



Avaliação de diferentes formulações para utilização no controle biológico de doenças agrícolas

Evaluation of various formulations for utilization in the biological control of agricultural diseases

Mayara Gabriela de Lima de Oliveira¹, Lilian Gavazzoni², Heron dos Santos Lima³, Mirela Vanin dos Santos Lima⁴

RESUMO

O desenvolvimento de formulações de microrganismos para controle biológico permanece pouco explorado. Sendo que o controle biológico na agricultura demonstra baixo impacto ambiental comparado às substâncias químicas sintéticas usualmente empregadas. Portanto, existe relevância em estudar diferentes formulações para produtos biodefensivos. Assim, este trabalho objetivou desenvolver uma formulação estável e microbiologicamente ativa. Para tanto, duas formulações foram desenvolvidas combinando microrganismos (MO's), e outros componentes: formulação 1 (F1): MO's + óleo vegetal + aditivos 3 e 4; e formulação 2 (F2): MO's + óleo vegetal + aditivos 2, 3 e 4. Cada formulação em triplicata foi analisada aos 7, 30 e 60 dias para avaliação da atividade microbiológica, que foi realizada pela contagem do número de conídios em câmara de Neubauer e contagem das unidades formadoras de colônias/mL. Também foi medido o pH e fez-se observação visual para identificar separação de fases. A F1 demonstrou inicialmente maior número de conídios/mL do que F2. Porém, F1 apresentou pH inferior e menor atividade microbiana durante o armazenamento em relação à F2. A F2 superou a F1 em termos de viabilidade microbiana, podendo-se destacar a relevância do óleo na conservação de microrganismos, auxiliando na manutenção do produto por um período superior a 30 dias.

PALAVRAS-CHAVE: Controle biológico; Formulações; Microrganismos; Óleo vegetal.

ABSTRACT

The development of microorganism formulations for biological control remains relatively unexplored. Biological control in agriculture demonstrates low environmental impact compared to the synthetic chemical substances commonly used. Therefore, there is significance in studying different formulations for biodefensive products. Thus, the aim of this study was to develop a stable and microbiologically active formulation. To achieve this, two formulations were created by combining microorganisms (MOs) with other components: Formulation 1 (F1): MOs + vegetable oil + additives 3 and 4; and Formulation 2 (F2): MOs + vegetable oil + additives 2, 3, and 4. Each formulation in triplicate was analyzed at 7, 30, and 60 days to assess microbiological activity, which was determined by counting the number of conidia using a Neubauer chamber and counting colony-forming units/mL. pH measurements were also taken, and visual observation was conducted to identify phase separation. Initially, F1 displayed a higher number of conidia/mL compared to F2. However, F1 exhibited a lower pH and reduced microbial activity during storage in comparison to F2. F2 outperformed F1 in terms of microbial viability, underscoring the importance of oil in preserving microorganisms and aiding in product maintenance for a period exceeding 30 days.

KEYWORDS: Biological control; Formulations; Microorganisms; Vegetable oil.

¹ Bolsista do Curso de Tecnologia Em Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil. E-mail: mayaragabriela@alunos.utfpr.edu.br.

² Mestre em Biotecnologia Ambiental. Universidade de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil. E-mail:lilianzzoni@gmail.com. ID Lattes: 8434947007179089.

³ Docente nos cursos de Tecnologia em Alimentos, Engenharia de Alimentos e Engenharia Química no Departamento Acadêmico de Alimentos e Engenharia Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil. E-mail: heronsantoslina@gmail.com. ID Lattes:2772457185479727.

⁴ Docente nos Cursos de Tecnologia em Alimentos, Engenharias de Alimentos e Engenharia Química no Departamento Acadêmico de Alimentos e Engenharia Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil. E-mail: mvanin@utfpr.edu.br. ID Lattes: 8238389800294077.



INTRODUÇÃO

Alternativas sustentáveis estão cada vez mais presentes no cotidiano, sobretudo no setor alimentício. Desde que a população tem se tornado mais exigente quanto aos produtos que consomem, buscando por alimentos mais saudáveis e livres de agrotóxicos.

Neste cenário, o controle biológico nas lavouras e criações tem emergido como alternativa sustentável de forma significativa frente aos defensivos químicos ainda amplamente empregados.

Controle biológico é o controle do número patógenos em espécies de plantas e animais através de agentes naturais que propiciam a letalidade biótica, controlando a praga de maneira orgânica através da conservação e multiplicação de inimigos naturais (PARRA *et al.*, 2002).

Assim, produtos como os bio defensivos são comercializados para auxiliar na regularização da incidência e magnitude de doenças em plantas, sendo disponibilizados em diferentes formulações, como pó molhável, grânulos dispersíveis em água e líquidos, na forma de suspensões aquosas ou oleosas (POMELLA; RIBEIRO, 2009).

Devido a composição conter células vivas, o armazenamento, bem como a formulação, se mostra importantes para o tempo de vida de prateleira deste tipo de produto. Além disso, para sua viabilidade, a demanda de componentes, como os óleos vegetais auxiliam na fórmula conferindo proteção, adesão e garantindo a conservação dos organismos presentes pela camada protetora gerada (ALVES; FARIA, 2010).

De acordo com Lopes (2009) e Florencio *et al.* (2022) o desenvolvimento de formulações voltadas a microrganismos ainda se encontra sutilmente explorada, desta forma, estes estudos demonstram a necessidade de ensaios de diferentes formulações para a qualidade de produtos voltados ao controle biológico, auxiliando na implantação de métodos sustentáveis. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo analisar a adaptação de formulações distintas voltadas à estabilidade de microrganismos, a fim de encontrar a que melhor se adequa à estabilidade e viabilidade microbiana.

METODOLOGIA

Foram testadas duas formulações combinando microrganismos (MO's), e outros componentes como óleo vegetal e outras variáveis. Os microrganismos foram denominados A e B, e os demais componentes denominadas como: óleo vegetal (1); aditivo 2, aditivo 3 e aditivo 4.

Tabela 1 – Formulações desenvolvidas pela mistura dos microrganismos A e B e com a combinação de variáveis.

Formulação	Mistura de MO	Variável
F1	A + B	1 + 3 + 4
F2	A + B	1 + 2 + 3 + 4

MO: microrganismo.

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

As formulações foram preparadas em triplicata, as quais foram armazenadas em frascos estéreis de 50 mL cada. A quantificação dos microrganismos nas formulações foi obtida através do número de conídios (Conídios/mL), pela contagem em câmara de Neubauer logo após o preparo das formulações. A viabilidade dos conídios foi determinada



pela contagem do número de Unidade Formadora de Colônias por mL (UFC/mL) com plaqueamento em duplicata de acordo com Pinto, Lucon e Bettiol (2019). As análises de concentração de UFC/mL, pH e separação de fases foram realizadas no tempo de 7 (inicial), 30 e 60 dias.

Para UFC/mL pipetou-se 10 mL da formulação em um erlenmeyer contendo 90 mL de solução NaCl 0,9% acrescido de Tween 0,1% (corresponde à diluição 10^{-1}) seguido de homogeneização. Em seguida, transferiu-se 1 mL para um tubo de ensaio com 9 mL de NaCl 0,9% mais Tween 0,1% (corresponde à diluição 10^{-2}) e assim sucessivamente, até a diluição 10^{-9} .

Para o plaqueamento, foi necessário, agitar o erlenmeyer já com a diluição feita e pipetar 100µl sobre uma placa de Petri com ágar Potato Dextrose Agar (BDA), para cada diluição; com o auxílio de uma alça de drigalski espalhou-se por toda superfície de cada placa, as placas foram incubadas durante 7 dias em incubadora BOD. Todos os procedimentos foram realizados com materiais estéreis, atrás da chama. Os materiais e reagentes utilizados foram disponibilizados pela empresa Ergon Tecnologia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de conídios inicial da F1 foi de $4,2 \times 10^9$ / mL e para a F2 de $3,5 \times 10^9$ /mL, os resultados experimentais obtidos ao longo do tempo de armazenamento são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultados de pH e viabilidade das formulações preparadas, ao longo do tempo de armazenamento.

FORMULAÇÃO	7 dias		30 dias		60 dias	
	pH	UFC/mL	pH	UFC/mL	pH	UFC/mL
F1	2,9	$1,6 \times 10^8$	3,2	-	3,8	-
F2	5,9	$4,1 \times 10^7$	5,0	$4,1 \times 10^6$	5,3	-

UFC: Unidades Formadoras de Colônias. - : Não houve contagem.
Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

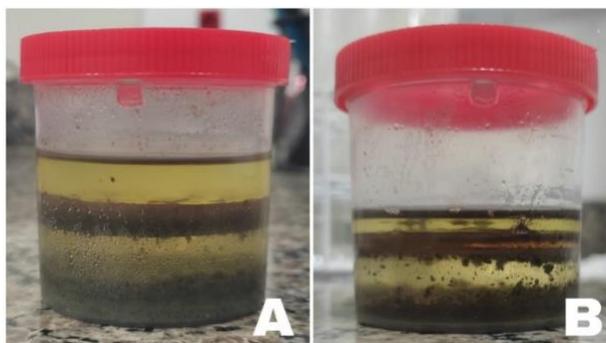
Analisando a Tabela 2 observa-se que F1 contendo óleo vegetal com os aditivos 3 e 4 em sua composição (Figura 1A) no início demonstraram um número superior de conídios/mL quando comparado a F2. A F1 apresentou também pH inferior e menor crescimento microbiano ao longo do tempo de armazenamento em comparação com a F2 preparada com a adição dos aditivos 2, 3 e 4 (Figura 1B).

No estudo de Nascimento *et al.* (2007) verificou-se que a adição de apenas óleos vegetais nas formulações em comparação com água pura resultou em menor germinação devido a existência de filmes de óleo ligados aos conídios, inferindo na hidratação e invalidando a germinação dos microrganismos, o que denota a importância de demais aditivos para auxiliar nesses aspectos, concordando com o que foi constatado neste estudo onde a formulação ligada somente ao óleo vegetal denota menor crescimento microbiano do sua utilização como adjuvante ligado a aditivos que complementam sua ação conservante.

De acordo com Angelo *et al.* (2015) quando se fala da utilização do óleo vegetal, além de ser considerado mais sustentável, alguns fatores devem ser destacados visto que alguns tipos de óleos possuem maior propensão a manutenção da estabilidade térmica e oxidação do que outros, assim como alterações na viscosidade interferindo na qualidade da formulação. Dessa forma, as características do óleo devem ser levadas em consideração, mas não unicamente, pois é importante observar a adequação dos microrganismos ao tipo de óleo quando se trata da formulação do produto.

Ainda assim, segundo Alves, Moino e Almeida (1998) a alteração oriunda desse componente, pode gerar instabilidades no crescimento vegetativo, esporulação, e na própria genética do microrganismo, influenciando na virulência do isolado.

Figura 1 - A: Formulação 1: Base 1 + óleo + aditivo 3 e 4. B: Formulação 2: Base 1 + óleo + aditivo 2, 3 e 4.



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Ao observar as imagens A e B da Figura 1, pode se notar a camada superficial protetora gerada pelo óleo vegetal, que traz consigo maior estabilidade para armazenamento em prateleiras a temperatura ambiente, proteção à radiação ultravioleta, proteção do ingrediente ativo e em sua maior parte uma boa viscosidade auxiliando no adesivamento as superfícies alvo, sendo um adjuvante importante para a conservação de conídios (ALVES; FARIA, 2010; HOWARD *et al.*, 2010).

CONCLUSÃO

Diante disso, conclui-se que diferentes formulações influenciam na viabilidade dos microrganismos durante o período de armazenamento, sendo que o óleo vegetal combinado aos aditivos 2, 3 e 4 apresentou viabilidade microbiana em até 30 dias de armazenamento, no presente estudo. O estudo permitiu observar ainda que os 3 aditivos (aditivos 2, 3 e 4) combinados ao óleo vegetal são necessários para garantir a vida de prateleira pretendida.

Agradecimento

Gostaria de agradecer a todos os envolvidos para a realização desse projeto, a Universidade Tecnológica Federal do Paraná *campus* de Campo Mourão pela oportunidade para meu processo de formação profissional, a empresa Ergon Tecnologia pelo fornecimento de materiais fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa que



contribuíram para a realização desse trabalho, a professora Mirela Vanin dos Santos Lima por ter sido minha orientadora e pelo incentivo e em especial a Lilian Gavazzoni, que sempre me ajudou em cada passo desse trabalho.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERENCIAS

ALVES, R. T. FARIA, M. R. **Pequeno Manual sobre Fungos Entomopatogênicos**. Planaltina - DF: Embrapa Cerrados, 2010 (Série Documentos).

ALVES, S.B.; MOINO JR, A.; ALMEIDA, J. E. M. Produtos fitossanitários e entomopatogênicos, p. 217-238. *In* S.B. Alves (ed.), **Controle microbiano de insetos**. 2ª. ed.: Piracicaba, FEALQ, 1163 p., 1998.

ANGELO, I. *et al.* Formulações oleosas contendo fungos artropodopatogênicos para o controle de *Rhipicephalus*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 37, p. 18-24, 2015.

FLORENCIO, C. *et al.* Avanços na produção e formulação de inoculantes microbianos visando uma agricultura mais sustentável. **Química Nova**, v. 45, n. 9, p. 1133 - 1145, 2022.

HOWARD, A. F. V. *et al.* Pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* leads to increased susceptibility to the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. **Malaria Journal**, v. 9, n. 168, 16 jun. 2010.

LOPES, R. B. A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microrganismos no Brasil. *In*: Bettiol, W.; Morandi, M. A. B. (Org.). **Biocontrole de doenças de plantas: Uso e Perspectivas**. 1ª.ed.: Jaguariúna-SP, Embrapa Meio Ambiente, p. 15-28, 2009.

NASCIMENTO, K. L. *et al.* Efeito da formulação em diferentes óleos vegetais e surfactantes na germinação de conídios de *Trichoderma harzianum* LCB 47. *In*: **Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Semi-Árido**, Petrolina. **Anais**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2007.

PARRA, J. R. P. *et al.* Controle Biológico no Brasil: parasitóides-predadores. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 78, n.1, p. 128, 2002.

PINTO, Z. V.; LUCON, C. M. M.; BETTIOL, W. Controle de qualidade de produtos biológicos à base de *Trichoderma*. *In*: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. da (Ed.). **Trichoderma: uso na agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2019. pt 3. cap. 9. 2019.

XIII Seminário de Extensão e Inovação
XXVIII Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR

Ciência e Tecnologia na era da Inteligência Artificial: Desdobramentos no Ensino Pesquisa e Extensão
20 a 23 de novembro de 2023 - *Campus Ponta Grossa, PR*



SEI-SICITE
2023



POMELLA, A. W. V.; RIBEIRO, R. T. S. Controle Biológico com Trichoderma em Grandes Culturas - Uma visão empresarial. *In*: Bettioli, W.; Morandi, M. A. B. (Org.) **Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas**. 1ed.: v. 1, p. 239-244, 2009.