UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE BIOMEDICINA

MARIA VICTÓRIA FERREIRA CRUZ

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO *Trichoderma asperelloides* CONTRA O FUNGOS *Aspergillus* sp.

GOIÂNIA
2024

UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio do Repositório Institucional (RI/UFG), regulamentado pela Resolução CEPEC no 1240/2014, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei no 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo dos Trabalhos de Conclusão dos Cursos de Graduação disponibilizado no RI/UFG é de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o(s) autor(a)(es)(as) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCCG)

Nome(s) completo(s) do(a)(s) autor(a)(es)(as): Maria Victória Ferreira Cruz

Título do trabalho: "Avaliação *in vitro* do potencial antifúngico do *Trichoderma asperelloides* contra o fungos Aspergillus sp."

2. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador) Concorda com a liberação total do documento [x] SIM [ ] NÃO[1]

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(à)(s) autor(a)(es)(as) e ao(à) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo do TCCG. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro.

Obs.: Este termo deve ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.

Documento assinado eletronicamente por **Raphaela De Castro Georg**, **Professora do Magistério Superior**, em 04/12/2024, às 10:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 .

Documento assinado eletronicamente por **Maria Victória Ferreira Cruz**, **Discente**, em 04/12/2024, às 15:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5008600** e o código CRC **F43CCE7B**.

MARIA VICTÓRIA FERREIRA CRUZ

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO *Trichoderma asperelloides* CONTRA O FUNGOS *Aspergillus* sp.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Biomedicina, da Universidade Federal de Goiás, como critério para obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

Prof.ª Dr.ª Raphaela de Castro Georg

GOIÂNIA

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Cruz, Maria Victória Ferreira
Avaliação in vitro do potencial antifúngico do Trichoderma asperelloides contra o fungos Aspergillus sp. [manuscrito] / Maria Victória Ferreira Cruz. - 2024.
28 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Raphaela de Castro Georg.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Biomedicina, Goiânia, 2024.
Bibliografia.
Inclui lista de figuras, lista de tabelas.

1. Trichoderma. 2. Aspergillus. 3. Antagonismo. I. Georg, Raphaela de Castro, orient. II. Título.

CDU 57

UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos vinte nove dias do mês de novembro de dois mil e vinte e quatro iniciou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado "Avaliação *in vitro* do potencial antifúngico do *Trichoderma asperelloides* contra o fungos Aspergillus sp." de autoria de Maria Victória Ferreira Cruz, do curso de Biomedicina, do Instituto de Ciências Biológicas da UFG. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Drª Raphaela de Castro Georg - Instituto de Ciências Biológicas/ UFG com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Dr. Cirano José Ulhoa - Instituto de Ciências Biológicas/ UFG e Drª Cristine dos Santos Settimi Cysneiros - Instituto de Ciências Biológicas/ UFG. Após a apresentação, a banca examinadora realizou a arguição do(a) estudante. Posteriormente, de forma reservada, a Banca Examinadora atribuiu a nota final de 10,0 (dez) , tendo sido o TCC considerado aprovado.

Proclamados os resultados, os trabalhos foram encerrados e, para constar, lavrou-se a presente ata que segue assinada pelos Membros da Banca Examinadora.

Documento assinado eletronicamente por **Cirano Jose Ulhoa**, **Professor do Magistério Superior**, em 29/11/2024, às 17:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Raphaela De Castro Georg**, **Professora do Magistério Superior**, em 29/11/2024, às 17:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **CRISTINE DOS SANTOS SETTIMI CYSNEIROS**, **Usuário Externo**, em 13/12/2024, às 13:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4998108** e o código CRC **DE82A48D**.

Dedico este trabalho a minha mãe Luceni Ferreira dos Santos e a minha avó Fátima Raimunda dos Santos pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a minha mãe, Luceni Ferreira dos Santos, por todo cuidado, apoio emocional, força, encorajamento e paciência ao longo da minha jornada acadêmica. Com certeza, todo o seu amor e sua abdicação ao longo de minha vida, me permitiu chegar onde estou hoje. Obrigada por tudo, você é a minha maior inspiração de vida, de pessoa e de profissional.

A minha família, em especial, a minha avó Fátima Raimunda dos Santos, minhas tias Rosilene Ferreira dos Santos, Rosimar Ferreira dos Santos e Lucilene Ferreira dos Santos por todo cuidado, apoio e por escutarem sobre as minhas vivências diárias da faculdade e do laboratório.

As minhas amigas Amanda Pessoa Silva, Amanda do Prado Lima, Beatriz Nunes Gouveia e Jade Nunes Wanderley por sempre acreditarem em mim, escutarem meus desabafos e por todo os momentos de diversão e alegrias, que com certeza foram essenciais para que eu me mantivesse firme na minha jornada acadêmica.

A minha colega do curso de Biomedicina Amanda Mota Lara, pelo apoio, pelas conversas, pela ajuda e conhecimentos compartilhados.

A toda equipe do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos (LBMic), em especial, aos meus colegas de laboratório que já passaram e aqueles que ainda se encontram no laboratório, Ivana Neres Diamantino, Danielle Santos Ribeiro, Angie Marcela Silva Samboni e Jomal Rodrigues Barbosa Filho por todo apoio emocional, pelo companheirismo, pelas conversas e, principalmente, por todos os ensinamentos e conhecimentos que com certeza foram essenciais para que eu me adaptasse ao ambiente laboratorial, a pesquisa e também para meu crescimento profissional.

A minha orientadora Prof.ª Drª Raphaela de Castro Georg por ter aceitado me orientar desde a iniciação científica, por acreditar no meu potencial dentro da pesquisa científica, pelos eventos de extensão que, com certeza, foram importantes para meu crescimento pessoal e profissional, e por todo conhecimento passado ao longo da minha presença no laboratório.

Aos membros titulares da banca avaliadora Prof. Dr. Cirano José Ulhoa e a Drª Cristine dos Santos Settimi Cysneiros por terem aceitado fazer parte da minha avaliação do TCC e disponibilizarem um tempo para estarem nesta etapa tão importante da minha vida. Fico honrada por tê-los como avaliadores.

A Coordenação do Curso de Biomedicina, ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (ICB/UFG) e a Universidade Federal de Goiás (UFG).

Por fim, agradeço a todos que, de alguma maneira, contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Obrigada!

“É preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser conhecer as borboletas.”

(O Pequeno Príncipe)

RESUMO

O gênero *Trichoderma* é composto por fungos cosmopolitas e ubíquos, na qual atuam na decomposição, micoparasitismo, auxilio no tratamento de doenças e no estímulo do crescimento em plantas e produzem enzimas que apresentam propriedades antifúngicas. O controle biológico é definido como o uso de organismos vivos, conhecidos como antagonistas, com o objetivo de reduzir a presença de outros organismos considerados patogênicos. O *Trichoderma* atua como biocontrole através do micoparasitismo, competição com os patógenos por espaço físico e nutrientes, produção de metabólitos com função antimicrobiana e produção de enzimas líticas. O gênero *Aspergillus* é composto por fungos cosmopolitas, ubíquos e saprofíticos. Atuam nos processos de decomposição, biorremediação e são usadas na indústria alimentícia e farmacêutica. Produzem micotoxinas, que são metabólitos secundários caracterizados por serem tóxicas ao ser humano e aos animais e estarem presentes no ambiente natural. Além disso, podem causar uma micose oportunista, de causa recorrente, chamada aspergilose, em que a forma de infecção é a inalação dos esporos. As manifestações clínicas são variadas. Este estudo apresentou como objetivo principal compreender o potencial antifúngico do fungo *Trichoderma asperelloides* contra o fungo *Aspergillus* sp. através de ensaios de antagonismo *in vitro*. Foram preparadas placas contendo meio BDA para a manutenção do fungo *Trichoderma asperelloides*. O isolamento do fungo *Aspergillus* sp. foi feito a partir de amostras de solo, que foram cultivadas em meio BDAT+. Os ensaios de antagonismo *in vitro* foram feitos em meio BDA com cloranfenicol, na qual, em uma placa de Petri 90x15 mm, um disco de 5 mm *Trichoderma* e um disco de 5 mm *Aspergillus* foram colocados no meio de cultura, com uma distância de 4 cm entre os dois discos, e uma distância de 2,5 cm entre as bordas da placa. Primeiramente, foi inoculado o *Trichoderma* e, após 12h, o fungo *Aspergillus* foi acrescentado a placa. As amostras foram levadas a incubadora, à 27°C $\pm$ 1°C, na qual foram observadas e analisadas durante 6 dias não consecutivos. A porcentagem de inibição de crescimento micelial do *Aspergillus* sp. foi calculado seguindo a fórmula de Edgington (1971). Os resultados mostraram que, nos ensaios de antagonismo, o *Trichoderma asperelloides* conseguiu inibir o crescimento do *Aspergillus* sp., apresentando um maior crescimento micelial ao longo dos dias quando comparado com o patógeno. Também foi observado que as porcentagens de inibição de crescimento micelial do *Aspergillus* sp. aumentaram ao longo dos dias, apresentando um valor médio de 57%. Conclui-se que o biocontrole *Trichoderma asperelloides* atuou como antagonista, quando confrontado com o *Aspergillus* sp.

Palavras-chave: *Trichoderma*; *Aspergillus*; antagonismo.

ABSTRACT

The *Trichoderma* genus is composed of cosmopolitan and ubiquitous fungi that act in decomposition, mycoparasitism, aid in the treatment of diseases and in stimulating growth in plants, and produce enzymes that have antifungal properties. Biological control is defined as the use of living organisms, known as antagonists, with the aim of reducing the presence of other organisms considered pathogenic. *Trichoderma* acts as biocontrol through mycoparasitism, competition with pathogens for physical space and nutrients, production of metabolites with antimicrobial function and production of lytic enzymes. The *Aspergillus* genus is composed of cosmopolitan, ubiquitous and saprophytic fungi. They act in the processes of decomposition, bioremediation and are used in the food and pharmaceutical industries. They produce mycotoxins, which are secondary metabolites characterized by being toxic to humans and animals and being present in the natural environment. In addition, they can cause an opportunistic mycosis of recurrent cause, called aspergillosis, in which the form of infection is the inhalation of spores. The clinical manifestations are varied. The main objective of this study was to understand the antifungal potential of the fungus *Trichoderma asperelloides* against the fungus *Aspergillus* sp. through *in vitro* antagonism assays. Plates containing PDA medium were prepared for the maintenance of the fungus *Trichoderma asperelloides*. The fungus *Aspergillus* sp. was isolated from soil samples, which were cultivated in PDA médium + Tween 80 + chloramphenicol. The in vitro antagonism assays were performed in PDA medium with chloramphenicol, in which, in a 90 x 15 mm Petri dish, a 5 mm *Trichoderma* disk and a 5 mm *Aspergillus* disk were placed in the culture medium, with a distance of 4 cm between the two disks, and a distance of 2.5 cm between the edges of the plate. First, *Trichoderma* was inoculated and, after 12 hours, the fungus *Aspergillus* was added to the plate. The samples were placed in an incubator at 27°C ± 1°C, where they were observed and analyzed for 6 non-consecutive days. The percentage of inhibition of mycelial growth of *Aspergillus* was calculated according to the formula of Edgington (1971). The results showed that, in the antagonism tests, *Trichoderma asperelloides* was able to inhibit the growth of *Aspergillus* sp., presenting a greater mycelial growth over the days when compared to the pathogen. It was also observed that the percentages of inhibition of mycelial growth of *Aspergillus* sp. increased over the days, presenting an average value of 57%. It is concluded that the biocontrol *Trichoderma asperelloides* acted as an antagonist when confronted with *Aspergillus* sp.

Keywords: *Trichoderma*; *Aspergillus*; antagonism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Macroscopia do *Trichoderma asperelloides*.....16
Figura 02 - Macroscopia e microscopia de espécies do gênero *Aspergillus*. A = *Aspergillus flavus*, B = *Aspergillus niger*, C = *Aspergillus fumigatus*, D = *Aspergillus terreus*.....22
Figura 03 - Controles de *Trichoderma asperelloides* durante cinco dias.....29
Figura 04 - Controles de *Aspergillus* sp. durante cinco dias.....30
Figura 05 - Ensaios de antagonismo *in vitro* entre *Trichoderma asperelloides* e *Aspergillus* sp.....31
Figura 06 - Diâmetro das colônias de crescimento ao longo de cinco dias.....33
Figura 07 - Porcentagem de inibição durante seis dias não consecutivos.....35

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Fases dos ensaios de antagonismo *in vitro*.....28
Tabela 02 - Diâmetros das colônias dos controles de *Trichoderma asperelloides*.....29
Tabela 03 - Diâmetros das colônias dos controles de *Aspergillus* sp.....30
Tabela 04 - Diâmetros das colônias dos tratamentos de *Trichoderma asperelloides*.....31
Tabela 05 - Diâmetros das colônias dos tratamentos de *Aspergillus* sp.....32
Tabela 06 - Média dos diâmetros das colônias dos controles e tratamentos de *Trichoderma asperelloides* e *Aspergillus* sp.....32
Tabela 07 - Porcentagem de inibição de crescimento micelial do *Aspergillus* sp.....34
Tabela 08 - Média, erro padrão da média e desvio padrão da porcentagem de inibição de crescimento micelial do *Aspergillus* sp.....34

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	**15**
1.1	***Trichoderma* spp**	**15**
1.2	***Aspergillus* spp**	**20**
2	**JUSTIFICATIVA**	**24**
3	**OBJETIVOS**	**25**
3.1	**Geral**	**25**
3.2	**Específicos**	**25**
4	**METODOLOGIA**	**26**
4.1	**Manutenção do fungo *Trichoderma asperelloides***	**26**
4.2	**Isolamento e manutenção do fungo *Aspergillus* sp**	**26**
4.3	**Antagonismo em placa entre *Trichoderma* e *Aspergillus***	**26**
4.4	**Análise estatística**	**28**
5	**RESULTADOS E DISCUSSÃO**	**29**
6	**CONCLUSÃO**	**38**
	REFERÊNCIAS	**39**

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Trichoderma* spp.

Os fungos do gênero *Trichoderma* possuem a seguinte classificação taxonômica: pertencem ao Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem Hypocreales e Família Hypocreaceae (SALES *et al.*, 2020). São organismos cosmopolitas e ubíquos, na qual são localizados em solos variados e tipicamente ácidos de regiões de clima temperado e tropical, em matéria orgânica em decomposição e na região da rizosfera. São capazes de sobreviver em condições adversas, como solos salinos e alcalinos, em locais de temperaturas extremas e com pouca umidade (SCHUSTER; SCHMOLL, 2010; MEYER *et al.*, 2019).

As ações desempenhadas pelo *Trichoderma* são de grande importância ambiental e biotecnológica, na qual atuam no processo de decomposição e micoparasitismo, podem auxiliar no tratamento de doenças em plantas, além de estimular seu crescimento e produzem enzimas que apresentam propriedades antifúngicas (HARMAN, 2006; SALES *et al.*, 2020; SAITO *et al.*, 2009).

O *Trichoderma* também apresenta um importante papel na biorremediação, na qual é utilizado para modificar, degradar ou remover contaminantes tóxicos presentes no solo em componentes inertes ou não tóxicos (SOARES *et al.*, 2011). Segundo Colla *et al.* (2008), os fungos do gênero *Trichoderma* conseguiram crescer em solos contendo os herbicidas atrazine e zimarine, mostrando que os mesmos poderiam ser utilizados em pesquisas sobre biorremediação. Outros estudos demonstram que o *Trichoderma* contribui para a remoção de agrotóxicos como metalaxil e herbicidas triazínicos do meio agrícola (LUCON; CHAVES; BACILIERI, 2014).

O *Trichoderma* é comumente utilizado para produção de enzimas hidrolíticas comerciais, como celulases, glucanases, xilanases e glucosidases, usadas nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e têxteis. Dentre as espécies utilizadas estão o *Trichoderma reesei*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma viride* (FRANCISCO, 2016).

Em relação a morfologia e ao crescimento do *Trichoderma*, esse gênero apresenta um rápido crescimento, apresentando micélio composto por hifas septadas, conidióforos ramificados e conídios esverdeados. Microscopicamente, o *Trichoderma* possui conidióforos com diferentes padrões de ramificação, fiálides dispostas ao longo do conidióforo e conídios presentes em torno das fiálides. Além disso, podem apresentar clamidósporos, que são estruturas que permitem o *Trichoderma* sobreviver em condições adversas. Em meio de cultura, inicialmente, a colônia é incolor com aspecto flocoso, cotonoso ou liso. À medida que os

conídios são produzidos, a colônia adquire uma coloração que varia do verde ao amarelo (SCHUSTER; SCHMOLL, 2010; SALES *et al.*, 2020; SAITO *et al.*, 2009; MEYER *et al.*, 2019).

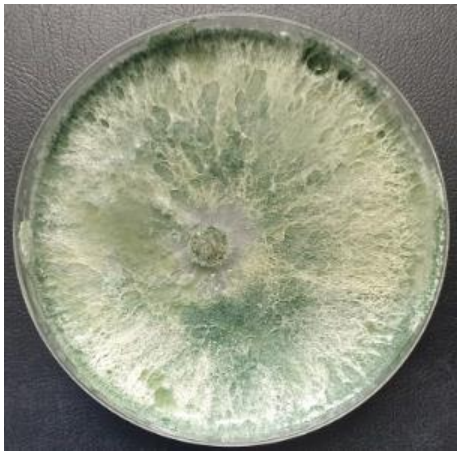

Figura 01: Macroscopia do *Trichoderma asperelloides*
Fonte: Acervo do autor (2024)

A espécie *Trichoderma asperelloides*, considerada uma espécie irmã de *Trichoderma asperellum*, é um fungo encontrado nos solos, apresenta distribuição cosmopolita e uma morfologia, que consiste em hifas septadas esbranquiçadas com conídios verdes. Como em outras espécies de *Trichoderma*, essa também atua como um micoparasita, sendo usada para controle biológico de fungos patogênicos em plantas (SAMUELS *et al.*, 2010).

A análise molecular do *Trichoderma* contribui para identificar espécies e estabelecer as relações filogenéticas dentro deste gênero. As regiões ITS 1 e ITS 2, presente entre os genes que codificam para as subunidades 18S e 28S do RNA ribossômico, foram os primeiros marcadores moleculares utilizados em estudos filogenéticos. No entanto, por serem sequências altamente conservadas, foram necessários aplicar outros marcadores moleculares para ajudar a identificar filogeneticamente as espécies de *Trichoderma*. Dentre esses marcadores, estão os genes alfa-actina (*act*), a calmodulina (*cal*), endoquitinase CHI18-5 (*chi18-5*), fator de elongação 1-alfa (*tef1*) e segunda maior subunidade da RNA polimerase II (*rpb2*). Para a identificação molecular do gênero *Trichoderma*, geralmente são usados os genes *tef1* e *rpb2* (MEYER *et al.*, 2019).

O controle biológico é definido como o uso de organismos vivos, conhecidos como antagonistas, com o objetivo de reduzir a presença de outros organismos considerados patogênicos. Esse conceito é amplamente utilizado no contexto de doenças que acometem plantas (FERREIRA; MUSUMECI, 2021). Dentre as vantagens do uso de biocontroles, estão a redução do uso e da exposição aos agrotóxicos, possui uma baixa probabilidade de

contaminarem o meio ambiente, não causam resistência nos patógenos e protegem as plantas contra as doenças por mais tempo (LUCON; CHAVES; BACILIERI, 2014).

Em relação ao papel do *Trichoderma* no biocontrole, o mesmo ganhou importância no contexto do aumento do uso de fungicidas em plantações, a resistência adquirida pelos fitopatógenos, além da preocupação com a saúde humana e ambiental (SILVA; MELLO, 2007). O primeiro trabalho publicado acerca do assunto foi em 1950, por Reinaldo Foster, em que o *Trichoderma* foi utilizado para inativar o vírus do mosaico comum em fumo, na qual o mesmo conseguiu inibir o patógeno em até 90% (BETTIOL; MORANDI, 2009; FORSTER, 1950). Já em 1987, o primeiro biocontrole comercial foi o *Trichoderma viride*, usado para combater *Phythophthora cactorum* em plantas macieiras (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Dentre as espécies mais estudadas e utilizadas como biocontrole estão o *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma virens* e *Trichoderma stromaticum* (BETTIOL; MORANDI, 2009; MEYER *et al.*, 2019).

Esses fungos podem desempenhar papéis de biocontrole através do micoparasitismo, competição com os patógenos por espaço físico e nutrientes, produção de metabólitos com função antimicrobiana e produção de enzimas líticas. A produção de enzimas é a principal atividade exercida pelo *Trichoderma* no controle de fitopatógenos (SILVA; MELLO, 2007; FERREIRA; MUSUMECI, 2021).

Além disso, o *Trichoderma* pode induzir nas plantas a chamada resistência sistêmica induzida (ISR), em que o mesmo libera substâncias elicitoras ou indutoras que são capazes de ativar os mecanismos de defesa em plantas. Este fungo é capaz de regular a expressão de genes envolvidos nas vias de sinalização de defesa contra patógenos, aumentando, assim, a proteção de plantas contra doenças. Na maioria dos casos, a ativação do sistema de defesa da planta pelo *Trichoderma* é independente de ácido salicílico, sendo reguladas pelo ácido jasmônico e etileno (MEYER *et al.*, 2019; SANTOS, 2022).

O micoparasitismo do *Trichoderma* é descrito como uma ação, em que este fungo cresce em direção do patógeno até encontra-lo e liberar enzimas líticas. Essas enzimas, como as quitinases, glucanases e proteases, impedem o crescimento e o desempenho das funções vitais do patógeno, levando-o a morte. Já a competição do *Trichoderma* com outros patógenos, o mesmo compete por espaço e nutrientes, buscando fontes nutricionais à base de carbono e nitrogênio. Devido ao seu rápido crescimento, o *Trichoderma* consegue combater facilmente os patógenos presentes no meio. Já a antibiose desempenhada pelo *Trichoderma* é caracterizada pela produção de metabólitos secundários com função antimicrobiana. Esses metabólitos são

produtos derivados do próprio metabolismo fúngico, que não contribuem para o crescimento, mas contribuem para facilitar a colonização de ambientes. Ao serem liberados no espaço contendo patógenos, impedem o crescimento e a reprodução dos mesmos. As principais classes de metabólitos secundários do *Trichoderma* são os peptídeos não ribossômicos (peptaibols), poliquetídeos, terpenos e pironas (LUCON; CHAVES; BACILIERI, 2014; SILVA; MELLO, 2007; MEYER *et al.*, 2019).

Os metabólitos secundários podem ser produzidos a partir de modificações ocorridas em um metabólito primário como acetil coenzima A, aminoácidos e o mevalonato, como de produtos derivados dos complexos enzimáticos das sintetases não ribossomais (peptaibols). Além disso, podem ser divididos em metabólitos voláteis e não voláteis. A classe dos poliquetídeos apresentam metabólitos com propriedades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitárias e antitumorais, podendo ser objetos de estudos nas áreas agrícola e farmacológica. Alguns exemplos de poliquetídeos são as trichoharzinas, trichodimerols, trichodermatideos, koningininas, antroquinonas e benzoquinonas. A classe das pironas possuem metabólitos com propriedades antibióticas e antifúngicas. São substâncias consideradas citotóxicas, neurotóxicas e fitotóxicas. Um exemplo de metabólito secundário pertencente a classe das pironas é a 6-pentil-α-pirona (6-PP), na qual foi o primeiro metabólito com propriedade antifúngica estudada. A classe dos terpenos e terpenóides apresentam metabólitos com propriedades antimicrobianas, antitumorais e participam dos processos de defesa das plantas. Alguns exemplos de terpenos e terpenóides são os ácidos trichodérmicos, harzianona, trichoacorenol, harziandiona, lanostadiol, ergosterol, pirocalciferol, viridiol, viridina, farnesyl, geranil-geranil difosfato e esqualeno. A classe dos peptaibols são benéficas as plantas e possuem atividade antimicrobiana. Alguns exemplos de peptaibols são a alameticina, trichorzinas, asperelinas e trichotoxinas. A classe das dicetopiperazinas apresentam atividade antimicrobiana e exemplos de metabólitos pertencentes a essa classe são as gliotoxinas e gliovirinas (RAMADA; LOPES; ULHOA, 2019).

As ações de antagonismo do *Trichoderma asperelloides* sobre o *Aspergillus* sp. incluem o micoparasitismo, a antibiose e competição. O micoparasitismo é caracterizado pelo quimiotropismo positivo, em que as hifas do biocontrole crescem em direção ao patógeno, enrolando e liberando enzimas líticas, como glucanases, quitinases e celulases, que destrói a parede celular do patógeno. Há quatro fases no micoparasitismo: quimiotropismo positivo, reconhecimento, adesão e ondulação. A antibiose é caracterizada pela produção de metabólitos secundários com propriedades antibióticas pelo *Trichoderma*, que levam a inibição de crescimento micelial do patógeno. A classe de metabólitos secundários que conseguem inibir

de forma eficaz fungos do gênero *Aspergillus* são os terpenos e terpenóides, na qual são hidrocarbonetos naturais. Alguns exemplos de metabólitos secundários que combatem o patógeno *Aspergillus* são o viridiol e a viridina. Ambos os metabólitos possuem atividade antimicrobiana e a viridina pode sofrer redução, levando a formação do viridiol. O viridiol é menos eficiente no combate a fitopatógenos, mas é considerado uma fitotoxina. As antroquinonas, como, por exemplo, o chrysophanol, apresentou atividade antifúngica contra o *Aspergillus fumigatus*. A competição é caracterizada pela disputa entre o biocontrole e o patógeno por recursos no ambiente, como nutrientes, espaço, luz, entre outros. O *Trichoderma*, por ser um fungo ubíquo, ele é considerado um grande competidor por espaço e nutrientes (MEYER *et al.*, 2019; SANTOS, 2022; PAKORA *et al.*, 2021).

O fungo *Trichoderma* possui sucesso como biocontrole devido a algumas características, como: alta atividade reprodutiva, habilidade de sobreviver em condições ambientais desfavoráveis, utilizam os nutrientes com eficiência, podem modificar a rizosfera, são altamente agressivos contra fitopatógenos e fornecem maior capacidade de crescimento e defesa para as plantas (BENÍTEZ *et al*., 2004).

O estudo de Valenzuela *et al.* (2015) mostrou que as espécies *Trichoderma asperellum* e o *Trichoderma viride*, através do mecanismo de micoparasitismo, conseguiram combater o fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* com uma eficácia de 77,40%, em *Carica papaya* (mamão ou papaia) acometidas por antracnose. Segundo Cariño *et al.* (2020), o fungo *Trichoderma asperelloides* conseguiu combater os fitopatógenos *Alternaria alternata* e *Fusarium oxysporum*, com 76,9% e 66,7% de eficácia, respectivamente. Os mecanismos utilizados pelo biocontrole foram competição por espaço e nutrientes com *Alternaria alternata* e micoparasitsimo com *Fusarium oxysporum*. Ambos os patógenos foram coletados de tomateiros.

O *Trichoderma* pode, ainda, ser usado para produção de bioinsumos, para fins de aumentar o crescimento, desenvolvimento e produtividade de plantas, realizar a fixação de nitrogênio para uma melhor assimilação desse nutriente pelas plantas, combater patógenos, induzir mecanismos de resistência e defesa das plantas contra estresses bióticos e abióticos e ajudar no combate de efeitos adversos causados pelo estresse salino. Dentre as espécies mais utilizadas como bioinsumos estão o *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma atroviride* e *Trichoderma asperellum* (MEYER *et al.*, 2019).

O gênero *Trichoderma* é composto por fungos que, em sua maioria, não são patogênicos aos seres humanos. No entanto, em pacientes imunossuprimidos, neutropênicos, com doenças hematológicas malignas (como leucemias e linfomas), transplantados, submetidos a

tratamentos com corticoides e quimioterapia e que necessitam de diálise peritoneal contínua, eles podem causar hialo-hifomicose, levando a quadros de micoses pulmonares invasivas, infecções no sistema nervoso central, peritonite e endocardite. Dentre as espécies de *Trichoderma*, a mais comum de provocar essas enfermidades é o *Trichoderma longibrachiatum*, seguido de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma pseudokoningii*, *Trichoderma bissettii* e *Trichoderma citrinoviride* (SAL *et al.*, 2022). Segundo Alanio *et al.* (2008), foi relatado um caso de infecção pulmonar invasiva por *Trichoderma longibrachiatum* em um paciente do sexo masculino, de 16 anos, com leucemia linfoblástica aguda de células B. Neste caso clínico, mostra como o *Trichoderma longibrachiatum* conseguiu mimetizar a aspergilose pulmonar invasiva, causada por espécies do gênero *Aspergillus*. Segundo Chouaki *et al.* (2002), foram relatados outros dois casos de infecção por *Trichoderma longibrachiatum* em uma paciente de 63 anos submetida a um transplante de fígado com uso de imunossupressores e um paciente de 11 anos com fibrose cística que foi submetido a um transplante de pulmão.

Sobre a utilização do *Trichoderma* na produção de medicamentos, ainda estão sendo desenvolvidos estudos acerca do potencial farmacológico que os metabólitos secundários produzidos por esse fungo podem apresentar. Um estudo de Saravanakumar *et al.* (2019) mostrou que os metabólitos 1,3-diona-5,5-dimetilciclohexano, 2-enona-3-hidroxi-5,5-dimetilciclohexano e 4H-1,3-dioxina-4-ona-2,3,6-trimetil, produzidos pelo *Trichoderma atroviride*, apresentaram atividades anticancerígenas contra células tumorais presentes no câncer de próstata, além de propriedades antibacterianas, inibindo o crescimento da *Helicobacter pylori* e *Escherichia coli* produtora da toxina Shiga.

1.2 *Aspergillus* spp.

Os fungos do gênero *Aspergillus* estão presentes no filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Eurotiales e família Aspergillaceae (BATISTA *et al.*, 2019). São organismos cosmopolitas, ubíquos e saprofíticos, sendo encontrados em diversos ambientes, como ar, solo, vegetações e em matéria orgânica em decomposição. Além disso, os esporos desses fungos podem estar amplamente distribuídos em ambientes hospitalares. Os fungos deste gênero são tolerantes a mudanças de temperatura e umidade, sendo encontrados em todas as estações do ano. Devido a essa característica, o *Aspergillus* apresenta um papel biotecnológico importante, sendo usados na indústria alimentícia e na produção de alguns medicamentos, como o hipocolesterolemiante Lovastatina. (BATISTA *et al.*, 2019; CARVALHO, 2013; OLIBONI, 2022).

Dentre os papéis que os fungos do gênero *Aspergillus* desempenham no meio ambiente estão a reciclagem de nutrientes (como o nitrogênio, por exemplo) através da decomposição da matéria orgânica, como a biorremediação, degradando, modificando ou removendo substâncias tóxicas e metais pesado presentes no solo (CORBU *et al.*, 2023).

O *Aspergillus* pode produzir micotoxinas, que são metabólitos secundários, produzidos a partir de reações bioquímicas subsequentes no metabolismo primário de aminoácidos, acetatos e de compostos participantes da via metabólica dos ácidos graxos. Essas substâncias são caracterizadas por serem tóxicas ao ser humano e aos animais, por estarem presentes no ambiente natural, causarem toxicidade aguda ou crônica e serem produzidas por fungos. Ao entrarem em contato com o organismo vivo, podem provocar diversas patologias, devido a serem teratogênicas, mutagênicas, carcinogênicas, alergênicas, hepatotóxicas, nefrotóxicas, neurotóxicas e afetarem o funcionamento correto do sistema imune. Dentre as micotoxinas mais conhecidas do fungo *Aspergillus*, estão as aflatoxinas, citrinina, patulina, ocratoxina A, esterigmatocistina e ácido penicílico. Algumas micotoxicoses humanas estão o hepatocarcinoma, Síndrome de Reye, Nefropatia dos Balkans e câncer urotelial superior. Já algumas micotoxicoses em animais, estão a aflatoxicose, nefrotoxicose e Síndrome de Tremorgenataxia (MOUSAVI *et al.*, 2016; LOPES, 2011; FREIRE *et al.*, 2007; CARVALHO, 1995).

Em relação a morfologia, o *Aspergillus* é um fungo filamentoso com hifas septadas. Na região terminal do conidióforo, há uma vesícula, de formato variado, podendo ser esférica, alongada ou elíptica. Fixadas a esta vesícula, estão as fiálides ou células conidiogênicas, que formam acimas delas, cadeias de conídios ou esporos. O conjunto da vesícula, fiálides e conídios forma a chamada “cabeça aspergilar”, que é sustentada pelo conidióforo. A base do conidióforo é a célula basal ou célula pé (MURRAY *et al.*, 2009; CARVALHO, 2013).

Quanto as colônias, elas podem apresentar um aspecto algodonoso ou pulverulento. Já em relação a cor, inicialmente, as colônias possuem cor branca, em que, à medida que ocorre o crescimento, essas colônias podem assumir as cores amarelo, verde, castanho ou preto, que variam de acordo com a espécie (MURRAY *et al.*, 2009; CARVALHO, 2013).

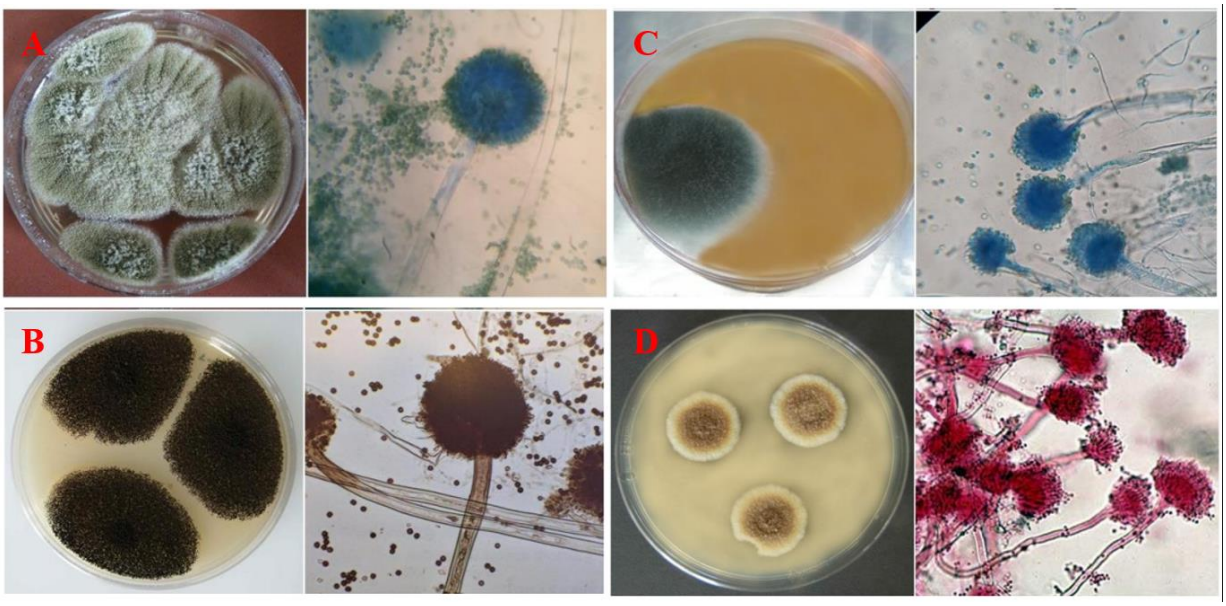

Figura 02: Macroscopia e microscopia de espécies do gênero *Aspergillus*. A = *Aspergillus flavus*, B = *Aspergillus niger*, C = *Aspergillus fumigatus*, D = *Aspergillus terreus*
Fonte: Abbas, Khudor e Alkhursan (2021)

Os fungos do gênero *Aspergillus* podem causar uma micose oportunista, de causa recorrente, chamada aspergilose, em que a forma de infecção é a inalação dos esporos. A principal espécie causadora da aspergilose é o *Aspergillus fumigatus*, mas outras espécies podem causar esta doença como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus*. Devido a porta de entrada desses fungos serem a via respiratória, as principais manifestações clínicas estão relacionadas aos órgãos desse sistema (MURRAY *et al.*, 2009; CARVALHO, 2013; OLIBONI, 2022).

O grau de periculosidade da aspergilose depende do sistema imune do hospedeiro, da virulência da cepa do fungo, a quantidade de conídios inalados e o local de infecção. Devido a porta de entrada desses fungos serem a via inalatória, o sistema respiratório, na maioria dos casos, é o mais acometido. As manifestações podem ir de doenças respiratórias locais, como alergias, até infecções invasivas nos pulmões e disseminação para outros órgãos. Em pessoas imunocompetentes, os conídios de *Aspergillus* são eliminados pelo sistema imune através da ação de neutrófilos e macrófagos. No entanto, pessoas imunossuprimidas devido ao uso de corticoides, transplantadas (órgãos sólidos ou medula óssea), com doenças pulmonares prévias, acometidas pelo HIV e que estejam em tratamento contra o câncer estão mais susceptíveis as formas invasivas e graves da aspergilose (MURRAY *et al.*, 2009; CARVALHO, 2013; OLIBONI, 2022; PAULUSSEN *et al.*, 2017).

As manifestações clínicas da aspergilose são: aspergiloma, aspergilose pulmonar invasiva, osteomielite, aspergilose brônquica, aspergilose alérgica (aspergilose broncopulmonar alérgica e alveolite alérgica), aspergilose cutânea, otomicose, aspergilose

sinusal, micotoxicoses, endocardite, aspergilose cerebral, ceratite, endoftalmite, onicomicose, aneurismas, infecções em dispositivos e acometimento de rins, fígado, baço e trato gastrointestinal (MURRAY *et al.*, 2009; CARVALHO, 2013; OLIBONI, 2022; AMORIM *et al.*, 2004).

As manifestações pulmonares invasivas e as formas disseminadas da aspergilose ocorrem em pessoas com neutropenia significativa e imunossuprimidos. Essa infecção nesses pacientes é grave e potencialmente letal. Já as formas alérgicas da aspergilose ocorrem em resposta a inalação dos conídios e são mediadas pelo anticorpo IgE. Elas acometem principalmente indivíduos com problemas respiratórios subjacentes, como asma, bronquite crônica e fibrose cística (MURRAY *et al.*, 2009; CARVALHO, 2013).

Nos últimos tempos, há um aumento de pessoas imunocomprometidas devido ao envelhecimento da população, aumento da poluição, alcoolismo, obesidade, sedentarismo, diabetes, higiene pessoal inadequada, doenças infectocontagiosas, transplantes e terapias para o tratamento contra o câncer. Consequentemente, isso leva a um aumento de pessoas susceptíveis a doenças oportunistas. A aspergilose é considerada uma das patologias fúngicas oportunistas mais frequentes ao redor do mundo, e, com isso, há maior uso de antifúngicos. No entanto, um dos problemas da atualidade é lidar com a resistência antimicrobiana. Vários fungos, incluindo o *Aspergillus*, já apresentam resistência a medicamentos utilizados no tratamento de micoses, devido ao uso inadequado e excessivo na saúde humana, animal e ambiental (MURRAY *et al.*, 2009; OLIBONI, 2022; PAULUSSEN *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2020). Desenvolver novos estudos sobre formas alternativas de medidas terapêuticas mais modernas podem contribuir para aumentar as opções de tratamento contra as micoses.

2 JUSTIFICATIVA

O fungo *Trichoderma* é amplamente conhecido por sua atividade de micoparasitismo contra fitopatógenos, que são conhecidos por causarem doenças em plantas. No entanto, ainda há poucos dados na literatura sobre seu potencial antagônico contra fungos patogênicos humanos.

No contexto atual, os microrganismos como, por exemplo, os fungos, estão adquirindo crescente resistência a antimicrobianos, devido ao uso indiscriminado desses produtos na agricultura e no tratamento de micoses. Isso torna uma grande preocupação à saúde pública, por reduzir o número de tratamentos eficazes e dificultar o controle dessas doenças infecciosas. Portanto, torna-se essencial desenvolver novos estudos que forneçam informações cruciais acerca dos mecanismos de ação e das substâncias com potencial farmacológico, a fim de estabelecer novas medidas terapêuticas no futuro.

Sendo assim, compreender a capacidade que o *Trichoderma* tem de inibir o crescimento no fungo *Aspergillus* sp., pode ser o ponto de partida para oferecer conhecimentos básicos e primordiais para as áreas como bioquímica, microbiologia, biologia molecular e farmacologia. Esses estudos irão contribuir para que, no futuro, haja o desenvolvimento de medicamentos antifúngicos mais inovadores e eficazes no tratamento de micoses.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Compreender o potencial antifúngico do fungo *Trichoderma asperelloides* contra o fungo *Aspergillus* sp.

3.2 Específicos

- Realizar ensaios de antagonismo em placa entre *Trichoderma asperelloides* e *Aspergillus* sp.
- Avaliar a porcentagem de inibição de crescimento micelial do *Aspergillus* sp.

4 METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos (LBMic), localizado no Instituto de Ciências Biológicas 2 (IBC 2) da Universidade Federal de Goiás (UFG). A execução dos experimentos ocorreram durante os meses de setembro a novembro do ano de 2024.

4.1 Manutenção do fungo *Trichoderma asperelloides*

O isolado de *Trichoderma asperelloides* (TR-356) pertence à coleção do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos (LBMic), da Universidade Federal de Goiás (UFG). O *Trichoderma asperelloides* foi mantido em meio BDA (batata 20%; glicose 2%; ágar 2%) com repiques periódicos. Sua preservação seguiu o método de Castellani (1939).

4.2 Isolamento e manutenção do fungo *Aspergillus* sp.

Para o isolamento do fungo *Aspergillus* sp., foi necessário coletá-lo a partir de amostra de solo. Para o cultivo de fungos em amostras de solos, os mesmos foram coletados de solos do cerrado, na região sudeste da cidade de Goiânia/GO (Brasil). Essas amostras foram mantidas em meio BDAT+, tratado com Triton x-100 e o antibiótico cloranfenicol (200 $mg.L^{-1}$). A solução de extração foi preparada com NaCl 0,9%, Tween 0,1% e água destilada.

Para semear a amostra de solo no meio BDAT+, foram pesados 5 gramas de solo e o volume final de 25 mL foi completado com solução de extração em um tubo falcon. Com isso, a amostra de solo encontrou-se em uma diluição de 5x. No entanto, foi feita uma diluição seriada, em que, foram colocados 100 µL de amostra de solo com 900 µL de solução de extração em um tubo eppendorf. Assim, a amostra ficou diluída 10x (1/10). Após a diluição, foram colocados 100 µL da amostra de solo diluída no centro da placa de Petri e, com o auxílio da Alça de Digralsky, a amostra foi distribuída uniformemente por toda a placa. No fim, a placa foi levada para a estufa de germinação de microrganismos (Eletrolab), à, aproximadamente, 28°C, por 5 dias.

Após o crescimento do *Aspergillus*, a colônia foi transferida para uma placa de Petri 90x15 mm, contendo meio BDAT+. Foram realizados repiques periódicos para a manutenção do fungo.

4.3 Antagonismo em placa entre *Trichoderma* e *Aspergillus*

Para a realização dos ensaios de antagonismo entre *Trichoderma asperelloides* e *Aspergillus* sp., as placas foram feitas em meio BDA com cloranfenicol. Foram preparadas três

réplicas biológicas de *Trichoderma asperelloides*, três réplicas biológicas de *Aspergillus* sp. e três réplicas biológicas do antagonismo em placa entre *Trichoderma* e *Aspergillus*.

Na placa de Petri 90x15 mm, um disco de 5 mm de *Trichoderma asperelloides* e um disco de 5 mm de *Aspergillus* sp. foram colocados no meio de cultura, com uma distância de 4 cm entre os dois discos, e uma distância de 2,5 cm entre as bordas da placa. Primeiramente, foi inoculado o *Trichoderma asperelloides* e, após 12h, o fungo *Aspergillus* foi acrescentado a placa. As amostras foram levadas a incubadora, à 27°C $\pm$ 1°C, na qual foram observadas e analisadas durante 6 dias não consecutivos. A cada dia, as placas foram fotografadas e as colônias foram medidas com o auxílio do software ImageJ.

A porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do *Aspergillus* sp. foi calculada por meio da fórmula de Edgington (1971). Os cálculos foram feitos a partir dos valores dos diâmetros das colônias de *Aspergillus* sp., tanto dos controles, que corresponde ao crescimento isolado do *Aspergillus* sp. na placa, como dos tratamentos, que corresponde ao crescimento do *Aspergillus* sp. na presença do *Trichoderma asperelloides*. A PIC foi calculada para as três réplicas biológicas de *Aspergillus* sp., durante seis dias não consecutivos.

$$\text{PIC} = \frac{\text{Crescimento do controle} - \text{Crescimento do tratamento}}{\text{Crescimento do controle}} \text{ x } 100$$

O crescimento micelial do *Trichoderma asperelloides e Aspergillus* sp. durante os ensaios de antagonismo, juntamente com a porcentagem de inibição de crescimento micelial do *Aspergillus* sp. foram comparados com a escala de Bell *et al.* (1982) modificada por Primo *et al.* (2014). Essa escala avalia a atividade do biocontrole, atribuindo notas, de acordo com o crescimento micelial do mesmo na presença de um determinado patógeno. A classificação é feita como: nota 1 – o biocontrole cresce completamente sobre o patógeno, ocupando todo o meio (porcentagem de inibição do crescimento do patógeno de 100%); nota 1,5 – o biocontrole ocupa 7/8 do meio (porcentagem de inibição do crescimento do patógeno de 87,5%); nota 2 – o biocontrole ocupa 2/3 do meio (porcentagem de inibição do crescimento do patógeno de 67%); nota 2,5 – o biocontrole ocupa 5/8 do meio (porcentagem de inibição do crescimento do patógeno de 62,5%); nota 3 – o biocontrole ocupa 1/2 do meio (porcentagem de inibição do crescimento do patógeno de 50%); nota 3,5 – o biocontrole ocupa 3/8 do meio (porcentagem de inibição do crescimento do patógeno de 37,5%); nota 4 – o biocontrole ocupa 1/3 do meio (porcentagem de inibição do crescimento do patógeno de 34%); e nota 5 – o patógeno ocupa todo o meio (porcentagem de inibição do crescimento do patógeno de 0%). O antagonismo do biocontrole é considerado eficiente quando apresentar notas iguais ou menores que 3.

Também foram anotadas as informações sobre as fases de pré contato, contato e pós contato entre os dois fungos, como mostrados na tabela 01.

Tabela 01: Fases dos ensaios de antagonismo *in vitro*

Datas	**Fases**
Dia 0	Quando os inóculos foram cultivados no meio BDA
Dia 1	Fungos encontravam-se na fase de pré contato
Dia 2	Fungos encontravam-se na fase de contato
Dia 3	Fungos encontravam-se na fase de contato
Dia 4	Fungos estavam iniciando a fase de pós contato
Dia 5	Fungos encontravam-se na fase de pós contato

4.4 Análise estatística

Os cálculos de média, erro padrão da média e desvio padrão foram realizados no software Jamovi 2.3.28.

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), na qual as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de significância. Os mesmos foram realizados na plataforma Jamovi 2.3.28.

Os gráficos representativos de crescimento micelial e porcentagem de inibição de crescimento micelial foram construídos no programa Python.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a finalidade de observar e avaliar os ensaios de antagonismo *in vitro* entre *Trichoderma asperelloides* e *Aspergillus* sp., primeiramente foram necessários avaliar as três réplicas biológicas dos controles para cada fungo correspondente. Na figura 03, encontra-se a imagem dos controles de *Trichoderma asperelloides* durante cinco dias.

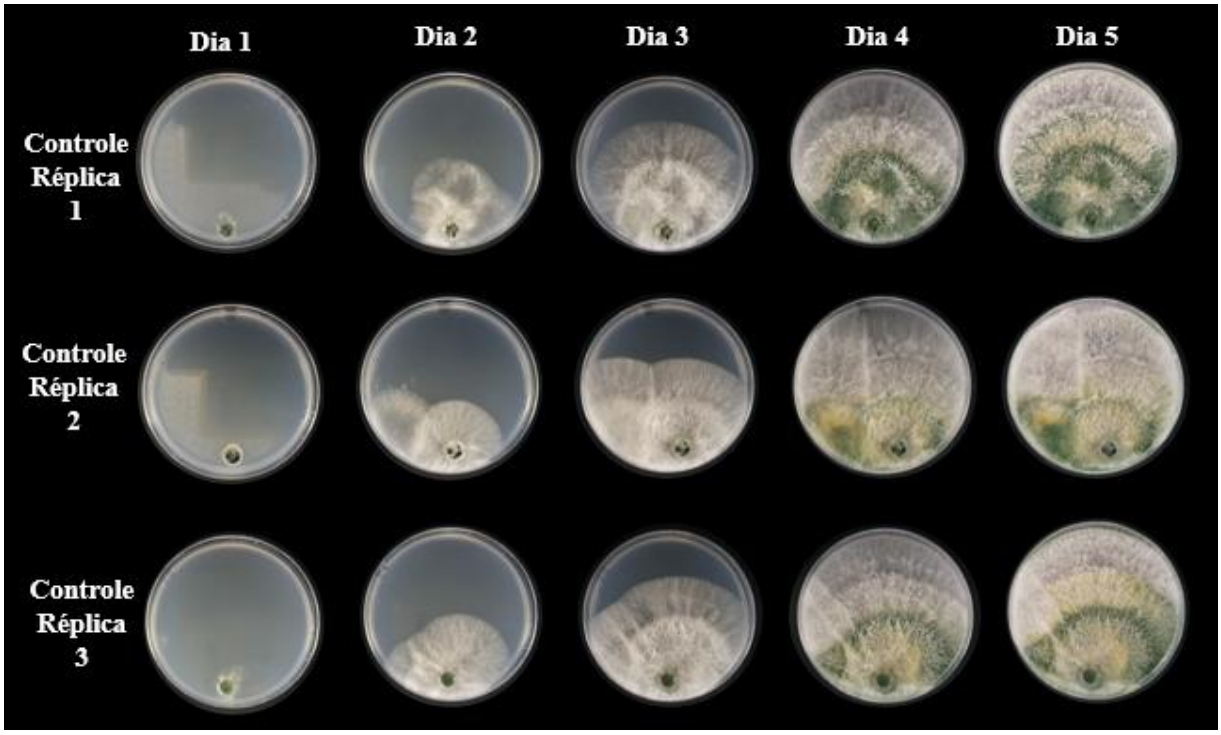

Figura 03: Controles de *Trichoderma asperelloides* durante cinco dias
Fonte: Acervo do autor (2024)

Os valores das medidas de diâmetro, em cm, dos controles de *Trichoderma asperelloides*, ao longo de cinco dias, estão dispostos na tabela 02.

Tabela 02: Diâmetros das colônias dos controles de *Trichoderma asperelloides*

	Dia 1 (cm)	Dia 2 (cm)	Dia 3 (cm)	Dia 4 (cm)	Dia 5 (cm)
Controle Réplica 1	1,491	4,813	6,932	9	9
Controle Réplica 2	1,491	3,866	6,076	9	9
Controle Réplica 3	2,15	4,592	6,916	9	9

Na figura 04, encontra-se a imagem dos controles de *Aspergillus* sp. durante cinco dias.

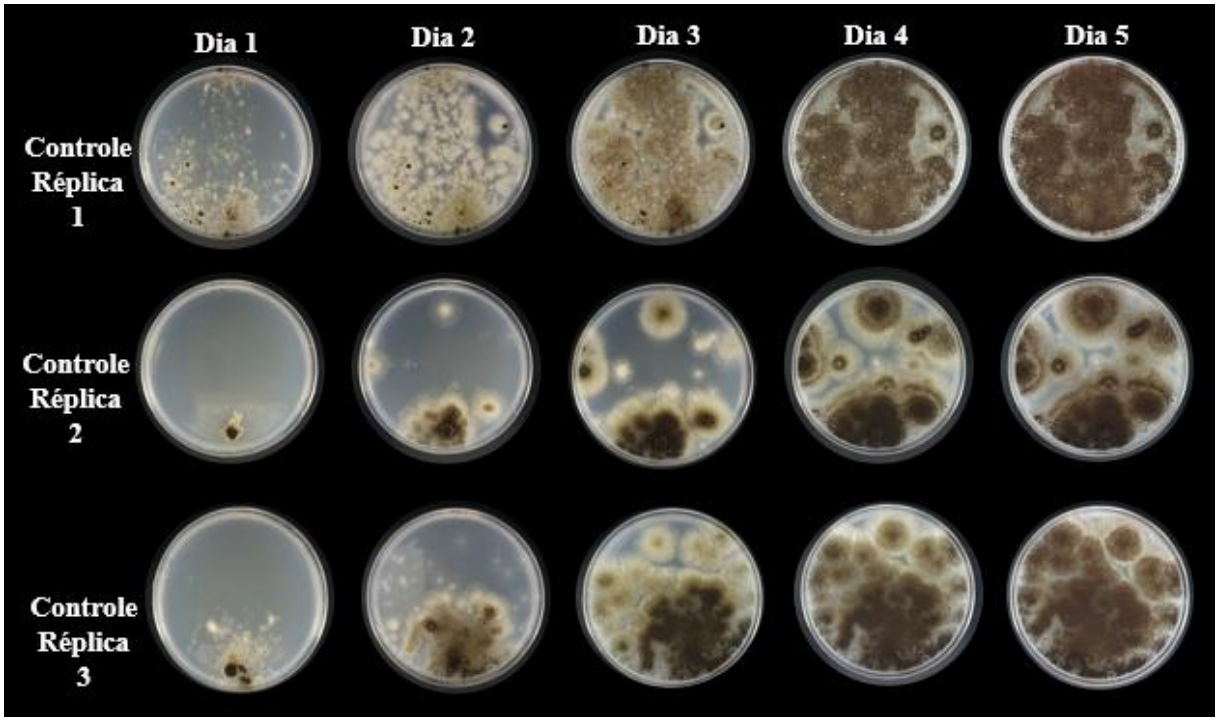

Figura 04: Controles de *Aspergillus* sp. durante cinco dias
Fonte: Acervo do autor (2024)

Os valores das medidas de diâmetro, em cm, dos controles de *Aspergillus* sp., ao longo de cinco dias, estão dispostos na tabela 03.

Tabela 03: Diâmetros das colônias dos controles de *Aspergillus* sp.

	Dia 1 (cm)	Dia 2 (cm)	Dia 3 (cm)	Dia 4 (cm)	Dia 5 (cm)
Controle Réplica 1	4,268	8,477	9	9	9
Controle Réplica 2	2,009	4,074	6,289	8,004	8,969
Controle Réplica 3	4,131	5,383	8,205	9	9

A partir dos resultados acima, foi possível observar que os controles de *Trichoderma asperelloides* conseguiram crescer atingir seu crescimento máximo após quatro dias, mostrando que fungos desse gênero apresentam um rápido crescimento, conforme dito no estudo de Meyer *et al.* (2019).

Também foi possível observar que os controles de *Aspergillus* sp. apresentaram um rápido crescimento, em que as colônias, inicialmente, apresentavam uma coloração branca, que posteriormente, com a esporulação, adquiriram um aspecto pulverulento e de coloração castanho escuro, estando de acordo com o estudo de Junior *et al.* (2020). Ainda foi possível constatar que a maioria das réplicas atingiram seu crescimento máximo a partir do dia 4.

Posteriormente, foram analisadas as três réplicas biológicas de tratamento, correspondente aos ensaios de antagonismo *in vitro* entre o *Trichoderma asperelloides* e o *Aspergillus* sp. Na figura 05, encontra-se as imagens dos ensaios de antagonismo *in vitro* entre *Trichoderma asperelloides* e *Aspergillus* sp. por seis dias não consecutivos.

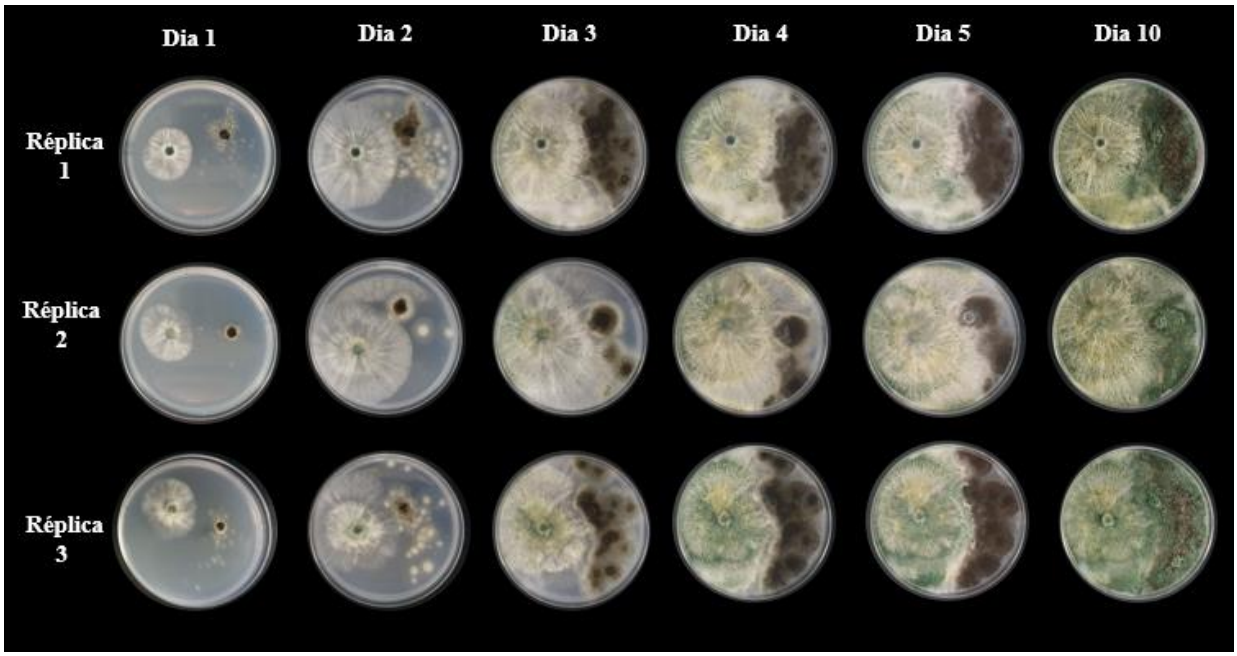

Figura 05: Ensaios de antagonismo *in vitro* entre *Trichoderma asperelloides* e *Aspergillus* sp.
Fonte: Acervo do autor (2024)

Os resultados das medições das colônias de *Trichoderma asperelloides* nos ensaios de antagonismo estão presentes na tabela 04.

Tabela 04: Diâmetros das colônias dos tratamentos de *Trichoderma asperelloides*

	Dia 1 (cm)	Dia 2 (cm)	Dia 3 (cm)	Dia 4 (cm)	Dia 5 (cm)
Réplica 1	3,401	5,38	5,822	5,695	6,048
Réplica 2	3,504	6,238	6,465	5,844	6,715
Réplica 3	3,6	5,376	5,573	5,716	6,041

Os resultados das medições das colônias de *Aspergillus* sp. nos ensaios de antagonismo estão presentes na tabela 05.

Tabela 05: Diâmetros das colônias dos tratamentos de *Aspergillus* sp.

	Dia 1 (cm)	Dia 2 (cm)	Dia 3 (cm)	Dia 4 (cm)	Dia 5 (cm)
Réplica 1	2,294	3,536	3,309	3,137	3,048
Réplica 2	1,749	1,66	1,70	2,71	2,5
Réplica 3	1,825	3,711	3,989	3,844	3,318

Em seguida, foram realizados os cálculos de média dos valores dos diâmetros das réplicas de *Trichoderma asperelloides* e *Aspergillus* sp. Os resultados estão demonstrados na tabela 06.

Tabela 06: Média dos diâmetros dos controles e tratamentos de *Trichoderma asperelloides* e *Aspergillus* sp.

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Média Controle *T. asperelloides*	1,71	4,42	6,64	9	9
Média Controle *Aspergillus* sp.	3,47	5,98	7,83	8,67	8,99
Média Tratamento *T. asperelloides*	3,50	5,66	5,95	5,75	6,27
Média Tratamento *Aspergillus* sp.	1,96	2,97	3	3,23	2,96

Após o cálculo das médias dos diâmetros das colônias de *Trichoderma asperelloides* e *Aspergillus* sp., um gráfico de linhas foi montado, relacionando o crescimento dos controles e dos tratamentos ao longo dos dias. O gráfico está mostrado na imagem 06.

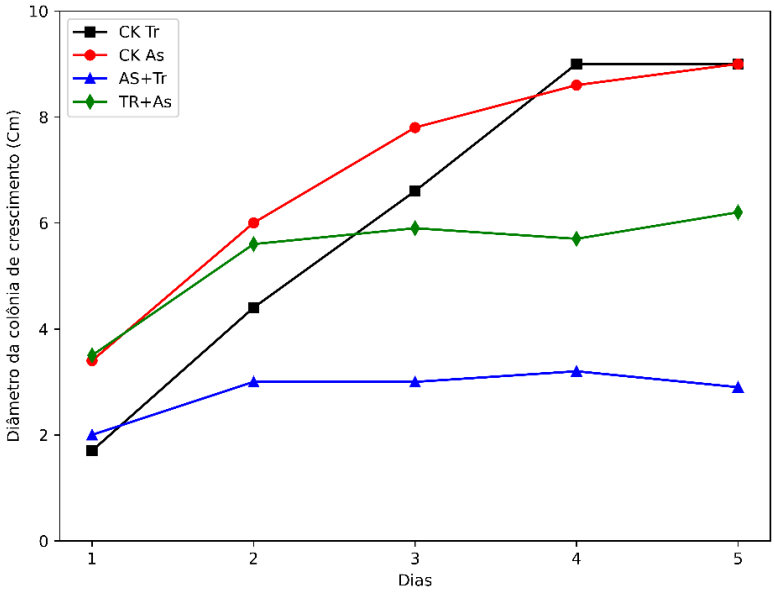

Figura 06: Diâmetro das colônias de crescimento ao longo de cinco dias
Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2024)

Ao observar o gráfico acima, é possível notar que os controles de *Trichoderma asperelloides* (linha preta) e *Aspergillus* sp. (linha vermelha) apresentaram um maior crescimento micelial quando comparado ao crescimento dos mesmos nos ensaios de antagonismo *in vitro*. Por sua vez, nos ensaios de antagonismo, o *Trichoderma asperelloides* (linha verde) apresentou um maior crescimento micelial ao longo dos dias quando comparado com o *Aspergillus* sp. (linha azul).

Segundo o estudo de Quevedo *et al.* (2022), os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram um crescimento micelial uniforme e superior quando comparado ao patógeno *Fusarium oxysporum*. Essa característica para um ensaio de antagonismo é ansiada, pois o fungo com crescimento mais rápido apresentará maior vantagem quando competir com o outro por espaço e nutrientes. Ao observar a figura 06, os controles de *Trichoderma asperelloides* e *Aspergillus* sp. apresentaram crescimentos miceliais semelhantes, na qual inicialmente, o *Aspergillus* sp. apresentou vantagem no crescimento, mas nos dias finais de análise, os crescimentos miceliais do *Trichoderma asperelloides* e *Aspergillus* sp. padronizaram, mostrando que esses fungos apresentam um rápido crescimento.

Para analisar a inibição do *Aspergillus* sp. nos ensaios de antagonismo *in vitro*, foram calculadas as porcentagens de inibição de crescimento micelial do patógeno. Os valores estão demonstrados na tabela 07.

Tabela 07: Porcentagem de inibição de crescimento micelial do *Aspergillus* sp.

	Dia 1 (%)	Dia 2 (%)	Dia 3 (%)	Dia 4 (%)	Dia 5 (%)	Dia 10 (%)
Réplica 1	0	58,29	63,23	65,14	66,13	100
Réplica 2	0	59,25	72,97	66,14	72,13	100
Réplica 3	0	31,06	51,38	57,29	63,13	100

Em seguida, foram realizados os cálculos de média, erro padrão da média e desvio padrão das porcentagens de inibição de crescimento micelial do *Aspergillus* sp. Os resultados estão mostrados na tabela 08.

Tabela 08: Média, erro padrão da média e desvio padrão da porcentagem de inibição de crescimento micelial do *Aspergillus* sp.

	Dia 1 (%)	Dia 2 (%)	Dia 3 (%)	Dia 4 (%)	Dia 5 (%)	Dia 10 (%)
Média	0	49,5	62,5	62,9	67,1	100
Erro padrão da média	0	9,24	6,24	2,80	2,65	0
Desvio padrão	0	16	10,8	4,85	4,58	0

Após os cálculos de média, erro padrão da média e desvio padrão das porcentagens de inibição de crescimento micelial do *Aspergillus* sp., um gráfico de linhas com barras de erro foi montado relacionando a taxa de inibição de crescimento micelial ao longo dos dias. O gráfico está mostrado na figura 07.

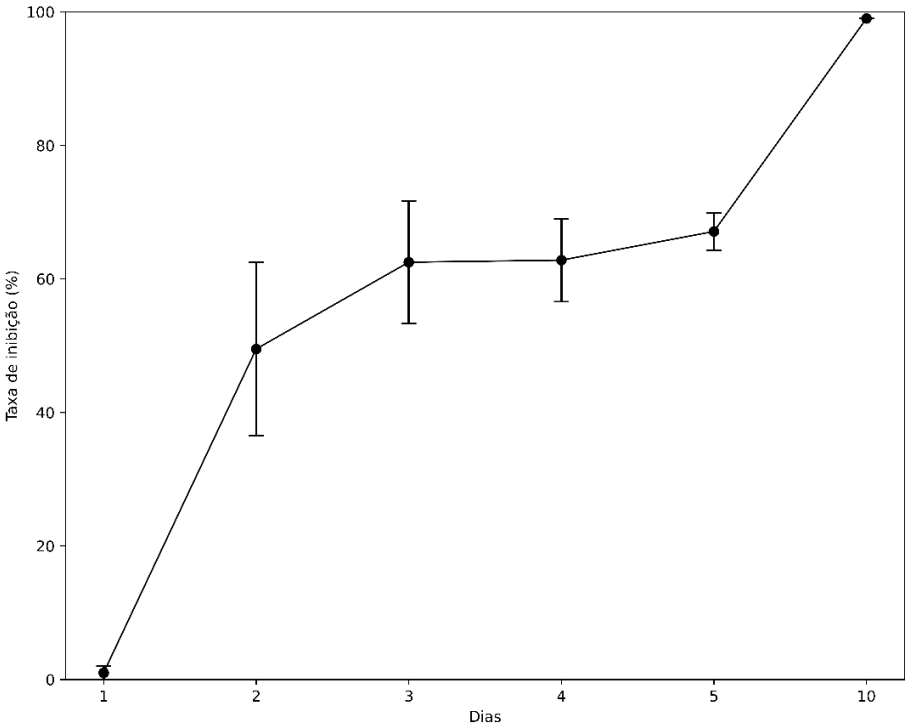

Figura 07: Porcentagem de inibição durante seis dias não consecutivos
Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2024)

Ao analisar a figura 07, foi possível observar que no dia 1, a taxa de inibição foi de zero por cento, pois neste dia, os fungos *Trichoderma asperelloides* e *Aspergillus* sp. encontravam-se na fase de pré contato. Ao longo dos dias 2, 3, 4 e 5, notou-se uma tendência de aumento das taxas de inibição, mostrando que, conforme o *Trichoderma asperelloides* crescia na placa, o crescimento do *Aspergillus* sp. foi reduzindo pela ação do antagonista. No dia 10, foi observado que o *Trichoderma asperelloides* cresceu completamente sobre a colônia de *Aspergillus* sp., atingindo, assim, uma taxa de inibição de 100%. O resultado da porcentagem de inibição de crescimento micelial do dia 10 está de acordo com o estudo de Sá (2009), em que os isolados de *Trichoderma* spp. (TCS16 e TCS23) apresentaram um rápido crescimento, inibindo em 100% o crescimento micelial e a esporulação do *Aspergillus niger*.

Ao comparar as figuras 05 e 07 com a escala de Bell *et al.* (1982) modificada por Primo *et al.* (2014), o dia 2 (com PIC de 49,5%) apresenta nota 3, os dias 3 (com PIC de 62,5%) e 4 (com PIC de 62,9%) apresentam nota 2,5 e o dia 5 (com PIC de 100%) apresenta nota 1. Os resultados do presente estudo estão de acordo com o trabalho de Primo *et al.* (2014), em que todos os seis isolados de *Trichoderma* spp. conseguiram inibir do crescimento micelial dos quatro isolados de *Aspergillus* spp., atingindo notas menores ou iguais a 3. No entanto, segundo o trabalho de Santos (2018), três isolados de *Trichoderma* (*Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii* e *Trichoderma harzianum*) atingiram notas maiores que 3 na escala de Bell *et al.*

(1982) quanto a inibição dos fungos *Aspergillus flavus* e *Rhizopus stolonifer*. Com isso, o presente estudo não corrobora com os resultados do trabalho de Santos (2018).

Segundo o trabalho de Andrade (2023), a porcentagem de inibição de crescimento micelial da cepa AIS19, de *Aspergillus flavus*, foi de 39,42%, mostrando que o *Trichoderma* sp. não conseguiu inibir o patógeno de forma significativa. Na figura 07, ao realizar o cálculo de uma média geral dos valores das porcentagens de inibição, o resultado obtido foi de 57%, mostrando que houve uma inibição do crescimento do *Aspergillus* sp. por parte do *Trichoderma asperelloides*. Portanto, o presente estudo não está de acordo com o resultado encontrado no trabalho de Andrade (2023). Isso pode ser devido as cepas e espécies distintas de *Trichoderma* e *Aspergillus* usadas em cada trabalho.

No entanto, a média da porcentagem de inibição de 57%, correspondente ao presente estudo está parcialmente de acordo com os resultados de Gajera e Vakharia (2010), em foram testadas atividades de antagonismo para doze isolados de *Trichoderma* contra o *Aspergillus niger*. A partir dessas análises, foram observados que seis isolados de *Trichoderma* conseguiram inibir o crescimento do *Aspergillus niger*, sendo eles o T6 (com porcentagem de inibição de 86,2%), T8 (com porcentagem de inibição de 80,4%), T3 (com porcentagem de inibição de 74,3%), T2 (com porcentagem de inibição de 71,9%), T1 (com porcentagem de inibição de 60,9%) e T12 (com porcentagem de inibição de 50,6%). As diferenças entre as porcentagens de inibição dos dois estudos provavelmente são devidas as diferentes espécies de *Trichoderma* utilizadas em cada trabalho.

Para verificar se houve diferença significativa das medidas de porcentagem de inibição de crescimento micelial, foi aplicado, primeiramente, análise de variância (ANOVA) com 5% de significância. Para a porcentagem de inibição de crescimento micelial, o $p < 0,001$, mostrou que houve diferença significativa entre as médias de porcentagem de inibição de crescimento micelial ao longo dos dias. Devido a essa diferença significativa, foi aplicado o teste de Tukey com 5% de significância, para verificar quais dias essa porcentagem de inibição foi mais significativa. Pelo teste, observou-se que o dia 1, comparado aos outros dias (dias 2, 3, 4 e 5), apresentou uma porcentagem de inibição significativa ($p < 0,001$). O dia 10, quando comparado aos outros dias (dias 2, 3, 4 e 5), também apresentou uma porcentagem de inibição significativa ($p < 0,001$ para o dia 2, $p < 0,003$ para os dias 3 e 4 e $p < 0,007$ para o dia 5). Os dias 1 e 10 serem os mais significativos são devido aos mesmos apresentarem valores extremos de porcentagem de inibição, na qual para o dia 1, a taxa de inibição é zero por cento, enquanto o dia 10, a taxa de inibição foi de 100%.

A análise de variância (ANOVA) também foi aplicado para verificar se o crescimento micelial do *Aspergillus* sp. ao longo dos dias, durante os ensaios de antagonismo, foi significativo. Foi notado que não houve diferença significativa ($p < 0,394$) das medidas de crescimento micelial do *Aspergillus* sp. durante os ensaios de antagonismo. No entanto, houve diferença significativa ($p < 0,001$) entre as medidas de controle e de tratamento do crescimento micelial de *Aspergillus* sp., conforme encontrado no estudo de Quevedo *et al.* (2022) em que as medidas de crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* não diferiram entre si, mas diferiram dos controles.

No artigo de Guédez *et al.* (2009), após 96 horas de incubação, foi observado que houve uma diferença significativa ($p < 0,001$) no crescimento de *Trichoderma harzianum* quando comparado ao patógeno *Aspergillus niger*, devido que, ao rápido crescimento do biocontrole, reduziu o crescimento do *Aspergillus niger*. No presente estudo, ao realizar ANOVA dos dados de crescimento micelial de *Trichoderma asperelloides* e *Aspergillus* sp. do dia 4 de incubação, foi notado que houve diferença significativa dos resultados de crescimento micelial ($p < 0,002$). Portanto, este estudo está de acordo com os resultados encontrados por Guédez *et al.* (2009), provando que o rápido crescimento do *Trichoderma asperelloides* conseguiu reduzir o crescimento micelial do *Aspergillus* sp.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios de antagonismo *in vitro* entre o *Trichoderma asperelloides* e o *Aspergillus* sp., pode-se concluir que o biocontrole *Trichoderma asperelloides* atuou como um bom antagonista, quando confrontado com o *Aspergillus* sp., apresentando um valor médio de porcentagem de inibição de 57%. Observou-se que, após 10 dias, o *Trichoderma asperelloides* conseguiu crescer completamente sobre o patógeno na maioria das réplicas biológicas, atingindo uma taxa de inibição de crescimento micelial de 100%, além de apresentar nota 1 na escala de Bell *et al*. (1982).

No entanto, ao comparar com estudos na literatura, houve tanto discordâncias como concordâncias, mostrando que é necessário realizar mais estudos sobre o antagonismo entre os gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus*, analisando o papel de biocontrole do *Trichoderma* para diferentes cepas e espécies de *Aspergillus*.

REFERÊNCIAS

ABBAS, B. A.; KHUDOR, M. H.; ALKHURSAN, R. N. Poultry feed fungi a practical guide polutry feed fungi a practical guide. **ResearchGate**, Basrah, 2021.

ALANIO, A. *et al*. Invasive pulmonary infection due to *Trichoderma longibrachiatum* mimicking invasive aspergilosis in a neutropenic patient sucessfully treated with voriconazole combined with caspofungin. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 46, p. 116-118, 2008.

AMORIM, D. S. D. et al. Infecções por *Aspergillus* spp.: aspectos gerais. **Pulmão RJ**, Catete, v. 13, n. 2, p. 111-118, 2004.

ANDRADE, E. C. D. **Isolamento e avaliação do desempenho antagonista de *Trichoderma* spp. contra fungos fitopatogênicos oriundos de solo do campus Araguatins – IFTO, *in vitro***. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Agronômica) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Tocantins Campus Araguatins, Araguatins, 2023.

BATISTA, L. R.; SOUZA, S. C.; EVANGELISTA, S. R.; AZEVEDO, N. L. Identificação de fungos: gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces*. **Conhecimento, conservação e uso de fungos**, Manaus, p. 1-10, 2019.

BELL, D. K. *et al*. In vitro Antagonism of *Trichoderma* species Against Six Fungal Plant Pathogens. **Phytopathology**, St. Paul, v. 72, n. 4, p. 379-382, 1982.

BENÍTEZ, T. et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, p. 249-260, 2004.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas**: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009.

CARIÑO, H. F. R. *et al*. Biocontrol of *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum* by *Trichoderma asperelloides* and *Bacillus paralicheniformis* in tomato plants. **Antonie van Leeuwenhoek**, [s. l.], v. 113, p. 1247-1261, 2020.

CARVALHO, E. C. Q. D. Micotoxinas e alimentos: implicações na saúde humana e animal. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 27-31, 1995.

CARVALHO, L. I. C. ***Aspergillus* e Aspergilose**: desafios no combate da doença. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.

CHOUAKI, T. *et al*. Invasive infections due to *Trichoderma* species: report of 2 cases, findings of in vitro susceptibility testing, and review of the literature. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 35, p. 1360-1367, 2002.

COLLA, L. M. *et al*. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 809-813, 2008.

FERREIRA, F. V.; MUSUMECI, M. A. *Trichoderma* as biological control agent: scope and prospects to improve efficacy. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 1-17, 2021.

FORSTER, R. Inativação do vírus do mosaico comum do fumo pelo filtrado de culturas de *Trichoderma* sp. **Bragantia**, [s. l.], v. 10, n.5, p. 139-148, 1950.

FRANCISCO, M. R. **Seleção e identificação de *Trichoderma* spp e potencial para produção de enzimas industriais**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2016.

FREIRE, F. D. C. O. et al. **Micotoxinas**: na alimentação e na saúde humana e animal. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007.

GAJERA, H. P.; VAKHARIA, D. N. Molecular and biochemical characterization of *Thichoderma* isolates inhibiting a phytopathogenic fungi *Aspergillus niger* Van Tieghem. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 74, p. 274-282, 2010.

GUÉDEZ, C. *et al*. Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp.). **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, Caracas, v.29, n.1, 2009.

HARMAN, G. E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, Geneva, v. 96, n.2, p. 190-194, 2006.

JUNIOR, F. B. D. P. Caracterização morfológica e proteolítica de A*spergillus niger* isolado da biblioteca do IFPE - campus Recife. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 8, p. 63959-63966, 2020.

LOPES, F. C. **Produção e Análise de Metabólitos Secundários de Fungos Filamentosos**. 2011. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

LUCON, C. M. M.; CHAVES, A. L. R.; BACILIERI, S. ***Trichoderma***: o que é, para que serve e como usar corretamente na lavoura. São Paulo: Instituto Biológico, 2014.

MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. D. ***Trichoderma***: uso na agricultura. Brasília: Embrapa, 2019.

MOUSAVI, B. et al. *Aspergillus* species in indoor environments and their possible occupational and public health hazards. **Current Medical Mycology**, Sari, v.2, n.1, p.36-42, 2016.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. São Paulo: Elsevier, 2009.

OLIBONI, G. M. **Identificação e perfil de sensibilidade de *Aspergillus* spp. presente no ar atmosférico**. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2022.

PAKORA, G. A. et al. Bioconversion of antifungical viridin to phytotoxin viridiol by environmental non-viridin producing microorganisms. **Bioorganic Chemistry**, [s. l.], v. 112, p. 1-6, 2021.

PAULUSSEN, C. et al. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. **Microbial Biotechnology**, [s. l.], v. 10, n.2, p. 296-322, 2017.

PRIMO, H. E. D. L. *et al*. Antagonismo *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. contra isolados de *Aspergillus* spp. produtores de aflatoxinas em castanha do Brasil. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 23., 2014, Cuiabá. **Fruticultura**: oportunidades e desafios para o Brasil. [s. l.]: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2014, p. 1-4.

QUEVEDO, A. C. *et al*. Ação antagonista in vitro de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium oxysporum*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 32, n. 4, p. 2288-2303, 2022.

RAMADA, M. H. S.; LOPES, F. A. C.; ULHOA, C. J. *Trichoderma*: metabólitos secundários. In: MEYER, M. C. et al. ***Trichoderma***: uso na agricultura. Brasília: Embrapa, 2019. cap. 5, p. 201-218.

SÁ, J. O. D. **Patogênese de *Aspergillus niger* e biocontrole da podridão vermelha do sisal por *Trichoderma* spp**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Cruz das Almas, 2009.

SAITO, L. R. et al. Aspectos dos efeitos do fungo *Trichoderma* spp. no biocontrole de patógenos de culturas agrícolas. **Pesquisa Aplicada e Agrotecnologia**, Guarapuava, v. 2, n. 3, p. 203-208, 2009.

SAL, E. *et al*. Invasive *Trichoderma* spp. infections: clinical presentation and outcome of cases from the literature and the FungiScope® registry. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 77, n. 10, p. 2850-2858, 2022.

SALES, L. S. et al. Diversidade taxonômica e identificação de *Trichoderma*. **Tópicos em Microbiologia Agrícola**, Santa Cruz, p. 187-217, 2020.

SAMUELS, G. J. et al. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. **Mycologia**, Lawrence, v. 102, n. 4, p. 944-966, 2010.

SANTOS, A. C. N. D. ***Trichoderma* spp. para o controle biológico de fitopatógenos**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Agronômica) – Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2022.

SANTOS, I. S. **Antagonismo de isolados de *Trichoderma* frente a fungos associados a sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) – Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, 2018.

SARAVANAKUMAR, K. *et al*. Novel metabolites from *Trichoderma atroviride* against human prostate câncer cells and their inhibitory effect on *Helicobacter pylori* and *Shigella* toxin producing *Escherichia coli*. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 126, p. 19-26, 2019.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Viena, v. 87, n. 3, p. 787-799, 2010.
SILVA, J. B. T.; MELLO, S. C. M. **Utilização de *Trichoderma* no Controle de Fungos Fitopatogênicos**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

SILVA, R. A. D. et al. Resistência a Antimicrobianos: a formulação da resposta no âmbito da saúde global. **Saúde Debate**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 126, p. 607-623, 2020.

SOARES, I. A. *et al*. Fungos na biorremediação de áreas degradadas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n.2, p. 341-350, 2011.

VALENZUELA, N. L. *et al*. Biological control of anthracnose by postharvest application of *Trichoderma* spp. on maradol papaya fruit. **Biological Control**, [s. l.], v. 91, p. 88-93, 2015.