



UNIVERSIDADE FEDERAL DO SUL E SUDESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS FACULDADE DE QUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS NATURAIS

ARTHUR SOUSA DOS SANTOS

**MÉTODO ALTERNATIVO PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS BACTERIANOS
COM AÇÃO ANTIFÚNGICA.**

MARABÁ – PA

2023

ARTHUR SOUSA DOS SANTOS

**MÉTODO ALTERNATIVO PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS BACTERIANOS
COM AÇÃO ANTIFÚNGICA.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Licenciatura em Ciências Naturais do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, como parte dos requisitos para a obtenção do título de graduado em Ciências Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Ulisses Brigatto Albino

MARABÁ – PA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará
Biblioteca Setorial II da UNIFESSPA

S237m Santos, Arthur Sousa dos
Método alternativo para obtenção de extratos bacterianos
com ação antifúngica / Arthur Sousa dos Santos. — 2023.
43 f. il., (algumas color.)

Orientador (a): Ulisses Brigatto Albino.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) –
Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Campus
Universitário de Marabá, Instituto de Ciências Exatas, Faculdade
de Química, Curso de Licenciatura em Ciências Naturais, 2023.

1. Ciência – Experiências. 2. Projeto experimental. 3.
Fungos – Cultura e meios de cultura. 4. Fungos – Testes. 5.
Pesquisa. I. Albino, Ulisses Brigatto, orient. II. Título.

CDD: 22. ed.: 507

Elaborado por Nádia Lopes Serrão – CRB-2/575

ARTHUR SOUSA DOS SANTOS

**MÉTODO ALTERNATIVO PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS BACTERIANOS
COM AÇÃO ANTIFÚNGICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Licenciatura em Ciências Naturais do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, como parte dos requisitos para a obtenção do título de graduado em Ciências Naturais.

Data de aprovação: Marabá (PA) ___ de ____ 2023.

Banca Examinadora:

Prof^o. Dr^o. Ulisses Brigatto Albino
Orientador

Prof^o. Dr^o. Emerson Paulinho Boscheto
Examinador

Prof^o. Dr^o. Sebastião da Cruz Silva
Examinador

Dedico este trabalho a minha família, a todos os meus amigos, aos meus professores e todos que colaboraram para que eu concluísse esta trajetória.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero muito agradecer a todos, pois a gente tem sempre que agradecer a todo mundo para ninguém poder falar que a gente não é humilde, mas acima de tudo eu só quero agradecer a mim mesmo, porque eu não desisti.

A minha mãe, Aldenir Vieira de Sousa e pai, Reginaldo Cesar Amaral dos Santos, que sempre estiveram me apoiando nesta longa jornada, e compreensão pelo distanciamento condicionado.

A minha irmã, Sabrina Amaral, que me deu todo o suporte necessário no início desta jornada, e que sem sua ajuda eu não chegaria até aqui.

Aos meus irmãos, Ana Carla, Carlos Eduardo, Reginaldo Cesar, que sempre se preocuparam e desmontaram todo carinho e atenção quanto ao meu bem estar.

Ao meu orientador Ulisses Albino Brigatto, que desde o começo esteve me ajudando e me dando suporte dentro da faculdade, por todo carinho e atenção que me foi dado.

Aos meus professores que me ajudaram na minha formação e que me moldaram, Camilla Sitiko, Claudio Emidio silva, Clesianu Rodrigues, Emerson Boscheto, Sheyla Maysa Gordo, Renata Soraia Guimarães, Rigler da Costa e Ulisses Albino, por todos puxões de orelha e pela paciência em ensinar até mesmo quando a turma estava metade no celular e outra metade dormindo.

A minha amiga Loneide dos Santos Couto, que me ajudou nesta pesquisa e sempre esteve a postos pra me ajudar de forma solícita, por todas as caronas até a universidade e muito mais pelo tempo dedicado a minha pesquisa.

A “panelinha” que se formou desde o primeiro dia de aula, Alexsandra Rosa, Bruna Lima, Daniel Rodriguês, João Mateus Carvalho e Márcia Loreni Gomes, por nunca me deixarem só, e estarem do meu lado até hoje, e sempre nos encorajarmos uns aos outros.

Ao querido Hangison Oliveira Borges, que chegou na reta final deste ciclo, mas que se fez crucial para a minha conclusão, me ajudando e me suportando em meus piores momentos.

A UNIFESSPA que me proporcionou a oportunidade de cursar esta graduação, e por meio da Proex me dar todo o auxílio necessário para permanecer no curso.

Aos amigos que estiveram comigo em dias especiais e também em dias tristes, Antônia Gabriela Brito, Daniel Vasconcelos, Debora Cardoso e Gabriel Gomes e por muitas das vezes me fazerem companhia, e me ampararem quando mais precisei.

“Eu vejo, eu quero, sou negro de pele clara, eu sonho, trabalho duro, e batalho até conseguir”

Beyoncé Knowles, 2016.

RESUMO

As pesquisas desenvolvidas em laboratório são de suma importância para toda a população, contudo a maioria das vezes não é valorizada devidamente. Levando em consideração que algumas pesquisas obtêm adversidades, como; grande custo com materiais, metodologias longas, execução em larga escala e periculosidades proveniente de substâncias usadas. O meio de cultura por exemplo é crucial em algumas pesquisas, e devido ser bastante utilizado, se torna um custo enorme. A minuciosidade para se chegar a resultados leva tempo, assim qualquer contratempo atrasa os procedimentos, quando não, anula as possibilidades, obrigando a reiniciar todo o processo. Seguindo esta linha de raciocínio, este trabalho comparou um método alternativo a um método convencional de obtenção de extratos. Onde o método teste foi feito em meio sólido e o convencional em meio líquido, com a intenção de averiguar se os métodos obteriam os metabólitos do co-cultivo entre bactéria e fungo equiparadamente. Para então extrair as substâncias deste confronto e testá-las, e assim confirmar se existe atividade dos extratos. Com a finalidade de apresentar qual das metodologias seria mais adequada para execução, levando em consideração o tempo, econômica e segurança.

Palavras-chave: Metodologia alternativa; Co-cultivo; Compostos Antifúngicos.

ABSTRACT

Research carried out in the laboratory is of paramount importance for the entire population, but most of the time it is not properly valued. Taking into account that some researches had adversities, such as; high cost of materials, lengthy methodologies, large-scale execution and hazards arising from the substances used. The culture medium, for example, is crucial in some research, and because it is widely used, it becomes an enormous cost. The meticulousness to arrive at results takes time, so any setback delays the procedures, if not, it cancels out the possibilities, forcing the whole process to restart. Following this line of thought, this work compares an alternative method to a conventional method of implementing extracts. Where the test method was done in solid medium and the conventional one in liquid medium, with the intention of verifying if the methods would obtain the metabolites of the co-culture between bacteria and fungi equally. To then extract the substances from this confrontation and test them, and thus verify if there is activity of the extracts. In order to present which of the methodologies would be most suitable for execution, taking into account time, economic and safety.

Keywords: Alternative methodology; Co-cultivation; Antifungal Compounds.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Esquema de co-cultivo em meio líquido BD e obtenção de extratos.....30
- Figura 2** - Esquema de co-cultivo e obtenção de extratos.....32
- Figura 3** - Ilustração do teste dos extratos.....34
- Figura 4** - Testes dos extratos da CV02 do método utilizando meio BDA, testando o fungo *M. phaseolina*, realizado em triplicata; (A, B e C) mostram a parte de posterior das placas; (a, b e c) mostram a parte superior das placas respectivamente.....35
- Figura 5** - Teste dos extratos da CV39 do método de meio sólido BDA, testando o fungo *S. sclerotiorum*, realizado em triplicata; (A, B e C) mostram a parte posterior das placas36
- Figura 6** - Teste dos extratos da CV39 do método de meio líquido BD, testando o fungo *S. sclerotiorum*, realizado em triplicata; (A, B e C) mostram a parte posterior das placas36
- Figura 7** - Grid para a contagem das áreas que houve inibição; (A) Placa teste feito com CV02 e *M. phaseolina*; (B) Placa teste feito com CV39 e *S. sclerotiorum*.....37

LISTA DE ABREVIATURAS

AvA	Aveia Ágar
BDA	Batata Dextrose e Ágar
BD	Batata Dextrose
BSA	Batata Sacarose Ágar
B.O.D.	Biochemical Demands Oxigen
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV02	Bactéria de caverna 02
CV30	Bactéria de caverna 30
CV39	Bactéria de caverna 39
CLED	Ágar Cystine Lactose Electrolyte Deficient
EMB	Ágar Eosin Methilene Blue
FAQUIM	Faculdade de Química
HE	Ágar Hektoen Enteric
MA	Milho Ágar
PLE	Extração com líquido pressurizado
SA	Soja Ágar
SFE	Extração com fluido supercrítico
SS	Ágar Salmonella-Shigella
VCB	Ágar Chocolate
V-8	Suco V-8 Ágar
UNIFESSPA	Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
mg	Miligramas
mL	Mililitros
µl	Microlitros

GLOSSÁRIO

Ascomicetos	Os ascomicetos são fungos do filo Ascomycota que produzem seus esporos em esporângios específicos chamados ascos.
Ascósporos	Estrutura de reprodução de fungos da classe Ascomicetos. São formados no interior de uma estrutura denominada asco (saco).
Clorose	A clorose, em botânica, é a condição de uma planta, em que as suas folhas não produzem suficiente clorofila.
Necrose Foliar	É quando ocorre a morte do tecido onde haviam as pontuações da planta que apresentou fitotoxidade.
Oligotrófico	Caracterizado pela pobreza em nutrientes e por uma baixa taxa de produção de matéria orgânica
Termoestáveis	Algo que é resistente à temperatura.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1. Meios de cultivo.....	19
3.2. Métodos de extração.....	20
3.2.1. Soxhlet.....	21
3.2.2. Maceração.....	21
3.2.3. Ultra-som.....	22
3.2.4. Extração com fluido supercrítico (SFE).....	22
3.3. Fungos fitopatógenos.....	23
3.4. O microbioma cavernícola.....	23
3.5. Bactérias como produtoras de compostos antifúngicos.....	24
3.6. A agricultura.....	25
4. METODOLOGIA.....	25
4.1. Reagentes, solventes e equipamentos.....	25
4.2. Reativação dos microrganismos.....	26
4.3. Co-cultivo em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) Sólido.....	27
4.4. Co-cultivo meio líquido Batata Dextrose (BD).....	27
4.5. Obtenção de extratos do método utilizado meio BD.....	29
4.6. Obtenção de extratos através do método usando meio BDA.....	30
4.7. Teste capacidade de inibição fúngica dos extratos.....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1. Controle fúngico dos extratos.....	35
6. CONCLUSÃO.....	38
BIBLIOGRAFIA.....	39

1. INTRODUÇÃO

São diversas as pesquisas desenvolvidas em laboratórios ao redor de todo mundo, buscando trazer melhorias para a vida humana, desde a produção de alimentos à produção de remédios. Essas pesquisas, em grande parte, realizadas em universidades, tem cada vez mais trazido inovações para o meio científico (ESCOBAR, 2019)

Existe um grande potencial para resolução de problemáticas globais que podem ser desenvolvidas por meio de pesquisas acadêmicas, assim como afirma Latour (1979) “dá-me um laboratório e eu moverei o mundo” Afirmado assim, a competência desses ambientes como melhor forma para o desenvolvimento qualitativo desses pesquisadores.

Grande parte das investigações realizadas em laboratórios necessitam de materiais em grande quantidade, tornando assim, as pesquisas mais custosas (GOMES, 2017). Exemplo disso são os métodos de extração e os meios de cultura que são usados para o crescimento e desenvolvimento de microrganismos. Estes constituem o cerne de muitos estudos em função do grande potencial metabólico na obtenção de compostos naturais, muito utilizados na agricultura (O`BRIEN 2011).

O meio agrícola o que proporciona alimentação para a população mundial, passou por várias mudanças em relação às formas de cultivo e aos impactos provocados pela ação de pragas ou microrganismos que se desenvolveram neste meio, sendo estes agentes causadores de doenças (STUKENBROCK & MCDONALD, 2008).

No intuito de atenuar as perdas, uma das vias empregadas no controle desses patógenos é o intenso uso dos defensivos agrícolas, os quais contribuem para a seleção de estirpes mais resistentes de cada patógeno (ANBARASAN et al; 2022; COSTA et al., 2019).

A procura de substâncias capazes de inibir o crescimento destes microrganismos fitopatogênicos é uma linha promissora para a pesquisa científica a fim de melhores perspectivas para a agricultura. Os microrganismos se combatem quimicamente por meio dos metabólitos que produzem substâncias, conseguindo

assim, território e os recursos energéticos de que necessitam (CRUSEMANN et al., 2017).

Nos dias atuais encontramos na indústria muitos resultantes do metabolismo de fungos e bactérias que são operados em benefício à saúde humana, na agricultura, na veterinária e também na industrialização de alimentos (CALDERANI et al., 2016). A maior parte destes microrganismos são originados de lugares hostis e inabitáveis, locais estes que proporcionam um certo tipo de seleção, pois são atreladas a várias batalhas químicas e onde estão submetidos a liberação de novas substâncias (SANTOS, VARAVALLHO, 2011).

As cavernas são apontadas como um bom exemplo destes ambientes, por possuírem um microbioma com ausência de nutrientes e uma grande privação de luz tornando a subsistência de alguns microrganismos improvável. Por esse motivo, os microrganismos cavernícolas vêm sendo muito explorados por possuírem a capacidade de suportar a ausência de luz e viverem com baixo nível de nutrientes, estimulando assim a adaptação no local e a busca por novas vias metabólicas (BIAGIOLI et al., 2023).

Oriundo do estudo realizado pela pesquisadora Jeane Conceição Alves Nunes que isolou as bactérias da caverna arenítica Pedra da Cachoeira, localizada no município de Altamira, no estado do Pará (03° 18' 43" S e 52° 20' 28" W) (NUNES et al., 2014), onde foram isolados 49 microrganismos, os quais apresentaram ótimos resultados no contenção do desenvolvimento de patógenos que atacam as culturas da soja e mandioca

Este trabalho irá reativar os microrganismos que melhor apresentaram ação inibitória com os fungos patogênicos da soja e da mandioca e assim cultivar a interação entre fungo e bactéria através de duas metodologias diferentes no processo de extração das substâncias liberadas pela interação dos fungos fitopatogênicos *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum* e do gênero *Fusarium* com as bactérias coletadas na caverna, com o intuito de apresentar qual dessas metodologia será a mais ágil, barata e segura.

Visando assim o aprimoramento das pesquisas desenvolvidas em laboratórios, busca-se averiguar se a metodologia substituta e usada como segunda

opção é mais econômica que a utilizada recorrentemente para extrair as substâncias da interação entre fungos e bactérias, levando em consideração que é necessário o uso de grandes quantidades de materiais para se chegar ao resultado esperado, assim oferecendo uma segunda opção mais barata para pesquisas futuras que usem desta mesma metodologia.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Comparar duas metodologias diferentes na extração de substâncias liberadas a partir da interação entre fungo e bactéria, em busca do método mais econômico e viável.

2.2. Objetivos específicos

- Reativar os microrganismos;
- Realizar o cultivo e o co-cultivo dos microrganismos reativados em meio sólido e líquido;
- Realizar extração dos extratos dos cultivos e co-cultivos;
- Avaliar a produtividade de metabólitos bacterianos das diferentes condições de cultivo;
- Investigar o potencial antifúngico dos metabólitos produzidos dos dois métodos de cultivo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1.Meios de cultivo

Os meios de cultivos são responsáveis pela nutrição dos microrganismos, fazendo assim com que esses consigam se desenvolver fora do seu local de habitat natural, o que proporciona assim para que os pesquisadores consigam estudar profundamente estes seres (SINERGIA, 2021)

Esses são categorizados como sintético e complexo, onde respectivamente um obtém a composição química conhecida e outro uma distribuição diferente de nutrientes, com vários tipos de substâncias, pois assim um serve para o cultivo de seres específicos e o outro abrange a maioria dos microrganismos (IBAP, 2022)

Divididos em meio sólido e líquido, os quais são utilizados para fins específicos, onde o meio sólido é mais usado para obtenção de maior diversidade de compostos pois causa maior estresse dos metabólitos, já o líquido é empregado com mais frequência nos programas de triagem (VANDERMOLEN et al., 2013).

O tipo de meio influencia diretamente nos resultados. Meios sólidos e líquidos podem dar diferentes resultados para o mesmo microrganismos, possibilitando que se obtenha maior variabilidade de compostos, quando se usa o tipo de meio a fim de se obter diversidade (ÖZKAYA et al., 2018).

São vários os tipos de meios de cultura usados nas análises microbiológicas, onde cada um tem a sua especificidade quanto ao desenvolvimento microbiano, entre os mais utilizados estão ágar sangue, VBC, Thayer-Martin, EMB, MacConkey, SS, CLED, Mueller-Hinton, Lowenstein-Jensen, HE (BRUNETTI, 2020), BDA, V-8, MA, AvA, BSA e SA (CARNAÚBA, 2007).

Quanto ao retrato de custo dos meios de cultura, eles variam de valor no mercado, onde os frascos contendo 500g custam no intervalo de 290,00 reais até aproximadamente 700 reais. A Tabela 1, mostra um levantamento dos valores de alguns meios de cultivo, coletados nas lojas virtuais LABORCHEMIKER e LOJA NET LAB.

Tabela 1. Valores dos meios de cultivo no mercado virtual

Meios de Cultura	Valor
Ágar Sangue	411,00 R\$
Ágar Thayer-Martin	701,25 R\$
Ágar Eosin Methilene Blue (EMB)	356,38 R\$
Ágar MacConkey	350,94 R\$
Ágar Salmonella-Shigella (SS)	358,69 R\$
Ágar Cystine Lactose Electrolyte Deficient (CLED)	375,62 R\$
Ágar Mueller-Hinton,	400,20 R\$
Ágar Lowenstein-Jensen	438,08 R\$
Ágar Hektoen Enteric (HE)	554,08 R\$
Batata dextrose Ágar (BDA)	290,85 R\$
Milho Ágar (MA)	448,19 R\$
Soja Ágar (SA)	394,00 R\$

Fonte: LABORCHEMIKER e LOJA NET LAB.

3.2.Métodos de extração

Os extratos são classificados como fluidos (*extracta fluida*), moles (*extracta spissa*) e secos (*extracta sicca*), onde os fluidos são preparações líquidas, os moles contém consistência pastosa e os secos são sólidos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1996)

Os métodos de extração de amostras sólidas tem como base a dessorção, solvatação e difusão, que tornam a porção líquida. O solvente extrator é escolhido conforme as especificidades da espécie a serem extraídas. Podendo ser empregados ácidos diluídos ou solventes orgânicos (MELLO, 2019)

Os métodos extração sólido-líquido mais utilizados para o isolamento de substâncias são: maceração, percolação, extração com soxhlet, etanol e por evaporação ou evaporação do solvente, outrossim existem os métodos menos convencionais sendo; ultra-som, SFE e PLE (MELECCHI, 2005)

3.2.1. Soxhlet

Soxhlet foi desenvolvido por Von Soxhlet em 1879, e se torna uma técnica utilizada por mais de um século, contudo este método de extração hoje pode ser considerado ultrapassado, por obter várias adversidades na área da pesquisa, pois em parte, os métodos mais antigos podem danificar compostos valiosos por serem expostos a altas temperaturas.(MOHAMMADPOUR et al.; 2019)

O soxhlet por ser um dos métodos mais antigos usados para a extração de amostras sólidas, acaba sendo um método obsoleto. Não sendo usado com frequência devido a demora do tempo para obter a extração. Pois pode levar de 1 a 72 horas de duração. Outra grande desvantagem deste método é o uso de grandes quantidades de solventes o que se torna ecologicamente inviável (LUZ, 1998)

Deste modo, hoje este método se torna inviável para as pesquisas, devido não ter resultados rápidos. Levando também em consideração o surgimento de novos métodos mais amadurecidos e que visam a economia e entrega resultados em menor duração de tempo tirando o soxhlet de cogitação, sendo assim mais favorável a busca por métodos superiores (WANG & WELLER, 2006; CASTRO; GARCIA-AYUSO 1998)

3.2.2. Maceração

A maceração é um método bastante utilizado, consiste em colocar a substância em contato com uma certa quantidade de solvente em temperatura ambiente, em local fechado e tempo determinado, gerando assim equilíbrio entre substância e solvente, podendo ser influenciado por fatores derivado de ambos, advindos da natureza, tamanho, umidade e peso da substância ou por seletividade o quantidade do solvente (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1996; SIMÕES et al., 2003)

Entre algumas das desvantagens da maceração está a vagarosidade, a perda dos princípios ativos, o que influencia diretamente no resultado dos extratos. Outra desvantagem é o grande risco de contaminação quando se é empregado solventes com água (MELECCHI, 2005).

3.2.3. Ultra-som

A extração por ultra-som ocorre através de energia das ondas sonoras que criam uma variação na pressão do líquido ocasionando a cavitação e por ser utilizada como método alternativo ao Soxhlet (LUZ, 1998)

Esta abordagem é recomendada pois obtém bastante eficiência de extração por ser rápida e por utilizar solventes com menos toxicidade. Sendo ainda considerada um procedimento complacente a indústria de alimentos (FERREIRA, 2020)

Contudo ainda precisa-se aprimorar este método, pois ainda se obtém resultados divergentes em algumas extrações, pois os ultrassons precisam atravessar as paredes do recipiente em que se encontram as substâncias, assim uma porcentagem da energia canalizada é consumida pelas paredes do frasco (KORN, 2019)

Desta forma, na maioria das vezes não se é um método desejável, para algumas substâncias/espécies instáveis, Devido a exposição de altas temperaturas e pressão em alguns pontos indesejados ou não visados, tendo também alta dissipação de calor, e formação de micro-jatos (MELLO, 2019)

3.2.4. Extração com fluido supercrítico (SFE)

O método de extração por fluido supercrítico é considerado ecologicamente amigável, quando referido aos outros que utilizam de solventes para executar a extração. Pois o SFE usa fluido supercrítico como solvente, que é levado a um ponto crítico pela temperatura e pressão crítica. Fazendo assim com que sua densidade contribua para uma maior solubilização dos compostos (SAHENA et al; 2009)

Na prática se chega ao fluido supercrítico elevando a pressão e temperatura de um gás/líquido até o seu ponto de agregação para que assim mude as propriedades do composto interessado. Isso ocorre através da solvatação que é provocada pela agregação do gás/líquido, assim mudando o comportamento químico da substância (MELECCHI, 2005)

As baixas temperaturas, a alta seletividade e a oportunidade de recuperação de compostos importantes são as principais vantagens que esta técnica

proporciona. Considerada uma metodologia ecologicamente sustentável (COSTA, 2018)

3.3.Fungos fitopatógenos

Os fungos fitopatogênicos estão presentes em todo o meio agrícola, sendo os principais: *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum* e do gênero *Fusarium*, são microrganismos que podem causar várias doenças para as vegetações (ALBERT, 2022) fungos como a *Macrophomina phaseolina* tem a capacidade de causar podridão em frutos, queima nas plantas e até mesmo a podridão em carvão (MARQUEZ et al., 2021).

O *Fusarium* é um dos mais importantes fitopatogênicos e age nas raízes e as sementes causam necrose radicular, o que pode afetar diretamente as plantas deixando-as com clorose e necrose foliar, levando assim as plantações ao apodrecimento por toxinas (CHIOTTA et al., 2016; ROSATI et al., 2021).

Capaz de atingir mais de 500 espécies vegetais, o fungo *M. phaseolina* se espalha pelo território da planta infectada, onde ele sobrevive e se proliferando para as plantas vizinhas, causando assim grandes prejuízos às plantações (GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012).

O ascomiceto *S. sclerotiorum* é considerado o mais perigoso dos fungos patogênicos e é responsável por infectar centenas de plantas hospedeiras, utilizando-se de ascósporos que são transmitidos através do ar, se desenvolvendo rapidamente dentro do hospedeiro, ocasionando o necrosamento e atrofiamento e o murchamento do vetor (WANG et al., 2019).

3.4. O microbioma cavernícola

O microma das cavernas é classificado como um âmbito inóspito para a vida, devido à escassez de recursos naturais. As cavernas são influenciadas por agentes externos comuns como o vento, a percolação de água, insetos, temperaturas, e também por ação humana. Tornando assim um ambiente oligotrófico o que contribui para o avanço de comunidades eucariotas e procariotas em cavernas. (ALAOUI-SOSSE, 2022)

Analisando as condições do microbioma das cavernas, surge um questionamento, como estes seres sobrevivem nestes habitats e de que maneira ocorre um fluxo de energia e nutrientes (GHOSH et al., 2017). O que se torna amplamente diferente, já que cada caverna obtém suas peculiaridades físico-químicas e biofísicas. (WISESCHART & POOTANAKIT 2020)

Existe uma escassez enorme de pesquisas feitas em cavernas, quando comparado aos diversos campos de estudo ecológico, porém, o microbioma das cavernas é uma ramo da pesquisa que vem crescendo. Obtendo uma atenção notável na atualidade, a fim de conhecer melhor o microbioma cavernícola pelo mundo, com o intuito de obter uma melhor percepção das interações da vida em condições desfavoráveis. (WISESCHART & POOTANAKIT 2020)

3.5.Bactérias como produtoras de compostos antifúngicos

As buscas por atenuantes de compostos antifúngicos é antiga e sempre foi uma área de pesquisa muito visada pelos pesquisadores, através destas surgiu a penicilina em 1928 que foi descoberta a partir da interação entre o fungo *Penicillium crisozeum* e uma bactéria do gênero *Staphylococcus* (BRAS et al., 2009). Desde então as bactérias têm mostrado ser um grande potencial na batalha contra os patógenos.

A partir das pesquisa de Dimkic et al. (2022) pode-se concluir que bactérias do gênero *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp. obtêm bons resultados na inibição do crescimento do fitopatógenos bacterianos e fúngicos.

As bactérias demonstram ações eficazes na contenção de patógenos, podendo ser devido a disputa por espaço e nutrientes na planta hospedeira ou até por produção de compostos microbianos (MELO 2005) se mostrando também capaz de Inibir o crescimento de *Fusarium oxysporum f. sp.lycopersici* através da formação de resíduos termoestáveis como metabólitos, com a antibiose sendo o seu predominante método de operar. (LIMA, 2014)

Uma pesquisa recente aponta as bactérias do gênero *Bacillus* spp. vem sendo bastante utilizadas como biopesticida na agricultura, consideradas um controlador biológico ambientalmente correto, sendo apontadas como grandes aliadas da agricultura sustentável (MONNERAT et al., 2023; SANSINENEA, 2019)

3.6. A agricultura

A agricultura hoje é mundialmente pré estabelecida e desenvolvida em todo o mundo, tendo vários métodos e práticas que são peculiares de cada local em que é aplicada, devido a revolução verde surgiram novos meios de produção, o que trouxe aumento ao rendimento agrícola (MAZOYER & ROUDART, 2010)

Passando por diversas mudanças e alterando também os biomas e transformando-os em sistemas ecologicamente mais simples, a agricultura vem sendo reestruturada e modificada ao decorrer dos anos, sendo adaptativa, na proporção em que surgem as necessidades dos seres humanos (SILVA, 2022)

Outrora, conforme surgiu a agricultura, assim também se manifestou às pragas e patógenos deste meio, que se propagaram até os dias de hoje, se desenvolvendo e evoluindo junto com seus hospedeiros mutuamente desde os primeiros desenvolvimentos agrícolas a cerca de 10.000 anos atrás (Stukenbrock & McDonald, 2008)

As buscas por compostos antifúngicos que controlem estas pragas de forma sustentável, é uma pesquisa que vem sendo feita por anos, a fim de amenizar os males causados pelos pesticidas químicos, uma via encontrada foi a de pesticidas desenvolvidos através da bactérias do gênero *Bacillus*, que se mostrou ótimas inibidoras de fungos fitopatogênicos (MONNERAT et al., 2023)

4. METODOLOGIA

4.1. Reagentes, solventes e equipamentos

- Acetato de etila (C₄H₈O₂, Dinâmica);
- Ágar (Kasvi);
- Cloreto de sódio (NaCl, Synth)
- Dextrose (C₆H₁₂O₆, Neon)
- Etanol (CH₃CH₂OH, Synth)
- Hidróxido de sódio (NaOH, Neon);
- Metanol (CH₃OH, Synth)
- Autoclave (Primatec, CS-14190);
- Balança analítica (Eduotec, FA2204C);
- B.O.D. (Eletrolab, EL202/3);
- Capela de fluxo laminar (Veco, CFLH-09);
- Medidor de pH (Quimis, 0400AS)
- Estufa Microprocessada de secagem (Quimis, 0317M-22)

4.2.Reativação dos microrganismos

Os microrganismos foram reativados no laboratório de biologia da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, As bactérias foram provenientes do estudo realizado pela pesquisadora Jeane C. A. N. (2014). As linhagens fúngicas foram fornecidas pelo professor Leopoldo do Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Estadual do Norte do Paraná, Bandeirantes – PR. Onde foram selecionadas três bactérias cavernícolas desta pesquisa e três fungos patogênicos.

Esta pesquisa utilizou três bactérias sendo elas; CV02, CV30 E CV39, e três linhagens fúngicas que foram *Fusarium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Macrophomina phaseolina*.

Os fungos e bactérias presentes neste estudo estavam guardados no laboratório de biologia da UNIFESSPA, e foram reativados a partir do meio de cultura Ágar Mueller Hinton. Para o preparo do meio de cultura foi pesado 36,0g de Ágar Mueller Hinton e colocado 1000 ml de água destilada aquecida, para que pudesse diluição, logo após foi ajustado o pH para 7,0, através da solução hidróxido de sódio NaOH1 M. A partir disso, o meio foi colocado em autoclave por

20 minutos à temperatura de 121 °C e pressão de 1 atm para ser esterilizado. Logo após, o meio de cultivo foi resfriado e levado para a câmara de fluxo laminar, onde foi vertido em placas de Petri, 25 ml em cada. Com o auxílio de uma alça de inoculação, os três fungos fitopatogênicos à soja, *F. solani*, *S. sclerotiorum* e *M. phaseolina*, e as três bactérias cavernícolas, CV02, CV30 e CV39, foram inoculadas nas Placas de Petri, em seguida, as placas foram incubadas na Biochemical Demands Oxygen (B.O.D) por 7 dias sob a temperatura de 28 °C.

4.3. Co-cultivo em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) Sólido

O meio de cultura escolhido para o co-cultivo desses microrganismos foi o BDA. As etapas para a preparação do meio foram: primeiro foi pesado em balança analítica 300 g de batata cortada em pedaços, logo após adicionada em 1000 mL de água destilada. Colocada em processo de cozimento por 6 minutos no forno micro-ondas é escoada para um béquer de 2000 mL. Onde foi adicionado e dissolvido 12 gramas de dextrose, posteriormente, o pH do meio foi regulado para 7,0 através de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 M, seguido o acerto do pH, foi vertido 250 mL de meio em 4 frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 3,75 g de ágar. Em seguida foi levado o meio BDA para esterilização na autoclave por 20 minutos à temperatura de 121 °C e pressão de 1 atm. Logo após a esterilização os frascos Erlenmeyer foram resfriados e levados para a câmara de fluxo laminar, sendo vertidos 25 mL de meio em placa de Petri estéreis.

Assim as bactérias CV02, CV30 e CV39 e as linhagens fúngicas *F. solani*, *S. sclerotiorum* e *M. phaseolina* foram postas em confronto em placa de petri no meio de cultivo BDA, sendo feitas em triplicata.

Foram usadas 15 Placas de Petri contendo meio BDA, onde 12 delas foram destinadas ao co-cultivo e 3 placas para o controle fúngico. Adiante isso os fungos fitopatogênicos: *F. solani*, *S. sclerotiorum* e *M. phaseolina*, foram inoculados na extremidade das 12 placas. Em cada placa foi inoculado um disco de micélio fúngico de 5 mm². Posteriormente os fungos inoculados foram levados para a incubadora B.O.D. por 48 horas, sob a temperatura de 28 °C. Com o desenvolvimento preliminar dos fungos já ocorrido, as placas de Petri foram levadas para a câmara de fluxo laminar. Utilizando uma alça de inoculação, as três bactérias cavernícolas CV02, CV30 e CV39 foram inoculadas na parte oposta às que haviam sido os fungos. Em seguida, as 12 placas foram reservadas para incubação na B.O.D. por 5 dias sob a

temperatura de 28 °C. Assim sendo o crescimento dos fungos e das bactérias foi acompanhado diariamente até que se chegou à estagnação do mesmo.

4.4.Co-cultivo meio líquido Batata Dextrose (BD)

A partir do co-cultivo em meio BDA, foram selecionados os microrganismos que obtiveram melhores resultados no confronto, passando a serem cultivados em meio líquido BD, em co-cultivo e isoladamente. Estes procedimentos foram realizados em triplicata.

No método de preparo do meio BD, foram trituradas 135,0g de batata, e adicionadas em 450,00 mL de água destilada. Em seguida colocadas em cozimento por 6 min no micro-ondas, escoadas para um Erlenmeyer de 500 mL, onde foi adicionada 5 g de dextrose. A seguir o pH foi ajustado para 7,0 com uma solução de NaOH 1M. Posteriormente, o meio foi dividido em 6 Erlenmeyer, sendo 3 de 250 mL, comportando 100 mL de BD cada (a fim de cultivar o fungo separadamente), e 3 de 125 mL, contendo 50 mL de meio BD (para o co-cultivo).

Em seguida os frascos foram levados à autoclave (121 °C e 1 atm) por 20 minutos. Após esta etapa, foram resfriados e levados para a capela de fluxo laminar, e então foram inoculados o disco de micélio de 5 mm² do fungo *S. sclerotiorum* nos 6 frascos. Assim, os frascos separados para co-cultivo foram incubados na B.O.D. por 48 horas e os destinados a isolamento do fungo foram mantidos na incubadora. Passadas as 24 horas da inoculação do *S. sclerotiorum* foi feito um novo meio BD com o intuito de efetuar a inoculação da bactéria. De mesmo modo que foi descrito anteriormente, foram preparados 450 mL de BD e vertidos em 3 frascos de 250 mL, com 100 mL de BD(para o cultivo da bactéria) cada e 3 frascos de 125 mL contendo 50 mL de cada (para o co-cultivo). Em cada um dos seis frascos de Erlenmeyer foram inoculados 100 µL de suspensão da bactéria CV39 com concentração 10⁸ UFC/mL (a metodologia da padronização de UFC), e incubados na B.O.D. por 24 horas.

Passado o tempo de incubação, os frascos de 125 mL contendo a bactéria CV39, e os que continham o fungo *S. sclerotiorum*, ambos destinados ao co-cultivo, que estavam incubados na B.O.D. por 48 horas, foram levadas a capela de fluxo laminar. Na capela, um frasco contendo a bactéria cultivada em 50 mL de meio BD e um frasco do fungo cultivado em 50 mL de meio BD foram vertidos em um

Erlenmeyer de 250 mL para o co-cultivo, totalizando 100 mL de meio de cultivo com ambos os microrganismos. Logo após eles foram levados para a incubadora B.O.D. por 5 dias e posteriormente extraídos com solvente orgânico. Todo o método está ilustrado na Figura 1. pág - 29.

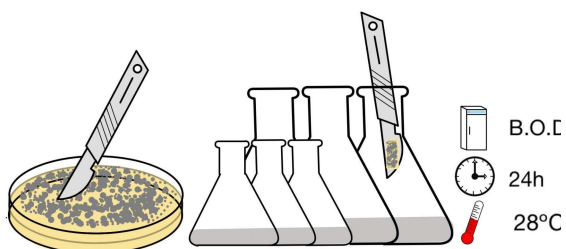
4.5. Obtenção de extratos do método utilizado meio BD

Decorridas as 120 horas de incubação dos microrganismos, da bactéria CV39 e do fungo *S. sclerotiorum*, os cultivos foram levados até a câmara e fluxo laminar e em cada um dos frascos foi adicionado 20 mL de etanol, e colocados em filtração à vácuo, através do funil de Büchner e frasco Kitassato de 500 mL.

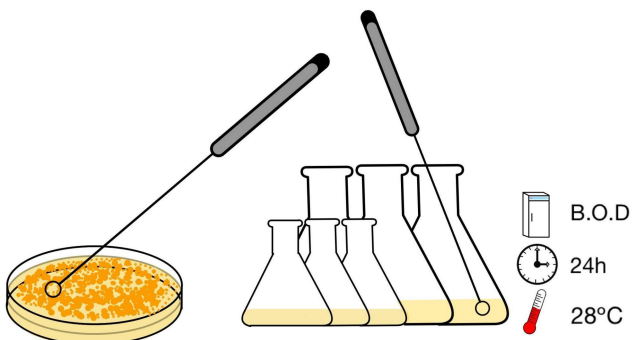
As porções em estado líquido coletadas no Kitassato passaram por extração líquido-líquido com acetato de etila por três vezes. Assim cada extração foi realizada com 50 mL do solvente. Logo após as extrações as amostras foram colocadas em balões de fundo redondo e concentradas à pressão reduzida no evaporador rotativo. Os extratos adquiridos dos microrganismos cultivados separadamente e do co-cultivo (bactéria CV39 e fungo *S. sclerotiorum*) foram secos à temperatura ambiente durante 5 dias, conforme é representado na Figura 1. pág 30.

Figura 1. Esquema de co-cultivo em meio líquido BD e obtenção de extratos; (A) fungo sendo recortado na placa, e inoculando o recorte no meio líquido, em seis Erlenmeyer, três destinados ao co-cultivo; (B) Alçada de bactéria na placa e inoculando com a alça em seis Erlenmeyer, três destinados ao co-cultivo; (C) Após 24 horas, inoculação dos cultivos destinados ao co-cultivo em novos erlenmeyers unindo fungo e bactérias, e levados para a B.O.D. por 5 dias; (D) Filtração a vácuo dos co-cultivos; (E) Extração com acetato de etila; (F) Concentração no evaporador; (G) Secagem dos extratos em temperatura ambiente.

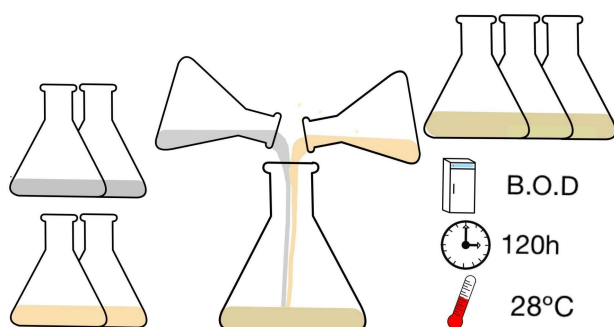
A Inoculação do fungo



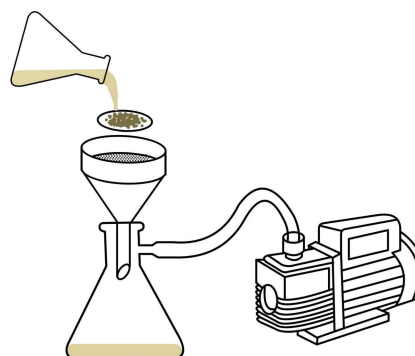
B Inoculação da bactéria



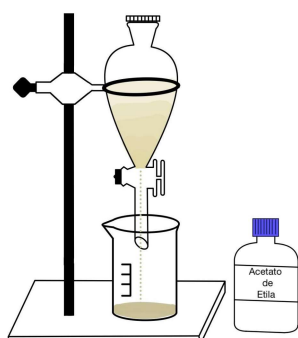
C Co-cultivo



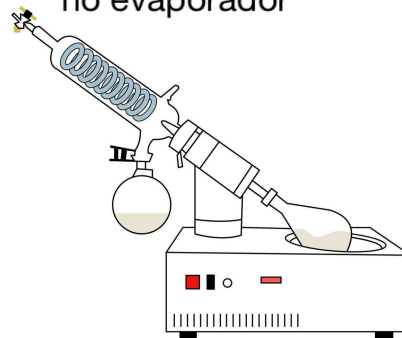
D Filtração a vácuo



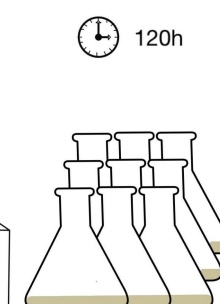
E Extração



F Concentração no evaporador



G Extratos



Fonte: Autor (2023)

4.6.Obtenção de extratos através do método usando meio BDA

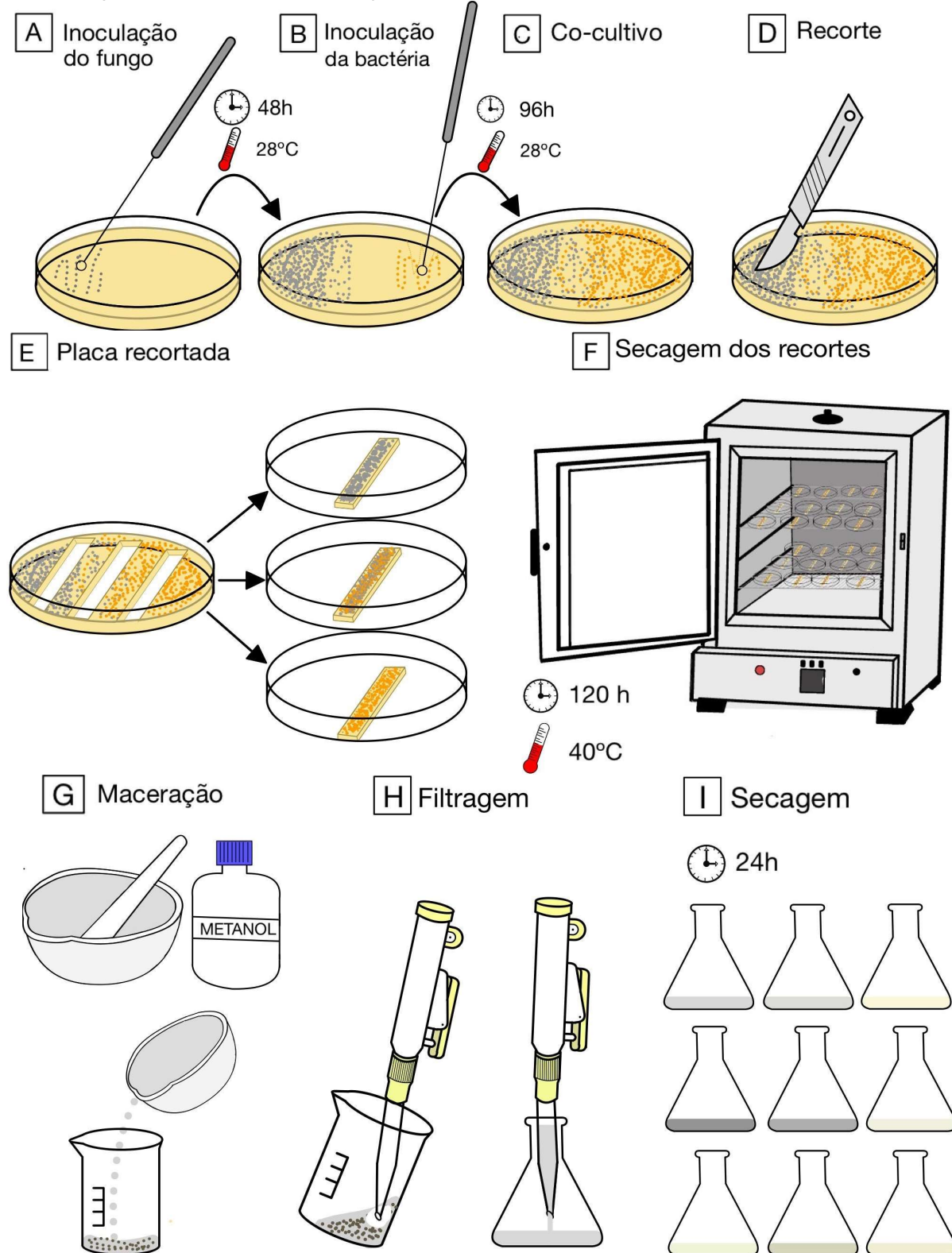
O meio de cultivo escolhido para o método foi o BDA, devido ao seu baixo custo de uso, o meio foi preparado conforme descrito no item 4.3. Após o preparo, foi levado a câmara de fluxo laminar onde foi vertido em três placas de petri, sendo destinados ao co-cultivo das bactérias com os fungos. Assim, depois do meio ser vertido, os fungos *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum* e *Fusarium* foram inoculados com o auxílio de uma alça, os fungos foram inoculados em uma das laterais de cada placa. Deste modo as placas foram levadas para a incubadora por 48 horas, para o crescimento do fungo.

Novamente as nove placas foram levadas para a câmara de fluxo laminar para inoculação das bactérias, que foram inoculadas na extremidade oposta aquela em que os fungos foram inoculados. Cada fungo foi inoculado com a bactéria que apresentou melhor ação inibitória dos fungos. O co-cultivo foi realizado entre CV02 e *M. phaseolina*, CV30 e *Fusarium* e CV39 e *S. sclerotiorum*.

Passadas 96 horas, as placas foram levadas para câmara de fluxo laminar, foi observado um desenvolvimento de ambos os microrganismos, seguindo assim para os recortes com bisturi esterilizado, sendo recortada três retângulos de cada placa, e passados para novas placas esterilizadas. Foram realizados dois recortes em cada lateral das placas onde se obtinha maior concentração do fungo e da bactéria, e um outro recorte no meio de cada placa onde ocorria a interação através do crescimento do fungo e da bactéria. Com todos os recortes especificados em placas de petri, foram levados para estufa sob a temperatura de 40°C por 120 horas para serem secados.

Passados as 120 horas com os recortes já secos, cada um foi macerado com almofariz (gral) e pistilo, até chegar em uma consistência mais próxima de pó, com a maceração já executada, foi adicionado metanol no almofariz com o recorte macerado, sendo transferido para um becker onde em seguida, foram filtrados através de um pipetador com algodão em sua ponta, passando para Erlenmeyer de 25 mL todo o extrato. Este processo foi repetido para cada recorte e colocados em erlenmeyer separados, que foram colocados para secar em temperatura ambiente por 24 horas. Todo o procedimento deste método está descrito na Figura 2. pág - 32.

Figura 2. Esquema de co-cultivo e obtenção de extratos: (A) Inoculação do fungo em placa de petri com BDA; (B) inoculação da bactéria após crescimento do fungo, mantidas a 28°C por 96 horas; (C) Co-cultivo de fungo e bactéria; (D) Recortes retangulares nas laterais e meio da placa; (E) Placa recortada e recortes em novas placas; (F) Placas colocadas na estufa para secagem dos recortes por 120 horas; (G) Maceração com metanol de cada recorte após ser secado, e transferência para becker; (H) Filtragem do extrato por pipetador com algodão na ponta; (I) Secagem em temperatura ambiente para obtenção dos extratos, por 24 horas.



4.7. Teste capacidade de inibição fúngica dos extratos

Foram realizados três testes em triplicata, em um destes testes foi usado o extrato da CV39 advindo do método utilizando o meio líquido BD, testando a ação inibitória do fungo *S. sclerotiorum*. Os dois outros testes foram realizados utilizando os extratos da CV02 e CV39 advindos do método proposto nesta pesquisa que utiliza meio sólido BDA, testando os fungos *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum*, respectivamente.

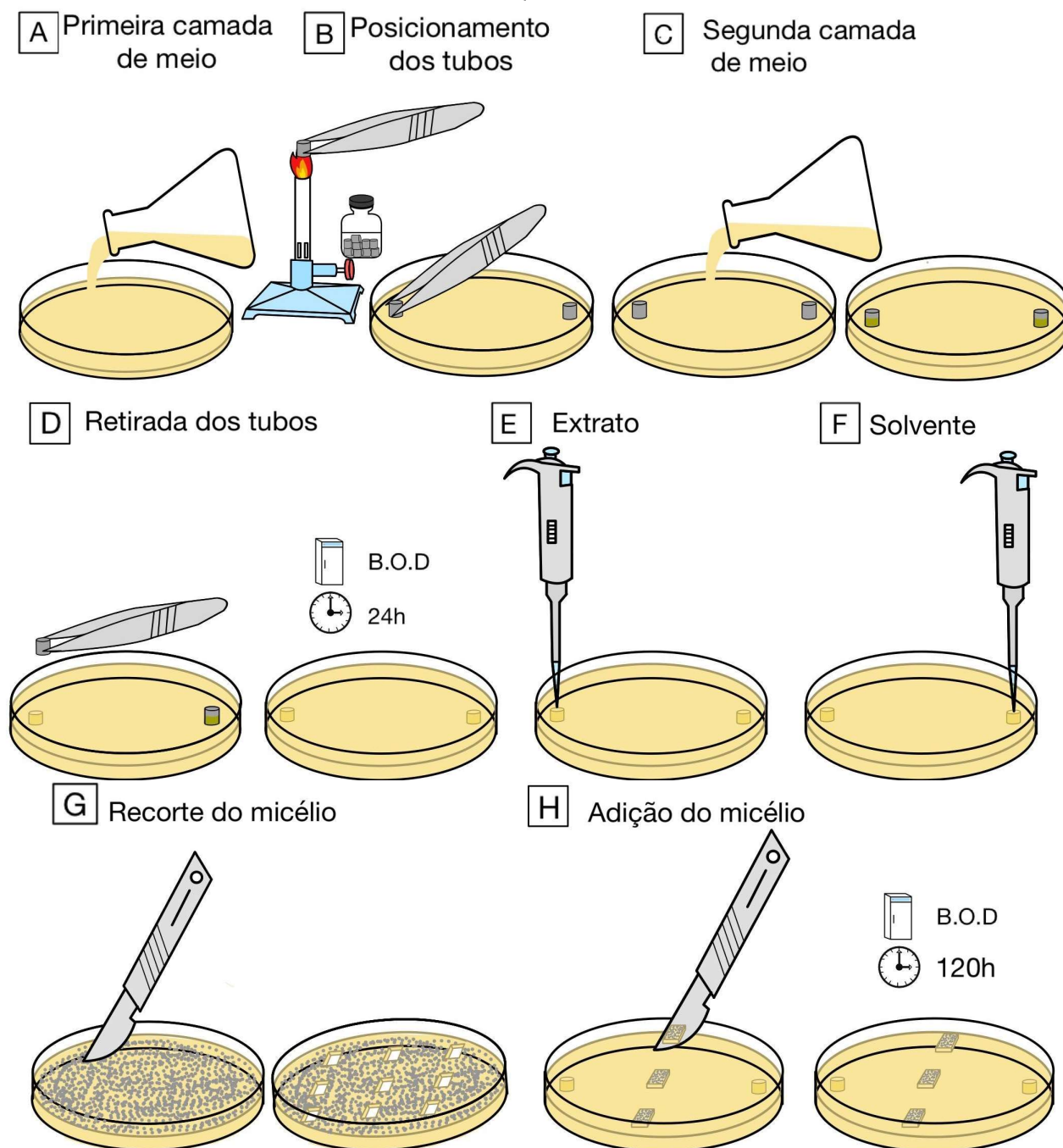
O método escolhido para o teste dos extratos foi o teste de inibição em meio de cultivo. Para execução deste método o primeiro passo foi o preparo do meio sólido BDA seguindo os métodos apresentados no item 4.3. Com o meio pronto, seguiu para a câmara de fluxo laminar, onde foi vertido uma camada fina de meio em nove placas de petri, que foram deixadas dentro da câmara até solidificar a camada de meio.

O segundo passo foi o posicionamento dos tubos para formação dos precipitados. Os tubos utilizados obtêm formato cilíndrico com um diâmetro de 1,12 cm e massa de aproximadamente 0,300 mg cada, os quais estavam submersos em um frasco com álcool. Para a formação dos precipitados estes tubos foram retirados do frasco e levados até o bico de bunsen com auxílio de uma pinça para serem esterilizados, depois de alguns instantes no bico de bunsen, esperou-se até que os tubos esfriassem, para então serem posicionados nas laterais das nove placas com a camada fina de meio. Com os tubos já posicionados se adicionou mais uma camada de meio até a altura dos tubos, assim que a segunda camada solidificou foram retirados os tubos com o auxílio da pinça esterilizada, criando assim dois poços no meio de cultivo dentro das placas, que em seguida, foram levadas para B.O.D. por 24 horas para testes de contaminação.

Decorridas as 24 horas, foi adicionado metanol nos extratos obtidos dos dois métodos utilizando, do meio líquido BD e do meios sólido BDA. Com auxílio de uma pipeta regulada para 35 µL, foi inoculado 35 µL de cada extrato em um dos poços de três placas. Com a pipeta foi inoculado nos outros poços das placas somente o solvente (metanol). Posteriormente utilizando um bisturi foram recortados quadrados de micélios dos fungos *S. sclerotiorum* e *M. phaseolina* cultivados em placas de petri. Os recortes foram levados para o centro das placas onde foram inoculados os

extratos. Seguidamente as placas foram levadas para a B.O.D. por 120 horas para crescimento do fungo e testagem da inibição do fungo através dos extratos. Todo este procedimento está ilustrado na Figura 3. na pagina 34.

Figura 3. Ilustração do teste dos extratos; (A) Foi adicionada uma camada fina de meio BDA em placa de petri; (B) Após a solidificação do meio foi posicionado os tubos metálicos devidamente esterilizados em bico de bunsen, em cada lateral da placa; (C) Adicionada a segunda camada de meio até a altura dos tubos; (D) Após a secagem do meio foi retirado os tubos com a pinça; (E) Inoculação através de pipeta de 35 μ l do extrato dissolvido no metanol dentro nos poços; (F) Inoculação do solvente; (G) Recorte do micélio de fungo cultivado em placa de petri; (H) Posicionamento do micélio recortado no meio da placa.



Fonte: Autor (2023)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

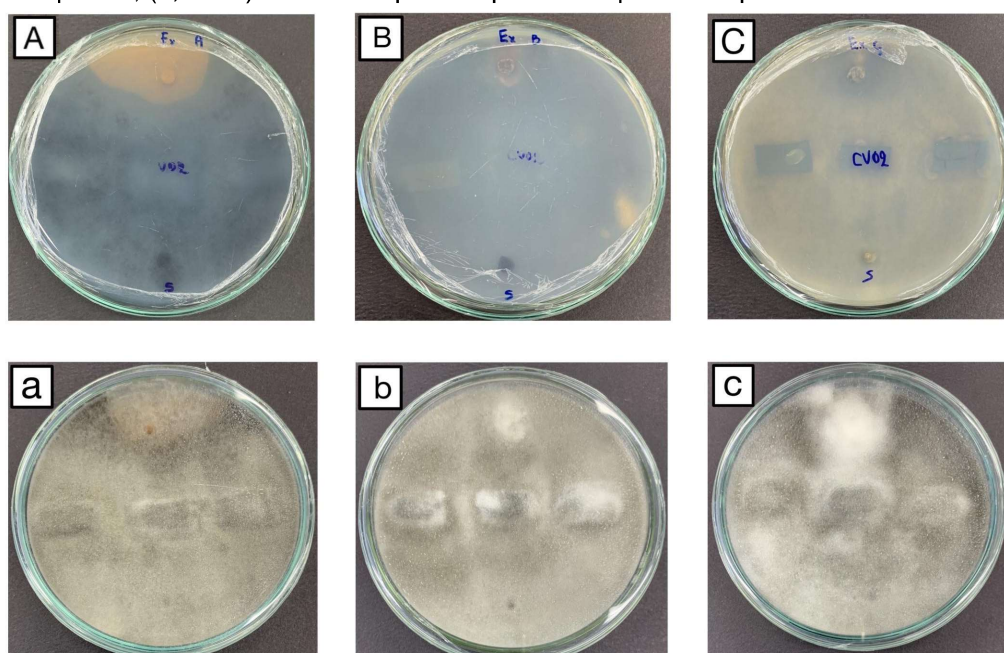
Os resultados obtidos e aqui apresentados em parte, fornecidos da dissertação da discente Ioneide Couto, referente a parte do cultivo em meio líquido BD, o qual foi realizado em conjunto, para comparar com o método realizado nesta pesquisa.

5.1. Controle fúngico dos extratos

Os resultados obtidos a partir dos métodos realizados nesta pesquisa, foram similares, mostrando produtividade de metabólitos bacterianos de ambos métodos de cultivo, assim apresentando que os extratos destes metabólitos, possuem ação inibitória dos fungos *M. phaseolina* e *S. sclerotiorum*.

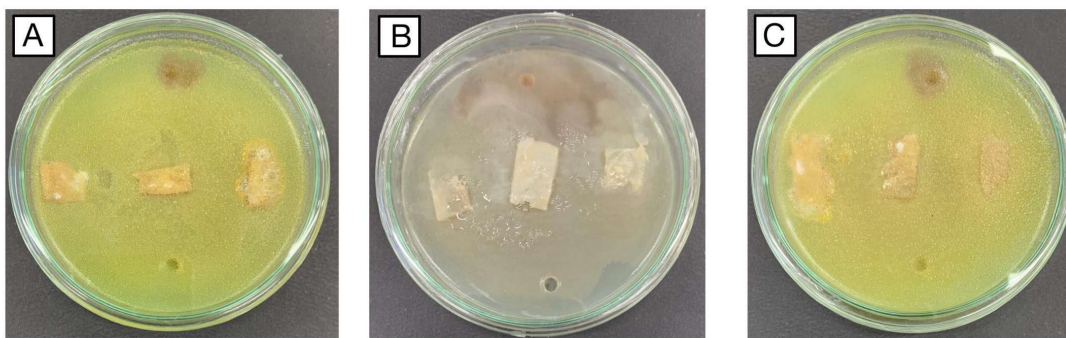
Dos dois testes feitos dos extratos do meio sólido BDA, apenas os testes dos extratos feitos com CV02 e *M. phaseolina* obtiveram resultados consideráveis (Figura 4). Já as placas com CV39 e *S. sclerotiorum* por mais que os extratos apresentaram ação inibitória do fungo, houve contaminações e o fungo cessou o crescimento nas primeiras 96 horas de incubação, com isso estes resultados não foram levados em consideração, como mostrado na Figura 5. pág 36.

Figura 4. Testes dos extratos da CV02 do método utilizando meio BDA, testando o fungo *M. phaseolina*, realizado em triplicata; (A, B e C) mostram a parte de posterior das placas; (a, b e c) mostram a parte superior das placas respectivamente.



Fonte: Autor (2023)

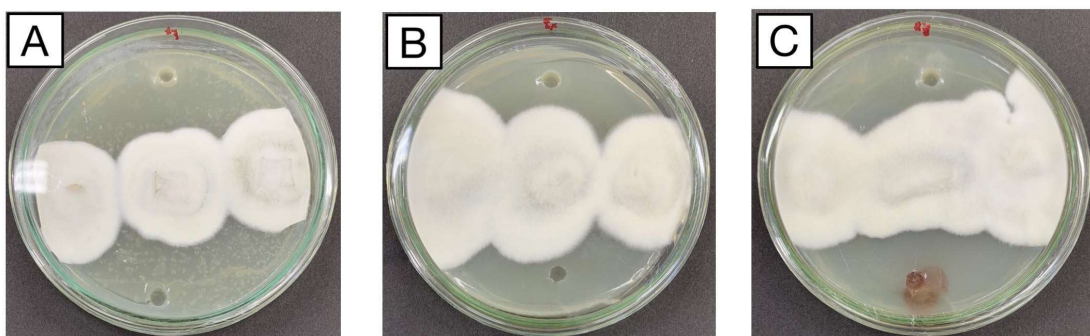
Figura 5. Teste dos extratos da CV39 do método de meio sólido BDA, testando o fungo *S. sclerotiorum*, realizado em triplicata; (A, B e C) mostram a parte posterior das placas.



Fonte: Autor (2023)

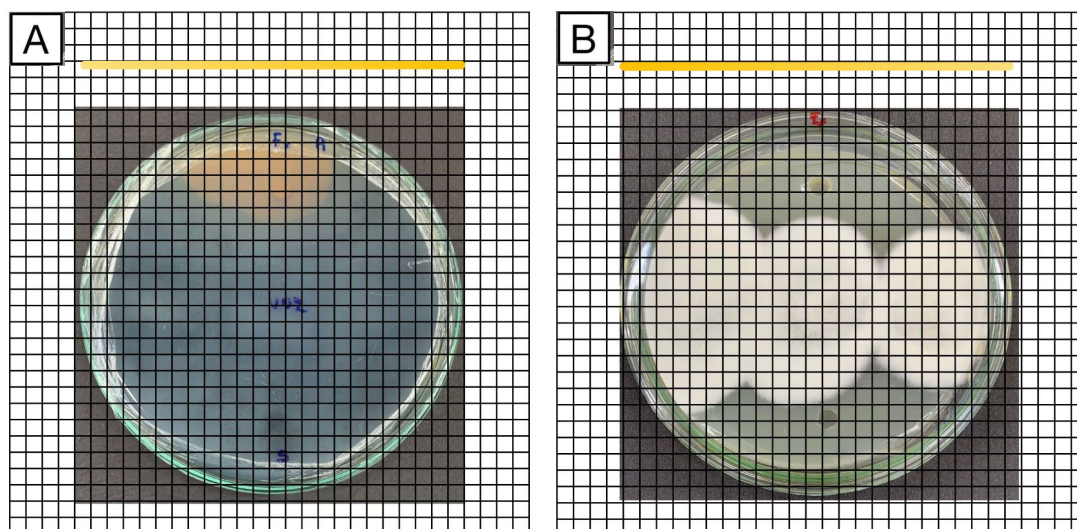
Referente aos testes feitos dos extratos da CV39 proveniente do método do meio líquido BD, testando o fungo *S. sclerotiorum*, uma das placas apresentou contaminação, contudo as outras duas mostraram que também existe ação inibitória, como demonstrado na Figura 6.

Figura 6. Teste dos extratos da CV39 do método de meio líquido BD, testando o fungo *S. sclerotiorum*, realizado em triplicata; (A, B e C) mostram a parte posterior das placas.



Fonte: Autor (2023)

Figura 7 - Grid para a contagem das áreas que houve inibição; (A) Placa teste feito com CV02 e *M. phaseolina* s; (B) Placa teste feito com CV39 e *S. sclerotiorum*.



Fonte: Autor (2023)

Mostrando assim que os extratos obtidos a partir dos dois métodos testados apresentaram inibição do crescimento dos fungos *M. phaseolina* e *S. sclerotiorum*, como mostrado na Figura 7, que apresenta a contagem da área em que o fungo foi inibido, dando o percentual de inibição fúngica, calculada seguindo a equação abaixo.

$$I\% = \frac{C_{\text{controle}} - C_{\text{co-cultivo}}}{C_{\text{controle}}} \cdot 100$$

$I\%$ – Porcentagem de inibição

$C_{\text{co-cultivo}}$ – Crescimento no teste do extrato

C_{controle} – Crescimento do fungo isolado

Com base nos cálculos feitos, conclui-se que os testes realizados com o extrato da CV02 frente a *M. phaseolina*, apresentaram o controle do fungo de 12,37% e os testes feitos dos extratos da CV39, testando o fungo *S. sclerotiorum*, apresentaram o controle fúngico de 23,32%.

Estes resultados mostram que os extratos obtidos nos dois métodos são capazes de inibir os fungos, logo a metodologia alternativa aqui proposta não altera os resultados de ação inibitória dos fungos.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, pode-se concluir que o método alternativo se mostra uma ótima opção para se chegar aos extratos de forma rápida e econômica, podendo ser conciliada ainda com os outros métodos. Outrossim, conclui-se que os dois métodos testados nesta pesquisa, quando equiparados, são completamente diferentes em relação a custos, tempo e periculosidade dentro do laboratório.

Comparando os dois métodos é clara a diferença de custos, pois no método que usa meio líquido BD, é utilizada maior quantidade de produtos, enquanto no método alternativo a quantidade de meio para se chegar até o extrato é mínima, podendo ser reduzido a poucas placas de petri de meio.

Logo, pode se afirmar que esta via alternativa se mostra mais segura, pois algumas das substâncias utilizadas nesses métodos convencionais são na maioria das vezes perigosa para os pesquisadores, como é o exemplo do acetato de etila que é inflamável e se inalado causa irritação na respiração e caso entre em contato com a pele causa vermelhidão, coceira e dor (CRUZ 2003).

Comprovando assim que o método alternativo é mais rápido, econômico e seguro. Pois o tempo de execução foi menor, a quantidade de materiais usados foi reduzida e a utilização de compostos perigosos foi mínima.

BIBLIOGRAFIA

ALBERT, D. et al. Combining Desirable Traits for a Good Biocontrol Strategy against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Microorganisms*, v. 10, n. 6, p. 1189, 2022.

ANBARASAN, R. et al. Chlorpyrifos pesticide reduction in soybean using cold plasma and ozone treatments. *Lebensmittel-wissenschaft & technologie*, v. 159, p. 113-193, 2022.

BIAGIOLI, F., Coleine, C., Piano, E. *et al.* Diversidade microbiana e espécies proxy para impacto humano em cavernas cársticas italianas. v.13 n. 689 p. 1- 13. 2023. Disponível em; <https://www.nature.com/articles/s41598-022-26511-5#article-info> Acesso em 24 de mar de 2023.

BRAS, J. P. Med. Lab. Alexander Fleming e a descoberta da penicilina. **Nossa capa.** Rio de Janeiro, v. 45, n. 5, p. I, out. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442009000500001&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 20 de mar de 2023.

BRUNETTI, B. Microbiologia Clínica: meios de cultura mais utilizados na rotina, LINKED IN. 2020. Disponível em; <https://pt.linkedin.com/pulse/microbiologia-cl%C3%ADnica-meios-de-cultura-mais-na-rotina-bruno-brunetti> Acessado em; 09 de junho de 2023.

CALDERANI, F. A. et al. Compostos bioativos com propriedades antitumorais por fungos endofíticos. *Revista Uningá*, v. 25, n. 2, 2016.

CARNAÚBA, J.P.; Sobral, M.F.; Amorim, E.P. da R.; Silva, J.C.; Santos, V.B.; Félix, K.C. da S.; Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de *Scytalidium lignicola*. *Summa Phytopathologica*, v.33, n.2, p.199-200, 2007.

CALVO, P.; NELSON, L; KLOEPPER, J. W. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil*, v. 383, n. 1, p. 3-41, 2014.

CASTRO M. D. L.; GARCIA-AYUSO L. E. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*. v. 369, n. 1-2 p. 1-10; 1998.

CHIOTTA, M. L. et., al. Pathogenicity of *Fusarium graminearum* and *F. meridionale* on soybean pod blight and trichothecene accumulation. *Plant Pathology* v. 65 n. 9 p 1492-1497. 2016.

COSTA, J. H. et al. Potencial antifúngico de metabólitos secundários envolvidos na interação entre patógenos cítricos. *Relatórios científicos*, v. 9, n. 1, p.1-11, 2019.

COSTA, W. A. Extração e transesterificação do óleo de resíduo industrial de palmiste usando metanol supercrítico. Orientador: Raul Nunes de Carvalho Júnior. 2018. 136f. Tese (Doutorado em Engenharia de Recursos Naturais da Amazônia) - Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.

CRUZ, O. Revisão do acetato de etila e identificação do produto. v.1 p.1-3, 2003.

DEMAIN, A. L.; **ADRIO**, J. L. Contributions of microorganisms to industrial biology. *Mol Biotechnol*, v. 38, n. 1, p. 41-55, 2008.

DIMKIĆ, I. Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms - A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 117, p. 101754, 2022.

ESCOBAR. H. Fábricas de conhecimento: o que são, como funcionam e para que servem as universidades públicas de pesquisa. **Jornal da USP**, São Paulo, 5 abr. 2019, Ciências. Disponível em: <https://jornal.usp.br/ciencias/fabricas-de-conhecimento/> Acesso em: 29 mai. 2023.

ESCOBAR, N. et al. Spatially-explicit footprints of agricultural commodities: Mapping carbon emissions embodied in Brazil's soy exports. *Global Environmental Change*, v. 62, p. 102067, 2020.

FERREIRA BL, Beik JV, Alves SJZ, Henrique FA, Sauer E, Chornobai CA, et al.. EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM PARA DETERMINAÇÃO DE LIPÍDEOS EM ALIMENTOS: UM EXPERIMENTO DE LABORATÓRIO. *Quím Nova*. v. 43 n,9 p.5-1320. 2020.

GHOSH, S., Kuisiene, N., & Cheeptham, N. The cave microbiome as a source for drug discovery: Reality or pipe dream? In *Biochemical Pharmacology* v. 134, p. 18–34, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.018>> Acesso em 20 de Mar 2023.

GOMES, D.C. Sistemática para determinação do custo de operação de laboratório de pesquisa. p. 1-63. 2017.

GUPTA, G. K.; SHARMA, S. K.; RAMTEKE, R. Biologia, epidemiologia e manejo do fungo patogênico *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid com referência especial à podridão carvoeira da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) J. Phytopathol, v. 160, p. 167–180, 2012.

GUERRA, L. C. C.; CARVALHO, L. C. G. de., Moreira, L. M. Potencial biotecnológico de bactérias cultiváveis obtidas a partir da Gruta Martimiano II, Parque Estadual do Ibitipoca - MG. **Revista Brasileira e Espeleologia BEsp**, v. 1, n. 11, p. 62–86. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.37002/rbesp.v1i11.2318> Acesso em 24 de mar de 2023.

HARRIS, L. J. et al. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. J Food Protection, v. 52, p. 384-387, 1989.

JACOB, C. J. et al., A severe outbreak of black rot in cantaloupe melon caused by *Macrophomina phaseolina* in Chile. Plant Disease, v. 97, n. 1, p. 141–142, 2013.

KORN, M.; et al; Métodos de preparo de amostras para análise elementar, cap 6 Ultrassons para o preparo de amostras / 2. ed. rev. ampl. / editado por Francisco José Krug; Fábio Rodrigo Piovezani Rocha. São Paulo: Edit SBQ – Sociedade Brasileira de Química, v.2 p. 182-207 . 2019

LABORCHEMIKER, Laborchemiker Artigos para Laboratórios, Curitiba- PR, Disponível em; <https://www.laborchemiker.com.br/index.php> Acessado em; 12 de junho de 2023.

LATOUR, B. “Give Me a Laboratory and I will Raise the World”, In: K. Knorr-Cetina y M. Mulkay (eds.), *Science Observed: Perspectives on the Social Study of Science*. Londres. p. 141-170. 1979.

LIMA, O. D. R; et al. AÇÃO ANTIFÚNGICA *in vitro* DE ISOLADOS DE *Bacillu ssp.* SOBRE *Fusarium oxysporum f. sp.Lycopersic* Revista Caatinga, Mossoró, v. 27, n. 4, p. 57-64. 2014

LOJA NET LAB, Netlab equipamentos para laboratórios EIRELI, São Paulo-SP. Disponível em; <https://www.lojanetlab.com.br/> Acessado em; 12 de junho de 2023.

LUZ, L. P.; Estudo da ultra-som como técnica de extração de carvões naturais e a caracterização de hidrocarbonetos poliaromáticos. Rio Grande do Sul. p. 1- 108 1998.

MOHAMMADPOUR, H.; et al Optimization of ultrasound-assisted extraction of Moringa peregrina oil with response surface methodology and comparison with Soxhlet method. Industrial Crops and Products. v. 131, p. 106-116. maio de 2019

MAZOYER, M., & ROUDART, L. História das agriculturas no mundo: Do neolítico à crise contemporânea. Editora Unesp v.1 p 1-569, 2010.

MELECCHI, M. I. S.; Caracterização química de extratos de *Hibiscus tiliaceus* L: estudo comparativo de métodos de extração. Porto Alegre-RS p. 1-218. 2005

MELLO, P. A.; et al; Métodos de preparo de amostras para análise elementar, cap 6 Ultrassons para o preparo de amostras cap 13, Preparo de amostras para especiação química / 2. ed. rev. ampl. / editado por Francisco José Krug; Fábio Rodrigo Piovezani Rocha. São Paulo: Edit SBQ – Sociedade Brasileira de Química, v.2 p. 485-541 . 2019

MELO, F. M. P. Atividade antifúngica de metabólitos secundários produzidos pelo endófito de mandioca *Bacillus pumilus* MAIIM4a. 102 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.2005

MONNERAT, R. G. et al., Produção em grande escala de *Bacillus spp.* na instalação fabril da empresa Agrosalgueiro v. 1, p 1-11. 2023

NUNES, J. et al. A. Antibiose por Bactérias de Caverna Arenítica da Amazônia Oriental. In: I Congresso Paranaense de Microbiologia, 2014, Londrina-PR. Anais eletrônicos. Disponível em: <http://www.uel.br/eventos/cpm/pages/anais-doseventos.php> Acesso: em 06 de junho de 2023

O`BRIEM, J.; WRIGHT G. D. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. *Current Opinion in Biotechnology* v. 22 n.4, p. 552-558. 2011.

ÖZKAYA, F.C.; EBRAHIM, W.; EL-NEKETI, M.; TANSEL TANIKUL, T.; KALSCHEUER, R.; MULLER, W.E.G.; GUO, Z.; ZOU, K.; LIU, Z.; PROKSCH, P. Induction of new metabolites from sponge-associated fungus *Aspergillus carneus* by OSMAC approach. *Fitoterapia, Germany*, v. 131, p. 9-14, 2018.

PEREIRA, E. L.; MARTINS, B. A. Processos biotecnológicos na produção de bioinseticidas. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações*, v. 14, n. 2, p. 714-734, 2016.

ROSATI, R. G. et al., Pathogenicity and toxicity of *Fusarium tucumaniae* and *Fusarium crassistipitatum* for soybean and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Pathology*, v. 70, n. 2, p. 407-416, 2020.

SAHENA, F. et al Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review. *Journal of Food Engineering*. v. 95 n. 2, p. 240-253. novembro de 2009.

SANSINENEA, E. Applications and patents of *Bacillus* spp. in Agriculture. In: SINGH, H.; KESWANI, C.; SINGH, S. (Eds). *Intellectual property issues in microbiology*. Singapore: Springer, v 1, p 133-146, 2019.

SANTOS, T. T.; Varavallo, M. A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. v. 32, n. 2, p. 199-212, 2011

SILVA, A. F. C.. Pragas, patógenos e plantas na história dos sistemas agroecológicos. v 17, n 1, p 1-32 2022.

SINERGIA, C. O que é Meio de Cultura? Qual é sua função? Quais são os tipos de meios de cultura? 2018 Disponível em; <https://www.sinergiaceutifica.com.br/o-que-e-meio-de-cultura-qual-e-sua-funcao-quais-os-tipos-de-meios-de-cultura/> Acessado em; 07 de junho de 2023.

STUKENBROCK, E. H.; MCDONALD. B. A. The Origins of Plant Pathogens in Agro-Ecosystems Annual Review of Phytopathology. v 46, n 1, p 75-100, 2008

IBAP; CAMILA; Tipos de Meios de Cultura Empregados na Microbiologia Clínica | Cultura de Bactérias e Fungos. Disponível em; <https://ibapcursos.com.br/tipos-de-meios-de-cultura-empregados-na-microbiologia-clinica-bacterias-e-fungos/> Acessado em; 07 de junho de 2023

VANDERMOLEN, K. M. .; RAJA, H.A.; EL-ELIMAT, T.; OBERLIES, N.H. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. AMB Express, United States of America, v. 3, n. 1, p. 71, 2013.

WANG, L. WELLER, C. L.; Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Science & Technology. v. 17, n. 6, p 300-312, June 2006

WANG, Z, Bao LL, Zhao FY, Tang MQ, Chen T, Li Y, Wang BX, Fu B, Fang H, Li GY, Cao J, Ding LN, Zhu KM, Liu SY, Tan XL. *BnaMPK3* Is a Key Regulator of Defense Responses to the Devastating Plant Pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* in Oilseed Rape. Front Plant Sci. v.10 n. 91 p 1-18

WISESCHAR, A., & POOTANAKIT, K. Abordagem baseada em metagenômica para uma compreensão abrangente da diversidade microbiana das cavernas. Em *Avanços recentes na diversidade microbiana* (eds Bhatt, P., de Mandal, S.) 561–586 Academic Press, 2020.