerodes in the intact and lyophilized capsules were monitored for 120 days of storage under different temperatures. The intact and lyophilized capsules were characterized in terms of size, moisture, yield and Fourier Transform Infrared - FTIR spectroscopy. The intact capsules were further analyzed in terms of their mean weight, mean number and apparent density, while the lyophilized capsules were submitted to scanning electron microscopy (SEM) analysis. In relation to the viability of the propagules, a gradual decrease over time was observed for both formulations. FTIR spectra are suggestive of interactions between the polymer alginate and the microorganism. The results obtained show that it was possible to obtain alginate capsules containing *T. asperellum* T356, with maintenance of the viability of the fungus after the process of encapsulation and lyophilization, constituting a great potential for use in biological control.

Keywords: Alginate, biocontrol, fungi, encapsulation.

*Artigo será submetido à revista *Journal of Microencapsulation* (ANEXO)

1. INTRODUÇÃO

Os impactos negativos causados pelo uso dos agrotóxicos têm motivado o interesse pelo emprego de sistemas de cultivo mais sustentáveis e menos dependentes do uso de produtos químicos. Nesse contexto, o emprego de técnicas de controle biológico tem recebido destaque no cenário fitossanitário atual e assume papel importante na busca pelo desenvolvimento de agricultura mais sustentável e menos poluidora.

Entre os microrganismos benéficos ou úteis para uso na agricultura, destacam-se os fungos do gênero *Trichoderma* Persoon, 1794, que são os mais empregados no controle de fitopatógenos, devido aos mecanismos de ação incluindo hiperparasitismo e antibiose e à facilidade de cultivo massal *in vitro* em diversos substratos, cujos propágulos produzidos são empregados tanto para controle de patógenos radiculares como para aqueles de parte aérea em plantas cultivadas (GRIGOLETTI JUNIOR; SANTOS; AUER, 2000). São reconhecidos como antagonistas de numerosos fungos patógenos na agricultura (HARMAN, 2006), além de promoverem o crescimento vegetal direta e indiretamente. De acordo com van Lenteren *et al.* (2017), são mais de 3 milhões de hectares no Brasil aplicados com *Trichoderma* spp.

O método mais empregado para a produção de biopesticidas à base de *Trichoderma* é a obtenção de esporos assexuais (conídios) a partir do cultivo em substrato sólido, normalmente usando grãos de cereais umedecidos (BETTIOL, 2011; WOO *et al.*, 2014). Este processo apresenta desvantagens como falta de controle de qualidade, alta dependência de mão-de-obra, longo período/ciclo de fermentação e dificuldades no escalonamento do processo. Para que o processo seja economicamente viável e explorado comercialmente nos diferentes sistemas agrícolas, é necessário que o fungo seja produzido em larga escala, de forma eficiente, em ciclos curtos de fermentação e utilizando substratos de baixo custo e alta disponibilidade no mercado.

Em artigo publicado pela Embrapa e USDA (U.S. Department of Agriculture) (Kobori *et al.*, 2015), é relatada ineditamente a produção de microescleródios (MS) por *T. harzianum* em cultivo líquido submerso. MS são estruturas de resistência que apresentam maior persistência no ambiente em relação aos conídios aéreos, e o desenvolvimento de formulações empregando MS constitui-se num importante avanço tecnológico visando à expansão de mercado de biopesticida. No contexto, o presente trabalho teve por objetivo a obtenção de cápsulas de alginato contendo MS e conídios submersos de *Trichoderma asperellum* T356 visando à aplicação no controle de fitopatógenos de importância agrícola.

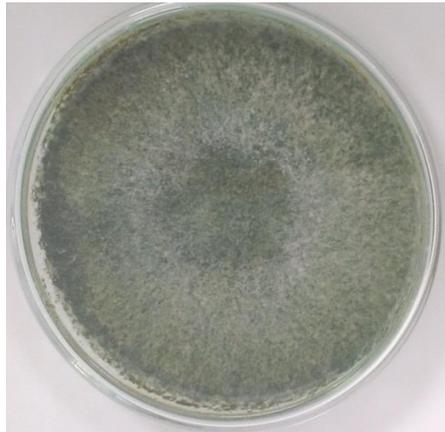
2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção do microrganismo e manutenção da cultura

O fungo *T. asperellum* T356 foi cedido pela Embrapa Arroz e Feijão, em decorrência de um acordo de cooperação técnica existente entre a Embrapa e a UFPE/CAV sob respaldo do documento TTM (Termo de Transferência de Material), que regulamenta este trâmite de material genético entre instituições de pesquisa no país, para fins exclusivamente de pesquisa científica.

Inicialmente, a cultura foi mantida em placas de Petri contendo o meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar) a 28 °C, sendo repicada a cada duas semanas. A Figura 1 mostra o aspecto morfológico da cultura de *T. asperellum* T356 crescida em meio BDA.

Figura 1 - Aspecto morfológico da cultura de *Trichoderma asperellum* T356 crescida em meio BDA após 21 dias a 28 °C.



Fonte: O autor.

A cultura esporulada foi então preservada por meio de liofilização, com a finalidade de se criar um banco de estoque para fornecer inóculo aos experimentos e evitar, consecutivamente, a repicagem excessiva do fungo em meio de cultura artificial. Partindo-se de uma colônia esporulada, os esporos foram raspados e posteriormente misturados numa solução crioprotetora (10 % m/v de sacarose e 1 % m/v de gelatina). Após homogeneização, alíquotas de 1 mL foram distribuídas em frascos de vidro, congeladas a -80 °C por 16 h e transferidas para o liofilizador (Sentry 2.0, VirTis, SP Scientific) com vácuo a 300 mT por 48 h a -50 °C. Os frascos foram lacrados e armazenados à temperatura ambiente (28 °C). A Figura 2 mostra os frascos contendo a cultura liofilizada. Para a contagem de células, o material liofilizado foi ressuspendido em 3 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85 % m/v), e a

contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) realizada a partir de plaqueamento em meio BDA a 28 °C por 5-7 dias.

Figura 2 – Frascos contendo a cultura liofilizada de *Trichoderma asperellum* T356.



Fonte: O autor.

2.2.Cultivo de *Trichoderma asperellum* T356

A cultura estoque liofilizada foi inoculada em placas contendo meio BDA por 2-3 semanas a 28 °C. Em seguida, uma suspensão de esporos foi obtida pela adição de 10 mL de solução estéril de Tween 80 (0,04 % m/v) e inoculada no meio de cultivo (concentração inicial ajustada para 10^5 conídios/mL). O cultivo foi realizado em frascos aletados tipo Erlenmeyer (Nalgene) de 500 mL de capacidade contendo 200 mL de meio à base de sais minerais, sacarose e levedura autolisada (Lyscell®, ICC, Brasil), concentração de carbono (C) de 20 g/L, razão C:N de 10:1, pH 5,5, a 300 rpm por 7 dias a 28 °C, de acordo com Locatelli *et al.* (2017). Os experimentos foram realizados em dois dias diferentes, cada um deles em quadruplicata. A Figura 3 mostra o aspecto da cultura crescida após 7 dias de cultivo. Diariamente, um volume de 2 mL foi retirado de cada frasco para a contagem de microescleródios (MS) e conídios submersos. Periodicamente, os frascos eram agitados manualmente para remoção do anel de biomassa na parede dos frascos.

Após o término de cada cultivo, as amostras foram homogeneizadas, filtradas em três peneiras (malhas de 16, 20 e 35 *mesh*) para a obtenção dos propágulos (conídios e MS) de *T. asperellum* T356. Nesta etapa, as células foram submetidas à lavagem com água destilada estéril (200 mL). A Figura 4 mostra a etapa do processo de filtração das células.

Figura 3 – Frascos contendo a cultura de *Trichoderma asperellum* T356 após 7 dias de cultivo a 28°C.



Fonte: O autor.

Figura 4 – Etapa de filtração das células de *Trichoderma asperellum* T356.



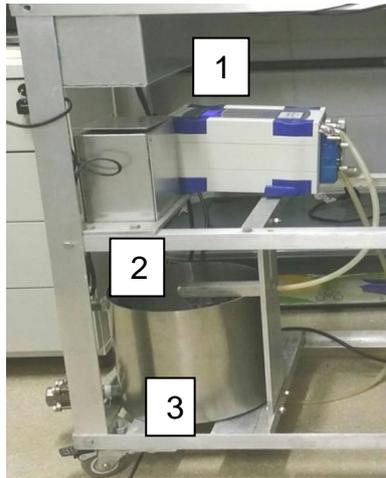
Fonte: O autor.

2.3 Formulações em cápsulas de alginato

Inicialmente, preparou-se uma solução de alginato de sódio a 2 % (m/v) (Dinâmica®, Brasil) em água estéril. Uma massa de 2 g de alginato foi dissolvida em 60 mL de água destilada estéril a 40 °C sob agitação constante. Após a suspensão atingir a temperatura ambiente, adicionou-se 25 mL da suspensão celular contendo conídios e microescleródios e obtida na etapa anterior. A suspensão foi homogeneizada e o volume foi completado com água para 100 mL (Akhtar *et al.*, 2009), sendo retirada uma amostra para a realização da contagem de MS e de conídios. O experimento foi realizado para um volume total (células + alginato) de 1 L, e a suspensão foi bombeada (bomba peristáltica Marconi®, MA 2400/400) a

uma vazão de 861,7 mL/min, sendo utilizado um sistema de microencapsulação conforme mostra a Figura 5.

Figura 5– Sistema de microencapsulação utilizado para a obtenção de cápsulas de alginato contendo *Trichoderma asperellum* T356.

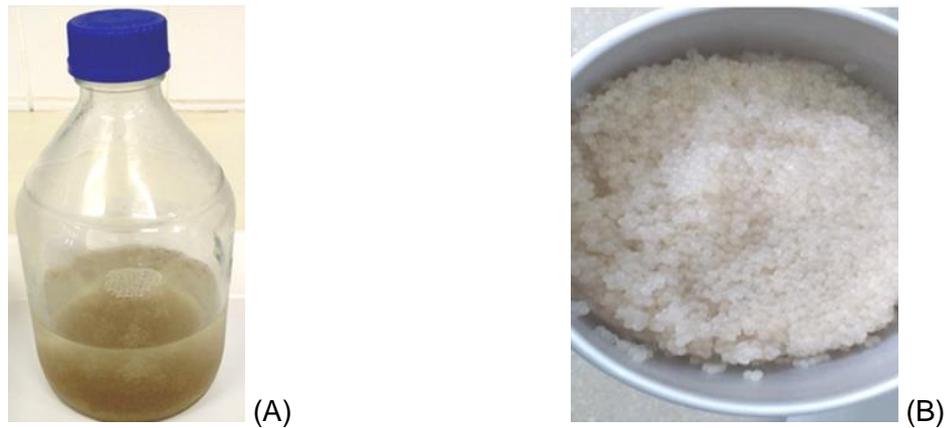


1. Bomba peristáltica; 2. Sistema contendo quatro agulhas; 3. Recipiente contendo CaCl_2 a 0,2 M

Fonte: o autor

A amostra foi extrudada por quatro agulhas estéreis (0,70 × 25 mm) em 1 L de CaCl_2 a 0,2 M, sob agitação constante. As microcápsulas foram deixadas em repouso por 2 h a 4 °C (Figura 6A), sendo posteriormente coletadas por meio de uma peneira (Figura 6B) e lavadas com água estéril para retirada do excesso de CaCl_2 . Cápsulas “vazias” sem o microrganismo foram preparadas de acordo com o mesmo procedimento, como controle.

Figura 6 – Microcápsulas de *Trichoderma asperellum* T356 em repouso após a extrusão



(A) e coleta das cápsulas em peneira (B).

Fonte: o autor.

As cápsulas obtidas foram separadas em dois lotes (cápsulas íntegras e liofilizadas). Enquanto as cápsulas íntegras foram acondicionadas em frascos de penicilina contendo água estéril, o outro lote de cápsulas foi liofilizado conforme descrito no item 2.1, sendo que neste caso as cápsulas não foram imersas em água estéril. Após contagem inicial de MS e conídios, as amostras foram armazenadas (8 °C, 25 °C e 35 °C) para a contagem de propágulos e contagem de UFC a cada 30 dias durante 120 dias de avaliação, sendo realizadas três repetições para cada tratamento. A Figura 7 mostra as amostras armazenadas nas temperaturas citadas.

Figura 7– Microcápsulas de *Trichoderma asperellum* T356 (íntegras e liofilizadas) armazenadas nas temperaturas de 25 °C (A), 35 °C (B) e 8° C (C).



Fonte: o autor

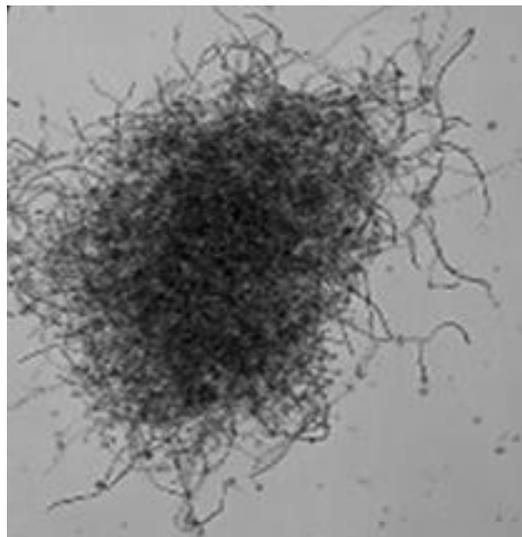
2.4. Caracterização das cápsulas

2.4.1. Concentração de propágulos *T. asperellum* T356

As contagens de MS nas suspensões durante o acompanhamento do cultivo foram determinadas a partir de diluições decimais seriadas em solução salina e posterior observação em microscópio ótico. As contagens de conídios e de MS das cápsulas foram realizadas dissolvendo-se 1 g (cápsulas íntegras) e 0,1 g (cápsulas liofilizadas) em solução de citrato de sódio 1,0 % (m/v), com posterior diluição e observação em microscópio ótico. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey a 5 % de probabilidade, por meio do programa Past[®]. A Figura 2.8 mostra uma fotomicrografia de microescleródio de *T. asperellum* T356 após 4 dias de crescimento em meio de cultura líquido.

Para a determinação da concentração de células viáveis das cápsulas de alginato (íntegras e liofilizadas), o mesmo procedimento descrito anteriormente foi realizado. No entanto, após as diluições decimais seriadas foi inoculado um volume de 100 µL em placas de Petri contendo meio BDA pelo método *spread plate*. As placas foram incubadas por 5-7 dias a 28 °C e os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por massa de amostra.

Figura 8– Fotomicrografia de microescleródio de *T. asperellum* T356 após 4 dias de crescimento em meio de cultura líquido.



Fonte: O autor.

2.4.2. Tamanho

O tamanho médio das cápsulas foi determinado a partir da observação direta de acordo com o seguinte procedimento: Foram escolhidas de forma aleatória 12 cápsulas de cada ensaio, sendo estas colocadas sobre a superfície de um papel escuro e fotografadas com uma câmera fotográfica digital (Canon EOS 70D) com lentes macro de 100mm. Uma escala de tamanho foi adicionada na imagem calibrada empregando-se o software ImageJ 1.47v.

2.4.3. Determinação do peso médio, número médio e densidade aparente das cápsulas íntegras

Primeiramente, foram pesados 10 tubos vazios de centrífuga, tipo Falcon, para cada tipo de amostra (cápsulas íntegras, com e sem o microrganismo). Em seguida, foi acrescentado um volume de cápsulas íntegras correspondente a 10 mL, o número de cápsulas foi contado e cada tubo foi novamente pesado. O peso médio das cápsulas foi então determinado por diferença, calculando-se a média e o desvio padrão, enquanto que a densidade aparente (D_{ap}) foi calculada pela Equação 1:

$$D_{ap} = \left[\frac{m}{v} \right] \quad (1)$$

onde m é a massa de cápsulas (em g) e v é o volume ocupado de cápsulas (10 mL).

2.4.4. Determinação da umidade e do rendimento de cápsulas íntegras em cápsulas liofilizadas

Inicialmente, foram pesados 10 tubos vazios de centrífuga, tipo Falcon, para cada tipo de amostra. Em seguida, foi acrescentado um volume de cápsulas íntegras correspondente a 20 mL, e os tubos foram liofilizados conforme descrito anteriormente. Após a liofilização, os tubos foram novamente pesados e o rendimento de cápsulas íntegras em cápsulas liofilizadas foi determinado por diferença, calculando-se a média e o desvio padrão.

O teor de umidade foi determinado segundo a metodologia descrita pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2008). Uma massa de 2,0 g de cápsulas íntegras e de 0,7 g de cápsulas liofilizadas, com e sem o microrganismo, foi levada a estufa por 3 horas a temperatura de 105 °C. Após resfriamento em dessecador, as massas foram pesadas e o procedimento foi repetido até obtenção de peso constante. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.4.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O estudo microscópico das amostras foi executado em microscópio eletrônico de varredura Hitachi, modelo TM3030, operado em 15 kV e equipado com um sistema de energia dispersiva de raio-X Quantax70 para microanálise dos elementos constituintes. As amostras foram adicionadas sob uma fita de carbono e avaliadas posteriormente. A análise foi realizada no Laboratório de Caracterização Estrutural de Materiais do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMat) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

2.4.6. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR

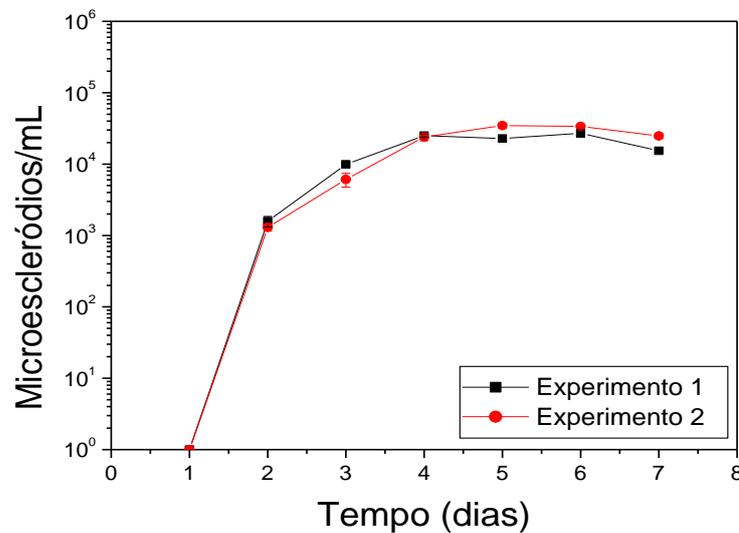
As análises FTIR foram realizadas no Laboratório de Caracterização Estrutural de Materiais do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMat) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Os espectros FTIR foram obtidos em um intervalo de números de onda de 700 a 4000 cm^{-1} . Esta técnica é utilizada para a caracterização de polímeros, principalmente no que se refere a grupos funcionais e de ligações presentes na amostra.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Cultivo de *Trichoderma asperellum* T356

Conforme mostra a Figura 9, a produção de MS é iniciada a partir de 2 dias de cultivo e aumenta gradativamente até o quinto dia, atingindo $2,8 \times 10^4$ MS/mL. Após 7 dias, a concentração de MS diminui para $2,0 \times 10^4$ MS/mL. Kobori *et al.* (2015) verificaram que a produção de MS de *T. harzianum* T-22 foi favorecida pelo meio com maior concentração de C (36 g/L) e razão C:N de 10:1, especialmente no quarto dia de cultivo, atingindo $4,83 \times 10^4$ MS/mL. Esses resultados corroboram com os obtidos no presente estudo.

Figura 9– Produção de microescleródios por *Trichoderma asperellum* T356 em frascos agitados a 300 rpm por 7 dias a 28 oC.



Cada ponto representa a média \pm desvio padrão (n = 4).

Por outro lado, MASCARIN *et al.* (2014) investigaram a produção de microescleródios por cepas de *Metarhizium* spp. por fermentação líquida submersa. Os fungos foram cultivados em meio líquido com razão C:N de 50:1, um meio escasso em nutrientes, sendo observado um rendimento máximo de MS de 0,7-1,1 $\times 10^7$ MS/mL após 5 dias de crescimento.

Estudos anteriores têm demonstrado que sob condições de estresse nutricional, alguns fungos tem a capacidade de produzirem MS, conforme relatado por Jackson e Schisler (1995), Shearer e Jackson (2006) e Jackson e Jaronski (2009). A formação, melanização e quantidade produzida de MS, dentre outros fatores, são influenciados pela linhagem e concentração do fungo, e pela composição, aeração, temperatura e atividade de água do meio de cultura líquido (MASCARIN *et al.*, 2014). De acordo com Jackson e Schisler (1995), que analisaram a produção de MS de *Colletotrichum truncatum*, a formação e a melanização de MS estão relacionadas com a depleção de nitrogênio e carbono, respectivamente. Como as concentrações de carbono e de nitrogênio não foram avaliadas no presente estudo, pode-se apenas especular sobre a exaustão desses nutrientes a partir do quarto dia de cultivo a partir dos resultados obtidos em relação à cinética de produção de MS.

Mendes e colaboradores relataram em seu trabalho que o desenvolvimento do fungo *Fusarium oxysporum*, Snyder, W.C. e Hansen, H.N. 1940, foi inibido por metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma harzianum*, Rifai, 1969, e o *Trichoderma longibrachiatum*, Rifai, 1969. Os resultados obtidos por Mendes e colaboradores corroboraram com os resultados do

trabalho, demonstrando que o gênero *Trichoderma* é um importante fungo usado como controle de patógenos de plantas.

Os resultados obtidos por Hoffmann e colaboradores indicaram grande potencial de controle de *F. solani* utilizando-se espécies de *Trichoderma*. Os isolados apresentaram eficiência como antagonistas de *Fusarium spp.* Demonstrando maior potencial para controle biológico do patógeno. Dos antagonistas selecionados 80% apresentaram inibição completa contra o crescimento dos patógenos.

3.2 Formulações em cápsulas de alginato

3.2.1. Concentração de propagulos

Conforme mostra a Tabela 1, observa-se que a concentração de conídios aumenta após o encapsulamento, passando de $2,9 \times 10^6$ conídios/mL para $5,7 \times 10^8$ conídios/g. Em relação à concentração de MS, antes da encapsulação a concentração foi de $8,7 \times 10^2$ MS/mL, cerca de 2-log inferior à concentração final de MS após o cultivo, evidenciando a perda celular durante a filtração e preparo da solução de alginato. Após a encapsulação, a concentração de MS foi de $3,0 \times 10^2$ MS/g de cápsula.

A análise dos dados pelo teste t-Student revelou que há diferença significativa ($p < 0,5$) entre as concentrações de conídios antes de depois da encapsulação, o que não ocorre entre as concentrações de MS. Entretanto perde MS na etapa de filtração, por ter um tamanho em torno de 68-541 μm .

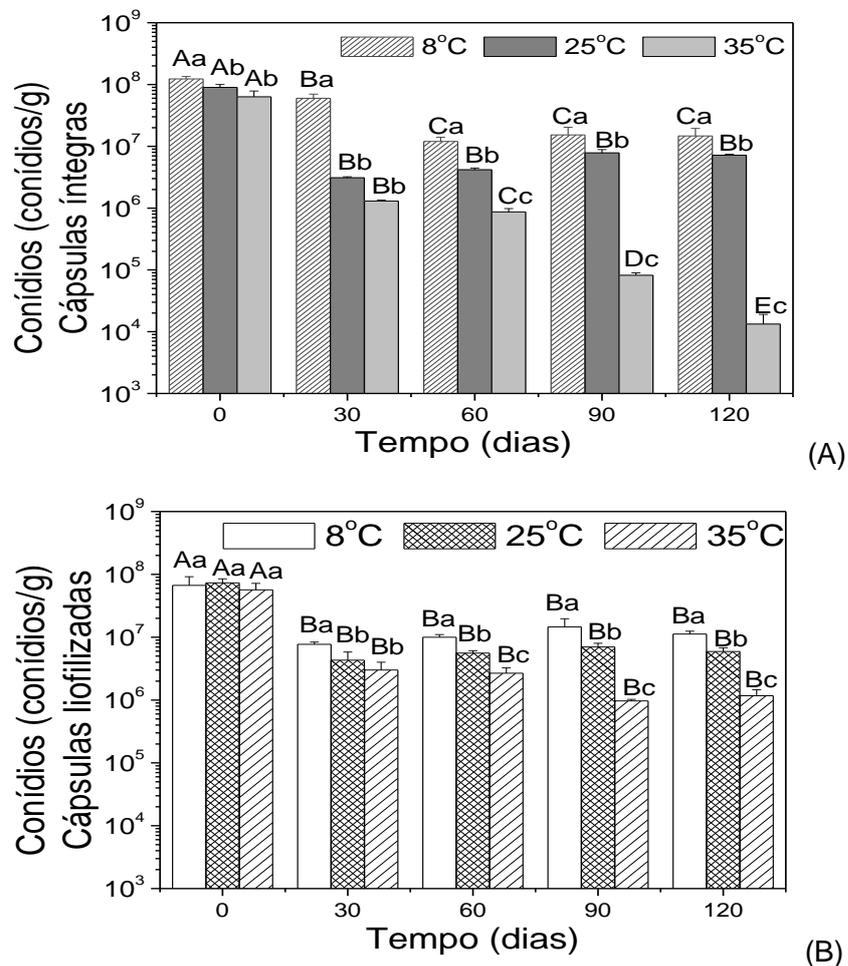
Tabela 1 – Concentrações de microescleródios e de conídios de *Trichoderma asperellum* T356 antes e após o preparo de cápsulas íntegras de alginato

Amostra	Microescleródios (média \pm dp)	Conídios (média \pm dp)
Antes de encapsular (por mL de suspensão de alginato)	$(8,7 \pm 0,7) \times 10^2$	$(2,9 \pm 1,2) \times 10^6$
Após encapsular (por g de cápsula)	$(3,0 \pm 0,5) \times 10^2$	$(5,7 \pm 0,8) \times 10^8$

dp = desvio padrão; n = 3 por amostra

As Figuras 10 e 11 mostram, respectivamente, os valores das concentrações de conídios e de microescleródios de *T. asperellum* T356 nas cápsulas íntegras e liofilizadas durante 120 dias de armazenamento a 8, 25 e 35 °C.

Figura 10 – Concentração de conídios de *Trichoderma asperellum* T356 em cápsulas íntegras (A) e liofilizadas (B) durante 120 dias de armazenamento a 8, 25 e 35 °C.



Letras minúsculas diferentes (a–c) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) no mesmo dia; Letras maiúsculas diferentes (A–E) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dias.

Observa-se que, após 120 dias de armazenamento, os conídios mantiveram-se viáveis (10^7 conídios/g) para os dois tipos de cápsulas a 8 e 25 °C, diminuindo apenas log 1/g em relação à concentração inicial de conídios.

Por outro lado, na temperatura de 35 °C a concentração de conídios diminuiu para ambas as cápsulas, sendo essa diminuição mais evidente para as cápsulas íntegras (10^4 conídios/g) do que para cápsulas liofilizadas (10^6 conídios/g), demonstrando que o processo de liofilização ajudou na preservação dos conídios ao longo do tempo para as cápsulas desenvolvidas no presente estudo.

A liofilização tem sido usada como método de preservação de microrganismos há décadas e é a técnica preferida para a preservação de coleções de cultura (Morgan *et al.*, 2006). As desvantagens deste método, especialmente quando aplicado em larga escala,

incluem a possibilidade de contaminação cruzada, perda de viabilidade e altos custos de processamento (JIN; CUSTIS, 2011).

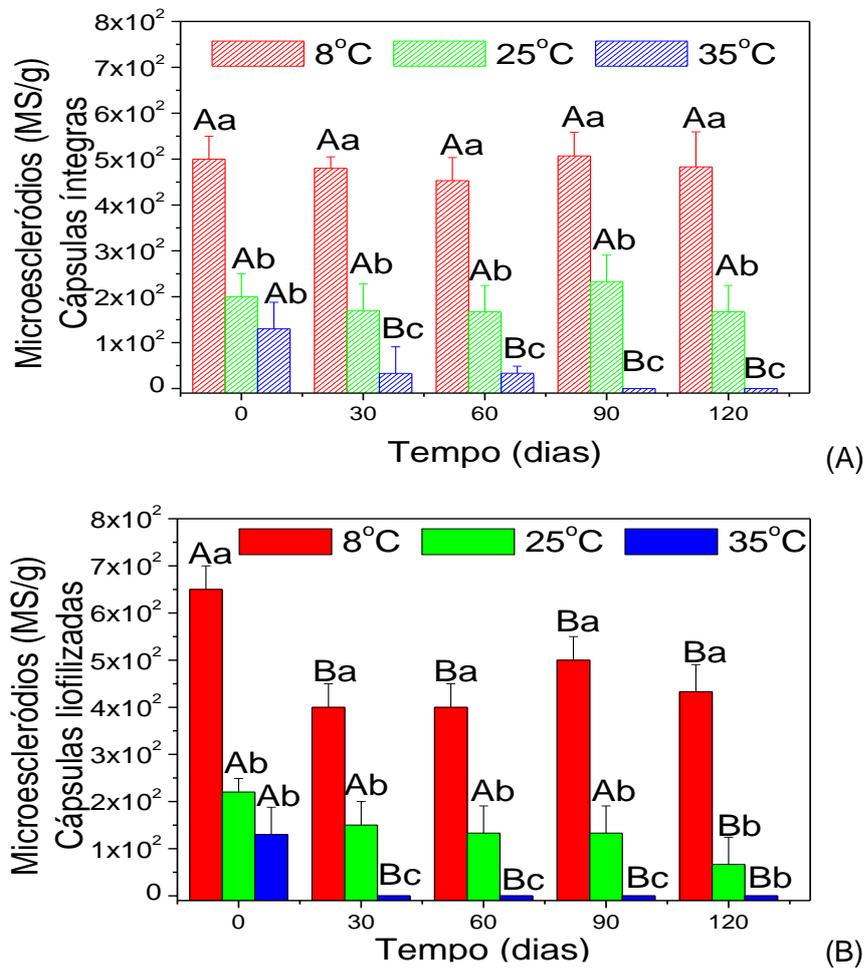
Em contrapartida, nota-se que após o processo de liofilização a concentração inicial dos conídios nas cápsulas liofilizadas é de 10^8 conídios/g, similar à concentração inicial de conídios nas cápsulas íntegras. No entanto, vale salientar que os valores das concentrações estão expressos por grama de cápsula, e que as cápsulas íntegras foram avaliadas em base úmida. Dessa forma, o processo de secagem por liofilização pode ter provocado uma diminuição da concentração inicial de conídios nas cápsulas liofilizadas. No entanto, conforme relatado anteriormente, as cápsulas liofilizadas tendem a manter a concentração de conídios ao longo do tempo, mesmo sob armazenamento a 35 °C.

Santos (2016) desenvolveu formulações multiparticuladas do fungo *Metarhizium anisopliae* por meio da técnica de extrusão-esferonização, com secagem em leito fluidizado com temperatura do ar de saída mantida a 40°C ou 50°C e avaliação da concentração e viabilidade de conídios após armazenamento dos *pellets* por 7 a 21 dias sob duas condições: câmara climática a 40 °C e 75% de umidade relativa e refrigerador a 4 °C. A formulação selecionada foi composta por vermiculita, terra diatomácea e dióxido de silício coloidal (78:20:2), que apresentou concentração de conídios superior a $1,7 \times 10^9$ conídios/g de *pellets*. A autora observou contaminação dos *pellets* sob armazenamento a 40 °C após o 7º dia de ensaio, enquanto que a 4 °C a produção e a viabilidade dos conídios permaneceram estáveis até o 21º dia de armazenamento. No presente trabalho, não foi observado o aparecimento de contaminação durante os 120 dias de armazenamento em nenhuma das condições investigadas.

Com relação aos MS (Figura 11), observa-se que as concentrações se mantiveram em torno de 10^2 MS/g para ambas as cápsulas e nas temperaturas de 8 e 25 °C, sem diferenças significativas entre os tratamentos. No entanto, foi observada significativa redução da concentração de MS a 35 °C para ambas as cápsulas. Apesar de serem estruturas de resistência, sabe-se que o conteúdo de umidade pode ser crítico para a sobrevivência e estabilidade durante estocagem de microrganismos, incluindo propágulos fúngicos (CONNICK *et al.*, 1996; HONG *et al.*, 1998).

No presente estudo, os MS parecem ter sofrido degradação quando armazenados a 35 °C, sendo este resultado observado já a partir de 30 dias de armazenamento. De acordo com Mascarin *et al.* (2014), a influência do conteúdo de umidade em grânulos de MS pode ser um fator crítico para a estabilidade a estocagem ao longo do tempo a temperatura ambiente, especialmente nos trópicos, quando os micopesticidas podem ser expostos à condições extremas por longos períodos de tempo.

Figura 11 – Concentração de microescleródios de *Trichoderma asperellum* T356 em cápsulas íntegras (A) e liofilizadas (B) durante 120 dias de armazenamento a 8, 25 e 35 oC.

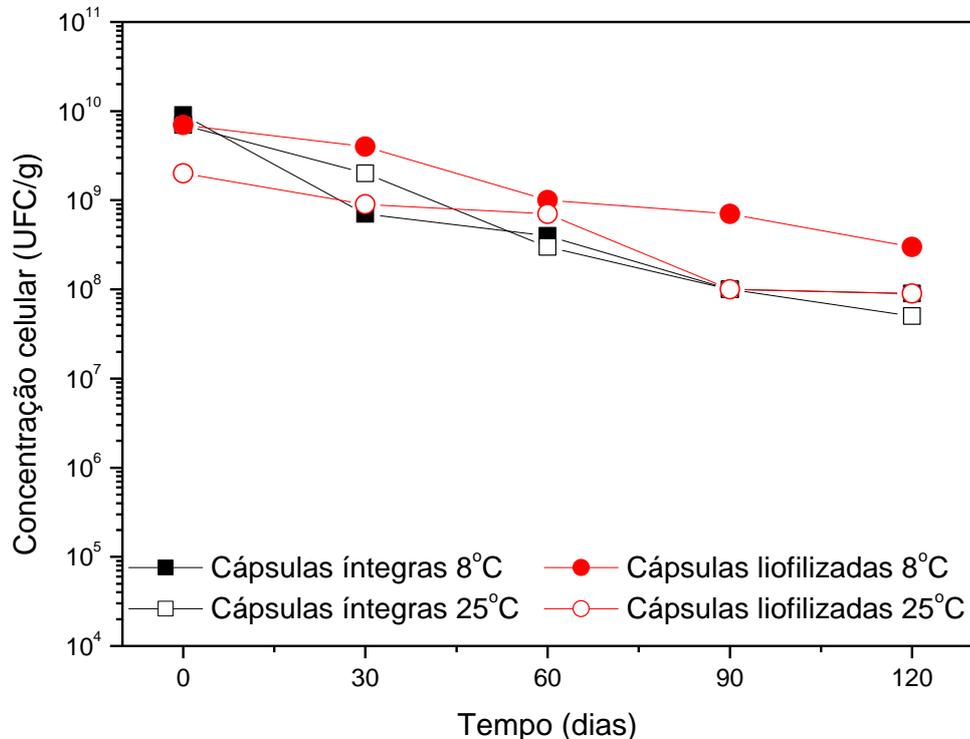


Dois fatores que influenciam: baixa umidade e alta temperatura

Letras minúsculas diferentes (a–c) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) no mesmo dia; Letras maiúsculas diferentes (A–E) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dias.

A Figura 12 mostra a concentração de células viáveis (UFC/g) de *Trichoderma asperellum* T356 em cápsulas íntegras e liofilizadas de acordo com a temperatura de armazenamento ao longo de 120 dias. Observa-se uma diminuição gradativa da viabilidade dos propágulos ao longo do tempo para ambas as formulações. No entanto, as cápsulas liofilizadas e mantidas a 8 °C foram as que apresentaram a maior concentração de propágulos viáveis ($3,0 \times 10^8$ propágulos/g) após 120 dias de armazenamento.

Figura 12 – Concentração de células viáveis (UFC/g) de *Trichoderma asperellum* T356 em cápsulas íntegras e liofilizadas de acordo com a temperatura de armazenamento ao longo de 120 dias

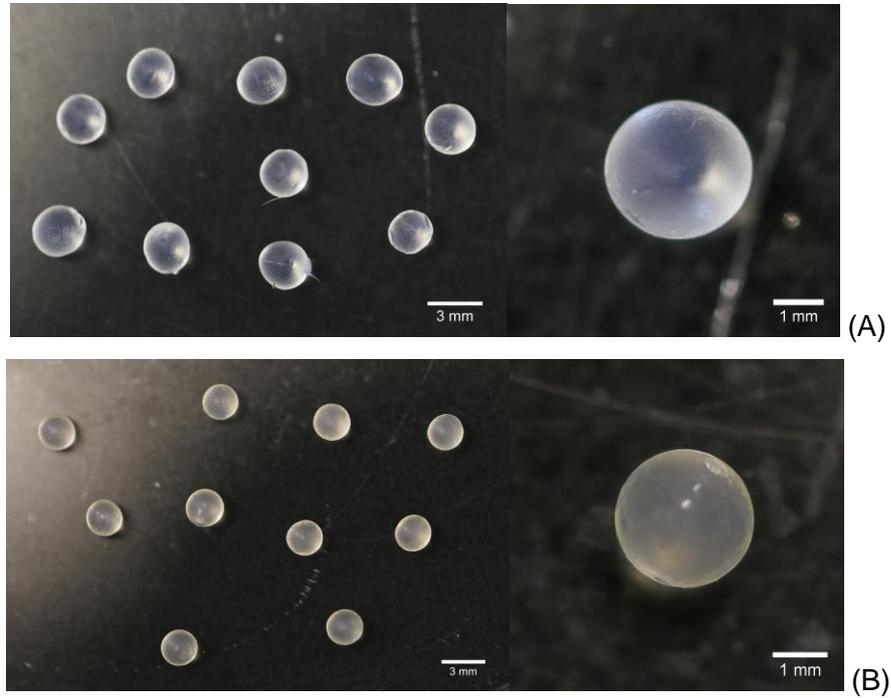


3.2.2. Tamanho das cápsulas

As Figuras 13 e 14 mostram, respectivamente, o aspecto visual das cápsulas íntegras e liofilizadas de alginato, armazenadas a temperatura ambiente (25 °C). Observou-se que as cápsulas íntegras eram de tamanho regular, esféricas, mononucleadas, opacas, sendo que as partículas contendo o microrganismo tinham uma coloração levemente marrom e apresentaram vasto número de “núcleo” (microrganismo) em todas as amostras, demonstrando alta eficiência de encapsulação. O tamanho médio das cápsulas íntegras “vazias” foi de $3,0 \pm 0,2$ mm, enquanto que o tamanho médio das cápsulas íntegras contendo o microrganismo foi um pouco menor, de $2,5 \pm 0,2$ mm.

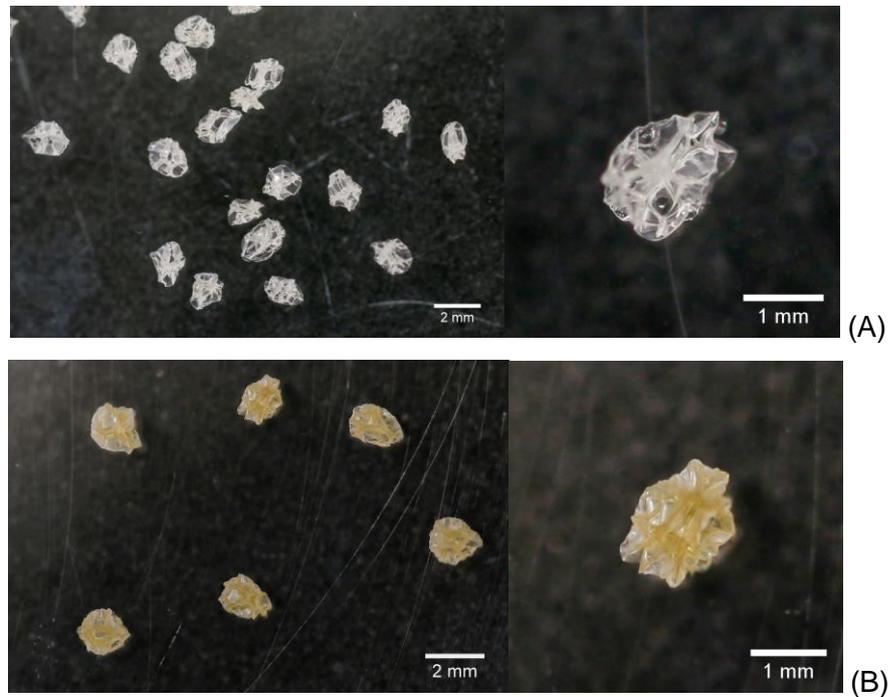
Observa-se ainda que as partículas liofilizadas eram de tamanho irregular, com aspecto “enrugado”, isto devido ao processo de secagem. Assim como observado em relação às partículas íntegras, as cápsulas liofilizadas contendo o microrganismo tinham uma coloração levemente marrom. Os tamanhos médios das cápsulas liofilizadas “vazias” e contendo o microrganismo, expressos como maior comprimento *versus* menor comprimento foram, respectivamente, de $1,7 \times 1,2$ mm ($\pm 0,1$ mm) e de $1,5 \times 1,1$ mm ($\pm 0,1$ mm).

Figura 13 – Imagens fotográficas das cápsulas íntegras de alginato armazenadas a temperatura ambiente (25 oC) sem o microrganismo (A) e com *Trichoderma asperellum* T356 (B).



Barra=1mm

Figura 14 – Imagens fotográficas das cápsulas liofilizadas de alginato armazenadas a temperatura ambiente (25 oC) sem o microrganismo (A) e com *Trichoderma asperellum* T356 (B).



Barra=1mm

3.2.3. Peso médio, número médio e densidade aparente das cápsulas íntegras

A Tabela 2 mostra os resultados dos parâmetros avaliados para cápsulas de alginato “vazias” e contendo *T. asperellum* T356 em relação ao número e peso das cápsulas que ocupam um volume de 10 mL, densidade aparente e peso estimado de cada cápsula. Pode-se observar que as amostras apresentaram baixo valor de desvio padrão, indicando que o processo de manipulação foi realizado de maneira correta e eficiente, demonstrando haver uniformidade nas cápsulas analisadas. De acordo com BRASIL (2007), a determinação do peso médio de formas farmacêuticas sólidas e a análise de tais resultados é um indicador da qualidade da técnica de preparação empregada.

Tabela 2 – Parâmetros avaliados para cápsulas de alginato “vazias” e contendo *Trichoderma asperellum* T356

Parâmetro	Cápsulas “vazias” (média ± dp)	Cápsulas com <i>Trichoderma asperellum</i> T356 (média ± dp)
Número de cápsulas em 10 mL	447 ± 13	447 ± 13
Peso de cápsulas em 10 mL	5,4 ± 0,3	6,1 ± 0,2
Densidade aparente (g/mL)	0,54 ± 0,03	0,61 ± 0,02
Peso de uma cápsula	0,0120 ± 0,0004	0,0137 ± 0,0003

dp = desvio padrão; n = 10 por amostra

3.2.4. Umidade e rendimento de cápsulas íntegras em cápsulas liofilizadas

A Tabela 3 mostra os valores obtidos para a umidade e o rendimento de cápsulas íntegras em cápsulas liofilizadas, com e sem *T. asperellum* T356. O elevado teor de água das microcápsulas íntegras, com e sem o microrganismo, é esperado para matrizes produzidas com o polissacarídeo alginato, que apresentam como característica alta capacidade de retenção de água. Após o processo de liofilização, o teor de umidade diminui consideravelmente, atingindo 9,6 % para cápsulas liofilizadas “vazias” e 6,7 % para cápsulas liofilizadas com *Trichoderma asperellum* T356.

Microcápsulas obtidas por gelificação iônica, apesar de apresentarem boas propriedades funcionais como a liberação controlada do princípio ativo, contêm um alto teor de umidade e, portanto, podem apresentar uma vida útil curta. A secagem das microcápsulas

pode aumentar sua durabilidade, estocagem e facilidade de manuseio, no entanto, deve garantir a viabilidade do microrganismo encapsulado.

Tabela 3– Umidade e rendimento de cápsulas íntegras em cápsulas liofilizadas para cápsulas de alginato “vazias” e contendo *Trichoderma asperellum* T356

Amostra	Umidade (%) (média ± dp)	Massa (g) (média ± dp)	Rendimento** (%)
Cápsulas íntegras “vazias”	96,20 ± 0,10	11,92* ± 0,91	3,52
Cápsulas liofilizadas “vazias”	9,60 ± 0,05	0,42 ± 0,10	
Cápsulas íntegras com <i>Trichoderma asperellum</i> T356	95,90 ± 0,10	13,60* ± 0,81	3,31
Cápsulas liofilizadas com <i>Trichoderma asperellum</i> T356	6,70 ± 0,02	0,45 ± 0,03	

*Massa correspondente a um volume de cápsulas íntegras de 20mL;

**Rendimento em base úmida;

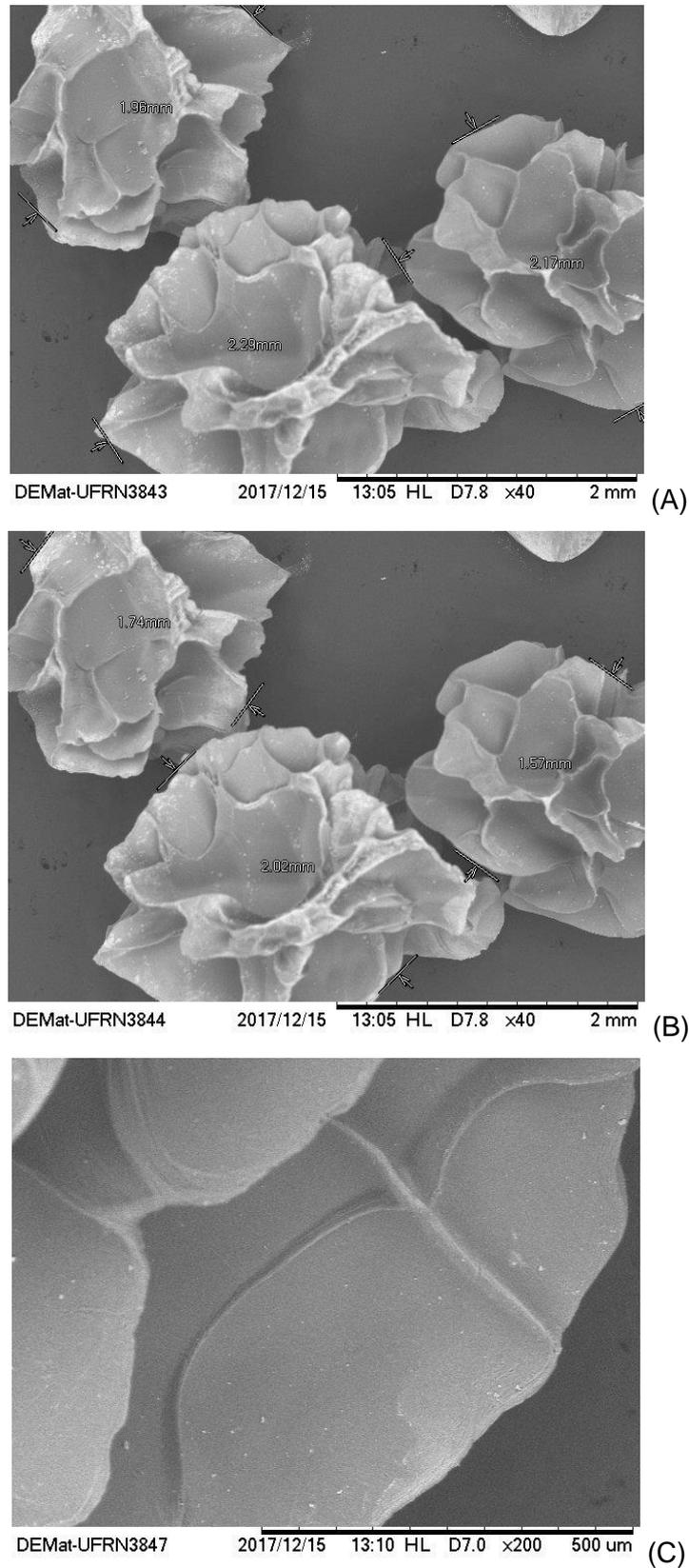
dp=desvio padrão;n=10 (para determinação do rendimento, por amostra); n=3 (para determinação da umidade, por amostra)

3.2.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As Figuras 15 e 16 mostram, respectivamente, as micrografias obtidas por MEV para microcápsulas de alginato “vazias” e contendo *Trichoderma asperellum* T356, ambas secas por liofilização. Para ambas as amostras, a morfologia das microcápsulas secas por liofilização mostrou um baixo grau de aglomeração, com partículas irregulares de superfície lisa e contínua. Conforme visualizado em microscopia ótica com partículas de aparência “enrugada”, observa-se um aspecto análogo a uma "couve-flor". Dessa forma, as micropartículas não apresentam uma parte interna “maciça”, o que provavelmente deve dificultar a localização do microrganismo por toda a sua extensão.

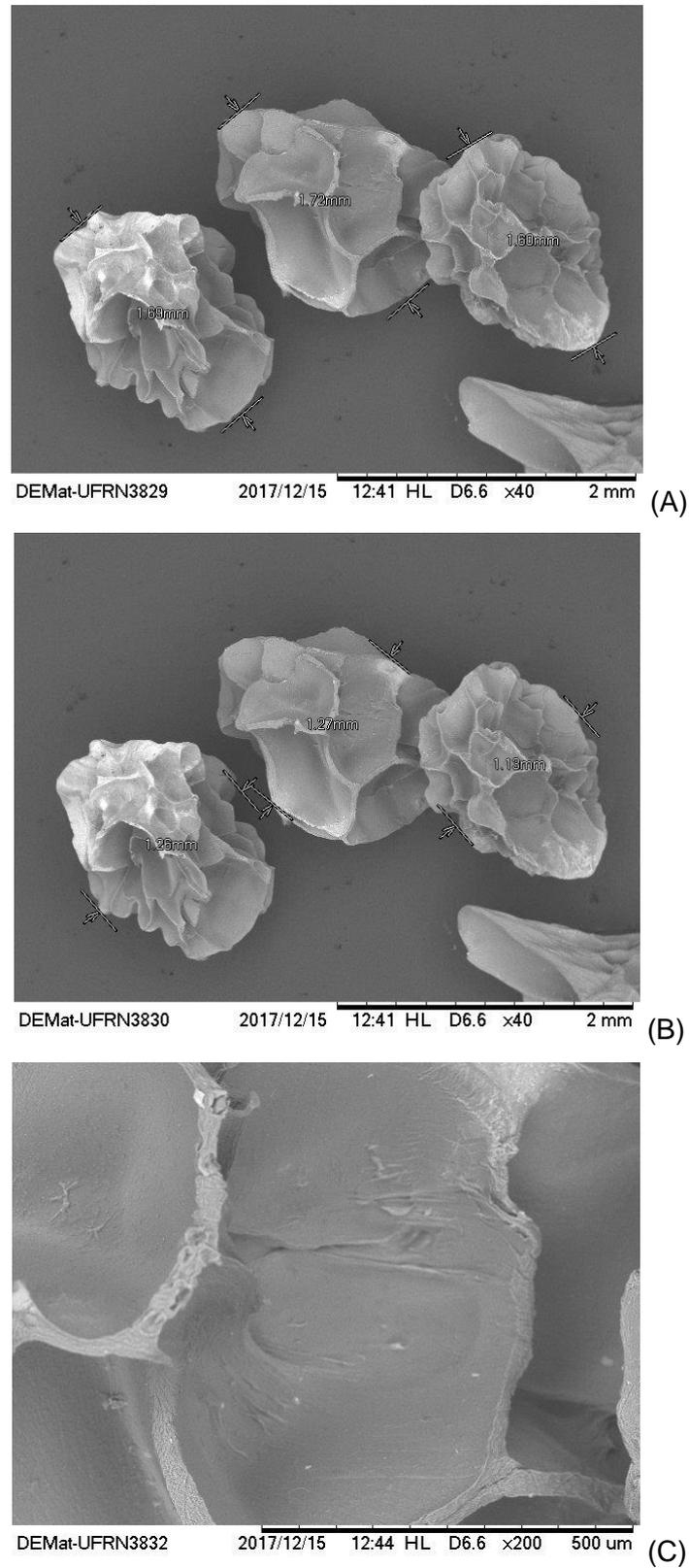
Os tamanhos obtidos pela análise das imagens do MEV demonstraram que as partículas “vazias” são maiores em comprimento e largura quando comparadas às partículas contendo o microrganismo, conforme visualizado por microscopia ótica.

Figura 15 – Micrografias obtidas por MEV para microcápsulas de alginato “vazias” secas por liofilização



A) e B) Microcápsulas com medidas (40x); C) Detalhe da parede (200x).

Figura 16 – Micrografias obtidas por MEV para microcápsulas de alginato contendo *Trichoderma asperellum* T356 secas por liofilização



A) e B) Microcápsulas com medidas (40x); C) Detalhe da parede (200x).

3.2.6. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier – FTIR

Os espectros de absorção no infravermelho foram usados para identificar a composição das amostras a partir dos grupos funcionais presentes e informações sobre as interações moleculares entre os componentes.

A Figura 17A mostra o espectro do alginato puro. A extensa banda de absorção entre 3.200 e 3.400 cm^{-1} é referente ao grupo funcional O-H, uma característica dos polissacarídeos naturais (Vinceković *et al.*, 2018), tal como o alginato. O pico presente em torno de 2937 cm^{-1} é atribuído ao estiramento simétrico e assimétrico de C-H. O aumento da intensidade do pico em torno de 1600 cm^{-1} é referente ao estiramento assimétrico do COO-, o pico 1417 cm^{-1} é referente ao estiramento simétrico do COO- e os picos 1090 cm^{-1} e 1030 cm^{-1} estão associados ao estiramento referente ao grupo C-O (FALKEBORG *et al.*, 2015; HONG-YAN *et al.*, 2015; BEKHIT *et al.*, 2016; LOCATELLI *et al.*, 2018). As bandas características de FTIR de alginato de sódio estão de acordo com os dados da literatura.

A Figura 17B mostra o espectro de *T. asperellum* T356 (microrganismo liofilizado). Pode-se observar que alguns picos de absorção correspondem a grupos funcionais característicos da parede celular de *Trichoderma*. Bishnoi *et al.* (2007) avaliaram o espectro de absorção de *T. viride* e identificaram os seguintes grupos funcionais: N-H e -OH (bandas de absorção entre 3253,5 e 3284,5 cm^{-1}), $>\text{CH}_2$ e -OH (bandas de absorção entre 2360,7 e 2925,8 cm^{-1}), -NH, C=O e C=C (absorção entre 1508 e 1637,5 cm^{-1}), C-F e C-Br (1029,9 cm^{-1}) e -OH (929,6 cm^{-1}). No presente estudo, foi observado um acentuado pico de absorção em 3250 cm^{-1} , que pode estar associado ao grupo amino (-NH) sobreposto aos grupos hidroxil (-OH). A absorção em 2900 cm^{-1} indica a presença do grupo alquil ($>\text{CH}_2$), e o pico forte a 1620 cm^{-1} bem como vários pequenos picos entre 1200 e 1400 cm^{-1} são causados pelo alongamento do grupo carbonílico (C=O) conjugado com -NH (um indicativo de formação de ligação amida). O pequeno pico a 1535 cm^{-1} representa a vibração do alongamento do grupo amina resultante do modo de deformação -NH para o modo de deformação C=N, e um pico forte a 1030 cm^{-1} representa as vibrações C-F e C-Br. Os grupos funcionais detectados no espectro de FTIR relacionam-se bem com a estrutura química da parede celular, e esses resultados corroboram com os relatados por Vinceković *et al.* (2016).

A Figura 18 mostra o espectro infravermelho das cápsulas íntegras e liofilizadas de alginato, vazias ou contendo *T. asperellum* T356. Os espectros mostram algumas mudanças em relação aos espectros isolados de alginato e de *T. asperellum* T356. Pode-se observar o desaparecimento de algumas bandas: 2937 cm^{-1} , 1417 cm^{-1} , 1030 cm^{-1} e 1090 cm^{-1} para o

alginato e 2900 cm^{-1} , 1535 cm^{-1} , 1409 cm^{-1} e 1030 cm^{-1} para *T. asperellum* T356 pode ser um indicativo de interações com grupamentos tipo amina, carboxilato e CO (Vinceković *et al.*, 2016). Como esperado, observa-se ainda que a secagem das cápsulas provocou uma diminuição nas bandas de absorção na faixa de 3200 cm^{-1} , referentes ao grupo funcional O-H.

Figura 17 – Espectro infravermelho das amostras de alginato (A) e *Trichoderma asperellum* T356 (microrganismo liofilizado) (B)

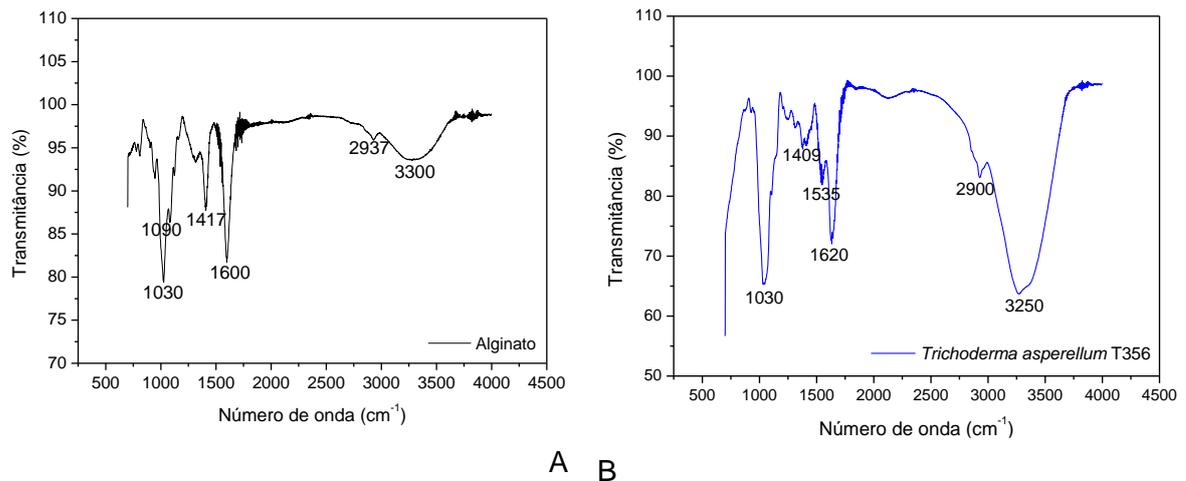
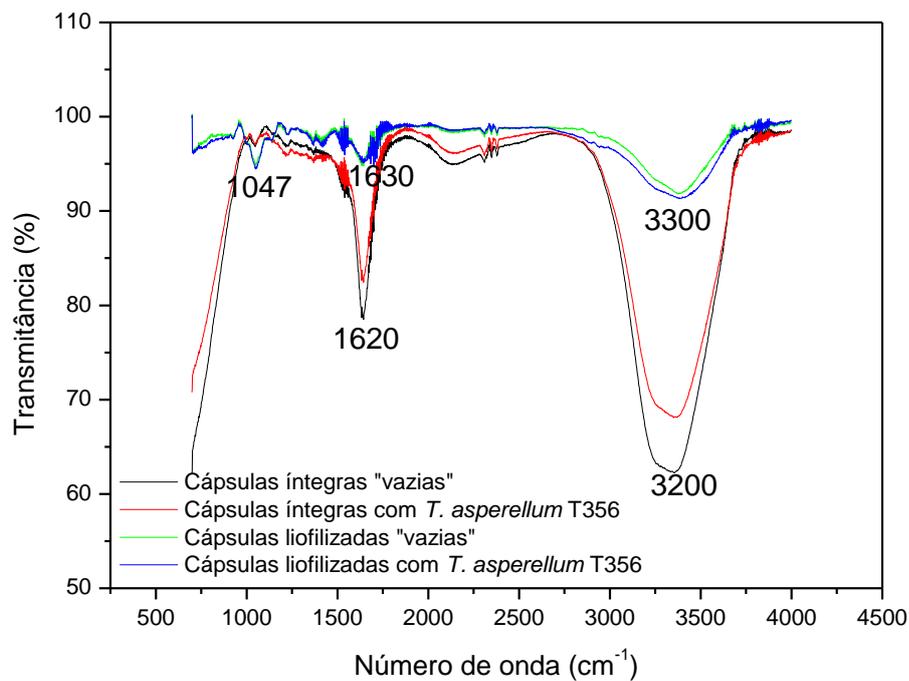


Figura 18 – Espectro infravermelho das cápsulas íntegras e liofilizadas de alginato, vazias ou contendo *Trichoderma asperellum* T356



REFERÊNCIAS

- AKHTAR, K. *et al.* Removal and recovery of uranium from aqueous solutions by Ca-alginate immobilized *Trichoderma harzianum*. **Bioresource Technology**, New York, v. 100, p. 4551–4558, 2009.
- BEKHIT *et al.* Design of microcapsules containing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in alginate shell and xanthan gum with nutrients core. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 68, p. 446-453, 2016.
- BETTIOL, W. Biopesticide use and research in Brazil. **Outlooks on Pest Management**, Jaguariúna, SP, v. 22, n. 6, p. 280-283, 2011.
- BISHNOI, N. R.; KUMAR, R.; BISHNOI, K. Biosorption of Cr (VI) with *Trichoderma viride* immobilized fungal biomass and cell free Ca-alginate beads. **Indian Journal of Experimental Biology**, Nova Delhi, v. 45, p. 657-664, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução. RCD número 67, de 08 de outubro de 2007. Dispõe sobre as boas práticas de manipulação de preparações magistrais e oficinais para uso humano em farmácias. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 09 de outubro de 2007.
- CONNICK, W.J. J. *et al.* Water activity and other factors that affect the viability of *Colletotrichum truncatum* conidia in wheat flourkaolin granules ('Pesta'). **Biocontrol Science Technology**, Abingdon – Oxfordshire, v. 6, p. 277–284, 1996.
- FALKEBORG, M. *et al.* Dodecenyly succinylated alginate as a novel material for encapsulation and hyperactivation of lipases. **Carbohydrate Polymers**, Aveiro – Coimbra, v. 133, p. 194–202, 2015.
- GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SANTOS, A.F.; AUER, C.G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Revista Floresta**, Curitiba, v.30, p.135-165, 2000.
- HARMAN, G.E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, p. 190-194, 2006.
- HOFFMANN, C.A.; CHAGAS, L.F.B.; SILVA, D.P.; CHAGAS JUNIOR, A.F.; SCHEIDT, G.N. Potencial de antagonismo de isolados de *Trichoderma* sp. contra o isolado de- *Fusarium* sp., in vitro. **Revista Verde**, Pombal, v.10, n.1, p.236 – 242. 2015.
- HONG, T.D. *et al.* Limits to the negative logarithmic relationship between moisture content and longevity in conidia of *Metarhizium flavoviride*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 81, p. 625–630, 1998.
- HONG-YAN *et al.* Characterization of pumpkin polysaccharides and protective effects on streptozotocin-damaged islet cells. **Chinese Journal of Natural Medicines**, Nanjing, v. 13(3): p. 0199–0207, 2015.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análises de alimentos, v. 1, 4 ed. São Paulo, ANVISA, 2008.

JACKSON, M.A.; SCHISLER, D.A. Liquid culture production of microsclerotia of *Colletotrichum truncatum* for use as bioherbicide propagules. **Mycological Research**, Cambridge, v. 99, p. 879–884, 1995.

JACKSON, M. A; JARONSKI, S. T. Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. **Mycological Research**, Cambridge, v. 113, n. 8, p. 842–850, 2009.

JIN, X.; CUSTIS, D. Microencapsulating aerial conidia of *Trichoderma harzianum* through spray drying at elevated temperatures. **Biological Control**, Amsterdam, v. 56, p. 202–208, 2011.

KOBORI, N. N. *et al.* Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. **Fungal Biology**, New York, v. 119, n. 4, p. 179-190, 2015.

LOCATELLI, G.O. *et al.* Development of *Trichoderma* sp. formulations in encapsulated granules (CG) and evaluation of conidia shelf-life. **Biological Control**, Amsterdam, v. 117, p. 21-29, 2018.

MASCARIN, G. M. *et al.* Production of microsclerotia by Brazilian strains of *Metarhizium* spp. using submerged liquid culture fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 30, n. 5, p. 1583-1590, 2014.

MENDES, H. T. A. *et al.* Metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma longibrachiatum* e *Trichoderma harzianum* sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. **Cadernos de Agroecologia**, Recife, v. 13, n. 1, 2018.

MORGAN, C.A. *et al.* Preservation of microorganisms by drying: A review. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 66, p.183–193, 2006.

SANTOS, T.R. **Desenvolvimento de formulações multiparticuladas contendo microescleródios do fungo *Metarhizium anisopliae* para controle biológico.** 2016. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, 2016.

SHEARER, J.F.; JACKSON, M.A. Liquid culturing of microsclerotia of *Mycoleptodiscus terrestris*, a potential biological control agent for the management of Hydrilla. **Biological Control**, Amsterdam, v. 38, p. 298–306, 2006.

VAN LENTEREN, J.C.; Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. **Biological Control**, Amsterdam. DOI 10.1007/s10526-017-9801-4., 2017.

VINCEKOVIĆ, M. *et al.* Release of *Trichoderma viride* Spores from Microcapsules Simultaneously Loaded with Chemical and Biological Agents. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, Zagreb, v. 82, p. 395-401, 2018.

VINCEKOVIĆ, M. *et al.* S.Encapsulation of Biological and Chemical Agents for Plant Nutrition and Protection: Chitosan/Alginate Microcapsules loaded with copper cations and *Trichoderma viride*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 64, p. 8073-8083, 2016.

WOO, S.L. *et al.* *Trichoderma*- based products and their widespread use in agriculture. **The Open Mycology Journal**, Hilversum, v. 8, p. 71-126, 2014.

5 DISCUSSÃO GERAL

O desenvolvimento de biopesticidas para o controle de pragas na agricultura é uma estratégia de importância para o manejo de doenças no campo e podem ser utilizados sem prejudicar o equilíbrio do meio ambiente. *Trichoderma* spp. são agentes de biocontrole extensivamente usados no manejo de doenças causadas por fitopatógenos, sendo empregados com sucesso no solo, sementes e folhas, além de serem utilizados como promotores de crescimento de plantas.

O emprego de linhagens de *Trichoderma* produtoras de microescleródios representa uma alternativa interessante para a obtenção de bioformulados, isto porque estas estruturas têm se mostrado mais eficazes do que produtos à base de conídios para o controle de algumas pragas no campo.

De acordo com os resultados obtidos no trabalho, foi possível observar que *Trichoderma asperellum* T356 foi capaz de produzir microescleródios em fermentação submersa a partir de 2 dias de cultivo em meio com concentração de carbono de 20 g/L e razão C:N de 10:1, atingindo uma concentração máxima de $2,8 \times 10^4$ MS/mL após 5 dias.

Foi possível obter cápsulas de alginato íntegras e liofilizadas contendo o microrganismo, e a avaliação da concentração dos propágulos (conídios e microescleródios) ao longo de 120 dias de armazenamento a diferentes temperaturas mostrou que os conídios se mantiveram viáveis (10^7 conídios/g) para os dois tipos de cápsulas a 8 e 25 °C, enquanto que a 35 °C as concentrações de conídios diminuem para as cápsulas íntegras (10^4 conídios/g) e liofilizadas (10^6 conídios/g). Para os microescleródios, as concentrações mantiveram-se em torno de 10^2 MS/g para ambas as cápsulas e nas temperaturas de 8 e 25 °C, enquanto que estas estruturas são degradadas quando as cápsulas são armazenadas a a 35 °C a partir de 30 dias de armazenamento. Em relação à viabilidade dos propágulos, observou-se uma diminuição gradativa da viabilidade ao longo do tempo para ambas as formulações, e o melhor resultado foi obtido para cápsulas liofilizadas e mantidas a 8 °C, que apresentaram uma concentração de $3,0 \times 10^8$ propágulos/g após 120 dias de armazenamento.

As cápsulas íntegras de alginato contendo o microrganismo apresentaram tamanho regular e esférico, com tamanho médio de $2,5 \pm 0,2$ mm, enquanto que as cápsulas secas por liofilização apresentaram tamanho irregular e com aspecto “enrugado”, com tamanho de $1,5 \times 1,1$ mm ($\pm 0,1$ mm). Em relação à umidade, cápsulas íntegras com *Trichoderma asperellum* T356 apresentaram um percentual de $95,90 \pm 0,10$ %, e após a liofilização a umidade foi de $6,70 \pm 0,02$ %. As micrografias obtidas por MEV para cápsulas liofilizadas mostrou um baixo grau de aglomeração, com partículas irregulares de superfície lisa e contínua. Por fim, os espectros de absorção no infravermelho sugerem uma interação entre grupos funcionais presentes na parede celular do fungo e o polímero.

6 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o encapsulamento de propágulos de *T. asperellum* T356 em matriz de alginato, armazenadas na temperatura de 8 °C em 120 dias, pode ser considerado um método eficaz para a obtenção de veículos de fungos entomopatogênicos a serem empregados no controle biológico de pragas na agricultura.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, B. S. *et al.* Phytochemistry, antioxidant potential and antifungal of *Byrsonima crassifolia* on soil phytopathogen control. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos-SP, v. 78, n. 1, p. 140-146, 2018.
- ANTONACCI, A. *et al.* Nanostructured (Bio) sensors for smart agriculture. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 98, p. 95-103, 2018.
- AULER, A. C. V.; CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M. Antagonismo de *trichoderma harzianum* a *sclerotium rolfsii* nas culturas do feijoeiro e soja. **Revista Agro@ambiente**, Boa Vista – RR, v. 7, n. 3, p. 359-365, 2013.
- BATISTA, D.P.C. *et al.* Formulações bioinseticidas de *Beauveria bassiana* a base de nanocompósito polimérico visando o controle de praga do coqueiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS., 12, 2013 Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: ABPol, 2013.
- BEKHIT *et al.* Design of microcapsules containing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in alginate shell and xanthan gum with nutrients core. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 68, p. 446-453, 2016.
- BELLEI, T.T. **O uso de agrotóxicos e a prevalência de neoplasias no município de Vacaria/RS.** 2017. 126 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências Ambientais) - Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciências Ambientais, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2017.
- BETTIOL, W. Biopesticide use and research in Brazil. **Outlooks on Pest Management**, Jaguariúna, SP, v. 22, n. 6, p. 280-283, 2011.
- BISHNOI, N. R.; KUMAR, R.; BISHNOI, K. Biosorption of Cr (VI) with *Trichoderma viride* immobilized fungal biomass and cell free Ca-alginate beads. **Indian Journal of Experimental Biology**, Nova Delhi, v. 45, p. 657-664, 2007.
- BORZANI, W. *et al.* **Biotecnologia industrial: fundamentos.** São Paulo: Edgard Blücher, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT: Sistema de agrotóxicos fitossanitários.** [Brasília]: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, c2003. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 02 ago. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RCD número 67, de 08 de outubro de 2007. Dispõe sobre as boas práticas de

manipulação de preparações magistrais e oficinais para uso humano em farmácias. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, 09 out. 2007.

CARBONELL, S. A. M. *et al.* Tamanho de grão comercial em cultivares de feijoeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria – RS, v. 40, n. 10, p. 2067-2073, 2010.

CARVALHO, D. D. C. *et al.* Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by *Trichoderma harzianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília – DF, v. 46, n. 8, p. 822-828, 2011.

CHARCHAR, M. J. D. *et al.* Occurrence of a new disease of irrigated cotton, in Brazil, caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 6, p. 1100-1106, 1999.

CONNICK, W.J. J. *et al.* Water activity and other factors that affect the viability of *Colletotrichum truncatum* conidia in wheat flourkaolin granules ('Pesta'). **Biocontrol Science Technology**, Abingdon – Oxfordshire, v. 6, p. 277–284, 1996.

CONTINA, J. B.; DANDURAND, L. M.; KNUDSEN, G. R. Use of GFP-tagged *Trichoderma harzianum* as a tool to study the biological control of the potato cyst nematode *Globodera pallida*. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 115, p. 31-37, 2017.

DIAS, S. C. J.; NORONHA, E. F. **Avaliação do potencial biotecnológico de fungos isolados de solos do cerrado da região de Unaí, Minas Gerais**. 2011. 81f. Tese (Doutorado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2011.

DIAS, J.C.T.; REZENDE, R.P.; LINARDI, V.R. Effects of immobilization in Ba-alginate on nitrile-dependent oxygen uptake rates of *Candida guilliermondii*. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 3, p. 221-224, 2001.

ETHUR, L. Z.; CEMBRANEL, C. Z.; SILVA, A. C. F. da. Selection of *Trichoderma* spp. seeking the control of *Sclerotinia sclerotiorum*, in vitro. **Ciência Rural**, Santa Maria – RS, v. 31, n. 5, p. 885-887, 2001.

FALKEBORG, M. *et al.* Dodecanyl succinylated alginate as a novel material for encapsulation and hyperactivation of lipases. **Carbohydrate Polymers**, Aveiro – Coimbra, v. 133, p. 194–202, 2015.

FIGUEIRA, F. C.; HOTZA, D.; BERNARDIN, A. M. Obtaining grits by gelation of ceramic suspensions. **Cerâmica**, São Paulo, v. 60, n. 356, p. 457-464, 2014.

GOMES, A. A. *et al.* Acumulação de biomassa, características fisiológicas e rendimento de grãos em cultivares de feijoeiro irrigado e sob sequeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 10, p. 1927-1937, 2000.

- GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SANTOS, A.F.; AUER, C.G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Revista Floresta**, Curitiba, v.30, p.135-165, 2000.
- HARMAN, G.E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, p. 190-194, 2006.
- HARMAN, G. E. *et al.* *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 2, p. 43-56, 2004.
- HONG, T.D. *et al.* Limits to the negative logarithmic relationship between moisture content and longevity in conidia of *Metarhizium flavoviride*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 81, p. 625–630, 1998.
- JABER, L. R.; OWNLEY, B. H. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens?. **Biological Control**, Cambridge, v. 116, p. 36-45, 2018.
- JACKSON, M.A.; SCHISLER, D.A. Liquid culture production of microsclerotia of *Colletotrichum truncatum* for use as bioherbicidal propagules. **Mycological Research**, Cambridge, v. 99, p. 879–884, 1995.
- JACKSON, M. A; JARONSKI, S. T. Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. **Mycological Research**, Cambridge, v. 113, n. 8, p. 842–850, 2009.
- JIN, X.; CUSTIS, D. Microencapsulating aerial conidia of *Trichoderma harzianum* through spray drying at elevated temperatures. **Biological Control**, Amsterdam, v. 56, p. 202–208, 2011.
- JUNGES, E. *et al.* *Trichoderma* spp. in the Production of Seedling of Forest Species. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 2, p. 237-244, 2016.
- KOBORI, N. N. *et al.* Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. **Fungal Biology**, New York, v. 119, n. 4, p. 179-190, 2015.
- LEITE, R. M. V. B. C. *et al.* Incidência da podridão branca causada por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol semeado após a colheita da safra de verão, no Estado do Paraná. **Summa Phytopathol**, Jaguariúna, v. 26, p. 81-84, 2000.
- LOCATELLI, G.O. *et al.* Development of *Trichoderma* sp. formulations in encapsulated granules (CG) and evaluation of conidia shelf-life. **Biological Control**, Amsterdam, v. 117, p. 21-29, 2018.
- MACHADO, D. F. M. *et al.* *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, Recife, v. 35, n.1, p. 274-288, 2012.

- MAFIA, R. G. *et al.* Encapsulamento de *Trichoderma inhamatum* para o controle biológico de *Rhizoctonia solani* na propagação clonal de Eucalyptus. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 28, p. 101-105, 2003.
- MARQUES, R. P.; MONTEIRO, A. C.; PEREIRA, G. T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de Nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, p. 1675-1680, 2004.
- MASCARIN, G. M. *et al.* Production of microsclerotia by Brazilian strains of *Metarhizium* spp. using submerged liquid culture fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 30, n. 5, p. 1583-1590, 2014.
- MASCARIN, G.M. *et al.* Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, 2018.
- MEDEIROS, F. R. *et al.* Occurrence of *Purpureocillium lilacinum* in citrus black fly nymphs. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 40, n. 2, p. 1-3, 2018.
- MORANDI, M. A. B; BETTIOL, W. Controle Biológico de Plantas no Brasil. In: _____. **Biocontrole de Doenças de Plantas Usos e Perspectivas**. Brasília: Embrapa, 2009. cap. 1, p. 300-334.
- MORETINI, A.; MELO, I. S. Formulação do fungo *Coniothyrium minitans* para controle do mofo-branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 2, p. 155-161, 2007.
- MORGAN, C.A. *et al.* Preservation of microorganisms by drying: A review. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 66, p.183–193, 2006.
- MILANESI, P. M. *et al.* Detecção de *fusarium spp.* e *trichoderma spp.* e antagonismo de *trichoderma sp.* em soja sob plantio direto. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, supl. 1, p. 3219-3234, 2013.
- PEDRO, E. A. de S. *et al.* Plant growth promotion of common bean and anthracnose control by *Trichoderma* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 11, p. 1589-1595, 2012.
- RAMANUJAM, B. *et al.* Mass production, formulation, quality control and delivery of *Trichoderma* for plant disease management. **The Journal of Plant Protection Sciences**, Bet Dagan, v. 2, p. 1-8, 2010.
- RESENDE, M. L. *et al.* Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 793-798, 2004.

RODRIGUES, F. A.; CARVALHO, E. M.; VALE, F. X. R. do. Severidade da podridão-radicular de *Rhizoctonia* do feijoeiro influenciada pela calagem, e pelas fontes e doses de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 9, p. 1247-1252, 2002.

SANTOS, T.R. **Desenvolvimento de formulações multiparticuladas contendo microescleródios do fungo *Metarhizium anisopliae* para controle biológico.** 2016. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, 2016.

SBRAVATTI JÚNIOR, J. A. *et al.* Seleção *in vitro* de fungos endofíticos para o controle biológico de *Botrytis cinerea* em *Eucalyptus benthamii*. **Revista Floresta**, Curitiba, v.43, n.1, 2013.

SHARMA, P. *et al.* A Lysine Desert Protects a Novel Domain in the Slx5-Slx8 SUMO Targeted Ub Ligase To Maintain Sumoylation Levels in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, Burlington, v. 4, p. 1807-1821, 2017.

SHEARER, J.F.; JACKSON, M.A. Liquid culturing of microsclerotia of *Mycleptodiscus terrestris*, a potential biological control agent for the management of Hydrilla. **Biological Control**, Amsterdam, v. 38, p. 298–306, 2006.

VALADARES, A. C. F. *et al.* Essential oils from *Piper aduncum* inflorescences and leaves: chemical composition and antifungal activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 3, p. 2691-2699, 2018.

VERMA, M. *et al.* Review. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, New York, v. 37, p. 1-20, 2007.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 390-400, maio 2003.

VINCEKOVIĆ, M. *et al.* Release of *Trichoderma viride* Spores from Microcapsules Simultaneously Loaded with Chemical and Biological Agents. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, Zagreb, v. 82, p. 395-401, 2018.

VINCEKOVIĆ, M. *et al.* S.Encapsulation of Biological and Chemical Agents for Plant Nutrition and Protection: Chitosan/Alginate Microcapsules loaded with copper cations and *Trichoderma viride*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 64, p. 8073-8083, 2016.

WANDERLEY, V. S.; OLIVEIRA, J. V.; ANDRADE JR, M. L. Resistance of cultivars and lines of bean, *Phaseolus vulgaris* L., to *Zabrotes subfasciatus* (Boh.)(Coleoptera: Bruchidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Santo Antônio de Goiás, v. 26, n. 2, p. 315-320, 1997.

WOO, S.L. *et al.* *Trichoderma*- based products and their widespread use in agriculture. **The Open Mycology Journal**, Hilversum, v. 8, p. 71-126, 2014.