



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CLÁUDIO TAKEO UENO

**CULTIVO DE *Trichoderma atroviride* PARA A BIOSÍNTESE  
DO 6-PENTIL  $\alpha$  PIRONA E SUA AÇÃO SOBRE *Mycosphaerella  
fijiensis* E *Phakopsora pachyrhizi***

---

Londrina  
2007

**CLÁUDIO TAKEO UENO**

**CULTIVO DE *Trichoderma atroviride* PARA A BIOSÍNTESE  
DO 6-PENTIL  $\alpha$  PIRONA E SUA AÇÃO SOBRE *Mycosphaerella  
fijiensis* E *Phakopsora pachyrhizi***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação,  
em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual  
de Londrina, como requisito parcial à obtenção do  
título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientador: Dr. Raúl Jorge Hernan Castro Gómez

Londrina  
2007

**CLÁUDIO TAKEO UENO**

**CULTIVO DE *Trichoderma atroviride* PARA A BIOSÍNTESE  
DO 6-PENTIL  $\alpha$  PIRONA E SUA AÇÃO SOBRE *Mycosphaerella  
fijiensis* E *Phakopsora pachyrhizi***

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Raúl Jorge Hernan Castro Gómez  
(orientador)

---

Dra. Cláudia Vieira Godoy

---

Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira

---

Prof. Dr. Pedro Manuel Oliveira Janeiro Neves

---

Prof. Dra. Suely Mayumi Obara Doi

Londrina, 21 de agosto 2007.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Raúl Jorge Hernan Castro Gómez, pela orientação, inovação, dedicação, estímulo à criatividade, apoio e novas idéias.

À Universidade Estadual de Londrina – UEL e todos os professores do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos pela brilhante aprendizagem e troca de experiências.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR (antigo CEFET) pelo apoio e a política de capacitação docente.

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

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento da Universidade Estadual de Londrina – FAUEL, pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca Examinadora: Dra. Cláudia Vieira Godoy, Marco Antonio Nogueira, Pedro Manuel Oliveira Janeiro Neves, Suely Mayumi Obara Doi, pelas sugestões.

Aos amigos de laboratório, Adriana Pereira da Silva, Alessandra Braga Ribeiro, Alexandre Rodrigo Coelho, Alexandre Santa Bárbara, Ana Augusta Odorissi Xavier, Ariane Gaspar, Carmen Maria Oliveira Muller, Caroline Maria Calliari, Daniel, Denis Marchi, Elisabete Hashimoto, Elvis Perboni Martins, Fábio Bublitz, Flávio Itano, Joice Sifuentes Letícia Murate, Luciana Hayashi, Luciana Lobatto Luciane Yoshiara, Luciana Bernd, Luiz Rodrigo Morioka, Marcela Frata, Michelle Roset, Mirian Maretti, Mônica Scapin, Neusa Seibel, Norma, Rafael Dias, Rafaela Ferrari, Ricardo Reche Ribeiro, Roberta Barreiros de Souza, Simone Fujii, Suellen, e muitos outros, cuja companhia sempre foi um estímulo para dedicação e desenvolvimento deste trabalho.

Aos técnicos de laboratório: Patrícia Sambatti, Marly Piologo, Jurandir Pereira Pinto e Nelson Fuzinato; do setor de prestação de serviço: Alessandra, Célia, Maria Alice, Rubens, Berenice, Elza e Sandra Rezende, pelo apoio.

Aos meus amigos da UTFPR, Adriana Droval, Cassiane Kissel, César Cardoso, Cristiane Canan, Edward Kavanagh, Estor Gnoatto, Janete Hruschka, José Airton Azevedo dos Santos, Jorge Kawahara, Marcos Himamura, Margarida Yamaguchi, Paulo Oyama e Sascha Habu pela amizade e apoio do meu trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

Aos meus pais, Takako e Tsugio que nunca deixaram de me apoiar.

Às minhas irmãs, Tioko e Tomoko que sempre me estimularam a seguir em frente e batalhar e a Paulo Hara e Alcides Kikuchi que sempre ouviram minhas idéias.

Aos meus sobrinhos, Mônica, Binho, Lincoln e George que com alegria sempre me estimularam.

À minha companheira Lyssa Setsuko Sakanaka, por todo amor, carinho, dedicação, compreensão e paciência, pela presença constante mesmo durante dificuldades, e que sempre me apoiou para conclusão deste trabalho.

UENO, Cláudio Takeo. **Cultivo de *Trichoderma atroviride* para a biossíntese do 6 pentil  $\alpha$  pirona e sua ação sobre *Mycosphaerella fijiensis* e *Phakopsora pachyrhizi***. 2007. 70f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

## RESUMO

A aplicação de desenhos experimentais em processos de otimização para produção de metabólitos a partir de microrganismos é uma ferramenta útil para redução de custos e aumento de produtividade. A produção do 6 pentil  $\alpha$  pirona (6PP) a partir do fungo *Trichoderma atroviride* é influenciada por vários fatores nutricionais tais como fontes de carbono e nitrogênio. O desenho experimental utilizando melaço de cana como fonte alternativa de carbono e a utilização de um mínimo de nitrogênio sob a forma de extrato de levedura auxiliaram no equilíbrio entre o custo do meio de cultura e a produção do 6PP. A restrição nutricional aumenta a proporção do 6PP sintetizado por massa de micélio, entretanto, reduz a produção de biomassa. Dessa forma, meios extremamente pobres não são recomendáveis, bem como meios extremamente ricos, onde não há estresse nutricional. O 6PP produzido pelo *T. atroviride* possui atividade antimicrobiana contra fungos. Tais propriedades são interessantes para combate de fitopatógenos de várias culturas, como, por ex., *Mycosphaerella fijiensis*, agente etiológico da Sigatoka Negra da bananeira, e *Phakopsora pachyrhizi*, agente causal da ferrugem asiática da soja. Ambos os fungos são controlados com fungicidas químicos e plantio de variedades mais resistentes. A influência do 6PP sobre o desenvolvimento desses fitopatógenos “in vitro” forneceu informações importantes para futuras pesquisas. O crescimento micelial dos esporos de *M. fijiensis* cultivados na presença do 6PP foi inibido em concentrações superiores a 40 $\mu$ g/mL e a germinação dos esporos de *P. pachyrhizi* foram inibidos em concentrações acima de 10 $\mu$ g/mL do 6PP. Tais resultados demonstram o potencial desta molécula como agente antimicrobiano. Estudos complementares são necessários para elucidar mecanismos de ação do 6PP, bem como a estabilidade em condições de armazenamento e resistência da molécula de 6PP às condições ambientais.

**Palavras-chave:** Microbiologia industrial. Biossíntese. *Trichoderma*.

UENO, Cláudio Takeo. **Culture of *Trichoderma atroviride* for biosynthesis of the 6 fijiensis pentil  $\alpha$  pirona and its action on *Mycosphaerella* and *Phakopsora pachyrhizi*.** 2007. 70p. Thesis (Doctor in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

### ABSTRACT

The use of statistical experimental design for optimizing production of metabolites by microorganisms is useful for costs reducing and increase metabolites productivity. The 6 pentyl  $\alpha$  pirona (6PP) production by *Trichoderma atroviride* is influenced by many nutritional factors such as carbon and nitrogen sources. An experimental design using molasses as alternative carbon source and yeast extract as limiting nitrogen source was assessed to balance the culture media cost and 6PP production. The nutritional stress increased the proportion of 6PP but, on the other hand, reduced the biomass production. Thus, culture media with extremely limiting nutritional conditions are not recommended, as well as rich nutritional culture media were no nutritional stress. The 6PP produced by *T. atroviride* have shown antimicrobial activity against fungi and thus is interesting agent to control many phytopathogens of different crops, e. g., *Mycosphaerella fijiensis*, the etiological agent of Black Sigatoka bananas and *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asiatic Soybean Rust. The influence of 6PP over the development of spores of such phytopathogens gave very important information for further researches. *M. fijiensis* spores were inhibited with 6PP at concentrations higher than 40  $\mu\text{g/mL}$ . On the other hand, *P. pachyrhizi* spores were inhibited by concentrations higher than 10  $\mu\text{g/mL}$  of 6PP. These results confirm the antimicrobial potential of 6PP. Complementary studies is necessary to identify the mechanism of action of the 6PP against fungi, stability under storage and resistance to unfavorable conditions.

**Keywords:** Industrial microbiology. Biosynthesis. Trichoderma.

## LISTA DE FIGURAS

### Figuras do item 4.1

<b>Figura 1</b> – Estrutura da 6 pentil $\alpha$ pirona .....	23
<b>Figura 2</b> – Superfície de resposta para produção do 6PP (mg/L de meio) variando os níveis de melaço e extrato de levedura e pH fixo (pH 4,5 .....	33

### Figuras do item 4.2

<b>Figura 1</b> – Controle – 24 h $10^4$ esporos <i>M. fijiensis</i> /mL .....	40
<b>Figura 2</b> – Controle – 48 h $10^4$ esporos <i>M. fijiensis</i> /mL .....	40
<b>Figura 3</b> – Controle – 72 h $10^4$ esporos <i>M. fijiensis</i> /mL .....	41
<b>Figura 4</b> – 48 h $10^4$ esporos <i>M. fijiensis</i> /mL + 20 $\mu$ g 6PP/mL .....	41
<b>Figura 5</b> – 72 h $10^4$ esporos <i>M. fijiensis</i> /mL + 20 $\mu$ g 6PP/mL .....	41
<b>Figura 6</b> – 48 h $10^4$ esporos <i>M. fijiensis</i> /mL + 30 $\mu$ g 6PP/mL .....	41
<b>Figura 7</b> – 72 h $10^4$ esporos <i>M. fijiensis</i> /mL + 30 $\mu$ g 6PP/mL .....	42
<b>Figura 8</b> – 48 h $10^4$ esporos <i>M. fijiensis</i> /mL + 40 $\mu$ g 6PP/mL .....	42
<b>Figura 9</b> – 72 h $10^4$ esporos <i>M. fijiensis</i> /mL + 40 $\mu$ g 6PP/mL .....	42
<b>Figura 10</b> – 48 h $10^4$ esporos <i>M. fijiensis</i> /mL + 50 $\mu$ g 6PP/mL .....	42
<b>Figura 11</b> – 72 h $10^4$ esporos <i>M. fijiensis</i> /mL + 50 $\mu$ g 6PP/mL .....	43
<b>Figura 12</b> – Controle – 96 h $10^4$ esporos <i>M. fijiensis</i> /mL caldo batata .....	43
<b>Figura 13</b> – 96 h $10^4$ esporos <i>M. fijiensis</i> /mL caldo batata 10 $\mu$ g/mL .....	43
<b>Figura 14</b> – 96 h $10^4$ esporos <i>M. fijiensis</i> /mL caldo batata 20 $\mu$ g/mL .....	43
<b>Figura 15</b> – 96 h $10^4$ esporos <i>M. fijiensis</i> /mL caldo batata 30 $\mu$ g/mL .....	44
<b>Figura 16</b> – 96 h $10^4$ esporos <i>M. fijiensis</i> /mL caldo batata 40 $\mu$ g/mL .....	44
<b>Figura 17</b> – 96 h $10^4$ esporos <i>M. fijiensis</i> /mL caldo batata 50 $\mu$ g/mL .....	44
<b>Figura 18</b> – 96 h $10^4$ esporos <i>M. fijiensis</i> /mL caldo batata 60 $\mu$ g/mL .....	44
<b>Figura 19</b> – Controle negativo de <i>M. fijiensis</i> (sem 6PP) incubada a 25°C .....	45
<b>Figura 20</b> – <i>M. fijiensis</i> ( $10^4$ esporos/mL) submetido a 50 $\mu$ g do 6PP/mL com diferentes tempos de estocagem a -20°C, tempo de incubação: 48hs .....	46
<b>Figura 21</b> – <i>M. fijiensis</i> submetido a 6PP com diferentes tempos de estocagem a -20°C, tempo de incubação: 72hs .....	46

<b>Figura 22</b> – <i>M. fijiensis</i> submetido a 6PP com diferentes tempos de estocagem a -20°C, tempo de incubação:96hs .....	47
<b>Figura 23</b> – <i>M. fijiensis</i> submetido a 6PP (100µg) estocada a -20 °C, tempo de incubação: 48, 72, 96 e 120hs .....	48

### **Figuras do item 4.3**

<b>Figura 1</b> – <i>P. pachyrrhizi</i> Controle negativo (0 h) .....	56
<b>Figura 2</b> – <i>P. pachyrrhizi</i> + 5 µg 6PP/mL (0 h) .....	56
<b>Figura 3</b> – <i>P. pachyrrhizi</i> Controle negativo (2 h) .....	57
<b>Figura 4</b> – <i>P. pachyrrhizi</i> + 5 µg 6PP/mL (2 h) .....	57
<b>Figura 5</b> – <i>P. pachyrrhizi</i> Controle negativo (4 h) .....	57
<b>Figura 6</b> – <i>P. pachyrrhizi</i> + 5 µg 6PP/mL (4 h) .....	57
<b>Figura 7</b> – <i>P. pachyrrhizi</i> Controle negativo (6 h) .....	57
<b>Figura 8</b> – <i>P. pachyrrhizi</i> + 5 µg 6PP/mL (6 h) .....	57
<b>Figura 9</b> – <i>P. pachyrrhizi</i> Controle negativo (18 h) .....	58
<b>Figura 10</b> – <i>P. pachyrrhizi</i> + 5 µg 6PP/mL (18 h) .....	58
<b>Figura 11</b> – <i>P. pachyrrhizi</i> Controle negativo (24 h) .....	58
<b>Figura 12</b> – <i>P. pachyrrhizi</i> + 5 µg 6PP/mL (24 h) .....	58
<b>Figura 13</b> – <i>P. pachyrrhizi</i> + 10 µg 6PP/mL (2 h) .....	58
<b>Figura 14</b> – <i>P. pachyrrhizi</i> + 30 µg 6PP/mL (2 h) .....	58
<b>Figura 15</b> – <i>P. pachyrrhizi</i> + 10 µg 6PP/mL (6 h) .....	58
<b>Figura 16</b> – <i>P. pachyrrhizi</i> + 30 µg 6PP/mL (6 h) .....	58
<b>Figura 17</b> – <i>P. pachyrrhizi</i> + 10 µg 6PP/mL (24 h) .....	59
<b>Figura 18</b> – <i>P. pachyrrhizi</i> + 30 µg 6PP/mL (24 h) .....	59
<b>Figura 19</b> – <i>P. pachyrrhizi</i> + 60 µg 6PP/mL (2 h) .....	59
<b>Figura 20</b> – <i>P. pachyrrhizi</i> + 60 µg 6PP/mL (6 h) .....	59
<b>Figura 21</b> – <i>P. pachyrrhizi</i> + 60 µg 6PP/mL (24 h) .....	59

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Características químicas do melão.....	27
<b>Tabela 2</b> – Constituintes e níveis utilizados no desenho experimental ( $2^{9-5}$ ) .....	27
<b>Tabela 3</b> – Desenho experimental $2^{9-5}$ , 16 experimentos codificados.....	28
<b>Tabela 4</b> – Constituintes e níveis do desenho experimental $3^3$ .....	29
<b>Tabela 5</b> – Desenho Experimental $3^3$ incompleto – Box – Benhken.....	29
<b>Tabela 6</b> – Condições experimentais e resposta obtida a partir de desenho experimental $2^{9-5}$ .....	30
<b>Tabela 7</b> – Condições experimentais e resultados obtidos a partir Desenho Experimental $3^3$ – Box – Benhken .....	31
<b>Tabela 8</b> – Análise de variância dos resultados para a resposta 6PP (mg/L) .....	32
<b>Tabela 9</b> – Valores do 6PP mg/L preditivos aplicando a equação do modelo .....	33

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
3.1 OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS FERMENTATIVOS UTILIZANDO DESENHOS EXPERIMENTAIS .....	15
3.2 O CONTROLE BIOLÓGICO E SEUS MECANISMOS .....	16
3.2.1 <i>TRICHODERMA HARZIANUM</i> E 6 PENTIL $\alpha$ PIRONA (6PP) .....	18
<b>4 MATERIAL, MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	21
4.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DO <i>TRICHODERMA ATROVIRIDE</i> PARA A PRODUÇÃO DO 6 PENTIL A PIRONA (6PP) .....	22
4.2 INFLUÊNCIA DO 6 PENTIL A PIRONA (6PP) PRODUZIDA POR <i>TRICHODERMA</i> <i>ATROVIRIDE</i> SOBRE <i>MYCOSPHAERELLA FIJENSIS</i> , AGENTE CAUSAL DA SIGATOKA NEGRA DA BANANEIRA ( <i>MUSA SATIVA</i> ) .....	35
4.3 INFLUÊNCIA DO 6 PENTIL A PIRONA (6PP) PRODUZIDO POR <i>TRICHODERMA</i> <i>ATROVIRIDE</i> NA GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE <i>PHAKOPSORA PACHYRHIZI</i> , AGENTE CAUSAL DA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA ( <i>GLYCINE MAX</i> MERRIL) .....	51
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	61
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	62

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos poucos países do mundo que possui fronteiras agrícolas em condições de expansão sem ocasionar grandes impactos ao meio ambiente, desde que haja planejamento e manejo dos ecossistemas. Atualmente, o Brasil é o maior exportador de café, açúcar, etanol e suco de laranja; o segundo maior produtor de soja em grãos, mas é o primeiro exportador do complexo da soja (grãos, farelo, óleo). Além disso, é o terceiro pólo mundial de fruticultura, com potencial de expandir a produção em todos os setores da agroindústria. Nesse cenário, investimentos em biotecnologia na área de controle de pragas, doenças, aumento da produção agrícola e também na própria segurança do setor agrícola são essenciais para um crescimento ordenado (BRASIL, 2007).

A extensa fronteira brasileira apresenta barreiras naturais como a floresta amazônica, que dificultam a entrada de pragas e doenças no território brasileiro. Entretanto, o aumento do comércio internacional e os meios de transportes atuais facilitam a entrada de fungos fitopatogênicos de outros países e continentes. Alguns fitopatógenos invasores relativamente recentes no Brasil são *Mycosphaerella fijiensis* M. morelet e *Phakopsora pachyrhizi* Syd & P. Syd, agentes causadores da Sigatoka Negra da bananeira (Black Sigatoka) e da Ferrugem Asiática da Soja (Asian Soybean Rust), respectivamente.

A Sigatoka Negra, doença que ataca folhas de bananeiras era restrita a região costeira do Oceano Pacífico há poucos anos, tendo como barreira natural, a cordilheira dos Andes e a floresta amazônica. Porém, esse fungo conseguiu transpor essas barreiras, sendo detectado inicialmente na região norte do Brasil (FIORAVANÇO; PAIVA, 2005) e atualmente já está disseminado em todo território brasileiro. A severidade dessa doença pode variar de acordo com o clima e é muito agressiva em condições favoráveis (SMITH et al., 1997).

O Brasil atualmente produz 7 milhões de toneladas de banana (BRASIL, 2007a) e, portanto, essa doença pode ocasionar impactos econômicos negativos bem como provocar riscos pela imposição de barreiras sanitárias para exportação desse produto.

A Sigatoka Negra é controlada com pulverizações periódicas de fungicidas em plantações de banana (WASHINGTON et al., 1998) e com variedades resistentes à doença (OKOLE; SCHULZ, 1997). A aplicação constante de fungicidas para o controle desta doença facilita a seleção de populações resistentes do agente causador (CHIN et al., 2001; ROMERO;

SUTTON 1997) sendo necessários cuidados especiais relacionadas à aplicação indiscriminada desses produtos químicos.

A cultura da soja, principal grão exportado pelo Brasil, tem como uma das principais doenças a ferrugem asiática da soja, cujo agente etiológico é o fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd & P. Syd. Projeções realizadas pelos Estados Unidos, demonstram perdas de 11% ou mais, além dos aumentos de custos de produção (KUCHLER et al., 1984). A severidade pode variar de acordo com as condições climáticas e inóculo inicial (HARTMAN et al., 1991). Dessa forma, para evitar altas perdas o controle químico no momento certo é necessário (SOARES et al., 2004; LEVY 2005).

A ferrugem asiática da soja é uma doença agressiva, pois o fungo *P. pachyrhizi* se desenvolve em ampla faixa de temperatura (KOCHMAN, 1979) e pode sobreviver em diversas plantas hospedeiras (YAMAOKA et al., 2002; YEH et al., 1981). Atualmente está amplamente disseminado na América Latina, ocasionando altos custos para seu controle que no Brasil atingiram US\$ 2 bilhões, entre os anos 2001 e 2003 (YORINORI et al., 2005).

Além dos riscos à saúde provocados pelo uso indiscriminado de agrotóxicos, o aumento da área de cultivo e o plantio extensivo da mesma espécie de vegetal facilitam a seleção de populações resistentes e reduzem os antagonistas naturais. Isso demanda o desenvolvimento de novos produtos, gerando altos custos tanto para a agroindústria como para o agricultor. Estes fatores estimulam a procura por antimicrobianos naturais destacando-se os produzidos por microrganismos e plantas que atuam somente sobre pragas específicas e não acarretam a eliminação de outros microrganismos/insetos/plantas benéficos (LINDOW; WILSON, 1999; TRIPATHI; DUBEY, 2004; FARIA et al., 2006). Neste sentido é importante salientar que a pesquisa do espectro de ação sobre fitopatógenos é um item imprescindível para o desenvolvimento de antimicrobianos naturais para futura aplicabilidade comercial.

Por sua vez, a agricultura orgânica e a consciência de produzir sem agredir o meio ambiente favorecem a demanda por produtos livres de agrotóxicos, o que induz a aplicação de antimicrobianos naturais. Trata-se assim, de uma área de grande importância que recentemente está sendo contemplada pela política governamental através do plano plurianual 2004-2007 (BRASIL, 2007b).

Dentre os microrganismos produtores de antimicrobianos destacam-se algumas espécies de *Trichoderma* que apresenta a capacidade de produzir o metabólito secundário 6 pentil  $\alpha$  pirona (6PP) com aroma de côco (COLLINS; HALIM, 1972; KIKUCHI

et al., 1974), com propriedades antimicrobianas (CUTLER et al., 1986). Estes fungos também atuam como inibidores diretos através de parasitismo por meio de seu micélio, como é o caso de algumas cepas de *Trichoderma harzianum* (KOLOMBET et al., 2000).

Os estudos referentes aos efeitos das variações de cultivo na produção do 6PP pelo fungo *Trichoderma* spp têm sido realizados utilizando delineamentos lineares, não permitindo verificar os efeitos das interações das diferentes variáveis parâmetros que eventualmente possam contribuir para otimizar sua produção. Neste contexto, foi proposto definir as melhores condições de cultivo do fungo *Trichoderma atroviride* (anteriormente denominado *Trichoderma harzianum* IMI 206040, CARSOLIO et al, 2001) que possui bom potencial para produzir 6PP, utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta para uma produção máxima do 6PP e avaliar o seu efeito sobre a germinação de esporos dos fungos fitopatógenos *Mycosphaerella fijiensis* e *Phakopsora pachyrhizi*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar as melhores condições de cultivo do fungo da espécie *Trichoderma atroviride* (*Trichoderma harzianum* IMI 206040, CARSOLIO et. al., 2001) para a produção do 6PP e seu efeito sobre *Mycosphaerella fijiensis* e *Phakopsora pachyrhizi*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir a melhor fonte de carbono e nitrogênio para a produção do 6PP;
- Definir as melhores condições de cultivo (agitação, temperatura, pH) e nutricional (fonte de carbono e nitrogênio) para obter a máxima produção do 6PP;
- Estudar o processo de extração do 6PP do meio de cultura (“Down-stream”);
- Verificar o efeito antagônico “in vitro” do 6PP contra *Mycosphaerella fijiensis* e *Phakopsora pachyrhizi*;
- Determinar a concentração mínima inibitória (CMI) do 6PP para *Mycosphaerella fijiensis* e *Phakopsora pachyrhizi*;
- Estudar a estabilidade do 6PP armazenada em temperatura ambiente (25 °C-30 °C), em geladeira (8°C-10°C) e em freezer (-15°C a -20°C).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS FERMENTATIVOS UTILIZANDO DESENHOS EXPERIMENTAIS

A produção de compostos a partir de microrganismos via biorreatores, requer, além de planejamento, a análise de muitos fatores entre os quais se destacam: o estudo de mercado, a definição dos custos diretos e indiretos de produção, a abundância, a facilidade de transporte e a garantia de fornecimento das matérias primas a utilizar (NAVARRO et al., 2000). Assim, a otimização das condições de fermentação para o rendimento máximo de um produto é fundamental para atingir a viabilidade econômica do processo (STROBEL; SULLIVAN, 1999).

Fontes alternativas de baixo custo e abundantes são amplamente pesquisadas, pois muitas vezes são economicamente viáveis, bastando para isso alguns ajustes no processo de fermentação, substituindo por ex. fontes de carbono mais nobres como é o caso da glicose, sacarose e frutose por melaço de cana proveniente da indústria canavieira (CAZETTA; CELLIGOI, 2006).

A produção de biomoléculas por fermentação utilizando um determinado microrganismo pode ser influenciada por vários fatores como a fonte de carbono, fonte de nitrogênio e de sais minerais, a presença de aminoácidos, a aeração, a agitação, o pH e a temperatura. Os estudos dos efeitos individuais e das interações destes fatores tornam-se extremamente dispendiosos e praticamente inviáveis (DAHOD, 1999).

Um programa de otimização de processos fermentativos para produção de biomoléculas pode ser iniciado medindo-se o produto final como resposta a um aumento ou redução intencional de uma variável por ex. o aumento de fonte de nitrogênio, da fonte de carbono, da temperatura, da agitação etc. e mantendo os outros constantes. Este tipo de delineamento impossibilita observar os efeitos interativos entre as variáveis (CHEN, 1994).

Os desenhos experimentais obtidos aplicando a Metodologia de Superfície de Resposta podem otimizar e racionalizar processos produtivos. Estes delineamentos facilitam o desenvolvimento de processos fermentativos em que é possível analisar simultaneamente os efeitos de várias variáveis que podem influenciar na resposta (KALIL et al., 2000). A Metodologia de Superfície Resposta tem sido utilizada para otimizar a produção

de etanol (BOWMAN; GEIGER, 1984), de antibióticos (SAVAL et al., 1993), de enzimas (CRUZ et al., 1993; SETH; CHAND 2000), do xilitol a partir de xilose (HORITSU et al., 1992), do ácido láctico (HUJANEN; LINKO, 1994) e do crescimento microbiano (SANCHEZ et al., 1996).

### **3.2 O CONTROLE BIOLÓGICO E SEUS MECANISMOS**

O controle químico de fitopatógenos afeta diretamente o meio ambiente devido aos resíduos que são deixados na natureza, bem como a saúde humana em função do acúmulo no organismo. Trata-se de uma área dinâmica, sempre com lançamento de novos produtos, em substituição de outros, ora por perda da eficácia, devido ao surgimento de população resistentes, ou por questões ambientais, custos etc. Preocupados com tal situação, os países mais ricos investem em desenvolvimento controles alternativos como o controle biológico de pragas e doenças apesar de serem os maiores produtores e consumidores de agroquímicos do mundo (KIMATI, 1995).

O controle biológico de doenças por definição consiste na redução da soma de um inóculo ou dos determinantes da doença provocada por um patógeno, realizado por ou através de um ou mais organismos que não o homem (COOK; BAKER, 1983). A interação entre microrganismo patogênico e o antagonista é fundamental para o sucesso desse processo. Os mecanismos de ação dos antagonistas podem ser divididos em:

- Antibiose, que ocorre quando um agente antagonista produz um composto tóxico inibitório contra o fitopatógeno;
- Competição, quando um agente antagonista compete por nutrientes e/ou espaço físico no substrato em que se desenvolve, retirando nutrientes e expulsão/eliminação do fitopatógeno do espaço físico;
- Parasitismo ou predação, que ocorre quando um microrganismo ataca estruturas de outro, aproveitando os seus nutrientes para desenvolvimento próprio. Alguns fungos com estas características são descritos como micoparasitas;
- Hipovirulência, mecanismo que pode ser manipulado pela inoculação de cepas hipovirulentas de determinado fitopatógeno juntamente com uma outra altamente

virulenta de forma que a característica hipovirulenta pode ser transmitida para as gerações posteriores;

- Indução de defesa do hospedeiro, que pode ser feita pela inoculação de cepas avirulentas de fitopatógenos em plantas, originando uma resistência local ou sistêmica à doença (LUCAS, 2002).

Os antagonistas por sua vez, podem ser capazes de atuar através de mais de um desses mecanismos citados (BETTIOL; GHINI, 1995).

Os produtos pós colheita também são alvo do controle biológico. Vários patógenos são provenientes do campo (MERTELY, 2000) e estes, em função das condições de armazenamento (% umidade relativa, temperatura, embalagens etc.), agem causando danos aos produtos. Além disso, a manipulação no armazenamento e durante o transporte ocasionam lesões que facilitam a ação dos patógenos como o *Botrytis cinerea* em frutas (MICHAILIDES; ELMER, 2000).

O controle de pragas e doenças tem um papel importante sobre o desequilíbrio entre crescimento populacional humano e a quantidade de alimento disponível, pois é uma das principais ferramentas no combate às perdas desde o campo até o consumo. Em casos específicos da pós-colheita, os principais fatores a considerar são: fisiologia do vegetal e suas fitopatologias. Ambos podem ser controlados por armazenamento adequado, tratamentos térmicos, controle químico e biológico (CHITARRA, 1990).

A atividade e a diversidade da microbiota do ambiente são fundamentais para o sucesso dos antagonistas. A eliminação total da microbiota, com inoculação somente do antagonista, provou não ser eficaz (FURTADO, 1969; WILLIAMS; AYANABA, 1975). Assim, aplicações localizadas, ou a manutenção do equilíbrio da microbiota, favorece a prevalência do antagonista, sendo este o procedimento mais adequado.

O emprego de biomassa de microrganismos antagonísticos é uma alternativa ao controle químico e térmico contra fitopatógenos, mas pode ser usado também associado. Micélios do fungo do gênero *Trichoderma* devidamente estocados demonstraram eficácia no combate a *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii* (LABUDOVA; GOGOROVA, 1988) *Fusarium oxysporum* f.sp *radicis-lycopersici* que ataca tomateiros (DATNOFF et al., 1995). Alguns fungos do gênero *Trichoderma* spp são eficazes contra fitopatógenos, mas, são pouco eficientes quando aplicados em produtos armazenados a baixas temperaturas (PRATELLA, 1993).

A inoculação de antagonistas no solo visando reduzir o inóculo de patógenos tem efeito dependente das condições (PAPAVIZAS, 1985). *T. harzianum*

inoculados no solo são eficazes para reduzir a presença do patógeno *Armillaria*, responsável pela podridão de raízes em diversas culturas, porém não o elimina (OTIENO et al., 2003). A aplicação de micélios peletizados de *T. viride* em troncos de olmos (árvore da região da Suécia) reduziu a ação do *Ceratocystis ulmi*, um fitopatógeno desta árvore (RICARD, 1983).

As propriedades antimicrobianas do *T. harzianum* tornam-o uma boa ferramenta para o controle de pragas e doenças em culturas de interesse econômico. A utilização comercial de micélio de *T. harzianum* para combate de fitopatógenos já é utilizada, mas sua eficácia está relacionada às condições climáticas (HJELJORD et al., 2000). Por outro lado, algumas enzimas produzidas por *T. harzianum*, tais como quitinase e glucanases, também estão relacionadas com sua atividade antimicrobiana (El-KATATNY et al., 2001).

Outra face do mecanismo de ação de microrganismos antagonistas é a produção de metabólitos secundários que apresentam atividade antimicrobiana (WAINWRIGHT, 1992), cuja aplicação por pulverização em superfície ou inoculação por injeção são possíveis de serem utilizados em processos de conservação de raízes e frutos (POOLE; WHITMORE, 1997).

A utilização de compostos voláteis como metil jasmonato e alguns álcoois na conservação de frutos, reduz a ação de microrganismos fitopatogênicos (WANG et al., 1994; BUTA et al., 1998; WANG et al., 2003). Muitos outros compostos de origem natural apresentam atividade antimicrobiana, como o 6 pentil  $\alpha$  pirona (6PP), o ácido acético, os glucosinolatos, as fusapironas e deoxifusapironas, as quitosanas e os óleos essenciais. Esses compostos, extraídos de plantas ou microrganismos, são promissores extratos que podem ter ação antifúngica (TRIPATHI et al., 2004).

O fungo *T. harzianum*, além da sua capacidade antagonista, é um produtor de inúmeras biomoléculas de interesse. O mecanismo de ação antagonista deste fungo ainda não é totalmente conhecido, pois além das enzimas, novos metabólitos antagonistas foram descobertos, como a isoharzandiona (MANNINA et al., 1997), viridepirona (EVIDENTE et al., 2003) e o 6 pentil  $\alpha$  pirona (COLLINS; HALIN, 1972).

### **3.2.1 Trichoderma Harzianum E 6 Pentil $\alpha$ Pirona (6pp)**

As características antimicrobianas do 6PP foram analisados primeiramente por Cutler et al. (1986), que constatou uma fraca atividade sobre bactérias e uma ação eficaz

sobre fungos. Depois de comprovada essa última característica, o 6PP tornou-se alvo de estudos visando seu espectro e mecanismo de ação. A suscetibilidade de vários fungos fitopatogênicos ao 6PP depende da espécie, o que foi observado com *Sclerotinia sclerotiorum* que apresentou pouca sensibilidade, ao contrário de *Phytophthora cinnamomi* (CLAYDON et al., 1987).

A aplicação tópica do 6PP em kiwi em pós-colheita auxiliou na redução da podridão causada por *Botrytis cinerea*, bem como a aplicação através de injeção no fruto (POOLE; WHITMORE, 1997). Igualmente, a aplicação do 6PP no solo cultivado com mudas de lentilhas demonstrou ser eficaz no controle de *Athelia rolfsii* (DODD et al., 2000).

A característica lipofílica deste metabólito indica uma possível interação com a superfície de esporos de fitopatógenos tais como *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, explicando um possível mecanismo de ação através da formação de uma camada hidrorrepelente que impediria a absorção de água pelos esporos e conseqüentemente sua germinação (SCARSELETTI; FAULL, 1994).

O estudo de fatores relacionados com a produção deste metabólito, tais como fontes de nitrogênio (aminoácidos, inorgânico) em meio de cultura, demonstrou que a presença de determinados aminoácidos interfere na síntese do 6PP (YONG et al., 1985). Condições de fermentação sob agitação favorecem a síntese do 6PP, provavelmente pelo estresse ocasionado pela agitação ou pela melhora na aeração do meio (GALINDO et al., 2003).

A relação de consumo de glicose, produção de biomassa e 6PP evidenciam que este metabólito é produzido em maior intensidade na passagem da fase “log” para a estacionária de crescimento do fungo. Comprovou-se a ação inibitória do 6PP contra o próprio fungo, com o uso do adsorvente Amberlite XAD-2, que capturou parte do metabólito e reduziu sua ação tóxica (PRAPULLA et al., 1992). A ação inibitória do 6PP sobre o fungo *T. harzianum* também pode ser reduzida pela sua remoção do meio de cultura, ou por isolamento do metabólito em sistema bifásicos de cultivo óleo-água (RITO-PALOMARES et al., 2000; 2001).

A substituição de substratos líquidos por sólidos, de baixo custo (bagaço de cana) que fornecem fonte de carbono (celulose), umidificados com meio de cultura (Caldo Dextrose Batata favorecem a produção do 6PP, pelo *T. harzianum*, provavelmente, por redução da ação tóxica do metabólito, adsorvido pelo bagaço de cana (SARHY-BAGNON et al., 2000; ARAÚJO et al., 2002). Processos fermentativos de superfície demonstraram ser mais eficazes na produção do 6PP por *T. harzianum* (KALYANI et al., 2000).

A presença de diferentes óleos vegetais no meio de cultura também foi explorada. Entretanto, o fungo *Trichoderma* spp aparentemente não os utilizou como fonte de carbono, mas a característica lipofílica do metabólito fez com que este fosse adsorvido pelo óleo, evitando a sua ação tóxica. Como consequência, houve um aumento substancial na produção do 6PP e da biomassa do fungo (BONNARME et al., 1997).

A baixa toxicidade do 6PP para o homem (GRAS – Generally Recognized As Safety) (OSER et al., 1984), torna este metabólito uma alternativa muito interessante para o controle biológico de microrganismos fitopatogênicos. Entretanto, o alto custo da síntese química do 6PP e a baixa produção do 6PP pelo fungo *Trichoderma* spp, ainda são empecilhos para a sua utilização em larga escala, justificando a busca por processos e cultivos otimizados que aumentem a produção e reduzam os custos de produção do 6PP (POOLE; WHITMORE, 1997).

## 4 MATERIAL, MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO

O material e os métodos utilizados neste trabalho bem como, os resultados obtidos e sua discussão, estão expostos nos seguintes artigos:

4.1 Otimização das condições de cultivo de *Trichoderma atroviride* para a produção do 6 pentil  $\alpha$  pirona (6PP)

4.2 Influência do 6 pentil  $\alpha$  pirona (6PP) produzido por *Trichoderma atroviride* sobre *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal da Sigatoka Negra da bananeira (*Musa sativa*)

4.3 Influência do 6 pentil  $\alpha$  pirona (6PP) produzido por *Trichoderma atroviride* na germinação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi*, agente causal da ferrugem asiática da soja (*Glycine max* Merrill)

#### 4.1 Otimização das condições de cultivo de *Trichoderma atroviride* para a produção do 6 pentil $\alpha$ pirona (6PP)

Cláudio Takeo Ueno<sup>1\*</sup> Raúl Jorge Hernan Castro Gómez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR - 86020-430 [ctueno2002@yahoo.com.br](mailto:ctueno2002@yahoo.com.br) Londrina - PR

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Londrina – UEL Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos - 86051-980 [rcastrrog@yahoo.com](mailto:rcastrrog@yahoo.com) Londrina - PR

#### ABSTRACT

*Some species of Trichoderma sp fungus produce lactones, a secondary metabolite with antifungal properties, known as 6 pentyl  $\alpha$  pyrone (6PP). In this work, the influence of culture conditions parameters, type and nutrients concentration on the production of 6PP by Trichoderma atroviride was studied and optimized, giving emphasis to the use of cheap raw materials culture components. Sucrose, glucose,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and  $\text{NaNO}_3$  had a negative effect in 6PP production whereas starch, molasses, peptone, yeast extract and low pH influenced positively.*

**Keywords:** Antimicrobial activity. Biological control. Culture conditions. Molasses. Process optimization.

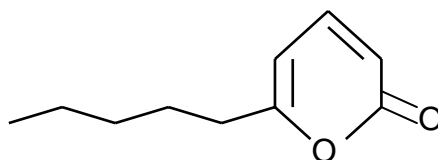
#### RESUMO

*Algumas espécies do fungo Trichoderma sp produzem lactonas, um metabólito secundário com propriedades antifúngicas, denominado 6 pentil  $\alpha$  pirona (6PP). Neste trabalho, estudou-se a influência dos parâmetros de condições de cultivo, concentração e tipo de nutrientes, sobre a produção do 6PP por Trichoderma atroviride. Para o processo de otimização aplicou-se um desenho experimental utilizando a metodologia de superfície resposta dando ênfase para o uso de matérias primas de baixo custo na composição de meio de cultura. Sacarose, glicose,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $\text{NaNO}_3$  tiveram efeito negativo sobre a biossíntese do 6PP, enquanto, melão de cana, peptona, extrato de levedura e pH baixo influenciaram positivamente.*

**Palavras chave:** Atividade antimicrobiana. Controle biológico. Condições de cultivo. Melão. Processo de otimização.

## INTRODUÇÃO

Produtos naturais podem ser utilizados como alternativas para o controle de fungos em culturas pós-colheita de grãos. O interesse nesses produtos está aumentando pelo fato de serem potenciais substitutos para fungicidas sintéticos correntemente utilizados na agricultura (TRIPATHI; DUBEY, 2004). O fungo *Trichoderma harzianum* possui muitas aplicações na agricultura, sendo possível utilizá-lo para o controle de fitopatógenos em solo (DODD et al., 2000; OTIENO et al., 2003; PAPAIVIZAS, 1985) e para biossíntese de metabólitos antimicrobianos (CLAYDON et al., 1987). Algumas espécies de *Trichoderma* spp produzem o 6 pentil  $\alpha$  pirona (6PP) (Fig. 1), metabólito secundário com aroma de côco (ARAÚJO et al., 2002; COLLINS; HALIM, 1972; PRAPULLA et al., 1992) e propriedades antimicrobianas (CUTLER et al., 1986; SCARSELLETTI; FAULL, 1994).



**Figura 1** – estrutura do 6 pentil  $\alpha$  pirona

O 6PP sintética possui o status de GRAS – “Generally Recognized as Safe” (OSER et al., 1984). A origem natural e as propriedades antifúngicas do 6PP fazem deste metabólito um biofungicida em potencial para controlar doenças tanto durante o cultivo como na pós-colheita. (POOLE; WHITMORE, 1997). A biossíntese do 6PP ocorre via  $\beta$ -oxidação (SERRANO-CARREON et. al., 1993), que pode ser estimulada na presença de ésteres de ácidos graxos no substrato (SERRANO-CARREON et al., 1992). Assim, cultivos utilizando ácido ricinoleico obtiveram uma maior produção do 6PP, sugerindo que este ácido graxo seja

precursor deste metabólito (BONNARME et al., 1997). As condições de fermentação, por ex: agitação, turbulenta e não turbulenta (SARHY-BAGNON et al., 2000; KALYANI et al., 2000; GALINDO et al., 2004), presença ou ausência de luz, diferentes temperaturas (COONEY et al., 1997), podem influenciar a biossíntese do 6PP (COONEY et al., 1997a; YONG et al., 1985), As fontes de nitrogênio e carbono do meio de cultura também afetam a síntese do 6PP. O melão de cana, devido à sua composição (Tab. 1), é considerado uma boa matéria prima por apresentar glicose que é sabidamente conhecida como uma fonte primordial de carbono e sacarose, que também é utilizada por muitos microrganismos. As fontes de nitrogênio, como extrato de levedura, peptona,  $\text{NaNO}_3$  e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  são muito utilizados em processos fermentativos. Considerando este quadro, o objetivo deste trabalho foi otimizar as condições de cultivo que promovam o máximo de produção do 6PP por *T. atroviride*, anteriormente denominado *T. harzianum* IMI 206040 (CARSOLIO et al., 1994).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Microrganismo***

O fungo *Trichoderma atroviride* foi gentilmente cedido pelo Dr. Enrique Galindo do Instituto de Biotecnologia da Universidad Nacional Autónoma de México e mantido em Ágar Batata Dextrose (ABD) a 5,0 °C até o momento de uso.

### ***Meio de cultura***

Os meios de cultura líquidos foram preparados de acordo com Bonnarne et al., (1997), com algumas modificações, utilizando reagentes de grau analítico. As fontes de nitrogênio foram:  $\text{NaNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , peptona e extrato de levedura (0,01 – 0,1 g%). Fontes de carbono: amido, sacarose, glicose (0,1 – 1 g%), melão (0,3 - 3 °Brix) e valores de pH: 4,5 a 6,5 corrigidos com HCl/NaOH. O melão de cana de açúcar foi obtido da Cooperativa Agroindustrial - COROL, Rolândia, PR.

### ***Manutenção dos microrganismos***

O fungo *T. atroviride* foi inoculado em Ágar Batata Dextrose (ABD) em placas de Petri e incubado a 25 °C/72 h e em seguida estocado a 5 °C até o momento de uso.

### ***Inóculo***

Micélios de *T. atroviride* mantidos a 5 °C foram inoculados em placas de Petri com ABD e incubados a 25 °C/72 h. Os inóculos foram preparados cortando-se 40 pequenos fragmentos do micélio em ABD (0,5cm<sup>2</sup> aproximadamente) e adicionados ao meio de cultura (150 mL).

### ***Delineamento experimental***

Primeiramente, delineou-se um desenho experimental ( $2^{9-5}$ ) fracionado incompleto com 16 combinações e nove variáveis tendo como resposta a produção do 6PP (Tabela 2 e 3). Após selecionar as melhores fontes de carbono e nitrogênio pelo efeito e custo, as concentrações

destas foram ajustadas utilizando a Metodologia de Análise de Superfície de Resposta com um desenho experimental fracionado incompleto ( $3^3$ ) (Box-Behnken) com 3 replicatas no ponto central (Tabela 4 e 5) tendo como resposta a produção do 6PP. Ambos os desenhos experimentais foram analisados aplicando-se o programa Statistica 6.0 (Statsoft).

### ***Condições de cultivo***

Os meios de cultura com diferentes fontes de carbono e nitrogênio foram incubados a 120rpm/25 °C/72 h.

### ***Determinação de massa micelial***

Após o período de incubação (72 h), o meio de cultivo foi filtrado sob vácuo utilizando papel filtro Wathman nº5. Em seguida o micélio retido no filtro foi secado a 105 °C até peso constante (aprox. 24 horas). A massa micelial foi expressa em mg/L de meio de cultura.

### ***Extração e determinação do 6PP***

A extração do 6PP procedeu-se de acordo com Scarselletti e Faull (1994). Após 72 h de incubação, o meio de cultura foi filtrado (Wathman nº. 5) sob vácuo e ao filtrado, adicionou-se acetato de etila (2:1). A solução foi submetida à agitação (5 °C/72 h) e em seguida, separada a fração hidrofóbica na qual foi adicionado  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  para eliminar a água remanescente. A fração hidrofóbica foi evaporada sob vácuo a 35 °C e em seguida, o resíduo contendo 6PP, diluído em etanol PA (99,5 %). A concentração do 6PP foi determinada com espectrofotômetro UV-visível (Cintra 20) em 302 nm e a absorvância da solução comparada com curva padrão do 6PP (Sigma).

**Tabela 1** – Características químicas do melação

Sólidos solúveis (°Brix)	79,5
Sólidos totais (%)	75,0
Açúcares totais (%)	46,0
Proteínas (%)	3,0
Extrato livre de Nitrogênio (%)	63,0
Lipídeos totais (%)	0,0
Fibras totais (%)	0,0
Cinzas (%)	8,1
Ca (%)	0,8
P (%)	0,08
K (%)	2,4
Na (%)	0,2
Cl (%)	1,4
S (%)	0,5
Cu (mg/kg)	36,0
Fe (mg/kg)	249,0
Mn (mg/kg)	35,0
Zn (mg/kg)	13,0
Biotina (mg/kg)	0,36
Colina (mg/kg)	745,0
Ácido Pantatênico (mg/kg)	21,0
Riboflavina (mg/kg)	1,8
Tiamina (mg/kg)	0,9

Fonte: Curtin et al., (1983)

**Tabela 2** – Constituintes, variáveis e níveis utilizados no desenho experimental (2<sup>9-5</sup>)

Constituinte	Nível	
	- 1	1
A - Sacarose	0,1 g/L	1g/L
B – Glicose	0,1g/L	1g/L
C – Melação	0,3 °Brix	3 °Brix
D – Amido	0,1 g/L	1g/L
E - NaNO <sub>3</sub>	0,01g/L	0,1g/L
F – Peptona	0,01g/L	0,1g/L
G - Ext. de levedura	0,01g/L	0,1g/L
H – (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,01g/L	0,1g/L
I – pH	4,5	6,5

**Tabela 3** – Desenho experimental  $2^{9-5}$ , 16 tratamentos codificados

Exp	Variáveis codificadas									Variáveis decodificadas								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	a	b	c	d	e	f	g	h	i
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,01	0,01	0,01	0,01	4,5
2	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1,0	0,1	0,3	0,1	0,1	0,01	0,1	0,1	4,5
3	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	0,1	1,0	0,3	0,1	0,1	0,1	0,01	0,1	4,5
4	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1,0	1,0	0,3	0,1	0,01	0,1	0,1	0,01	6,5
5	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	0,1	0,1	3,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,01	4,5
6	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	1,0	0,1	3,0	0,1	0,01	0,1	0,01	0,1	6,5
7	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	0,1	1,0	3,0	0,1	0,01	0,01	0,1	0,1	6,5
8	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1,0	1,0	3,0	0,1	0,1	0,01	0,01	0,01	4,5
9	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	0,1	0,1	0,3	1,0	0,01	0,1	0,1	0,1	4,5
10	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	1,0	0,1	0,3	1,0	0,1	0,1	0,01	0,01	6,5
11	-1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	0,1	1,0	0,3	1,0	0,1	0,01	0,1	0,01	6,5
12	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	-1	1,0	1,0	0,3	1,0	0,01	0,01	0,01	0,1	4,5
13	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	1	0,1	0,1	3,0	1,0	0,1	0,01	0,01	0,1	6,5
14	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1,0	0,1	3,0	1,0	0,01	0,01	0,1	0,1	6,5
15	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0,1	1,0	3,0	1,0	0,01	0,1	0,01	0,01	4,5
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,0	1,0	3,0	1,0	0,1	0,1	0,1	0,1	6,5

**Tabela 4** – Constituintes e níveis do desenho experimental incompleto  $3^3$ 

Constituinte	Nível		
	-1	0	+1
X <sub>1</sub> - Melaço (°Brix)	2,0	4,0	6,0
X <sub>2</sub> - Extrato de levedura (g/L)	0,01	0,035	0,06
X <sub>3</sub> – pH	4,5	5,5	6,5

**Tabela 5** – Desenho Experimental  $3^3$  incompleto – Box - Benhken

Exp.	Variáveis codificadas			Variáveis decodificadas		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	-1	-1	0	2,0	0,01	5,5
2	1	-1	0	6,0	0,01	5,5
3	-1	1	0	2,0	0,06	5,5
4	1	1	0	6,0	0,06	5,5
5	-1	0	-1	2,0	0,035	4,5
6	1	0	-1	6,0	0,035	4,5
7	-1	0	1	2,0	0,035	6,5
8	1	0	1	6,0	0,035	6,5
9	0	-1	-1	4,0	0,01	4,5
10	0	1	-1	4,0	0,06	4,5
11	0	-1	1	4,0	0,01	6,5
12	0	1	1	4,0	0,06	6,5
13	0	0	0	4,0	0,035	5,5
14	0	0	0	4,0	0,035	5,5
15	0	0	0	4,0	0,035	5,5

Onde: X<sub>1</sub>= melaço de cana (°Brix), X<sub>2</sub>= ext. de leved. (g%) e X<sub>3</sub>= pH

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Seleção das melhores fontes de carbono, nitrogênio e pH para produção do 6PP*

A composição dos meios de cultura e as condições de fermentação utilizadas para selecionar as variáveis ótimas foram baseadas em experimentos prévios e em literatura (BONNARME et al., 1997), onde foi observado que 120 rpm a 25 °C/ 72 h, eram as condições mais adequadas para otimização da produção do 6PP, com relação aos nutrientes de meio de cultivo (carbono e nitrogênio) o aumento das concentrações de NaNO<sub>3</sub> e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> apresentou um efeito negativo significativo na produção do 6PP (Tab. 6). No caso do observado para peptona e

extrato de levedura, verifica-se um efeito negativo não significativo. A produção do 6PP (mg/L de meio) não foi influenciada pela variação da concentração de sacarose e glicose. No caso do amido e melaço de cana de açúcar, foi verificado que um aumento de sua concentração afeta positivamente a produção do 6PP, sendo este efeito significativo para o amido e não significativo no caso do melaço (Tab. 6). As mudanças do valor de pH dentro da faixa experimental indicaram um efeito negativo não significativo na produção do 6PP (mg/L de meio) (Tab. 6). De acordo com estes resultados, a melhor fonte de nitrogênio para a produção do 6PP, correspondeu ao extrato de levedura por apresentar o menor efeito negativo não significativo. No caso da fonte de carbono, verificou-se que o amido apresentou um efeito positivo significativo, ao contrário das outras fontes estudadas que tiveram efeitos positivos, mas não significativos na produção do 6PP. Entretanto, foi escolhido o melaço de cana de açúcar por sua composição rica em sais minerais (Tab. 1), facilidade de manipulação durante o preparo do substrato e por sua disponibilidade na região oferecendo assim, mais uma opção de utilização a indústria.

**Tabela 6** – Condições experimentais e resposta obtida a partir de desenho experimental  $2^{9-5}$

Exp	a	b	c	d	e	f	g	h	i	6PP (mg/L)
1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,01	0,01	0,01	0,01	4,5	31,80
2	1,0	0,1	0,3	0,1	0,1	0,01	0,1	0,1	4,5	8,66
3	0,1	1,0	0,3	0,1	0,1	0,1	0,01	0,1	4,5	13,80
4	1,0	1,0	0,3	0,1	0,01	0,1	0,1	0,01	6,5	39,07
5	0,1	0,1	3,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,01	4,5	17,13
6	1,0	0,1	3,0	0,1	0,01	0,1	0,01	0,1	6,5	11,67
7	0,1	1,0	3,0	0,1	0,01	0,01	0,1	0,1	6,5	15,67
8	1,0	1,0	3,0	0,1	0,1	0,01	0,01	0,01	4,5	30,53
9	0,1	0,1	0,3	1,0	0,01	0,1	0,1	0,1	4,5	13,40
10	1,0	0,1	0,3	1,0	0,1	0,1	0,01	0,01	6,5	14,87
11	0,1	1,0	0,3	1,0	0,1	0,01	0,1	0,01	6,5	40,07
12	1,0	1,0	0,3	1,0	0,01	0,01	0,01	0,1	4,5	56,13
13	0,1	0,1	3,0	1,0	0,1	0,01	0,01	0,1	6,5	15,80
14	1,0	0,1	3,0	1,0	0,01	0,01	0,1	0,1	6,5	102,47
15	0,1	1,0	3,0	1,0	0,01	0,1	0,01	0,01	4,5	83,93
16	1,0	1,0	3,0	1,0	0,1	0,1	0,1	0,1	6,5	8,6
Efeito	0,76	1,35	1,27	3,13	-3,83	-1,85	-0,25	-4,05	-2,78	
p	0,557	0,311	0,337	0,043	0,020	0,180	0,843	0,016	0,062	

Onde: a= glicose, b= sacarose, c= melaço, d= amido, e= NaNO<sub>3</sub>, f= peptona, g= ext. levedura, h= (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, i= pH

### ***Determinação das melhores condições de fermentação para produção do 6PP***

Os efeitos da análise de variância dos dados experimentais para a resposta: produção do 6PP (mg/L) se encontram nas tabelas 7 e 8. As variáveis analisadas ( $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$ ) apresentaram efeitos não significativos ( $p < 0,05$ ) dentro das condições experimentais estudadas. O coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,726$ ) para a resposta 6PP (mg/L) permite afirmar que 72,6% da variação da resposta é explicada pelo modelo, índice aceitável para sistemas biológicos. A falta de ajuste dos dados não foi significativa ( $p = 0,261477$ ) indicando que o modelo matemático se ajusta adequadamente aos dados experimentais (Tab. 8), portanto, é adequado para fins preditivos (Tab.9), dentro da região experimental (Tab 4). A figura 2 revela o gráfico de linhas de contorno dos efeitos da concentração do extrato de levedura e do melão de cana de açúcar, sobre a produção do 6PP (mg/L) em pH= 4,5. Nesta figura observa-se que as melhores produções do 6PP foram obtidas em duas condições distintas. Assim, após a análise destes dados e aplicando-se a equação do modelo (Tab.9), as maiores concentrações dos componentes do meio de cultura para produção do 6PP foram em primeiro

**Tabela 7** – Condições experimentais e resultados obtidos a partir Desenho Experimental  $3^3$  – Box - Benhken-

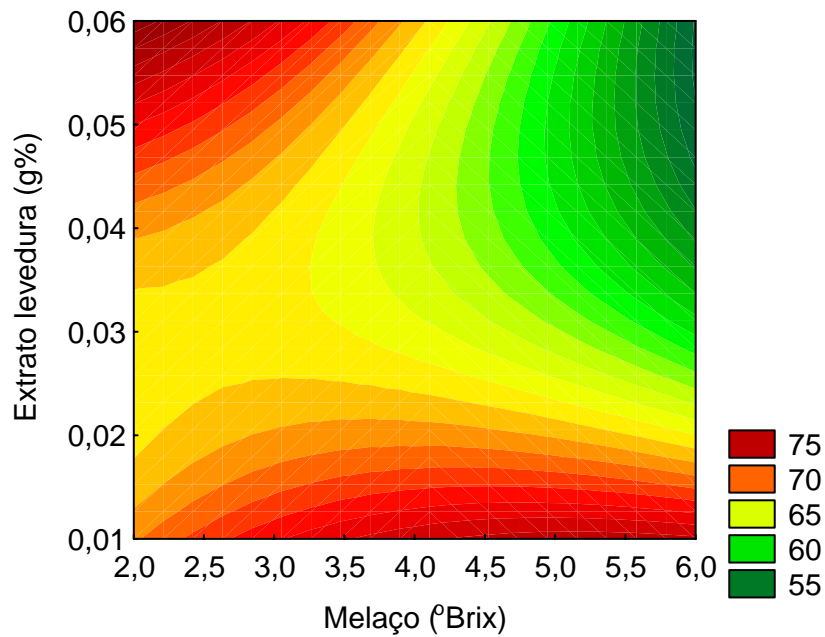
Trat. nº.	Variável decodificada			6PP (mg/L)*
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	
1	2,0	0,01	5,5	48,93
2	6,0	0,01	5,5	67,53
3	2,0	0,06	5,5	53,27
4	6,0	0,06	5,5	51,67
5	2,0	0,035	4,5	63,20
6	6,0	0,035	4,5	49,93
7	2,0	0,035	6,5	48,07
8	6,0	0,035	6,5	54,13
9	4,0	0,01	4,5	82,40
10	4,0	0,06	4,5	70,27
11	4,0	0,01	6,5	54,47
12	4,0	0,06	6,5	41,47
13	4,0	0,035	5,5	59,67
14	4,0	0,035	5,5	47,13
15	4,0	0,035	5,5	54,93
p*	0,991	0,141	0,063	

Onde:  $X_1$ = melão de cana ( $^{\circ}$ Brix),  $X_2$ = ext. de leved. (g%) e  $X_3$ = pH

lugar, 2,0 °Brix de melão de cana, 0,06g% de extrato de levedura e pH 4,5 e em segundo, 5,0 ° Brix de melão 0,01g% de extrato de levedura e pH 4,5. Por outro lado, a produção do 6PP é maior em meios nutricionalmente pobres. Assim, quando um dos componentes, extrato de levedura ou melão de cana, encontra-se em concentrações elevadas, seguramente um compensa a deficiência do outro, explicando as duas melhores condições de produção do 6PP. Este comportamento do *T. atroviride* sugere que o estresse pela competição por nutrientes ativa o metabolismo secundário e então, aumenta a biossíntese do 6PP. Esta pode ser uma possível via utilizada pelo *T. atroviride* para produzir uma ferramenta de competição contra outros fungos por nutrientes e sobreviver no ambiente. Pesquisas neste sentido estão sendo desenvolvidas em nosso laboratório. A diferença de produção do 6PP entre as duas condições foi de 4,29%. A escolha entre usar uma ou outra condição deverá ser decidida em função de critérios econômicos, considerando a disponibilidade e os preços do melão de cana de açúcar e do extrato de levedura. De qualquer forma, mais estudos poderão fornecer subsídios para determinar uma única melhor condição de produção do 6PP.

**Tabela 8** – Análise de variância dos resultados para a resposta 6PP (mg/L)

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	p
X <sub>1</sub>	17,863	2	8,9314	0,817566
X <sub>2</sub>	226,709	2	113,3547	0,260956
X <sub>3</sub>	588,803	2	294,4015	0,119684
X <sub>1</sub> *X <sub>2</sub>	228,010	1	228,0100	0,139683
X <sub>1</sub> *X <sub>3</sub>	93,412	1	93,4122	0,266165
X <sub>2</sub> *X <sub>3</sub>	0,189	1	0,1892	0,951438
Falta de ajuste	357,479	3	119,1597	0,261477
Erro puro	80,051	2	40,0254	
Total soma dos quadrados	1597,185	14		
Coeficiente de Determinação (R <sup>2</sup> )=0,726.				
Onde: X <sub>1</sub> = Melão (°Brix), X <sub>2</sub> = Extrato de levedura (g%), X <sub>3</sub> = pH				



**Figura 2** – Superfície de resposta para produção do 6PP (mg/L de meio) variando os níveis de melão e extrato de levedura e pH fixo em pH 4,5

**Tabela 9** – Valores do 6PPmg/L preditivos aplicando a equação do modelo:  $Z = 202,76 - 3,62x - 0,55x^2 - 166,63y + 9793,33y^2 - 151xy + (2,42*4,5x) - (8,70*4,5y) - 142,14$

	Melão de Cana (°Brix)	Ext. Levedura g/100mL	pH	Resposta 6PP (mg/L)
1	2,0	0,01	4,5	68,826
2	2,0	0,035	4,5	67,149
3	2,0	0,06	4,5	77,713
4	2,0	0,06	5,5	62,087
5	3,0	0,01	4,5	71,821
6	4,0	0,01	4,5	73,716
7	4,5	0,01	4,5	74,252
8	5,0	0,01	4,5	74,512
9	4,0	0,035	4,5	64,489
10	4,0	0,01	5,5	63,358

Onde: x= extrato de levedura e y= melão de cana

## CONCLUSÃO

- A produção do 6PP (mg/L de meio) foi influenciada pelas fontes de carbono e nitrogênio.
- Valores de pH acima de 4,5 interferem negativamente na produção do 6PP

- Em condições de baixa concentração de fonte de nitrogênio ou de fonte de carbono há um efeito positivo para a produção do 6PP, ao passo que altas concentrações de ambos (nitrogênio e carbono) há um efeito negativo.
- Foram detectados duas condições ótimas de produção do 6PP:
  - 5,0 °Brix, 0,01 g% de extrato de levedura, pH 4,5, temperatura de incubação 25 °C com agitação de 120rpm durante 72 h;
  - 2,0 ° Brix, 0,06 g% de extrato de levedura, pH 4,5, temperatura de incubação 25 °C com agitação de 120rpm durante 72 h.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos à COROL – Cooperativa Agroindustrial (Rolândia – PR) pelo fornecimento do melão e ao Dr. Enrique Galindo do Instituto de Biotecnologia da Universidad Nacional Autónoma de México pela doação do fungo *T. atroviride*.

## 4.2 Influência do 6 pentil $\alpha$ pirona (6PP) produzida por *Trichoderma atroviride* sobre *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal da Sigatoka Negra da bananeira (*Musa sativa*)

Cláudio Takeo Ueno<sup>1\*</sup> Raúl Jorge Hernan Castro Gómez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR - 86020-430 [ctueno2002@yahoo.com.br](mailto:ctueno2002@yahoo.com.br) Londrina - PR

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Londrina – UEL Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos - 86051-980 [rcastrrog@yahoo.com](mailto:rcastrrog@yahoo.com) Londrina - PR

### ABSTRACT

*The 6 pentyl  $\alpha$  pyrone (6PP) is a metabolite produced by *Trichoderma atroviride* with antimicrobial properties which inhibit fungal growth. This characteristic is very important to biological control of phytopathogens. *Mycosphaerella fijiensis* is the causal agent of the Black Sigatoka disease in banana, is causing for reduction in productivity and increase in pesticide use. Nowadays, the disease is controlled by resistant cultivars and pulverization of synthetic chemical fungicides in banana crops. Thus, the objective of this work was to analyze “in vitro”, the influence of 6PP on *M. fijiensis* development. The results showed that the development of the mycelium of *M. fijiensis* was inhibited when using 40  $\mu$ g of 6PP/mL agar in culture media. 6PP showed fungicide effect but its activity decreases with the decrease of 6PP concentration.*

**Keywords:** Antimicrobial. Biofungicide. Biological control. Biotechnology.

### RESUMO

*O 6 pentil  $\alpha$  pirona (6PP) é um metabólito produzido por *Trichoderma atroviride* que possui propriedades antimicrobianas que inibem o crescimento de fungos. Tal característica é muito importante no controle biológico de fitopatógenos. O fungo *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal da Sigatoka negra da banana, é responsável por redução nas colheitas e aumento de consumo de pesticidas. Essa doença é controlada por meio de variedades resistentes e com a pulverização de fungicidas químicos em plantações de banana. Sob este aspecto, o objetivo deste trabalho foi analisar a influência “in vitro” do 6PP sobre o desenvolvimento de *M. fijiensis*. Os resultados demonstraram que o desenvolvimento de micélio de *M. fijiensis* foi inibido com 40  $\mu$ g do 6PP/ mL de ágar em meio de cultura. O 6PP demonstrou efeito fungicida e redução da atividade proporcional à concentração do 6PP.*

**Palavras-chave:** Antimicrobiano. Biofungicida. Controle biológico. Biotecnologia.

## INTRODUÇÃO

O fungo *Mycosphaerella fijiensis* é causador da sigatoka negra da bananeira (FIORAVANÇO; PAIVA, 2005), cujo controle atualmente é feito por meio de variedades resistentes e da utilização de fungicidas químicos (WASHINGTON et al., 1998). A consequência do uso indiscriminado de fungicidas é a seleção de populações resistentes (ROMERO; SUTTON 1997, CHIN et al., 2001) que exigem o desenvolvimento de novos fungicidas e alternativas para os mesmos. O plantio de cultivares de banana mais resistente à sigatoka negra é uma alternativa para controle da doença (OKOLE; SCHULZ, 1997; ORTIZ; VUYLSTEKE, 1994; HARELIMANA et. al., 1997), bem como a utilização de produtos naturais com atividade antimicrobiana, que são potenciais substitutos dos fungicidas químicos (TRIPATHI; DUBEY, 2004). O fungo *Trichoderma harzianum* é utilizado na agricultura para controle de fitopatógenos no solo, bem como em frutos (DODD et al., 2000; OTIENO et al., 2003; PAPAIVIZAS, 1985). Algumas espécies de *Trichoderma* produzem um metabólito secundário com propriedades antimicrobianas, o 6 pentil  $\alpha$  pirona (6PP) (CUTLER et al., 1986; PARKER et al, 1997; DODD et al., 2000), também produzido pelo *Trichoderma atroviride* (anteriormente *Trichoderma harzianum* IMI 206040, CARSOLIO et al., 1994). A produção do 6PP a partir de cultivo de *T. harzianum* (BONNARME et al., 1997) e processos de extração permite possíveis usos contra fitopatógenos que atacam frutos e hortaliças (POOLE; WHITMORE, 1997) bem como as culturas de grãos. Considerando o impacto que a sigatoka negra causa à produção de banana, o objetivo deste trabalho foi analisar a influência “in vitro” do 6PP sobre o crescimento micelial de *M. fijiensis* e a concentração mínima inibitória em meio com Ágar Batata Dextrose (ABD) e gerar dados para futuros estudos em campo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### ***Microrganismos***

*Trichoderma atroviride* (anteriormente *Trichoderma harzianum* IMI 206040 Carsolio et al., 1994) que foi gentilmente cedido pelo Dr. Enrique Galindo, do Instituto de Biotecnologia da Universidad Nacional Autónoma de México.

*Mycosphaerella fijiensis* (amostra gentilmente cedida pela EMBRAPA de Goiás).

### ***Meios de Cultura***

Os meios de culturas líquidos foram preparados com reagentes analíticos (p.a), de acordo com Bonnarne et al., (1997) com algumas modificações. A fonte de nitrogênio utilizada foi extrato de levedura (0,01g %) e a fonte de carbono, melação de cana (4,0 °Brix) em pH 4,5 (HCl/NaOH) com volume final de 150mL.

### ***Manutenção dos microrganismos***

*T. atroviride* e *M. fijiensis* foram mantidos em placas de Petri com Ágar Batata Dextrose (ABD) a 5 °C até o momento de uso.

### ***Preparo de inóculo de *T. atroviride* para produção do 6PP***

Micélios de *T. atroviride* mantidos a 5 °C foram inoculados em placas de Petri com Ágar Batata Dextrose e incubados a 25 °C/72 h, a partir deste, o inóculo foi preparado cortando-se 40 pequenos fragmentos de ágar com micélio (0,5 cm<sup>2</sup> aproximadamente) e inoculado ao meio de cultura líquido citado anteriormente, que foi incubado a 25 °C a 120rpm/72 h em agitador horizontal (TE-421 Tecnal).

### ***Extração do 6PP***

A extração do 6PP procedeu-se segundo Scarselletti e Faull (1994). Após 72 h de incubação, a cultura foi filtrada (Whatman n<sup>o</sup>.5) sob vácuo e, ao filtrado foi adicionado acetato de etila (2:1). A solução foi agitada 120 rpm a 5°C/72 h e em seguida, separadas as frações hidrofóbicas e hidrofílicas. À fração hidrofóbica, adicionou-se Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para eliminar a água remanescente e filtrou-se novamente (Whatman n<sup>o</sup> 5). A fração hidrofóbica foi evaporada sob vácuo fraco a 35°C e o resíduo obtido contendo 6PP, ressuspendido em etanol p.a. (99,5 %). A concentração do 6PP foi determinada com espectrofotômetro UV-visível (Cintra 20) em 302 nm e a absorbância da solução comparada com curva padrão do 6PP (Sigma).

### ***Preparação dos esporos de *M. fijiensis****

*M. fijiensis* foi cultivado em ABD a 25 °C até esporulação. Em seguida os esporos foram coletados em condições assépticas e diluídos em solução estéril de Tween 2 % e sua população determinada por contagem em câmara de Neubauer.

### ***Determinação da concentração mínima do 6PP para inibição “in vitro” do *M. fijiensis****

O 6PP dissolvida em etanol foi adicionada em Placa de Petri em quantidade suficiente para propiciar as concentrações finais de 10, 20, 30, 40, 50 µg/mL de ABD em duplicata e mantida em temperatura ambiente sob condições assépticas para evaporação do solvente. Em seguida,  $5 \times 10^4$  esporos de *M. fijiensis* foram depositados na placa de Petri ao lado oposto do 6PP suspendendo-os em seguida em 5mL de ABD (43 °C) seguido de homogeneização suave juntamente com a 6PP. Após a solidificação do ABD, as placas foram incubadas a 25 °C/72 h com observações diárias do crescimento do fungo. A determinação da atividade fungistática/fungicida foi realizada inoculando  $10^4$  esporos de *M. fijiensis* em meio Caldo Dextrose Batata contendo 6PP nas concentrações de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 µg/mL e incubados a 25 °C/72 h. Após esse intervalo, alíquotas de 0,1 mL do caldo foram retirados desses tubos e inoculados em tubos contendo Caldo Dextrose Batata isento do 6PP e incubados novamente a 25 °C /72 h e observado a formação de micélio.

### ***Estabilidade do 6PP sob estocagem***

O 6PP produzida foi estocada em recipiente âmbar a -20 °C, 8 °C e temperatura ambiente protegido da luz. A estabilidade do 6PP foi medida pela observação do efeito inibitório do mesmo sobre *M. fijiensis* em Placas de Petri com 50 µg do 6PP/mL de ABD. As placas de Petri foram inoculadas com  $10^4$  esporos/mL de *M. fijiensis* e incubadas a 25 °C/72 h. O efeito inibitório foi comparado com controle negativo, isento do 6PP. Após intervalo de 96 h o procedimento acima foi repetido até o período 17 dias de estocagem.

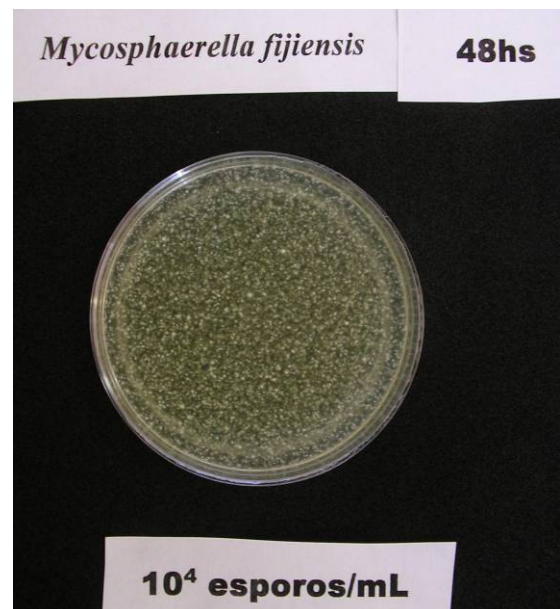
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 72 h de incubação, a inibição do crescimento pelo 6PP foi observada a partir de 40 µg do 6PP/mL (Figs. 8 a 11). Concentrações inferiores a 40 µg/mL provocaram um crescimento lento do fungo. A ação sobre crescimento do micélio em Caldo Dextrose Batata foi observada em concentrações acima de 30 µg do 6PP/mL, cujo desenvolvimento era inibido à medida que a concentração aumentava (Fig. 16 a 18). Inóculos do fungo proveniente do caldo com concentrações inferiores a 40 µg do 6PP/mL apresentaram um crescimento lento quando inoculados em caldo isento do 6PP, se comparado ao controle (Fig. 12) provavelmente devido a uma possível injúria celular (Fig. 15 e 16).

**Seção de Figuras:** Esporos de *M. fijiensis* submetidos a diferentes concentrações do 6PP



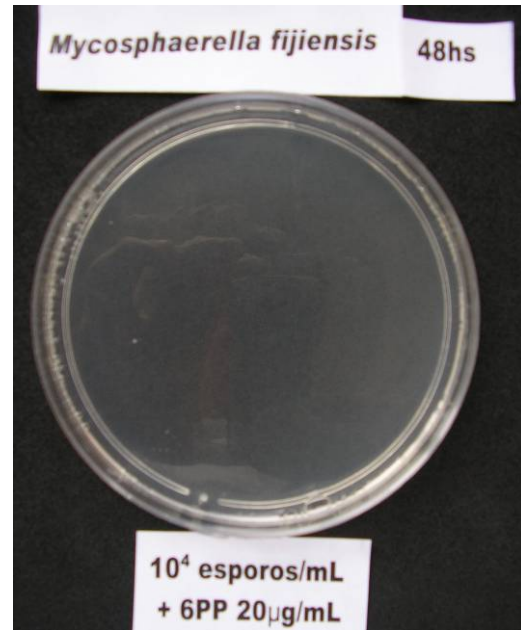
**Figura 1** – Controle – 24 h 10<sup>4</sup> esporos *M. fijiensis*/mL



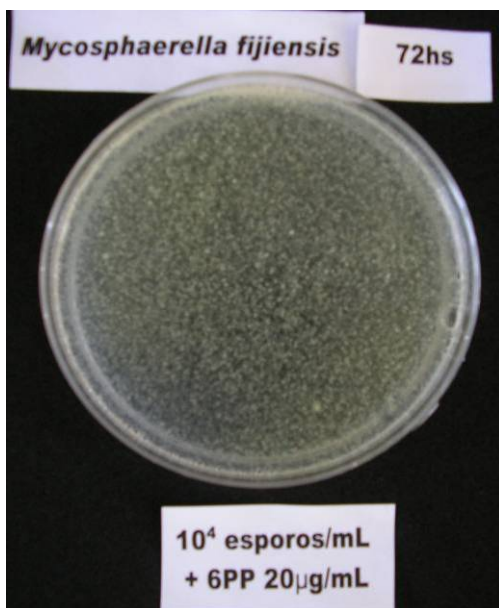
**Figura 2** – Controle – 48 h 10<sup>4</sup> esporos *M. fijiensis*/mL



**Figura 3** – Controle – 72 h 10<sup>4</sup> esporos *M. fijiensis*/mL



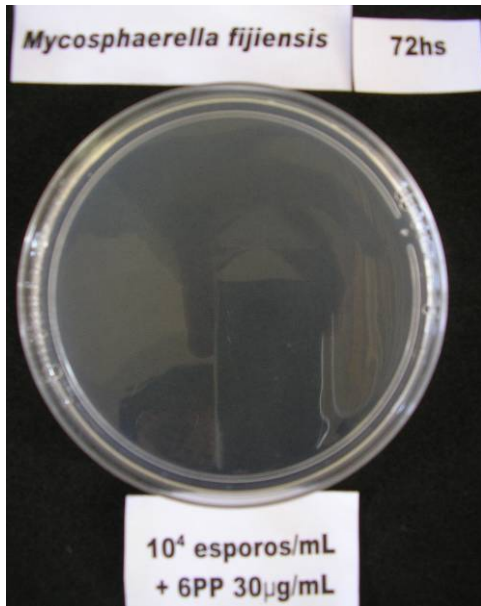
**Figura 4** – 48 h 10<sup>4</sup> esporos *M. fijiensis*/mL + 20 μg 6PP/mL



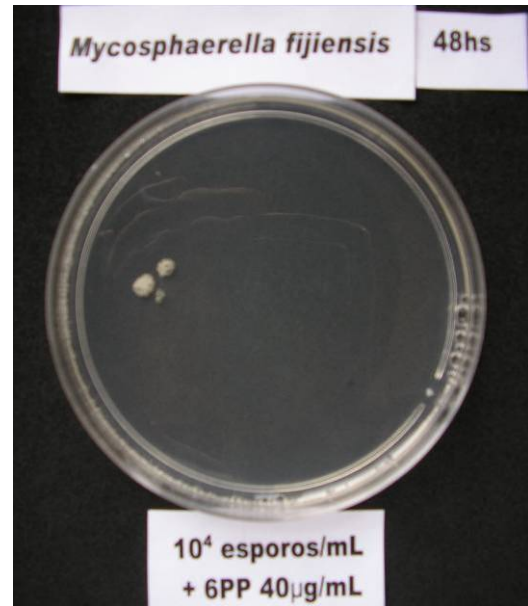
**Figura 5** – 72 h 10<sup>4</sup> esporos *M. fijiensis*/mL + 20 μg 6PP/mL



**Figura 6** – 48 h 10<sup>4</sup> esporos *M. fijiensis*/mL + 30 μg 6PP/mL



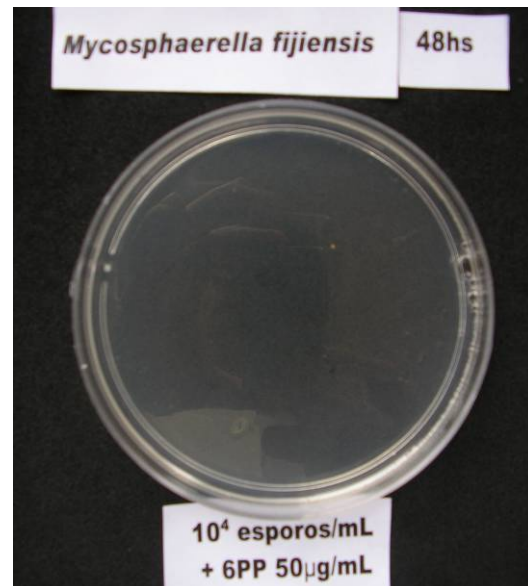
**Figura 7** – 72 h 10<sup>4</sup> esporos *M. fijiensis*/mL + 30 µg 6PP/mL



**Figura 8** – 48 h 10<sup>4</sup> esporos *M. fijiensis*/mL + 40 µg 6PP/mL



**Figura 9** – 72 h 10<sup>4</sup> esporos *M. fijiensis*/mL + 40 µg 6PP/mL



**Figura 10** – 48 h 10<sup>4</sup> esporos *M. fijiensis*/mL + 50 µg 6PP/mL



**Figura 11** – 72 h 10<sup>4</sup> esporos *M. fijiensis*/mL + 50 µg 6PP/mL



**Figura 12** – Controle – 96 h 10<sup>4</sup> esporos *M. fijiensis*/mL Caldo Dextrose Batata



**Figura 13** – 96 h 10<sup>4</sup> esporos *M. fijiensis*/mL Caldo Dextrose Batata 10 µg/mL



**Figura 14** – 96 h 10<sup>4</sup> esporos *M. fijiensis*/mL Caldo Dextrose Batata 20 µg/mL



**Figura 15** – 96 h  $10^4$  esporos *M. fijiensis*/mL  
Caldo Dextrose Batata 30 µg/mL



**Figura 16** – 96 h  $10^4$  esporos *M. fijiensis*/mL  
Caldo Dextrose Batata 40 µg/mL



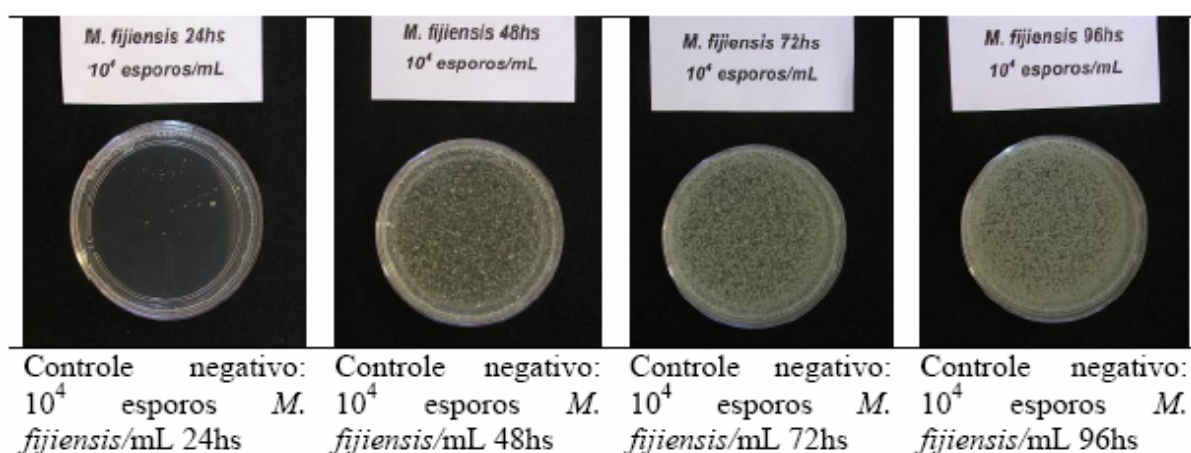
**Figura 17** – 96 h  $10^4$  esporos *M. fijiensis*/mL  
Caldo Dextrose Batata 50 µg/mL



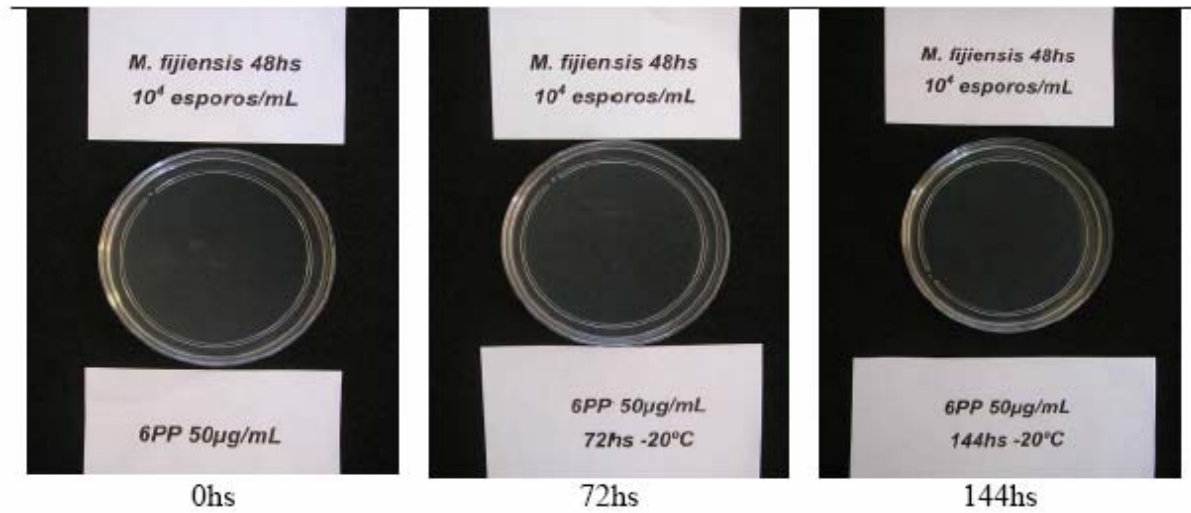
**Figura 18** – 96 h  $10^4$  esporos *M. fijiensis*/mL  
Caldo Dextrose Batata 60 µg/mL

### ***Estabilidade do 6PP***

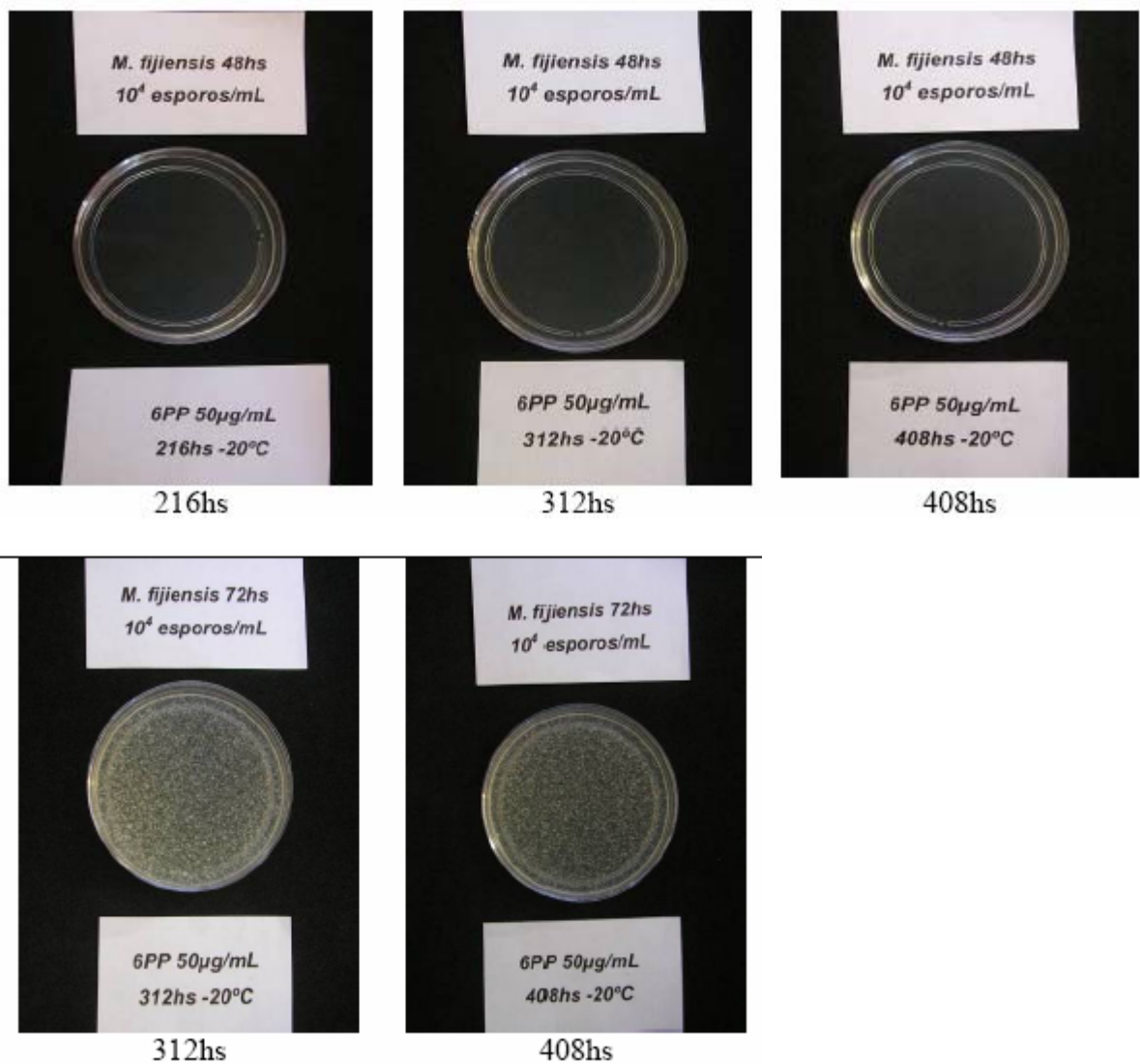
A potência do 6PP aparentemente é reduzida após 72hs de estocagem, afetando a sua ação sobre o *M. fijiensis* (Figs. 20-21) quando comparado com a ação da 6PP recém extraída (Figs. 20-22). Após esse período, a ação do 6PP é semelhante até 408hs de estocagem. As temperaturas de estocagem (-20°C, 8°C e temperatura ambiente) influíram pouco na atividade do 6PP. Por outro lado, provavelmente o microrganismo apresenta alguma ação metabólica que conduz a uma adaptação após 72hs de incubação quando inicia o seu desenvolvimento. Entretanto quando a concentração do 6PP foi duplicada ou seja, aumentou de 50 para 100 µg/mL (Fig. 23), foi observado que o microrganismo necessitou de 120hs de incubação para recém começar o seu crescimento. Isto pode estar demonstrando que o fitopatógeno em questão possui uma capacidade de metabolizar a 6PP e que quando a concentração do 6PP atinge um valor inferior ao mínimo necessário para inibir, o microrganismo começa a se desenvolver. Provavelmente deve existir uma concentração acima de 100ug/mL na qual o microrganismo será afetado de tal forma, que injúria (dano metabólico irreversível) provocada pela 6PP não lhe permitirá adaptar-se permanecendo inibido.



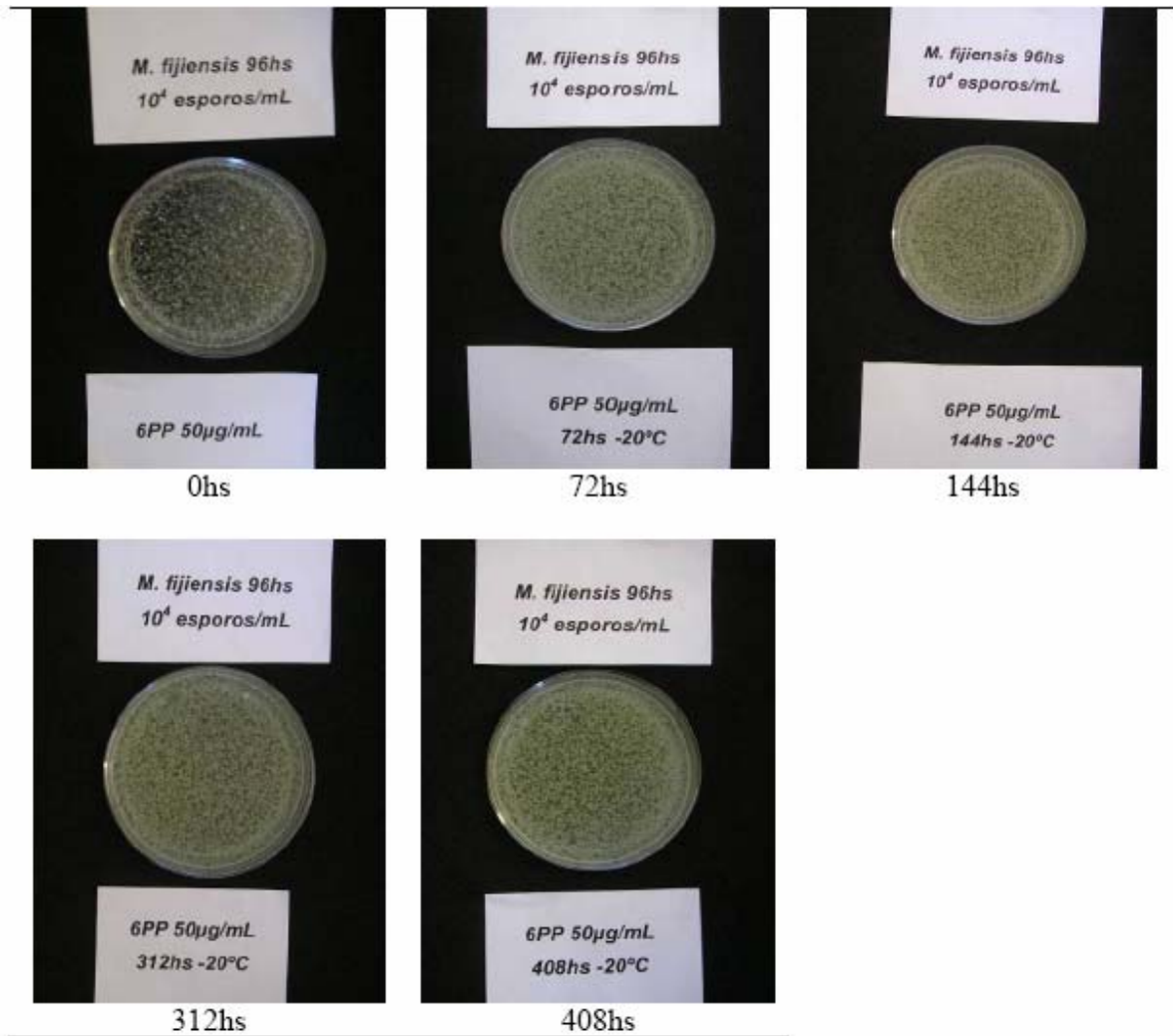
**Figura 19** Controle negativo de *M. fijiensis* (sem 6PP) incubada a 25°C



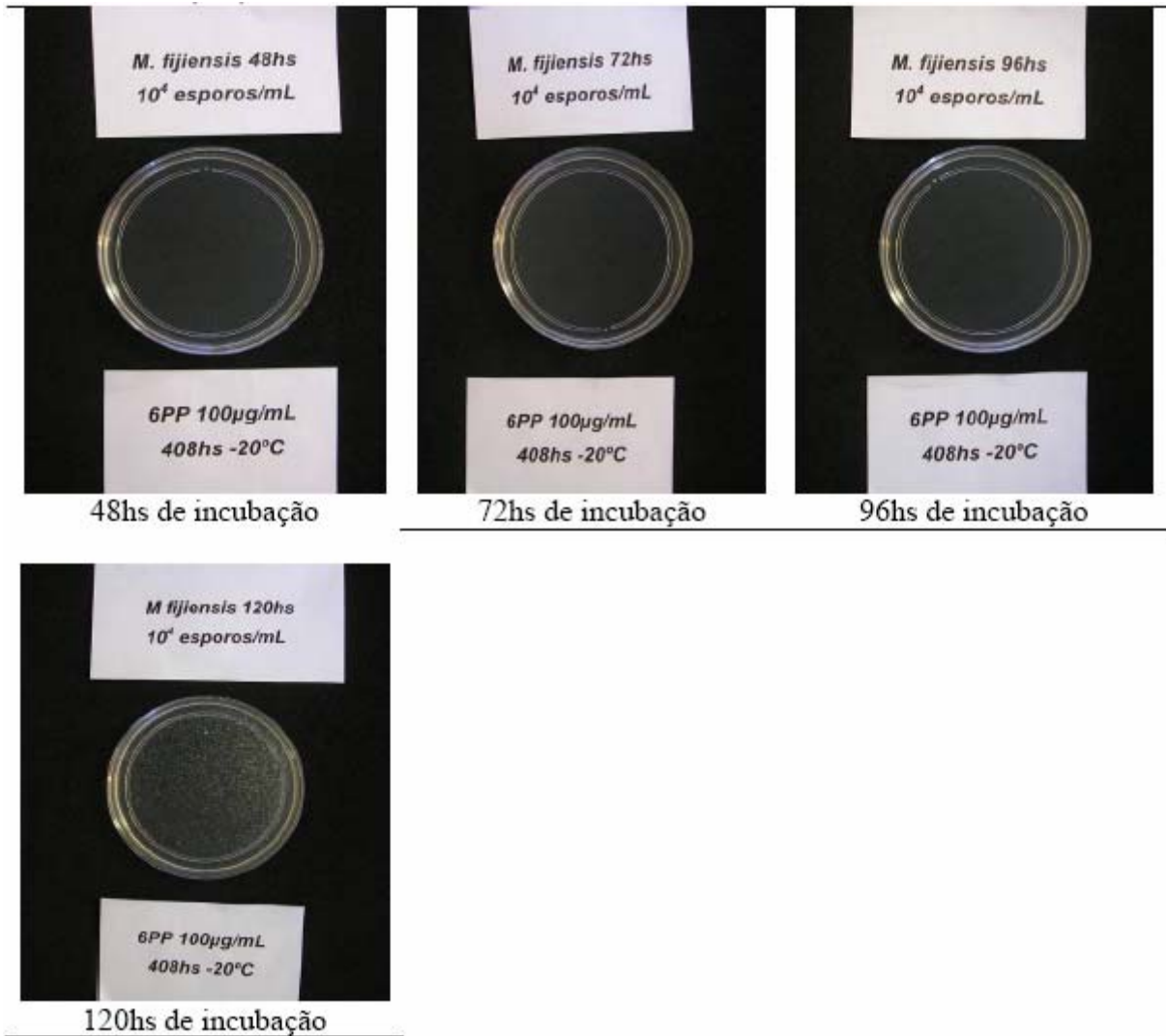
**Figura 20** – *M. fijiensis* (10<sup>4</sup> esporos/mL) submetido a 50 µg do 6PP/mL com diferentes tempos de estocagem a -20°C, tempo de incubação: 48hs



**Figura 21** – *M. fijiensis* submetido a 6PP com diferentes tempos de estocagem a -20°C, tempo de incubação: 72hs



**Figura 22** – *M. fijiensis* submetido a 6PP com diferentes tempos de estocagem a -20°C, tempo de incubação:96hs



**Figura 23** – *M. fijiensis* submetido a 6PP (100µg) estocada a -20 °C, tempo de incubação: 48, 72, 96 e 120hs

## CONCLUSÃO

- As placas de Petri contendo 20 e 30 µg do 6PP /mL de Agar Batata Dextrose apresentaram um crescimento lento do *M. fijiensis* quando comparado com o controle negativo;
- A atividade do 6PP em Caldo Dextrose Batata contra *M. fijiensis* foi eficaz a partir de 30 µg/mL não apresentando desenvolvimento em concentrações superiores a essa, mesmo após 96 h de incubação;

- A atividade fungicida em Caldo Dextrose Batata foi observada somente em concentrações superiores a 30 µg/mL sendo que, abaixo desta, a ação foi somente fungistática;
- O 6PP permaneceu ativo até 17 dias de estocagem, independente da temperatura utilizada no armazenamento;
- O crescimento do fitopatógeno ocorrido somente após 72hs de estocagem na presença do 6PP, provavelmente foi devido a processos de degradação e/ou pela capacidade do microrganismo de metabolizar a molécula;
- O aumento da concentração do 6PP de 50 µg/mL para 100 µg/mL prolongou o tempo de inibição de *M. fijiensis* em 48 h;
- A ação inibitória do 6PP sobre o *M. fijiensis* foi mais intensa em meios líquidos;

### **PERSPECTIVAS FUTURAS DE APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DO 6PP**

O potencial do 6PP é promissor dado às características antimicrobianas que a mesma possui, além da sua inocuidade (OSER et al., 1984). Estudos demonstram atividade contra outros microrganismos além de *M. fijiensis* (DODD et al., 2000; OTIENO et al., 2003; PAPAVIDAS, 1985). O mecanismo de ação, a interação com vegetais e sua metabolização caso seja absorvida, devem ser estudadas para analisar a interação com o meio ambiente. A análise detalhada da ação de intempéries e outros agentes externos são necessários para gerar dados adicionais que auxiliem no desenvolvimento de um produto estável. A utilização de coadjuvantes tecnológicos como antioxidantes, protetores de UV, detergentes que reduzam o processo de evaporação e saponificantes que aumentem a solubilidade do composto em água

são sugestões para pesquisas futuras com esta molécula, bem como a seleção de isolados mais produtivos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos ao Dr. Enrique Galindo do Instituto de Biotecnologia da Universidad Nacional Autónoma de México que gentilmente cedeu o fungo *T. atroviride*.

### 4.3 Influência do 6 pentil $\alpha$ pirona (6PP) produzido por *Trichoderma atroviride* na germinação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi*, agente causal da ferrugem asiática da soja (*Glycine max* Merrill)

Cláudio Takeo Ueno<sup>1\*</sup> Raúl Jorge Hernan Castro Gómez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR - 86020-430 [ctueno2002@yahoo.com.br](mailto:ctueno2002@yahoo.com.br) Londrina - PR

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Londrina – UEL Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos - 86051-980 [rcastrrog@yahoo.com](mailto:rcastrrog@yahoo.com) Londrina - PR

#### ABSTRACT

*The 6PP is a secondary metabolite produced by Trichoderma atroviride with antimicrobial properties. This characteristic is very important to the development of new fungicides against phytopathogens in fruits, vegetables and grain crops. Phakopsora pachyrhizi is a fungus that attack soybeans causing decrease in crop production and enhance the use of chemical fungicides. Considering these information, analysis of the “in vitro” influence of 6PP produced by T. atroviride on P. pachyrhizi spores germination can support basic information to its further application in soybean fields. P. pachyrhizi spores were incubated at 25 °C/24 h in Petri dishes with PDA at different concentrations of 6PP. The 6PP inhibited the spores germination in concentrations above 10  $\mu\text{g/mL}$ , and reduced the germination velocity at concentration of 5  $\mu\text{g/mL}$ .*

**Keywords:** Biological control. Crop protection. Biotechnology. Biofungicide.

#### RESUMO

*O 6PP é um metabólito secundário produzido por Trichoderma atroviride com propriedades antifúngicas, cuja característica é muito importante para o desenvolvimento de novos fungicidas contra fitopatógenos em frutas, hortaliças e culturas de grãos. O Phakopsora pachyrhizi é um fungo que ataca a soja ocasionando perdas em colheitas e aumento do uso de fungicidas químicos. Considerando esse quadro, a análise da influência “in vitro” do 6PP produzida por T. atroviride na germinação de esporos de P. pachyrhizi pode fornecer informações básicas para futuras aplicações do 6PP no campo. Os esporos de P. pachyrhizi foram incubados a 25 °C/24 h em placas de Petri com ABD com diferentes concentrações do 6PP. Os resultados demonstraram que o 6PP inibe a germinação dos esporos em concentrações acima de 10  $\mu\text{g/mL}$ , e reduz a velocidade de germinação em concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$ .*

**Palavras-chave:** Controle biológico. Proteção de culturas. Biotecnologia. Biofungicida.

## INTRODUÇÃO

O *Phakopsora pachyrhizi* Syd & P. Syd, agente causal da ferrugem asiática da soja (asian soybean rust) ocasiona quedas na produção dessa cultura em muitos continentes. Inicialmente encontrado na Ásia, o fungo disseminou-se para outros países e continentes como África (LEVY, 2005), Tanzânia (BERNDT, 2005), México (RODRÍGUEZ; RIOS, 2006) e em países da América Latina, incluindo o Brasil, maior exportador de soja (DESLANDES, 1979, YORINORI et al. 2005). O fungo *P. pachyrhizi* apresenta ampla gama de hospedeiros (YAMAOKA et al., 2002, YEH et al., 1981), e sua disseminação é rápida por desenvolver-se em amplas faixas de temperaturas (17-27°C) (KOCHMAN, 1979). Atualmente, o controle dessa doença é realizado através de aplicação de fungicidas químicos (SOARES et al., 2004). As conseqüências econômicas com a entrada desse fungo em regiões produtoras de soja são consideráveis, incentivando o desenvolvimento de novos meios de controle alternativos (KUCHLER et al., 1984). A seleção de variedades de soja resistentes (KEOGH et al., 1980; MCLEAN, 1979; SCHOEN et al., 1992), a pesquisa de produtos naturais com atividade antimicrobiana (TRIPATHI; DUBEY, 2004) e microrganismos antagonistas (DATNOFF et al., 1995). O fungo *Trichoderma harzianum* é utilizado na agricultura para controle de fitopatógenos no solo (DODD et al., 2000; OTIENO et al., 2003; PAPAVIDAS, 1985) sendo que algumas espécies de *Trichoderma* sintetizam o 6 pentil  $\alpha$  pirona (6PP), metabólito secundário com propriedades antimicrobianas (CUTLER et al., 1986; POOLE; WHITMORE 1997; DODD et al., 2000). Considerando o impacto que a ferrugem asiática da soja causa à produção de grãos, o objetivo deste trabalho foi analisar a influência “in vitro” do 6PP sobre a germinação de esporos de *P. pachyrhizi*, e obter informações para estudos futuros sob condições controladas e em campo.

## **MATERIAL E MÉTODOS:**

### ***Microorganismos***

*Trichoderma atroviride* (*Trichoderma harzianum* IMI 206040, Carsolio et al., 1994) gentilmente cedido pelo Dr. Enrique Galindo do Instituto de Biotecnologia da Universidad Nacional Autónoma de México.

Esporos de *Phakopsora pachyrhizi* gentilmente cedidos pela EMBRAPA soja de Londrina – PR.

### ***Meios de Cultura***

Os meios de cultura líquidos foram preparados com reagentes analíticos grau p.a., de acordo com Bonnarne et al., (1997) com modificações. A fonte de nitrogênio utilizada foi extrato de levedura (0,01g %) e a fonte de carbono, melão de cana (4,0 °Brix) em pH 4,5 (HCl/NaOH). Os meios de cultura sólidos (Ágar Batata Dextrose - ABD) foram preparados de acordo com as indicações do rótulo do mesmo.

### ***Manutenção de microrganismos***

*T. atroviride* cultivado em placas de Petri com ABD foi mantido em geladeira a 5 °C até o momento de uso. Os esporos de *P. pachyrhizi* foram coletados a partir de culturas infectadas

de soja em estufa sob cuidados da EMBRAPA Soja – Londrina - PR e estocados em freezer à – 20 °C, por período máximo de 48 h, quando foram utilizados para o experimento.

### ***Inoculação de *T. atroviride* para produção do 6PP***

Micélios de *T. atroviride* mantidos a 5 °C foram inoculados no centro de placas de Petri com ABD e incubados a 25°C/72 h. O inóculo foi preparado cortando-se pequenos fragmentos de ágar (0,5 cm<sup>2</sup> aproximadamente) com micélios, inoculados ao meio de cultura líquido citado anteriormente e incubados a 25°C a 120 rpm/72 h em agitador horizontal Tecnal (mod. TE-421).

### ***Extração do 6PP***

A extração do 6PP procedeu-se segundo Scarselletti & Faull (1994). Após 72 h de incubação, a cultura foi filtrada (Whatman nº 5) sob vácuo e ao filtrado foi adicionado acetato de etila (2:1). A solução foi agitada a 120 rpm a 5°C/72 h e em seguida as frações hidrofóbicas e hidrofílicas foram separadas. À fração hidrofóbica adicionou-se Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para eliminar a água remanescente e filtrada novamente (Whatman nº 5). A fração hidrofóbica foi evaporada sob vácuo a 35 °C e o resíduo obtido contendo 6PP foi diluído em etanol p.a (99,5%). O 6PP assim obtida foi armazenada em freezer a – 20 °C e diluída em etanol até o momento de uso, para manter a estabilidade do metabólito. A concentração do 6PP foi determinada com espectrofotômetro UV-visível (Cintra 20) em 302 nm e a absorbância da solução comparada com curva padrão do 6PP (Sigma).

### ***Preparação de esporos do P. pachyrhizi***

Esporos de *P. pachyrhizi* recém coletados, mantidos em freezer e em ambiente seco, foram diluídos em Tween 2% estéril no momento de uso. A quantificação da população foi estimada por contagem em câmara de Neubauer.

### ***Teste “in vitro” da ação do 6PP sobre a germinação de esporos de P. pachyrhizi***

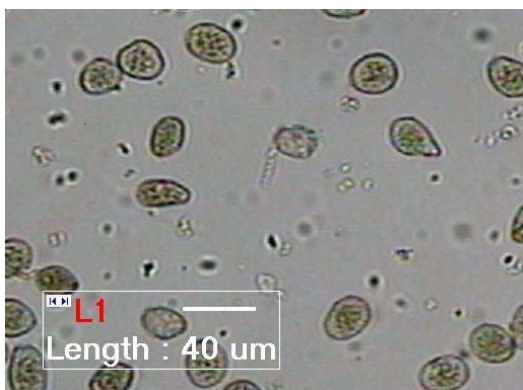
O 6PP diluída em etanol foi adicionada em Placa de Petri em quantidade suficiente para atingir as concentrações finais de 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60µg/mL e mantido à temperatura ambiente sob condições assépticas para evaporação do solvente. Em seguida, foram adicionados 5mL de ágar-ágar (43°C) seguido de homogeneização suave. Após a solidificação do ágar-ágar, aproximadamente  $10^4$  esporos de *P. pachyrhizi* foram inoculados na superfície do ágar-ágar e incubados a 25 °C/24 h (Kochman, 1979). O comportamento dos esporos foi observado através de microscópio óptico (objetiva 40x) em tempos de 0, 2, 4, 6, 18 e 24 h e registrado utilizando um sistema de captura de imagem.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

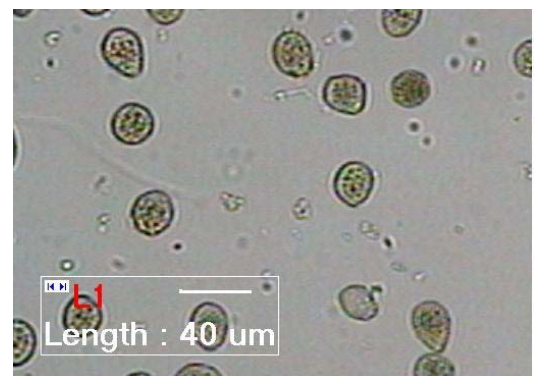
A germinação dos esporos de *P. pachyrhizi* é rápida, sendo possível sua observação a partir de 2 h de incubação no controle negativo em ágar-ágar (Figs. 1, 3, 5, 7, 9 e 11). A germinação

dos esporos também ocorre na presença de 5 µg/mL do 6PP (Figs. 2, 4, 6, 8, 10 e 12), porém a germinação é mais lenta. A inibição da germinação dos esporos foi muito eficiente a partir de 10 µg/mL (Figs. 13 a 21). O fato de inibir o crescimento do broto germinativo sugere uma interferência na estabilidade de membrana das células jovens, ainda desprovidas de parede, ou talvez, na capacidade de absorção de água pelo esporo já que o 6PP é uma molécula hidrofóbica, formando assim uma camada hidrorrepelente (SCARSELLETTI; FAULL, 1994). A ação fungistática do 6PP a longo prazo não foi possível ser observada devido à fragilidade dos esporos de *P. pachyrhizi* que perde rapidamente a viabilidade impedindo experimentos de longa duração. A atividade inibitória do 6PP durante o processo germinativo de esporos é muito interessante, pois compostos que atuam nessa fase são muito úteis como preventivos. Dessa forma, caso o 6PP evite o processo de invasão da folha da soja, essa pode não desenvolver a doença, evitando a aplicação de fungicidas químicos. Estudos complementares de campo são necessários para avaliar melhor o desempenho do 6PP, analisando sua estabilidade, espectro de ação, toxicidade, seletividade de microrganismos, interação com plantas, bem como a influência de fatores climáticos que possam vir a interferir na eficácia do produto.

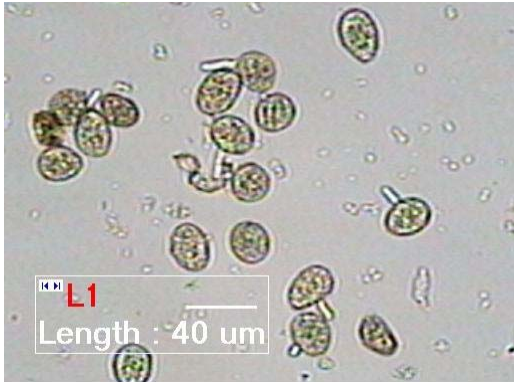
**Seção de Figuras:** Esporos de *P. pachyrhizi* submetidos a diferentes concentrações do 6PP em função do tempo:



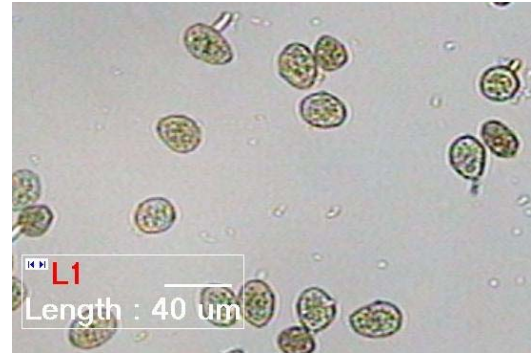
**Figura 1** – *P. pachyrhizi*, Controle negativo (0 h)



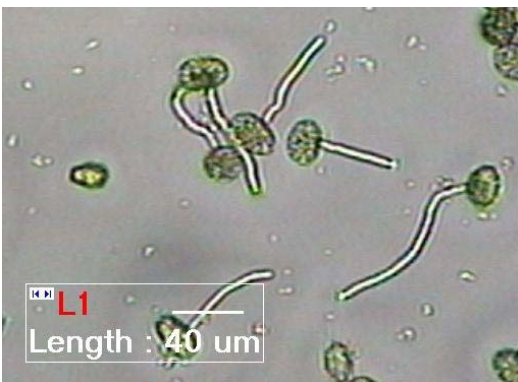
**Figura 2** – *P. pachyrhizi* + 5µg 6PP/mL (0h)



**Figura 3** – *P. pachyrhizi*, Controle negativo (2 h)



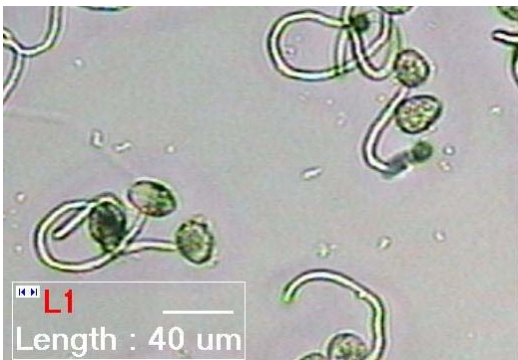
**Figura 4** – *P. pachyrhizi* + 5 $\mu$ g 6PP/mL (2h)



**Figura 5** – *P. pachyrhizi*, Controle negativo (4 h)



**Figura 6** – *P. pachyrhizi* + 5 $\mu$ g 6PP/mL (4h)



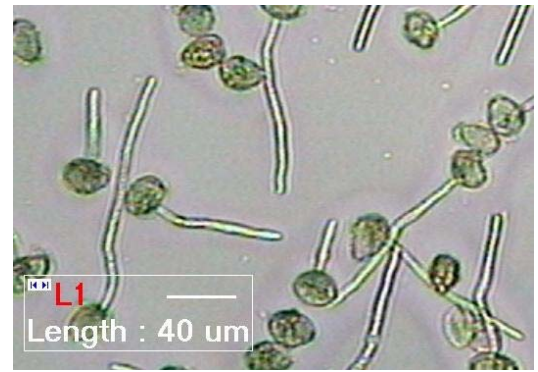
**Figura 7** – *P. pachyrhizi*, Controle negativo (6 h)



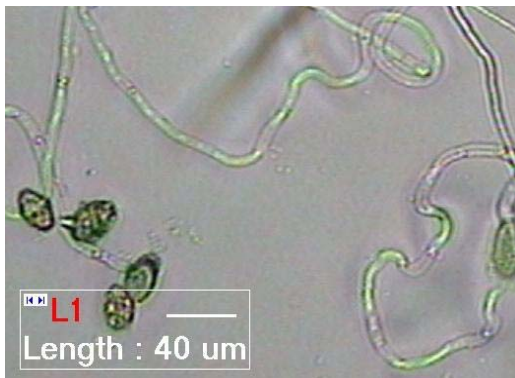
**Figura 8** – *P. pachyrhizi* + 5 $\mu$ g 6PP/mL (6h)



**Figura 9** – *P. pachyrhizi*, Controle negativo (18 h)



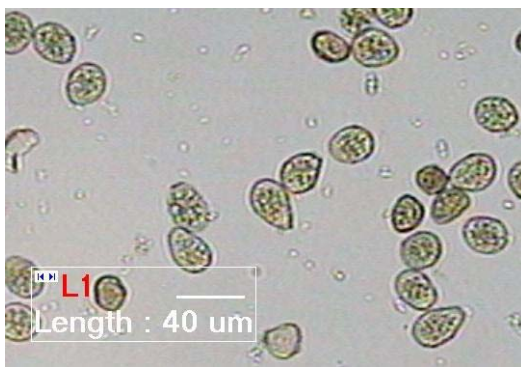
**Figura 10** – *P. pachyrhizi* + 5 $\mu$ g 6PP/mL (18 h)



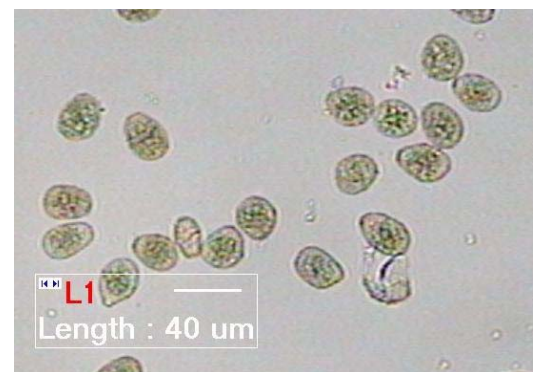
**Figura 11** – *P. pachyrhizi*, Controle negativo (24 h)



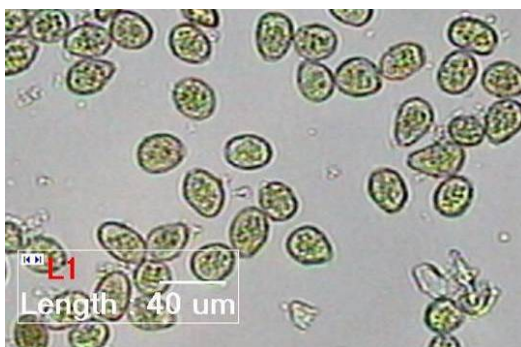
**Figura 12** – *P. pachyrhizi* + 5 $\mu$ g 6PP/mL (24 h)



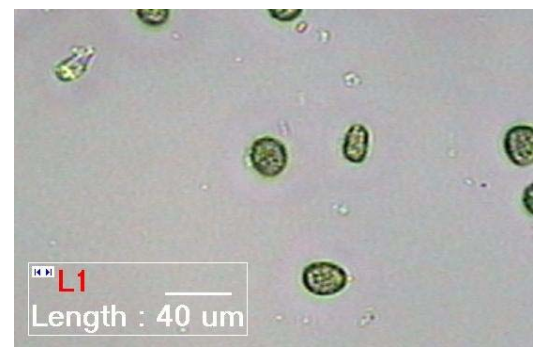
**Figura 13** – *P. pachyrhizi* + 10 $\mu$ g 6PP/mL (2 h)



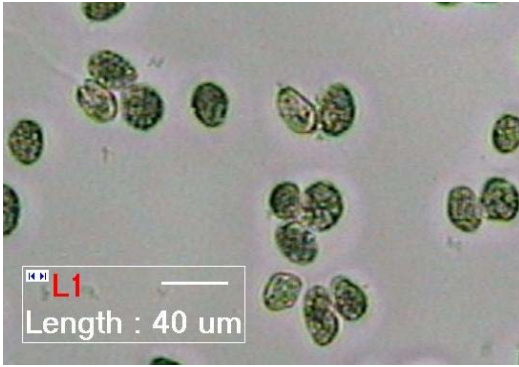
**Figura 14** – *P. pachyrhizi* + 30 $\mu$ g 6PP/mL (2 h)



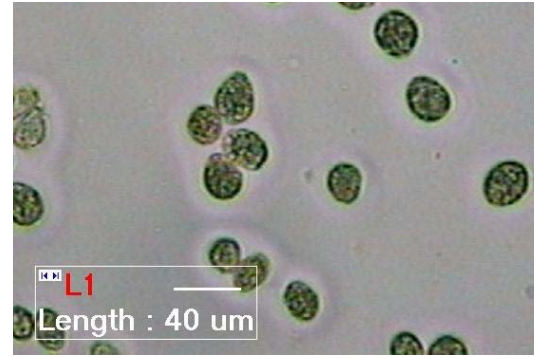
**Figura 15** – *P. pachyrhizi* + 10 $\mu$ g 6PP/mL (6 h)



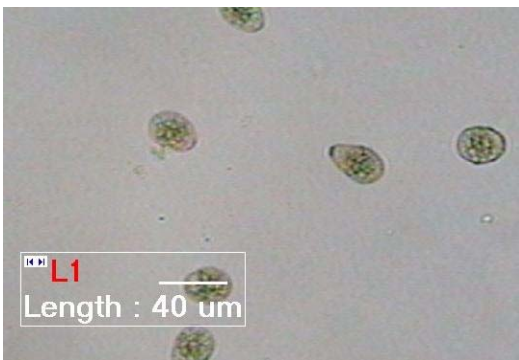
**Figura 16** – *P. pachyrhizi* + 30 $\mu$ g 6PP/mL (6 h)



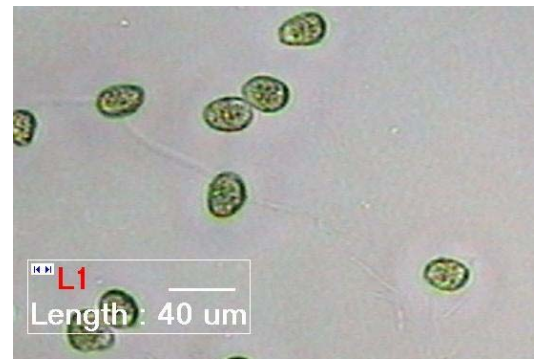
**Figura 17** – *P. pachyrhizi* + 10µg 6PP/mL (24 h)



**Figura 18** – *P. pachyrhizi* + 30µg 6PP/mL (24 h)



**Figura 19** – *P. pachyrhizi* + 60µg 6PP/mL (2h)



**Figura 20** – *P. pachyrhizi* + 60µg 6PP/mL (6 h)



**Figura 21** – *P. pachyrhizi* + 60µg 6PP/mL (24 h)

## CONCLUSÕES

- Os esporos germinaram mais lentamente do que o controle quando a concentração foi de 5  $\mu\text{g}$  do 6PP/mL, sendo possível observar o processo de germinação somente após 2 horas de incubação;
- Na concentração de 10  $\mu\text{g}$  do 6PP/mL a inibição foi de 100% dos esporos observados;
- A Concentração Mínima de Inibição do 6PP sobre o *P. pachyrhizi* esta entre valores superiores a 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos à pesquisadora Dra. Cláudia Vieira Godoy (EMBRAPA Soja - Londrina – PR) por fornecer os esporos do fungo *P. pachyrhizi* e ao Dr. Enrique Galindo do Instituto de Biotecnologia da Universidad Nacional Autónoma de México pelo fornecimento do fungo *T. atroviride*.

## 5 CONCLUSÕES

O controle químico de pragas e doenças em culturas ainda é amplamente utilizado. Os avanços da agricultura orgânica e o aumento da consciência de produzir sem agredir o meio ambiente favorecem o uso de agentes naturais no controle de pragas e doenças. Além do *Trichoderma harzianum*, muitos outros microrganismos apresentam atividade antimicrobiana, como ex. *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus subtilis* entre outros. Extratos de origem vegetal como essências, óleos, possuem características antimicrobianas úteis. A 6 pentil  $\alpha$  pirona produzida pelo *T. atroviride* possui boas propriedades antimicrobianas, baixa toxicidade, facilidade de obtenção através de processos fermentativos simples, o que torna este metabólito de interesse industrial. Embora seja uma molécula relativamente simples, sua estabilidade ainda não está bem estudada e sua síntese química é de alto custo, o que inibe iniciativas para sua exploração comercial. A lista de compostos naturais com propriedades antimicrobianas vem aumentando com o tempo, e o 6PP, juntamente com outros compostos, talvez possa substituir pesticidas químicos. O uso de produtos naturais para o combate de pragas e doenças pode ser uma alternativa viável para muitas culturas, entretanto, é necessária uma evolução tecnológica visando à substituição de produtos sintéticos, desenvolvimento de equipamentos agrícolas para sua aplicação, adaptação dos procedimentos de plantio, consciência de quem produz e de quem consome etc. Assim, a pesquisa na área de antimicrobianos naturais possui grande potencial para as próximas décadas.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, A. A.; PASTORE, G. M.; BERGER, R. G. Production of coconut aroma by fungi cultivation in solid-state fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 98-100, p. 747-751, 2002.
- BERNDT, R. An unusual new *Phakopsora* from Tanzânia. *Mycol. Prog.*, v. 4, n. 4, p. 339-341, 2005.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico In. BERGAMIN et. al. Manual de Fitopatologia V. 1: Princípios e Conceitos cap. 36, 3º ed. 1995.
- BONDE, M. R.; MELCHING, J. S.; BROMFIELD, K. R. Histology of the suscept-pathogen relationship between *Glycine max* and *Phakopsora pachyrhizi*, the cause of soybean rust. *Phytopatol.*, v. 66, n. 1, p. 1290-1294, 1976.
- BONNARME, P.; DJIAN, A.; LATRASSE, A.; FÉRON, G.; GINIÈS, C.; DURAND, A.; LE QUÉRÉ, J.-L. Production of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone by *Trichoderma* sp. from vegetable oils. *J. Biotechnol.*, v. 56, p. 143-150, 1997.
- BOWMAN, L.; GEIGER, E. Optimization of fermentation conditions for alcohol production *Biotechnol. Bioeng.*, v. 26, p.1492-1497, 1984.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Agricultura em Números – Anuário 2005. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em 15 jun. 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Agricultura em números – Estatísticas. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br> . Acesso em 20 jun. 2007a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Agricultura em números – Anuário 2005. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em 20 jun. 2007b.
- BUTA, J., G.; MOLINE, H., E. Methyl jasmonate extends shelf life and reduces microbial contamination of fresh-cut celery and peppers. *J. Agric. Food Chem.*, v. 46, p. 1253-1256, 1998.

- CARSOLIO, C., GUTIERREZ, A., JIMENEZ, B., VAN MONTAGU, M. & HERRERA-ESTRELLA, A. Characterization of *ech-42*, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. In: Mycological Research News, *Mycol. Res.* v. 105, n. 7, p. 769-772, 2001.
- CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C. Study of molasses/vinasse waste ratio for single cell protein and total lipids production by microorganism. *Semina: Ciênc. Ex. Tecnol.*, v. 20, n. 1, p. 03-10, 2006.
- CHEN, H. C. Response-surface methodology for optimizing citric acid fermentation by *Aspergillus foetidus*. *Proc. Biochem.*, v. 29, p. 399-405, 1994.
- CHIN, K. M.; WIRZ, M.; LAIRD, D. Sensivity of *Mycosphaerella fijiensis* from banana to trifloxystrobin. *Plant Disease*, v. 85, n. 12, p. 1264-1270, 2001.
- CHITARRA, M. I. F., CHITARRA, A. B., Pós Colheita de Frutos e Hortaliças: Fisiologia e Manuseio. Lavras: ESAL/FAEPE, p. 84-88, 1990.
- CHRISTEN, P.; RAIMBAULT, M. Optimization of culture media for aroma production by *Ceratocytis fimbriata*. *Biotechnol. Lett.*, v. 13, n. 7, p. 521-526, 1991.
- CLAYDON, N.; ALLAN, M.; HANSON, J. R., AVENT, A. G. Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. *Trans. British Mycol. Soc.*, v. 88, n. 4, p. 503-513, 1987.
- COLLINS, R. P.; HALIM, A. F. Characterization of the major aroma constituent of the fungus *Trichoderma viride* (Pers.). *J. Agric. Food Chem.*, v. 20, n. 2, p. 437-738, 1972.
- COOK & BAKER, The nature and practice of biological control of plant pathogens. In. BERGAMIN et. al., Manual de Fitopatologia v. 1: Princípios e Conceitos, p. 717. 3º ed. 1995.
- COOKSEY, D. A.; MOORE, L. W. Biological control of crown gall with fungal and bacterial antagonists *Phytopatol.* v. 70, n. 6, p. 506-509, 1980.
- COONEY, J. M.; LAUREN, D. R.; JENSEN, D. J.; PERRY-MEYER, L. J. Effect of harvest time, temperature, light, and spore inoculum concentration on 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one production by *Trichoderma* spp. *J. Agric. Food Chem.*, v. 45, p. 2802-2806, 1997.

COONEY, J. M.; LAUREN, D. R.; JENSEN, D. J.; PERRY-MEYER, L. J. Effect of solid substrate, liquid supplement, and harvest time on 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6PAP) production by *Trichoderma* spp. *J. Agric. Food Chem.*, v. 45, p. 531-534, 1997a.

COONEY, J. M.; LAUREN, D. R.; *Trichoderma*/pathogen interactions: measurement of antagonistic chemicals produced at the antagonist/pathogen interface using a tubular bioassay. *Let. App. Microbiol.* v. 27, p. 283-286, 1998.

CRUZ, P. M.; CHRISTEN, P.; FARRÉS, A. Medium optimization by a fractional factorial design for lipase production by *Rhizopus delemar*. *J. Fermentation Bioeng.*, v. 76, n. 2, p. 94-97, 1993.

CURTIN, L. V. Molasses – General considerations. In: Molasses in Animal Nutrition. West Des Moines: National Feed Ingredients Association. p. 1-11, 1983.

CUTLER, H. G.; COX, R. H.; CRUMLEY, F. G., COLE P. D. 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone from *Trichoderma harzianum*: Its plant growth inhibitory and antimicrobial properties. *Agric. Biol. Chem.*, v. 50, n. 11, p. 2943-2945, 1986.

DAHOD, S. Raw materials selection and medium development for industrial fermentation processes. In – *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2ed. ASM Press, Washington, D.C. p. 213-220, 1999.

DATNOFF, L., E.; NEMEC, S.; PERNEZNY, K. Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. *Biol. Control*, v. 5, p. 427-431, 1995.

DESLANDES, J. A. Ferrugem da soja e de outras leguminosas causada por *Phakopsora pachyrhizi* no estado de Minas Gerais. *Fitopatol. Bras.*, v. 4, p. 337-339, 1979.

DODD, S. L.; HILL, R. A., STEWART, A. Control of *Athelia rolfsii* disease on lentil seedlings using 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone. *Soil Biol. Chem.*, v. 32, p. 1033-1034, 2000.

EL-KATATNY, M. H.; GUDELJ, M.; ROBRA, K. H.; ELNAGHY, M. A.; GÜBITZ, G. M. Characterization of a chitinase and an endo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 56, p. 137-43, 2001.

EVIDENTE, A.; CABRAS, A.; MADDAU, L.; SERRA, S.; ANDOLFI, A.; MOTTA, A. Viridepyronone, a New Antifungal 6-Substituted 2H-Pyran-2-One Produced by *Trichoderma viride*. *J. Agric. Food. Chem.*, v. 51, p. 6957-60, 2003.

FARIA, T. J.; FERREIRA, R. S.; YASSUMOTO, L.; SOUZA, P. J. R.; ISHIKAWA, N. K.; BARBOSA, A. M.; Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against phytopathogenic fungi *Brazilian Arch. Biol. Technol.*, v.49, n. 6, 867-871, 2006

FIORAVANÇO, J. C.; PAIVA, M. C. Sigatoka negra da bananeira. *Rev. Bras. Agric.*, v. 11, n. 2, p. 135-141, 2005.

FURTADO, I. Effect of copper fungicides on the occurrence of the pathogenic form of *Colletotricum coffeanum*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, v. 53, p. 325-28, 1969.

GALINDO, E.; FLORES, C.; LARRALDE-CORONA, P.; CORKIDI-BLANCO, G.; ROCHA-VALADEZ, J. A. , SERRANO-CARREÓN, L. Production of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone by *Trichoderma harzianum* cultured in unbaffled and baffled shake flasks. *Biochem. Eng. J.*, v. 18, p. 1-8, 2004.

HARELIMANA, G.; LEPOIVRE, P.; JIJAKLI, H.; MOURICHON, X. Use of *Mycosphaerella fijiensis* toxins for the selection of banana cultivars resistant to black leaf streak. *Euphytica*, v. 96, p. 125-128, 1997.

HARTMAN, G. L.; WANG, T. C.; TSCHANZ, A. T. Soybean rust development and the quantitative relationship between rust severity and soybean yield. *Plant Disease*, v. 75, n. 6, p. 596-600, 1991.

HJELJORD, L. G.; STENSVAND, A.; TRONSMO, A. Effect of temperature and nutrient stress on the capacity of commercial *Trichoderma* products to control *Botrytis cinerea* and *Mucor piriformis* in greenhouse strawberries. *Biol. Control*, v. 19, p. 149-160, 2000.

HORITSU, H, Y.; YAHASHI, Y.; TAKAMIZAWA, K.; KAWAI, K.; SUZUKI, T.; WATANABE, N. Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: optimization of production rate. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 40, p. 1085-1091, 1992.

HUJANEN, M.; LINKO, Y. –Y. Optimization of L(+)-lactic acid production employing statistical experimental design. *Biotechnol. Tech.*, v. 8, p. 325-452, 1994.

KALIL, S. J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I., Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. *Process. Biochem.*, v. 35, p. 539-550, 2000.

KALYANI, A.; PRAPULLA, S. G. AND KARANTH, N. G. Study on the production of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone using two methods of fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 53, p. 610-612, 2000.

KEOGH, R. C.; DEVERALL, B. J.; McLEOD, S. Comparison of histological and physiological responses to *Phakopsora pachyrhizi* in resistant and susceptible soybean. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, v. 74, n. 2, p. 329-333, 1980.

KIKUCHI, T.; MIMURA, T.; HARIYAMA, K.; YANO, H.; ARIMOTO, T.; MASADA, Y.; INOUE T. Volatile Metabolite of Aquatic Fungi. Identification of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone from *Trichoderma* and *Aspergillus* species. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 22, n. 8, p. 1946-48, 1974.

KIMATI, H., Controle Químico. In: BERGAMIN et. al. Manual de Fitopatologia V. 1: Princípios e Conceitos 3º ed. 1995.

KOCHMAN, J. K. The effect of temperature on development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*). *Aust. J. Agric. Res.*, v. 30, p. 273-277, 1979.

KOLOMBET, L. V.; JIGLETSOVA, J. K.; DERBSHEV, V. V.; EZHOV, D. V.; KOSAREVA, N. I.; BYSTROVA, E. V.; Studies of mycofungicid, a preparation based on *Trichoderma viride*, for plant infection control. *Appl. Biochem. Microbiol.*, v. 37, n. 1, p. 110-114, 2001.

KUCHLER, F.; DUFFY, M.; SHRUM, R. D.; DOWLER, W. M. Potential economic consequences of the entry of an exotic fungal pest: The case of soybean rust. *Phytopatol.*, v. 74, n. 8, 916-920, 1984.

LABUDOVA, I.; GOGOROVA, L. Biological control of phytopathogenic fungi through lytic action of *Trichoderma* species. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 52, p. 193-98, 1988.

LEVY, C. Epidemiology and chemical control of soybean rust in southern Africa. *Plant Disease*, v. 89, n. 6, 669-674, 2005.

LINDOW, S. E.; WILSON, M. Biological control of foliar pathogens and pests with bacterial biocontrol agents. In – *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2ed. ASM Press, Washington, D.C. p. 642-650, 1999.

LUCAS, J. A. Biological Control of Plant Disease In: Plant Pathology and Plant Pathogens, cap. 13 3<sup>ed</sup>. Blackwell Publishing, Great Britain, 2002.

MANNINA, L.; SEGRE, L. A.; RITIENI, A.; FOGLIANO, V.; VINALE, F.; RANDAZZO, G.; MADDAU, L.; BOTTALICO, A. A New Fungal Growth Inhibitor from *Trichoderma viride*. *Tetrahedron*, v. 53, n. 9, p. 3135-44, 1997.

McLEAN, R. J. Histological studies of resistance to soybean rust *Phakopsora pachyrhizi* Syd. *Aust. J. Agric. Res.*, v. 30, p. 77-84, 1979.

MERTELY, J. C.; CHANDLER, C. K.; XIAO, C. L.; LEGARD, D. E., Comparison of Sanitation and Fungicides for Management of Botrytis Fruit Rot of Strawberry. *Plant Disease* v. 84, p. 11, p. 1197-202, 2000.

MICHAILIDES, T.; ELMER, P. A. G. Botrytis Gray Mold of Kiwifruit Caused by *Botrytis cinerea* in the United States and New Zeland. *Plant Disease*, v. 84, n. 3, p. 208-23, 2000.

NAVARRO, A. R.; SEPÚLVEDA, M. C.; RUBIO, M. C. Bio-conversion of vinasse from alcoholic fermentation of sugar cane molasses. *Waste Management*, v. 20, p. 81-585, 2000.

OKOLE, B. N.; SCHULZ, E. A. Selection of *Mycosphaerella fijiensis*-resistant cell lines from micro-cross sections of banana and plantain. *Plant Cell Reports*, v. 16, 339-343, 1997.

ORTIZ, R.; VUYLSTEKE, D. Inheritance of black sigatoka disease resistance in plantain-banana (*Musa* spp) hybrids. *Theor. Appl. Genet.*, v. 89, p. 146-152, 1994.

OTIENO, W.; JEGER, M., TERMORSHUIZEN, A. Effect of infesting soil with *Trichoderma harzianum* and amendment with coffee pulp on survival of *Armillaria*. *Biol. Control*, v. 26, 293-301, 2003.

OSER, B. L.; FORD, R. A., BERNARD, B. K. Recent progress in the consideration of flavoring ingredients under the Food Additives Amendment. GRAS substances. *Food Technol.*, v. 13, p. 66-89, 1984.

PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocadium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.*, v. 23, p. 23-54, 1985.

PARKER, S. R.; CUTLER, H. G.; JACYNO, J. M.; HILL, A. R. Biological activity of 6-pentyl-2H-pyran-2-one and its analogs. *J. Agric. Food. Chem.*, v. 45, p. 2774-2776, 1997.

- PARNELL, M.; BURT, P. J. A.; WILSON, K. The influence of exposure to ultraviolet radiation in simulated sunlight on ascospores causing Black Sigatoka disease of banana and plantain. *Int. J. Biometeorol.* v. 42, p. 22-27, 1998.
- POOLE, P. R., WHITMORE, K. J. Effects of topical post harvest applications of 6-pentyl-2-pyrone on properties of stored kiwifruit. *Postharvest Biol. Technol.*, v. 12, p. 229-237, 1997.
- PRAPULLA, S. G.; KARANTH, N. G.; ENGEL, K. H., TRESSL, R. Production of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone by *Trichoderma viride*. *Flavour and Fragrance J.*, v. 7, p. 231-234, 1992.
- PRATELLA, G. C.; MARI, M. Effectiveness of *Trichoderma*, *Gliocadium* and *Paecilomyces* in postharvest fruit protection. *Postharvest Biol. Technol.* v. 3, p. 49-56, 1993.
- RICARD, J. L. Field observations on the biocontrol of Dutch elm disease with *Trichoderma viride* pellets. *Eur. J. For. Path.* v. 13, p. 60-62, 1983.
- RITO-PALOMARES, M.; NEGRETE, A.; GALINDO, E.; SERRANO-CARREON, L. Aroma compounds recovery from mycelial cultures in aqueous two-phase processes. *J. Chromatogr. B.*, v.743, p. 403-08, 2000.
- RITO-PALOMARES, M.; NEGRETE, A.; MIRANDA, L.; FLORES, C.; GALINDO, E.; SERRANO-CARREÓN, L. The potential application of aqueous two-phase systems for in situ recovery of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microbial. Technol.*, v. 28, p. 625-31, 2001.
- RODRÍGUEZ, A. C.; RIOS, J. A.; HERNÁNDEZ, J. R. First report of Asian soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* from Mexico. *Plant Disease.* v. 90, n. 9, p. 1260, 2006.
- ROMERO, R. A.; SUTTON, T. B.; Sensivity of *Mycosphaerella fijiensis* causal agent of Black Sigatoka of banana, to propiconazole. *Phytopatol.*, v. 87, n. 1, p. 96-100, 1997.
- ROTEM, J.; WOODING, B.; AYLOR, D. E. The role of solar radiation, especially ultraviolet, in the mortality of fungal spores. *Phytopatol.* v. 75, n. 5, p. 510-514, 1985.
- SANCHEZ, J. L. G.; PEREZ, J. A. S.; CAMACHO, F. G.; SEVILLA, J.M. F.; GRIMA, E. M. Optimization of light and temperature for growing *Chlorella* sp. using response surface methodology. *Biotechnol. Tech.* v. 10, p. 329-334, 1996.

SARHY-BAGNON, V.; LOZANO, P.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., ROUSSOS, S. Production of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone by *Trichoderma harzianum* in liquid and solid state cultures. *Process Biochem.*, v. 36, p. 103-109, 2000.

SAVAL, S.; PABLOS, L.; SANCHEZ, S. Optimization of a culture medium for streptomycin production using response-surface methodology. *Bioresour. Technol.*, v. 10, p. 19-25, 1993.

SCARSELETTI, R., FAULL, J. L. *In vitro* activity of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone, a metabolite of *Trichoderma harzianum*, in the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium Oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Mycol. Res.*, v. 98, n. 10, p. 1207-1209, 1994.

SERRANO-CARREON, L., HATHOUT, Y., BENSOUSSAN, M., BELIN, J.-M. Production of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone by *Trichoderma harzianum* from 18:n fatty acid methyl esters. *Biotechnol. Lett.*, v. 14, n. 11, p. 1019-1024, 1992.

SERRANO-CARREON, L., HATHOUT, Y., BENSOUSSAN, M. BELIN, J.-M. Metabolism of linoleic acid or mevalonate and 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone biosynthesis by *Trichoderma harzianum* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 59, n. 9, p. 2945-2950, 1993.

SETH, M.; CHAND, S. Biosynthesis of tannase and hydrolysis of tannins to gallic acid by *Aspergillus awamori* – optimization of process parameters. *Process Biochem.*, v. 36, p. 39-44, 2000.

SCHOEN, D. J.; BURDON, J. J.; BROWN, A. H. D. Resistance of *Glycine tomentella* to soybean leaf rust *Phakopsora pachyrhizi* in relation to ploidy level and geographic distribution. *Theor. Appl. Genet.*, v. 83, p. 827-832, 1992.

SMITH, M. C.; RUTTER, J.; BURT, P. J. A.; RAMIREZ, F.; RAMIREZ, F.; GONZALEZ O, E. H. Black Sigatoka disease of banana: spatial and temporal variability in disease development. *Ann. Appl. Biol.*, v. 131, p. 63-67, 1997.

SOARES, R. M.; RUBIN, S. A. L.; WIELESICKI, A. P.; OZELAME, J. G. Fungicidas no controle da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) e produtividade da soja. *Ciência Rural*, v. 34, n. 4, p. 1245-1247, 2004.

STROBEL, R. J.; SULLIVAN, G. R. Experimental design for improvement of fermentations. In – *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2ed. ASM Press, Washington, D.C. p. 80-93, 1999.

TRIPATHI, P., DUBEY, N. K. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.*, v. 32, p. 235-245, 2004.

YAMAOKA, Y.; FUJIWARA, Y.; KAKISHIMA, M.; KATSUYA, K.; YAMADA, K.; HAGIWARA, H. Pathogenic races of *Phakopsora pachyrhizi* on soybean and wild host plants collected in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.*, v. 68, p. 52-56, 2002.

YEH, C. C.; TSCHANZ, A. T.; SINCLAIR, J. B. Induced teliospore formation by *Phakopsora pachyrhizi* on soybeans and other hosts. *Phytopatol.*, v. 71, n. 10, p. 1111-1112, 1981.

YONG, F. M.; WONG, H. A., LIM, G. Effect of nitrogen source on aroma production by *Trichoderma viride*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 22, p. 146-147, 1985.

YORINORI, J. T.; FREDERICK, R. D.; COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLLI, P. F.; HARTMAN, G. E.; GODOY, C. V.; NUNES JR., J. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. *Phytopatol.*, v. 89, n. 6, p. 675-677, 2005.

WAINWRIGHT, M. An introduction to fungal biotechnology. In: *Fungi in Agricultural Biotechnology*, cap. 9. p. 153-179, 1992.

WANG, C., Y.; BUTA, J., G.; Maintaining quality of fresh-cut kiwifruit with volatile compounds. *Postharvest Biol. Technol.*, v. 28, p. 181-186, 2003.

WANG, C., Y.; BUTA, J., G.; Methyl jasmonate reduces chilling injury in *Cucurbita pepo* through its regulation of abscisic acid and polyamine levels. *Environ. Exp. Bot.*, v. 34, p. 427-432. 1994.

WASHINGTON, J. R.; CRUZ, J.; LOPEZ, J.; FAJARDO, M. Infection studies of *Mycosphaerella fijiensis* on banana and the control of Black Sigatoka with chlorothalonil. *Plant Disease*, v. 82, n. 11, p. 1185-1190, 1998.

WILLIAMS, R. J. & AYANABA, A. Increased incidence of *Pythium* stem rot in cowpeas treated with benomyl and related fungicides. *Phytopatol.*, v. 65, p. 217-18, 1975.