



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DIOGO GIMENES PEDROLLO

**DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE
Trichoderma atroviride PARA PRODUÇÃO DE INIBIDORES
DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

Londrina
2013

DIOGO GIMENES PEDROLLO

**DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE
Trichoderma atroviride PARA PRODUÇÃO DE INIBIDORES
DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Raul Jorge Hernan Castro Gómez

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P372d Pedrollo, Diogo Gimenes.

Determinação das condições de cultivo de *Trichoderma atroviride* para produção de inibidores de fungos fitopatogênicos / Diogo Gimenes Pedrollo. – Londrina, 2013.
75.f. : il.

Orientador: Raul Jorge Heman Castro Gómez.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Trichoderma – Teses. 2. Inibidores – Teses. 3. Fungos – Biotecnologia – Teses. 4. Microbiologia industrial – Teses. I. Castro-Gómez, Raúl Jorge Heman. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos. III. Título.

CDU 641:579

DIOGO GIMENES PEDROLLO

DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE *Trichoderma atroviride* PARA PRODUÇÃO DE INIBIDORES DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Raúl Jorge Hernan Castro
Gómez
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Cláudio Takeo Ueno
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –
UTFPR

Prof. Dr. Hélio Hiroshi Suguimoto
Universidade do Norte do Paraná – UNOPAR

Londrina, 21 de junho de 2013.

Dedico este trabalho aos meus pais e à
minha irmã por todo o incentivo, apoio e
carinho.
Fontes de exemplo, carinho e amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Raúl Jorge Hernan Castro-Gómez, pela orientação, dedicação, estímulo à criatividade, apoio, paciência e confiança.

À Universidade Estadual de Londrina – UEL e todos os professores da Graduação em Agronomia e do Programa de Mestrado e do Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, em especial à Profa Elisa Yoko Hirooka, pelo aprendizado e troca de experiências e informações.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa – CNPq, pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca examinadora: Cláudio Takeo Ueno, Hélio Hiroshi Suguimoto, Wilma Spinosa e Sandra Garcia, por terem aceitado engrandecer meu trabalho com opiniões e sugestões.

Aos colegas de mestrado e laboratório pelos momentos vividos, experiências trocadas, breaks, momentos de descontração e ajuda durante todo meu aprendizado no Programa de Mestrado.

Aos técnicos de laboratório e prestação de serviço: Elza, Patrícia, Berenice, Nelson, Rubens, Alessandra, Maria Alice, Célia, Sandra Rezande e, em especial, à Neusa, pelo apoio.

Aos grandes amigos de faculdade Acácio Miotto, Bruno Lena, Bruno Pereira, Conrado Fioretto, Josiane Fukami, Lidiane Miotto, Mayara Murata, Renata Sobottka e Suzana Nakatani pelos ótimos anos de amizade vividos.

Aos meus amigos londrinenses ou àqueles cujos nossos caminhos se cruzaram em Londrina. Muito obrigado pelo carinho e amizade ao longo dos anos.

Às minhas queridas amigas Fernanda B., Thaís e Lara, pelo apoio, carinho e compreensão.

À Fernanda M. F. pelos momentos carinho, apoio, amor e compreensão dos últimos meses.

Aos meus pais por todo auxílio, apoio, conselhos, paciência, confiança, carinho, amor e compreensão.

À minha irmã, por quem tenho imenso amor e carinho.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a conclusão deste trabalho.

PEDROLLO, D. G. **Determinação das condições de cultivo de *Trichoderma atroviride* para produção de inibidores de fungos fitopatogênicos.** 2013. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2013.

RESUMO

Grandes perdas e prejuízo econômico no setor agrícola são causados por doenças de plantas, cujos fungos são os principais agentes etiológicos. Por sua capacidade de produzir metabólitos antifúngicos, *Trichoderma atroviride* destaca-se como alternativa ao uso de agrotóxicos no combate a fitopatógenos de importância neste setor. O objetivo deste trabalho foi determinar as melhores condições de cultivo de *T. atroviride* para a produção de metabólitos antifúngicos, utilizando farelo de trigo e bagaço de cana como substratos. Foram realizados experimentos multifatoriais da Análise de Superfície de Resposta para definir o melhor solvente extrator, traços minerais, concentrações de extrato de levedura e de glicose, teor de umidade do substrato, temperatura e tempo de cultivo. A resposta foi a inibição de *Diplodia maydis*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium moniliforme* e *Rhizoctonia solani*, em Ágar Batata Dextrose com os antifúngicos. Utilizou-se o programa “Statistica 7.0” para análise dos dados. Os metabólitos antifúngicos apresentaram inibição contra todos os fitopatógenos estudados, sendo acetato de etila o melhor solvente extrator. Os minerais adicionados para ambos os substratos (g/kg) e as condições de cultivo foram definidas em: 0,1 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,01 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 de $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,1 de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 5,0 de KCl a 27°C por 4 dias. Os melhores teor de umidade do substrato e concentração de glicose e de extrato de levedura variaram conforme o substrato em que *T. atroviride* foi cultivado e o microrganismo a ser inibido. As inibições obtidas utilizando farelo de trigo como substrato foram de 64,32%, para *D. maydis*, 49,40% para *C. gloeosporioides* e 53,90% para *F. moniliforme*. Já no uso de bagaço de cana de açúcar, foram obtidas inibições de até 61,69% para *C. gloeosporioides* e 70,31% para *R. solani*. A inibição fúngica total pode ser alcançada aumentando-se a concentração de antifúngicos utilizados. Além dos fungos estudados, os metabólitos de *T. atroviride* possivelmente inibem diversos outros fungos de importância econômica, podendo ser utilizados em futuras pesquisas para aplicações a nível comercial como no tratamento de sementes, cultivo a campo e pós-colheita.

Palavras-chave: Trichoderma. Diplodia. Colletotrichum. Fusarium, Rhizoctonia. Atividade antifúngica.

PEDROLLO, D. G. **Determination of *Trichoderma atroviride* culture conditions for production of phytopathogenic fungi inhibitors**. 2013. 75 p. Dissertation (Master's Degree in Food Science) – State University of Londrina, Londrina. 2013.

ABSTRACT

Large losses and economic damage in the agricultural sector are caused by plant diseases, being fungi the main etiological agents. For its ability to produce antifungal metabolites, *Trichoderma atroviride* has emerged as an alternative to the use of pesticides to combat important pathogens in this sector. The aim of this study was to determine the best growing conditions for *T. atroviride* to produce antifungal metabolites using wheat bran and sugar cane bagasse as substrates. Multifactorial Surface Response Analysis was used to define the best extractor solvent, mineral traces, concentrations of yeast extract and glucose, substrate moisture content, temperature and time of cultivation. The response variable was inhibition percentage of *Diplodia maydis*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium moniliforme* and *Rhizoctonia solani* in Potato Dextrose Agar with antifungal metabolites. "Statistica 7.0 software" was user for data analysis. The antifungal metabolites showed inhibition against all pathogens studied, ethyl acetate the best solvent extractor. The minerals added to both substrates (g/kg) and culture conditions were set at: 0,1 of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,01 of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 of $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,1 of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 of $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 5,0 of KCl at 27 ° C for 4 days. The best substrate moisture and glucose and yeast extract concentration varied according to the substrate in which *T. atroviride* was cultured and the microorganism to be inhibited. The inhibitions obtained using wheat bran as the substrate were 64.32% for *D. maydis*, 49.40% for *C. gloeosporioides* and 53.90% for *F. moniliforme*. For sugarcane bagasse, the inhibitions obtained were 61.69% for *C. gloeosporioides* and 70.31% for *R. solani*. The total fungi inhibition can be achieved by increasing the concentration of antifungal utilized. In addition to the studied molds, *T. atroviride* metabolites possibly inhibit several other fungi of economic importance, and may be used in future research to applications in commercial level as seeds treatment, crop field and postharvest.

Key words: *Trichoderma*. *Diplodia*. *Colletotrichum*. *Fusarium*. *Rhizoctonia*. Antifungal activity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ilustração de como foram mensuradas as colônias fúngicas33
- Figura 2.** Ajuste dos dados do desenho experimental Plackett-Burman de 11 fatores. Valores de inibição calculados vs. valores de inibição observados. $R^2 = 0,8064$. Resposta: inibição de *D. maydis*.....44
- Figura 3.** Ajuste dos dados do desenho experimental Fatorial Fracionado 2^{5-1} . Valores de inibição calculados vs. valores de inibição observados. $R^2 = 0,7697$. Resposta: inibição de *D. maydis* 50
- Figura 4.** Exemplos de gráficos de superfície de contorno do planejamento experimental Fatorial Fracionado 2^{5-1} . Resposta: inibição de *D. maydis*..... 52
- Figura 5.** Ajuste dos dados do desenho experimental Box-Behnken de 3 fatores. Valores de inibição calculados vs. valores de inibição observados. Resposta: *D. maydis* ($R^2 = 0,9185$), *C. gloeosporioides* ($R^2 = 0,6809$) e *F. moniliforme* ($R^2 = 0,7801$)57
- Figura 6.** Gráficos de desejabilidade de concentração de glicose e extrato de levedura e teor de umidade de substrato. Desenho experimental Box-Behnken de 3 fatores. Resposta: inibição de *D. maydis* ($R^2 = 0,9185$), *C. gloeosporioides* ($R^2 = 0,6809$) e *F. moniliforme* ($R^2 = 0,7801$)58
- Figura 7.** Ajuste dos dados do desenho experimental Central Composto 2^2 . Valores de inibição calculados vs. valores de inibição observados. Resposta: inibição de *C. gloeosporioides* ($R^2 = 0,8869$) e *R. solani* ($R^2 = 0,8204$)64
- Figura 8.** Gráficos de desejabilidade de concentração de glicose e extrato de levedura. Desenho experimental Central Composto 2^2 . Cultivo de *T. atroviride* em bagaço de cana de açúcar moído. Resposta: inibição de *C. gloeosporioides* ($R^2 = 0,8869$) e *R. solani* ($R^2 = 0,8204$)65
- Figura 9.** Superfície de contorno do Desenho Experimental Central Composto 2^2 . Cultivo de *T. atroviride* em bagaço de cana de açúcar moído. Resposta: inibição de *C. gloeosporioides* ($R^2 = 0,8869$) e *R. solani* ($R^2 = 0,8204$)66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Variáveis independentes e seus respectivos níveis estudados no desenho experimental Plackett-Burman de 11 fatores no cultivo de <i>T. atroviride</i>	35
Tabela 2.	Variáveis independentes e níveis utilizados no desenho experimental Fatorial Fracionado 2^{5-1} no cultivo de <i>T. atroviride</i>	37
Tabela 3.	Variáveis independentes e seus respectivos níveis estudados no desenho experimental Box-Behnken de 3 fatores no cultivo de <i>T. atroviride</i>	38
Tabela 4.	Variáveis independentes e seus respectivos níveis estudados no desenho experimental Central Composto 2^2 no cultivo de <i>T. atroviride</i>	39
Tabela 5.	Desenho experimental Plackett-Burman de 11 fatores. Tempo de cultivo e concentração de glicose fixados em 7 dias e 3 g/100 g de substrato, respectivamente. Resposta: inibição de <i>D. maydis</i> para extrato de cada solvente. Abaixo, coeficientes de determinação (R^2).....	42
Tabela 6.	Comparação de melhor solvente entre hexano e acetato de etila. Uso do teste t de Student ao nível de confiança de 95 % ($\alpha=95\%$).....	43
Tabela 7.	ANOVA do desenho experimental Plackett-Burman de 11 fatores. Valores de p e efeitos dos fatores. Resposta: inibição de <i>D. maydis</i>	46
Tabela 8.	Desenho experimental Fatorial Fracionado 2^{5-1} . Resposta: inibição de <i>D. maydis</i> ($R^2 = 0,7697$).....	50
Tabela 9.	ANOVA do desenho experimental Fatorial Fracionado 2^{5-1} . Valores de p e efeitos dos fatores e suas interações. Resposta: inibição de <i>D. maydis</i>	51
Tabela 10.	Desenho experimental Box-Behnken de 3 fatores. Resposta: inibição de <i>D. maydis</i> ($R^2 = 0,9185$), <i>C. gloeosporioides</i> ($R^2 = 0,6809$) e <i>F. moniliforme</i> ($R^2 = 0,7801$).....	55
Tabela 11.	ANOVA do desenho experimental Box-Behnken de 3 fatores. Valores de p e efeitos dos fatores para cada microrganismo inibido. Resposta: inibição de <i>D. maydis</i> , <i>C. gloeosporioides</i> e <i>F. moniliforme</i>	56
Tabela 12.	Desenho experimental Central Composto 2^2 . Resposta: inibição de <i>C. gloeosporioides</i> ($R^2 = 0,8869$) e <i>R. solani</i> ($R^2 = 0,8204$).....	63
Tabela 13.	ANOVA do desenho experimental Central Composto 2^2 . Valores de p e efeitos dos fatores para cada microrganismo inibido. Resposta: inibição de <i>C. gloeosporioides</i> e <i>R. solani</i>	63

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3	REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1	FUNGOS FITOPATOGÊNICOS NA AGRICULTURA	15
3.1.1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	16
3.1.2	<i>Diplodia maydis</i>	17
3.1.3	<i>Fusarium moniliforme</i>	18
3.1.4	<i>Rhizoctonia solani</i>	19
3.2	CONTROLE DE FITOPATÓGENOS DE IMPORTÂNCIA AGRÍCOLA.....	19
3.3	AGROTÓXICOS: CONTAMINAÇÃO, AGRICULTURA BIOLÓGICA E <i>TRICHODERMA</i>	22
3.4	<i>TRICHODERMA</i> SPP: RELAÇÕES ECOLÓGICAS E PRODUÇÃO DE METABÓLITOS.....	24
3.4.1	Produção de Metabólitos Antifúngicos por <i>Trichoderma</i> spp	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	MATERIAL.....	29
4.1.1	Microrganismos	29
4.1.2	Reagentes e Meios de Cultivo.....	29
4.2	MÉTODOS	30
4.2.1	Manutenção e Reativação das Cepas.....	30
4.2.2	Preparo de Inóculo de <i>T. atroviride</i>	31
4.2.3	Preparo de Substratos e Inoculação de <i>Trichoderma atroviride</i>	31
4.2.4	Extração de Metabólitos Antifúngicos.....	32
4.2.5	Inibição dos Fungos Fitopatogênicos	33
4.2.6	Determinação do Solvente Extrator, Ingredientes do Meio de Cultura e Condições de Cultivo.....	34
4.2.6.1	Definição do melhor solvente extrator	34

4.2.6.2	Definição dos ingredientes do meio e condições de cultivor	36
4.2.6.2.1	<i>Definição de Traços Mineraiis, Fontes de Nitrogênio e Condições de Cultivo</i>	36
4.2.6.2.2	<i>Determinação das Melhores Concentrações dos Ingredientes e Condições de Cultivo para Maior Produção de Antifúngicos</i>	36
4.2.6.2.2.1	<i>Utilização da metodologia de Análise de Superfície de Resposta para determinação das melhores concentrações de glicose e extrato de levedura e teor de umidade do substrato na produção de antifúngicos</i>	37
4.2.6.3	Melhores condições de cultivo de <i>T. atroviride</i> em bagaço de cana para produção de antifúngicos	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	DETERMINAÇÃO DO SOLVENTE EXTRATOR, INGREDIENTES DO MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO	40
5.1.1	Definição do Melhor Solvente Extrator	40
5.1.1.1	Metabólitos antifúngicos extraídos pelos solventes extratores	43
5.1.2	Definição dos Ingredientes do Meio e Condições de Cultivo.....	45
5.1.2.1	Determinação de traços mineraiis, fontes de nitrogênio e condições de cultivo de <i>T. atroviride</i>	45
5.1.2.2	Determinação das melhores concentrações dos ingredientes e condições de cultivo para a maior produção de antifúngicos	49
5.1.2.2.1	<i>Utilização da Metodologia de Análise de Superfície de Resposta para Determinação das Melhores Concentrações de Glicose e Extrato de Levedura e Teor de Umidade do Substrato na Produção de Antifúngicos</i>	54
5.1.3	Melhores Condições de Cultivo do <i>T. atroviride</i> em Bagaço de Cana de Açúcar para a Produção de Antifúngicos	62
6	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	70

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é dos poucos países no mundo com extensa fronteira agrícola em condições de expansão sem ocasionar grandes impactos ao meio ambiente. Grande parte do PIB do país é devido ao comércio agrícola, sendo maior exportador de café, açúcar, etanol, suco de laranja, produtos do complexo soja (grão, farelo e óleo) além de figurar entre os maiores produtores mundiais de banana, abacaxi, mamão, melão e outros. Atrelada à produção vegetal em larga escala, encontram-se doenças responsáveis por perdas de até 100% nas lavouras e o constante surgimento de novas fitopatologias, trazidas principalmente de outros países por conta do intenso comércio internacional. Deste modo, o estudo de novas tecnologias para controle de doenças vegetais que assegurem a produção agrícola é de extrema importância para o país.

As fitopatologias estão entre as principais responsáveis por perdas durante cultivo a campo e no pós-colheita, sendo os fungos os principais agente etiológicos destas doenças. Os bolores *Colletotrichum gloeosporioides*, *Diplodia maydis*, *Fusarium moniliforme* e *Rhizoctonia solani* são patógenos capazes de atingir cereais, leguminosas e frutas a campo e no pós-colheita, podendo gerar perdas importantes nessas culturas. O principal mecanismo de se prevenir e combater fitopatologias vem sendo o uso intensificado de agrotóxicos após a revolução verde na década de 1950, muitas vezes compostos por moléculas químicas de alta periculosidade e de difícil degradação ambiental. Com o aumento no relato de danos ambientais e de doenças humanas relacionadas à exposição excessiva aos agrotóxicos, houve, nos últimos anos, intensificação na busca de formas de controle biológico destas doenças.

Os fungos do gênero *Trichoderma* são largamente estudados por seu potencial no controle de fitopatologias. Estes microrganismos são capazes de parasitar e inibir o desenvolvimento de fungos patógenos vegetais, suprimindo os agentes etiológicos com ferramentas metabólicas como enzimas e metabólitos antifúngicos.

Os metabólitos produzidos pelo gênero *Trichoderma* são geralmente estudados de forma específica e isolada, buscando identificar cada molécula e o seu potencial antifúngico. Contudo, a purificação de um único metabólito ou de alguns

poucos pode ser cara e inviável para produções em escala industrial. Além disso, este gênero produz uma grande gama de moléculas que podem agir em sinergia no controle das fitopatologias, otimizando seu potencial antifúngico para aplicação na defesa vegetal.

Alguns dos metabólitos antifúngicos produzidos por *Trichoderma* são sintetizados em maior quantidade quando o fungo é cultivado em substratos sólidos e semi-sólidos se comparado a meios de cultivo líquidos (SARHY-BAGNON *et al.*, 2000). Uma boa alternativa para substrato de cultivos fúngicos em larga escala são os subprodutos das agroindústrias, produzidos em grande quantidade e são vendidos a baixos preços.

Ante o exposto, este trabalho objetivou estudar e melhorar as condições de cultivo de *Trichoderma atroviride* (cepa IMI 206040, anteriormente denominado *Trichoderma harzianum* IMI 206040) em farelo de trigo a fim de favorecer a produção de metabólitos com potencial antifúngico, testá-los contra *C. gloeosporioides*, *D. maydis*, *F. moniliforme* e *R. solani*, além de estudar o melhor solvente extrator destes metabólitos e o potencial do bagaço de cana de açúcar como substrato alternativo. O controle destes fitopatógenos por um produto dariam grande abrangência e possibilidade de uso dos antifúngicos em boa parte da agricultura.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar as melhores condições de cultivo de *Trichoderma atroviride* (= *Trichoderma harzianum* IMI 206040, Casolio *et al.*, 2001) para produção de metabólitos antifúngicos e seu potencial de inibição contra *Diplodia maydis*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium moniliforme* e *Rhizoctonia solani*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir o melhor solvente extrator de metabólitos antifúngicos do meio de cultura;
- Determinar as melhores concentrações de traços de sais minerais, fontes de nitrogênio e glicose adicionados ao farelo de trigo bem como as melhores condições de cultivo que proporcionem maior produção de metabólitos antifúngicos;
- Verificar efeito *in vitro* dos metabólitos antifúngicos contra *Diplodia maydis*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium moniliforme* e *Rhizoctonia solani*;
- Estudar bagaço de cana de açúcar como substrato alternativo ao farelo de trigo.

3. REVISÃO DE LITERATURA

O setor agrícola brasileiro vem sendo um dos principais alicerces da economia nacional, principalmente no atual cenário de crise econômica mundial. Nos primeiros três meses de 2013 o PIB Nacional registrou alta de 0,6%, abaixo do esperado pelos economistas, que desde 2012 vem registrando pequenas quedas a cada trimestre. O setor agropecuário foi um dos responsáveis por impulsionar o crescimento econômico com aumento de 9,7% em relação ao trimestre anterior, ajudado por altos preços das commodities e aumento de safra (OLIVON, 2013)

A safra nacional estimada de cereais, leguminosas e oleaginosas totalizou 185,0 milhões de toneladas, sendo arroz, milho e soja responsáveis por 92,4% da produção. Neste cenário, os Estados do Mato-Grosso e do Paraná são líderes na produção de grãos, com 23,2% e 20,8%, respectivamente (IBGE, 2013).

Acerca da fruticultura, o Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo, atrás da China e Índia, todos com produção principalmente voltada para o mercado interno. No ano de 2011 o país colheu 45,1 milhões de toneladas de frutas, das quais laranja, banana, coco, abacaxi e mamão as mais produzidas (PARANÁ, 2012). Estima-se que até a safra de 2021/2022 haja expansão em algumas culturas, sendo que as maiores serão de 32,6% na produção de maçã, 22,7% na produção de uva, 22,0% na produção de laranja e 4,3% na produção de banana, principais frutas produzidas no país (BRASIL, 2012).

As doenças de plantas são um dos principais fatores de perdas na produção agrícola a campo junto com competição com plantas daninhas, danos por insetos e nematóides e condições climáticas desfavoráveis, como seca ou excesso de chuva. Neste ambiente as doenças são agravantes dos demais fatores de perda, pois uma planta debilitada, seja por falta de nutrientes ou alguma injúria, tornam-se vulnerável à infecção por doenças, reduzindo a produção. Já no pós-colheita, as precárias condições de transporte e manuseio descuidado no atacado e varejo geram danos na superfície dos frutos, aumentando a infecção por fungos e perda de mercadoria. Neste contexto, os fungos são apresentados como os principais microrganismos responsáveis por perdas agrícolas.

3.1 FUNGOS FITOPATOGÊNICOS NA AGRICULTURA

O primeiro grande relato de uma doença fúngica atingindo diretamente o homem provavelmente ocorreu na Europa no fim da década de 1840, onde a requeima da batata, causada pelo fungo *Phytophthora infestans*, devastou produções de batata inglesa (*Solanum tuberosum*), principalmente na Irlanda, por três anos seguidos (1847-1849). O tubérculo era a base alimentar da ilha e estima-se que a perda nos campos tenha levado à morte entre um milhão e um milhão e meio de pessoas seja diretamente, pela fome, ou indiretamente, por doenças instaladas na população devido ao seu debilitado estado de saúde gerado pela fome (SCHILLING, 2002).

Desde então a agricultura vem sofrendo com o surgimento de novas patologias constantemente, e o cenário de intenso comércio mundial facilita uma rápida propagação de fitopatógenos. O caso mais recente e que afetou a economia mundial foi a disseminação da ferrugem asiática da soja (*Phacopsora pachyrizhi*), que chegou ao Brasil na safra 2001/2002. No primeiro ano no país, o fitopatógeno foi encontrado em 60% das lavouras brasileiras, sendo os danos mais severos encontrados na região Centro Oeste, com redução de produtividade relatada entre 30 e 75%, cerca de 125,5 milhões de dólares perdidos, referente a mais de 569 toneladas de grãos (YORINORI *et al.*, 2005). Um exemplo mais atual é o da ferrugem do café (*Hemileia vastatrix*), que segundo a Organização Internacional do Café (OIC), é esperada perda de 2,3 milhões de sacas, cerca de 550 milhões de dólares e 441 mil postos diretos de trabalho na América Central. Aproximadamente 53% da área total plantada (1,054 milhão de hectares) foi afetada pelo fungo (FERREIRA; PRESSINOTT, 2013).

A evolução das doenças nas culturas agrícolas está estreitamente relacionada à evolução dos sistemas de produção no Brasil. Modificações responsáveis por aumento de produtividade das culturas também aumentaram incidência e severidade das doenças. Deste modo, a expansão da fronteira agrícola, a ampliação das épocas de plantio (safra e safrinha, no caso das culturas anuais), a adoção do plantio direto, o aumento dos usos de sistemas de irrigação, a ausência de rotação de cultura e o uso de materiais suscetíveis tem promovido modificações importantes na dinâmica populacional dos patógenos, resultando no surgimento de

novos problemas relacionados à ocorrência de doenças a cada safra (EMBRAPA, 2012).

Muitos dos fungos de importância agrícola podem permanecer em estado de latência nas sementes por longos períodos, sendo transportados por milhares de quilômetros contaminando campos antes saudáveis ou sobreviver como saprófitas em restos de culturas. Dentre os patógenos que atacam sementes, predominam os fungos deuteromicetos, principalmente as espécies pertencentes aos gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Diplodia*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Macrophomina* e *Rhizoctonia*, bem como *Aspergillus* e *Penicillium*, considerados fungo de armazenamento (OLIVEIRA; PRATES JÚNIO, 2011). O presente estudo trabalha com as espécies de alguns destes gêneros, sendo elas: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Diplodia maydis*, *Fusarium moniliforme* e *Rhizoctonia solani*, descritos com mais detalhes a seguir.

3.1.1 *Colletotrichum gloeosporioides*

O grau de especialização de *C. gloeosporioides* não é alto, causando podridão em diversos frutos, dentre eles manga, abacate, citrus, morango, tomate, maçã, banana e outros. Acredita-se que este fungo penetre nos frutos ainda verdes, principalmente por injúrias causadas por insetos e manejo inadequado. A doença se manifesta apenas quando os frutos estão maduros, permanecendo em sua forma latente até encontrar condição favorável ao seu desenvolvimento, sendo esta o amadurecimento dos frutos. O fungo é capaz de sobreviver de um ano para outro nas lesões velhas dos frutos e das folhas, sobre planta ou solo (BERGAMIN; KIMATI, 1980; OLIVEIRA *et al.*, 2000; NERY-SILVA *et al.*, 2001).

Geralmente as podridões por *C. gloeosporioides* em frutos causam depressão na superfície do fruto e aspecto marrom que se transformam em lesões e afetam a aparência, reduzindo a aceitabilidade do produto. Em mamão, a incidência de antracnose pode levar a perdas de 30 a 40% e, dependendo do processo de acondicionamento dos frutos, podem chegar a até 90% dos frutos (HOMERO, 2012). A doença é encontrada com bastante frequência e sua incidência resulta automaticamente na eliminação dos frutos afetados, pois provoca podridão severa

que inutiliza o produto para fins comerciais, além de contaminar facilmente frutos sadios. (BERGAMIN; KIMATI, 1980).

3.1.2 Diplodia maydis

D. maydis (= *Stenocarpella maydis*) é contaminante específico de milho e comum em culturas em todo o mundo, sendo que sua maior incidência ocorre em épocas chuvosas durante o enchimento dos grãos, podendo atingir espiga e colmo. As espigas infectadas apresentam grãos de baixo peso, e crescimento micelial brando entre as fileiras de grãos e, com a deterioração, os grãos adquirem coloração entre marrom e rosa, sendo denominados grãos ardidos. No colmo há surgimento de lesões marrom-claras que atingem o interior deixando somente o xilema intacto. Nas lesões de espiga e de colmo são encontrados pequenos pontos negros (picnídios), que são estruturas de frutificação e de resistência que podem sobreviver a campo no solo e em restos de cultura contaminados. Este fungo pode permanecer latente nas sementes de milho, na forma de esporo ou micélio (EMBRAPA, 2012).

Os grãos ardidos são constantemente rejeitados pelas indústrias que utilizam milho como matéria prima para a alimentação animal, pois este fungo é produtor da micotoxina diplodiatoxina. Esta toxina, se ingerida por ovinos ou bovinos em grandes quantidades, pode provocar diplodiose, uma micotoxicose caracterizada por síndrome de paralisia neuromuscular (denominada ataxia). Esta doença é a micotoxicose mais comum em gados na África do Sul e já foi diagnosticada como causa de morte em gado na Argentina após ingestão de milho contaminado por *D. maydis*. Os sinais clínicos observados são tremores musculares generalizados, falta de coordenação, perda de movimento nos membros traseiros, paralisia e morte. Em exames histológicos foi detectada degeneração moderada a severa de bainhas de mielina na massa branca do cérebro dos animais mortos (ODRIOZOLA *et al.*, 2005).

3.1.3 *Fusarium moniliforme*

F. moniliforme possui característica saprofítica ativa, ou seja, se desenvolvendo em matéria orgânica morta, o que facilita sua permanência em uma área contaminada. O bolor atinge diversas culturas, sendo o milho mais estudado devido sua importância na agricultura mundial. *F. moniliforme* geralmente é um fungo oportunista, infectando a planta através de injúrias causadas por insetos, pássaros, nematóides e outros. Este bolor pode causar podridões nas raízes, colmo e espiga e é importante produtor das micotoxinas fumonisina e vomitoxina, tóxicas a seres humanos e animais, causando perdas econômicas e possível risco à saúde (EMBRAPA, 2012).

F. moniliforme pode estar presente nas sementes em seu estado latente e é comumente encontrado colonizando plantas assintomáticas (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997). Sendo assim, lotes de sementes dados como não contaminados provavelmente vêm do campo com o patógeno. Tanaka, Maeda e Plazas (2001) examinaram lotes de semente de milho e detectaram presença de fungos do gênero *Fusarium* em até 84% das amostras de determinados lotes, dentro do gênero, a espécie mais encontrada foi *F. moniliforme*.

Entre os danos causados em sementes por contaminação de *F. moniliforme* no campo pode-se citar descoloração, enrugamento e manchas (DHINGRA, 1985). A descoloração fúngica tendendo para o vermelho ou alaranjado caracteriza o milho como ardido, sendo constantemente rejeitado em indústrias que utilizam milho como matéria prima para produção de alimento humano ou animal. Isto porque o fungo é produtor de micotoxinas, principalmente as fumonisinas, comprovadamente tóxicas a frangos, equinos, suínos, ratos e seres humanos, sendo consideradas carcinógenas em humanos (IARC, 2002). Mais de 16 diferentes tipos de fumonisinas já foram isoladas, sendo que a forma predominantemente produzida pelo *F. moniliforme* é a fumonisina B₁, a qual também apresenta maior toxicidade (LEESON *et al.*, 1995).

3.1.4 *Rhizoctonia solani*

O fungo *R. solani* possui características saprófitas assim como *F. moniliforme*, ou seja, se desenvolvendo em matéria orgânica morta, o que facilita sua permanência em uma área contaminada. Este bolor atinge diversas plantas cultiváveis conhecidas, atacando a semente antes da germinação ou a plântula em seu estágio inicial de desenvolvimento. Se as sementes são atacadas antes da germinação, desenvolvem coloração marrom ou preta e apodrecem, e quando a plântula é atacada, o fungo causa escurecimento no colo e posterior tombamento, também conhecido como “*damping off*” ou estrangulamento. A consequência desta doença é a não emergência (tombamento pré-emergência) ou acamamento (tombamento pós-emergência) das plantas.

Goulart (2001) relatou uma grande incidência de tombamento por *R. solani* na Califórnia, onde foram perdidos anualmente 12.733 toneladas de algodão no período de 1991 a 1993. Nos EUA, em 1995, estimou-se uma redução na produtividade do algodoeiro devido às doenças iniciais da ordem de 180 mil toneladas. Na Califórnia, neste mesmo ano, estas perdas foram estimadas em 17.850 toneladas, maiores do que aquelas registradas em anos anteriores. Nos últimos 10 anos, nos EUA, estimativas de perdas têm revelado valores médios de 2,8% por ano.

Pelos danos causados à agricultura, as doenças fúngicas são combatidas de várias maneiras nas lavouras do Brasil e do mundo.

3.2 CONTROLE DE FITOPATÓGENOS DE IMPORTÂNCIA AGRÍCOLA

Muitas medidas para controle de fitopatogenias são de cunho preventivo, antecedendo até mesmo ao plantio, sendo as mais recomendadas: 1) utilizar cultivares resistentes às doenças mais severas e/ou de maior incidência na área; 2) realizar o plantio em época adequada, evitando períodos críticos; 3) utilizar sementes de boa qualidade e tratadas com fungicidas; 4) utilizar rotação de culturas não suscetíveis; 5) utilizar rotação de cultivares (mesma espécie cultivada, porém

com características genéticas diferentes); 6) manejo adequado da lavoura, ou seja, adubação equilibrada, população de plantas adequada, controle de plantas invasoras, controle de pragas e de invasoras e colheita na época correta (EMBRAPA, 2012).

A adoção das medidas citadas acima contribuem para uma maior durabilidade e estabilidade da resistência genética presentes nas cultivares comerciais por reduzirem a população de agente patogênicos, além de trazerem benefício imediato por reduzir o potencial de inóculo dos patógenos presentes na lavoura. Dentre as técnicas mencionadas, a utilização de cultivares resistentes é a mais atrativa e é eficiente contra doenças foliares, de raiz, de colmo de e pós-colheita. Além disso, não causa impacto ao meio ambiente, é perfeitamente compatível com as demais medidas e muitas vezes é suficiente para o controle dos fitopatógenos.

Todavia, o desenvolvimento de novas cultivares resistentes e/ou tolerantes às fitopatologias fúngicas não elimina uso de fungicidas e outros defensivos, ao contrário, estes são recomendados mesmo que em doses menores. Apesar de todos os cuidados, ainda assim os fitopatógenos são capazes de quebrar resistências genéticas ou de se aproveitarem de danos mecânicos, causados por choques ou ataque de insetos, para infectarem uma planta e se proliferarem em campo de cultivo. Segundo Sérgio Suzuki, existe a possibilidade de ocorrer quebra dos genes de resistência devido à facilidade de determinados fungos em se multiplicar e exercer maior pressão de seleção. Isto se deve ao fato de que quanto maior uma população de patógeno, maior chance um indivíduo, ou uma mutação, em quebrar a resistência da planta ou de ser resistente à molécula ativa de um defensivo agrícola. Assim sendo, a associação de cultivares resistentes e/ou tolerantes com aplicação de fungicidas é importante para dificultar perda da funcionalidade dos genes e dos produtos, aumentando tempo de uso destas tecnologias (SOJA INOX..., 2011).

Neste contexto, o uso de agrotóxicos ainda é fundamental para controle de doenças vegetais, seja de modo preventivo ou de caráter de controle. O uso de fungicidas de caráter preventivo é justificado por estudos como de Godoy e Canteri (2004), estes autores testaram antifúngicos registrados para cultura da soja e verificaram que a eficiência no controle da ferrugem da soja decresceu à medida que se atrasou a aplicação do fungicida. A aplicação preventiva tornou-se prática corriqueira por parte dos produtores sendo que muitos adquirem insumos para safra

futuras com mais de um ano de antecedência, incentivados por promoções e pacotes ofertados por empresas de assessoria agrônômica, tanto de fungicidas para controle de doenças de raiz e colmo como de doenças foliares e de pós-colheita.

O controle de doenças a campo deve se iniciar na escolha da cultivar plantada e da qualidade da semente, como citado anteriormente, e com o tratamento de sementes. Este último serve para impedir ou retardar a disseminação de patógenos presentes nas sementes ou no solo. No caso do caso de surgimento de doenças de raiz e colmo, sua ocorrência não resulta necessariamente em tombamento de plantas, entretanto, alguns pontos devem ser considerados como a realização da colheita em momento adequado, pois quanto mais avançada a podridão estiver, maior chance de ocorrer o tombamento. Recomenda-se que campos entre 15 e 20% de podridão de colmo sejam colhidos o mais rápido possível, evitando acamamento das plantas (EMBRAPA, 2012).

No caso de doenças foliares, a intervenção na lavoura é geralmente recomendada até o florescimento ou enchimento dos grãos, pois o potencial de produção vegetal já está determinado nestas fases, que variam de acordo com a cultura. A partir deste ponto, o custo/benefício de uma intervenção pode não ser favorável, sendo que a perda de produtividade pode ser mais barato que fazer uma aplicação para controle da doença, gerando gasto de mão-de-obra, insumo aplicado, custo do combustível e depreciação da máquina (EMBRAPA, 2012).

No período do pós-colheita, as principais perdas decorrem de manuseio errôneo, causando danos físicos e aparecimento de podridões, sendo que nas frutas os fungos são os principais agentes etiológicos, enquanto que nas hortaliças é comum também o surgimento de podridões por bactérias.

Os frutos destinados à exportação recebem tratamentos que evitam degradação durante transporte e armazenamento, por exemplo, termoterapia, quimioterapia e cobertura com cera de carnaúba (MENDES; DANTAS; MORALES, 1996). O uso de ceras, como a citada, restringe trocas gasosas e, atividade metabólica dos frutos e microrganismos que porventura estiverem presentes no fruto, retardando o amadurecimento das frutas e desenvolvimento do fitopatógeno.

Um dos primeiros tratamentos utilizados em frutas foi o tratamento térmico a 49 °C por 20 minutos para controle de mosca-das-frutas, sendo muito efetivo. Posteriormente o uso de ceras e fungicidas apresentou uma significativa redução nas perdas pós-colheita devido à antracnose (podridão das frutas). O surgimento de

fungicidas químicos ajudou no tratamento, entretanto os produtos utilizados comercialmente, principalmente benzimidazóis, vem perdendo eficácia no controle fúngico, pelo desenvolvimento de populações com alto nível de tolerância/resistência a estes produtos. Outros produtos utilizados que apresentam resultados satisfatórios são prochloraz e thiabendazol, principalmente usados em mamão exportado para União Européia e Estados Unidos, respectivamente (NERY-SILVA *et al.*, 2001).

Todavia, o principal mecanismo de controle dos fitopatógenos vem sendo o uso de agrotóxicos, independente do tipo de doença ou da fase de desenvolvimento de uma cultura vegetal. Esta tecnologia de defesa vegetal é extremamente importante para a agricultura mundial, porém traz alguns revezes e abre discussão sobre desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável e sem uso destas moléculas.

3.3 AGROTÓXICOS: CONTAMINAÇÃO, AGRICULTURA BIOLÓGICA E *TRICHODERMA*

Desde a revolução verde, na década de 1950, o processo tradicional de produção agrícola sofreu drásticas mudanças, com a inserção de novas tecnologias, visando a produção extensiva de *commodities* agrícolas. Estas tecnologias envolvem, quase em sua maioria, o uso de agrotóxicos com a finalidade de controlar doenças e aumentar a produtividade.

Segundo a legislação vigente, agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, utilizados nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas além de ambientes urbanos, hídricos e industriais. O agrotóxico visa alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos. Também são considerados agrotóxicos as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento. Os agrotóxicos podem ser divididos em agrícolas, utilizados na produção vegetal ou armazenamento agrícola, e não agrícolas, destinados a uso especial e licenciado pelo Ministério do Meio Ambiente/Ibama para uso na proteção florestas nativas ou ecossistemas, além do uso em ambiente urbano e industrial (BRASIL, 19--).

Existe cerca de 15 mil formulações para mais de 400 agrotóxicos diferentes no mercado, sendo que 8 mil encontram-se licenciadas no Brasil. O uso indiscriminado destes produtos ao longo dos anos tem provocado acúmulo de resíduos de compostos químicos nocivos na água, no solo e no ar, sendo que o Estado de São Paulo é o maior produtor e consumidor de agrotóxicos do país, com 25% do consumo, seguido por Paraná (16%), Minas Gerais (12%), Rio Grande do Sul (12%) e Mato Grosso (9%). Alguns estudos indicam que o Brasil ocupa a décima colocação no consumo de agrotóxicos, com 3,2 kg de ingredientes ativos por hectare, em outros o país ocupa a quinta colocação, consumindo 7,0 kg de ingredientes ativos por hectare, sendo a Holanda o primeiro colocado com 10 kg de ingrediente ativo por hectare (EMBRAPA, 200-; SÃO PAULO, 200-).

Nas últimas décadas houve aumento nos estudos dos efeitos diretos e indiretos de agrotóxicos na saúde do ser humano, dos animais e do meio ambiente, aumentando a conscientização da população, que cada vez mais opta por produtos livres ou com uso baixo e responsável de agrotóxicos. Vários trabalhos já detectaram presença de defensivos agrícolas contaminando o solo, a água e os alimentos, dos quais a grande maioria são inseticidas e herbicidas de difícil degradação ambiental alguns de uso proibido em muitos países. Alguns agrotóxicos, principalmente os organoclorados, já foram detectados em água das chuvas coletadas a centenas de quilômetros de áreas agrícolas, preocupando a população de grandes centros. Aumentando ainda mais a problemática do uso destas moléculas, em 2011 um estudo detectou presença de 10 agrotóxicas diferentes em leite materno em Lucas do Rio Verde – MT, município expressivo na produção Nacional de grãos, colocando em risco a saúde dos recém nascidos e das mães (KUMARI; MADAN; KATHPAL, 2007; PALMA, 2011).

Um estudo das frutas e hortaliças circulantes na CEAGESP no período de 1994 a 2005 detectou que 29,7% dos produtos continham resíduos de agrotóxicos. Destes, 50% estavam abaixo do limite máximo permitido (LMP), 4,5% acima e os 45,6% restante continham moléculas não registradas para as respectivas culturas. Dentro deste último grupo, 47,6% correspondiam às hortaliças e 45% às frutas. Das amostras positivas para agrotóxicos, 62,1% estavam contaminadas por fungicidas (GORENSTEIN, 2006). Além de presente nos alimentos, os fungicidas agrícolas do grupo dos triazóis já foram detectados como resíduos em água no Reino Unido (BOLYGÓ; ATREYA, 1991).

O uso excessivo de agrotóxicos e seus danos para a saúde humana e ambiental foram expostos em vários estudos, o que gerou interesse dos governos e da população em buscar tecnologias menos danosas. Segundo McNeely e Scherr (2009), o desafio central do século XXI é o de alcançar os objetivos da conservação da biodiversidade e da produção agrícola de forma simultânea e, geralmente, no mesmo espaço. O uso de uma agricultura 100 % orgânica em larga escala é o sonho de muitos pesquisadores e considerada uma utopia por outros. De fato, pode-se considerar que o uso de agrotóxicos hoje em dia ainda é um mal necessário, principalmente para grandes produtores rurais como Brasil, Estados Unidos, China, Ucrânia, Rússia, Argentina e outros países. Sabendo disso, muitos países apoiam o desenvolvimento de políticas e tecnologias com baixo uso de agrotóxicos. No Brasil, um exemplo de sucesso é o Manejo Integrado de Pragas (MIP) mais desenvolvido em culturas perenes, principalmente na laranja. Estas tecnologias dão preferência a biocontroladores como predadores e parasitas naturais de pragas agrícolas, bem como o uso de moléculas de origem biológicas no lugar de agrotóxicos.

Neste contexto, os fungos do gênero *Trichoderma* estão entre os mais estudados como agentes de controle biológico e são usados com sucesso como biopesticidas e biofertilizantes em casas de vegetação e em campos de plantio. Suas características que favorecem o desenvolvimento vegetal variam entre parasitismo de fitopatógenos, promotor de crescimento de plantas e produtor de metabólitos com atividade antifúngica (HARMAN *et al.*, 2004), descritos em seqüência com enfoque no último item, de especial interesse do presente trabalho.

3.4 *TRICHODERMA SPP*: RELAÇÕES ECOLÓGICAS E PRODUÇÃO DE METABÓLITOS

Trichoderma (teleomorfo *Hypocrea* Fr.) é um gênero fúngico de reprodução assexuada comumente isolado em solos, principalmente em regiões de clima temperado e tropical. Estes fungos também colonizam madeira e restos vegetais, onde a fase sexuada geralmente é encontrada, o gênero *Hypocrea*. Entretanto, muitas cepas não possuem teleomorfo conhecido (HARMAN *et al.*, 2004), por isso são classificados na sub-divisão Deuteromycotina, popularmente chamados de deuteromicetos (MACHADO *et al.*, 2012). Estes fungos são caracterizados por

produção de conídios formados a partir de células conidiógenas, contidas ou não em estruturas especializadas, ou por fragmentação do talo micelial (KRUGER; BACCHI, 1995). As colônias de *Trichoderma* geralmente crescem rápido, inicialmente são hialinas, adquirem tom branco e posteriormente podem apresentar coloração esverdeada devido produção de estruturas reprodutivas (SAMSON; HOEKSTRA; FRISVAD, 2004).

O gênero *Trichoderma* é amplamente aplicado na agricultura, no controle de fitopatógenos e promoção de crescimento vegetal. Essas vantagens são conferidas pela versatilidade do fungo em competir por nutrientes, induzir resistência em plantas, parasitar ou produzir metabólitos inibidores de outros fungos (MACHADO *et al.*, 2012).

A indução de crescimento vegetal por *Trichoderma* spp. está associada à produção de auxinas e análogos pelo fungo. Hoyos-Carvajal, Orduz e Bissett (2009) detectaram cepas com capacidade de síntese de ácido indol-acético (AIA), hormônio de crescimento vegetal, por algumas cepas de *T. harzianum*, que atuam diretamente na fisiologia da planta acelerando seu crescimento. Além disso, a indução de crescimento também parece estar associada à indução de resistência sistêmica, pois, segundo Romeiro (2007), plantas levadas ao estado de indução de crescimento apresentam aumento nas atividades enzimáticas, como de quitinases, glucanases e peroxidases, envolvidas nas rotas de percepção de patógenos em potencial e nas rotas de sinalização bioquímica. Assim como a produção de enzimas utilizadas na percepção é estimulada, o mesmo pode ocorrer com enzimas usadas na defesa vegetal, como proteases, lipases e outras.

Outra vantagem de uso de *Trichoderma* spp. em cultivos vegetais é devido sua capacidade de controle de fungos fitopatógenos, já comprovada em vários estudos realizados inoculando o microrganismo no solo, em casa de vegetação ou a campo, e *in vitro*. Dentre os fitopatógenos estudados, *Trichoderma* spp. inibiram *Rhizoctonia solani* Kühn e *Sclerotium rolfsii* em cultivo de feijão (*Phaseolus vulgaris*) realizado em casa de vegetação (ELAD; CHET; KATAN, 1980) e *Sclerotinia sclerotiorum* a campo (GÖRGEN *et al.*, 2009). Em cultivos *in vitro* foi relatada inibição de *Alternaria brassicicola*, *Colletotrichum capsici*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium gramineis*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. (synonim *Fusarium moliniforme* Sheldon), *Fusarium oxysporum*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Helminthosporium oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia*

sclerotium, e *Sclerotinia rolfsii* (COONEY; LAUREN; MENNA, 2000; KUÇUK; KIVANIÇ, 2004; AMIN *et al.*, 2010).

O parasitismo é um dos importantes processos de controle de patógenos por *Trichoderma* spp.. Nesta relação o fungo detecta e localiza hifas de fungos suscetíveis, cresce em sua direção, possivelmente em respostas a estímulos químicos produzidos pela hifa hospedeira, então forma estruturas semelhantes a apressórios, enrola-se ao redor da hifa, para então penetrá-la e digeri-la (MELO, 1998). Segundo Matroudi, Zamani e Motallebi (2009), *Trichoderma* spp. são capazes de produzir quitinase e β -1,3-glucanase, enzimas capazes de quebrar quitina e β -glucano, respectivamente, presentes na parede celular dos fungos, controlando diversos fitopatógenos. Contudo, ainda em 1987, Howell concluiu que o micoparasitismo não é o principal mecanismo de biocontrole de *T. virens* em muitos casos.

Um dos processos de controle não parasítico de *Trichoderma* spp. seria a inativação de enzimas utilizadas na infecção de plantas. Segundo Harman (2000) *Botrytis cinerea*, importante patógeno de plantas e frutas, depende de enzimas pectinolíticas, cutinolíticas e celulolíticas para infectar plantas, e algumas cepas de *T. harzianum* são capazes de inativar estas enzimas através de proteases, reduzindo a capacidade de infecção do fitopatógeno.

As espécies do gênero *Trichoderma* também são capazes de produzir inúmeros compostos biologicamente ativos, alguns considerados micotoxinas (metabólitos secundários fúngicos nocivos ao homem ou animais). Dentre toxinas produzidas pelo gênero pode-se citar: gliotoxina, produzida por *T. virens*, possui ação contra vírus, bactérias e fungos, entretanto possui ação imunossupressora em humanos; metabólitos isocianetos, produzidos por *T. hamatum*, tóxico para ovinos; e tricodermim, sesquiterpeno relacionado a tricotecenos, geralmente produzido pelo gênero *Fusarium*, já foi isolado em colônias de *T. viride* e *T. polysporum* (FRISVAD; THRANE, 2004).

Entretanto, o mecanismo de particular interesse do presente trabalho é o de controle de fitopatógenos por *Trichoderma* spp. via produção de metabólitos inibidores fúngicos.

3.4.1 Produção de Metabólitos Antifúngicos por *Trichoderma* spp.

O gênero *Trichoderma* produz grande quantidade de metabólitos com potencial antifúngico, dentre eles, pode-se citar os compostos 1-hidroxi-3-metil-antraquinona, 1,8-diidroxí-3-metil-antraquinona, T22azafilona, T39butenolida, harzianolida e harzianopiridona, encontrados em cultivo líquido de *T. harzianum* após 30 dias. Das moléculas citadas, as antraquinonas apresentaram pouca inibição a *G. graminis* var. *tritici* e nenhuma contra *R. solani* e *P. ultimum*. Os demais metabólitos inibiram com sucesso os mesmos fitopatógenos, sendo que menores concentrações de harzianopiridona foram necessárias para a inibição, seguido por T22azafilona, T39butenolida e harzianolida, este último precisando de maiores concentrações para total inibição fúngica (Vinale *et al.*, 2006).

A 6-pentil-alfa-pirona (6PP ou 6PAP) pertence ao grupo das 2-pironas e é provavelmente o mais estudado dos antifúngicos produzidos por *Trichoderma* spp.. Além de apresentar potencial antifúngico, a molécula é considerada flavorizante com aroma de coco, considerado não tóxico para seres humano. As pironas podem ser encontrados em bactérias, fungos, plantas, insetos e animais, participando de diferentes processos biológicos como defesa contra outros organismos, compostos bioquímicos intermediários e outros metabólitos (MCGLACKEN; FAIRLAMB, 2005).

A ação inibitória de 6PP foi comprovada contra alguns fungos fitopatógenos como *Fusarium graminearum*, *F. verticillioides*, *Sclerotium rolfsii*, e *Phakopsora pachyrhizi*, comumente presentes em culturas como trigo, milho, tomate, e soja, respectivamente. No último caso, o metabólito foi responsável por inibição da germinação dos esporos do patógeno. (POOLE; WHITMORE, 1997; COONEY; LAUREN; MENNA, 2000; DODD; HILL; STEWART, 2000; UENO, 2007; EL-HASAN; WALKER; BUCHENAUER, 2008). Entretanto, Bonnarme *et al.* (1997) observaram que concentrações acima de 400 mg/L são capazes de inibir o desenvolvimento do próprio *Trichoderma*. A partir desta descoberta vários trabalhos foram realizados na tentativa de retirar 6PP do meio enquanto era produzido, induzindo maior síntese do metabólito por *T. atroviride* (BONNARME *et al.*, 1997; RITO-PALOMARES *et al.*, 2000; RITO-PALOMARES *et al.*, 2001). Ilustrar

Por fim, para demonstrar a grande quantidade de metabólitos de com potencial antifúngico produzidos por *Trichoderma*, Reino *et al.* (2008) realizaram

uma grande revisão contendo 183 moléculas produzidas por espécies de *Trichoderma* dividindo-as em grupos químicos. Ao total foram contabilizados 23 grupos, dos quais em 9 havia presença de ao menos uma molécula antifúngica, sendo estes grupos: antraquinonas, azafilonas, harzialactonas, daucanas, pironas, viridinas, viridifungina, compostos heterocíclicos de nitrogênio, bisorbicilinoídes, ergosterol e coninginas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Microrganismos

Os microrganismos utilizados foram *Trichoderma atroviride* (= *Trichoderma harzianum*) cepa IMI 206040 (UNAM – Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología); *Colletotrichum gloeosporioides*, cepa 23 (coleção de fungos da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ e *Diplodia maydis*, *Fusarium moniliforme* e *Rhizoctonia solani* gentilmente cedidos pelo Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Londrina. Estes microrganismos abrangem diversas culturas e em diversos estádios de desenvolvimento, do plantio ao pós-colheita. Assim sendo, a comprovação de atividade antifúngica contra estes bolores indica bom espectro de controle de fitopatógenos.

4.1.2 Reagentes e Meios de Cultivo

Os reagentes utilizados foram: acetato de etila P.A. (99 %), marca Cinética; etanol absoluto P.A. (99,2 %), marca Anidrol; n-hexano P.A. (99,2 %), marca Vetec. O meio de cultura utilizado foi ágar batata dextrose (ABD), marca Acumedia. O farelo de trigo foi doado pelo Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR). O bagaço de cana de açúcar foi cedido por vendedores de caldo de cana de açúcar na cidade de Londrina, Paraná.

4.2 MÉTODOS

A dinâmica do trabalho se procedeu da seguinte maneira: após reativação da cepa de *T. atroviride*, IMI 206040 (conforme item 4.2.1), foi preparado inóculo do fungo em meio de cultura líquido (BONNARME *et al.*, 1997). O inóculo foi adicionado aos substratos suplementados e incubados nas condições definidas por cada planejamento experimental, num total de quatro planejamentos propostos. Após fermentação, procedeu-se com extração dos metabólitos fúngicos produzidos com diferentes solventes e em seguida os extratos tiveram seu potencial antifúngico testado *in vitro* contra diferentes fungos fitopatógenos.

Os métodos utilizados no trabalho são descritos a seguir, passo a passo, sendo eles: manutenção e reativação das cepas; preparo do inóculo de *T. atroviride* e dos substratos; inoculação de *T. atroviride*; extração dos metabólitos antifúngicos; teste de inibição fúngica e planejamentos experimentais para seleção de nutrientes e condições de cultivo para aumentar a produção e extração dos metabólitos antifúngicos.

4.2.1 Manutenção e Reativação das Cepas

Os fungos foram mantidos em tubos inclinados contendo Ágar Batata Dextrose (ABD) estéril (121°C/15 min.) a 5 °C até momento de uso. Para reativação, um pedaço de micélio das cepas de um dos tubos de ABD foi inoculado no centro de uma placa de Petri contendo ABD solidificado e estéril, seguido de incubação em estufa a 25 °C por três dias, no caso de *T. atroviride* e *R. solani*, e cinco dias, no caso dos demais fungos.

4.2.2 Preparo de Inóculo de *T. atroviride*

Frasco erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio estéril (BONNARME *et al.*, 1997) (121°C/15 min) foi inoculados com quinze cubos de aproximadamente 4 mm² (2 mm x 2 mm) de ABD contendo micélio de *T. atroviride* pré cultivado, e em seguida incubado por três dias a 28 °C e 100 rpm de agitação. Após este período, o caldo de cultivo foi descartado em ambiente asséptico, mantendo o micélio no frasco. Foi adicionada solução salina estéril 0,9% NaCl (121 °C/15 min) ao frasco, seguiu-se com homogeneização manual e descarte da solução salina, mantendo o micélio. Este processo se repetiu mais uma vez para retirada do meio de cultura remanescente. O micélio foi transferido a um Becker de 250 mL e adicionado de 50 mL de solução salina estéril (0,9% NaCl) seguido de homogeneização por um minuto (homogeneizador marca Marconi, modelo CT-712R). Esta suspensão de micélio assim preparada foi utilizada como inóculo.

4.2.3 Preparo de Substratos e Inoculação de *Trichoderma atroviride*

Nos experimentos foram testados dois substratos para estudar a produção de metabólitos antifúngicos produzidos por *T. atroviride*: farelo de trigo e bagaço de cana de açúcar, sendo o último seco e triturado entre 10 e 35 mesh. Ambos foram suplementados para otimizar a produção dos metabolitos antifúngicos conforme cada desenho experimental. A umidade dos substratos foi determinada por método gravimétrico, deixando-se amostras em estufa 105 °C *overnight*. Dez ou quinze gramas de substrato seco, conforme o experimento, foram adicionadas em erlenmeyer de 250 mL de capacidade, seguido de ajuste de umidade desejada e adição de nutrientes segundo os desenhos experimentais. O meio foi esterilizado a 121°C/15 min e armazenado a 5 °C até momento de uso. A inoculação foi feita adicionando-se 2,0 mL da suspensão de micélio de *T. atroviride* para cada 10,0 g de substrato seco.

4.2.4 Extração de Metabólitos Antifúngicos

Inicialmente foram utilizados três solventes para extração de compostos antifúngicos: hexano, acetato de etila e etanol absoluto, para seleção do melhor dentre eles, explicada no item 4.2.5.1. Cada desenho experimental teve uma amostra de substrato fermentado em base seca retirada dos seus experimentos individuais (corridas) para extração dos metabólitos antifúngicos. A quantidade de amostra retirada é especificada em cada desenho experimental.

As amostras retiradas dos experimentos foram embaladas individualmente em papel filtro, preparadas em cartuchos, seguido de extração em bateria de extração tipo Soxhlet (marca Marconi, modelo MA-487). Cada cartucho teve seu volume lavado por cinco refluxos do solvente na bateria de extração. Ao fim, os solventes foram recuperados em balão de fundo chato e transferidos para tubos de ensaio. Em seguida os extratos foram concentrados por evaporação em banho-Maria a 40 °C sob fluxo de nitrogênio gasoso até permanência de um líquido pastoso de coloração amarelada escura ou marrom. Por fim, este líquido foi ressuspensão no mesmo solvente utilizado para extração segundo a equação (1). Esta suspensão permitiu padronizar a concentração de metabólitos antifúngicos produzidos por grama de substrato fermentado, sendo utilizada nos testes de inibição fúngica. Em paralelo, foi feita extração de possíveis substâncias inibidoras de fungos presentes nos substratos não fermentados. Para tal, uma amostra de substrato não fermentado foi submetida às mesmas condições de extração, concentração e ressuspensão descrita para amostras de substrato fermentado. Esta ressuspensão foi utilizada como branco, ou testemunha, nos testes de inibição fúngica.

Equação (1). Determinação de volume de solvente utilizado na ressuspensão dos metabólitos antifúngicos.

$$V_r = \left(\frac{A_s}{2} \right)$$

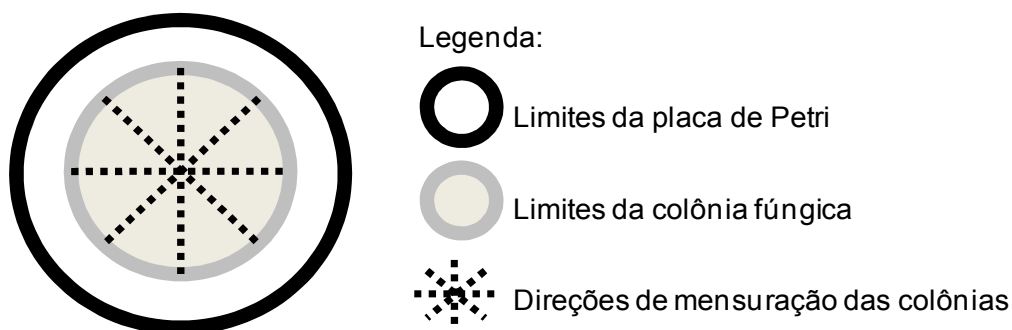
Sendo: V_r = volume de solvente utilizado na ressuspensão (em mililitros)

A_s = Quantidade de amostra submetida à extração (em gramas).

4.2.5 Inibição dos Fungos Fitopatogênicos

Dois mililitros dos extratos ressuspensos foram adicionados em placa de Petri de vidro esterilizadas a seco (2 h a 170 °C) e deixados em repouso até total evaporação do solvente. Em seguida, 20 mL de meio ABD ainda liquefeito foram adicionados às placas, submetidos a homogeneização e deixados em repouso até solidificação. Estes processos foram realizados em câmara de fluxo laminar para evitar contaminação externa. Cada placa foi inoculada em seu centro com um pedaço de meio ABD (aproximadamente 2 mm x 2 mm) contendo micélio do fitopatógeno pré reativado e utilizado no respectivo planejamento. As placas inoculadas foram incubadas em estufa tipo BOD a 25 °C. Foram utilizados mais de um fitopatógeno para inibição nos diferentes desenhos experimentais, sendo que cada fitopatógeno teve seu tempo de incubação especificado na metodologia dos desenhos experimentais e inicialmente o bolor *D. maydis* foi utilizado como microrganismo indicador (conforme item 4.2.6). O controle (testemunha) foi crescimento fúngico nas placas inoculadas com o extrato do substrato não fermentado. Após decorrido tempo de incubação, foi determinada a média de diâmetro de colônia, mensurando o diâmetro da mesma colônia nas direções vertical, horizontal e diagonais (figura 1). A porcentagem de inibição fúngica foi calculada conforme equação (2). Não foram feitas replicatas das placas.

Figura 1. Ilustração de como foram mensuradas as colônias fúngicas.



Equação (2). Percentual de inibição fúngica de extratos de substrato fermentado

$$\% \text{ de inibição} = 1 - \left(\frac{Dt}{Dc} \right) \times 100$$

Sendo: Dt = média do diâmetro da colônia no tratamento

Dc = média do diâmetro da colônia controle

4.2.6 Determinação do Solvente Extrator, Ingredientes do Meio de Cultura e Condições de Cultivo

Foram realizados experimentos sequenciais com o objetivo de determinar as melhores condições de produção de metabólitos antifúngicos contidos em substrato fermentado por *T. atroviride* com base na variação da composição do substrato e condições de cultivo do fungo. Outrossim, foram testados solventes com diferentes polaridades (hexano, acetato de etila e etanol) na extração destes metabólitos antifúngicos. A extração dos metabólitos foi realizada conforme item 4.2.4 e testes de inibição fúngica conforme item 4.2.5. O microrganismo *D. maydis* foi utilizado como indicador por ser de fácil avaliação e rápido crescimento. Posteriormente foi testada inibição em *C. gloeosporioides* e *F. moniliforme*.

4.2.6.1 Definição do melhor solvente extrator

Com o objetivo de determinar o melhor solvente extrator dos metabólitos antifúngicos produzidos por *T. atroviride* foi aplicado um desenho experimental Plackett-Burman com 11 fatores, doze corridas e 3 repetições no ponto central, totalizando 15 experimentos. As variáveis estudadas e seus níveis estão indicados na tabela 1 e o desenho experimental na tabela 5 (página 42). Para a realização do experimento, 15,0 g de farelo de trigo seco foi suplementado com 30,0 g/kg de glicose, conforme os autores Bonnarne *et al.* (1997), Sarhy-Bagnon *et al.* (2000), Ramos, Fiaux, e Leite (2008) e Ramos *et al.* (2009), e com os correspondentes

nutrientes indicados nas tabelas 1 e 5 (página 39). Após 7 dias de fermentação, três amostras de 5,0 g em base seca do substrato fermentado foram retiradas de cada experimento e colocadas em três cartuchos de papel filtro. Cada cartucho foi submetido à extração com um dos solventes, hexano, acetato de etila ou etanol absoluto para obter os metabólitos antifúngicos produzidos. Os extratos foram posteriormente concentrados em banho-Maria a 40 °C sob fluxo de nitrogênio gasoso e ressuspensos em 2,5 mL do mesmo solvente utilizado na extração. A resposta foi expressa em percentual de inibição do fungo *D. maydis* após 03 dias de incubação a 25 °C.

Tabela 1. Variáveis independentes e seus respectivos níveis estudados no desenho experimental Plackett-Burman de 11 fatores no cultivo de *T. atroviride*.

Variáveis independentes	Níveis		
	-1	0	+1
PE: Peptona bacteriológica (g/kg de substrato)	1	5,5	10
EL: Extrato de levedura (g/kg de substrato)	1	5,5	10
N1: (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/10 g de substrato)	0,1	0,55	1
N2: NaNO ₃ .7H ₂ O (g/10 g de substrato)	1	5,5	10
Mg: MgSO ₄ .7H ₂ O (g/10 g de substrato)	0,5	2,75	5
Ca: CaCl ₂ .6H ₂ O (g/10 g de substrato)	0,01	0,055	0,1
Fe: FeSO ₄ .7H ₂ O (g/10 g de substrato)	0,01	0,055	0,1
Zn: ZnSO ₄ .7H ₂ O (g/10 g de substrato)	0,01	0,055	0,1
K: KCl (g/10 g de substrato)	0,5	2,75	5
T: Temperatura de cultivo	25	30	35
U: Teor de umidade do substrato (%)	70	75	80

4.2.6.2 Definição dos ingredientes do meio e condições de cultivo

4.2.6.2.1 *Determinação de Traços Minerais, Fontes de Nitrogênio e Condições de Cultivo*

Os traços minerais, fontes de nitrogênio e condições de cultivo de *T. atroviride* foram determinadas no mesmo desenho experimental Plackett-Burman de 11 fatores descrito no item 4.2.5.1.

4.2.6.2.2 *Determinação das Melhores Concentrações dos Ingredientes e Condições de Cultivo para a Maior Produção de Antifúngicos*

Com o objetivo de determinar as melhores condições de cultivo do *T. atroviride* para a produção de metabolitos antifúngicos, com suporte no experimento anterior, foi realizado desenho experimental Fatorial Fracionado 2^{5-1} com três repetições no ponto central, totalizando 19 experimentos. As variáveis estudadas e seus níveis constam na tabela 2 e o desenho experimental consta na tabela 8 (página 47). Para a realização do experimento, 10,0 g de farelo de trigo seco suplementado com (g/kg de substrato): 0,1 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1 de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5,0 de KCl ; 0,01 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; e 0,1 de $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; além dos correspondentes nutrientes indicados nas tabelas 2 e 8 (página 47) e fermentado sob às condições de teor de umidade do substrato, temperatura e tempo de cultivo indicados. Após fermentação, todo o substrato fermentado (10,0 g em base seca) dos experimentos foi transferido para cartuchos de papel filtro e submetido à extração com acetato de etila. Os extratos foram posteriormente concentrados em banho-Maria a 40 °C sob fluxo de nitrogênio gasoso e ressuspensos com 5,0 mL de acetato de etila. A resposta foi expressa em percentual de inibição do fungo *D. maydis* após 3 dias de incubação a 25 °C,.

Tabela 2. Variáveis independentes e níveis utilizados no desenho experimental Fatorial Fracionado 2^{5-1} no cultivo de *T. atroviride*.

Variáveis independentes	Níveis		
	-1	0	+1
U: Teor de umidade do substrato	50 %	60 %	70 %
TPT: Temperatura de cultivo	27 °C	30 °C	33 °C
TPO: Tempo de fermentação	4 dias	6 dias	8 dias
EL: Extrato de levedura (g/kg de substrato)	10 g	30 g	50 g
GL: Glicose (g/kg de substrato)	10 g	30 g	50 g

4.2.6.2.2.1 Utilização da metodologia de Análise de Superfície de Resposta para determinação das melhores concentrações de glicose e extrato de levedura e teor de umidade do substrato na produção de antifúngicos

Com o objetivo de determinar as melhores condições de cultivo do *T. atroviride* para a produção de metabolitos antimicrobianos, com base nos experimentos anteriores, foi realizado planejamento Box-Behnken com três fatores e três variáveis e um bloco, totalizando 15 experimentos. As variáveis estudadas e seus níveis são apresentados na tabela 3 e o desenho experimental na tabela 10 (página 52). Para realização do experimento, 15,0 g de farelo de trigo seco foi suplementado com (g/kg de substrato): 0,1 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1 de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5,0 de KCl ; 0,01 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; e 0,1 de $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; além dos correspondentes nutrientes e teor de umidade ajustados conforme indicado nas tabelas 3 e 10 (página 52) . Os frascos erlenmeyers contendo o substrato inoculado foram incubados para fermentar por 4 dias a 28 °C. Após fermentação, todo o substrato fermentado dos experimentos foram transferidos para cartuchos de papel filtro e submetido à extração com acetato de etila para obter os metabolitos antifúngicos produzidos. Os extratos foram posteriormente concentrados em banho-Maria a 40 °C sob fluxo de nitrogênio gasoso e ressuspensos com 7,5 mL de acetato de etila. A resposta foi expressa em percentual de inibição do fungo *D. maydis* após 3 dias de incubação a 25 °C.

Paralelamente foi utilizado parte do extrato ressuspenso para testes de inibição contra *C. gloeosporioides* e *F. moniliforme* com o intuito de testar o espectro

de ação antifúngica dos metabólitos produzidos por *T. atroviride* nas condições do presente trabalho. A resposta foi expressa em percentual de inibição de *C. gloeosporioides* e *F. moniliforme* após 5 e 6 dias de incubação, respectivamente, a 25 °C.

Tabela 3. Variáveis independentes e seus respectivos níveis estudados no desenho experimental Box-Behnken de 3 fatores no cultivo de *T. atroviride*.

Variáveis independentes	Níveis		
	-1	0	+1
GL: Glicose (g/kg de substrato)	1 g	10 g	19 g
EL: Extrato de levedura (g/kg de substrato)	1 g	10 g	19 g
U: Teor de umidade do substrato	60%	70%	80%

4.6.2.3 Melhores condições de cultivo do *T. atroviride* em bagaço de cana para a produção de antifúngicos

Com o objetivo de testar uma matéria prima alternativa para possível falta de farelo de trigo, em caso de uso industrial do processo, foi testado o uso de bagaço de cana de açúcar como substrato para produção de metabólitos antifúngicos por *T. atroviride*. Para tal, foi realizado planejamento central composto (2^2) com duas variáveis, dois níveis e três repetições no ponto central, aplicando quatro pontos estrela, num total de 11 experimentos. As variáveis estudadas e seus níveis são apresentadas na tabela 4, sendo o intervalo de estudo baseado em experimentos preliminares. Para realização do experimento, 10,0 g de farelo de trigo seco foi suplementado com (g/kg de substrato) 0,1 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1 de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5,0 de KCl ; 0,01 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; e 0,1 de $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; além dos correspondentes nutrientes indicados na tabela 4 e 12. O substrato teve a umidade ajustada para 63% e os frascos erlenmeyers contendo o substrato inoculado foram incubados para fermentar por 4 dias a 28 °C. Após fermentação, todo o substrato fermentado dos experimentos foi transferido para cartuchos de papel filtro e submetido à extração com acetato de etila para obter os metabólitos antifúngicos produzidos. Os extratos foram posteriormente concentrados em banho-Maria a 40 °C sob fluxo de nitrogênio gasoso e ressuspensos com 5 mL de acetato de etila. A

resposta foi expressa em percentual de inibição dos fungos *C. gloeosporioides* e *R. solani* após 5 e 2 dias de incubação a 25 °C, respectivamente.

Tabela 4. Variáveis independentes e seus respectivos níveis estudados no desenho experimental Central Composto 2² no cultivo de *T. atroviride*.

Variáveis independentes	Níveis				
	- α	-1	0	+1	+ α
GL: Glicose (g/kg de substrato)	1,5	1,70	2,20	2,70	2,91
EL: Extrato de levedura (g/kg de substrato)	0,5	0,80	1,50	2,20	2,49

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de determinar as melhores condições de cultivo do *T. atroviride* para a produção de metabolitos antifúngicos em farelo de trigo, foram realizados 4 experimentos utilizando *Diplodia maydis* como fitopatógeno indicador. O primeiro, um desenho Plackett-Burman de 11 fatores, teve como objetivo definir o solvente a ser utilizado na extração dos metabolitos antifúngicos, bem com a definição de alguns ingredientes minerais, fontes de nitrogênio e parâmetros de cultivo. O segundo e terceiro desenhos experimentais, Fatorial Fracionado 2^{5-1} e Box-Behnken de 3 fatores, respectivamente, objetivaram determinar as melhores condições de cultivo em termos de composição de substrato e verificar a abrangência da capacidade antifúngica dos extratos obtidos em outros fitopatógenos além do *D. maydis*. Finalmente o quarto experimento, Central Composto 2^2 , objetivou determinar a viabilidade de utilizar o bagaço de cana de açúcar como um substrato alternativo para a produção de metabolitos antifúngicos verificando a capacidade de inibir *Rhizoctonia solani*, importante fitopatógeno causador de “damping-off” em diversas culturas, e *Colletotrichum gloeosporioides*, causador de podridão pós colheita em vários frutos e antracnose em alguma culturas.

5.1 DETERMINAÇÃO DO SOLVENTE EXTRATOR, INGREDIENTES DO MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO.

5.1.1 Definição do Melhor Solvente Extrator

A tabela 5 apresenta o desenho experimental Plackett-Burman de 11 fatores e os resultados da percentagem de inibição de *D. maydis* devido aos metabolitos antifúngicos produzidos em cada experimento e extraídos do meio de cultivo com os solventes hexano, acetato de etila e etanol absoluto. O coeficiente de determinação (R^2) para cada solvente foi de 0,9458, 0,8064 e 0,2752, respectivamente (tabela 5). Isto implica que os modelos explicam 94,58 %, 80,64 % e 27,52 % da variabilidade

obtida na inibição de *D. maydis* pelos extratos de hexano, acetato de etila e etanol, respectivamente. O R^2 dos extratos etanólicos foi baixo e considerado insatisfatório, já hexano e acetato de etila apresentaram R^2 satisfatório.

Os resultados indicam que os metabólitos inibidores de *D. maydis*, produzidos por *T. atroviride* sob as condições experimentais apresentam mais afinidade pelos solventes menos polares acetato de etila e hexano. Dentre estes dois solventes, o desempenho das inibições dos extratos de acetato de etila foram mais consistentes e eficientes. Para facilitar a comparação, foi realizado teste t de Student ao nível de confiança (α) de 95 % para avaliar o desempenho dos solventes, sempre confrontando uma inibição de hexano contra uma de acetato. Assim sendo, foram realizados dois confrontos: o confronto 1 comparou os experimentos de cada solvente em ordem das corridas; e confronto 2 comparou as melhores respostas de cada solvente. A tabela 6 apresenta os resultados do teste t de Student. Em ambos os casos o acetato de etila apresentou melhor desempenho. No primeiro caso este solvente foi superior em 9 experimentos, inferior em 2 e não houve diferença significativa em 4. No confronto entre as melhores respostas, o acetato foi superior em 13 experimentos e não houve diferença significativa em 2 confrontos.

Provavelmente a síntese dos metabólitos solúveis por acetato de etila foi menos afetada pelas condições de cultivo, apresentando assim uma menor variação na inibição. Verifica-se que a polaridade do solvente extrator tem um papel muito importante com relação à eficiência na extração dos inibidores fúngicos e que a produção e características dos metabólitos parece ser consequência das condições de cultivo e dos nutrientes adicionados ao substrato. Ante o exposto, o acetato de etila se apresentou como melhor solvente e assim foi selecionado para extração de metabólitos antifúngicos produzidos durante o desenvolvimento do *T. atroviride* em farelo de trigo.

Tabela 5. Desenho experimental Plackett-Burman de 11 fatores. Tempo de cultivo e concentração de glicose fixados em 7 dias e 3 g/100 g de substrato, respectivamente. Resposta: inibição de *D. maydis* para extrato de cada solvente. Abaixo, coeficientes de determinação (R^2).

Exp	PE*	EL*	N1*	N2*	Mg*	Ca*	Fe*	Zn*	K*	U*	T*	Inibição (%)		
												Hexano	Acetato	Etanol
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	13,09%	37,64%	5,84%
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	23,50%	34,94%	8,36%
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	11,17%	31,39%	4,42%
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	23,51%	14,63%	14,04%
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	45,74%	26,70%	5,05%
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	22,24%	34,80%	4,10%
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	33,44%	36,79%	-0,16%
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	17,98%	33,24%	10,25%
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	7,57%	20,17%	8,52%
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	3,31%	24,29%	7,41%
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	12,93%	42,76%	5,68%
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	26,97%	29,26%	4,26%
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12,93%	23,44%	7,26%
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18,77%	19,03%	21,14%
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26,03%	25,99%	21,29%
R^2												0,9458	0,8064	0,2752

*PE: peptona bacteriológica ; EL: extrato de levedura ; N1:sulfato de amônia ; N2: Nitrato de sódio heptaidratado ; Mg: sulfato de magnésio heptaidratado ; Ca: cloreto de cálcio hexaidratado ; Fe: sulfato ferroso heptaidratado ; Zn: sulfato de zinco heptaidratado ; K: cloreto de potássio ; U: umidade ; T: temperatura.

Tabela 6. Comparação de melhor solvente entre hexano e acetato de etila. Uso do teste t de Student ao nível de confiança de 95 % ($\alpha=95\%$).

Confronto: ordem experimental					Confronto: melhores inibições							
Exp	Inibição		p	Md*	Exp	Hexano	x	Acetato	p	Md*		
	Hexano	x				Acetato	Exp	Inibição			Inibição	Exp
1	13,09%	<	37,64%	0,000	*A	5	45,74%	=	42,76%	11	0,417	ns
2	23,50%	<	34,94%	0,005	*A	7	33,44%	=	37,64%	1	0,062	ns
3	11,17%	<	31,39%	0,000	*A	12	26,97%	<	36,79%	7	0,000	*A
4	23,51%	>	14,63%	0,000	*H	15	26,03%	<	34,94%	2	0,000	*A
5	45,74%	>	26,70%	0,002	*H	4	23,51%	<	34,80%	6	0,000	*A
6	22,24%	<	34,80%	0,000	*A	2	23,50%	<	33,24%	8	0,009	*A
7	33,44%	=	36,79%	0,086	ns	6	22,24%	<	31,39%	3	0,001	*A
8	17,98%	<	33,24%	0,000	*A	14	18,77%	<	29,26%	12	0,002	*A
9	7,57%	<	20,17%	0,000	*A	8	17,98%	<	26,70%	5	0,001	*A
10	3,31%	<	24,29%	0,000	*A	1	13,09%	<	25,99%	15	0,000	*A
11	12,93%	<	42,76%	0,000	*A	11	12,93%	<	24,29%	10	0,001	*A
12	26,97%	=	29,26%	0,056	ns	13	12,93%	<	23,44%	13	0,000	*A
13	12,93%	<	23,44%	0,000	*A	3	11,17%	<	20,17%	9	0,000	*A
14	18,77%	=	19,03%	0,900	ns	9	7,57%	<	19,03%	14	0,000	*A
15	26,03%	=	25,99%	0,952	ns	10	3,31%	<	14,63%	4	0,000	*A

*Na coluna Md (melhor desempenho): *H: houve diferença significativa e hexano apresentou melhor desempenho ; *A: houve diferença significativa e acetato de etila apresentou melhor desempenho ; ns: não houve diferença significativa entre as inibições dos solventes.

5.1.1.1 Metabólitos antifúngicos extraídos pelos solventes extratores

A polaridade de um solvente é medida, dentre outros fatores, pela sua constante dielétrica (CD), sendo que as CDs de hexano, acetato de etila e etanol são 1,9, 6,2 e 24,6, respectivamente, para termos de comparação, a CD da água é 80,4 (TEIXEIRA *et al.*, 2010). Hexano e acetato de etila possuem polaridade próxima, portanto há possibilidade de extração de um mesmo metabólito por ambos os solventes, o que de certa forma se manifestou nos resultados indicados na tabela 1. Aparentemente os metabólitos antifúngicos produzidos pelo *T. atroviride* tendem ser solubilizados pelos solventes menos polares.

Como não foi realizada identificação dos metabólitos presentes nos extratos de cada solvente não é possível afirmar aqueles responsáveis pela inibição apresentada no trabalho. Contudo, com base na literatura existente, um dos possíveis metabólitos presentes é 6-pentil- α -pirona (6PP), molécula com capacidade de inibição fúngica comprovada por vários autores e considerada o principal metabólito antifúngico produzido por *Trichoderma* spp. (GHISALBERTI; SIVASITHAMPARAM; 1991 UENO, 2007;).

A presença de 6PP pode ser inferida com base no trabalho de Sarhy-Bagnon *et al.* (2000), que utilizaram hexano para extrair e identificar este metabólito. A fermentação foi feita em condições de cultivo similares ao presente trabalho, com a mesma cepa (IMI 206040) e mesmo substrato (bagaço de cana moído), obtendo altas concentrações do 6PP. Sarhy-Bagnon *et al.* (2000) comprovam, portanto, que hexano é capaz de extrair 6PP e a cepa IMI 206040 é produtora do metabólito. O mesmo metabólito pode estar presente e ser responsável pelas inibições apresentadas nos extratos de acetato de etila, pois Claydon *et al.* (1987), Ueno (2007) e El-Hasan *et al.* (2008), utilizaram este solvente para extrair e identificar 6PP produzido por *Trichoderma* spp., provando ser possível também extrair o metabólito com acetato de etila, como no presente trabalho. Em nenhuma literatura pesquisada foi realizada extração com etanol, cuja ineficiência como extrator de metabólitos antifúngicos de *T. atroviride* foi comprovada (tabela 5),

Há também possibilidade de outros metabólitos antifúngicos estarem presentes nos extratos de acetato de etila. Vinale *et al.* (2006) e Vinale *et al.* (2009) utilizaram este solvente como extrator de cultivos de *T. harzianum* (cepas T22 e T39) em meio líquido e obtiveram os metabólitos hidroximetilantraquinona, diidroximetilantraquinona, T22azaphilone, harzianolide, T39butenolide e harzianopyridone. Os dois primeiros metabólitos com baixo potencial de inibição e os demais com bom potencial de inibição, tendo harzianopyridone o melhor desempenho, com maior inibição em menores concentrações.

5.1.2 Definição dos Ingredientes do Meio e Condições de Cultivo

A seleção dos melhores constituintes a serem adicionados ao farelo de trigo, como já foi mencionado, iniciou-se com um desenho experimental Plackett-Burman de 11 fatores utilizando o acetato de etila como solvente extrator, seguindo para dois novos desenhos, Fatorial Fracionado 2^{5-1} e Box-Behnken de 3 fatores, utilizando *D. maydis* como microrganismo indicador da inibição.

5.1.2.1 Determinação de traços minerais, fontes de nitrogênio e condições de cultivo de *T. atroviride*

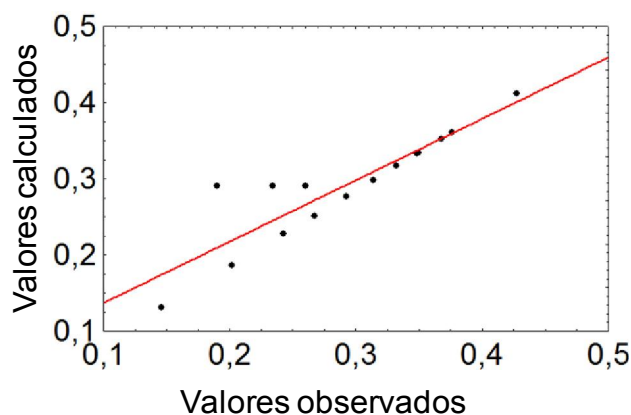
Para determinação de traços minerais, fontes de nitrogênio e condições de cultivo de *T. atroviride*, foi realizado desenho experimental Plackett-Burman de 11 fatores. O nível de glicose foi mantido constante ao nível, 30,0 g/kg de substrato, de acordo com informações da literatura (BONNARME *et al.*, 1997; SARHY-BAGNON *et al.*, 2000; UENO, 2007; RAMOS *et al.*, 2008;) e 7 dias de cultivo. O desenho experimental e a percentagem de inibição dos experimentos se encontram na tabela 5. Para análise dos resultados foram considerados os efeitos de cada variável no cultivo e análise de variância (ANOVA) (tabela 7).

Verifica-se pela ANOVA que o coeficiente de determinação, R^2 , foi de 0,8064 e a falta de ajuste não foi significativa ($p > 0,05$, tabela 7). Assim sendo, o modelo linear se adéqua bem para descrever e interpolar os dados de inibição de *D. maydis*. Estas proposições são confirmadas na figura 2, que mostra os valores observados e os valores calculados de acordo com o modelo proposto pelo planejamento experimental Plackett-Burman de 11 fatores.

Tabela 7. ANOVA do desenho experimental Plackett-Burman de 11 fatores. Valores de p e efeitos dos fatores. Resposta: inibição de *D. maydis*.

Fatores	Valor de p	Efeitos
Média do modelo		+0,290
PE: Peptona	0,233	-0,034
EL: Extrato de levedura	0,059	+0,080
N1: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,485	+0,017
N2: $\text{NaNO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,110	-0,056
Mg: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,172	-0,042
Ca: $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,247	-0,033
Fe: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,097	+0,060
Zn: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,080	+0,068
K: KCl	0,783	+0,006
T: Temperatura	0,768	-0,007
U: Umidade	0,242	-0,033
Falta de ajuste	0,077	
R^2	0,8064	

Figura 2. Ajuste dos dados do desenho experimental Plackett-Burman de 11 fatores. Valores de inibição calculados vs. valores de inibição observados. $R^2 = 0,8064$. Resposta: inibição de *D. maydis*.



O efeito positivo de uma variável indica que quanto maior o valor utilizado, desde que dentro do intervalo estudado, maior deveria ser o aumento na variável resposta, neste caso, de inibição de *D. maydis*. Logo, os sais com efeito positivo sulfato ferroso heptaidratado (+0,060), sulfato de zinco heptaidratado (+0,068) e cloreto de potássio (0,006), tiveram suas concentrações fixadas nos maiores níveis estudados, ou seja, 0,1 ; 0,1 ; e 5,0 g/kg de farelo de trigo seco, respectivamente. O efeito negativo de uma variável indica que quanto maior o valor utilizado menor será a inibição fúngica. Logo, os sais com efeitos negativos, sulfato de magnésio

heptaidratado (-0,042) e cloreto de cálcio hexaidratado (-0,033), tiveram suas concentrações fixadas nos menores níveis estudados, ou seja, 0,01 ; e 0,01, respectivamente.

Os sais com efeito negativo, mesmo com possibilidade de reduzir a inibição de *D. maydis*, não devem ser retirados completamente do meio de cultura, pois são fontes de minerais importantes para *T. atroviride*, por isso foram fixados em concentrações menores. No caso, os sais sulfato de magnésio heptaidratado (-0,042) e cloreto de cálcio hexaidratado (-0,033), são fontes de magnésio (Mg) e cálcio (Ca), respectivamente. O magnésio é utilizado para estabilizar ribossomos, membrana celular e ácidos nucleicos, além de necessário para atividade de várias enzimas. Já o cálcio é constituinte utilizado na estabilização de membranas de várias células além de auxiliar na resistência a calor em endósporos. Os sais com efeito positivo, sulfato ferroso heptaidratado (+0,060), sulfato de zinco heptaidratado (+0,068) e cloreto de potássio (0,006), são fontes de ferro (Fe), zinco (Zn) e potássio (K), respectivamente. O ferro é o mais importante dos microminerais por sua participação na respiração celular, além de ser essencial para citocromos e proteínas ferro-sulfuradas envolvidas nas reações com transporte de elétrons. O zinco está presente nas enzimas anidrase carbônica, álcool desidrogenase, RNA e DNA polimerases e outras proteínas de ligação em DNA. O potássio (K) é importante para atividade de enzimas. Por fim, o enxofre (S), aportado pelos sais de sulfato (SO_4^{2-}), está presente nos aminoácidos cisteína e metionina, além de várias vitaminas, incluindo tiamina, biotina e ácido lipóico (MADIGAN *et al.*, 2012).

O sulfato de amônia (N1) apresentou efeito positivo (+0,017) para inibição fúngica e o nitrato de sódio heptaidratado (N2) apresentou efeito negativo (-0,056). Isto indica que maiores concentrações de sulfato de amônia aumentam a inibição fúngica, por outro lado, quanto maior o valor de nitrato de sódio menor a inibição fúngica. O valor de p na análise de variância foi maior para sulfato de amônia ($p=0,485$) que para o nitrato de sódio heptaidratado ($p=0,110$), indicando que este último é mais significativo para a inibição. Entretanto, como ambos são fontes inorgânicas de nitrogênio, o primeiro foi descartado da composição do meio, logo, a concentração de sulfato de amônia foi fixada em seu nível mais alto (1,0 g/kg de farelo de trigo seco) para experimentos posteriores.

A peptona apresentou efeito negativo para inibição fúngica (-0,034) e o extrato de levedura apresentou efeito positivo (+0,080). Isto indica que maiores

concentrações de peptona bacteriológica reduziram a inibição fúngica, enquanto que maiores concentrações de extrato de levedura aumentariam a inibição. O valor de p na análise de variância foi menor para extrato de levedura ($p=0,059$) que para peptona ($p=0,233$), indicando que aquele nutriente é mais significativo para a resposta. Como ambos são fontes orgânicas de nitrogênio e outros nutrientes, a peptona bacteriológica foi descartada da composição do meio de cultivo por reduzir a inibição fúngica e o extrato de levedura foi mantido para estudos posteriores.

A umidade do meio (-0,033) e a temperatura de cultivo(-0.007), apresentaram efeito negativo indicando que a melhor inibição fúngica é obtida quando estas variáveis se encontram em seus menores valores. Entretanto, sabendo-se da importância destes fatores, principalmente para o crescimento do microrganismo (MANDIGAN *et al.*, 2012), optou-se por defini-los melhor em experimentos posteriores.

A ANOVA (tabela3) não detectou nenhum fator com efeito significativo ao nível convencionado de significância de 5 % ($\alpha=0,05$). Contudo, considerando que se trata de um experimento que envolve microrganismos, onde geralmente há maior variabilidade que em outros tipos de experimentos, um nível de significância maior poderia ser adotado. No caso de uso de nível de significância de 10 %, os fatores extrato de levedura ($p=0,059$), sulfato ferroso heptaidratado ($p=0,097$) e sulfato de zinco heptaidratado ($p=0,080$) seriam significativos ($p<0,10$), indicando que são variáveis importantes na inibição do microrganismo indicador *D. maydis*.

Se o nível de cada fator fosse fixado no valor onde foi obtida a melhor resposta no desenho Plackett-Burman de 11 fatores, seria possível obter inibição fúngica estimada da ordem de 42,96 %, através da interpolação dos dados com auxílio do modelo e do teste de desejabilidade.

Os nutrientes nitrato de sódio heptaidratado e peptona bacteriológica foram retirados do meio de cultivo, pois sua presença reduziria a inibição fúngica. Além disso, o sulfato de amônia e o extrato de levedura substituiriam, respectivamente, aqueles nutrientes com possível aumento na inibição. Assim sendo, pode-se concluir que as concentrações dos sais estudadas nas quais seriam obtidas as melhores respostas foram (g/kg de farelo de trigo seco): 0,01 g de sulfato de magnésio heptaidratado, 0,01 g de cloreto de cálcio hexaidratado, 0,1 g de sulfato ferroso heptaidratado, 0,1 g de sulfato de zinco heptaidratado, 5,0 g de cloreto de potássio e 1,0 de sulfato de amônia. A concentração de extrato de levedura, o teor de umidade

do substrato e a temperatura de cultivo foram estudados em novo experimento objetivando melhorar a inibição fúngica em função destas variáveis.

5.1.2.2 Determinação das melhores concentrações dos ingredientes e condições de cultivo para a maior produção de antifúngicos

Objetivando definir melhor o efeito da glicose, do extrato de levedura e dos parâmetros de cultivo no comportamento do *T. atroviride* na síntese de metabolitos antifúngicos, foi realizado um experimento Fatorial Fracionado 2^{5-1} . Neste experimento foram utilizadas as concentrações de minerais obtidas no experimento anterior. O desenho experimental e a percentagem de inibição se encontram na tabela 8. A ANOVA e os efeitos das variáveis se apresentam na tabela 9.

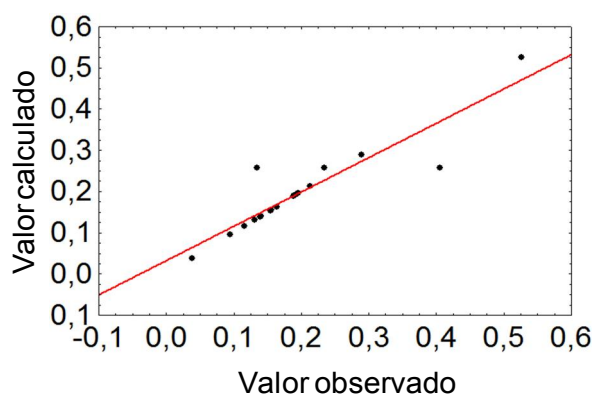
Verifica-se pela ANOVA que a falta de ajuste ($p=0,475$, tabela 9) não foi significativa e que o coeficiente de determinação, R^2 , foi de 0,7697, indicando que 76,97 % da variabilidade obtida na variável resposta é explicada pelos modelos. Assim sendo, o modelo linear se adequa bem para descrever e interpolar dados a inibição de *D. maydis*. Estas proposições são confirmadas ao observar a figura 3, que mostra os valores observados e os valores calculados de acordo com o modelo proposto pelo planejamento experimental Fatorial Fracionado 2^{5-1} .

Tabela 8. Desenho experimental Fatorial Fracionado 2^{5-1} . Resposta: inibição de *D. maydis* ($R^2 = 0,7697$).

Exp	U*	TPT*	TPO*	EL*	GL*	Inibição
1	-1	-1	-1	-1	+1	28,90%
2	+1	-1	-1	-1	-1	52,66%
3	-1	+1	-1	-1	-1	13,12%
4	+1	+1	-1	-1	+1	18,82%
5	-1	-1	+1	-1	-1	11,60%
6	+1	-1	+1	-1	+1	19,20%
7	-1	+1	+1	-1	+1	13,88%
8	+1	+1	+1	-1	-1	9,51%
9	-1	-1	-1	+1	-1	15,59%
10	+1	-1	-1	+1	+1	19,58%
11	-1	+1	-1	+1	+1	21,29%
12	+1	+1	-1	+1	-1	19,01%
13	-1	-1	+1	+1	+1	15,40%
14	+1	-1	+1	+1	-1	3,80%
15	-1	+1	+1	+1	-1	14,07%
16	+1	+1	+1	+1	+1	16,35%
17	0	0	0	0	0	13,50%
18	0	0	0	0	0	23,38%
19	0	0	0	0	0	40,49%

*U: umidade do substrato ; TPT: temperatura de cultivo ; TPO: tempo de cultivo ; EL: concentração de extrato de levedura ; GL: concentração de glicose.

Figura 3. Ajuste dos dados do desenho experimental Fatorial Fracionado 2^{5-1} . Valores de inibição calculados vs. valores de inibição observados. $R^2 = 0,7697$. Resposta: inibição de *D. maydis*.



De acordo com os resultados obtidos (tabela 9), nenhuma variável principal ou interação afetou significativamente a resposta ($p < 0,05$).

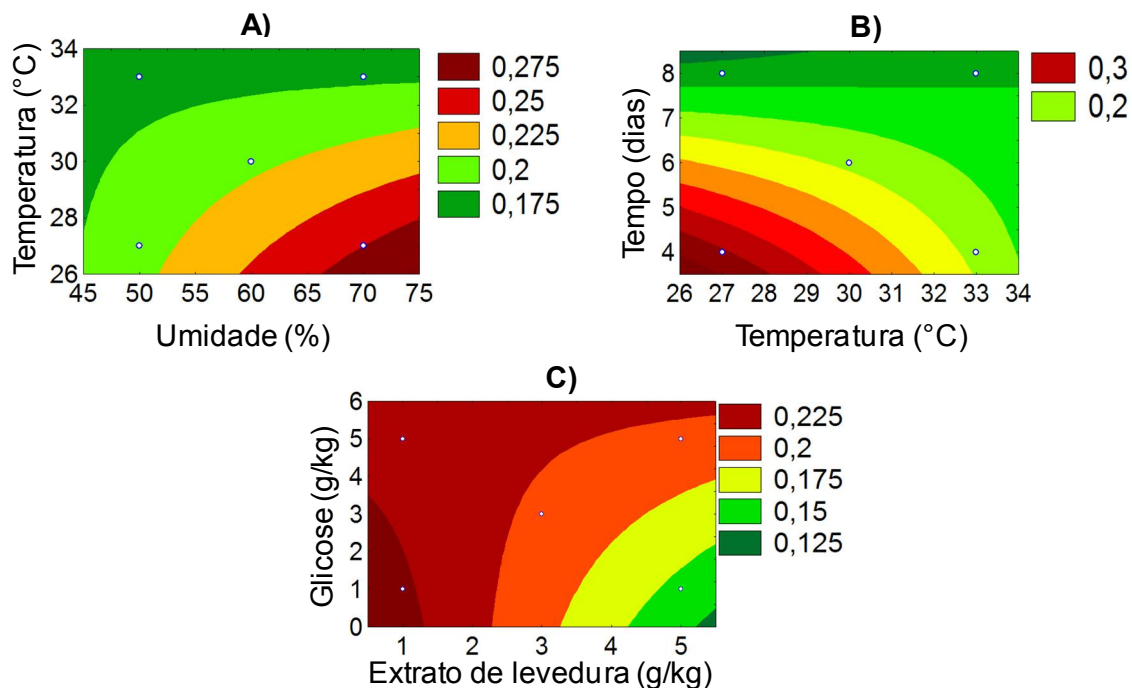
Tabela 9. ANOVA do desenho experimental Fatorial Fracionado 2^{5-1} . Valores de p e efeitos dos fatores e suas interações. Resposta: inibição de *D. maydis*.

Fatores	Valor de p	Efeitos
Média do modelo		+0,195
U: Teor de umidade	0,691	+0,031
TPT: Temperatura	0,534	-0,051
TPO Tempo	0,259	-0,106
EL: Extrato de levedura	0,517	-0,053
GL: Glicose	0,821	+0,018
U x TPT	0,721	-0,028
U x TPO	0,566	-0,047
U x EL	0,537	-0,050
U x GL	0,576	-0,451
TPT x TPO	0,470	+0,060
TPT x EL	0,311	+0,092
TPT x GL	0,807	+0,019
TPO x EL	0,603	+0,042
TPO x GL	0,562	+0,047
EL x GL	0,678	+0,032
Falta de ajuste	0,475	
R^2	0,7697	

Os fatores umidade (+0,031) e concentração de glicose (+0,018) apresentaram efeitos positivos, indicando que um aumento na umidade e na concentração de glicose levaria a um aumento na produção de antifúngicos, entretanto não significativa. Os fatores temperatura (-0,051), tempo de fermentação (-0,106) e extrato de levedura (-0,053) apresentaram efeitos negativos, indicando que um aumento destas variáveis levaria a uma redução na produção de metabolitos antifúngicos, também não significativas. As interações com coeficiente positivo, TPT x TPO (+0,060), TPT x EL (+0,092), TPT x GL (+0,019), TPO x EL (+0,042), TPO x GL (+0,047) e EL x GL (+0,032) indicam que maior inibição fúngica pode ser obtida quando os fatores associados estão ambos em seus maiores valores ou ambos em seus menores valores. As interações com coeficientes negativos, U x TPT (-0,028), U x TPO (-0,047), U x EL (-0,050) e U x GL (-0,451) indicam que uma maior inibição fúngica pode ser obtida quando um dos fatores associados está no maior nível e outra no menor. Como há duas possibilidades para as interações com efeito negativo, ou o primeiro fator é positivo e o segundo é negativo ou o primeiro é

negativo e o segundo é positivo, os gráficos de superfície de contorno (figura 4) auxiliam na interpretação e discussão dos resultados que se segue.

Figura 4. Exemplos de gráficos de superfície de contorno do planejamento experimental Fatorial Fracionado 2^{5-1} . Resposta: inibição de *D. maydis*.



O fator umidade apresentou efeito negativo nas interações com as demais variáveis, indicando que um aumento na variável resposta poderia ser obtido se a umidade se encontrar em nível oposto aos demais fatores (+1 e -1 ou -1 e +1). Os gráficos de interação mostram que as melhores respostas de inibição são obtidas quando a umidade está em 70 % (figura 4, item A), como esta umidade corresponde ao nível máximo trabalhado no desenho experimental, a interação desta variável com as demais só produziria a melhor resposta quando a outra variável estiver em seu menor valor. Como observado na figura 4, item A, há possibilidades de se alcançar melhor inibição fúngica quando a umidade do substrato se encontrar acima de 65%. Assim sendo, esta variável foi incluída como uma das variáveis no próximo experimento.

O fator temperatura apresentou efeito positivo em interação com tempo (+0,060), concentração de extrato de levedura (+0,092) e concentração de glicose (+0,019) e efeito negativo em interação com umidade (-0,028). Com auxílio dos gráficos de superfície de contorno observa-se que a interação desta variável com as

demais só produziria a melhor resposta quando a temperatura estivesse em nível mais baixo, ou seja, a 27 °C (figura 4, item B), portanto, poderia ser interessante trabalhar com temperaturas inferiores a este valor. Contudo, a temperatura de cultivo de *T. atroviride* utilizada por outros autores varia de 15 °C (COONEY *et al.*, 1997) a 34 °C (RAMOS *et al.*, 2008), sendo na grande maioria dos trabalhos utilizada entre 25 e 28 °C (BONNARME *et al.*, 1997; COONEY *et al.*, 1997; SARHY-BAGNON *et al.*, 2000; UENO, 2007; RAMOS *et al.*, 2008). Como a temperatura de 27 °C encontra-se dentro dos padrões encontrados na literatura, optou-se por fixar este parâmetro em 27 °C.

O fator tempo apresentou efeito positivo em interação com temperatura (+0,060), extrato de levedura (+0,042) e glicose (+0,047) e efeito negativo em interação com umidade (-0,047). Com auxílio dos gráficos de superfície de contorno observa-se que a interação desta variável com as demais só produziria a melhor resposta quando o tempo de cultivo estivesse em menor nível, ou seja, quatro dias, como mostra figura 4, item B. O tempo de cultivo encontrado na literatura variou entre 3 dias (UENO, 2007) e 31 dias (VINALE *et al.*, 2006). Entretanto, os autores Bonnarne *et al.* (1997) encontraram grandes concentrações de 6PP em 4 dias de cultivo; para Ramos *et al.* (2008) a concentração de 6PP decai a partir do sétimo dia, por uma provável degradação do próprio fungo e Sarhy-Bagnon *et al.* (2000), mesmo cultivando por até 10 dias, encontraram máxima produção de 6PP no terceiro dia de cultivo. Cabe ressaltar que Sarhy-Bagnon *et al.* (2000) trabalharam com a mesma cepa de *T. atroviride* (IMI 206040) e bagaço de cana, como no presente trabalho. Segundo o exposto, o tempo de cultivo fixado em 4 dias seria suficiente para *T. atroviride* produzir quantidades satisfatórias de metabólitos antifúngicos.

O fator concentração de extrato de levedura apresentou efeito positivo em interação com temperatura (+0,092), tempo de cultivo (+0,042) e glicose (+0,032) e negativo em interação com umidade (-0,050). Com auxílio dos gráficos de superfície de contorno observa-se que a interação desta variável com as demais só produziria a melhor resposta quando a concentração de extrato de levedura estivesse em seu menor valor (10,0 g/kg de substrato), como demonstra a figura 4, item C. Entretanto, como há tendência do ponto ótimo de inibição ser alcançado com extrato de levedura em menores concentrações que as estudadas, optou-se por trabalhar com extrato de levedura em novo experimento com faixa inferior à 10,0 g/kg.

A concentração de glicose apresentou efeito positivo em interação com temperatura (+0,019), tempo (+0,047) e extrato de levedura (+0,032) e negativo em interação com o teor de umidade do substrato (-0,451). Com auxílio dos gráficos de contorno observa-se que a interação desta variável com as demais só produziria a melhor resposta quando a concentração de glicose estivesse em seu menor valor (10,0 g/kg de substrato), como demonstra a figura 4, item C. Entretanto, como há tendência do ponto ótimo de inibição ser alcançado com extrato de levedura em menores concentrações que as estudadas, optou-se por levar a glicose a novo experimento para trabalhar com uma faixa menor que a utilizada.

Se o nível de cada fator fosse fixado no valor onde foi obtida a melhor resposta no desenho Fatorial Fracionado 2^{5-1} , seria possível obter inibição de *D. maydis* da ordem de 53,84%, interpolando os dados com auxílio do modelo e do teste de desejabilidade.

De acordo com o exposto, optou-se por trabalhar em concentrações menores de glicose e extrato de levedura, como também verifica-se que o melhor teor de umidade do substrato poderia ser encontrado acima do máximo trabalhado no experimento. Assim sendo, com o objetivo de melhor definir os valores destas variáveis foi realizado o experimento a seguir.

5.1.2.2.1 *Utilização da Metodologia de Análise de Superfície de Resposta para Determinação das Melhores Concentrações de Glicose e Extrato de Levedura e Teor de Umidade do Substrato na Produção de Antifúngicos*

Objetivando determinar as melhores concentrações de glicose e extrato de levedura e umidade do substrato para produção de metabólitos antifúngicos por *T. atroviride* foi realizado experimento Box-Behnken de 3 fatores. Neste experimento, além de utilizar *D. maydis* como microrganismo indicador, foi testada a inibição de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium moniliforme*. A tabela 10 apresenta o desenho experimental Box-Behnken e os resultados de percentagem de inibição dos bolores já mencionados pelos metabólitos antifúngicos. A ANOVA e os efeitos dos fatores se apresentam na tabela 11.

Tabela 10. Desenho experimental Box-Behnken de 3 fatores. Resposta: inibição de *D. maydis* ($R^2 = 0,9185$), *C. gloeosporioides* ($R^2 = 0,6809$) e *F. moniliforme* ($R^2 = 0,7801$).

Exp.	GL*	EL*	U*	Inibição		
				<i>D. maydis</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>F. moniliforme</i>
1	-1	-1	0	52,33%	40,15%	33,16%
2	+1	-1	0	55,54%	41,25%	35,53%
3	-1	+1	0	46,23%	38,31%	36,84%
4	+1	+1	0	48,80%	47,88%	31,58%
5	-1	0	-1	56,82%	44,20%	37,37%
6	+1	0	-1	56,34%	43,46%	34,21%
7	-1	0	+1	47,83%	18,23%	31,05%
8	+1	0	+1	64,04%	41,25%	46,84%
9	0	-1	-1	52,49%	16,02%	7,63%
10	0	+1	-1	45,75%	15,84%	33,68%
11	0	-1	+1	52,01%	16,02%	5,26%
12	0	+1	+1	39,00%	12,52%	6,32%
13	0	0	0	51,20%	13,81%	4,47%
14	0	0	0	45,43%	50,46%	28,95%
15	0	0	0	46,23%	14,36%	5,53%

*GL: concentração de glicose ; EL: concentração de extrato de levedura ; U: umidade.

Verifica-se pela ANOVA que a falta de ajuste dos modelos de *D. maydis* ($p=0,774$), *C. gloeosporioides* ($p=0,966$) e *F. moniliforme* ($p=0,720$) não foram significativas (tabela 11), para $p<0,05$. Os coeficientes de determinação (R^2) foram 0,9185 para *D. maydis*, 0,6809 para *C. gloeosporioides* e 0,7801 para *F. moniliforme* (tabela 11), indicando que 91,85%, 68,09% e 78,0 % da variabilidade é explicada pelos respectivos modelos. Assim sendo, os modelos se adéquam bem para descrever e interpolar os dados de inibição fúngica. Esta proposição é confirmada ao observar a figura 5, que mostra os valores observados e os valores calculados de acordo com o modelo proposto pelo desenho experimental.

Para a seleção das melhores concentrações de glicose e extrato de levedura, bem como melhor umidade do substrato, foram considerados os valores de p da ANOVA de cada microrganismo (tabela 11) e os gráficos de desejabilidade (figura 6). O gráfico de desejabilidade interpola as faixas dos fatores pesquisados, determina o melhor resultado possível para a inibição fúngica e indica o valor em cada fator para atingi-la.

Tabela 11. ANOVA do desenho experimental Box-Behnken de 3 fatores. Valores de p e efeitos dos fatores para cada microrganismo inibido. Resposta: inibição de *D. maydis*, *C. gloeosporioides* e *F. moniliforme*.

Fator	<i>D. maydis</i>		<i>C. gloeosporioides</i>		<i>F. moniliforme</i>	
	Valor de p	Efeito	Valor de p	Efeito	Valor de p	Efeito
Média		+0,514		0,313		+0,283
GL	0,136	+0,054	0,635	0,082	0,827	+0,024
GL ²	0,066	-0,060	0,229	-0,187	0,087	-0,227
EL	0,067	-0,081	0,987	+0,003	0,564	+0,067
EL ²	0,215	+0,029	0,809	+0,030	0,861	+0,014
U	0,438	-0,021	0,649	-0,079	0,610	-0,059
U ²	0,250	-0,026	0,535	+0,081	0,838	-0,017
GL x EL	0,928	-0,003	0,859	+0,042	0,809	-0,038
GL x U	0,117	+0,083	0,629	+0,119	0,564	+0,095
EL x U	0,423	-0,031	0,944	-0,016	0,462	-0,125
Falta de ajuste	0,606		0,966		0,720	
R ²	0,9185		0,6809		0,7801	

Figura 5. Ajuste dos dados do desenho experimental Box-Behnken de 3 fatores. Valores de inibição calculados vs. valores de inibição observados. Resposta: *D. maydis* ($R^2 = 0,9185$), *C. gloeosporioides* ($R^2 = 0,6809$) e *F. moniliforme* ($R^2 = 0,7801$).

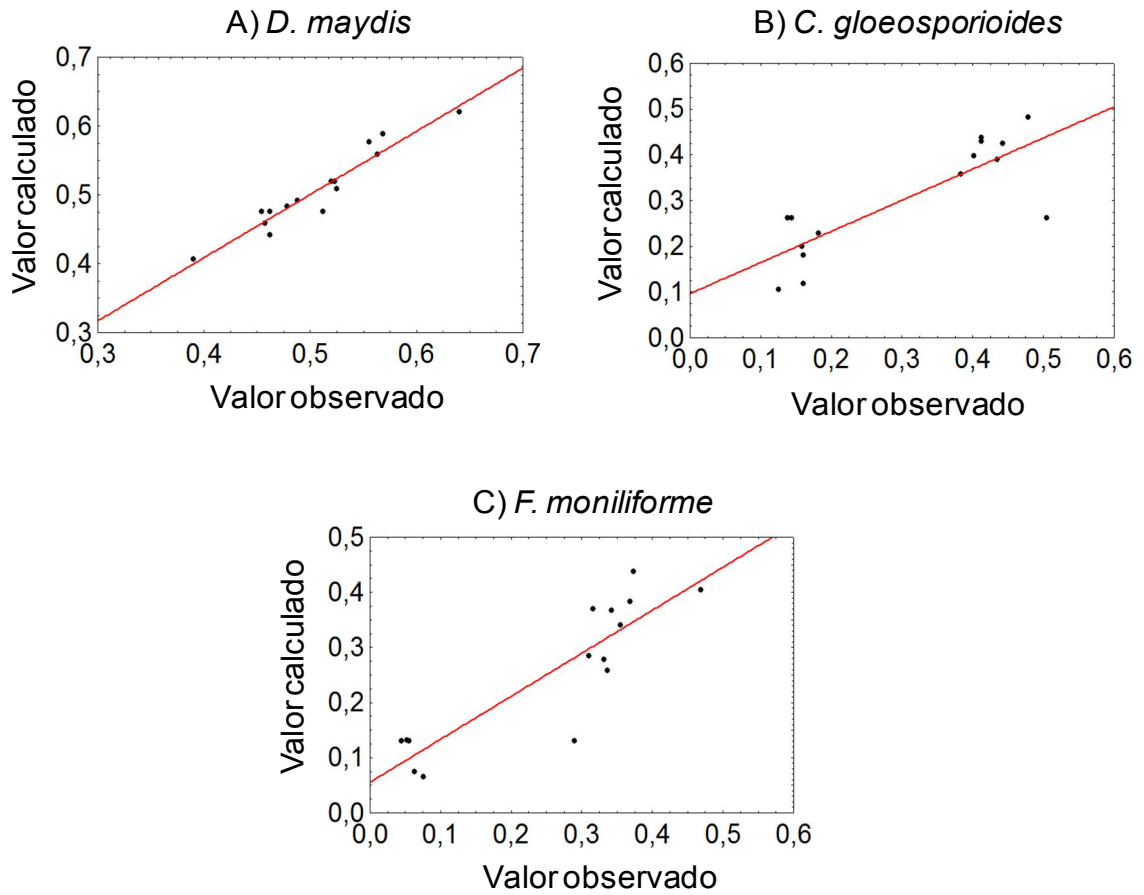
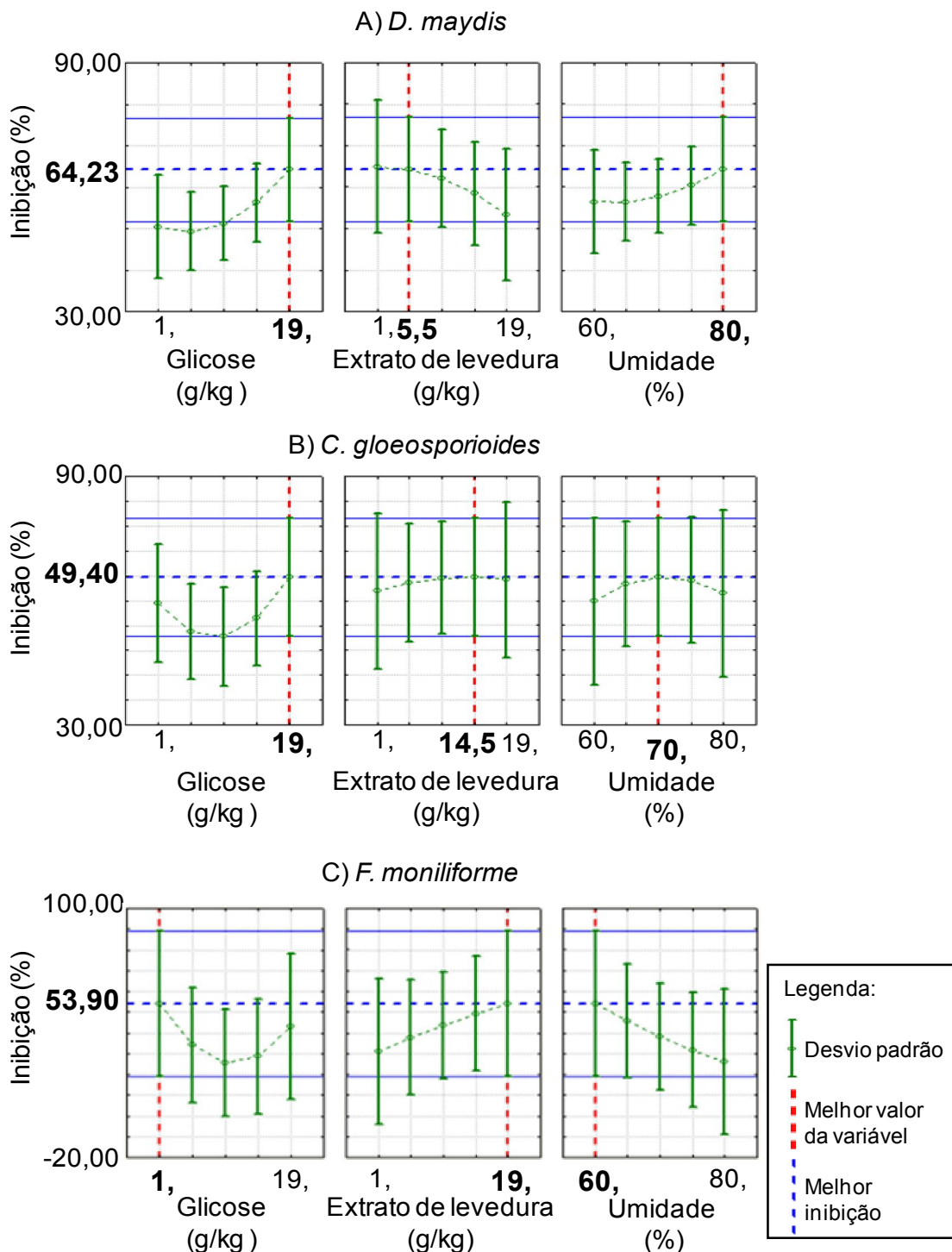


Figura 6. Gráficos de desejabilidade de concentração de glicose e extrato de levedura e teor de umidade de substrato. Desenho experimental Box-Behnken de 3 fatores. Resposta: inibição de *D. maydis* ($R^2 = 0,9185$), *C. gloeosporioides* ($R^2 = 0,6809$) e *F. moniliforme* ($R^2 = 0,7801$).



*Valores em negrito no eixo vertical (Y) correspondem ao máximo de percentagem de inibição; valores em negrito no eixo horizontal (X) correspondem ao ponto ótimo para cada fator.

Verifica-se pela ANOVA que nenhum fator principal, linear ou quadrático, nem as interações apresentaram significância para $p < 0,05$. Contudo, considerando que se trata de um experimento que envolve microrganismos, onde geralmente há maior variabilidade que em outros tipos de experimentos, um nível de significância maior poderia ser adotado. No caso de considerar um nível de significância de 10%, os seguintes fatores se apresentariam significativos ($p < 0,10$): glicose quadrático, ($p = 0,066$) e extrato de levedura linear ($p = 0,067$) para *D. maydis*, e glicose quadrático para *F. moniliforme* ($p = 0,087$), o que indica que estas variáveis tem um papel importante na síntese de metabólitos antifúngicos contra os respectivos microrganismos por parte do *T. atroviride*.

A tendência indicada pelos gráficos de desejabilidade (figura 6) mostra que o cultivo de *T. atroviride* deve ser feito em diferentes condições para melhor inibição de cada fitopatógeno. Para *D. maydis* (figura 6, item A), a concentração ótima foi alcançada apenas para a concentração de extrato de levedura, sendo 5,5 g/kg de substrato seco. A melhor inibição obtida (64,23%) com a presença dos pontos extremos de concentração de glicose e umidade do substrato indicam que os pontos ótimos destes fatores ainda não foram obtidos, sendo que em ambos os casos há indicação de que valores acima dos estudados deveriam ser pesquisados.

A faixa de estudo do teor de umidade do substrato, de 60 a 80%, para *D. maydis*, encontra-se dentro do intervalo do desvio padrão obtido para a melhor inibição, que corresponde às faixas azuis contínuas no gráfico. Isto indica que os teores estudados pouco influenciaram na inibição do bolor e que provavelmente o ponto máximo desta variável está próximo de 80%.

Acerca da concentração de glicose, ainda para *D. maydis*, a curva gerada no gráfico apresenta um aumento brusco de inibição fúngica nos valores próximos ao limite máximo (+1) estudados (figura 6, item A), indicando assim que, provavelmente, a ótima concentração de glicose deve se encontrar consideravelmente acima de 19 g/kg de substrato. Já o extrato de levedura, mesmo não apresentando $p < 0,05$ para seu efeito quadrático, atingiu sua concentração ótima para inibição de *D. maydis*. Os gráficos de desejabilidade de *D. maydis* (figura 6, item A) mostram que a maior inibição fúngica possível para as condições do experimento seria de 64,23%. Para tal, as concentrações de glicose, extrato de levedura e umidade deveriam ser 19,0 g/kg e 5,5 g/kg de substrato e 80% de umidade do meio.

Para *C. gloeosporioides* e *F. moniliforme* também não houveram fatores significativos ($p < 0,05$) segundo a ANOVA (tabela 11). No caso de *C. gloeosporioides* o ponto de máxima inibição foi encontrado com cultivo de *T. atroviride* em 70% de umidade do farelo de trigo com concentrações de glicose e extrato de levedura em 19,0 g/kg e 14,5 g/kg de substrato, respectivamente (figura 6, item B). A concentração de glicose apresentou brusca inclinação ascendente nos pontos próximos à concentração máxima estudada. Provavelmente um aumento considerável na inibição de *C. gloeosporioides* pode ser alcançado se forem estudadas faixas de concentração de glicose acima de 19,0 g/kg. Todavia, nas condições do experimento, a melhor inibição possível deste bolor seria 49,40%.

No caso de *F. moniliforme*, o ponto de máxima inibição foi encontrado com cultivo de *T. atroviride* em 60% de umidade do substrato e concentrações de glicose e extrato de levedura em 1,0 g/kg, 19,0 g/kg de substrato, respectivamente (figura 6, item C). Nenhuma das variáveis apresentou ponto ótimo para inibição, e possivelmente este ponto se encontra abaixo da faixa estudada, para concentração de glicose e teor de umidade do substrato, ou acima, para concentração de extrato de levedura. Para o caso de concentração de glicose, a curva indica melhor inibição tanto acima quanto abaixo da faixa estudada, contudo, deve ser considerado que no caso de estudo de faixas inferiores à atual, o valor mínimo a ser estabelecido é concentração de 0,0 g/kg de substrato. Para novos estudos do teor de umidade do substrato, outro aspecto importante a ser considerado é que estudos preliminares demonstraram que *T. atroviride* (cepa IMI 206040) não apresenta crescimento fúngico aparente em farelo de trigo com teor de umidade abaixo de 50%, este seria, portanto, o limite mínimo utilizável para esta variável. Todavia, nas condições do experimento, a melhor inibição fúngica possível nas as condições do experimento seriam de 53,90% para *F. moniliforme*.

Os resultados acima expostos demonstraram que as inibições de *C. gloeosporioides* (49,40%) e *F. moniliforme* (53,90%) ainda estão muito abaixo da inibição de *D. maydis* (64,23%), porém são passíveis de serem melhoradas. A figura 6 evidencia que para *C. gloeosporioides* a umidade do substrato e a concentração de extrato de levedura já atingiram um patamar ótimo, sendo necessário trabalhar melhor a concentração de glicose em valores acima de 19,0 g/kg de substrato.

As inibições relatadas estão diretamente ligadas às condições de cultivo de *T. atroviride*, à composição e tipo de metabólitos antifúngicos produzidos, bem como

à sua concentração. Assumindo que o extrato de acetato de etila obtido após cultivo de *T. atroviride* em farelo de trigo é complexo e possui vários compostos com potencial antifúngico, a otimização das condições de cultivo deve ser estudada para cada fitopatógeno alvo. Isso se deve ao fato de que cada microrganismo a ser inibido tem suas especificidades, sendo mais ou menos resistente aos metabólitos antifúngicos produzidos por *T. atroviride*.

O teor de umidade do farelo de trigo, entre 60% e 80%, esta de acordo com a umidade dos substratos sólidos ou semi-sólidos citados na literatura científica (SARHY-BAGNON *et al.*, 2000; RAMOS *et al.*, 2008). Cabe mencionar, entretanto, que a maioria dos trabalhos utiliza meios de cultivo líquidos (BONNARME *et al.*, 1997; VINALE *et al.*, 2006; VINALE *et al.*, 2008). Já a grande maioria dos autores fixa a concentração de glicose em 3% do caldo de cultivo (BONNARME *et al.*, 1997, 1997; VINALE *et al.*, 2006; VINALE *et al.*, 2008) ou em substrato sólido (SARHY-BAGNON *et al.*, 2000). Mesmo Ramos *et al.* (2008), que otimizaram produção de 6PP com experimentos multifatoriais utilizando em farelo de coco com substrato acabaram encontrando melhor produção do metabólito com 3% de sacarose.

Por final, os desenhos experimentais Plackett-Burman de 11 fatores, Fatorial Fracionado 2^{5-1} e Box-Behnken de 3 fatores, demonstraram que a melhor composição do meio e condições de cultivo de *T. atroviride* em farelo de trigo para inibição de *D. maydis* são: sais minerais (g/kg de farelo de trigo seco): 0,1 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,01 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 de $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,1 de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; e 5,0 de KCl ; fontes de carbono e nitrogênio (g/kg de farelo de trigo seco): 19,0 de glicose e 5,5 de extrato de levedura ; condições de cultivo: 27 °C, por 4 dias e 80% de umidade do substrato. Ao fim dos experimentos, a inibição máxima de *D. maydis* passou de 42,96% no desenho Plackett-Burman, passando para 53,84% no Fatorial Fracionado 2^{5-1} , e finalmente para 64,32% no Box-Behnken, correspondendo a um aumento de 21,36% de inibição entre o primeiro e o terceiro experimentos.

Para *C. gloeosporioides* e *F. moniliforme*, os traços de sais minerais e as condições de cultivo permaneceram iguais àquelas utilizadas para inibir *D. maydis*. Houve variação na umidade do substrato e as concentrações de glicose e extrato de levedura. Assim, para *C. gloeosporioides* o ponto de máxima inibição foi encontrado com cultivo de *T. atroviride* em 70% de teor umidade do farelo de trigo com concentração de glicose e extrato de levedura em 19,0 g/kg e 14,5 g/kg de

substrato, respectivamente. Já para *F. moniliforme* o ponto de máxima inibição foi encontrado com cultivo de *T. atroviride* em 60% de umidade do substrato e concentrações de glicose e extrato de levedura em 1,0 g/kg, 19,0 g/kg de substrato, respectivamente. As inibições máximas possíveis nas condições experimentais estudadas foram de 49,40% para *C. gloeosporioides* e 53,90% para *F. moniliforme*.

Vale ressaltar que a grande maioria dos trabalhos revisados pesquisa metabólitos antifúngicos específicos de *T. atroviride*, não com a somatória de inibição de todos os metabólitos presentes no cultivo. Os metabólitos produzidos por cada cepa e as condições de cultivo de *T. atroviride* destes trabalhos visam otimizar produção apenas do metabólito de interesse de cada autor. Assim sendo, é difícil comparar as condições de cultivo de *T. atroviride* sem especificar o metabólito para o qual as condições foram determinadas.

5.1.3 Melhores Condições de Cultivo do *T. atroviride* em Bagaço de Cana de Açúcar para a Produção de Antifúngicos

A cepa do fitopatógeno *D. maydis* que estava sendo utilizada, foi perdida ao longo dos experimentos, desta forma não foi utilizada neste planejamento.

Para este desenho experimental foi utilizado o bagaço de cana como alternativa ao substrato farelo de trigo. Também foram utilizados o fungo *C. gloeosporioides* e *R. solani*. O primeiro como referência aos resultados obtidos no desenho experimental Box-Behnken de 3 fatores, utilizando farelo de trigo e o segundo por sua importância como fitopatógeno e também para verificar qual seria o potencial e abrangência de utilização dos extratos.

Para otimização do cultivo de *T. atroviride* em bagaço de cana foi realizado desenho experimental Central Composto 2². A tabela 12 apresenta o desenho experimental e os resultados de percentagem de inibição de *C. gloeosporioides* e *R. solani* pelos metabólitos antifúngicos produzidos por *T. atroviride*. Experimentos prévios indicaram que o teor de umidade do bagaço de cana para um bom desenvolvimento do *T. atroviride* foi 63%. A ANOVA do desenho Central Composto 2² se apresenta na tabela 13.

Ambos os modelos obtiveram bom coeficiente de determinação (R^2), sendo 0,8869 para *C. gloeosporioides* e 0,8204 para *R. solani* (tabela 13). Isto indica que 88,69% e 82,04% da variabilidade da inibição de *C. gloeosporioides* e *R. solani* pode ser explicada pelos respectivos modelos. A falta de ajuste não foi significativa em nenhum dos modelos (tabela 13). Assim sendo, os modelos se adéquam bem para descrever e interpolar a inibição dos fungos testados. Esta proposição pode ser observada na figura 7, que mostra os valores observados e os valores calculados de acordo com os modelos propostos pelo planejamento experimental Central Composto 2².

Tabela 12. Desenho experimental Central Composto 2². Resposta: inibição de *C. gloeosporioides* ($R^2 = 0,8869$) e *R. solani* ($R^2 = 0,8204$).

Exp.	GL*	EL*	Inibição (%)	
			<i>C. gloeosporioide</i>	<i>R. solani</i>
1	-1,0	-1,0	64,05%	55,09%
2	-1,0	+1,0	41,52%	53,70%
3	+1,0	-1,0	31,65%	46,76%
4	+1,0	+1,0	38,99%	41,20%
5	-1,41421	0,0	50,38%	68,06%
6	+1,41421	0,0	38,99%	53,70%
7	0,0	-1,41421	41,78%	49,54%
8	0,0	+1,41421	46,59%	49,07%
9	0,0	0,0	57,88%	60,65%
10	0,0	0,0	58,99%	70,37%
11	0,0	0,0	66,59%	77,78%

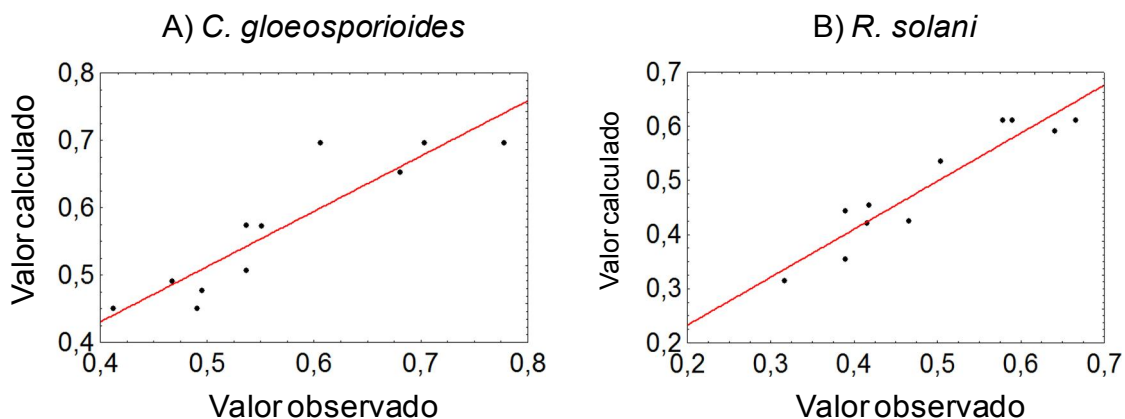
*GL: concentração de glicose ; EL: concentração de extrato de levedura.

Tabela 13. ANOVA do desenho experimental Central Composto 2². Valores de p e efeitos dos fatores para cada microrganismo inibido. Resposta: inibição de *C. gloeosporioides* e *R. solani*.

Fator	<i>C. gloeosporioides</i>		<i>R. solani</i>	
	Valor de p	Efeito	Valor de p	Efeito
Média do modelo		+0,612		+0,696
GL	0,063	-0,127	0,233	-0,103
GL ²	0,053	-0,165	0,249	-0,116
EL	0,595	-0,021	0,784	-0,019
EL ²	0,050	-0,172	0,085	-0,233
GL x EL	0,088	+0,149	0,831	-0,021
Falta de ajuste	0,412		0,802	
R^2	0,8869		0,8204	

*Sendo que: GL: concentração de glicose ; EL: concentração de extrato de levedura.

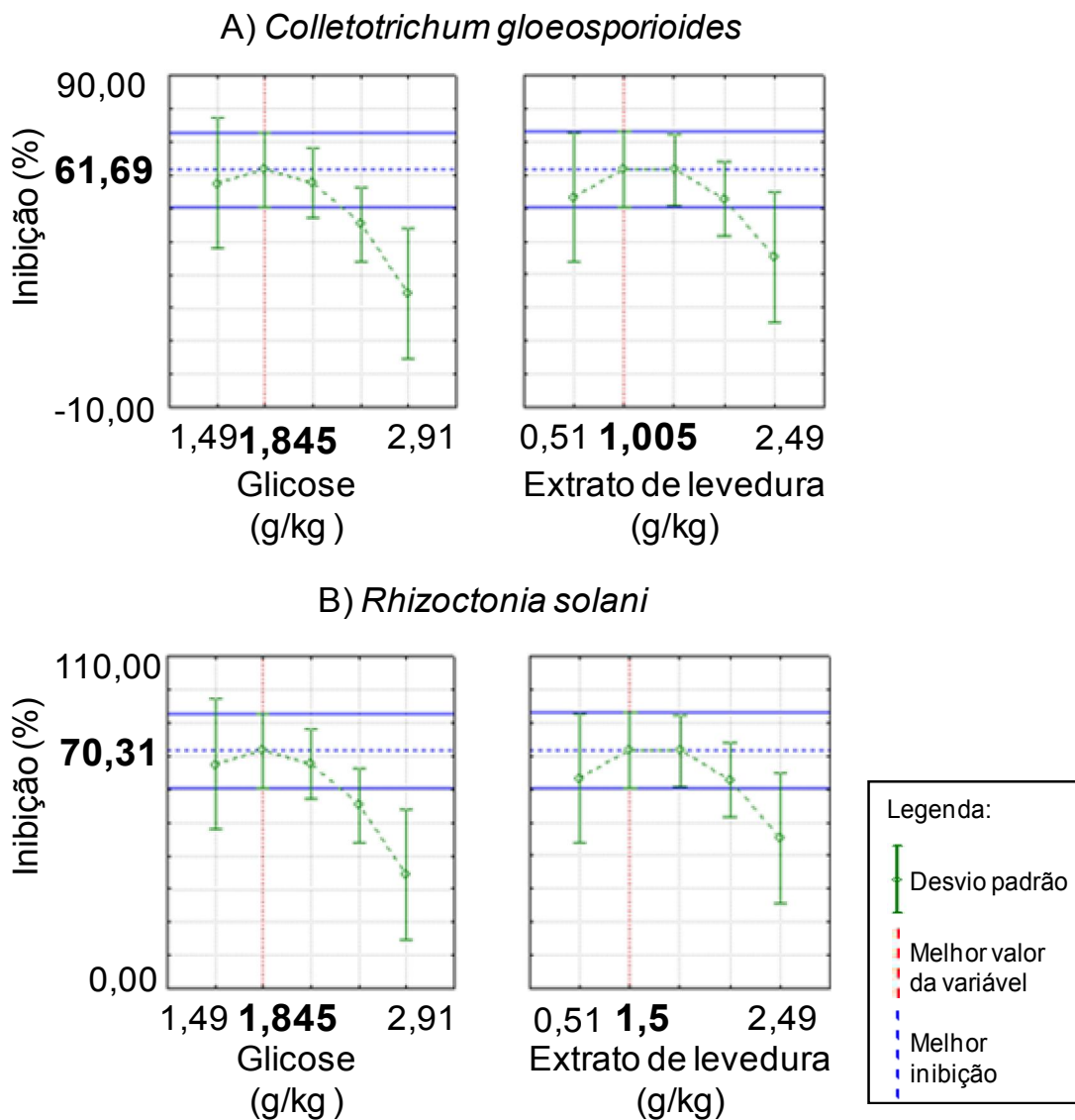
Figura 7. Ajuste dos dados do desenho experimental Central Composto 2^2 . Valores de inibição calculados vs. valores de inibição observados. Resposta: inibição de *C. gloeosporioides* ($R^2 = 0,8869$) e *R. solani* ($R^2 = 0,8204$).



Para a seleção das melhores concentrações de glicose e extrato de levedura foram considerados os valores de p da ANOVA de cada microrganismo (tabela 13) e os gráficos de desejabilidade (figura 8). No caso de *C. gloeosporioides*, os valores de p lineares e quadráticos e a interação linear das variáveis principais não foram significativos, porém foram muito baixos, próximos a 0,05, à exceção de extrato de levedura linear. Os gráficos de desejabilidade para *C. gloeosporioides* (figura 8, item A) indicam que a maior inibição fúngica possível para as condições do experimento seria de 61,69%. Para tal, as concentrações de glicose, extrato de levedura e unidade deveriam ser 1,845 g/kg e 1,005 g/kg de substrato. O gráfico de superfície de contorno (figura 9, item A) facilita a visualização do ponto central.

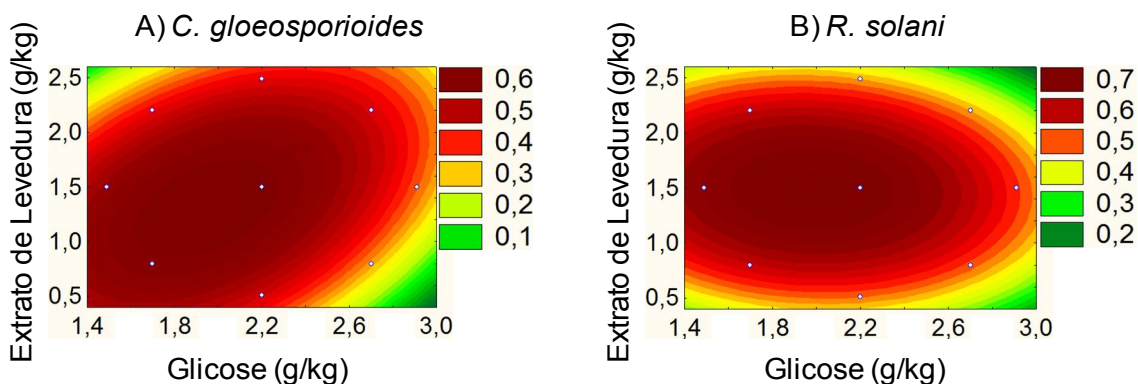
Para *R. solani*, o único valor de p considerado baixo é o quadrático de extrato de levedura. Os gráficos de desejabilidade para *R. solani* (figura 7, item B) indicam que a maior inibição fúngica possível para as condições do experimento seria de 70,31%. Para tal, as concentrações de glicose, extrato de levedura e unidade deveriam ser 1,845 g/kg e 1,5 g/kg de substrato. O gráfico de superfície de contorno (figura 9, item B) facilita a visualização do ponto central.

Figura 8. Gráficos de desejabilidade de concentração de glicose e extrato de levedura. Desenho experimental Central Composto 2². Cultivo de *T. atroviride* em bagaço de cana de açúcar moído. Resposta: inibição de *C. gloeosporioides* ($R^2 = 0,8869$) e *R. solani* ($R^2 = 0,8204$).



*Valores em negrito correspondem ao máximo de porcentagem de inibição, quando no eixo vertical, e ponto ótimo de cada fator quando no eixo horizontal.

Figura 9. Superfície de contorno do Desenho Experimental Central Composto 2². Cultivo de *T. atroviride* em bagaço de cana de açúcar moído. Resposta: inibição de *C. gloeosporioides* ($R^2 = 0,8869$) e *R. solani* ($R^2 = 0,8204$).



A priori os extratos de acetato de etila de cultivo de *T. atroviride* em bagaço de cana apresentaram maior poder de inibição que os extratos de cultivo em farelo de trigo. Contudo, maiores testes são necessários para confirmar esta afirmação.

Os resultados demonstram possibilidade de inibição de 61,69% desde que as concentrações de glicose, extrato de levedura e teor de umidade, sejam mantidas em 1,845, 1,005 g/kg de substrato e 63,0%, respectivamente, para cultivo de *T. atroviride* em bagaço de cana de açúcar. Já em cultivo em farelo de trigo, os resultados do desenho experimental Box-Behnken indicaram máxima inibição de *C. gloeosporioides* de 49,40%, desde que a umidade fosse fixada em 70%, a concentração de glicose em 19,0 g/kg de substrato e a de extrato de levedura em 14,5 g/kg de substrato.

A exigência de diferentes valores de umidade dos substratos, concentrações de glicose e de extrato de levedura para máxima inibição de *C. gloeosporioides* está possivelmente associada aos substratos utilizados no cultivo e suas características. Uma das explicações possíveis da menor necessidade de glicose no bagaço de cana é que, mesmo após prensa da cana, há restos de caldo impregnados nas fibras dos colmos contendo certa quantidade de açúcares, principalmente sacarose.

Quanto à umidade, a real importância da umidade do substrato é sua relação com a atividade de água (A_w). Para um mesmo volume de água adicionado, a percentagem de umidade é a mesma para bagaço de cana e farelo de trigo, pois se trata de uma relação gravimétrica, onde o peso seco dos substratos foi constante, dez gramas. Entretanto, a atividade de água é diferente, o farelo de trigo, com uma umidade ajustada para 63% apresentou 0,9985 de A_w (Aqualab Der Point Water

Activity Meter), enquanto o bagaço de cana, para a mesma umidade, apresentou 0,9868. Ambas as medidas estão próxima a A_w máxima, que é de 1,0 e, provavelmente, a diferença entre eles pouco diferenciou o comportamento fúngico, entretanto, observando estes dados, a menor atividade de água no bagaço de cana seria mais favorável à produção de metabólitos antifúngicos.

Além dos diferentes valores de umidade e concentração de glicose e de extrato de levedura tido como ótimo pelos diferentes substratos, a inibição proporcionada por cultivo de *T. atroviride* contra *C. gloeosporioides* em bagaço de cana foi superior ao de farelo de trigo, sendo 61,69% contra 49,40%, respectivamente. O substrato utilizado pode ter modificado a fisiologia do fungo, e isto influencia diretamente na produção de metabólitos. Sarhy-Bagnon *et al.* (2000) mensurou a produção de 6PP por *T. atroviride* em meio líquido e sólido (bagaço de cana) umidificado a 75% com o mesmo meio utilizado para cultivo líquido. A concentração do metabólito produzida no meio sólido foi 17 vezes maior que a produção em estado líquido. Mesmo a diferença entre bagaço de cana e farelo de trigo não ser tão grande quanto o bagaço de cana e o meio líquido utilizados por Sarhy-Bagnon *et al.* (2000), este fato comprova a capacidade do substrato em modificar o metabolismo do fungo e interferir na produção de metabólitos, aumentando ou reduzindo a mesma. Outro exemplo encontrado na natureza é o fato de que dificilmente as espécies do gênero *Trichoderma*, entre outros fungos, apresentam teleomorfo (*Hypocrea* spp.) em substratos que não sejam madeira em decomposição e restos vegetais (HARMAN *et al.*, 2004).

Há também a possibilidade da maior porosidade do bagaço de cana ter interferido positivamente no metabolismo de *T. atroviride* aumentando a produção de metabólitos antifúngicos produzidos. O farelo de trigo com umidade de 11,78% apresentou densidade de 0,238 g/cm³ enquanto que o bagaço teve densidade de 0,091 g/cm³ para a mesma umidade, assim, a densidade do farelo de trigo é 2,62 vezes maior que a do bagaço de cana. Uma das consequências da menor densidade é aumento da superfície de trocas gasosas do fungo, podendo acelerar o desenvolvimento fúngico e a produção de metabólitos antifúngicos, principalmente no curto tempo de 4 dias de cultivo aplicado.

No presente trabalho não foram feitos testes de inibição contra *R. solani* em cultivo de *T. atroviride* em farelo de trigo, entretanto o cultivo em bagaço de cana foi eficiente também no controle deste fungo, inibindo 70,31%. A possível presença de

6PP, T22azafiilona, antraquinonas, harzianopiridona e harzianolida pode ter inibido *R. solani*, já que estes metabólitos apresentaram capacidade de inibir o fungo em outros trabalhos (VINALE *et al.*, 2006). Este resultado também evidencia que o cultivo de *T. atroviride* em bagaço de cana pode ser apresenta produção de metabólitos de grande amplitude na inibição de fitopatógenos.

Apesar do bagaço de cana de açúcar ser uma boa opção e proporcionar aumento de inibição, este substrato apresenta o inconveniente de seu difícil armazenamento, devido sua baixa densidade e alta perecibilidade caso não seja armazenado seco ou em ambiente refrigerado.

Por final, algumas considerações acerca de futuros trabalhos complementares a este podem ser feitas, tais como determinar a concentração mínima inibitória para os fitopatógenos dos extratos obtidos. Seria igualmente interessante pesquisar os compostos presentes nos extratos de *T. atroviride* e estudar sua toxicidade, para que assim possam ser determinadas as possíveis áreas de aplicação do extrato, como no pós-colheita de frutas ou no tratamento de sementes para plantio. Além disso, o hexano apresentou potencial como extrator de compostos antifúngicos podendo ser feito um estudo semelhante ao presente trabalho utilizando este solvente como extrator. Outra possibilidade seria estudar a extração seriada com acetato de etila e hexano, somando os extratos obtidos, ou uma extração única com uma mistura de acetato de etila e hexano.

6. CONCLUSÃO

Assim sendo, pode-se concluir que:

1. Os extratos de acetato de etila, hexano e etanol apresentaram potencial antifúngico contra *D. maydis*.
2. O acetato de etila foi o melhor solvente extrator, utilizando *D. maydis* como microrganismo indicador.
3. Foi comprovada a inibição dos extratos de acetato de etila contra *Diplodia maydis*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium moniliforme* e *Rhizoctonia solani*.
4. A melhor concentração dos traços minerais adicionados ao farelo de trigo, e as melhores temperatura e tempo de cultivo foram: 0,1 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,01 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 de $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,1 de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 5,0 de KCl a 27°C por 4 dias, para farelo de trigo.
5. O melhor teor de umidade e concentrações de glicose e de extrato de levedura utilizando farelo de trigo como substrato foram, respectivamente (g/kg de farelo de trigo seco): 80%, 19,0 e 5,5 e para inibição de *D. maydis*; 70%, 19,0 e 14,5 para inibir *C. gloeosporioides* e 60%, 1,0 e 19,0 para inibição de *F. moniliforme*.
6. A melhora nas condições de cultivo de *T. atroviride* em farelo de trigo foi um sucesso, aumentando a inibição *D. maydis* de 42,96 % no desenho Plackett-Burman de 11 fatores, 64,32%, no desenho Box-Behnken de 3 fatores.
7. O bagaço de cana de açúcar se apresentou como boa alternativa de substrato ao farelo de trigo.
8. As maiores inibições utilizando bagaço de cana de açúcar como substrato foram 61,69% para *C. gloeosporioides* e 70,31% para *R. solani*.

REFERÊNCIAS

AMIN, F.; RAZDAN, V. K.; MOHUDDIN, F. A.; BHAT, K. A.; SHEIKH, P. A. Effect of volatile metabolites of *Trichoderma* species against seven fungal plant pathogens *in-vitro*. **Journal of Phytopathology**, v. 2, n. 10, p. 34-37, 2010.

BERGAMIN, F. A.; KIMATI, H. Doenças do mamoeiro – *Carica papaya* L. In: GALLI, F. (Coord.) **Manual de fitopatologia** – Doenças das plantas cultivadas. 2 v. São Paulo: CERES, 1980. p. 338-346.

BOLYGÓ, E. ATREYA, N. C. Solid-phase extraction for multi-residue analysis of some triazole and pyrimidine pesticides in water. **Frenesius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 339, n. 6, p.432-430.

BONNARME, P.; DIJAN, A.; LATRASSE, A.; FÉRON, G.; GINIÈS, C.; DURAND, A.; LE QUÉRÉ, J. L. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma* sp. from vegetable oils. **Journal of Biotechnology**, v. 56, n. 2, p. 143-150, aug. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Brasil projeções do agronegócio 2011/2012 a 2021/2022**: Resumo executivo. Brasília, abr. 2012. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 05 jun. 2013.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). **Agrotóxicos**. 19---. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br>>. Acesso em: 06 jun. 2013.

CASOLIO, C.; GUTIERREZ, A.; JIMENES, B.; VAN MONTAGU, M.; HERRERA-ESTRELLA, A. Characterization of *ech-42*, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. **Mycological Research News**, v. 105, n. 7, p. 769-772, 2001.

CLAYDON, N.; ALLAN, M.; HANSON, J. R.; AVENT, A. G. Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. **Transactions of the British Mycological Society**, n. 88, v. 4, p.503-513, 1987.

COONEY, M. J.; LAUREN, D. R.; JENSEN, D. J.; PERRY-MEYERS, L. J. Effect of harvest time, temperature, light, and spore inoculum concentrations on 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one production by *Trichoderma* spp. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 2808-2806, 1997.

COONEY, M. J.; LAUREN, D. R.; MENNA, M. E. Impact of competitive fungi on trichothecene production by *Fusarium graminearum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 522-526, 2000.

DODD, S. L.; HILL, R. A.; STEWART, A. Control of *Athelia rolfsii* disease on lentil seedlings using 6-pentyl- α -pyrone. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, n. 7, p. 1033-1034, jul. 2000.

DHINGRA, O. O. Prejuízos causados por microrganismos durante o armazenamento de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 7, n. 1, p. 139-146, 1985.

EL-HASAN, A.; WALKER, F.; BUCHENAUER, H. *Trichoderma harzianum* and its metabolite 6-pentyl-alpha-pyrone suppress fusaric acid produced by *Fusarium moliniforme*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 156, n. 2 p. 79-87, 2008.

ELAD, Y.; CHET, I.; KATAN, J. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v. 70, n. 2, p. 119-121, 1980.

EMBRAPA. EMBRAPA Milho e Sorgo. **Sistemas de produção**, 1. 8 ed. out. 2012. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em 06 jun. 2013.

EMBRAPA. Agência EMBRAPA de Informação e Tecnologia (AGEITEC). **Agrotóxicos no Brasil**. 200-. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 06 jun. 2013.

FERREIRA, C.; PRESSINOTT, F. **Fungo causa perda de US\$ 550 milhões na América Central**. 2013. Disponível em: <<http://www.canaldoprodutor.com.br>>. Acesso em: 10 maio. 2013.

FRISVAD, J. C.; THRANE, U. Mycotoxin production by common filamentous fungi. In: SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C. **Introduction to food- and airborne fungi**. 7. ed. Wageningen: CBS, 2004. p. 321-330.

GHISALBERTI, E. L.; SIVASITHAMPARAM, K. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 23, n. 11, p. 1011-1020, 1991.

GODOY, C. V.; CANTERI, M. G. Efeito protetor, curativo e erradicante de fungicidas no controle da ferrugem da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi*, em casa de vegetação. **Fitopatologia brasileira**, v. 29, n. 1, jan.-fev. 2004.

GORENSTEIN, O. Resultados gerais do monitoramento de resíduos de agrotóxicos executado pela CEAGESP durante 1994 a 2005. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 36, n. 12, dez. 2006.

GÖRGEN, C. A.; SILVEIRA NETO, A. N.; CARNEIRO, L. C.; RAGAGNIN, V.; LOBO JUNIOR, M. Controle de mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 12, p. 1583-1590, dez. 2009.

GOULART, A. C. P. Tratamento de sementes do algodoeiro com fungicidas. In: **Algodão: tecnologia de produção**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Campina Grande: Embrapa Algodão, 2001. p. 140-158.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v. 84, n. 4, p. 377-393, apr. 2000.

HARMAN, G. E.; HOWEL, C. R.; VITERBO, A.; CHET.; LORITO, M. Trichoderma species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 43-56, 2004.

HOMERO, V. **Extratos vegetais para combater fungos e pragas agrícolas**. FAPERJ, Rio de Janeiro. 2012. Disponível em: <<http://www.faperj.br>>. Acesso em 05 jun. 2013.

HOWELL, C. R. Relevance of mycoparasitism in the biological control of *Rhizoctonia solani* by *Gliocladium virens*. **Phytopathology**, v. 77, n. 7, p. 992-994, 1987.

HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biological Control**, v. 51, n. 3, p. 409-416, dec. 2009.

IARC – International Agency for Research on Cancer. Fumonisin B₁. In: _____. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans and their supplements: some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. **International Agency for Research on Cancer, World health Organization**. Lyon: IACPress, v. 2, p. 301-366, 2002.

IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola**: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. 2013. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 05 jun. 2013.

KRUGER, T. L.; BACCHI, L. M. A. Fungos. In: FILHO, A. B.; KIMTAI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia**. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 46-95.

KUÇUK, Ç.; KIVANÇ, M. In vitro antifungal activity of strains of *Trichoderma harzianum*. **Turkish Journal of Biology**, v. 28, n. 2-4, may, p. 111-115, 2004.

KUMARI, B.; MADAN, V. K.; KATHPAL, T. S. Pesticide residues in rain water from Hisar, India. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 133, p. 467-471, 2007.

LEESON, S. et al. **Poultry metabolic disorders and mycotoxins**. Guelph University Books, p. 352, 1995.

MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, F. R.; DA SILVA, A. C. F.; ANTONIOLLI, Z. I. Trichoderma no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.

MADIGAN, M. T.; MRTINKO, J. M.; STAHL, D. A.; CLARCK, D. P. Nutrition and Culture of microorganisms. In: _____. **Brock Biology of Microorganisms**. 13. ed. San Francisco: Benjamin Cummings. 2012. p. 85-91.

MATROUDI, S.; ZAMANI, M. R.; MOTALLEBI, M. Antagonistic effects of the three species of *Trichoderma* sp. on *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of canola stem rot. **Egyptian Journal of Biology**, v. 11, p. 47-44, 2009.

- MCGLACKEN, G. P.; FAIRLAMB, J. S. 2-Pyrone natural products and mimetics: isolation, characterization and biological activity. **Natural Product Reports**, v. 22, n. 3, p. 369-385, 2005.
- MCNEELY, J. A.; SCHERR, S. J. **Ecoagricultura: alimentação do mundo e biodiversidade**. São Paulo: SENAC São Paulo, 2009. 459 p.
- MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. *In*: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**, v. 1. Jaguariúna: Embrapa, 1998. p. 17-60.
- MENDES, L. G.; DANTAS, J. L.; MORALES, C. F. G. (Ed.) **Mamão no Brasil**. Cruz das Almas: EUFBA/EMBRAPA-CNPMP, 1996.
- MUNKVOLD, G. P., DESJARDINS, A.E. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence?, **Plant Disease**, v. 81, n. 6, p.556-565, jun.1997.
- NERY-SILVA, F. A.; MACHADO, J. C.; LIMA, L. C. O.; DE RESENDE, M. L. V. Controle químico da podridão peduncular de mamão causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 3, p. 519-524, maio/jun. 2001.
- ODRIOZOLA, E.; ODEÓN, A.; CANTON, G.; CLEMENTE, G.; ESCANDE, A. *Diplodia maydis*: a cause of death of cattle in Argentina. **New Zeland Veterinay Journal**, v. 53, n. 2, p. 160-161, 2005.
- OLIVEIRA, A. A. R.; BARBOSA, C. J.; SANTOS FILHO, H. P.; MEISSNER FILHO, P. E. **Mamão Produção**: Aspectos técnicos. EMBRAPA Mandioca e Fruticultura. Cruz das Almas. EMBRAPA Comunicação para transferência de tecnologia. Brasília. 2000.
- OLIVEIRA, M. Z. A.; PRATES JÚNIOR, P. Sementes sadias: um meio de reduzir perdas agrícolas. **Bahia Agrícola**, v. 9, n. 1, p. 28-31, nov. 2012
- OLIVON, B. **PIB sobe 0,6 % np 1º trimestre de 2013 ante anterior**. 2013. Disponível em: <<http://exame.abril.com.br>>. Acesso em: 05 jun. 2013.
- PALMA, Danielly Cristina de Andrade. **Agrotóxicos em leite humano de mães residentes em Lucas do Rio Verde**. 2011. 103 f. Dissertação (Mestre em Saúde Coletiva) – Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2011.
- PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento (SEAB). **Fruticultura – Análise da conjuntura agropecuária**. Dez. 2012. Disponível em: <<http://www.agricultura.pr.gov.br>>. Acesso em 05 jun. 2013.
- POOLE, P. R.; WHITMORE, K. J. Effects of topical postharvest applications of 6-pentyl-2-pyrone on properties of stored kiwifruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 2, n. 3, p. 229-237, dec. 1997.

- RAMOS, A. S.; FIAUX, S. B.; LEITE, S. G. F. Production of 6-pentyl- α -pirone by *Trichoderma harzianum* in solid-state fermentarion. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 712-717, dec. 2008.
- RAMOS, A. S.; MARTINS, P. S. O.; FIAUS, S. B.; LEITE, S. G. F. Microextração em fase sólida de 6-pentil- α -pirona produzida por fermentação em estado sólido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 523-528, jul.-set. 2009.
- REINO, J. L.; GUERRERO, R. F.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R.; COLLADO, I. G. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 1, p. 89-123, 2008.
- RITO-PALOMARES, M.; NEGRETE, A.; GALINDO, E.; SERRANO-CARREÓN, L. Aroma compounds recovery from mycelial cultures in aqueous two-phase processes. **Journal of Chromatography B**, v. 743, n. 1-2, p. 403-408, jun. 2000.
- RITO-PALOMARES, M.; NEGRETE, A.; MIRANDA, L.; FLORES, C.; GALINDO, E.; SERRANO-CARREÓN, L. The potencial application of aqueous two-phase systems for in situ recovery of 6-pentyl- α -pyrone produced by *Trichoderma harzianum*. **Enzime and Microbial Technology**, v. 28, n. 7-8, p. 625-631 mai. 2001.
- ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de doenças de plantas – procedimentos**. Viçosa: Editora UFV, 2007. 172 p.
- SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C. **Introduction to food- and airborne fungi**. 7. ed. Wageningen: CBS, 2004. p. 260-263.
- SAMSON, R.A.; HOESKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C. **Introduction to food-borne fungi**. 4 ed. The Netherlands, Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995.
- SÃO PAULO. Secretaria de Saneamento e Recursos Hídricos (SSRH). Sistema de Informações para o Gerenciamento de Recursos Hídricos do Estado de São Paulo (SigRH). **Uso de agrotóxicos na agricultura**. 200-. Disponível em: <<http://www.sigrh.sp.gov.br>>. Acesso em: 06 jun. 2013.
- SARHY-BAGNON, V.; LOZANO, P.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; ROUSSOS, S. Production of 6-pentyl- α -pirone by *Trichoderma harzianum* in liquid and solid state cultures. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 1, p. 103-109, sep. 2000.
- SCHILLING, V. **Irlanda, a grande fome da batata**. 2002. Disponível em: <<http://educaterra.terra.com.br>>. Acesso em: 05 jun. 2013.
- SOJA INOX – FUNDAÇÃO MT. 27 abr. 2011. Disponível em: <www.sementestomazetti.com.br>. Acesso em: 04 ago. 2011.
- TANAKA, M. A. S.; MAEDA, J. A.; PLAZAS, I. H. A. Z. Microflora fúngica de sementes de milho em ambientes de armazenamento. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 3, p. 501-508, jul./set. 2001.

TEIXEIRA, E. F.; DOS SANTOS, A. P. B.; BASTOS, R. S.; PINTO, A. C. O uso de aparelho de micro-ondas doméstico em aulas de experimentação química orgânica: nitração de salicilaldeídos. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1603-1606, 2010.

UENO, C. T. **Cultivo de *Trichodermaatroviride* para a biossíntese do 6-pentil-a-pirona e sua ação sobre *Mycosphaerellafijiensis* e *Phakopsorapachyrhizi***. 2007. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

VINALE, F.; MARRA, R.; SCALA, F.; GHISALBERTI, E. L.; LORITO, M.; SIVASITHAMPARAM, K. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 143-148, 2006.

VINALE, F.; GHISALBERTI, E. L.; SIVASITHAMPARAM, K.; MARRA, R.; RITIENI, A.; FERRACANE, R.; WOO, S.; LORITO, M. Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 6, jun. 2009.

YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M.; FREDERICK, R. D.; COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLLI, P. F.; HEARTMAN, G. E.; GODOY, C. V.; JUNES JUNIOR, J. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, v. 89, n. 7, p. 675-677, jun. 2005.