



XXII CONGRESSO  
BRASILEIRO DE  
ENGENHARIA QUÍMICA  
23 a 26 de Setembro de 2018  
Hotel Maksoud Plaza  
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO  
SOBRE O ENSINO DE  
ENGENHARIA QUÍMICA  
27 a 28 de Setembro de 2018  
USP  
São Paulo – SP

# OBTENÇÃO DE CÁPSULAS DE ALGINATO CONTENDO *Trichoderma asperellum* T356

LOPES, ARO<sup>1</sup>, LOCATELLI, GO<sup>2</sup>, LOBO Jr, M<sup>3</sup>, MASCARIN, GM<sup>4</sup> e LUNA-FINKLER, CL<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Doutorando da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO)

<sup>3</sup> Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO

<sup>4</sup> Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória  
E-mail para contato: [chrislluna@yahoo.com.br](mailto:chrislluna@yahoo.com.br)

**RESUMO** – *O controle biológico constitui uma estratégia de grande importância para a redução do uso de pesticidas químicos no controle de fitopatógenos. Neste sentido, um microrganismo amplamente utilizado neste método é o fungo Trichoderma. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a viabilidade de conídios submersos e microescleródios (MS) de Trichoderma asperellum T356 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 MS, enquanto a viabilidade das cápsulas íntegras e liofilizadas foi monitorada ao longo de 120 dias de armazenamento sob diferentes temperaturas. Verificou-se que após 120 dias, os conídios mantiveram-se viáveis (log 7/g) tanto para cápsulas íntegras quanto liofilizadas nas temperaturas de 8 e 25 °C, enquanto que para MS a melhor condição foi 8 °C (log 2/g) para ambas as formulações.*

## 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, sendo parte fundamental da recém-famigerada “segunda revolução verde” com bases microbiológicas voltadas ao desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável e menos poluidora. Entre os microrganismos para uso na agricultura, destacam-se os fungos do gênero *Trichoderma*, que são os mais usados no controle de fitopatógenos devido a modos de ação como hiperparasitismo e antibiose e à sua facilidade de



XXII CONGRESSO  
BRASILEIRO DE  
ENGENHARIA QUÍMICA  
23 a 26 de Setembro de 2018  
Hotel Maksoud Plaza  
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO  
SOBRE O ENSINO DE  
ENGENHARIA QUÍMICA  
27 a 28 de Setembro de 2018  
USP  
São Paulo – SP

cultivo massal *in vitro* em diversos substratos, cujos propágulos produzidos são empregados tanto para controle de patógenos radiculares como de parte aérea em plantas cultivadas. 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. 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 (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 deste biopesticida. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo a obtenção de cápsulas de alginato contendo MS e conídios submersos de *Trichoderma asperellum* T356 visando à sua aplicação no controle de fitopatógenos.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Obtenção do microrganismo e manutenção da cultura

O fungo *T. asperellum* T356 foi cedido pela Embrapa Arroz e Feijão. 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. Partindo-se de uma colônia esporulada, obteve-se uma cultura estoque liofilizada em solução crioprotetora (10 % p/v de sacarose e 1 % p/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).

### 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 % p/v) e inoculada no meio de cultivo (concentração inicial ajustada para 10<sup>5</sup> 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 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. Após o término de cada cultivo, as amostras foram homogeneizadas, filtradas em três peneiras



XXII CONGRESSO  
BRASILEIRO DE  
ENGENHARIA QUÍMICA  
23 a 26 de Setembro de 2018  
Hotel Maksoud Plaza  
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO  
SOBRE O ENSINO DE  
ENGENHARIA QUÍMICA  
27 a 28 de Setembro de 2018  
USP  
São Paulo – SP

(malhas de 16, 20 e 35 *mesh*) e as células foram lavadas com água destilada estéril.

### 2.3. Formulações em cápsulas de alginato

Inicialmente, preparou-se uma solução de alginato de sódio a 2 % (p/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 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. A amostra foi extrudada por quatro agulhas estéreis (0,70 × 25 mm) sobre 1 L de CaCl<sub>2</sub> a 0,2 M, sob agitação constante. Após repouso por 2 h a 4 °C, as cápsulas foram coletadas em peneira, lavadas com água estéril, distribuídas em frascos de penicilina e divididas em dois lotes (cápsulas íntegras e liofilizadas). Após contagem inicial de MS e conídios, as amostras foram armazenadas (8 °C, 25 °C e 35 °C) para a contagem de propágulos a cada 30 dias durante 120 dias de avaliação. Cápsulas sem o microrganismo foram preparadas como controle.

### 2.4. Viabilidade de *T. asperellum* T356 e análise estatística

As contagens de conídios e de MS nas suspensões foi determinada a partir de diluições decimais seriadas em solução salina e posterior observação em microscópio ótico. As contagens das cápsulas foram realizadas dissolvendo-se 1 g (cápsulas íntegras) e 0,1 g (cápsulas liofilizadas) em solução de citrato de sódio 1,0 % (p/v), com posterior diluição e contagem. 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®.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme mostra a Figura 1, 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. Foi observado que as concentrações celulares aumentam após o encapsulamento, sendo mais evidente para os MS. A concentração de MS antes da encapsulação 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 aumenta para  $3,0 \times 10^4$  MS/g de cápsula. Para os conídios, as concentrações antes e após a encapsulação foram de  $2,9 \times 10^6$  conídios/mL e  $5,7 \times 10^6$  conídios/g, respectivamente. A Figura 2 mostra que após 120 dias os conídios mantiveram-se viáveis (log 7/g) para os dois tipos de cápsulas a 8 e 25 °C, enquanto que para os MS a melhor condição foi a 8 °C (log 2/g).

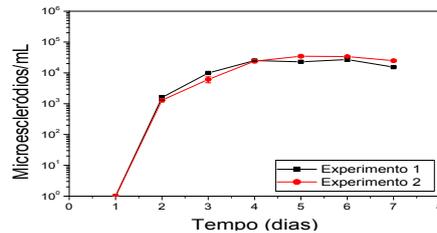


Figura 1 – Produção de microescleródios por *Trichoderma asperellum* T356 em frascos agitados a 300 rpm por 7 dias a 28 °C. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão (n = 4).

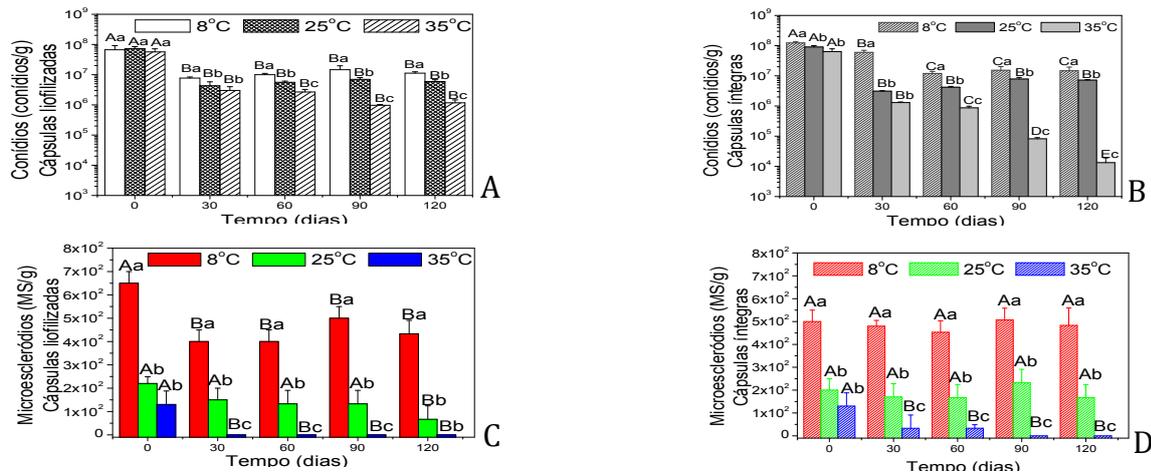


Figura 2 – Concentração de conídios (A e B) e de microescleródios (C e D) de *Trichoderma asperellum* T356 durante 120 dias de armazenamento a 8, 25 e 35 °C. Letras minúsculas diferentes (a–c) indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no mesmo dia; Letras maiúsculas diferentes (A–E) indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os dias.

## 4. CONCLUSÕES

Conclui-se que o encapsulamento de conídios e de MS em matriz de alginato favorece a manutenção da viabilidade desses propágulos ao longo do tempo, obtendo-se os melhores resultados em armazenamento a 8 °C.

## 5. REFERÊNCIAS

- AKHTAR K, KHALID AM, AKHTAR MW, GHAURI MA, Removal and recovery of uranium from aqueous solutions by Ca-alginate immobilized *Trichoderma harzianum*. *Biores. Technol.*, v. 100, p. 4551–4558, 2009.
- KOBORI NN, MASCARIN GM, JACKSON MA, SCHISLER DA, Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biol.*, v. 19, p. 179-190, 2015.
- LOCATELLI, GO, FINKLER, CLL, MASCARIN, GM, BUENO, LA, LOBO Jr, M, Optimization of microsclerotia production by *Trichoderma asperellum*, XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2017, Aracaju - SE, Brasil.