

# Controle de qualidade de produtos biológicos à base de *Trichoderma*

Zayame Vegette Pinto

Cleusa Maria Mantovanello Lucon

Wagner Bettiol

## Introdução

*Trichoderma* é o fungo mais estudado e utilizado como agente de biocontrole, principalmente, de fitopatógenos habitantes do solo, e, mais recentemente, como bioestimulante na promoção de crescimento de plantas e aumento de produtividade (Woo et al., 2014). Como fungos de vida livre, comumente encontrados no solo e associados ao ecossistema radicular, possuem estilo de vida versátil (Druzhinina et al., 2011; Carreras-Villaseñor et al., 2012).

O micoparasitismo, a competição, a antibiose e a indução de respostas de defesa da planta são os principais mecanismos de ação de *Trichoderma* no controle de fitopatógenos (Carreras-Villasen et al., 2012). Como bioestimulante, linhagens de *Trichoderma* competentes na colonização do sistema radicular, afetam diretamente a promoção de crescimento e aumento da produtividade de plantas. Esses efeitos, mediados por *Trichoderma*, estão baseados na modificação da arquitetura do sistema radicular; na solubilização, disponibilização e uso eficiente de nutrientes; no aumento da porcentagem e taxa de germinação de sementes e no estímulo das defesas das plantas contra danos bióticos e abióticos (Contreras-Cornejo et al., 2009; Hermosa et al., 2012; Samoslki et al., 2012).

*Trichoderma* spp. são caracterizadas pelo rápido crescimento e produção de conídios de tonalidades da cor verde em conidióforos ramificados. A sobrevivência e dispersão de *Trichoderma* envolve diversos mecanismos. A produção de conídios, desenvolvimento assexual, é favorecida pela luz e injúrias mecânicas, influenciada diretamente pelas condições ambientes de crescimento, tais como disponibilidade de nutrientes e pH (Carreras-Villasen et al., 2012). Também, há isolados que produzem microescleródios em determinadas condições (Kobori et

al., 2015).

A maioria dos produtos comerciais à base de *Trichoderma* é produzida por meio da fermentação em estado sólido, na qual o fungo produz conídios aéreos, os quais são extraídos e formulados (Bettioli, 2011; Woo et al., 2014). Por outro lado, pesquisas são desenvolvidas com fermentação líquida submersa para produção de conídios e microescleródios, sem todavia resultados, até o momento, que possam ser comparáveis com a produção em estado sólido (Papavizas et al., 1984; Harman et al., 1991; Kobori et al., 2015; Locatelli et al., 2017). Os conídios e os microescleródios são estruturas que possuem maior resistência às condições adversas. Desta forma, estas estruturas podem ser utilizadas como ingrediente ativo de produtos biológicos à base de *Trichoderma*.

No mercado brasileiro, os produtos biológicos à base de *Trichoderma* são comercializados em diferentes formulações, como por exemplo grânulo dispersível em água, suspensão concentrada, pó-molhável e concentrado emulsionável e gel emulsionável. Na bula dos produtos formulados registrados é informada a concentração de propágulos do fungo, que consiste no ingrediente ativo. As unidades de medida utilizadas para indicar a concentração não são padronizadas. Há produtos registrados considerando a concentração de conídios e ou esporos viáveis e unidades formadoras de colônia. Além disto, as metodologias de análise de conformidade e controle de qualidade de produtos biológicos não são padronizadas para todos os antagonistas. Este panorama dificulta a análise adequada da qualidade dos produtos, a comparação de resultados, a realização de testes e a emissão de laudos no processo de registro (Teixeira et al., 2010).

Em 2008, considerando os problemas existentes com a qualidade dos produtos contendo agentes de biocontrole comercializados, bem como a inexistência, no Brasil, de metodologias padronizadas, foi formada uma rede de pesquisa denominada Projeto Qualibio (“Desenvolvimento de metodologia analítica e amostral para avaliação de conformidade e da inocuidade de produtos comerciais formulados à base de agentes microbianos”), a qual desenvolveu metodologias para avaliar a conformidade e qualidade de produtos comerciais formulados à base de agentes microbianos para o controle de doenças de plantas. O projeto foi financiado pelo edital MCT/CNPq/Mapa/DAS n° 64/2008; com a participação da Embrapa Meio Ambiente, Embrapa Arroz e Feijão, Instituto Biológico de São Paulo, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Universidade Federal de Pelotas e Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC/CEFET).

As metodologias desenvolvidas no âmbito do Projeto Qualibio não foram oficializadas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - Mapa, mas são utilizadas por, praticamente, todas as empresas, laboratórios e instituição de pesquisa para avaliar a conformidade e a qualidade de produtos comerciais formulados à base de agentes microbianos

para o controle de doenças de plantas, bem como pesquisas na área. As metodologias foram desenvolvidas para produtos à base de fungos do gênero *Trichoderma* e bactérias do gênero *Bacillus*. Porém, as metodologias desenvolvidas podem também ser utilizadas para outros microrganismos antagonistas, como *Clonostachys rosea*, *Pochonia clamydosporea*, *Purpureocillium lilacinum* entre outros e, também para outras bactérias, desde que consideradas as especificidades de cada espécie.

O controle de qualidade em todas as etapas da cadeia de produção de um agente de biocontrole é extremamente importante para que produtos de reconhecida qualidade sejam disponibilizados no mercado e, desta forma, manter a confiança dos agricultores sobre a eficácia dos bioprodutos. Consequentemente, contribuirá para ampliar o mercado de agentes de biocontrole para o manejo integrado de doenças e pragas de plantas.

### Descrição das metodologias

No Projeto Qualibio foram desenvolvidas as metodologias para a determinação do número total de conídios, da porcentagem de conídios viáveis e do número das unidades formadoras de colônias (UFC) para produtos formulados à base de *Trichoderma* spp. (Bettiol et al., 2016).

A metodologia desenvolvida para a determinação do número total de conídios informa a quantidade de conídios na amostra, porém, não avalia a viabilidade dos conídios. Assim, é complementada com a metodologia desenvolvida para a determinação da porcentagem de conídios viáveis, a qual informa a porcentagem de conídios viáveis na amostra, bem como o seu vigor baseado no tempo de germinação. Finalmente, a metodologia desenvolvida para a determinação do número de unidades formadoras de colônias informa a quantidade de estruturas presentes no bioproduto que são capazes de dar origem a uma colônia do fungo em meio de cultura. É importante considerar que uma colônia do fungo pode ser originada de um conídio, de um aglomerado de conídios, de fragmentos de hifas e outras estruturas do fungo. Assim, a realização dessas análises são complementares, mas consideramos que a determinação das unidades formadoras de colônias é sempre a mais relevante e realista para os agricultores.

As metodologias, apesar de simples, devem ser executadas por profissionais qualificados. Assim, os resultados obtidos serão precisos. Além disso, os equipamentos utilizados devem ser sempre calibrados e estarem em perfeitas condições de uso.

A seguir serão descritas detalhadamente essas três metodologias, sempre lembrando que são complementares.

## Protocolo da metodologia 1: determinação do número total de conídios na amostra

### Equipamentos e vidrarias necessários para a realização da metodologia

Frascos com capacidade para 250 mL e 1.000 mL; tubos de ensaio; tampas para tubo de ensaio; estante para tubos de ensaio; autoclave; balança; agitador tipo vortex (de tubo de ensaio); banho de ultrassom com frequência de 40 kHz; mesa agitadora; micropipeta (10 mL e 1.000  $\mu$ L); ponteiros esterilizados para micropipetas (10 mL e 1.000  $\mu$ L); câmara de Neubauer (hemacitômetro); microscópio óptico; contador manual de conídios; agitador magnético; barra magnética.

### Solução

#### Solução salina com Tween 80

Ingredientes: NaCl P.A.: 9,0 g; água destilada: 1.000 mL; Tween 80: 1 mL.

Preparo: em frasco de 1.000 mL suspender o NaCl em 1.000 mL de água destilada e acrescentar o Tween 80. Homogeneizar bem e autoclavar o diluente a 121 °C e a 1 atm por 20 minutos.

### Procedimento

1. As amostras devem ser colocadas à temperatura ambiente por 30 a 40 minutos antes do início da análise, principalmente as originárias de formulação com base em óleo emulsionável.

2. Pesar 10 g do produto a ser testado em frasco de 250 mL e acrescentar 90 g de solução salina com Tween 80 (corresponde à diluição  $10^{-1}$ ). Devem ser realizadas duas pesagens para cada amostra e uma série de diluição para cada pesagem. A segunda pesagem deve ser realizada 10 minutos após a colocação de água na primeira amostra para obter o mesmo tempo de hidratação.

3. Colocar o frasco com a suspensão em agitador orbital ou mesa agitadora por 60 minutos a, pelo menos, 120 rpm.

4. Colocar o frasco com a suspensão em banho de ultrassom por 5 minutos. O nível de água do banho de ultrassom deve ultrapassar o volume da suspensão contida no frasco para garantir o efeito vibracional em todas as estruturas do fungo.

5. Misturar vigorosamente o conteúdo do frasco em agitador tipo vortex, colocando e tirando três vezes do aparelho até ser observado o turbilhamento total da suspensão, em cada uma das passagens. Ou colocar em agitador magnético por 5 minutos.

6. Transferir, imediatamente, 1,0 mL da suspensão contida no frasco ( $10^{-1}$ ), com auxílio de micropipeta com ponteira esterilizada para o tubo de ensaio seguinte contendo 9,0 mL da solução salina (corresponde à diluição  $10^{-2}$ ). Descartar a ponteira em seguida.

7. Homogeneizar o conteúdo da diluição  $10^2$  em agitador tipo vortex, colocando e tirando três vezes do aparelho até ser observado o turbilhonamento total da suspensão, em cada uma das passagens.

8. Para obter a diluição  $10^3$  repetir os itens 6 e 7 (diluição seriada), utilizando o tubo da diluição anterior ( $10^2$ ). Considerando as informações sobre a concentração contida no rótulo do produto, se necessário dar continuidade à diluição seriada até a diluição apropriada. Proceder assim repetidamente até alcançar a diluição apropriada (normalmente  $10^3$  ou  $10^4$ ). Para cada diluição deve-se trocar a ponteira da micropipeta.

9. Misturar o conteúdo do tubo de ensaio com a suspensão apropriada em agitador tipo vortex colocando e tirando três vezes. O tubo deve ser retirado quando ocorrer o turbilhonamento total.

10. Retirar imediatamente após a agitação uma alíquota representativa da suspensão com auxílio de uma micropipeta de 1.000  $\mu\text{L}$ .

11. Colocar cuidadosamente a suspensão na canaleta da câmara de Neubauer, já coberta com a lamínula, até o preenchimento de todo o espaço existente entre a lamínula e a câmara de Neubauer.

12. Antes de iniciar a contagem, deixar a câmara de Neubauer, com a suspensão de conídios, em repouso por 5 minutos, para que os conídios precipitem, facilitando a contagem e reduzindo erros.

13. Realizar a contagem de conídios ao microscópio óptico, no aumento de 250X ou 400X, nos campos 1 e 2 da câmara de Neubauer (Figura 1), nos cinco quadrados (subcompartimentos) como demarcados na Figura 2, totalizando cinco contagens por campo da câmara de Neubauer (E1, E2, E3, E4 e E5). **Observação:** Muitos conídios ficam exatamente sobre as linhas de demarcação internas dos subcompartimentos. Recomenda-se contar apenas os conídios que estiverem nas linhas da esquerda e superior do mesmo campo da observação para evitar que eles sejam contados duas vezes.

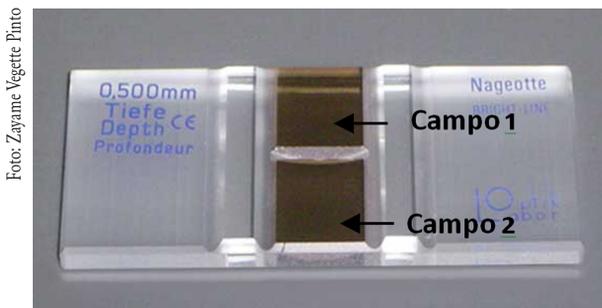


Figura 1. Localização dos campos 1 e 2 na câmara de Neubauer.

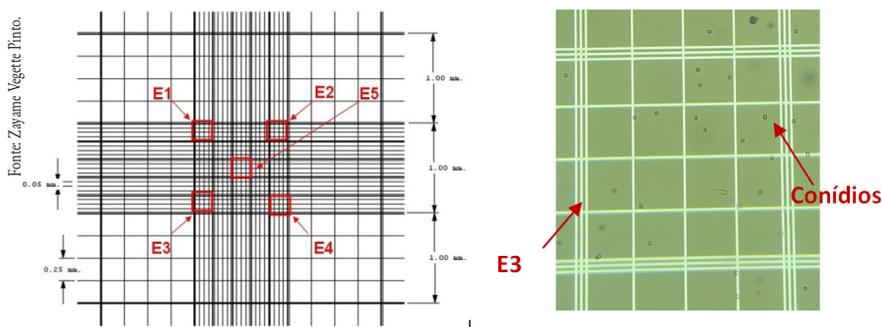


Figura 2. Área dentro dos subcompartimentos vermelhos para a realização da contagem de conídios - E1, E2, E3, E4 e E5.

### Cálculo do número de conídios

Para determinar o número de conídios, utilizar a fórmula: Número de conídios/mL =  $\left\{ \left[ \frac{(-\text{Campo } 1 + \text{Campo } 2)}{2} \right] \times 2,5 \times 10^3 \right\}$ , sendo que: Campo 1 =  $(E1+E2+E3+E4+E5)/5$  e Campo 2 =  $(E1+E2+E3+E4+E5)/5$ . Quando utilizada a diluição  $10^{-3}$ , multiplica-se o resultado do número de conídios/mL por  $10^3$  e quando utilizada a diluição  $10^{-4}$ , multiplica-se o resultado por  $10^4$ .

**Observação:** foi desenvolvido, no âmbito do projeto Qualibio, o software CALIBRA que está disponível para cópia do site da Embrapa Meio Ambiente. Este software realiza cálculos e armazena as informações para a emissão de laudos. A sugestão é que o CALIBRA seja sempre utilizado para uma maior facilidade e precisão das análises.

### Repetição

Devem ser feitas duas pesagens do produto, sendo que de cada pesagem deve ser realizada uma série de diluição seriada. Na segunda pesagem a solução salina deve ser colocada 10 minutos após ao da primeira pesagem para evitar a diferença na hidratação dos conídios. A diluição selecionada, geralmente  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ , deve ser colocada na câmara de Neubauer para a realização da contagem do número total de conídios presentes na amostra (Figura 3).

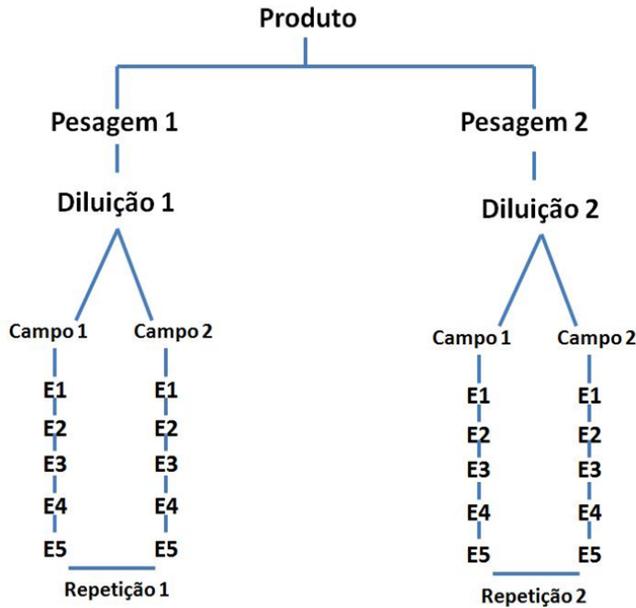


Figura 3. Esquema das repetições utilizadas na metodologia para análise da qualidade - número total de conídios contidos na amostra.

### Protocolo da metodologia 2: determinação do número de conídios viáveis na amostra

#### Equipamentos e vidrarias

Frascos com capacidade para 100 mL, 250 mL e 1.000 mL; tubos de ensaio; tampa para tubo de ensaio; estante para tubos de ensaio; autoclave; balança; agitador tipo vortex (de tubo de ensaio); banho de ultrassom com frequência de 40 kHz; mesa agitadora para frasco; incubadora operando  $25 \pm 2$  °C (BOD); micropipeta para volume de 10 mL, 15  $\mu$ L e 1.000  $\mu$ L; ponteiros esterilizados para micropipeta (10 mL, 15  $\mu$ L e 1.000  $\mu$ L); placas de Petri esterilizadas; agitador magnético; barra magnética esterilizada.

#### Soluções

##### Solução salina com Tween 80

Ingredientes: NaCl P.A.: 9,0 g; água destilada: 1.000 mL; Tween 80: 1 mL.

Preparo: em frasco de 1.000 mL suspender o NaCl em 1.000 mL de água destilada e acrescentar o Tween 80. Homogeneizar bem e autoclavar o diluente a 121 °C e a 1 atm por 20 minutos.

### **Azul de lactofenol**

Ingredientes: fenol: 20 g; ácido láctico: 20 g; água destilada: 20 g; glicerol: 40 g; azul de metila (ou azul de algodão ou azul de Trypan): 0,1 g.

Preparo: adicionar os ingredientes em um frasco e homogeneizar durante 5 minutos em agitador magnético dentro de capela de exaustão de gases. Utilizar os EPIs adequados. Outra opção é adquirir o produto pronto no mercado.

### **Meio de cultura**

#### **Meio de batata dextrose ágar (BDA)**

Ingredientes: meio de batata-dextrose-ágar comercial: recomendação do fabricante; água destilada: 1.000 mL.

Preparo: em frascos misturar a água destilada ao meio BDA e autoclavar a 121 °C a 1 atm por 20 minutos. Verter, aproximadamente, 10 mL do meio por placa descartável esterilizada. Depois de solidificado o meio, as placas devem ser invertidas e incubadas a  $25 \pm 2$  °C por uma noite para secar e para avaliar a condição de esterilidade do meio. As placas preparadas com BDA podem ser estocadas em local escuro e sob refrigeração (2-8 °C) por sete dias. Observação: todas as vidrarias e soluções devem ser esterilizadas em autoclave antes de serem utilizadas.

### **Procedimento**

1. As amostras a serem testadas devem ser colocadas à temperatura ambiente por 30 a 40 minutos antes do início da análise, principalmente as originárias de formulação com base em óleo emulsionável.

2. Pesar 10 g do produto a ser testado em frasco de 250 mL e acrescentar 90 g de solução salina com Tween 80 (corresponde à diluição  $10^{-1}$ ). Devem ser realizadas duas pesagens para cada amostra e uma série de diluição para cada pesagem. A segunda pesagem deve ser realizada 10 minutos após a colocação de água na primeira amostra para obter o mesmo de hidratação.

3. Colocar o frasco com a suspensão em agitador orbital ou mesa agitadora por 60 minutos a, pelo menos, 120 rpm.

4. Colocar o frasco com a suspensão em banho de ultrassom por 5 minutos. O nível de água do banho de ultrassom deve ultrapassar o volume da suspensão contida no frasco para garantir o efeito vibracional em todas as estruturas do fungo.

5. Misturar vigorosamente o conteúdo do frasco em agitador tipo vortex, colocando e tirando três vezes do aparelho até ser observado o turbilhonamento total da suspensão, em cada uma das passagens. Ou colocar em agitador magnético por 5 minutos.

6. Transferir, imediatamente, 1,0 mL da suspensão contida no frasco ( $10^{-1}$ ), com auxílio de micropipeta com ponteira esterilizada para o tubo de ensaio seguinte contendo 9,0 mL da

solução salina (corresponde à diluição  $10^2$ ). Descartar a ponteira em seguida.

7. Homogeneizar o conteúdo da diluição  $10^2$  em agitador tipo vortex (de tubo de ensaio), colocando e tirando três vezes do aparelho até ser observado o turbilhonamento total da suspensão, em cada uma das passagens.

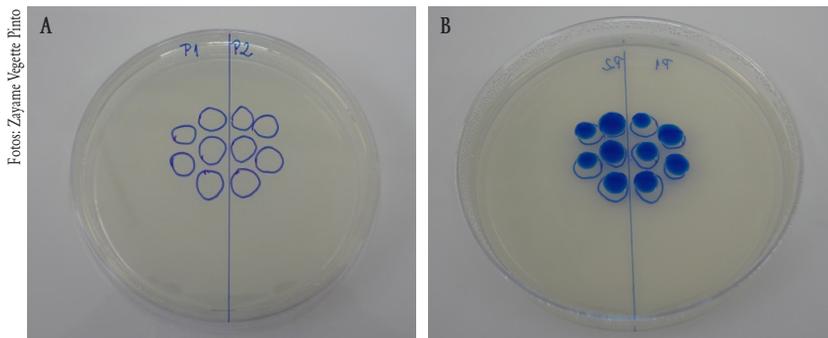
8. Para obter a diluição  $10^3$  repetir os itens 6 e 7 (diluição seriada), utilizando o tubo da diluição anterior ( $10^2$ ). Considerando as informações sobre a concentração contida no rótulo do produto, se necessário dar continuidade à diluição seriada até a diluição apropriada. Proceder assim repetidamente até alcançar a diluição apropriada (normalmente  $10^3$  ou  $10^4$ ). Para cada diluição deve-se trocar a ponteira da micropipeta.

9. Misturar o conteúdo do tubo de ensaio com a suspensão apropriada em agitador tipo vortex colocando e tirando três vezes. O tubo deve ser retirado quando ocorrer o turbilhonamento total.

10. Pipetar imediatamente após a agitação em aparelho tipo vortex, cinco aliquotas de 15  $\mu$ L de duas das diluições apropriadas (em geral são as de  $10^3$  e/ou  $10^4$ ), e transferir imediatamente para placas de Petri contendo meio BDA em cinco pontos previamente definidos e demarcados (Figura 4a). Repetir este passo para mais uma placa.

11. Transferir e incubar as placas para BOD a  $25 \pm 2$  °C, no escuro.

12. Após 9 horas de incubação, verificar a germinação dos conídios a cada duas horas, até 20 h após o plaqueamento em função do produto (o momento considerado ideal variará de acordo com as características da espécie, da cepa e da formulação do produto. Entretanto, em média são necessárias 16 horas). Neste momento, colocar uma gota de azul de lactofenol (8  $\mu$ L) em cada ponto (local onde foi colocada a diluição apropriada) com a suspensão (cinco pontos por placa) (Figura 4B).



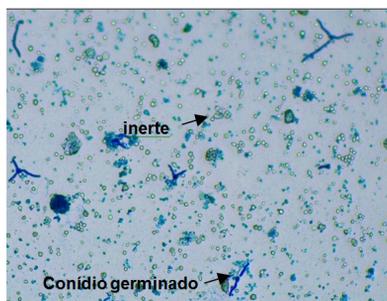
**Figura 4.** Placa de Petri com meio BDA com as marcações nos locais onde serão colocados os 15  $\mu$ L da suspensão para análise da viabilidade (A). Gotas com lactofenol após 16 horas de incubação (B).

13. Contar o número de conídios viáveis, germinados e ativos não germinados, e não viáveis (não germinados), conforme Figura 5, nos cinco pontos usando microscópio óptico no aumento de 200X a 400X. Para maior confiabilidade, deve-se contar pelo menos 100 conídios por área delimitada. Calcular a taxa média de viabilidade utilizando a fórmula:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \left( \frac{\text{média do número de conídios viáveis das pesagens}}{\text{total de conídios}} \right) \times 100$$

Deve ser realizado o cálculo para cada gota de cada diluição das duas pesagens, separadamente. Posteriormente, obter a média aritmética para cada pesagem.

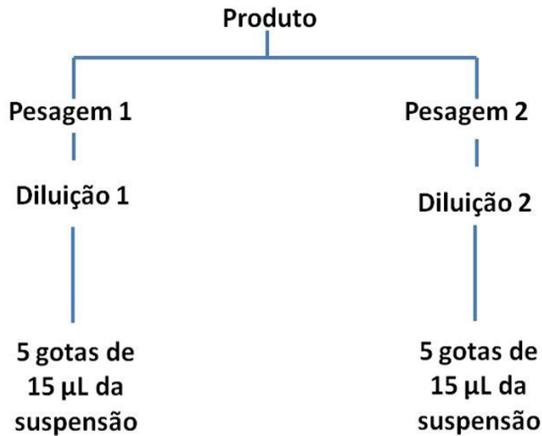
Fotos: Zayane Vegette Pinto



**Figura 5.** Aspecto ao microscópio óptico: do inerte usado na formulação, dos conídios viáveis, germinados e ativos, e não germinados de *Trichoderma* sp.

### Repetição

Devem ser feitas duas pesagens do produto (item 2), sendo que de cada pesagem deve ser realizada uma série de diluição seriada (itens 6, 7 e 8). Na segunda pesagem a solução salina deve ser colocada 10 minutos após ao da primeira pesagem para evitar a diferença na hidratação dos conídios. Da diluição selecionada, deve-se colocar cinco gotas por placa em duas placas diferentes (Figura 6).



**Figura 6.** Esquema das repetições utilizadas na metodologia para análise da qualidade - viabilidade de conídios.

### Metodologia 3:

#### determinação do número de unidades formadoras de colônias na amostra

#### Equipamentos e vidrarias

Frasco com capacidade para 250 mL e 1.000 mL; tubos de ensaio; tampa para tubo de ensaio; estante para tubos de ensaio; autoclave; balança; agitador tipo vortex (de tubo de ensaio); banho de ultrassom com frequência de 40 kHz; mesa agitadora para frasco; incubadora operando  $25 \pm 2$  °C (BOD); micropipeta para volume de 10 mL, 20 µL, 100 µL e 1.000 µL; ponteiros estéreis para micropipeta (10 mL, 20 µL, 100 µL e 1.000 µL); placas de Petri descartável esterilizada; alça de Drigalski esterilizada; agitador magnético; barra magnética estabilizada; microscópio óptico; lâmina de microscopia e fita adesiva transparente.

#### Solução

##### Solução salina com Tween 80

Ingredientes: NaCl P.A.: 9,0 g; água destilada: 1.000 mL; Tween 80: 1 mL.

Preparo: em frasco de 1.000 mL suspender o NaCl em 1.000 mL de água destilada e acrescentar o Tween 80. Homogeneizar bem e autoclavar o diluente a 121 °C e a 1 atm por 20 minutos.

#### Meio de cultura

**Meio de batata dextrose ágar (BDA +T).** Ingredientes: meio de batata dextrose ágar comercial: recomendação do fabricante, 1 mL de Triton X-100 e água destilada: 1.000 mL.

Preparo: o modo de preparo do meio deve seguir a recomendação do fabricante. Em frascos misturar a água destilada e Triton X-100 (reductor de colônia) ao meio de batata dextrose ágar e autoclavar a 121 °C a 1 atm por 20 minutos. Verter aproximadamente de 15 mL a 20 mL por placa descartável esterilizada. Depois de solidificado o meio, as placas devem ser invertidas e incubadas a  $25 \pm 2$  °C por uma noite para secar e para avaliar a condição de esterilidade do meio. As placas preparadas com BDA+T podem ser estocadas em local escuro e sob refrigeração (2-8 °C) por sete dias. Observação: todas as vidrarias e soluções devem ser esterilizadas em autoclave antes de serem utilizadas.

## Procedimento

### Teste de microgotas:

1.1. As amostras a serem testadas devem ser colocadas à temperatura ambiente por 30 a 40 minutos antes do início da análise, principalmente as originárias de formulação com base em óleo emulsionável.

1.2. Pesar 10 g do produto a ser testado em frasco de 250 mL e completar com 90 g da solução salina com Tween 80 (corresponde à diluição  $10^{-1}$ ). Devem ser realizadas duas pesagens para cada amostra e duas séries de diluições para cada pesagem. A segunda pesagem deve ser realizada 10 minutos após a colocação de água na primeira amostra para obter o mesmo tempo de hidratação.

1.3. Colocar o frasco com a suspensão em agitador orbital ou mesa agitadora por 60 minutos a, pelo menos, 120 rpm.

1.4. Colocar o frasco com a suspensão em banho de ultrassom por 5 minutos. O nível de água do banho de ultrassom deve ultrapassar o volume da suspensão contida no frasco para garantir o efeito vibracional em todas as estruturas do fungo.

1.5. Misturar vigorosamente o conteúdo do frasco em agitador tipo vortex, colocando e tirando três vezes do aparelho até ser observado o turbilhonamento total da suspensão, em cada uma das passagens. Ou colocar em agitador magnético por 5 minutos.

1.6. Transferir, imediatamente, 1,0 mL da suspensão contida no frasco ( $10^{-1}$ ), com auxílio de micropipeta com ponteira esterilizada para o tubo de ensaio seguinte contendo 9,0 mL da solução salina (corresponde à diluição  $10^{-2}$ ). Descartar a ponteira em seguida.

1.7. Homogeneizar o conteúdo da diluição  $10^{-2}$  em agitador tipo vortex, colocando e tirando três vezes do aparelho até ser observado o turbilhonamento total da suspensão, em cada uma das passagens.

1.8. Para obter a diluição  $10^{-3}$  repetir os itens 1.6 e 1.7 (diluição seriada), utilizando o tubo da diluição anterior ( $10^{-2}$ ). Considerando as informações sobre a concentração contida no rótulo do produto, se necessário dar continuidade à diluição seriada até a diluição apro-

priada. Proceder assim repetidamente até alcançar a diluição apropriada (uma diluição acima da concentração mencionado pelo fabricante) (Tabela 1). Para cada diluição deve-se trocar a ponteira da micropipeta.

**Tabela 1.** Máximo de diluição seriada da amostra que deve ser realizado para obtenção da diluição apropriada.

Concentração informada pelo fabricante	Diluir até
$10^5$	$10^6$
$10^6$	$10^7$
$10^7$	$10^8$
$10^8$	$10^9$
$10^9$	$10^{10}$
$10^{10}$	$10^{11}$
$10^{11}$	$10^{12}$

1.9. Delimitar com caneta de retroprojeter na parte externa da base das placas contendo meio BDA, dividindo-as em quatro quadrantes, conforme Figura 7.

1.10. Misturar o conteúdo do tubo de ensaio com a suspensão apropriada em agitador tipo vortex colocando e tirando três vezes. O tubo deve ser retirado quando ocorrer o turbilhonamento total.

1.11. Pipetar imediatamente três alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  de cada diluição preparada, logo em seguida da agitação vigorosa em aparelho tipo vortex por três vezes, para a superfície do meio de BDA de cada um dos quadrantes (Figura 7). Em cada placa é possível depositar quatro das diluições da série realizada.

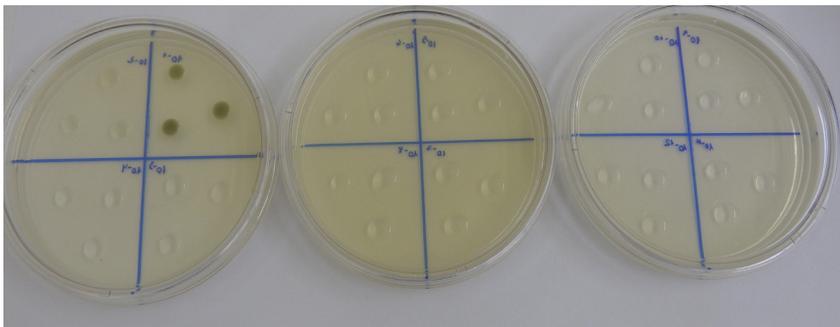


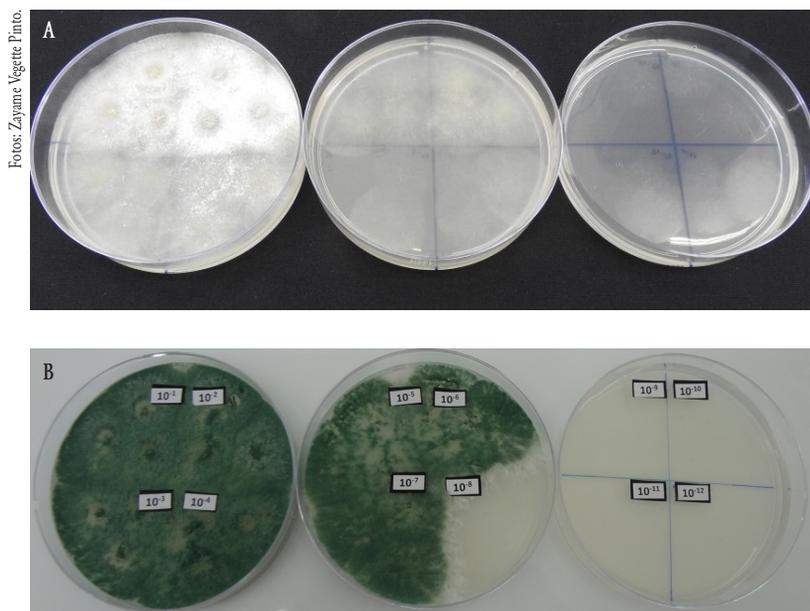
Foto: Zayane Vegette Pinto.

**Figura 7.** Aspecto das placas de Petri com meio BDA, dividida em quatro quadrantes, com três alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  de doze diluições da amostra do bioproducto.

1.12. Após o plaqueamento das alíquotas, os tubos com as diluições devem ser guardados sobre refrigeração ( $2 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) por, no máximo, 48 horas para serem utilizados na determinação do número de unidades formadoras de colônias.

1.13. Antes de incubar as suspensões, esperar para que os  $20\text{ }\mu\text{L}$  de cada diluição sejam absorvidos pelo meio de cultura. Em seguida, transferir as placas para BOD, por 24 a 48 horas,  $25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , no escuro.

1.14. Após dois dias, observar em quais diluições houve o crescimento de colônias do fungo e selecionar as três últimas diluições que apresentaram o crescimento do fungo nas três gotas, das duas pesagens realizadas, para a determinação do número de unidades formadoras de colônias (Figura 8).



**Figura 8.** Crescimento de *Trichoderma* em placa com meio BDA no testes de microgotas. A=48 h e B= 96 h de incubação.

### Determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) da amostra

2.1. Retirar os tubos de cultura com as diluições seriadas da refrigeração 30 a 40 minutos antes do início da análise.

2.2. Agitar vigorosamente o conteúdo dos tubos de cultura com as diluições escolhidas em agitador tipo vortex, colocando e tirando três vezes. O tubo deve ser retirado quando ocorrer o turbilhamento.

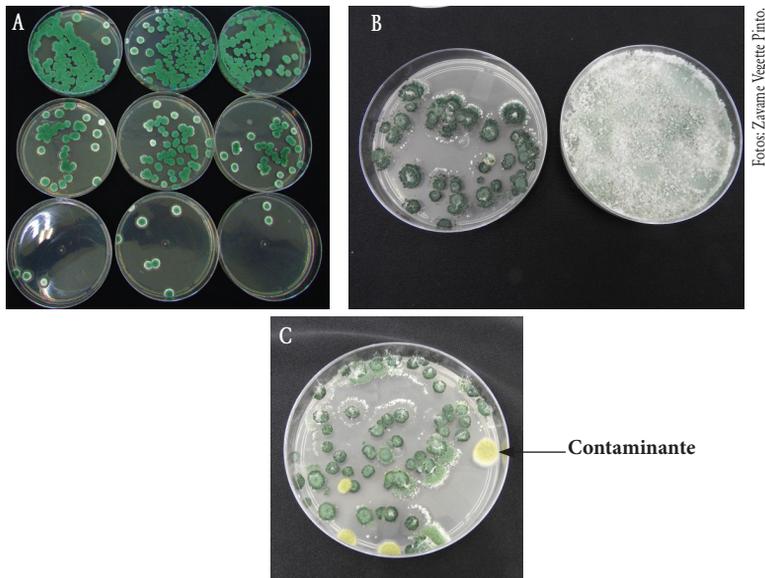
2.3. Transferir de cada diluição, previamente selecionada, conforme o resultado do teste das microgotas, com micropipeta com ponteira esterilizada, 100 µL para a superfície de cinco placas de Petri, com meio de cultura BDA + Triton X-100. Descartar a ponteira ao final do plaqueamento da diluição.

2.4. Distribuir uniformemente sobre a superfície do meio com uma alça de Drigalski esterilizada, imediatamente após a transferência. Para cada grupo de cinco placas, de cada diluição, utilizar uma alça de Drigalski.

2.5. Fazer uma placa controle antes de iniciar o item 2.3, espalhando 100 µL da solução salina esterilizada com Tween 80 em placa contendo o meio de cultura (BDA + T), com alça de Drigalski esterilizada.

2.6. Incubar as culturas a  $25 \pm 2$  °C, no escuro, por 48 e/ou 72 horas.

2.7. Após a incubação contar o número de colônias crescidas (Figura 9) e verificar, de acordo com as características do fungo, se as colônias formadas são realmente do *Trichoderma* presente no produto biológico, por meio da visualização da colônia na placa e das estruturas do fungo em microscópio óptico.



Fotos: Zayane Vêgiete Pinto.

**Figura 9.** Aspecto macroscópico das colônias de *Trichoderma harzianum* para a realização da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC): (A) crescimento de UFC em três diluições; (B) esquerda: placa com meio de cultura BDA contendo redutor de colônia e direita: placa com meio de cultura BDA sem redutor de colônia; (C) aspecto da colônia de contaminante na placa.

2.8. Para observar ao microscópio óptico as estruturas do fungo, pode ser utilizada a técnica da fita adesiva transparente. Para isso, pressionar com cuidado a parte adesiva sobre a colônia desenvolvida na placa de Petri com meio de cultura, retirar com cuidado e transferir a fita com as estruturas aderidas para uma lâmina de microscopia, com o lado adesivo sobre a lâmina. Observar as estruturas do fungo (geralmente conidióforos e conídios) ao microscópio óptico em aumento entre 200 a 400X (Figura 10). Comparar as estruturas com figuras e descrições de publicações sobre o gênero *Trichoderma*.

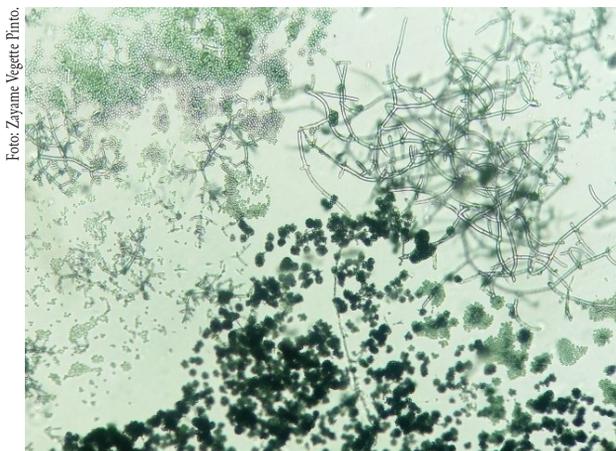


Foto: Zayane Vegette Pinto.

Figura 10. Aspecto microscópico das estruturas de *Trichoderma harzianum*.

### Repetição

Devem ser feitas duas pesagens do produto (item 1.2), sendo que de cada pesagem deve ser realizada duas séries de diluição (item 1.6). Das três diluições selecionadas, deve-se plaquear cinco repetições por diluição (item 2.3) (Figura 11).

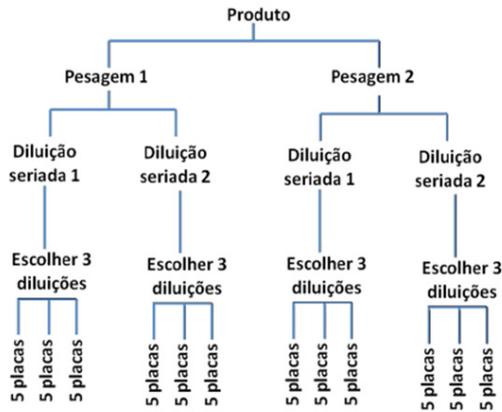


Figura 11. Esquema das repetições utilizadas na metodologia para análise da qualidade - unidades formadoras de colônias.

### Determinação do número de unidades formadoras de colônias

Fazer a contagem do número de colônias, por placa, no tempo de 72 e/ou 96 horas, e determinar o número segundo a fórmula:

Número de unidades formadoras de colônias/mL ou grama=UFC/mL ou grama= (número médio de colônias nas placas X diluição escolhida da amostra X 10).

Deve ser realizado o cálculo para cada placa das duas pesagens, separadamente. Posteriormente, obter a média aritmética para cada pesagem.

### Etapas comuns às metodologias: armazenamento das amostras e limpeza

Logo após as análises, as amostras deverão ser lacradas e armazenadas conforme recomendação do fabricante até a data de validade. O armazenamento, em condições adequadas, é importante para caso haja necessidade de repetição dos procedimentos. Após este período ou, se não houver mais interesse nas amostras, as mesmas deverão ser autoclavadas a 120 °C por 20 minutos, e em seguida descartadas. Em caso de produto comercial, há a necessidade de atender as normas de descarte de embalagens.

Antes e após a realização das análises é fundamental a limpeza das instalações. Neste caso, sugere-se os procedimentos padrões de cada instituição, sempre atendendo as boas práticas laboratoriais.

### Uso da metodologia no processo produtivo

Após a obtenção da cepa que será registrada e comercializada, o processo produtivo possui algumas etapas básicas que podem ser divididas em: 1ª - manutenção/preservação da matriz (ingrediente ativo da formulação); 2ª - produção de inóculo visando a produção em larga escala; 3ª - produção massal por meio da fermentação líquida, sólida e/ou bifásica; 4ª - beneficiamento/formulação; 5ª - preparação do lote e empacotamento (embalagem); 6ª - transporte/comercialização; 7ª - controle de qualidade (que permeia praticamente todas as fases); 8ª - assuntos regulatórios; e 9ª - pesquisa e desenvolvimento (Tabela 2).

As metodologias desenvolvidas no Projeto Qualibio podem ser utilizadas nas diferentes etapas da produção de produtos à base de *Trichoderma*. Na produção do inóculo pode ser utilizada a contagem de conídios visando a calibração da suspensão que será adicionada no substrato para a produção massal. Na produção massal e beneficiamento podem ser utilizadas as metodologias de contagem de conídios, viabilidade e unidades formadoras de colônias, com o objetivo de monitorar o processo, detectando possíveis contaminações e falhas com rapidez para adequar o ingrediente ativo de acordo com o registro. No final do processo produtivo, no controle de qualidade, podem ser utilizadas as metodologias do número de conídios viáveis e unidades formadoras de colônias com o objetivo de monitoramento para garantir a qualidade de cada lote. Não há regulamentação sobre o monitoramento dos lotes dentro do período de validade. Assim, cada empresa estipula a regularidade de suas análises. Os resultados devem ser os mesmos indicados no rótulo e em caso de não conformidade o lote deverá ser recolhido. Todo este controle garantirá a confiança dos consumidores e a segurança junto aos órgãos de fiscalização.

Além do processo produtivo, as metodologias podem ser utilizadas na área regulatória, de fiscalização e de pesquisa e desenvolvimento. Os testes de microgota e de viabilidade de conídios são de grandes utilidades para o desenvolvimento da formulação da cepa. A contagem de unidades formadoras de colônias e contagem de conídios são vitais para os testes de vida de prateleira de novos produtos e para o processo de registro dos produtos nos órgãos competentes, entre outros.

Considerando todos estes aspectos é fundamental que as empresas mantenham em seus quadros pessoas treinadas nas metodologias, bem como instalações adequadas para a realização dos testes de qualidade dos produtos.

**Tabela 2.** Uso das metodologias de avaliação da qualidade de produtos à base de *Trichoderma* no processo produtivo.

Processo	Metodologia utilizada	Função
Preservação/Manutenção da matriz	-	-
Produção de inóculo	Contagem de conídios	Calibrar inóculo
Produção massal	Viabilidade dos conídios	Monitorar produção
Beneficiamento/Formulação	Contagem de conídios Viabilidade dos conídios Unidades formadoras de colônias	Monitorar produção Avaliar a concentração do produto
Preparação do lote/empacotamento (embalagem)	-	-
Transporte /comercialização	-	-
Controle de qualidade	Unidades formadoras de colônias Contagem de conídios Viabilidade dos conídios	Monitorar a vida de prateleira*
Regulatório	Unidades formadoras de colônias Contagem de conídios Viabilidade dos conídios	Registro do produto
Pesquisa e desenvolvimento	Contagem de conídios Viabilidade dos conídios Unidades formadoras de colônias	Melhorar o processo produtivo Teste de formulação Desenvolvimento de novos produtos Ensaio de eficiência em campo para o controle biológico de doenças e promoção de crescimento de plantas/aumento de produtividade da cultura

\*A metodologia utilizada depende do registro.

### Considerações finais

A taxa composta anual de crescimento (CAGR) do mercado de biopesticidas, sejam os micro ou macrorganismos, cresce em torno de 17% ao ano no Brasil e no mundo. Esse aumento no consumo dos produtos formulados contendo agentes de biocontrole tem melhorado a qualidade dos produtos biológicos disponíveis, aumentando a oferta de novos produtos no mercado, estabelecido normas de registro adequadas aos produtos contendo os agentes de biocontrole, estimulado o investimento em pesquisa e desenvolvimento, estimulado a criação de novas empresas no setor e também incrementada a formação de profissionais na área. O crescimento desta cadeia produtiva tem levado os órgãos regulatórios a compreenderem os modos de ação dos agentes de biocontrole e com isso importantes conquistas na área regulatória, como o registro por alvo biológico e dispensa do uso dos símbolos da caveira e das duas tóxicas cruzadas em rótulo, bula e embalagem de produtos Classe Toxicológicas III e IV, vem sendo obtidas. Também as instituições de pesquisa e de fomento à pesquisa estão investindo no desenvolvimento de novas pesquisas com controle biológico. Esse maior investimento tem levado à criação de novos grupos de pesquisas na área no Brasil.

O crescimento do setor, conseqüentemente, tem colaborado para estimular a integração do controle biológico nos sistemas de manejo de pragas e doenças de plantas, com importantes ganhos para a sociedade, pois está conduzindo a uma redução do uso de pesticidas químicos na agricultura.

O crescimento do mercado mundial para biopesticidas, sem dúvida, está relacionado ao controle de qualidade dos produtos biológicos, pois aumenta a confiança dos agricultores em adquirir os produtos. Também tem reduzido a oferta de produtos sem as garantias exigidas pelos órgãos registrantes, pois sem um controle eficiente dos produtos registrados se torna difícil a comercialização de produtos de baixa qualidade.

A padronização de metodologias de análise de conformidade e controle de qualidade de produtos biológicos pelos órgãos competentes facilitará a fiscalização, o registro de produtos biológicos, a análise da concentração pelos laboratórios e a comparação dos resultados de pesquisa na área, bem como maior entendimento dos usuários.

Além dos testes de concentração do ingrediente ativo dos produtos à base de agentes de controle biológico, outros testes deverão ser incluídos no controle de qualidade, como a eficiência/estabilidade da cepa; presença de contaminantes; e estabilidade da formulação, entre outros. Essas etapas serão rapidamente exigidas pelo mercado consumidor. Com o avanço na pesquisa de fermentação líquida e dos metabólitos produzidos por *Trichoderma*, novas metodologias de controle de qualidade deverão ser desenvolvidas, visando além da concentração do fungo, estabelecer a concentração de determinadas substâncias presentes na formulação com ação antagonica aos fitopatógenos produzidas por *Trichoderma*.

## Glossário

**Conídio:** estrutura não sexual de reprodução de fungos.

**Conídio ativo ou em processo de germinação:** o conídio que aumentou de tamanho em relação ao não germinado, mas que ainda não emitiu tubo germinativo.

**Conídio germinado:** o conídio apresenta tubo germinativo com pelo menos o mesmo comprimento que o tamanho do conídio.

**Conídios inativos:** conídios não viáveis.

**Conídios não germinados:** conídios que podem ou não estar viáveis, porém não formou tubo germinativo com pelo menos o mesmo comprimento que o tamanho do conídio.

**Conídios viáveis:** são os conídios ativos e os germinados.

**Conidióforo:** estrutura do fungo produtora de conídios.

**Grânulos:** tipo de formulação de produto biológico em forma de grânulos que se desfazem na presença de água.

**Pó-molhável:** tipo de formulação de produto biológico composta pelo ingrediente ativo e inerte que permita a mistura com água, formando suspensões dotadas de grande estabilidade.

## Referências

- BETTIOL, W. Biopesticides use and research in Brazil. **Outlooks on Pest Management**, v.22: p.280-283, 2011.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z. V.; PAULA JÚNIOR, T. J.; MOURA, A. B.; LUCON, C. M. M.; COSTA, J. C. B.; BEZERRA, J. L. **Avaliação da qualidade de produtos à base de *Trichoderma***. Apostila. Disponível em: <[http://www.cnpma.embrapa.br/down\\_site/forum/2012/trichoderma/Apostila\\_Trichoderma\\_2012.pdf](http://www.cnpma.embrapa.br/down_site/forum/2012/trichoderma/Apostila_Trichoderma_2012.pdf)>. Acesso em: jul. 2016.
- CARRERAS-VILLASEÑOR, N.; SÁNCHEZ-ARREGUÍN, J. A.; HERRERA-ESTRELLA, A. H. *Trichoderma*: sensing the environment for survival and dispersal. **Microbiology**, v. 158, p. 3-16, 2012.
- CONTRERAS-CORNEJO, H. A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; CORTÉS-PENAGOS, C.; LÓPEZ-BUCIO, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 149, p. 1579-1592, 2009.
- DRUZHININA, I. S.; SEIDL-SEIBOTH, V.; HERRERA-ESTRELLA, A.; HORWITZ, B.A.; KERNERLEY, C. M.; MONTE, E.; MUKERJEE, P. K.; ZEILINGER, S.; GRIGORIEV, I. V.; KUBICEK, C. P. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**, v.16, p. 749-59. 2011.
- HARMAN, G. E.; JIN, X.; STASZ, T. E.; PERUZZOTTI, G.; LEOPOLD, A. C.; TAYLOR, A. G. Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control. **Biological Control**, v. 1, p. 23-28, 1991.
- HERMOSA, R.; VITERBO, A.; CHET, I.; MONTE, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, v. 158, p. 17-25, 2012.
- KOBORI, N. N.; MASCARIN, G. M.; JACKSON, M. A.; SCHISLER, D. A. Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. **Fungal Biology**, v. 119, p. 179-190, 2015.
- LOCATELLI, G. O.; FINKLER, C. L. L.; MASCARIN, G. M.; LOBO JUNIOR, M.; BUENO, L. A. Optimization of microsclerotia production by *Trichoderma asperellum*. In: SIMPOSIO NACIONAL DE BIOPROCESSO, 21.; SIMPOSIO DE HIDROLISE E ENZIMÁTICA DE BIOMASSA, 12., 2017, Aracajú, SE. [Anais...]. São Paulo: Associação Brasileira de Engenharia Química, 2017. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/164065/1/CNPAF-2017-snb.pdf>>. Acesso em: fev. 2019.
- PAPAVIZAS, G. C.; DUNN, M. T.; LEWIS, J. A.; BEAGLE-RISTAINO, J. Liquid fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi. **Phytopathology**, v. 74, p. 1171-1175, 1984.
- SAMOLSKI, I.; RINCÓN, A. M.; PINZÓN, L. M.; VITERBO, A.; MONTE, E. The qjd74 gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization. **Microbiology**, v. 158, p. 129-38, 2012.
- TEIXEIRA, H.; BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PINTO, Z. V.; LEHNER, M. S.; FREITAS, M. M. Q.; REZENDE, L.C. Conformidade e qualidade de produtos biológicos para o controle de doenças de plantas. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. **Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica**. Viçosa: U.R. Epamig ZM, 2010. p. 101-112.
- WOO, S. L.; RUOCCO, M.; VINALE, F.; NIGRO, M.; MARRA, R.; LOMBARDI, N.; PASCALE, A.; LANZUISE, S.; MANGANIELLO, G.; LORITO, M. *Trichoderma*- based products and their widespread use in agriculture. **The Open Mycology Journal**, v. 8, p. 71-126, 2014.

