



República Federativa do Brasil  
Ministério da Indústria, Comércio Exterior  
e Serviços  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102014031776-7 A2

(22) Data do Depósito: 18/12/2014

(43) Data da Publicação: 02/08/2016



\* B R 1 0 2 0 1 4 0 3 1 7 7 6 A

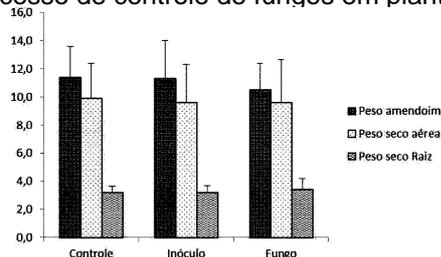
(54) **Título:** COMPOSIÇÃO ANTIFÚNGICA, PROCESSO PARA SUA OBTENÇÃO E PROCESSO PARA CONTROLE DE FUNGOS EM PLANTAS

(51) **Int. Cl.:** A01N 63/02; C12N 1/20

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

(72) **Inventor(es):** ANDREW MACRAE, LUDMILLA DE ALMEIDA VIEIRA, PEDRO HENRIQUE FREITAS PEREIRA, FERNANDA REINERT THOME MACRAE

(57) **Resumo:** COMPOSIÇÃO ANTIFÚNGICA, PROCESSO PARA SUA OBTENÇÃO E PROCESSO PARA CONTROLE DE FUNGOS EM PLANTAS. A presente invenção proporciona apresenta um melhorado meio de controle de fungos, notadamente fungos associados à produção de aflatoxinas e/ou fungos associados à produção de aflatoxinas em plantas, tendo como conceito inventivo comum o uso do microrganismo selecionado da estirpe bacteriana *Streptomyces* sp 80 e combinações dos mesmos. A presente invenção também proporciona uma composição compreendendo os referidos microrganismos em um veículo agriculturalmente e/ou farmacologicamente aceitável. São também revelados um processo para a obtenção da referida composição e um processo de controle de fungos em plantas.



## Relatório Descritivo de Patente de Invenção

### **COMPOSIÇÃO ANTIFÚNGICA, PROCESSO PARA SUA OBTENÇÃO E PROCESSO PARA CONTROLE DE FUNGOS EM PLANTAS**

#### **Campo da Invenção**

**[0001]** A presente invenção se situa nos campos da Microbiologia e da Agricultura. Mais especificamente, a presente invenção proporciona uma composição com atividade antifúngica, um processo para sua obtenção e um processo para o controle de fungos em plantas.

#### **Antecedentes da Invenção**

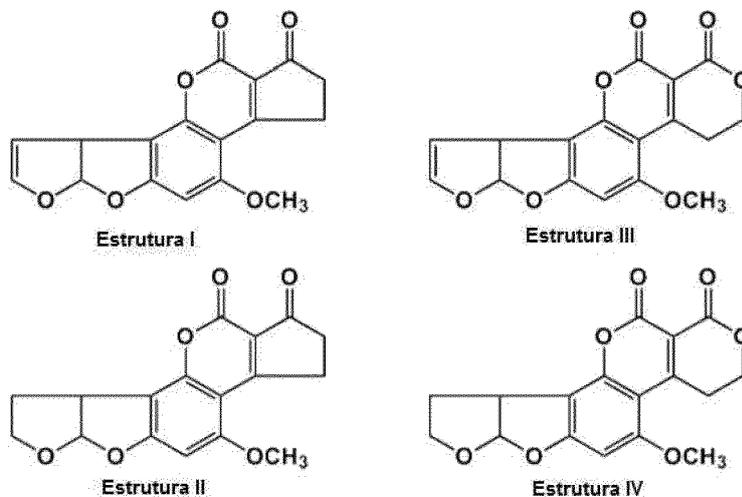
**[0002]** A busca por agentes fungistáticos ou fungicidas que proporcionem o controle de fungos patogênicos em plantas é um desafio atual. Em específico, agentes fungicidas para o controle dos níveis de aflatoxinas nas plantas e que apresentam como componente ativo um microrganismo não são comuns no mercado atual. Apenas dois produtos aprovados e disponíveis no mercado (*Mycostop*<sup>®</sup> e *Actinovate*<sup>®</sup>) possuem como componente ativo para biocontrole um microrganismo da espécie *Streptomyces spp.* Entretanto, nenhum destes produtos é recomendado para o controle de *Aspergillus spp.*, conhecido gênero de fungos produtores de aflatoxinas. Assim, resta não resolvido um importante problema técnico relacionado ao desenvolvimento de novos fungicidas em que o ingrediente ativo é um microrganismo como, por exemplo, novas estirpes de actinomicetos.

**[0003]** Também é de conhecimento que as atuais composições fungicidas requerem condições de baixa temperatura para armazenamento para garantia da estabilidade do produto. Assim, um outro desafio técnico atual é também o desenvolvimento de formulações fungicidas que apresentem longa estabilidade em temperatura ambiente, principalmente para os países tropicais.

**[0004]** As aflatoxinas são compostos químicos pertencentes ao grupo das micotoxinas (toxinas produzidas por fungos) e são consideradas o grupo de micotoxinas de maior preocupação em uma perspectiva global de saúde

(STREIT et al, 2012). Foram descritas mais de 20 tipos de aflatoxinas, sendo as mais importantes AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e as designações B e G provêm da cor da fluorescência destas (em inglês *blue* e *green*, respectivamente) sob luz ultravioleta e seus índices referem-se à mobilidade destas em uma placa cromatográfica (ABDIN et al, 2010). A aflatoxina B1 (AFB1) é a mais abundante e muitas vezes referida como o mais potente carcinógeno de ocorrência natural, classificada no Grupo 1 humano pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) (STREIT et al, 2012). Os mesmos autores destacam ainda que os resultados de elevadas doses de aflatoxina podem se dar desde um aflatoxicose aguda, causando graves sintomas gastrointestinais e até a morte, sendo que também a exposição à aflatoxina pode ser associada ao raquitismo em crianças e imunossupressão. Atualmente, mais de cinco bilhões de pessoas no mundo, ou seja, aproximadamente 80% da população mundial corre risco de desenvolver doenças crônicas por exposição à aflatoxinas em alimentos. (STREIT et al, 2012)

**[0005]** As aflatoxinas têm substituintes dihidrofurano ou tetrahydrofurano fundidos a um anel cumarínico (CALONI; CORTINOVIS, 2011), onde o grupo B possui um anel ciclopentanona e o grupo G possui uma lactona insaturada, conforme observado nas estruturas de I a IV abaixo:



**[0006]** As estrutura indicadas acima são: aflatoxina B<sub>1</sub> (I), aflatoxina B<sub>2</sub> (II), aflatoxina G<sub>1</sub> (III) e aflatoxina G<sub>2</sub> (IV) (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

**[0007]** Os fungos são responsáveis pela presença de aflatoxinas no meio ambiente. A produção é vista em diferentes espécies e tipos morfológicos que diferem na capacidade competitiva, virulência e produção de aflatoxinas (PROBST; COTTY, 2012). Dentre os fungos do gênero *Aspergillus*, as espécies *A. flavus* e *A. parasiticus* são as mais representativas entre as produtoras de aflatoxinas, porém outras espécies como *A. ochraceoroseus*, *A. toxicarius*, *A. arachidicola* e *A. minisclerotigenes* também já foram citadas (ABDIN et al, 2010).

**[0008]** A contaminação de alimentos por aflatoxinas é uma questão de segurança alimentar em todo o mundo e várias estratégias, como métodos de controle químico, físico e biológico são utilizadas para gerenciar e investigar aflatoxinas em alimentos (CHOUDHARY; KUMARI, 2010). Dentre eles, o controle biológico parece ser a abordagem mais promissora para o controle de aflatoxinas. Vários gêneros de bactérias, tais como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* e *Burkholderia* spp., têm demonstrado capacidade de inibir o crescimento de *Aspergillus flavus* em condições de laboratório (REDDY et al, 2010). Os mesmos autores citam também que estirpes de leveduras foram capazes de inibir significativamente o crescimento e produção de toxinas por *Aspergillus* sob condições de laboratório. Na maior parte dos casos, embora as estirpes sejam altamente eficazes em inibir o crescimento de fungos e toxinas sob condições de laboratório, não se tem bons resultados em campo. Uma explicação para isso é que é difícil levar as células bacterianas aos sítios de infecção por *Aspergillus* (REDDY et al, 2010), pois precisam de um veículo ou formulação adequada.

**[0009]** A busca na literatura patentária apontou alguns documentos parcialmente relevantes, descritos a seguir.

**[0010]** O documento de GOMES et al. (*Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol*. Letters in

Applied Microbiology, 2000, Vol. 30, pp. 146–150) revela que extratos brutos de estirpes específicas do gênero *Streptomyces* apresentaram atividade inibitória contra fungos patogênicos. A presente invenção difere do referido documento, dentre outras razões técnicas, pelo fato de revelar estirpes bacterianas específicas do gênero *Streptomyces* que apresentam atividade inibitória contra fungos produtores de aflatoxinas.

**[0011]** O documento de ZUCCHI et al. (*Streptomyces sp. ASBV-1 reduces aflatoxin accumulation by Aspergillus parasiticus in peanut grains*. J Appl Microbiol., 2008 Dez; v. 105, ed. 6, pp. 2153-60) revela uma estirpe específica do gênero *Streptomyces* (*Streptomyces sp. ASBV-1*) que inibiu a viabilidade de esporos do fungo produtor de aflatoxinas *A. parasiticus* em plantas. A presente invenção difere do referido documento, dentre outras razões técnicas, por tratar de novas estirpes bacterianas do gênero *Streptomyces*, distintas daquela revelada no documento de ZUCCHI et al., e que apresentaram atividade antifúngica contra fungos produtores de aflatoxinas.

**[0012]** O documento US 5,403,584 revela um microrganismo do gênero *Streptomyces*, composições compreendendo o microrganismo e método de controle de fungos com as referidas composições. A presente invenção difere do referido documento, dentre outras razões técnicas, pelo fato de o microrganismo do gênero *Streptomyces* descrito ser de uma estirpe bacteriana distinta (*Streptomyces WYEC 108*) daquelas reveladas na presente invenção; além disso, não se revela no referido documento a inibição de fungos produtores de aflatoxinas pela referida cepa.

**[0013]** O documento de FRÓES et al. (*Selection of a Streptomyces Strain Able to Produce Cell Wall Degrading Enzymes and Active against Sclerotinia sclerotiorum*. The Journal of Microbiology (2012) Vol. 50, No. 5, pp. 798–806) indica que uma das estirpes da bactéria do gênero *Streptomyces* apresentou atividade antifúngica, inibindo o crescimento da forma micélio do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* e a germinação de escleródios. A presente invenção

difere do referido documento, dentre outras razões técnicas, pelo fato de revelar a atividade antifúngica de estirpes bacterianas específicas do gênero *Streptomyces* sobre fungos que produzem aflatoxinas e presentes em plantas, sendo também diferentes das reveladas nesta invenção.

**[0014]** Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta, aos olhos dos inventores, possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

**[0015]** Assim, no estado da técnica atual, há uma grande dificuldade em se isolar, caracterizar, obter e formular microrganismos com atividade antifúngica, particularmente fungos patogênicos que produzem aflatoxinas e/ou aflatoxinas em plantas. Também é um problema enfrentado no estado da técnica a estabilidade e viabilidade de composições antifúngicas em que o ingrediente ativo é um microrganismo actinomiceto.

#### **Sumário da Invenção**

**[0016]** A presente invenção apresenta em uma de suas concretizações um melhorado meio de controle de fungos, notadamente fungos associados à produção de aflatoxinas e/ou fungos associados à produção de aflatoxinas em plantas, tendo como conceito inventivo comum o uso do microrganismo selecionado da estirpe bacteriana *Streptomyces sp 80*.

**[0017]** É um dos objetos da presente invenção uma composição compreendendo: um veículo agriculturalmente e/ou farmacêuticamente aceitável; e o microrganismo da estirpe bacteriana *Streptomyces sp 80*.

**[0018]** É ainda um objeto adicional da presente invenção um processo de preparação de composição antifúngica compreendendo as etapas de:

- a. preparar um veículo agriculturalmente e/ou farmacêuticamente aceitável; e
- b. adicionar ao referido veículo o microrganismo da estirpe bacteriana *Streptomyces sp 80*.

**[0019]** É também um objeto da presente invenção um processo de controle de fungos em plantas compreendendo a aplicação de uma composição antifúngica sobre plantas.

**[0020]** Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

### **Breve Descrição das Figuras**

**[0021]** A figura 1 mostra o gráfico da análise da estabilidade do inóculo durante a estocagem em temperatura ambiente, entre 22 e 28°C.

**[0022]** A figura 2 mostra um gráfico do efeito do inóculo na contagem de fungos do solo após sete dias a 25°C, sendo: 1. Controle - contagem de fungos no solo; 2. Solo inoculado com *A. parasiticus* (número 10 vezes maior em relação ao controle); 3. Solo inoculado com *A. parasiticus* (número 100 vezes maior em relação ao controle); 4. Solo inoculado com *A. parasiticus* (número 1000 vezes maior em relação ao controle); 5. Solo inoculado com *A. parasiticus* (número 1000 vezes e com a formulação). N = 5. Barras finas representam os valores máximos e mínimos observados em cada ensaio e as barras em cinza representam maior e menor média de cada ensaio.

**[0023]** A figura 3 mostra o gráfico com dados após experimento *in vivo*. Média do peso do amendoim, peso seco da parte aérea e da raiz, por vaso. N = 21 e barra de erros é o desvio padrão. Letras a, b e c mostram que as médias não foram diferentes entre os tratamentos.

**[0024]** A figura 4 mostra o gráfico com dados após experimento *in vivo*. Média do número de vagens e flores por vaso.

**[0025]** A figura 5 representa o crescimento de *A. parasiticus* em meio ADM, após três dias de cultivo (A) e o crescimento de *A. parasiticus* em meio BDA, após 3 dias de cultivo (controle) (B).

**[0026]** A figura 6 representa o cromatograma com o padrão de aflatoxinas (*Aflatoxin Standard Mix*) nos volumes de 20µl, 30µl, 40µl e 50µl (de

cima para baixo estão: B1, B2, G1 e G2, respectivamente) e as bandas referentes às aflatoxinas provenientes do *plug* de ágar.

**[0027]** A figura 7 representa o teste de antagonismo (em triplicata) com as estirpes de *Streptomyces sp.* e *A. parasiticus*, em que: A) Estirpe M7A, B) Estirpe 70, C) Estirpe 52, D) Estirpe 218, E) Estirpe Q11, F) Estirpe 80 e G) Controle (fungo *A. parasiticus*).

**[0028]** A figura 8 representa o teste de antagonismo de *A. parasiticus* e o inóculo.

**[0029]** A figura 9 representa o inóculo contendo *Streptomyces sp.* 80 (A) e contagem de UFC/g de inóculo (diluição  $10^{-7}$ ) (B).

**[0030]** A figura 10 representa a contagem da diluição  $10^{-2}$  de *A. parasiticus* em meio Dicloran Rosa bengala, em que: A) Fungos isolados do solo original; B) Fungos isolados do solo infestado artificialmente com 10x a contagem do solo original; C) Fungos isolados do solo infestado artificialmente com 100x a contagem do solo original; D) Fungos isolados do solo infestado artificialmente com 1000x a contagem do solo original; E) Fungos isolados do solo original adicionado de 1g do inóculo; F) controle.

### **Descrição Detalhada da Invenção**

**[0031]** A presente invenção apresenta em uma de suas concretizações um melhorado meio de controle de fungos, notadamente fungos associados à produção de aflatoxinas e/ou fungos associados à produção de aflatoxinas em plantas, tendo como conceito inventivo comum o uso do microrganismo da estirpe bacteriana *Streptomyces sp* 80.

**[0032]** A composição da presente invenção compreende: um veículo agriculturalmente e/ou farmacêuticamente aceitável; e o microrganismo da estirpe bacteriana *Streptomyces sp* 80.

**[0033]** Em uma concretização, a composição da invenção proporciona estabilidade e viabilidade prolongadas em temperatura ambiente por longos períodos, composição esta que apresenta pelo menos um veículo agriculturalmente e/ou farmacêuticamente aceitável da composição e que

compreende veículos para formação de emulsões e/ou suspensões, agentes liofilizantes, agentes surfactantes, agentes diluentes, agentes espalhantes e agentes dispersantes. Os agentes diluentes incluem, por exemplo, água destilada, água estéril, água tratada por osmose reversa, acrescida ou não de nutrientes (fonte de carbono, por exemplo) para a manutenção das cepas de microrganismos.

**[0034]** Em uma concretização, o veículo agriculturalmente e/ou farmacologicamente aceitável da composição compreende veículos para formação de emulsões e/ou suspensões, agentes liofilizantes, agentes surfactantes, agentes diluentes, agentes espalhantes e agentes dispersantes.

**[0035]** Em uma concretização, o veículo agriculturalmente e/ou farmacologicamente aceitável da composição compreende: polissacarídeos (tais como, por exemplo, amilose e amilopectina), água, aminoácidos (tais como, por exemplo, lisina, treonina, metionina e triptofano, dentre outros), óleo vegetal e/ou combinações das mesmas.

**[0036]** Em uma concretização, o veículo agriculturalmente e/ou farmacologicamente aceitável da composição compreende a combinação de: amilose, amilopectina, água, lisina, treonina, metionina, triptofano e óleo vegetal.

**[0037]** Em uma concretização, o veículo agriculturalmente e/ou farmacologicamente aceitável da composição compreende a combinação de: amilose (7g a 21g), amilopectina (18g a 48g), água (9g), lisina (1,2g a 3,6g), treonina (1,2g a 3,6g), metionina (1,2g a 3,6g), triptofano (até 1,8g) e óleo vegetal.

**[0038]** Em uma concretização, o veículo agriculturalmente e/ou farmacologicamente aceitável da composição está na forma de pellets.

**[0039]** O processo de preparação de composição antifúngica compreende as etapas de:

preparar um veículo agriculturalmente e/ou farmacologicamente aceitável; e

adicionar ao referido veículo, pelo menos um microrganismo selecionado das estirpe bacteriana *Streptomyces sp 80*.

**[0040]** Em uma concretização, o processo adicionalmente compreende: o prévio cultivo, em meio de cultivo e condições controladas, de pelo menos um microrganismo da estirpe bacteriana *Streptomyces sp 80*, seguido de adição de solução salina ao referido meio contendo o(s) organismo(s) cultivado(s); e, opcionalmente, transferir a cultura para um meio contendo um preservante, como o glicerol

**[0041]** O processo de controle de fungos em plantas compreende as etapas de aplicação da composição antifúngica sobre plantas.

**[0042]** Em uma concretização, o processo compreende a aplicação da composição sobre sementes de plantas. O processo da invenção proporciona o controle da contaminação por aflatoxinas.

**[0043]** Definição de alguns dos termos empregados no presente pedido de patente

**[0044]** Aminoácidos

**[0045]** O termo, no presente pedido de patente, deve ser entendido como qualquer aminoácido como, por exemplo: ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), alanina (Ala), arginina (Arg), asparagina (Asn), cisteína (Cys), fenilalanina (Phe), glicina (Gly), glutamina (Gln), histidina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), metionina (Met), pirrolisina (Pyl), prolina (Pro), serina (Ser), selenocisteína (Sec), tirosina (Tyr), treonina (Thr), triptofano (Trp) e valina (Val).

**[0046]** Óleo Vegetal

**[0047]** O termo, no presente pedido de patente, deve ser entendido como qualquer óleo que possua origem vegetal. Exemplos não limitantes de óleo vegetal compreendem óleo de soja, óleo de canola, óleo de girassol, óleo de mamona (castor oil), óleo de algodão, dentre outros óleos vegetais que podem ser utilizados como componente de veículo agriculturalmente aceitável e/ou de veículo farmacêuticamente aceitável.

[0048] Polissacarídeos

[0049] O termo, no presente pedido de patente, deve ser entendido como qualquer tipo de polissacarídeo que possa ser empregado na formulação de excipientes agriculturalmente e/ou farmacologicamente aceitáveis. Exemplos não limitantes de polissacarídeos incluem amilose e amilopectina.

[0050] Estirpe bacteriana *Streptomyces sp* 80 ou *Streptomyces sp.* STR80

[0051] O termo, no presente pedido de patente, deve ser entendido como o microrganismo (material biológico) que está devidamente depositado na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria – CBMAI, sob o código da coleção CBMAI número 1612.

### **Exemplo 1. Preparação de Composição**

#### **1. Materiais e métodos empregados nesta concretização**

##### **1.1a. Seleção de estirpe como agente ativo através dos testes de antagonismo de cultura dupla**

[0052] Foram utilizadas seis estirpes de actinomicetos: a *Streptomyces sp* 80 e *Streptomyces sp* Q11 e M7A isoladas de solo sob vegetação de cerrado, no Planalto Central (GOMES et al, 2000a), a *Streptomyces sp* 218 isolada de solo de floresta da Mata Atlântica (SÊMEDO, 2001), e a *Streptomyces sp* 52 previamente isolada de solo de plantação de sisal, na Bahia, a *Streptomyces sp* 70 isolada de solo de Floresta da Mata Atlântica (SOUZA et al, 2006).

[0053] Primeiramente cada uma foi inoculada a 2 cm da borda de uma placa de Petri em meio PDA e incubou-se a 28°C por três dias. Posteriormente, foi adicionado um *plug* de ágar com o fungo crescido por sete dias. Após cinco dias de incubação a 28°C, a inibição foi calculada subtraindo-se a distância (mm) do crescimento do fungo ( $\gamma_0$ ) do crescimento da estirpe de *Streptomyces* ( $\gamma$ ),  $\Delta \gamma = \gamma_0 - \gamma$ , onde  $\Delta \gamma < 5 \text{ mm} = 0$ ;  $\Delta \gamma > 5 \text{ mm} = +$ ;  $\Delta \gamma > 10 \text{ mm} = + +$  e  $\Delta \gamma > 20 \text{ mm} = + + +$  (El-Tarabily et al, 2000). O teste foi conduzido em triplicata (FRÓES et al, 2012).

**[0054]** A estirpe foi selecionada de acordo com tamanho do halo de inibição do crescimento fúngico em placa contendo meio PDA, ou seja, a estirpe de *Streptomyces* que apresentou o maior halo de inibição, após sete dias de incubação a 28°C foi selecionada para as etapas posteriores.

#### **1.1b. Desenvolvimento do inóculo e teste de antagonismo utilizando o inóculo**

**[0055]** A estirpe 80 foi inoculada em placa de Petri contendo meio YMA e incubada a 28°C e depois de cinco dias foi adicionada solução salina 0,85%. Com o auxílio de uma alça, a biomassa foi transferida para criotubo contendo glicerol 80% e armazenada a 4°C. Um composto contendo 99% de ingredientes inertes (amido, água e sais) e 1% do ingrediente ativo foi adicionado da biomassa bacteriana e, após sete dias de incubação a 28°C no escuro, o inóculo foi transferido e armazenado em tubos Falcon de 50 mL.

**[0056]** A estabilidade do inóculo foi determinada de acordo com Souza (2006) da seguinte maneira: a cada 30 dias, um grama do inóculo foi adicionado em tubo contendo 9 mL de solução salina 0,85% estéril e foram feitas diluições seriadas, até a diluição necessária para se obter uma contagem em placa entre 30 e 300 colônias. Os resultados obtidos foram apresentados em UFC por grama de inóculo. O teste de antagonismo utilizando o inóculo foi realizado colocando-se um grama (1 g) de inóculo (com 6 meses de preparo) e adicionado a 2 cm da borda de uma placa de Petri contendo meio PDA. Na extremidade oposta a 2 cm da borda foi adicionado um *plug* de ágar com o fungo e após 10 dias de incubação a 28°C a inibição foi calculada conforme já descrito no item 1.1a. desta concretização.

#### **1.1c. Detalhes quantitativos e qualitativos dos componentes da composição neste exemplo de concretização**

**[0057]** Em relação aos componentes da composição, estão indicados na **Tabela 1** a seguir os dados qualitativos e quantitativos dos componentes da composição antifúngica que foi preparada neste exemplo de concretização:

**Tabela 1.** Componentes da composição antifúngica deste exemplo de concretização

Descrição	Componente	Quantidade (em gramas, para cada 100 gramas totais da composição)
Veículo (agriculturalmente e/ou farmacêuticamente aceitável)	Amilose	14 ± 7
	Amilopectina	33 ± 15
	Lisina	2,4 ± 1,2
	Treonina	2,4 ± 1,2
	Metionina	2,4 ± 1,2
	Triptofano	0,6 ± 1,2
	Água	9
	Óleo Vegetal	2g (aproximadamente)
Microrganismo	<i>Streptomyces</i> str 80	0,5 ± (0,4 a 0,5)
Solvente	Água	33,5 g

**[0058]** Em relação à Tabela 1, amilose e amilopectina são polissacarídeos e que podem ser substituídos por outros polissacarídeos que possam constituir um veículo agriculturalmente e/ou farmacêuticamente aceitável. Os aminoácidos lisina, treonina, metionina e triptofano também podem ser substituídos por aminoácidos com propriedades químicas / físico químicas semelhantes, assim como o óleo vegetal.

**[0059]** Além disso, deve-se observar que as informações quantitativas podem variar dependendo da formulação a ser obtida. Neste exemplo de concretização, cada componente da composição pode variar dentro de uma faixa quantitativa mas há também a possibilidade de ocorrer variações quantitativas maiores. Por exemplo, em vez de 2,4 gramas de aminoácido para cada 100 gramas de composição, haver apenas 1 grama de aminoácido para cada 100 gramas de composição ou então 4 gramas de aminoácido para 100 gramas de composição. Ou seja, as quantidades reveladas pela Tabela 1 não limitam as variações quantitativas da composição.

### **Exemplo 2. Processo de Controle de Fungos**

### **1.1c. Contagem de fungos do solo antes e após aplicação do inóculo**

**[0060]** Foi realizado um experimento para contagem de fungos do solo de acordo com HORN et al. (1995) com modificações. O solo foi passado em peneira com abertura de 20 mesh e incubado em forno a 80°C para secagem por dois dias. Posteriormente, amostras de 10g de solo foram homogeneizadas com 30 mL de água destilada em vórtex por 2 minutos. Foram feitas diluições seriadas em tubos contendo salina e 0,2 mL das três primeiras diluições foram plaqueadas em meio Dicloran Rosa Bengala modificado com 3% de NaCl, incubadas por sete dias a 25°C. As colônias sugestivas de *Apergillus* foram identificadas diretamente nas placas de acordo com HORN et al. (1995) e as colônias que não pudessem ser identificadas não foram contadas. Após contagem inicial de UFC/g de solo, outros quatro ensaios foram montados. Amostras de 10g de solo foram adicionadas de esporos de fungo (suspensão de esporos com contagem conhecida) em concentrações de 10x, 100x e 1000x da contagem inicial de fungos no solo. E no quarto ensaio, amostras de 10g de solo contendo 1000x a contagem inicial de fungos, foram adicionadas de 1g do inóculo. Todos os tubos foram incubados por dez dias a 28°C no escuro e posteriormente foram feitas diluições seriadas para contagem das colônias em placa de Petri.

### **1.1d. Experimento piloto e método de crescimento de amendoim**

**[0061]** Foi realizado um piloto do experimento em casa de vegetação, para que pudessem ser conhecidas, na prática, as condições para o experimento. Para tal, foram colocadas para germinar duzentas sementes do cultivar IAC Tatu-ST, em sementeira de fundo cônico (de 3,5cm x 3,5cm) com capacidade para 10 g de solo cada. A irrigação foi por gotejamento e pontual, portanto cada vaso recebeu água individualmente e pela raiz, e por dia cada vaso recebeu 200 mL de água. O solo utilizado foi produzido pela West Garden, localizada em São Paulo – SP, e cuja embalagem apresenta a informação de isento de pragas. Após a germinação (cinco dias), as sementes

foram colocadas em vasos plásticos nº 04 (4,8 L), mantidas sob iluminação natural em casa de vegetação e com irrigação pelo sistema automatizado.

#### **1.1e. Experimento para avaliar o efeito do inóculo no crescimento de amendoim e *A. parasiticus***

**[0062]** Este experimento foi conduzido em casa de vegetação, com irrigação automática e solo proveniente de plantação de cana-de-açúcar da região de Ribeirão Preto – SP. Inicialmente, 150 sementes de amendoim cultivar IAC Tatu-ST foram adicionadas em três sementeiras de fundo cônico (de 3,5cm x 3,5cm) com capacidade para 50 sementes e 10g de solo em cada orifício. Após a germinação as sementes viáveis foram retiradas e transferidas para vasos de plástico. Foram consideradas viáveis aquelas que emitiram radícula em aproximadamente cinco dias. Os vasos com as plantas foram dispostos em um delineamento de blocos ao acaso. Um grama do inóculo foi adicionado na superfície de cada vaso aproximadamente 60 dias após a emergência das plântulas. A infestação do solo com o fungo foi realizada com a adição de 10 mL de uma suspensão de esporos de *A. parasiticus* contendo  $10^8$  esporos/mL. Posteriormente, o sistema de irrigação foi acionado para facilitar a infiltração do inóculo e do fungo no solo. O desenho experimental foi: controle positivo (CP) – sementes não tratadas – 50 sementes em 50 vasos; controle negativo (CN) – sementes plantadas em solo infestado pelo fungo – 50 sementes em 50 vasos; teste (T) – sementes plantadas em solo infestado pelo fungo e tratado com o inóculo – 50 sementes, em 50 vasos. O plantio foi realizado em meados de julho/2012 e a colheita realizada em meados de novembro/2012. As condições de cultivo foram as mesmas utilizadas no experimento piloto (item 5.5).

### **Exemplo 3. Processo de Controle de Aflatoxinas**

#### **1.1f. Análise qualitativa e quantitativa de aflatoxinas no amendoim**

**[0063]** Para a determinação das aflatoxinas em amendoim *in natura* por cromatografia em camada delgada foi utilizado o método referido por PROBST e COTTY (2012). Cada amostra de 50g foi triturada em multiprocessador,

depois transferida para um Erlenmeyer de 500 mL com 270 mL de metanol e 30 mL de solução aquosa de cloreto de potássio 4%. Após a mistura passar por um agitador horizontal a 160 rpm por 1 dia, filtrou-se a mistura em papel de filtro qualitativo, e 150 mL de sulfato de cobre 30% foram adicionados. Novamente o meio foi filtrado e repassado para um funil de separação de 500 mL com 150 mL de clorofórmio para a partição líquido-líquido. A fase clorofórmica (inferior) foi coletada e colocada em um concentrador de amostras com temperatura máxima de 55 °C. O resíduo obtido após a concentração foi resuspenso, com auxílio de um agitador de tubos Vortex<sup>®</sup> com 200 µL de clorofórmio e foi utilizado para identificação e quantificação das aflatoxinas por cromatografia de camada delgada.

**[0064]** A amostra e as soluções padrões foram aplicadas, com auxílio de uma microseringa de 10 µL, em cromatoplaça de alumínio sílica gel 60 Merck<sup>®</sup> (sem indicador fluorescente, 20 x 20 cm, 02 mm de espessura) e colocada uma cuba de vidro contendo clorofórmio:acetona (9:1). O padrão utilizado foi *Aflatoxin Standard Mix*, 5x1 mL, Benzeno:Acetonitrila (46300-U Sigma-Aldrich), sem necessidade de diluição. Os cromatogramas foram visualizados pelo aparelho *Camag TLC Scanner 3* e avaliados utilizando o programa *winCATS Planar Chromatography Manager*.

### **1.1g. Análise estatística dos dados**

**[0065]** As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad InStat 3.06 (*GraphPad Software, San Diego, California, USA*). Para cada tratamento (CN, CP e T1) foram utilizados 21 vasos. Os dados foram primeiramente submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e posteriormente foram realizadas as análises de variância (ANOVA) do fator principal, inóculo. Em todos os testes o nível de significância foi de 5%.

## **2.1 Resultados obtidos nesta concretização**

### **2.1a. Confirmação da espécie do fungo**

**[0066]** A fim de confirmar a classificação dos isolados dentro do grupo-espécie *A. flavus*, foi realizado o crescimento em meio ADM conforme descrito

no item 5.1. Após três dias de incubação em estufa a 25°C, foi observada a alteração da pigmentação do verso do meio, que passou de amarelo para alaranjado, indicando que os isolados podem pertencer ao grupo-espécie *A. flavus*. No anexo 1 é possível comparar a pigmentação do meio de cultura sem o fungo (B) com as triplicatas do meio ADM inoculado com o fungo (A).

**[0067]** Como apresentado no anexo 2, é possível através desta técnica de *plugs* de ágar em TLC verificar se o fungo é produtor de aflatoxinas, como neste caso.

### **2.1b. Teste de antagonismo de cultura dupla**

**[0068]** Os testes de cultura dupla em placas de Petri revelaram que todas as estirpes, exceto a estirpe 52 foram capazes de inibir o crescimento fúngico após sete dias de incubação, reafirmando portanto o potencial deste grupo como agentes de controle biológico. De acordo com a tabela 2, é possível verificar que a estirpe 52 não apresentou halo de inibição, sendo portanto considerado resultado neutro (0). As estirpes M7A e 70 apresentaram comportamento semelhante quanto a inibição e halos superiores a 1 mm. Porém as estirpes 80 e Q11 foram as que inibiram de forma mais significativa o crescimento do fungo com halo de inibição acima de 2 mm. Analisando-se o anexo 3, é possível observar que não há qualquer pigmentação nos meios de cultura, exceto em (a) onde é possível visualizar ao redor da colônia bacteriana uma cor alaranjada. O controle mostra como o fungo forma um tapete de crescimento na placa de Petri em contraste com o pouco crescimento observado nos testes (exceto em c).

**Tabela 2.** Teste de seleção da estirpe de *Streptomyces*

<b>Estirpes <i>Streptomyces</i></b>	<b>Antagonismo</b>
M7A	++
70	++
52	0
218	++
Q11	+++

### **2.1c. Viabilidade do inóculo, vida de prateleira**

**[0069]** Como se pode observar no anexo 4, o teste com o inóculo revelou que a estirpe 80 apresentou-se viável preservando inclusive sua capacidade de inibição do crescimento fúngico mesmo após dez meses de estocagem. Comparando o teste com o controle, é notado como o crescimento do fungo foi inibido pelo inóculo. Este resultado demonstra não apenas a eficiência da bactéria como agente ativo do inóculo, mas também reforça a estabilidade do inóculo. O anexo 5 mostra como o inóculo foi armazenado e preservado ao longo dos dez meses em temperatura ambiente (A) e é possível ver o crescimento da bactéria em placa de Petri após diluição do inóculo em solução salina (B).

**[0070]** A estabilidade do inóculo foi analisada através de contagem de UFC durante dez meses, em intervalos de 30 dias e após estocagem a temperatura ambiente. Pode-se constatar que o inóculo apresentou viabilidade durante todo tempo de estocagem (figura 1). Nos três primeiros meses, o inóculo permaneceu totalmente estável e apresentou pequeno declínio após quatro meses quando novamente voltou a ficar estável até o sexto mês. No mês de junho a contagem apresenta novo declínio e se estabiliza no mês seguinte. De agosto a outubro a contagem das bactérias apresenta pequeno declínio e ao final dos dez meses de estocagem o inóculo apresenta contagem superior a  $10^8$  UFC/g de inóculo.

### **2.1d. Crescimento de amendoim em casa de vegetação – experimento piloto**

**[0071]** Através da realização de um experimento piloto, condições como tempo e frequência de irrigação das plantas, tempo de germinação das sementes, floração das plantas, produção e amadurecimento das vagens e ciclo após germinação, foram conhecidas e utilizadas posteriormente no experimento de teste do inóculo em casa de vegetação. O plantio foi realizado

em meados de julho e a colheita realizada em meados de novembro, confirmando o ciclo de cento e vinte dias descrito na literatura. Desta forma, verificou-se que a irrigação realizada em dois períodos do dia (manhã e tarde) e por cinco minutos (200 mL de água por dia) proporcionou crescimento adequado das plantas e manteve a umidade do solo suficientemente controlada a ponto de não serem vistos a olho nu proliferação de fungos. O tempo médio de germinação das sementes foi de cinco dias. Após cinco dias houve emissão dos folíolos e entre vinte e vinte e cinco dias houve a floração, e da floração até a formação das primeiras vagens foram, aproximadamente, sete dias.

### **2.1e. Análise qualitativa de aflatoxinas – experimento piloto**

**[0072]** Após colheita e preparo das sementes de amendoim conforme item 1.1d., foram realizadas cromatografias de camada fina para identificação e quantificação das aflatoxinas nos grãos. No anexo 2 é possível observar as quatro aflatoxinas separadas em placa cromatográfica e suas respectivas posições, na ordem de cima para baixo: AFB1, AFB2, AFG1, AFG2. A amostra apresentou duas bandas, que se referem às aflatoxinas AFB1 e AFG1 do padrão.

### **2.1f. Contagem de fungo no solo antes e depois da aplicação do inóculo**

**[0073]** A figura 2 mostra uma contagem inicial de 10 UFC/g de solo (ponto 1), quando foi realizado o isolamento de fungos do solo proveniente de Ribeirão Preto – SP. Na medida em que há infestação artificial do solo com concentrações diferentes de uma suspensão de esporos do fungo, observa-se um aumento um aumento da contagem de UFC/g de solo. No ponto 2, onde verifica-se uma contagem em torno de 20 UFC/g de solo, o solo foi infestado com 10x a contagem inicial de fungos. No ponto 3, a contagem sobe para quase 40 UFC/g de solo após infestação artificial com 100x a contagem inicial. No ponto 4, a contagem se dá em quase 100 UFC/g de solo, quando a infestação artificial foi de 1000x. No ponto 5 (quando o inóculo foi adicionado) a contagem apresenta um decréscimo abrupto e se torna bastante semelhante à

contagem inicial (1), que representa uma diminuição de 80% em comparação com o ponto 4. Neste ensaio houve adição do inóculo no solo infestado artificialmente com 1000x a contagem inicial de fungos. No anexo 6, observam-se as colônias bem definidas, sugestivas da seção *Flavi*. Este resultado mostra claramente a capacidade do inóculo em diminuir o número de fungos capazes de produzir aflatoxinas nos solos.

### **2.1g. Experimento de controle biológico com amendoim cultivar IAC Tatu-ST e inóculo**

**[0074]** Os resultados dos testes de antagonismo com o inóculo, estabilidade do inóculo, contagem de fungos do solo e o piloto puderam indicar que um experimento de controle biológico *in vivo* seria viável. Conhecidas as condições de crescimento da planta de amendoim do experimento piloto, foram montados três ensaios conforme citado no item 1.1e..

**[0075]** O tempo médio de germinação das sementes foi de cinco dias e, após dezessete dias, houve emissão dos folíolos. O período de floração foi entre vinte e cinco a trinta dias após a germinação e da floração até a formação das vagens foram, aproximadamente, dez dias.

**[0076]** As plantas apresentaram boas condições de crescimento durante todo o experimento, com as folhas praticamente íntegras. Por vezes, as folhas apresentaram pequenos pontos pretos, tratando-se possivelmente de fungos. Este fato não comprometeu o crescimento das plantas ou a produção de sementes.

**[0077]** As plantas do CP se apresentaram conforme o esperado, ou seja, como referência dos números e pesos aferidos. Foi possível observar (figura 3) que o peso do amendoim foi semelhante nas plantas do controle positivo e com o inóculo, e apresentou-se menor nas plantas cujo solo foi infestado com o fungo. O peso seco da raiz revelou-se bastante semelhante com um pequeno aumento nas plantas com o fungo, enquanto que o peso seco da parte aérea não sofreu praticamente nenhuma alteração, com um pequeno aumento apenas nas plantas do controle positivo. Também se mostra (figura 4) que

houve homogeneidade no número de vagens por planta no controle positivo e nas plantas com o inóculo e uma diminuição do número de vagens nas plantas que receberam o fungo. Além disso, observa-se na figura 4 que o número de flores por planta sofreu um pequeno aumento nas plantas adicionadas do inóculo. Os resultados demonstram que o inóculo não apresentou qualquer efeito negativo no crescimento e desenvolvimento da planta, bem como no crescimento e desenvolvimento dos grãos de amendoim, apresentando valores bastante semelhantes aos do controle positivo. Quanto à quantificação de aflatoxinas nos grãos, não foi possível obter um resultado conclusivo, pois houve problemas relacionados à técnica de cromatografia de camada fina, o que impossibilitou as análises das amostras. O programa GraphPad, através do teste Kolmogorov-Smirnov, mostrou que os dados apresentaram uma distribuição normal e, portanto, foi possível uma análise estatística paramétrica em todos os dados. Através de uma comparação intergrupos, o teste *t* de Student comparou as diferenças nas variáveis estudadas entre os três grupos.

#### **Exemplo 4. Estabilidade de Composição**

##### **2.1h. Viabilidade e estabilidade do inóculo**

**[0078]** A composição da invenção foi avaliada quanto à estabilidade. O inóculo permaneceu viável após dez meses de preparo, mesmo sendo estocado em temperatura ambiente (20 °C –35 °C). Os inóculos, geralmente, apresentam estabilidade a baixas temperaturas (4 ou 5°C) como destaca YIN et al (2008). Desse modo, o inóculo produzido apresenta melhor estabilidade em relação aos produtos disponíveis no mercado. O biofungicida T34 Biocontrol (Fargro®), cujo agente ativo é a estirpe T34 do fungo *Trichoderma asperellum*, e utilizado contra a murcha do Fusarium, apresenta recomendação de estocagem a 4°C. Já o biofungicida Rhapsody® ASO™ QST 713, à base de uma estirpe da bactéria *Bacillus subtilis*, apresenta recomendação de estocagem em temperatura ambiente, mas deve ser ressaltado que o agente ativo é liofilizado, contribuindo para sua estabilidade.

**[0079]** Semelhantemente, o AflaGuard® também é estocado em temperatura ambiente, porém a durabilidade do produto estocado é de apenas quatro meses. Desse modo, a composição da presente invenção proporciona maior estabilidade em condições de temperatura ambiente.

**[0080]** Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outros variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.

### Reivindicações

#### **COMPOSIÇÃO ANTIFÚNGICA, PROCESSO PARA SUA OBTENÇÃO E PROCESSO PARA CONTROLE DE FUNGOS EM PLANTAS**

1. Composição antifúngica **caracterizada** por compreender: um veículo agriculturalmente ou farmacêuticamente aceitável; e o microrganismo da estirpe bacteriana *Streptomyces sp 80*.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1 **caracterizada** pelo fato de que o referido microrganismo está na concentração de 0,1% a 10% em massa.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo veículo agriculturalmente e/ou farmacêuticamente aceitável ser uma combinação de: pelo menos um polissacarídeo, pelo menos um aminoácido, água e óleo vegetal.

4. Composição, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo veículo agriculturalmente e/ou farmacêuticamente aceitável ser a combinação de: amilose, amilopectina, água, lisina, treonina, metionina, triptofano e óleo vegetal.

5. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo veículo agriculturalmente e/ou farmacêuticamente aceitável ser selecionado do grupo que consiste de: veículos formadores de emulsões e/ou suspensões, agentes liofilizantes, agentes surfactantes, agentes diluentes, agentes espalhantes e agentes dispersantes.

6. Composição, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo veículo agriculturalmente e/ou farmacêuticamente aceitável ser um agente diluente.

7. Processo de controle de fungos em plantas **caracterizado** por compreender aplicar a composição antifúngica, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, sobre plantas.

8. Processo, de acordo a reivindicação 7, **caracterizado** pela aplicação da composição antifúngica ser sobre sementes de plantas.

9. Processo de acordo com a reivindicação 7 ou 8 **caracterizado** por ser para o controle de contaminação por aflatoxinas.

10. Processo de preparação de composição antifúngica **caracterizado** por compreender as etapas de:

preparar um veículo agriculturalmente e/ou farmacêuticamente aceitável; e

adicionar ao referido veículo o microrganismo da estirpe bacteriana *Streptomyces sp 80*.

11. Processo, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** por adicionalmente compreender o prévio cultivo, em meio de cultivo e condições controladas, do microrganismo selecionado da estirpe bacteriana *Streptomyces sp 80*, seguido de adição de solução salina ao referido meio contendo o(s) organismo(s) cultivado(s); e, opcionalmente, transferir a cultura para um meio contendo um preservante.

12. Processo, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que o referido preservante é o glicerol.

### FIGURAS

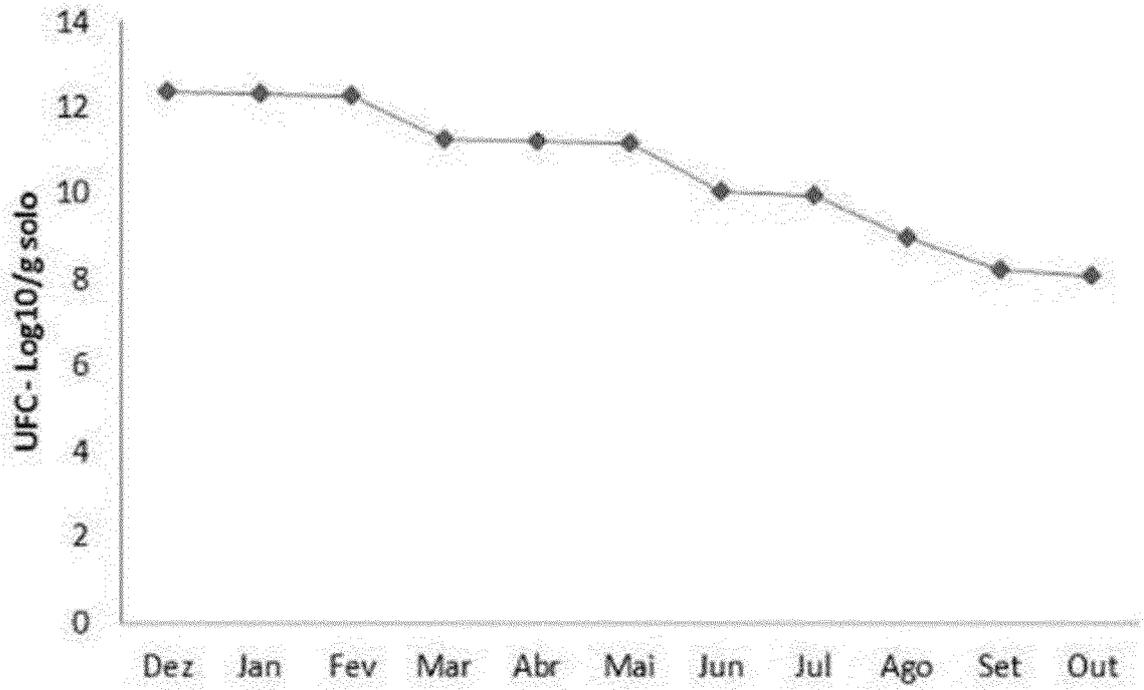


Figura 1

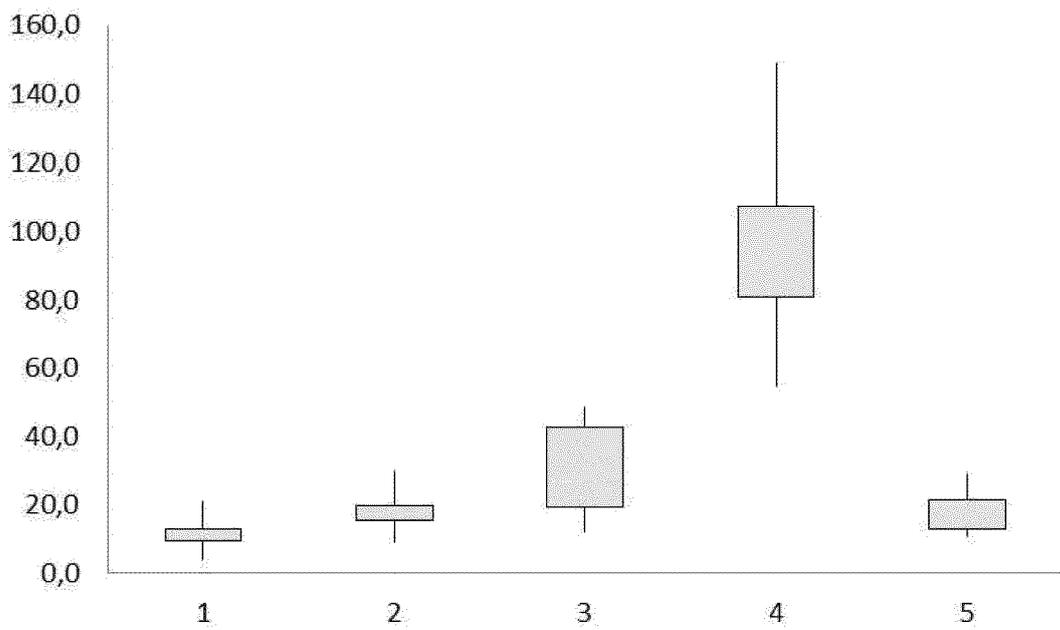


Figura 2

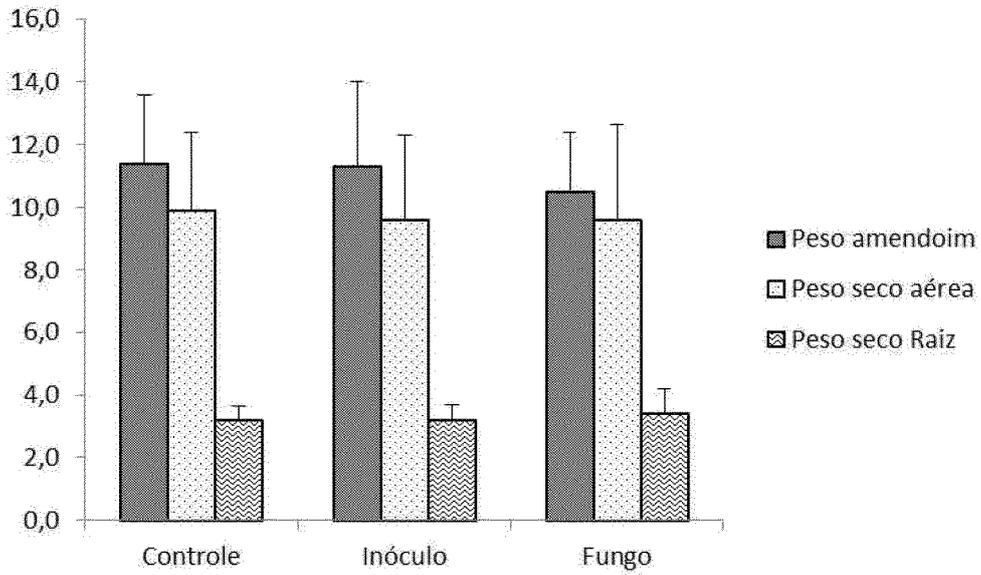


Figura 3

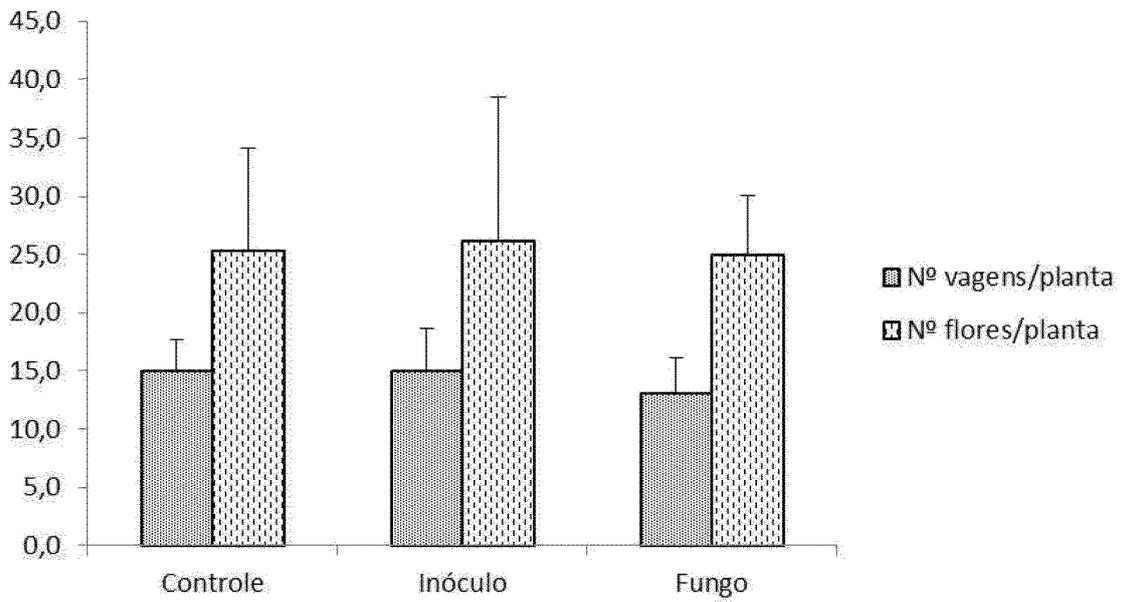


Figura 4

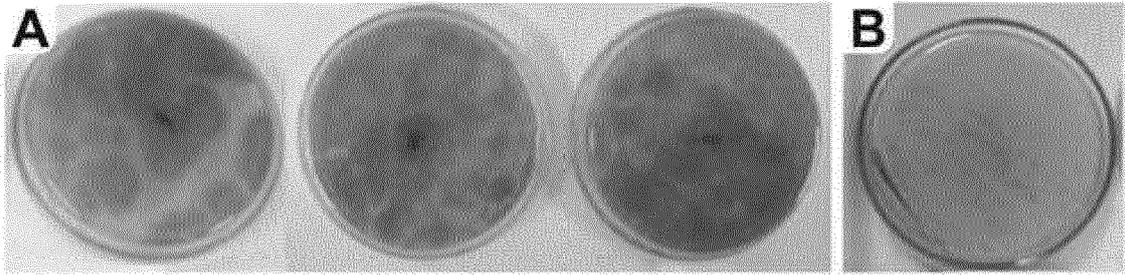


Figura 5

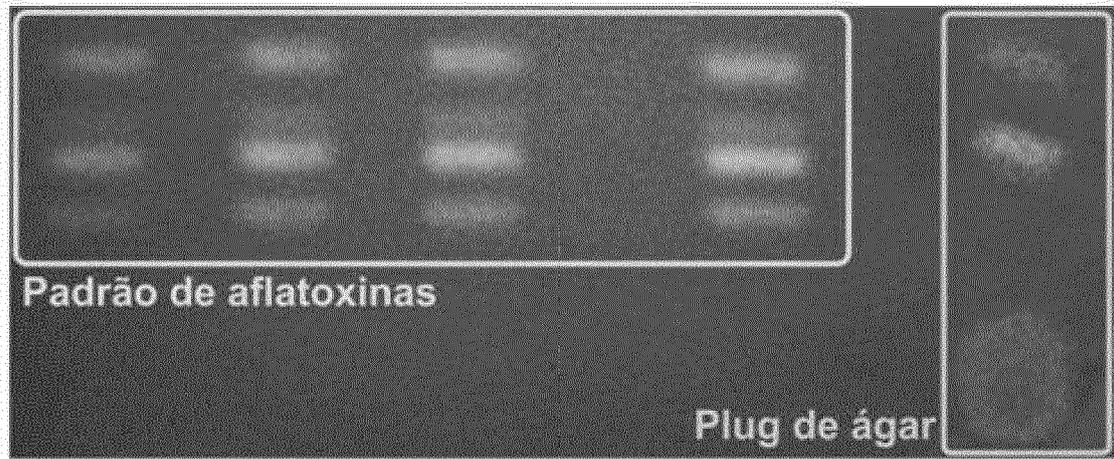


Figura 6

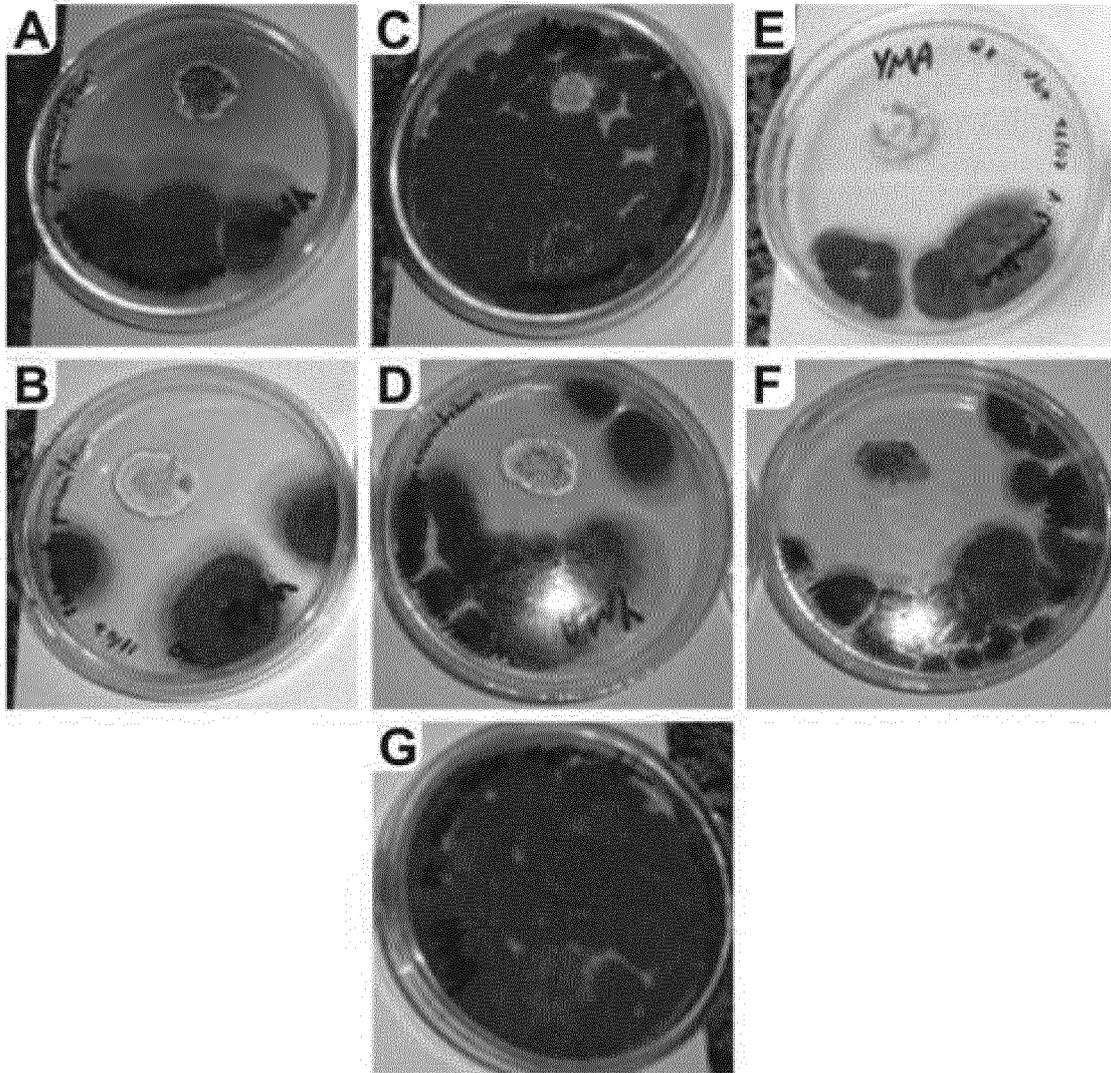


Figura 7

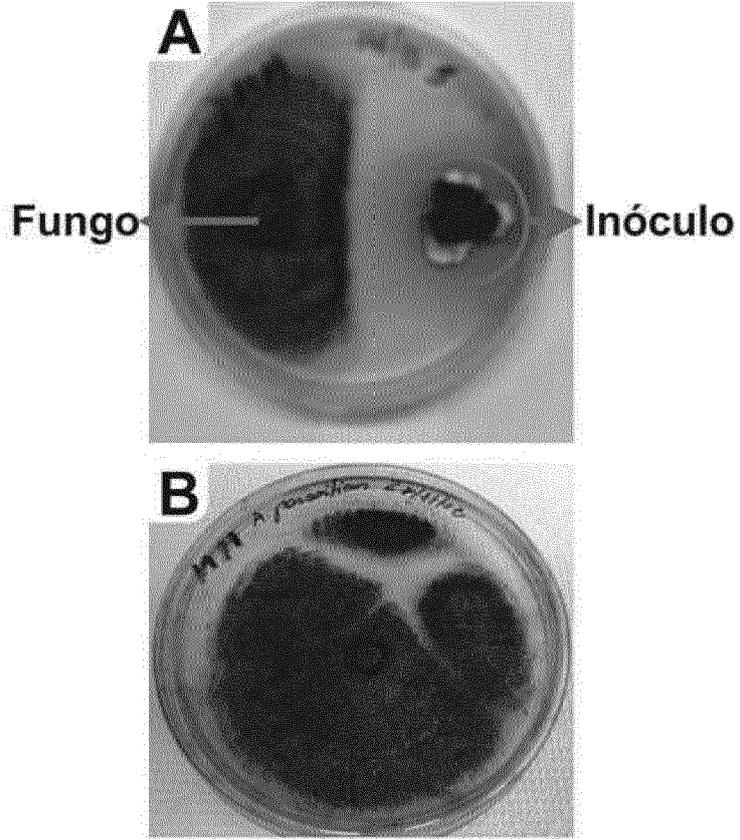


Figura 8

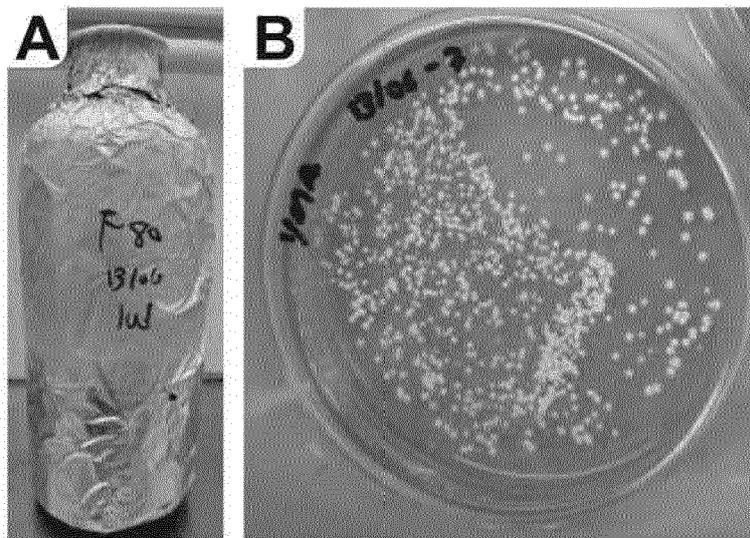


Figura 9

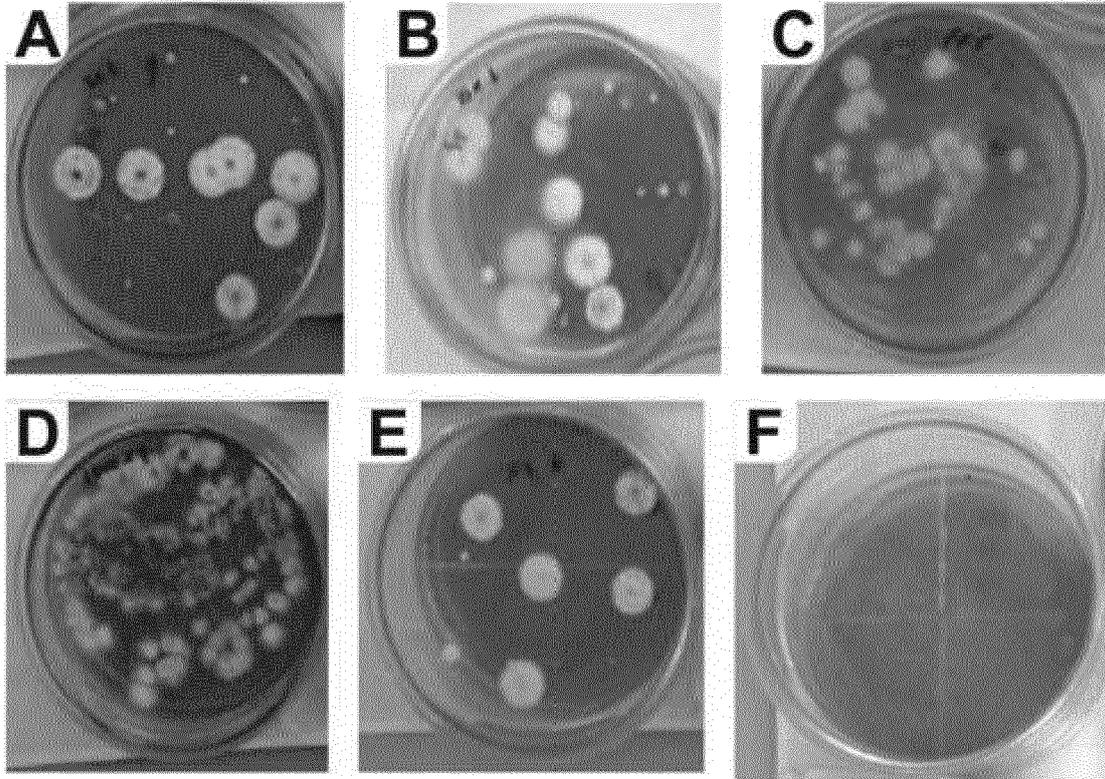


Figura 10

**Resumo****COMPOSIÇÃO ANTIFÚNGICA, PROCESSO PARA SUA OBTENÇÃO E  
PROCESSO PARA CONTROLE DE FUNGOS EM PLANTAS**

A presente invenção proporciona apresenta um melhorado meio de controle de fungos, notadamente fungos associados à produção de aflatoxinas e/ou fungos associados à produção de aflatoxinas em plantas, tendo como conceito inventivo comum o uso do microrganismo selecionado da estirpe bacteriana *Streptomyces sp* 80 e combinações dos mesmos.

A presente invenção também proporciona uma composição compreendendo os referidos microrganismos em um veículo agriculturalmente e/ou farmacêuticamente aceitável. São também revelados um processo para a obtenção da referida composição e um processo de controle de fungos em plantas.