

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Juliana de Oliveira Bastos

**OBTENÇÃO DE BIOHERBICIDA A PARTIR DE FUNGO ISOLADO DO
BIOMA MATA ATLÂNTICA**

Santa Maria, RS

2016

Juliana de Oliveira Bastos

**OBTENÇÃO DE BIOHERBICIDA A PARTIR DE FUNGO ISOLADO DO BIOMA
MATA ATLÂNTICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM – RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Química.**

Orientadora: Prof^ª. Dra Lisiane de Marsillac Terra

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª Raquel Cristine Kuhn

Santa Maria, RS, Brasil

2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da
Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

de Oliveira Bastos, Juliana
OBTENÇÃO DE BIOHERBICIDA A PARTIR DE FUNGO ISOLADO DO
BIOMA MATA ATLÂNTICA / Juliana de Oliveira Bastos.- 2016.
87 p.; 30 cm

Orientadora: Lisiane de Marsillac Terra
Co-orientadora: Raquel Cristine Kuhn
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Química, RS, 2016

1. bioherbicida 2. *Fusarium graminearum* 3.
fermentação submersa 4. fitotoxinas I. de Marsillac
Terra, Lisiane II. Kuhn, Raquel Cristine III. Título.

Juliana de Oliveira Bastos

**OBTENÇÃO DE BIOHERBICIDA A PARTIR DE FUNGO ISOLADO DO BIOMA
MATA ATLÂNTICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM – RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Química**.

Aprovada em: 22 de Agosto de 2016:

Lisiane de Marsillac Terra, Dr^a.

(Presidente/Orientadora)

Raquel Cristine Kuhn, Dr^a.

(Co-orientadora)

Ana Paula Manera, Dr^a. (UNIPAMPA)

Marcio Antonio Mazutti, Dr. (UFSM)

**Santa Maria, RS,
2016**

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Jorge e Regina pelo carinho, confiança e por estarem presentes em todas as etapas da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter estado sempre ao meu lado, me iluminando e mostrando o melhor caminho a ser seguido nesta difícil e longa jornada.

À minha querida orientadora Lisiane de Marsillac Terra, pelo apoio, confiança e paciência, por ter acreditado em mim e por todos os momentos que se dedicou para que este trabalho pudesse ser finalizado.

À professora Raquel C. Kuhn, pela atenção, dedicação, amizade e por todas as valiosas sugestões apresentadas na co-orientação deste trabalho.

Aos meus pais Jorge e Regina pela educação que me foi dada, pelo amor incondicional, pelo incentivo e dedicação em todos os momentos e os sacrifícios feitos para que eu pudesse chegar à conclusão de mais uma etapa.

À minha irmã Bruna e meu cunhado Gabriel pela ajuda.

Ao meu namorado Fernando, pela compreensão, parceria, ajuda e carinho nestes últimos meses.

Aos meus colegas e amigos do laboratório, pelos mates, pelas brincadeiras e infinitas risadas (vou sentir falta)!!

Aos bolsistas de iniciação científica, Daniel, Luiza e Eliana pelos momentos que compartilhamos e pela troca de conhecimentos.

À Nai, minha amigona de todas as horas, pela amizade e companhia principalmente nesse finalzinho me ajudando e apoiando!

E a todos que, de alguma maneira ou de outra, contribuíram e me acompanharam na realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!

“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade.”

Albert Einstein

RESUMO

OBTENÇÃO DE BIOHERBICIDA A PARTIR DE FUNGO ISOLADO DO BIOMA MATA ATLÂNTICA

AUTORA: Juliana de Oliveira Bastos

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Lisiane de Marsillac Terra

CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Raquel Cristine Kuhn

A busca pela diminuição de perdas na produção agrícola torna necessária a utilização de agroquímicos no combate de pragas e plantas daninhas. O uso de produtos derivados da indústria química no controle de doenças na agricultura tem sido questionado em função de seus efeitos adversos. Em virtude disso, muitos produtos agrícolas sintéticos foram retirados do mercado, o que cria a necessidade de desenvolver meios alternativos para manejo das plantas daninhas. Para isso, existe um interesse na descoberta e desenvolvimento de novos bioherbicidas, a partir de micro-organismos, principalmente fungos, sendo uma ferramenta importante no controle biológico. Portanto, o objetivo deste trabalho foi produzir um bioherbicida por fermentação submersa a partir do fungo *Fusarium graminearum* isolado do Bioma Mata Atlântica e avaliar o seu potencial fitotóxico. Inicialmente um planejamento do tipo Plackett Burman foi aplicado, onde as variáveis avaliadas na produção de biomassa foram pH (5-7), glicose (5-15 g.L⁻¹), peptona (5-15 g.L⁻¹) e extrato de levedura (5-10 g.L⁻¹). Somente a peptona apresentou efeito positivo significativo na produção de biomassa, portanto, novos ensaios com diferentes concentrações de peptona (10-80 g.L⁻¹) foram conduzidos, sendo avaliados a produção de biomassa e aplicação em pós-emergência em plantas teste *Cucumis sativus* . var. wisconsin (pepino) após 21 dias. Na primeira avaliação em pós-emergência, para o parâmetro de fitotoxicidade o melhor resultado ocorreu na concentração de 40 g.L⁻¹ de peptona. Nesta condição, dois tratamentos, liofilização parcial e separação por membranas, foram aplicados para concentração do caldo. Na avaliação da ação fitopatogênica após aplicação do sobrenadante tratado observou-se redução de 100% do comprimento das raízes, redução no crescimento da parte aérea e visualmente maior fitotoxicidade, no tratamento utilizando a fração permeada do processo de separação por membranas. Entre os compostos identificados através de cromatografia gasosa, destaca-se a presença de heterocíclicos nitrogenados, entre eles: pirimidinas, piperazinas, pirrolidinas, piperidinas, aziridinas, quinolinas e tetrazóis, porém outros estudos são necessários para definir qual(is) a(s) toxina(s) estão causando o efeito fitotóxico.

Palavras-Chave: bioherbicida, *Fusarium graminearum*, fermentação submersa, fitotoxinas

ABSTRACT

OBTAINMENT OF BIOHERBICIDE FROM ISOLATED FUNGI OF ATLANTIC FOREST BIOME

AUTHOR: Juliana de Oliveira Bastos

ADVISOR: Prof^a. Dr^a. Lisiane de Marsillac Terra

CO-ADVISOR: Prof^a. Dr^a. Raquel Cristine Kuhn

The search for decreases in losses of agricultural production makes it necessary to use pesticides to combat pests and weeds. The use of products derived from the chemical industry on disease control in agriculture has been questioned because of its adverse effects. As a result, many synthetic agricultural products were removed from markets, which creates the need for development of alternative means of weed management. There is an interest in the discovery and development of new bioherbicides from micro-organisms, especially fungi, and it's an important tool in biological control. Therefore, the aim of this work was to produce a bioherbicide from submerged fermentation of the fungus *Fusarium graminearum* isolated from the Atlantic Forest biome and evaluate its phytotoxic potential. Initially a experimental design Plackett Burman type was applied, and the variables measured in biomass yield were pH (5-7), glucose (5-15 g.L⁻¹), peptone (5-15 g.L⁻¹) and yeast extract (5-10 g.L⁻¹). Only peptone had a significant positive effect on biomass yield, so new tests with different concentrations of peptone (10-80 g.L⁻¹) were conducted. and post-emergence test was applied with *Cucumis sativus* . var. wisconsin plants (cucumber) after 21 days. At the first post-emergence evaluation for the phytotoxicity parameter the best results occurred at a concentration of 40 g.L⁻¹ peptone. In this condition, two treatments, partial lyophilization and membrane separation were used for concentration of the broth. In the evaluation of phytopathogen action after application of the treated supernatant was observed reduction of 100% of the length of the roots, reduced shoot growth and visually greater phytotoxicity in treatment using the permeated fraction of the membrane separation process. Among the compounds identified through gas chromatography, there was the presence of nitrogenous heterocyclic, including: pyrimidines, piperazines, pyrrolidines, piperidines, aziridines, quinolines and tetrazoles, but other studies are needed to define which one (s) toxin (s) are causing the phytotoxic effect.

Keywords: bioherbicide, *Fusarium graminearum*, submerged fermentation, phytotoxins

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Planta <i>Solanum paniculatum</i> (jurubeba).....	30
Figura 2 - Processo de separação por membranas – Microfiltração.....	36
Figura 3 - Casa de vegetação.....	37
Figura 4 - Extração líquido-líquido com solventes orgânicos (A), Tubo de ensaio com frações separadas (B).	38
Figura 5 - Placa de meio BDA com micro-organismo <i>Fusarium graminearum</i>	39
Figura 6 – Efeitos estimados das variáveis na produção de biomassa fúngica em meio sintético.....	41
Figura 7 - Sintomas de fitotoxicidade dos metabólitos do fungo <i>Fusarium graminearum</i> aplicados na concentração de 10 g.L ⁻¹ de peptona em plantas de <i>C. sativus</i> aos 21 dias após a aplicação.....	44
Figura 8 - Sintomas de fitotoxicidade dos metabólitos do fungo <i>Fusarium graminearum</i> aplicados na concentração de 20 g.L ⁻¹ de peptona em plantas de <i>C. sativus</i> aos 21 dias após a aplicação.....	45
Figura 9 - Sintomas de fitotoxicidade dos metabólitos do fungo <i>Fusarium graminearum</i> aplicados na concentração de 40 g.L ⁻¹ de peptona em plantas de <i>C. sativus</i> aos 21 dias após a aplicação.....	46
Figura 10 - Sintomas de fitotoxicidade dos metabólitos do fungo <i>Fusarium graminearum</i> aplicados na concentração de 60 g.L ⁻¹ de peptona em plantas de <i>C. sativus</i> aos 21 dias após a aplicação.....	47
Figura 11 - Sintomas de fitotoxicidade dos metabólitos do fungo <i>Fusarium graminearum</i> aplicados na concentração de 80 g.L ⁻¹ de peptona em plantas de <i>C. sativus</i> aos 21 dias após a aplicação.....	48
Figura 12 - Média de comprimento das raízes utilizando como tratamento a concentração de peptona de 10 g.L ⁻¹ para as 15 repetições (média do controle).	50
Figura 13 - Média de comprimento das raízes utilizando como tratamento a concentração de peptona de 20 g.L ⁻¹ para as 15 repetições (média do controle).....	51
Figura 14 - Média de comprimento das raízes utilizando como tratamento a concentração de peptona de 40 g.L ⁻¹ para as 15 repetições (média do controle).....	51
Figura 15 - Média de comprimento das raízes utilizando como tratamento a concentração de peptona de 60 g.L ⁻¹ para as 15 repetições (média do controle).....	52
Figura 16 - Média de comprimento das raízes utilizando como tratamento a concentração de peptona de 80 g.L ⁻¹ para as 15 repetições(média do controle).....	52
Figura 17 - Sintomas de fitotoxicidade do caldo bruto em plantas de <i>C. sativus</i> . (A) - 7 DAA, (B) - 14 DAA, (C) - 21 DAA.....	56
Figura 18 - Sintomas de fitotoxicidade do caldo liofilizado em plantas de <i>C. sativus</i> . (A) - 7 DAA, (B) - 14 DAA, (C) - 21 DAA.	57
Figura 19 - Sintomas de fitotoxicidade do caldo permeado em plantas de <i>C. sativus</i> . (A) - 7 DAA, (B) - 14 DAA, (C) - 21 DAA.	59
Figura 20 - Sintomas de fitotoxicidade do caldo retido em plantas de <i>C. sativus</i> . (A) - 7 DAA, (B) - 14 DAA, (C) - 21 DAA.....	60
Figura 21 - Comparação dos controles (A) 7 e (B) 28 dias após a aplicação.....	61
Figura 22 - Tratamentos e controle aos 28 dias após a aplicação, (A) caldo bruto, (B) caldo liofilizado, (C) caldo permeado e (D) caldo retido.....	61
Figura 23 - Média de comprimento das raízes utilizando como tratamento o caldo bruto (média do controle).	62

Figura 24 - Média de comprimento das raízes utilizando como tratamento o caldo liofilizado parcialmente (média do controle).....	63
Figura 25 - Média de comprimento das raízes utilizando como tratamento o caldo microfiltrado da fração permeada (média do controle).....	63
Figura 26 - Média de comprimento das raízes utilizando como tratamento o caldo microfiltrado da fração retida (média do controle).	64
Figura 27 - Exemplos de alguns grupos de compostos heterocíclicos nitrogenados.	67
Figura 28 - Estrutura química do herbicida Bromacil.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Planejamento experimental Plackett Burman, variáveis reais e codificadas (entre parênteses).	32
Tabela 2 - Avaliação da fitotoxicidade das plantas.	33
Tabela 3 - Biomassa fúngica obtida no planejamento experimental Plackett Burman após sete dias de fermentação.	40
Tabela 4 - Variação de concentração de peptona e biomassa fúngica.....	41
Tabela 5 - Média da altura da parte aérea (cm) e fitotoxicidade em plântulas de pepino (<i>Cucumis sativus</i>) para diferentes concentrações de peptona.....	43
Tabela 6 - Médias de comprimento de raízes de plântulas de pepino (<i>Cucumis sativus</i>), submetidas a diferentes concentrações de peptona.....	53
Tabela 7 - Médias das massas fresca e seca na parte aérea e raiz sobre plântulas de pepino (<i>Cucumis sativus</i>) 21 dias após a aplicação.....	54
Tabela 8 - Média da altura da parte aérea (cm) de plântulas de pepino (<i>Cucumis sativus</i>).....	55
Tabela 9 - Avaliação da fitotoxicidade em plantas de plântulas de pepino (<i>Cucumis sativus</i>).	55
Tabela 10 - Médias de comprimento de raízes de plântulas de pepino (<i>Cucumis sativus</i>), submetidas a diferentes tratamentos.	65
Tabela 11 - Médias dos efeitos dos tratamentos na parte aérea e raiz sobre plântulas de pepino (<i>Cucumis sativus</i>).....	66
Tabela 12 - Caracterização química dos compostos presentes na fração etanólica do caldo bruto e permeado resultante da extração líquido-líquido do sobrenadante produzido pelo fungo <i>Fusarium graminearum</i>	69
Tabela 13 - Caracterização química dos compostos presentes na fração de acetato de etila do caldo bruto e permeado resultante da extração líquido-líquido do sobrenadante produzido pelo fungo <i>Fusarium graminearum</i>	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-ADON	3-acetildesoxinivalenol
BDA	Batata dextrose ágar
<i>C. cibarius</i>	<i>Cantharellus cibarius</i>
<i>C. sativus</i>	<i>Cucumis sativus</i>
CG	Cromatografia gasosa
DAA	Dias após aplicação
DON	Desoxinivalenol
<i>E. densa</i>	<i>Egeria densa</i>
<i>E. najas</i>	<i>Egeria najas</i>
<i>F. cerealis</i>	<i>Fusarium cerealis</i>
<i>F. culmorum</i>	<i>Fusarium culmorum</i>
<i>F. equiseti</i>	<i>Fusarium equiseti</i>
<i>F. graminearum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>
<i>F. incarnatum</i>	<i>Fusarium incarnatum</i>
<i>F. moniliforme</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
<i>F. nivale</i>	<i>Fusarium nivale</i>
<i>F. oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>F. proliferatum</i>	<i>Fusarium proliferatum</i>
<i>F. semitectum</i>	<i>Fusarium semitectum</i>
<i>F. solani</i>	<i>Fusarium solani</i>
<i>F. verticillioides</i>	<i>Fusarium verticillioides</i>
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
MF	Microfiltração
MS	Espectrometria de massas
NIV	Nivalenol
rpm	Rotações por minuto
<i>S. alpanse</i>	<i>Sorghum alpanse</i>
<i>S. bicolor</i>	<i>Sorghum bicolor</i>
<i>S. hermonthica</i>	<i>Striga hermonthica</i>
<i>S. minor</i>	<i>Sclerotinia minor</i>
Trp	Triptofano
UEs	Unidades experimentais
ZEA	Zearalenona

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	BIOMA MATA ATLÂNTICA.....	18
3.2	PLANTAS DANINHAS	19
3.3	CONTROLE BIOLÓGICO DE PLANTAS DANINHAS	20
3.4	BIOHERBICIDAS	21
3.4.1	Fermentação submersa para produção de bioherbicidas	23
3.4.2	Micro-organismos do gênero <i>Fusarium</i> produtores de fitotoxinas	24
3.5	CONCENTRAÇÃO DO COMPOSTO FITOPATÓGENO.....	28
3.5.1	Extração líquido-líquido	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO.....	30
4.1.1	Micro-organismo	30
4.1.2	Identificação molecular do micro-organismo	30
4.2	MEIO DE CULTURA E OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO	31
4.2.1	Análises estatísticas	32
4.3	TESTES EM CASA DE VEGETAÇÃO	33
4.3.1	Primeira avaliação	34
4.3.1.1	<i>Bioensaio em pós-emergência</i>	34
4.3.2	Segunda avaliação	35
4.3.2.1	<i>Tratamentos</i>	35
4.3.2.2	<i>Bioensaio em pós-emergência</i>	36
4.4	EXTRAÇÃO COM SOLVENTES	37
4.5	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS.....	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO.....	39
5.2	CULTIVO DO MICRO-ORGANISMO.....	39
5.3	AVALIAÇÃO DO EFEITO FITOTÓXICO EM CASA DE VEGETAÇÃO	42
5.3.1	Avaliação da fitotoxicidade e da altura das plantas	42
5.3.2	Avaliação do comprimento das raízes	49
5.3.3	Avaliação das massas fresca e seca da parte aérea e da raiz	53
5.4	AVALIAÇÃO DO EFEITO FITOTÓXICO EM CASA DE VEGETAÇÃO PARA DIFERENTES TRATAMENTOS DO CALDO FERMENTADO.....	54
5.4.1	Avaliação da altura das plantas	54
5.4.2	Avaliação da fitotoxicidade	55
5.4.3	Avaliação do comprimento das raízes	62
5.4.4	Avaliação das massas fresca e seca da parte aérea e da raiz	66
5.5	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS.....	66
6	CONCLUSÃO	73
	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	74
	REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

A agricultura vem enfrentando desafios para garantir a produção de culturas de qualidade, preservando a saúde humana e ambiental (BRUSSAARD et al., 2010). A produção de alimentos em quantidades suficientes para atender as demandas da população é altamente dependente do desenvolvimento de métodos e/ou produtos para o controle de pragas, responsáveis por grande parte das perdas que ocorrem na agricultura (JAMAL et al., 2008). A busca pela diminuição de perdas na produção agrícola torna necessária a utilização de agroquímicos no combate de pragas e plantas daninhas. Estas plantas competem com a cultura pelos nutrientes do solo, por água, luz, calor, oxigênio e gás carbônico e são responsáveis por cerca de 20-30% do custo anual de produção (SILVA et al., 2007).

O uso de produtos derivados da indústria química no controle de doenças na agricultura tem sido questionado, em decorrência dos efeitos adversos causados por estes (JAMAL et al., 2008). O controle químico representa em torno de 80% dos métodos de tratamento, mas devido a questões ecológicas e de sustentabilidade, existem grandes preocupações em relação aos seus efeitos (CLARKE et al., 2008). A utilização de agroquímicos para o controle de plantas daninhas pode causar o desenvolvimento de resistência dessas pragas e plantas invasoras a certos princípios ativos dos agroquímicos; o surgimento de doenças ocorridas devido ao seu uso; o desequilíbrio biológico, a eliminação de organismos benéficos e a redução da biodiversidade. O principal fator responsável por esses problemas está ligado ao fato desses produtos serem, muitas vezes, aplicados em doses excessivas ou de forma inadequada (BETTIOL e MORANDI, 2009). Em virtude disso, muitos produtos agrícolas sintéticos foram retirados do mercado, o que cria a necessidade de desenvolver meios alternativos ecológicos, econômicos e eficazes para manejo de plantas daninhas. Para isso, existe um interesse na descoberta e desenvolvimento de novos bioherbicidas (CANTRELL et al., 2012; DAYAN et al., 2012; DEMAIN e FANG 2000).

Considerando os grandes prejuízos causados pelas plantas daninhas à agricultura e os problemas relacionados ao controle destas plantas em decorrência do aumento do número de biotipos resistentes, o desenvolvimento de novos herbicidas capazes de agir por diferentes mecanismos de ação torna-se de grande interesse. Portanto, os micro-organismos, principalmente os fungos, se tornam uma ferramenta importante junto à área de proteção de plantas e ao controle biológico (BETTIOL e MORANDI, 2009). O gênero *Fusarium* é um dos mais promissores, pois produz uma vasta variedade de produtos voláteis e metabólitos bioativos como toxinas, ácidos graxos e hidrocarbonetos com propriedades antifúngicas,

antibacterianas, antivirais e fitotóxicas, estas com capacidade de causar murcha, necrose, inibição de crescimento e inibição da germinação de sementes de algumas plantas (RASEKHI et al., 2014; CIOTOLA et al., 1996; MÜLLER-STÖVER et al., 2002).

Neste contexto, a utilização de compostos naturais ativos, também conhecidos como bioherbicidas, pode ser uma alternativa interessante para a proteção da produção agrícola (DEWHURST, 2001; DAYAN et al., 2011; CANTRELL et al., 2012; SEIBER et al., 2014). Muitos produtos naturais biologicamente ativos são parcialmente solúveis na água e, como consequência do processo de seleção natural, podem apresentar bioatividade em concentrações muito baixas. Além disso, o mecanismo de ação desses metabólitos sobre plantas daninhas é, muitas vezes, diferente daquele dos herbicidas sintéticos. Alguns estudos demonstram que os sítios moleculares de ação dos herbicidas naturais diferem significativamente dos sítios moleculares de ação dos herbicidas sintéticos conhecidos, assim como evidenciaram a eficácia de bioherbicidas para o controle de pragas em diferentes culturas (DUKE et al., 2000, DUKE et al., 2005; COPPING e MENN, 2000). Devido à diversidade de modos de ação dos bioherbicidas, os riscos para o surgimento de resistência são considerados baixos (COPPING e MENN, 2000; DAYAN e DUKE, 2014). Conseqüentemente, o mercado bioherbicida foi ganhando maior aprovação e interesse para o controle de pragas (COPPING e MENN, 2000; CANTRELL et al., 2012; SEIBER et al., 2014).

Diante disso, é de grande importância a realização do controle biológico fazendo uso de métodos alternativos que mantenham a mesma eficácia dada pelos agroquímicos, mas que possam manter uma maior qualidade dos produtos finais bem como a saúde dos trabalhadores envolvidos neste processo, destacando-se os fungos, na produção de metabólitos secundários que podem ser aplicados como bioherbicidas na agricultura.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir um bioherbicida por fermentação submersa a partir do fungo *Fusarium graminearum* isolado do Bioma Mata Atlântica e avaliar o seu potencial fitotóxico em planta teste.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar o fungo previamente isolado na Mata Atlântica;
- Otimizar as condições de fermentação, avaliando parâmetros do processo e composição do meio na produção de um bioherbicida por fermentação submersa em escala de bancada (agitador orbital);
- Avaliar o efeito fitotóxico da aplicação em casa de vegetação do sobrenadante obtido na fermentação após diferentes tratamentos (liofilizado parcialmente e separação por membranas: fração permeada e retida);
- Realizar a extração com solventes dos metabólitos secundários produzidos na fermentação e caracterizar através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas – CG-MS.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOMA MATA ATLÂNTICA

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2004), Bioma (bio: vida; oma: proliferação) é um conjunto de vida (vegetal e animal) constituído pelo grupamento de tipos de vegetação contíguos e identificáveis em escala regional, com condições geoclimáticas similares e história compartilhada de mudanças, o que resulta em uma diversidade biológica própria. O Estado do Rio Grande do Sul está subdividido em Mata Atlântica e Pampa. Estes biomas caracterizam as florestas rio-grandenses e a fauna do estado devido às suas condições climáticas e topográficas que apresenta (IBF, 2015).

De acordo com levantamento realizado pelo Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), entre os anos de 2013 e 2014, o Estado apresentava uma área de 26.880.228 hectares de mata. A Lei Federal 11428/2006 (Lei da Mata Atlântica) tem como área pertencente a este bioma o equivalente a 13.836.988 hectares, o que corresponde a 51% do território rio-grandense. Porém, a realidade deste bioma no Estado é outra, no ano de 2014, constatou-se que restavam apenas 1.090.991 hectares desta formação florestal, correspondendo a 7,9% da área de todo o território do Rio Grande do Sul. Este dado reflete uma taxa de desmatamento no Bioma equivalente a 40 hectares de área das florestas que compõem o Bioma Mata Atlântica (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2015).

A biodiversidade desse bioma, considerado um dos mais importantes "hotspots" tropicais globais (LAURANCE, 2009), é constituída por muitas espécies endêmicas dentre vegetais, invertebrados e vertebrados, grandemente ameaçadas pela destruição e conversão de seus habitats nativos decorrentes das atividades humanas (RIBEIRO et al., 2009). A maioria das áreas de proteção da Mata Atlântica está acima de 1.200 m altitude, porém regiões de altitude intermediária, entre 400 m e 1200 m, representam 74% da área de distribuição desse bioma e, apesar do menor número de espécies endêmicas, são consideradas regiões de transição, abrigando grande "turnover" de espécies graças a sua heterogeneidade ambiental (TABARELLI et al., 2010).

Atualmente, com o crescimento das rotas microbianas desenvolvidas, muitas espécies de micro-organismos são utilizadas em processos industriais permitindo a produção de metabólitos com características químicas específicas, em altas concentrações e causando poucos impactos ambientais. Portanto, tecnologias clássicas e avançadas de bioprospecção têm sido criadas e aplicadas para aumentar o conhecimento da diversidade microbiológica do

funcionamento dos ecossistemas microbianos, como também para a descoberta e uso de novos produtos (EMBRAPA, 2015).

3.2 PLANTAS DANINHAS

O termo plantas daninhas se enquadra como toda e qualquer planta que ocorre onde não é desejada (LORENZI, 1991). Acredita-se que as plantas daninhas originaram-se, inicialmente, com distúrbios naturais tais como glaciações, desmoronamentos de montanhas e a ação de rios e mares (MUZIK, 1970). Segundo Tessmann (2011), as plantas daninhas surgiram quando o homem iniciou suas atividades agrícolas, separando as benéficas (plantas cultivadas) das malélicas (plantas daninhas), de maneira que, as plantas daninhas encontram-se onde está o homem, porque é ele que cria o ambiente favorável a elas. O homem é, provavelmente, o responsável pela evolução das plantas daninhas, bem como das plantas cultivadas.

Em comunidades estabelecidas, as plantas daninhas possuem baixa capacidade em competir por recursos (nutrientes, água, luz e espaço), sendo encontradas, principalmente, em áreas onde a vegetação natural foi retirada. Essas espécies desenvolveram, ao longo do tempo, características que proporcionam a sobrevivência em ambientes sujeitos aos mais variados tipos e intensidades de limitações ao crescimento e ao desenvolvimento das plantas (TESSMANN, 2011).

As plantas daninhas constituem-se em um problema sério para a agricultura, pois desenvolvem-se em condições semelhantes às das plantas cultivadas. Se as condições edafoclimáticas são propícias à lavoura, são também para as espécies daninhas. Todavia, se as condições ambientais são antagônicas às espécies cultivadas, as invasoras, por apresentarem elevado grau de adaptação, podem aí sobreviver e perpetuar com maior facilidade. Elas podem germinar, crescer, desenvolver e reproduzir em condições ambientais pouco favoráveis, como em condições de estresse hídrico, umidade excessiva, temperaturas pouco propícias, fertilidade desfavorável, elevada salinidade, acidez ou alcalinidade (EMBRAPA, 2006).

Os efeitos negativos causados pela presença das plantas daninhas não devem ser atribuídos exclusivamente à competição, mas também a pressões ambientais, que podem ser diretas (competição, alelopatia, interferência na colheita e outras) e indiretas (hospedar insetos, doenças e outras), esse efeito total denomina-se interferência. Na cultura do milho, o

grau de interferência imposto pelas plantas daninhas é determinado pela composição florística (pelas espécies que ocorrem na área e pela distribuição espacial da comunidade infestante) e pelo período de convivência entre as plantas daninhas e a cultura (KARAM et al., 2007).

Atualmente, a principal ferramenta de controle de plantas daninhas em lavouras comerciais são os herbicidas, que superam em muito todas as outras formas de controle, tais como, o manual, o mecânico e o cultural (ROMAN, 2002).

3.3 CONTROLE BIOLÓGICO DE PLANTAS DANINHAS

O controle biológico de plantas daninhas pode ser definido como a ação de organismos vivos para reduzir ou controlar a densidade populacional de espécies de plantas indesejáveis (VAN DEN BOSCH et al., 1982). Existem duas estratégias básicas para este tipo de controle, a estratégia clássica e a estratégia inundativa ou bioherbicida (GREEN, 2003; HARLEY e FORNO, 1992). A estratégia clássica é mais apropriada para plantas exóticas e normalmente o agente é importado do local de origem da planta daninha e liberado em seguida. Uma vez introduzido, o agente biológico mantém-se controlando as plantas daninhas se espalhando por toda a área ocupada pela planta daninha (FRANTZEN et al., 2001). No entanto, esta estratégia tem o risco de atacar plantas não-alvo, após a introdução do agente de controle biológico em uma nova área. A abordagem clássica é submetida a normas rígidas por causa da introdução de patógenos potencialmente prejudiciais à produção agrícola.

A estratégia bioherbicida depende de inimigos naturais presentes na área de distribuição natural da planta para causar danos significativos à planta daninha e reduzir o impacto negativo no rendimento da cultura. A estratégia clássica é baseada na capacidade inata de inimigos naturais para reproduzir, enquanto que a estratégia bioherbicida é baseada na reprodução de inimigos naturais sob condições controladas pelo homem, sendo preferido sobre a estratégia clássica, porque oferece diversas possibilidades para uso em sistemas agrícolas, gramados e jardins (FRANTZEN et al., 2001; THOMAS e WILLIS, 1998).

A estratégia inundativa ou bioherbicida utiliza micro-organismos de uma forma concreta sobre populações de plantas daninhas a fim de gerar um rápido e alto grau de doença, resultando em morte ou extinção de populações da planta daninha em questão (CHARUDATTAN, 1991). Neste tipo de controle biológico, normalmente se empregam micro-organismos nativos da área onde são aplicados e podem ser fungos, vírus ou bactérias.

O produto formulado que contém o micro-organismo é chamado de bioherbicida e geralmente terá necessidade de reaplicação (TEBEEST, 1988; BORGES NETO 2003).

O conceito de micoherbicida foi introduzido por Daniel et al. (1973) que evidenciou que um patógeno pode ser totalmente destrutivo para uma planta daninha suscetível. Para haver resultado com esta abordagem deverá ser possível produzir inóculo em uma quantidade considerável e durável em cultura artificial e o patógeno deverá ser geneticamente estável e específico para a planta daninha alvo.

A estratégia inundativa, além de apresentar menor risco às espécies não alvo, mostra um forte apelo comercial já que não é esperado que o organismo se propague no ambiente. Um dos maiores problemas dessa estratégia relaciona-se à utilização de um inimigo natural atuando sobre uma única espécie de planta daninha, já que em climas tropicais e subtropicais as comunidades infestantes são bastante diversas (MELLO e RIBEIRO, 1998).

O interesse pela exploração de fitopatógenos para o biocontrole de plantas daninhas iniciou-se na década de 1960 e vem aumentando significativamente nos últimos anos, especialmente motivado pelos problemas ambientais decorrentes da contínua aplicação de pesticidas químicos. As diferentes estratégias de controle biológico disponíveis devem ser utilizadas de acordo com cada situação em particular, levando-se em conta não apenas os aspectos relacionados à espécie alvo e ao agente de biocontrole, como também às interações ecológicas envolvidas (MELLO e RIBEIRO, 1998).

O controle biológico de plantas daninhas desperta grande interesse nos países desenvolvidos, como nos EUA onde são realizados estudos sobre a viabilidade de fitopatógenos no controle de plantas daninhas desde 1965. Entre os micro-organismos, os fungos são preferidos como agente de controle biológico, pois são encontrados em abundância na natureza, apresentam maior facilidade de identificação e de cultivo em meios artificiais para produção massal, são específicos e destrutivos, podendo ser formulados e aplicados em larga escala (FREEMAN, 1977; CHARUDATTAN, 1985; SCHROEDER, 1992; TEBEEST et al.,1992).

3.4 BIOHERBICIDAS

O controle biológico para o controle de plantas daninhas usa organismos tais como: insetos, nematoides, bactérias ou fungos, assim, os bioherbicidas são uma fonte sustentável a

fim de substituir ou complementar os métodos convencionais, o que ajuda a satisfazer a necessidade de novas estratégias de manejo (GREEN, 2003).

Os bioherbicidas são produzidos através de patógenos, aos quais são formulados e utilizados como um agente de controle de plantas daninhas por meio de aplicações inundativas e repetidas de seu inóculo (CHARUDATTAN, 2000). Na maioria dos casos, um bioherbicida inclui um organismo fúngico como composto ativo, embora haja alguns exemplos do uso de bactérias (ANDERSON e GARDNER, 1999; DAIGLE et al., 2002; DEVALERIO e CHARUDATTAN, 1999; IMAIZUMI et al., 1997 e WEISSMANN et al., 2003) e vírus (CHARUDATTAN e HIEBERT, 2007 e FERRELL et al., 2008). O desenvolvimento comercial de um bioherbicida utilizando um fungo geralmente requer que o inóculo seja produzido em massa, a baixo custo e sob condições controladas (LIMA et al., 2010).

Segundo Charudattan (1991), toxinas com potencial bioherbicida são capazes de penetrar a planta alvo, desintegrar sua estrutura celular e induzir a produção de lesões necróticas ou halo clorótico, com a vantagem de não serem tóxicas aos mamíferos e serem facilmente degradadas no ambiente. A especificidade da toxina para a planta daninha hospedeira é variável, indo de uma única espécie a um conjunto de espécies, sendo que quanto menor a especificidade pela planta hospedeira mais promissora é a toxina para uso como bioherbicida.

Herbicidas com novos modos de ação são extremamente necessários devido à resistência das plantas aos herbicidas químicos. O maior desafio no manejo de pragas para a agricultura é a falta de herbicidas criados a partir de produtos naturais eficazes. A diversidade estrutural e a atividade biológica das fitotoxinas naturais oferecem oportunidades para o desenvolvimento de compostos naturais e herbicidas sintéticos com novos locais de destino com base nas estruturas desses compostos naturais. Existem muitos exemplos de fitotoxinas naturais com modos de ação diferentes dos utilizados pelos herbicidas químicos, o que indica que existem alvos moleculares de herbicidas que podem ser adicionados à lista comercial de herbicidas com novos modos de ação (DAYAN e DUKE 2014).

A obtenção de um composto bioativo para produzir um herbicida industrial requer uma série de testes que demandam de uma grande quantidade de amostras e recursos (RICE et al., 1998). Entretanto, os primeiros bioensaios realizados para avaliar o potencial de novos agroquímicos podem ser executados a partir de ensaios simples em laboratórios e casas de vegetação (DUKE et al., 2005). Nestes testes, plantas que apresentam facilidade na germinação e rápido crescimento são preferidas para os ensaios biológicos sendo as mais

utilizadas: *Latuca sativa* (alface), *Zea mays* (milho), *Sorghum bicolor* (sorgo) e *Cucumis sativus* (pepino) (BARUAH et al., 1994).

3.4.1 Fermentação submersa para produção de bioherbicidas

A fermentação submersa é um processo que consiste na inoculação de micro-organismos em meio líquido, sendo que este deve permanecer em fermentadores com agitação e aeração, assim como propõe Roveda (2007), os nutrientes em meio líquido com pH corrigido, temperatura, entre outros fatores, ficam facilmente acessíveis para serem utilizados pelos micro-organismos. Este sistema é empregado industrialmente para a produção de uma grande variedade de metabólitos de origem fúngica (GIBBS et al., 2000).

O processo de fermentação submersa é o mais utilizado industrialmente para a produção de uma variedade de produtos microbianos (GIBBS et al., 2000). Os fungos filamentosos são influenciados por diversos fatores, os quais vão desde o crescimento e obtenção de biomassa até a produção de metabólitos. Segundo Bramorski (1997) e Lu et al. (1998), algumas desvantagens da fermentação em estado sólido podem ser interpretadas como vantagens da fermentação submersa, entre elas: na fermentação submersa há maior diversidade de micro-organismos que podem ser utilizados; maior facilidade de remoção de calor gerado pelo metabolismo microbiano; menor complexidade na medida de pH, oxigênio, gás carbônico e cálculo de rendimento do produto; maior e melhor controle de temperatura; alto controle de crescimento microbiano e de algumas variáveis como agitação, aeração e concentração de nutrientes e produtos e maior produção de biomassa. Todos esses parâmetros podem variar durante o processo fermentativo e a relação desses parâmetros com complexo formado deve ser analisado durante a fermentação. O meio de cultura na fermentação é um fator importante, onde há estudos que utilizam meio de cultura sintético, assim como outros utilizam meio industrial (SINGHANIA et al., 2010; ZHANG et al., 2012; FENICE et al., 2000).

No estudo realizado por Klaic (2014), o cultivo submerso com fungos foi mais frequente em um tempo de fermentação variando de 5 a 12 dias, temperatura na faixa de 24-35°C e agitação de 50-150 rpm. Para fermentação utilizando bactérias, o tempo médio variou de 1 a 3 dias com a temperatura do sistema em torno de 26-30°C e agitação de 100 rpm. A agitação para os fungos devem ser mais branda em comparação com células de bactérias, uma vez que altas taxas de agitação aumentam as tensões de cisalhamento no biorreator

prejudicando o crescimento do micélio e, assim, reduzindo a biomassa fúngica. Salientando-se que nem sempre a melhor condição para o micro-organismo é garantia de que este irá produzir a toxina em maior quantidade ou concentração, em alguns essa produção ocorre quando o micro-organismo se desenvolve em condições não favoráveis (VAREJÃO, et al 2013).

O meio líquido é idealmente adequado para bactérias, Jackson et al. (1998) relataram a produção de 2×10^{12} células por mililitro de *Xanthomonas campestris* pv *poae*, o ingrediente ativo de um bioherbicida para *Poa annua* (IMAIZUMI et al., 1997; JOHNSON, 1994), em cultura submersa a 30°C utilizando sacarose ou glicose como única fonte de carbono.

Alguns fungos considerados promissores para bioherbicida irão produzir conídios ou outras formas de propágulos em cultura líquida e a fermentação submersa é um método ideal para a sua produção (por exemplo: *Colletotricum*, *Plectosporium*, *Fusarium*). Os fungos são também conhecidos por produzir microescleródios em cultura líquida (JACKSON e SCHISLER, 1995) ou clamidósporos de hifas ou de conídios (CIOTOLA et al., 2000, CLIQUET et al., 2004, CLIQUET e ZEESHAN, 2008, LANOISELET et al., 2001; MÜLLER-STÖVER et al., 2002) que pode ser variadamente formulados e aplicados como um bioherbicida.

A otimização das condições de crescimento de bactérias ou fungos em cultura submersa pode ser conseguido através do uso da metodologia de superfície de resposta (BHASKAR et al., 2008; CLIQUET et al., 2004). Essa abordagem é usada regularmente para desenvolver protocolos otimizados para composição do substrato e concentração, pH e temperatura. Na pesquisa de Briere et al. (2000) verificou-se que a incorporação de meio líquido contendo elevados níveis de ácido oxálico com micélio em grânulos de alginato de sódio aumentou a virulência de isolados de *S. minor* contra espécies de dente de leão.

Diversos micro-organismos são utilizados nas áreas biotecnológicas, mas a maioria se concentra em aplicações para a agricultura, saúde e energia ambiental (VERSTRAETE et al., 1996).

3.4.2 Micro-organismos do gênero *Fusarium* produtores de fitotoxinas

Os tricotecenos são o grupo mais importante de toxinas produzidas pelo gênero *Fusarium*, cuja biossíntese procede do farnesil pirofosfato, que é convertido a tricodieno. O possível papel dos tricotecenos na patogênese de plantas foi inicialmente observado em

estirpes mutantes UV-bloqueadas de *Fusarium sporotrichoides*, permitindo entender os mecanismos de produção dessa toxina, a organização e função dos genes tricotecenos e o papel destes nas doenças de plantas (DESJARDINS, 2003).

Desjardins e Hohn (1997) relatam que a fitotoxicidade dos tricotecenos e sua incidência nos tecidos de plantas infectadas indica que esta toxina seja fundamental na patogenicidade de fungos do gênero *Fusarium*. Proctor et al. (2002), também comprovam que sua produção favorece para a virulência de *Fusarium graminearum*, sendo que os mutantes do patógeno que perdem os genes para a produção da toxina tornaram-se avirulentos ou desencadearam doenças de menor gravidade que os tipos selvagens. Outros tipos de toxinas produzidas pelo gênero *F. graminearum* também são descritas por Lori et al. (1997), desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV) e zearalenona (ZEA), causando queima do ponteiro do trigo e podridão da espiga em milho, existindo forte correlação entre a concentração dessas toxinas nos tecidos das plantas e a severidade das doenças. Outras duas toxinas, o ácido fusárico produzido por *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, da bananeira, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, do algodoeiro, *F. oxysporum* f. sp. *pisi*, da ervilha e *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, do tomateiro e a naftazarina, produzida por *F. solani*, estão relacionadas a aumento na gravidade de doenças e sintomas de podridão em raízes de citros, respectivamente (MATSUMOTO et al., 1995; VAN RENSBURG et al., 2001).

Abbasher et al. (1992) estudaram o fungo *Fusarium nygamai*, como um potencial bioherbicida para o controle de *Striga hermonthica* no sorgo. A incidência da Striga foi diminuída até 100% quando o fungo foi incorporado ao solo, em diferentes fases de crescimento até a fase de floração, as plantas de Striga foram mortas pelo fungo quando o fungo foi aplicado pós-emergência.

Morin et al. (2000) investigaram a relação entre a produção de tricotecenos e a patogenicidade de 29 isolados de *Fusarium tumidum*, um potencial bioherbicida de tojo (*Ulex europaeus*) e vassoura (*Cytisus scoparius*). Todos os isolados derivados de vassoura produziram altos níveis de derivados tetraol T-2 quando cultivado em grãos de milho no solo e grãos de pérolas de cevada, em comparação com isolados de tojo. Pequenas quantidades de derivados de scirpentriol também foram produzidos por ambos os grupos de isolados. Nenhum derivado de nivalenol e desoxinivalenol foram encontrados em qualquer um dos extratos da cultura. Dois isolados de tojo foram altamente agressivos para ambas as plantas daninhas, oferecendo perspectivas para o desenvolvimento de um bioherbicida seguro tendo como alvo duas plantas daninhas importantes.

Nachtigal & Pitelli (1999) avaliando um isolado do fungo *Fusarium* sp. detectaram que o fungo possui um bom potencial como agente de controle para plantas aquáticas *Egeria densa* e *Egeria najas*, causando sintomas de necrose e clorose foliar, se intensificando até uma destruição completa dos tecidos vegetais. Porém a substância bioativa, causa da fitotoxicidade, não foi identificada. Borges Neto et al. (2005) também fizeram avaliação de um isolado de *Fusarium graminearum* como agente de controle biológico, destas plantas e estudaram os efeitos do fotoperíodo e da temperatura, além de avaliarem o crescimento por meio do ganho de massa fresca. Neste estudo, a maior severidade da doença foi observada quando as espécies foram mantidas no escuro, e a menor, em fotoperíodo de 12 horas. A temperatura de 30°C proporcionou maior severidade de doença em ambas as espécies. A espécie *E. densa* apresentou maior produção de massa fresca no regime de 12 horas de luz e de temperaturas abaixo de 25°C e menor produção no escuro total e nas temperaturas de 30 e 35°C e *E. najas* apresentou menor produção de massa fresca no escuro e nas temperaturas de 25 a 35°C.

Borges Neto & Pitelli (2004) estudaram o efeito de 6 herbicidas e 14 adjuvantes adicionados à suspensão do inóculo, sobre a ação de *Fusarium graminearum* em *Egeria densa* e *Egeria najas* e verificaram que os adjuvantes melhoraram a eficiência do bioherbicida e a associação herbicida+fungo proporcionou maior severidade de doença e controle do crescimento das plantas.

O controle da planta daninha *Striga hermonthica* foi avaliado utilizando-se nove toxinas produzidas por *Fusarium* spp.: bovericina, fusaproliferina e moniliformina (*F. proliferatum*); deoxifusapirona e fusapirona (*F. semitectum*); desoxinivalenol e toxina T2 (*Fusarium* spp.); fumonisina B1 (*F. moniliforme*); e nivalenol (*F. nivale*). A toxina T2 e desoxinivalenol foram as únicas toxinas que inibiram completamente a germinação de sementes da planta, quando testadas a 10^{-4} M, sendo que as demais toxinas a essa concentração causaram parcial inibição da germinação. Em concentrações menores, de até 10^{-7} M, apenas a toxina T2 ainda foi capaz de inibir a germinação de *S. hermonthica*, demonstrando a maior potencialidade de uso como bioherbicida (ZONNO; VURRO, 1999). A toxina ferricrocina, um tipo de sideróforo com atividade de quelação de ferro, foi isolada e purificada a partir de *Colletotrichum gloeosporioides* e causou danos extremos às plantas daninhas *Aeschynomene*, *Amaranthus retroflexus* e *Desmodium tortuosum*. *Sorghum halepense* sofreu necroses, mas não morreu em presença do extrato da toxina (OHRA et al., 1995).

Um outro composto, mevalocidin, foi descoberto a partir de culturas de dois fungos: *Rosellinia* DA092917 e *Fusarium* DA056446. Mevalocidin demonstrou atividade pós-

emergência de amplo espectro em gramíneas e folhosas e produziu um conjunto único de sintomas visuais nas plantas tratadas, sugerindo um novo modo de ação onde foi rapidamente absorvido (GERWICK et al., 2013).

As fitotoxinas fúngicas desempenham um papel importante na indução dos sintomas da doença nas plantas (GRANITI et al., 1989; SCHUEFFLER e ANKE, 2014) . Elas pertencem a diferentes classes de compostos naturais: aromáticos, aminoácidos, cumarinas e isocumarinas, etanonas, furopiranos, pironas, espirofitotoxinas, terpenos, tricotecenos, e algumas outras com uma complexa estrutura de carbono (CIMMINO et al., 2015).

Fusarium graminearum e *F. culmorum* são as principais fontes de DON, ocorrendo predominantemente no milho e cereais. Estas espécies têm diferentes temperaturas ótimas de crescimento (25 e 21°C, respectivamente) o que influencia a sua distribuição geográfica. *F. culmorum* é predominante nos territórios mais frios e *F. graminearum* nas zonas mais temperadas. Estes fungos têm ainda a particularidade de produzir outros tricotecenos como 15-acetildesoxinivalenol, 3-acetildesoxinivalenol, nivalenol, 4-acetilnivalenol e fusarenona-X, o que acarreta riscos toxicológicos acrescidos. Devido a esta diversidade metabólica, estudos filogenéticos determinaram que *F. graminearum* constitui um complexo com pelo menos 15 espécies (SARVER et al., 2011). Isolados do complexo *F. graminearum* variam quanto ao fenótipo químico (quimiotipo) em relação aos tricotecenos do tipo B. Métodos moleculares têm sido usados para genotipar isolados, pela presença de alelos de genes relacionados à síntese dessas toxinas (DESJARDINS, 2008).

Em plantas, os tricotecenos produzidos pelo fungo *Fusarium* spp. causam necrose, clorose e morte, o que permitem mediar uma grande variedade de doenças nas plantas, incluindo murcha, podridões do caule, raiz e da folha em muitas das principais culturas e plantas ornamentais (UENO, 1983; CUTLER, 1988; CHEEKE, 1998; CAST, 2003; HARRIS et al., 1999; WANG et al., 2006). Exemplos incluem araruta japonesa (ABBAS et al., 2002), orobanche (ZONNO e VURRO, 2002), lentilha (ABBAS et al., 1998), e muitas culturas de grãos (MORIN et al., 2000; TANAKA et al., 1993).

Wakulinski (1989), usando mudas de três variedades de trigo para avaliar os efeitos fitotóxicos dos seis metabolitos de *Fusarium*, encontrou DON e 3-acetildesoxinivalenol (3-ADON) por ser o inibidor da germinação e do desenvolvimento radicular, pois pareceu ser o mais sensível dos metabolitos. Foram observados os efeitos fitotóxicos de DON e 3-ADON de 10 a 100 vezes concentrações mais baixas do que as observadas para Zearalenona, toxina T-2 e diacetoxiscirpenol (DAS).

Rocha et al. (2005) resumiram os efeitos fitotóxicos de DON como retardo do crescimento, inibição de mudas e regeneração de plantas verdes. Shimada e Otani (1990) verificaram efeitos inibidores semelhantes de DON no desenvolvimento radicular em sete variedades de mudas de trigo. Uma concentração de aproximadamente $10 \mu\text{g}\times\text{mL}^{-1}$ de DON resultou numa inibição de 50% do crescimento da parte aérea, enquanto que para as raízes, este valor foi cinco vezes mais baixo (aproximadamente $2 \mu\text{g}\times\text{mL}^{-1}$). Nivalenol foi menos fitotóxico: $100 \text{g}\times\text{mL}^{-1}$ e $48 \mu\text{g}\times\text{mL}^{-1}$ causaram uma inibição de 50% da parte aérea e crescimento das raízes, respectivamente (SHIMADA; OTANI, 1990).

DON mostrou-se mais fitotóxico para genótipos de milho suscetível à podridão Gibberella ear de genótipos resistentes (COSSETE; MILLER, 1995). Bottalico et al. (1980) relataram que DON causou mais efeito inibitório no crescimento radicular do que de crescimento da parte aérea em folhas de tomateiro. Em sementes de trigo, $50 \text{g}\times\text{mL}^{-1}$ DON inibiu completamente a germinação, enquanto na faixa de $10\text{-}25 \text{mg}\times\text{mL}^{-1}$ o crescimento das plântulas foi reduzido significativamente (BANDURSKA et al., 1994).

3.5 CONCENTRAÇÃO DO COMPOSTO FITOPATÓGENO

3.5.1 Extração líquido-líquido

A extração com solventes ou extração líquido-líquido está baseada na diferença de solubilidade entre os compostos específicos de uma mistura heterogênea de líquidos num dado solvente. Quando comparada a outros métodos, este processo apresenta como principal vantagem o baixo consumo de energia, uma vez que a técnica é realizada sob pressão atmosférica e condições amenas de temperatura (RODRIGUES et al., 2007). O processo de extração líquido-líquido é amplamente utilizado devido à sua simplicidade, baixo custo, e facilidade de ampliação de escala (LIU et al., 1998).

É uma operação baseada na diferença de solubilidade entre os compostos presentes em uma solução líquida em um dado solvente, também na fase líquida. Esta operação se dá em três etapas: mistura inicial (onde a alimentação e o solvente são colocados em contato), agitação e a separação da mistura em duas fases (TREYBAL, 1980). O solvente deve apresentar a capacidade de extrair preferencialmente um ou mais componentes desejados (solutos). Entretanto, para que esta operação ocorra é necessário que os dois líquidos em contato sejam imiscíveis ou parcialmente miscíveis, possibilitando, desta forma, a

transferência dos constituintes de um líquido para outro, seguido da separação física das duas fases formadas, extrato e refinado. O refinado é a solução residual a qual é pobre em solvente enquanto que, a solução rica em solvente, contendo o soluto ou solutos extraídos, é conhecida como extrato (TREYBAL, 1980).

Líquidos iônicos, glicóis, água, aminoetanol, acetonitrila, nitrometano, dimetilformamida, acetona, álcoois de cadeia curta como o metanol, etanol, propanol e butanol são propostos na literatura como potenciais solventes no processo de extração líquido-líquido (ARCE et al., 2002, 2003, 2004a,b, 2005, 2006, 2007; SEVGILI et al., 2008; DOZ et al., 2007, 2008; ANTOSIK e STRYJEK, 1992; TAMURA e LI et al., 2005; TAMURA et al., 2008, 2009; CHÁFER et al., 2004, 2005; GIRONI et al., 1995; LI e TAMURA, 2006, 2008, 2010).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO

4.1.1 Micro-organismo

O fungo utilizado neste trabalho foi isolado da planta *Solanum paniculatum* (jurubeba), pertencente à família botânica Solanaceae (Figura 1), coletada na região de Dona Francisca (RS), localizada nas coordenadas 29°38'02.4"S e 53°21'10.8"W, a partir de amostras da planta infectada, realizado em trabalho anterior de Souza (2015). O micro-organismo inicialmente foi repicado em meio BDA (Batata Dextrose Ágar) e mantido em estufa bacteriológica a 28°C por 7 dias.

Figura 1 - Planta *Solanum paniculatum* (jurubeba)



Fonte: <https://www.flickr.com/photos/valedaneblina/18942718028> (2015)

4.1.2 Identificação molecular do micro-organismo

O micro-organismo isolado foi identificado por técnicas de biologia molecular no Instituto Biológico de São Paulo – SP. A extração do DNA dos isolados foi realizada de acordo com método empregando o reagente CTAB (brometo de cetiltrimetilamonio) descrito por Doyle e Doyle (1991) a partir do micélio do fungo cultivado em meio batata-dextrose e triturado em microtubos com auxílio de pistilo de plástico. O DNA genômico foi submetido à reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a amplificação da região ITS (internal

transcribed spacer) localizada entre os genes codificadores dos RNAs ribossomais 18S e 28S e de segmento do gene codificador do fator de alongação da tradução 1 α (EF). Os oligonucleotídeos iniciadores para a região ITS foram ITS1 (5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3') e ITS4 (5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3') (WHITE et al., 1990) e para o fator de alongação foram EF-1 (5' – ATGGGTAAGGARGACAAGAC – 3') e EF-2 (5' – GGARGTACCAGTSATCATGTT – 3') (O'DONNELL e CIGELNIK, 1997). A reação de PCR foi realizada empregando-se os primers na concentração final de 0,2 μ M, dNTPS a 0,2 mM, 1U da enzima GoTaq Green (Promega), em volume final de 50 μ L. O programa utilizado tanto para ITS quanto para EF foi: desnaturação inicial a 94°C/2 min, 40 ciclos de 94°C/30 s – 54°C/30 s – 72°C/40 s, extensão final a 72°C/4 min. A verificação dos produtos amplificados foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

Os produtos amplificados foram purificados através de precipitação com polietilenoglicol (SCHMITZ e RIESNER, 2006), submetidos à reação de sequenciamento pelo método de terminação de cadeia empregando-se o reagente Big Dye 3.1 (Applied Biosystems) e analisados em sequenciador capilar automático 3500 XL (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram comparadas com sequências de espécimes autênticos depositadas no NCBI (National Center for Biotechnology Information – www.ncbi.nlm.nih) através da ferramenta Blastn.

4.2 MEIO DE CULTURA E OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

Inicialmente um planejamento experimental do tipo Plackett Burman foi delineado, totalizando 11 ensaios, a fim de avaliar a influência da composição de meio de cultura na produção de biomassa. O inóculo da fermentação foi preparado adicionando 1 disco (6 mm) de micélio fúngico, cultivado em meio batata dextrose ágar (BDA) em Erlenmeyers contendo 150 mL de meio líquido, composto (g.L^{-1}): 1,5 de peptona, 1,5 de glicose, 1,125 de extrato de levedura, 0,3 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,15 de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,075 de MgSO_4 e 0,15 de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

As variáveis independentes do planejamento experimental foram: peptona (5-15 g.L^{-1}), glicose (5-15 g.L^{-1}), extrato de levedura (5-10 g.L^{-1}) e o pH (5-7), a composição de micronutrientes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2 g.L^{-1}), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 g.L^{-1}), MgSO_4 (0,5 g.L^{-1}), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1 g.L^{-1}) foi mantida fixa (SOUZA, 2015). As fermentações foram realizadas a 28°C e 120

rpm durante 7 dias. A Tabela 1 apresenta os valores reais e codificados utilizados no planejamento.

Após a fermentação, a massa de células foi separada por centrifugação em centrífuga orbital (Eppendorf modelo 5804 R) a $2860\times g$ durante 5 minutos. A biomassa fúngica foi determinada pelo método de peso do micélio seco em estufa a 50°C , num período de 24 horas (PRAKASH e SRIVASTAVA, 2008).

Tabela 1 - Planejamento experimental Plackett Burman, variáveis reais e codificadas (entre parênteses).

Ensaio	pH	Glicose (g.L ⁻¹)	Peptona (g.L ⁻¹)	Extrato de levedura (g.L ⁻¹)
1	7 (1)	5 (-1)	5 (-1)	10 (1)
2	7 (1)	15 (1)	5 (-1)	5 (-1)
3	7 (1)	15 (1)	15 (1)	5 (-1)
4	5 (-1)	15 (1)	15 (1)	10 (1)
5	7 (1)	5 (-1)	15 (1)	10 (1)
6	5 (-1)	15 (1)	5 (-1)	5 (-1)
7	5 (-1)	5 (-1)	15 (1)	10 (1)
8	5 (-1)	5 (-1)	5 (-1)	5 (-1)
9	6 (0)	10 (0)	10 (0)	7,5 (0)
10	6 (0)	10 (0)	10 (0)	7,5 (0)
11	6 (0)	10 (0)	10 (0)	7,5 (0)

Fonte: A autora.

Após a análise dos efeitos do planejamento Plackett Burman, foi feito um novo planejamento experimental utilizando apenas as variáveis independentes que apresentaram efeito significativo, para avaliação do efeito fitotóxico.

4.2.1 Análises estatísticas

A análise estatística do planejamento Plackett Burman foi realizada utilizando o software *Statistica 10.0*[®] (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA) com nível de significância de 5%.

Os resultados foram expressos em média onde foi utilizada análise de variância (ANOVA - one way) aplicando-se o teste *post-hoc* para a comparação entre os grupos utilizando como nível de significância 5%.

4.3 TESTES EM CASA DE VEGETAÇÃO

O sobrenadante obtido da fermentação foi utilizado para avaliação da ação bioherbicida em plantas-teste. Os ensaios foram conduzidos em condições parcialmente controladas em casa de vegetação, no qual utilizou-se como planta-teste *Cucumis sativus* L. var. wisconsin (pepino) por ser uma espécie sensível aos herbicidas sintéticos e de uso frequente em bioensaios. Além disso, as sementes dessas espécies possuem germinação rápida, uniforme e não apresentam dormência (ALVES et al., 2004).

As avaliações realizadas para cada tratamento foram: altura da parte aérea, comprimento da raiz, massa fresca e massa seca (parte aérea e raiz) e fitotoxicidade. Para avaliar a fitotoxicidade foi utilizada a escala de Frans e Crowley (1986) (Tabela 2), a qual possui intervalo de notas de 0 a 100%, onde 0% equivale à inexistência de fitotoxicidade e 100% representa a destruição completa da cultura.

Tabela 2 - Avaliação da fitotoxicidade das plantas.

%	Descrição das categorias principais	Descrição da fitointoxicação da cultura
0	Sem efeito	Sem injúria ou redução
10	Efeito leve	Leve descoloração ou atrofia
20		Alguma descoloração ou atrofia
30		Injúria mais pronunciada, mas não duradoura
40	Efeito moderado	Injúria moderada, normalmente com recuperação
50		Injúria mais duradoura, recuperação duvidosa
60		Injúria duradoura, sem recuperação
70	Efeito severo	Injúria pesada, redução de estande
80		Cultura próxima da destruição
90		Raramente restam algumas plantas
100	Efeito total	Destruição completa da cultura

Fonte: (Frans e Crowley, 1986)

4.3.1 Primeira avaliação

4.3.1.1 Bioensaio em pós-emergência

A primeira avaliação foi conduzida em casa de vegetação, localizada nas coordenadas 29°43'44.8"S e 53°33'42.1"W, para verificar o efeito fitopatógeno, sendo o sobrenadante aplicado na parte aérea das plantas de pepino.

Nesta avaliação foram considerados os tratamentos do planejamento, mais um controle onde aplicou-se somente água, sendo que em cada tratamento havia 3 repetições, representados por 15 vasos por repetição.

As unidades experimentais (UEs) foram copos de polietileno com capacidade de 400 mL, preenchidos com substrato comercial Tecnomax®, onde semeou-se manualmente uma semente por copo e após foram acondicionados em bandejas plásticas (40,0 x 27,0 x 6,5 cm).

As aplicações foram realizadas com borrifador de jardim, sendo feitas irrigações diárias. Os tratamentos foram aplicados com 14 dias, onde foram avaliados: fitotoxicidade, comprimento da haste e raiz e peso da massa seca da parte aérea e raiz. O controle consistiu em aplicação de água pura, seguindo a mesma metodologia dos demais tratamentos. A fitotoxicidade foi avaliada 21 dias após a aplicação.

Após a avaliação de fitotoxicidade as plantas foram seccionadas com tesoura a partir do colo para separação das raízes, acondicionadas em sacos de papel e levadas para uma estufa de secagem, onde permaneceram a uma temperatura de aproximadamente 50°C, pelo período de 7 dias, para a obtenção da massa seca da parte aérea e massa seca das raízes.

Para obtenção dos dados de comprimento da haste e raiz foram realizadas as medidas da zona de diferenciação entre raiz/haste, com régua, até os cotilédones de todas as plântulas avaliadas e expressas em centímetros (cm). Os dados de massa fresca e seca da haste e da raiz foram gerados utilizando-se todas as plântulas avaliadas para comprimento.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), 5 tratamentos e 15 repetições para cada tratamento. Os diferentes sobrenadantes aplicados nas plantas foram considerados tratamentos, aplicados sob pulverizações, aplicando-se 35 mL da solução diretamente na parte aérea da planta.

4.3.2 Segunda avaliação

Os caldos obtidos na fermentação foram submetidos a diferentes processos de purificação/concentração com o objetivo de avaliar a potencialização do efeito patógeno.

A fermentação foi realizada na melhor condição definida através do planejamento Plackett Burman (item 4.2) após o bioensaio em pós-emergência (item 4.3.1.1). O sobrenadante nesta condição foi submetido à liofilização parcial e à separação por membranas (fração permeada e fração retida).

4.3.2.1 Tratamentos

Liofilização parcial: O congelamento da amostra foi realizado em um ultrafreezer com temperatura de -50°C permanecendo por 24 horas e, após a liofilização foi conduzida em um liofilizador de bancada (Liotop - modelo L101), tendo como volume inicial 300 mL do sobrenadante e após 24 horas resultando em um volume final de 175 mL.

Separação por membranas: O processo de separação por membranas (Figura 2) foi realizado utilizando uma membrana de microfiltração de fluoreto de polivinilideno - PVDF (Microza – modelo UMP 1047R), módulo tubular com diâmetro de poro de $0,2\ \mu\text{m}$ e com área de filtração de $0,09\ \text{m}^2$, a pressão de trabalho foi de 1 bar em temperatura ambiente. O reservatório da unidade foi alimentado com 700 mL do sobrenadante e após o processo entrar em regime, as duas frações (permeada e retida) foram coletadas.

Figura 2 - Processo de separação por membranas – Microfiltração.



Fonte: A autora.

4.3.2.2 Bioensaio em pós-emergência

As aplicações foram feitas na parte área das plantas-teste de *Cucumis sativus* L. var. wisconsin (pepino), em copos plásticos com capacidade de 80 mL utilizando-se bandejas plásticas (40,0 x 27,0 x 6,5 cm) contendo substrato comercial Tecnomax®. Foram realizadas três repetições de 20 plântulas para cada tratamento, sendo o experimento conduzido em casa de vegetação (Figura 3), localizada nas coordenadas 29°43'05.8"S e 53°43'09.9"W.

Foram feitas irrigações diárias e a aplicação dos tratamentos ocorreram aos 9 dias após a semeadura e a avaliação da fitotoxicidade foi realizada aos 7, 14 e 21 dias após a semeadura, por meio de uma estimativa visual utilizando a escala desenvolvida por Frans e Crowley (1986), apresentada na Tabela 2. Nesta avaliação foram considerados os tratamentos do planejamento, mais um controle onde aplicou-se somente água, sendo que em cada tratamento havia 3 repetições, representados por 20 vasos por repetição, seguindo a mesma metodologia dos demais tratamentos.

Um delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com 4 tratamentos, após a última avaliação de fitotoxicidade realizada 21 dias após a aplicação foi aplicada metodologia descrita no item 4.3.1.1.

Figura 3 - Casa de vegetação

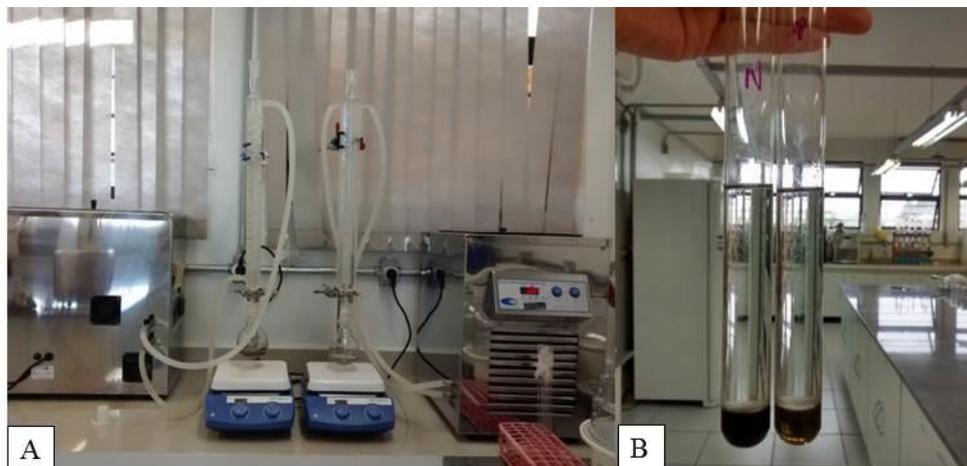


Fonte: A autora.

4.4 EXTRAÇÃO COM SOLVENTES

O caldo bruto e o da fração permeada foram submetidos à extração líquido-líquido (Figura 4) utilizando etanol (PA) e acetato de etila (PA). Para este processo, em balão foi adicionado caldo fermentado e solvente, razão (1:5), sendo mantidos sob agitação constante durante 24 horas. O balão foi conectado a um condensador com manutenção da temperatura por meio de um banho termostatizado com recirculação de água a 10°C. A agitação foi realizada através de um bastão magnético acionado por agitador magnético. Após a agitação, iniciou-se o processo de decantação em tubos de ensaio, durante 24 horas, verificando após este período a formação de duas fases límpidas e transparentes com interface definida. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta, foi retirada uma alíquota da fração solvente (fração superior) e armazenados em frascos de vidro âmbar e refrigerados para posterior identificação e caracterização dos compostos por cromatografia (BRUN, 2016).

Figura 4 - Extração líquido-líquido com solventes orgânicos (A), Tubo de ensaio com frações separadas (B).



Fonte: A autora.

4.5 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS

A identificação dos compostos produzidos foi realizada através de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) em cromatógrafo a gás (Shimadzu - GC-MS-QP-2010). As temperaturas do injetor e da fonte de íons foram 250 e 260°C, respectivamente. O fluxo de gás hélio foi 1,11 mL/min, split na razão 1/30 e volume de amostra de 1 µl. A coluna cromatográfica utilizada foi a RTX-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (Rastek Corporation, Bellefonte, PA) e foi utilizado um autoinjeter AOC-20i. A temperatura da coluna foi mantida a 150°C por 1 min e então aumentada para 230°C a 8°C/min, após 1 min, a temperatura aumentou para 250°C a 7°C/min, na qual foi mantida por mais 1 min, e aumentada para 300°C a 10°C/min.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO

O fungo utilizado neste trabalho foi identificado como pertencente ao gênero *Fusarium*, sendo identificado como *Fusarium graminearum* (Figura 5).

Figura 5 - Placa de meio BDA com micro-organismo *Fusarium graminearum*.



Fonte: A autora.

5.2 CULTIVO DO MICRO-ORGANISMO

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados para biomassa fúngica obtidos através do planejamento experimental do tipo Plackett Burman.

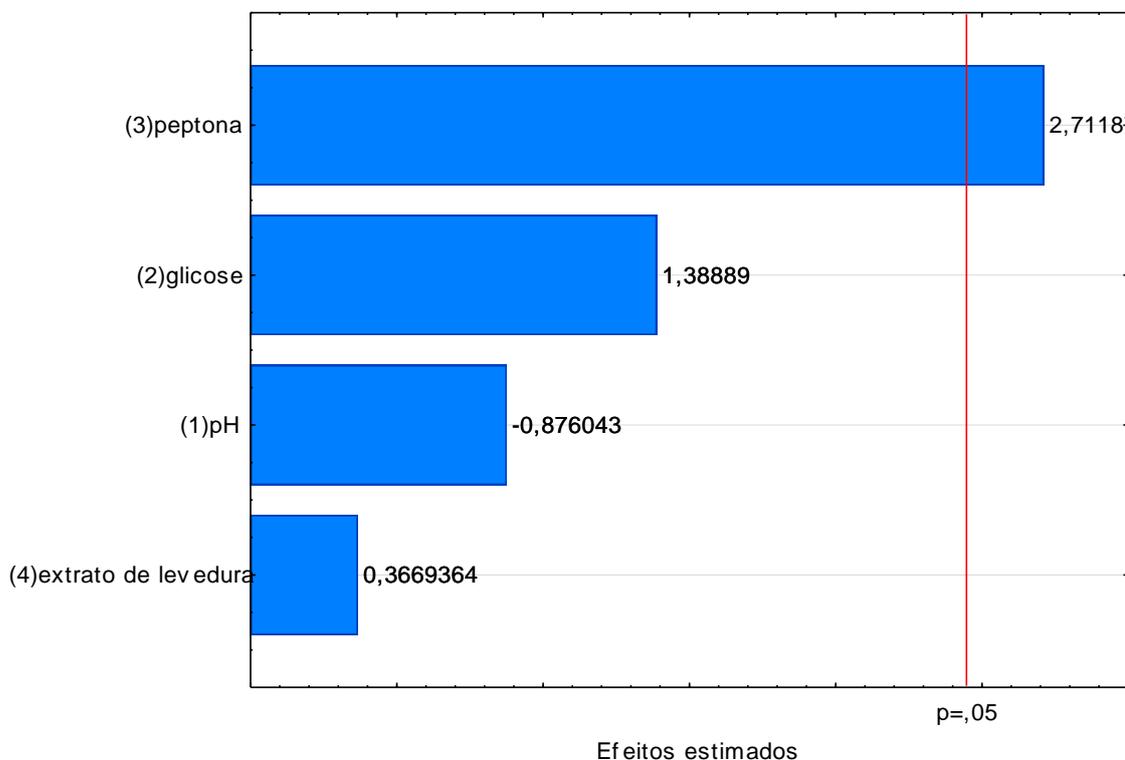
Tabela 3 - Biomassa fúngica obtida pelo planejamento experimental de Plackett-Burman para avaliar a influência do meio sintético após sete dias de fermentação, valores reais e codificados (entre parênteses)

Ensaio	pH	Glicose (g.L ⁻¹)	Peptona (g.L ⁻¹)	Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	Biomassa Fúngica (g.L ⁻¹)
1	7 (1)	5 (-1)	5 (-1)	10 (1)	7,287
2	7 (1)	15 (1)	5 (-1)	5 (-1)	8,217
3	7 (1)	15 (1)	15 (1)	5 (-1)	9,153
4	5 (-1)	15 (1)	15 (1)	10 (1)	13,855
5	7 (1)	5 (-1)	15 (1)	10 (1)	7,715
6	5 (-1)	15 (1)	5 (-1)	5 (-1)	6,395
7	5 (-1)	5 (-1)	15 (1)	10 (1)	9,961
8	5 (-1)	5 (-1)	5 (-1)	5 (-1)	6,221
9	6 (0)	10 (0)	10 (0)	7.5 (0)	8,113
10	6 (0)	10 (0)	10 (0)	7.5 (0)	8,634
11	6 (0)	10 (0)	10 (0)	7.5 (0)	8,019

Fonte: A autora.

Na Tabela 3 são observados que os resultados para concentração de biomassa variaram entre 6,22 g.L⁻¹ (ensaio 8) e 13,86 g.L⁻¹ (ensaio 4), demonstrando a influência das variáveis na resposta, sendo que o maior valor de biomassa correspondeu a todas as variáveis independentes no seu limite superior, com exceção do pH. A partir dos efeitos das variáveis avaliadas foi construído o gráfico de Pareto (Figura 6), onde apenas a concentração de peptona apresentou efeito significativo sobre a resposta avaliada ($p < 0,05$). O efeito foi positivo, indicando que com o aumento da concentração de peptona a produção de biomassa fúngica poderia aumentar.

Figura 6 – Efeitos estimados das variáveis na produção de biomassa fúngica em meio sintético



Fonte: A autora.

Para avaliar esse efeito, foram realizados experimentos aumentando gradativamente a concentração de peptona, a fim de qualificar sua influência no aumento de biomassa. Concentrações entre 10 g.L^{-1} e 80 g.L^{-1} foram avaliadas e os experimentos foram realizados com três repetições, as demais variáveis foram mantidas no ponto central do planejamento. Na Tabela 4 pode ser observado que a maior produção de biomassa foi obtida na maior concentração de peptona avaliada (80 g.L^{-1}).

Tabela 4 - Variação de concentração de peptona e biomassa fúngica.

Concentração de peptona (g.L^{-1})	Média biomassa fúngica (g.L^{-1})
10	$5,93 \pm 0,68^a$
20	$6,94 \pm 0,51^a$
40	$8,59 \pm 0,95^a$
60	$13,40 \pm 3,04^b$
80	$20,29 \pm 1,20^c$

Letras diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey a 95% de confiança.

Fonte: A autora.

Na Tabela 4, pode-se observar que a concentração de biomassa fúngica variou entre 5,93 g.L⁻¹ a 20,29 g.L⁻¹ para 10 g.L⁻¹ e 80 g.L⁻¹ de peptona, respectivamente. Somente as concentrações de 60 e 80 g.L⁻¹ apresentaram diferenças significativas no teste de Tukey a 95% de confiança indicando que o melhor crescimento ocorreu na concentração de 80 g.L⁻¹ de peptona.

TURATI (2012), avaliando a influência de parâmetros nutricionais e físicos sobre a produção de lipase por *Penicillium janthinellum*, em meio de cultura líquido, observou que todas as composições de meio de cultivo avaliadas possibilitaram o crescimento do fungo, porém no meio que tinha a maior concentração de peptona teve um efeito mais significativo no crescimento microbiano. Segundo Becker et al. (1997), as fontes de nitrogênio presentes no meio de cultura contêm algumas, senão todas as vitaminas necessárias para o metabolismo do micro-organismo. Porém, existem casos onde alguma vitamina ou uma suplementação é necessária para o crescimento celular.

5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO FITOTÓXICO EM CASA DE VEGETAÇÃO

Com o sobrenadante da fermentação foram realizados diferentes ensaios em casa de vegetação, onde utilizou-se como tratamentos as diferentes concentrações de peptona, a fim de definir o efeito fitotóxico do caldo fermentado.

5.3.1 Avaliação da fitotoxicidade e da altura das plantas

Os resultados apresentados na Tabela 5 mostram o efeito dos tratamentos sobre a porcentagem de fitotoxicidade em espécies de *Cucumis sativus*. De todos os caldos obtidos, o tratamento que apresentou a maior fitotoxicidade foi a concentração de 40 g.L⁻¹ de peptona (40% de fitotoxicidade). O menor potencial fitotóxico foi encontrado nos tratamentos em que foram utilizadas as concentrações de 10, 60 e 80 g.L⁻¹ de peptona (20, 20 e 10% de fitotoxicidade, respectivamente). O controle foi considerado como 0% de fitotoxidade, pois não apresentou lesão nas plantas.

Tabela 5 - Média da altura da parte aérea (cm) e fitotoxicidade em plântulas de pepino (*Cucumis sativus*) para diferentes concentrações de peptona.

Tratamento (g.L ⁻¹ de peptona)	7 DAA	14 DAA	21 DAA	Fitotoxicidade (%)
Controle	12,20 ^{A,bc}	12,77 ^{A,ab}	13,87 ^{A,bc}	0
10	10,83 ^{A,c}	11,23 ^{A,b}	12,54 ^{A,c}	20
20	10,75 ^{A,c}	11,05 ^{A,b}	12,52 ^{A,c}	30
40	13,25 ^{B,b}	13,79 ^{AB,a}	15,08 ^{A,ab}	40
60	12,34 ^{B,bc}	12,88 ^{AB,ab}	14,19 ^{A,abc}	20
80	14,97 ^{A,a}	14,48 ^{A,a}	16 ^{A,a}	10

DAA: dias após aplicação

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, letra maiúscula comparação entre a linha e minúscula comparação na coluna, pelo teste de Tukey a 95% de confiança.

Fonte: A autora.

De acordo com a Tabela 5, a altura da parte aérea, no período de 7 dias após a aplicação dos tratamentos nas concentrações de 40 g.L⁻¹ e 60 g.L⁻¹ de peptona foi observada uma diferença significativa em comparação com o controle, sendo que nos demais dias e concentrações aplicadas não houve diferença significativa. Nessas duas concentrações, observou-se que após o período de 7 dias a planta retomou o seu crescimento sugerindo que não houve mais a ação dos metabólitos. Nos demais tratamentos, não houve diferença estatística no crescimento das plantas entre os três períodos avaliados. Com base nos resultados apresentados pode-se constatar que, o maior efeito dos metabólitos está em uma dose intermediária em relação ao crescimento da parte aérea da planta, sendo que o dobro dessa concentração pode ter levado a saturação e perda da ação fitopatogênica dos metabólitos.

A avaliação do comprimento da parte aérea mostra que as concentrações de 10 e 20 g.L⁻¹ de peptona apresentaram menor crescimento em relação as demais aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação. Nas concentrações de 40 g.L⁻¹ e 60 g.L⁻¹ de peptona observa-se diferenças significativas entre os dias 7 e 21 para a altura da planta, apresentando um efeito gradativo no decorrer destes dias. Aos 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos, o comprimento da parte aérea nas concentrações de 40, 60 e 80 g.L⁻¹ de peptona não diferiram estatisticamente entre si. Isso nos mostra que, no intervalo testado e para uma produção em escala industrial, o uso de concentrações de peptona maiores que 40 g.L⁻¹ terão os mesmos resultados, porém com maiores custos.

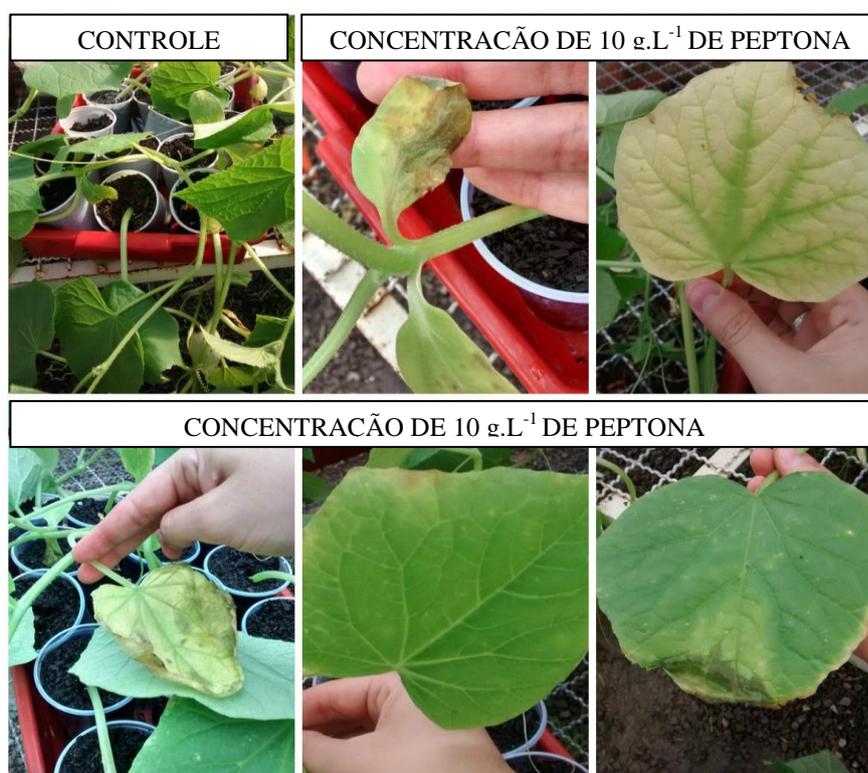
Nesse sentido, apesar dos resultados obtidos anteriormente no planejamento terem demonstrado que o maior crescimento de biomassa ocorreu na concentração de 80 g.L⁻¹ de

peptona, a concentração de 40 g.L⁻¹ foi escolhida para continuação dos ensaios, pois não apresentou diferença significativa com as concentrações maiores apresentando os melhores resultados em relação a avaliação da escala de fitotoxicidade (Tabela 2). Os resultados encontrados reforçam que a forma de ação do fitopatógeno neste caso, não está relacionada ao crescimento da biomassa.

A ação dos metabólitos com potencial de controle biológico se manifestou de diferentes maneiras, afetando tanto a parte aérea quanto o sistema radicular, conforme pode-se observar nas Figuras 9, 10, 11, 12 e 13.

De acordo com a Tabela 5 a avaliação da fitotoxicidade nos mostra que o tratamento utilizando a concentração de 10 g.L⁻¹ de peptona (Figura 7) demonstrou pouca fitotoxicidade sobre a planta *Cucumis sativus* apresentando um percentual de 20%, considerado um efeito leve.

Figura 7 - Sintomas de fitotoxicidade dos metabólitos do fungo *Fusarium graminearum* aplicados na concentração de 10 g.L⁻¹ de peptona em plantas de *C. sativus* aos 21 dias após a aplicação.

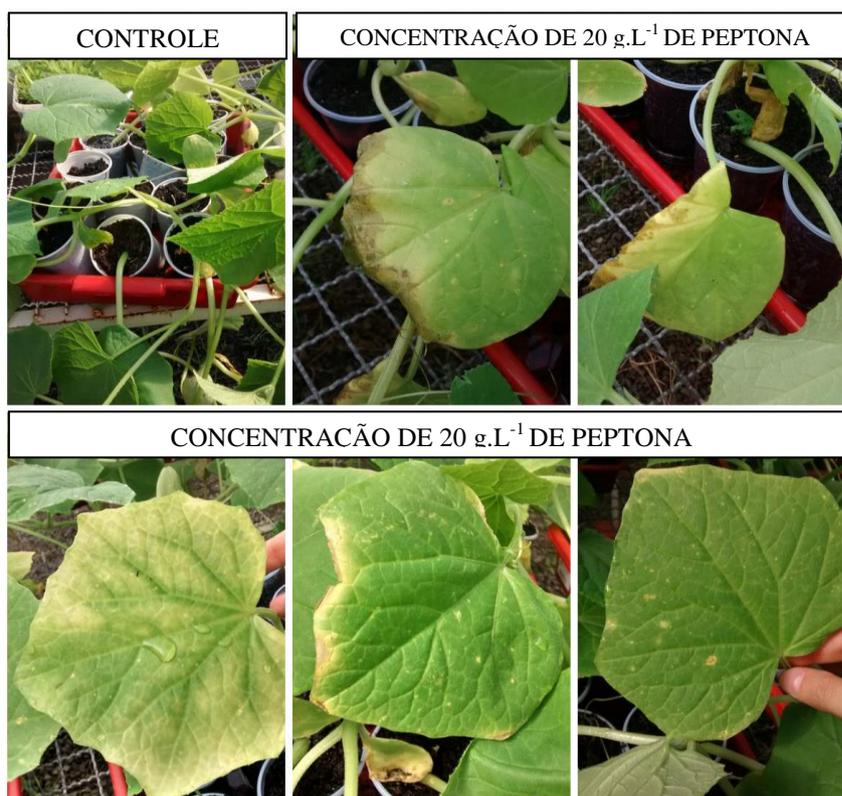


Fonte: A autora.

Conforme a Tabela 5, a avaliação da fitotoxicidade para a concentração de 20 g.L⁻¹ de peptona (Figura 8) indicou pouca atividade fitotóxica sobre a planta *Cucumis sativus*

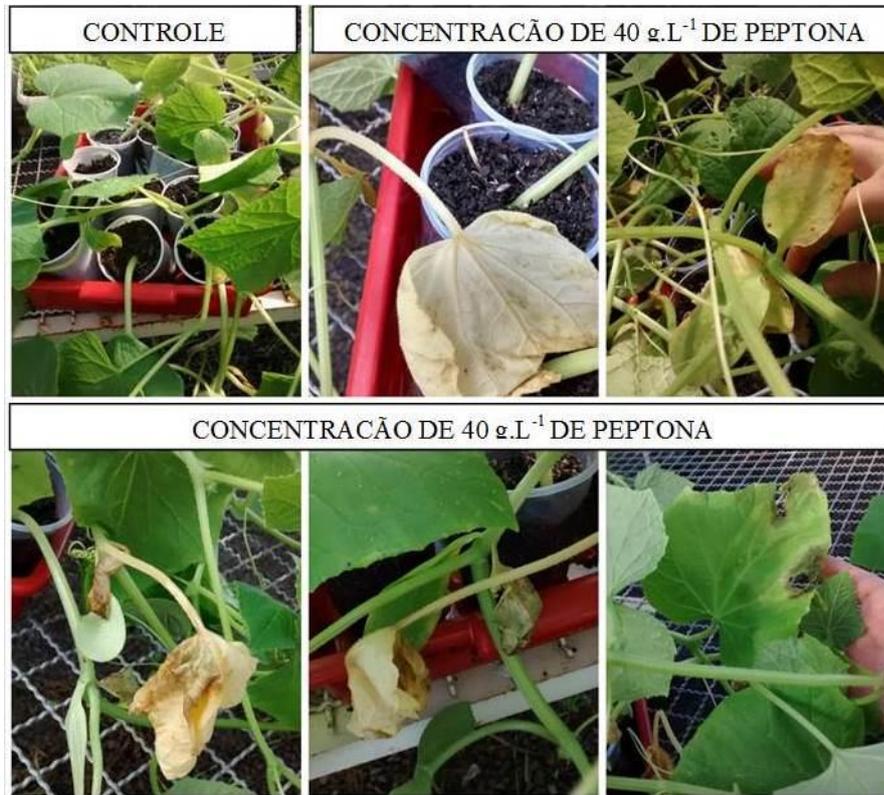
apresentando uma fitotoxicidade de 30%, considerado um efeito leve, que de acordo com a tabela de Frans & Crowley (1986), descrito como injúrias mais pronunciadas, mas não duradouras.

Figura 8 - Sintomas de fitotoxicidade dos metabólitos do fungo *Fusarium graminearum* aplicados na concentração de 20 g.L^{-1} de peptona em plantas de *C. sativus* aos 21 dias após a aplicação.



Fonte: A autora.

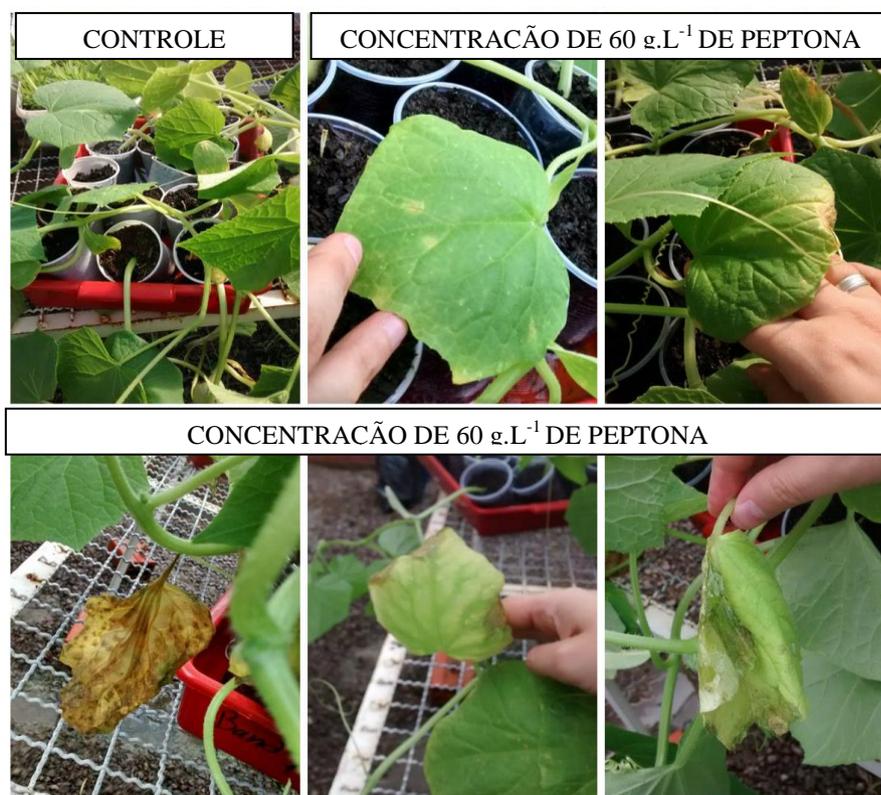
Figura 9 - Sintomas de fitotoxicidade dos metabólitos do fungo *Fusarium graminearum* aplicados na concentração de 40 g.L⁻¹ de peptona em plantas de *C. sativus* aos 21 dias após a aplicação.



Fonte: A autora.

De acordo com a Tabela 5 a avaliação da fitotoxicidade nos mostra que para a concentração de 40 g.L⁻¹ de peptona (Figura 9) observou-se o maior efeito fitotóxico sobre a planta *Cucumis sativus*, apresentando fitotoxicidade de 40%, considerado um efeito moderado, que de acordo com a tabela de Frans & Crowley (1986) é descrito como injúrias moderadas, normalmente com recuperação.

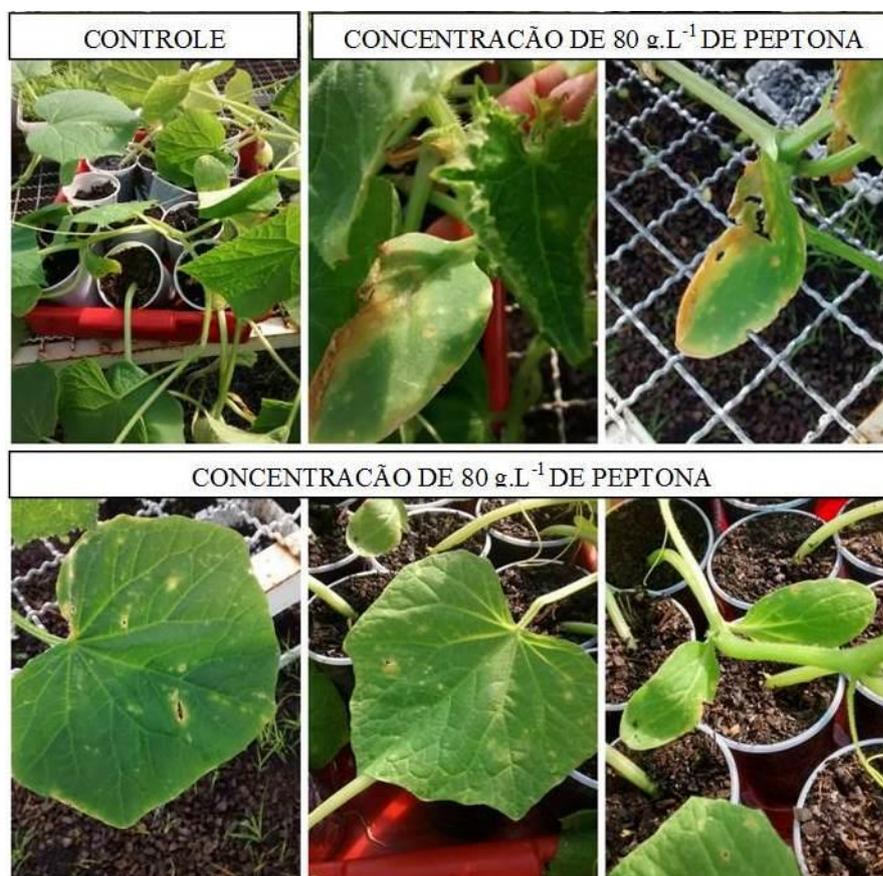
Figura 10 - Sintomas de fitotoxicidade dos metabólitos do fungo *Fusarium graminearum* aplicados na concentração de 60 g.L⁻¹ de peptona em plantas de *C. sativus* aos 21 dias após a aplicação.



Fonte: A autora.

Na Tabela 5, a avaliação da fitotoxicidade nos mostra que a concentração de 60 g.L⁻¹ de peptona (Figura 10) também demonstrou pouca atividade fitotóxica sobre a planta *Cucumis sativus* apresentando uma fitotoxicidade de 20%, considerado um efeito leve, de acordo com a tabela de Frans & Crowley (1986).

Figura 11 - Sintomas de fitotoxicidade dos metabólitos do fungo *Fusarium graminearum* aplicados na concentração de 80 g.L⁻¹ de peptona em plantas de *C. sativus* aos 21 dias após a aplicação.



Fonte: A autora.

Conforme avaliação da fitotoxicidade, apresentada na Tabela 5, observou-se que 80 g.L⁻¹ de peptona (Figura 11) demonstrou a menor atividade fitotóxica sobre a planta *Cucumis sativus* em relação aos outros tratamentos, apresentando uma fitotoxicidade de 10%, considerado um efeito leve, que de acordo com a tabela de Frans & Crowley (1986).

Nas Figuras 7, 8, 10 e 11 também pode-se observar a presença de sintomas como clorose e necrose nas folhas, assim como em outras houve clorose seguida de morte de algumas plantas devido a incapacidade da planta realizar a fotossíntese como no caso da Figura 9. Resultados semelhantes foram encontrados por Nachtigal e Pitelli (1999) onde ao estudar um isolado do fungo *Fusarium* sp. detectaram que o mesmo possui um bom potencial como agente de controle para plantas aquáticas *Egeria densa* e *Egeria najas*, causando sintomas de necrose e clorose foliar e se intensificando até uma destruição completa dos tecidos vegetais. A avaliação dos tratamentos foi realizada por meio da comparação com a

testemunha, sendo que nesta não houve danos nas folhas. Os sintomas ocorreram nas folhas onde houve o contato com o caldo fermentado.

Segundo Menezes (2009) o pepineiro é uma espécie sensível a uma gama de patógenos, dentre esses destaca-se o fungo *Fusarium* spp., agente causal da murcha de *Fusarium* no pepineiro. Esse fungo ataca o pepineiro em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, podendo ocasionar tombamento pré e pós – emergência. A descoloração vascular de raiz e caule é outro sintoma bastante comum. De acordo com Zitter et al. (1996), este micro-organismo ataca o pepineiro independente de qual seja seu estágio de desenvolvimento. A morte das mudas é comum, principalmente, em solos frios (18 – 20)°C, no entanto, também pode ocorrer em pré-emergência. Os sintomas se estabelecem normalmente em plantas mais velhas, ocasionando a murcha total da planta seguida de sua morte em três a cinco dias.

Conforme Gruszynski (2001), o patógeno pode se manifestar de diferentes formas, de acordo com as culturas existentes. O ataque do fungo nem sempre ocasiona a morte das plantas, provocando, muitas vezes, uma significativa redução no crescimento e ainda, o aparecimento de folhas “queimadas” de cor marrom na parte basal das plantas. Os sintomas da murcha de *Fusarium* também podem variar de acordo com a interação da cultivar da planta com os fatores ambientais, como as temperaturas do ar e do solo. Geralmente, os sintomas consistem na clorose da folha, murcha, descoloração vascular, necrose da haste e retardamento do crescimento. O pepino é afetado, comumente, por murchas vasculares, que são doenças economicamente importantes, causadas pelo fungo *Fusarium oxysporum*.

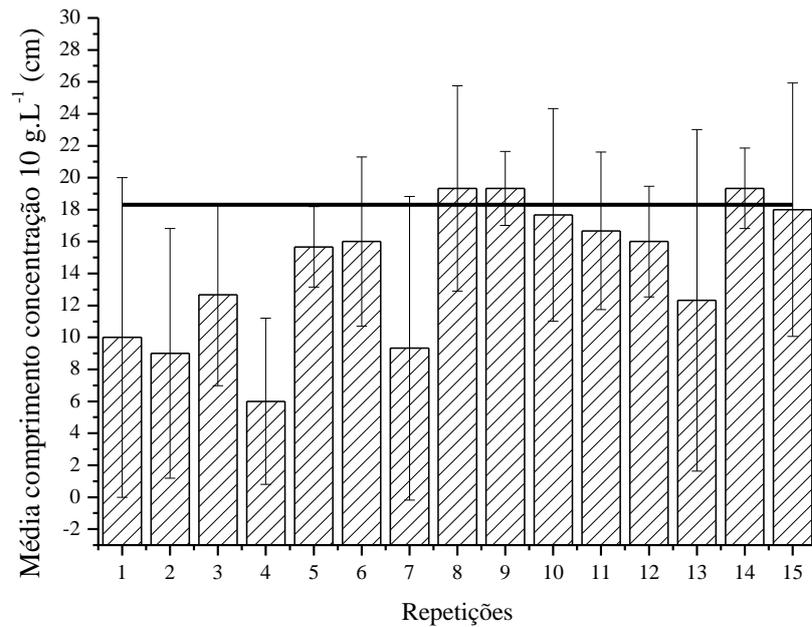
5.3.2 Avaliação do comprimento das raízes

O efeito da aplicação do caldo em diferentes concentrações de peptona (10, 20, 40, 60 e 80 g.L⁻¹) foi avaliado quanto ao seu efeito sobre o sistema radicular da planta *C. sativus* aos 21 dias após a aplicação. Os resultados dos bioensaios de cada tratamento são apresentados nas Figuras 12, 13, 14, 15 e 16.

Analisando as Figuras 12 e 13 nas concentrações de peptona de 10 e 20 g.L⁻¹ pode-se perceber que 80% das médias dos ensaios apresentaram um comprimento menor que a média do controle, considerando que a cada 15 plantas, 12 não atingiram a média. Nas Figuras 14 e 15 ao qual foram aplicadas as concentrações de 40 e 60 g.L⁻¹, respectivamente, ambas apresentaram efeito na redução do crescimento das raízes em 100% das amostras. Já a Figura 16 apresenta as médias de comprimento das raízes referente a concentração de peptona de 80

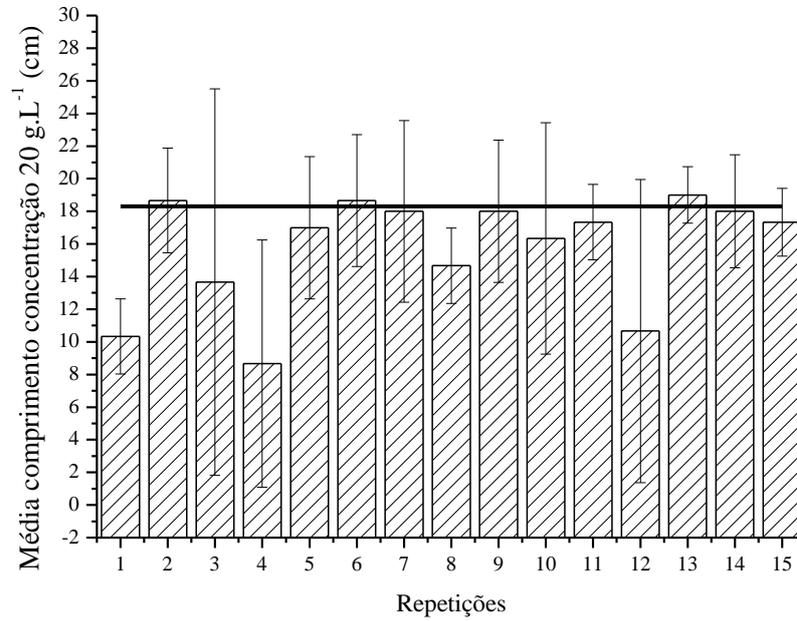
g.L^{-1} , onde obteve-se um efeito de redução de 86,7% dos ensaios, onde das 15 repetições 13 não atingiram a média.

Figura 12 - Média de comprimento das raízes utilizando como tratamento a concentração de peptona de 10 g.L^{-1} para as 15 repetições (— média do controle).



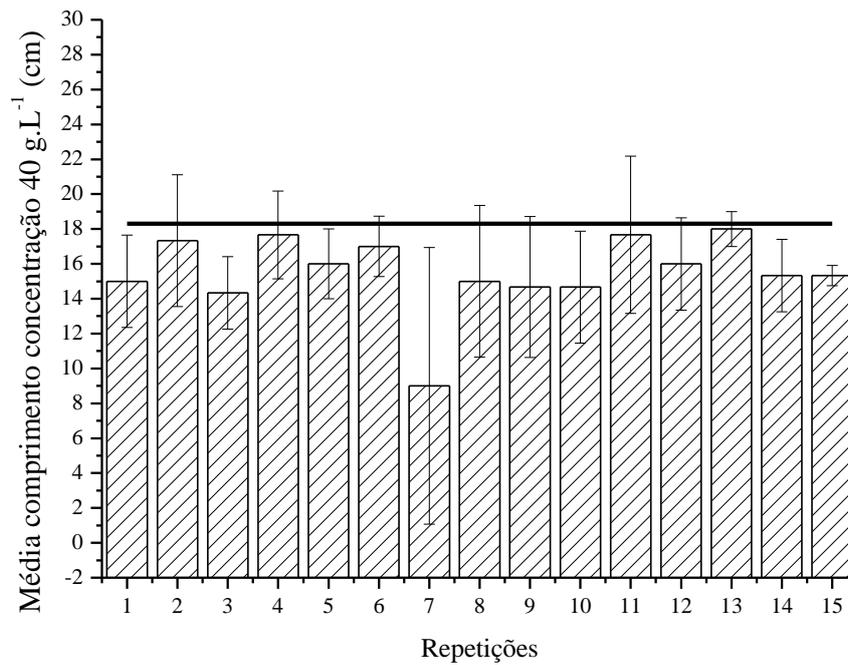
Fonte: A autora.

Figura 13 - Média de comprimento das raízes utilizando como tratamento a concentração de peptona de 20 g.L^{-1} para as 15 repetições (— média do controle).



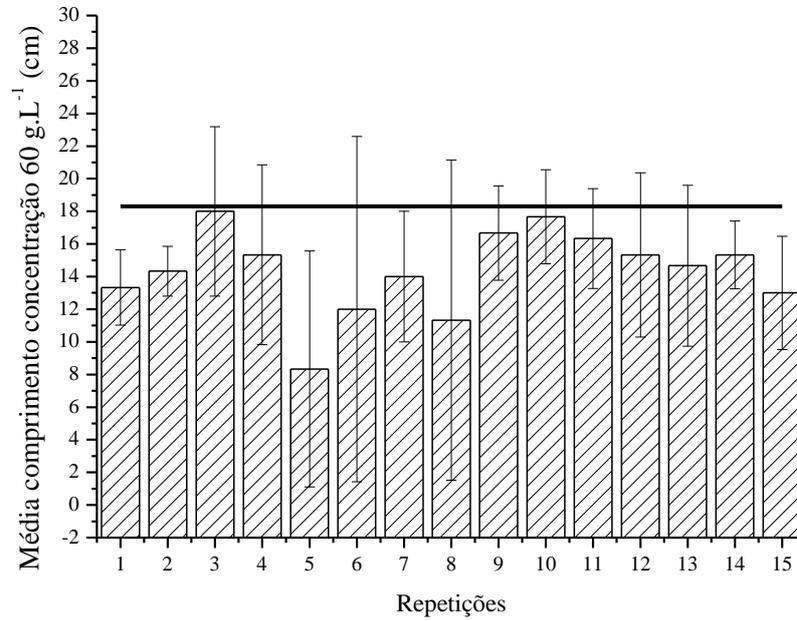
Fonte: A autora.

Figura 14 - Média de comprimento das raízes utilizando como tratamento a concentração de peptona de 40 g.L^{-1} para as 15 repetições (— média do controle).



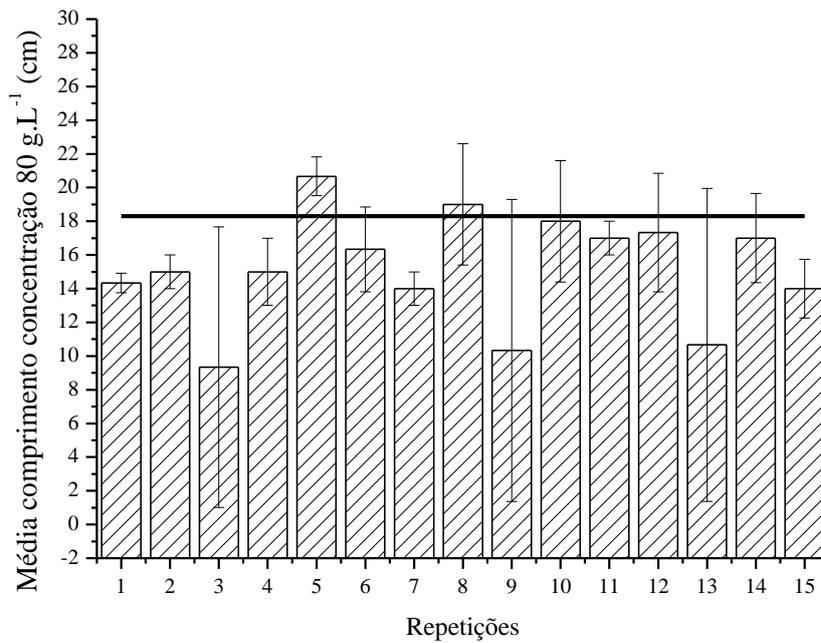
Fonte: A autora.

Figura 15 - Média de comprimento das raízes utilizando como tratamento a concentração de peptona de 60 g.L^{-1} para as 15 repetições (— média do controle).



Fonte: A autora.

Figura 16 - Média de comprimento das raízes utilizando como tratamento a concentração de peptona de 80 g.L^{-1} para as 15 repetições (— média do controle).



Fonte: A autora.

Comparando-se os diferentes tratamentos quanto ao efeito sobre o crescimento radicular da planta *C. sativus*, são apresentados na Tabela 6 os valores das médias de comprimento das raízes de plântulas de pepino para cada concentração aplicada.

Tabela 6 - Médias de comprimento de raízes de plântulas de pepino (*Cucumis sativus*), submetidas a diferentes concentrações de peptona.

Tratamento (g.L ⁻¹ de peptona)	Médias comprimento das raízes (cm)
Controle	18,3 ^a
10	14,5±6,1 ^b
20	15,8±4,8 ^{ab}
40	15,5±3,0 ^{ab}
60	14,4±4,7 ^b
80	15,2±3,4 ^{ab}

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 95% de confiança.
Fonte: A autora.

Na Tabela 6 pode-se verificar que a média dos comprimentos das raízes para os diferentes tipos de tratamentos aplicados variou entre 14,4 e 18,3 cm. Contudo, não houve diferença significativa, sugerindo que o modo de ação dos metabólitos do bioherbicida é de contato, ou seja, atuam simplesmente pelo contato com as plantas, não havendo translocação para dentro das mesmas (KARAM et al., 2006). Muitas vezes, o local onde o herbicida é aplicado não é o mesmo onde ele irá agir, assim, a maioria dos herbicidas atuam somente em um local alvo para matar a planta. Além disso, existem herbicidas no solo, que são aplicados diretamente ou incorporados onde passa a ser ocupado por sementes de plantas daninhas e mudas durante a germinação e desenvolvimento das plantas (CHRISTOFOLETTI, 1997; DUKE e DAYAN, 2011).

5.3.3 Avaliação das massas fresca e seca da parte aérea e da raiz

De acordo com a Tabela 7, apenas a massa seca da raiz na concentração de peptona de 60 g.L⁻¹ apresentou diferença estatística do controle, porém os demais, tanto a massa fresca e seca da parte aérea como a raiz apresentaram o mesmo comportamento, não apresentando nenhuma diferença significativa.

Tabela 7 - Médias das massas fresca e seca na parte aérea e raiz sobre plântulas de pepino (*Cucumis sativus*) 21 dias após a aplicação.

Tratamento (g.L ⁻¹ de peptona)	Haste		Raiz	
	Massa Fresca (g)	Massa Seca (g)	Massa Fresca (g)	Massa Seca (g)
Controle	268,93 ^a	13,71 ^a	63,06 ^a	4,38 ^a
10	244,01 ^a	13,71 ^a	44,05 ^a	3,59 ^{ab}
20	322,77 ^a	16,02 ^a	58,70 ^a	4,15 ^{ab}
40	324,89 ^a	20,07 ^a	48,64 ^a	2,96 ^{ab}
60	284,13 ^a	15,28 ^a	34,85 ^a	2,20 ^b
80	332,92 ^a	20,47 ^a	47,78 ^a	2,40 ^{ab}

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 95% de confiança.
Fonte: A autora.

5.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO FITOTÓXICO EM CASA DE VEGETAÇÃO PARA DIFERENTES TRATAMENTOS DO CALDO FERMENTADO

Nesta etapa foram realizadas novas fermentações a partir do melhor resultado obtido anteriormente, onde o parâmetro de fitotoxicidade foi decisivo na escolha do caldo fermentado com concentração de 40 g.L⁻¹ de peptona. As novas fermentações foram submetidas a diferentes processos de purificação/concentração.

5.4.1 Avaliação da altura das plantas

De acordo com a Tabela 8, nos tratamentos compostos pelo controle e pelos caldos bruto, liofilizado e retido (microfiltrado) ocorreu crescimento dos 7 aos 28 dias após a aplicação, já com o caldo permeado (microfiltrado) observou-se a morte de algumas plantas, justificando a redução das médias de crescimento dos 14 aos 28 dias após a aplicação.

A partir dos 14 dias após a aplicação até o final da avaliação, os tratamentos liofilizado parcialmente e a fração permeada da microfiltração foram os que apresentaram crescimento estatisticamente menor da parte aérea das plantas de *C. sativus*.

Tabela 8 - Média da altura da parte aérea (cm) de plântulas de pepino (*Cucumis sativus*).

Tratamento	7 DAA	14 DAA	21 DAA	28 DAA
Controle	4,4 ^{B,bc}	5,2 ^{A,ab}	5,4 ^{A,ab}	5,4 ^{A,a}
Caldo bruto	5,6 ^{A,a}	6,4 ^{A,a}	6,4 ^{A,a}	6,4 ^{A,a}
Liofilizado	4,3 ^{A,c}	3,8 ^{A,bc}	3,8 ^{A,bc}	3,7 ^{A,b}
MF – permeado	5,0 ^{A,ab}	3,7 ^{AB,c}	3,5 ^{B,c}	3,5 ^{B,b}
MF – retido	5,3 ^{A,a}	5,3 ^{A,ab}	5,4 ^{A,a}	5,3 ^{A,a}

DAA: dias após aplicação

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, letra maiúscula comparação na linha e minúscula comparação na coluna, pelo teste de Tukey a 95% de confiança.

MF-microfiltração

Fonte: A autora.

5.4.2 Avaliação da fitotoxicidade

De acordo com a Tabela 9, o tratamento utilizando o caldo bruto (Figura 17) aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação, apresentou pouca atividade fitotóxica sobre a planta *Cucumis sativus* com um percentual de fitotoxicidade de 10%, considerado um efeito leve, que de acordo com a tabela de Frans e Crowley (1986) é descrito por uma leve descoloração e atrofia, mesmo que algumas folhas da cultura tenham apresentado necrose ou até mesmo causando a morte da planta.

Tabela 9 - Avaliação da fitotoxicidade em plantas de plântulas de pepino (*Cucumis sativus*).

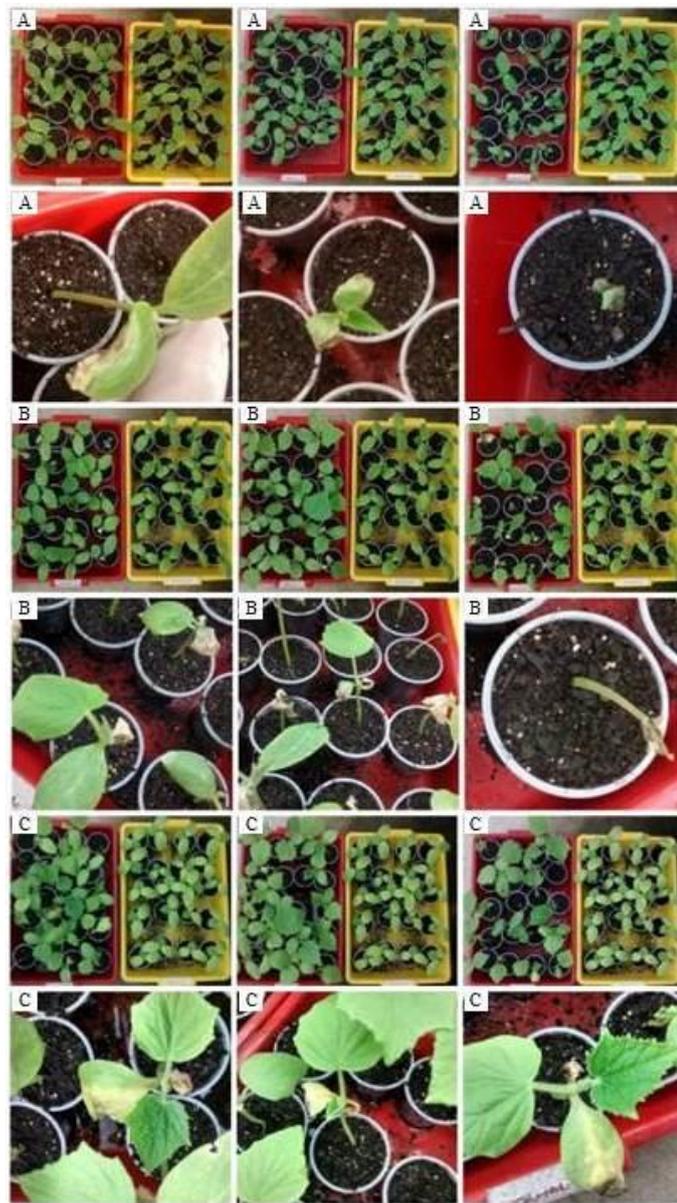
Tratamento	Fitotoxicidade (%)		
	7 DAA	14 DAA	21 DAA
Controle	0	0	0
Caldo bruto	10	10	10
Liofilizado	26	50	50
MF – permeado	36	60	50
MF – retido	23	33	30

DAA: dias após a aplicação

MF-microfiltração

Fonte: A autora.

Figura 17 - Sintomas de fitotoxicidade do caldo bruto em plantas de *C. sativus*. (A) - 7 DAA, (B) - 14 DAA, (C) - 21 DAA.



Bandejas vermelhas = tratamento, bandejas amarelas = controle.
 Fonte: A autora.

O tratamento com o caldo liofilizado (Figura 18) demonstra que aos 7 dias, o percentual de fitotoxicidade foi de 26% considerado assim, um efeito leve. Já aos 14 dias esse percentual subiu para 50% onde se manteve até os 21 dias, sendo esse efeito considerado moderado, de injúrias mais duradouras e de recuperação duvidosa.

Figura 18 - Sintomas de fitotoxicidade do caldo liofilizado em plantas de *C. sativus*. (A) - 7 DAA, (B) - 14 DAA, (C) - 21 DAA.



Bandejas vermelhas = tratamento, bandejas amarelas = controle.
 Fonte: A autora.

De acordo com a Tabela 9 a avaliação da fitotoxicidade nos mostra que o tratamento utilizando o caldo permeado (Figura 19) aos 7 e 14 dias demonstraram as maiores atividades fitotóxicas sobre a planta *Cucumis sativus* apresentando um percentual de fitotoxicidade de 36 e 60% respectivamente, já aos 21 dias se manteve igual aos tratamento utilizando o caldo retido. Evidente et al. (2008) obtiveram resultados promissores ao avaliar a ação herbicida das fitotoxinas produzidas pelo fungo *Phyllosticta cirsii*, utilizando um extrato bruto e purificado

por coluna de sílica gel eluída com um sistema de solvente em diferentes frações em folhas destacadas de *Cirsium arvense* (mal-me-quer dos campos) pelo teste de punctura, as toxinas puras e as frações foram primeiro dissolvidas numa pequena quantidade de metanol, logo após diluídas em 20 µl de soluções de teste e aplicadas nas folhas perfuradas e mantidas em câmaras umedecidas sob luz contínua. O aparecimento dos sintomas foi observado 3 dias após a aplicação das gotas.

Figura 19 - Sintomas de fitotoxicidade do caldo permeado em plantas de *C. sativus*. (A) - 7 DAA, (B) - 14 DAA, (C) - 21 DAA.



Bandejas vermelhas = tratamento, bandejas amarelas = controle.
 Fonte: A autora.

De acordo com a Tabela 9 a avaliação da fitotoxicidade utilizando o caldo retido (Figura 20) aos 7, 14 e 21 dias demonstraram atividades fitotóxicas sobre a planta *Cucumis sativus* apresentando um percentual de fitotoxicidade de 23, 33 e 30%, respectivamente, considerado um efeito leve, que de acordo com a tabela de Frans e Crowley (1986) como alguma descoloração e atrofia, mesmo que algumas folhas da cultura tenham apresentado necrose ou até mesmo causando a morte da planta.

Figura 20 - Sintomas de fitotoxicidade do caldo retido em plantas de *C. sativus*. (A) - 7 DAA, (B) - 14 DAA, (C) - 21 DAA.



Bandejas vermelhas = tratamento, bandejas amarelas = controle.
Fonte: A autora.

Figura 21 - Comparação dos controles (A) 7 e (B) 28 dias após a aplicação.



Fonte: A autora.

Figura 22 - Tratamentos e controle aos 28 dias após a aplicação, (A) caldo bruto, (B) caldo liofilizado, (C) caldo permeado e (D) caldo retido.



Bandejas vermelhas = tratamento, bandejas amarelas = controle.

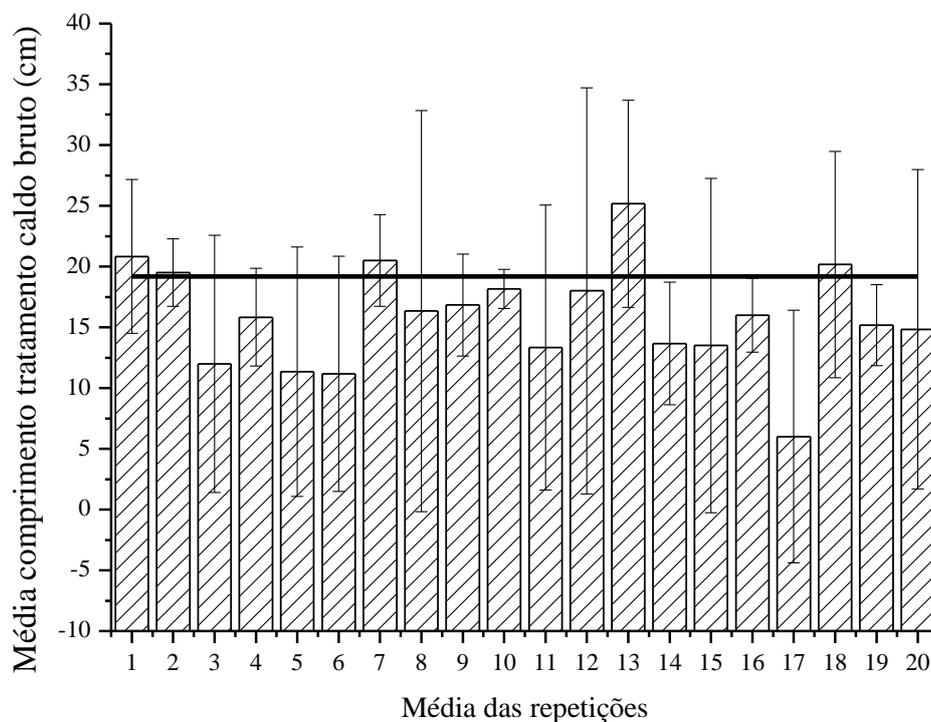
Fonte: A autora.

Após os 28 dias da aplicação dos tratamentos não foi realizada a avaliação visual da fitotoxicidade, pois foi observado o amarelecimento da cultura de *C. sativus*, ocorrido provavelmente pelas condições que as amostras foram mantidas no decorrer do tempo, sem realização de adubação (Figuras 21 e 22). O amarelecimento pode ter ocorrido devido a uma falta de absorção de nutrientes, levando a redução do teor de clorofila nas folhas afetando assim a fotossíntese (FERREIRA et al., 2015; NESMITH e DUVAL, 1998).

5.4.3 Avaliação do comprimento das raízes

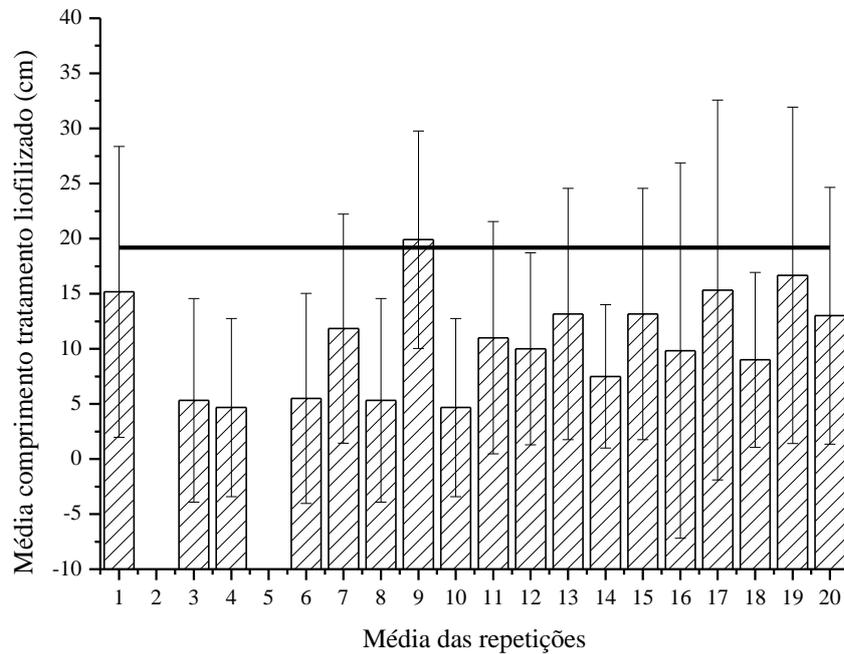
O efeito da aplicação do caldo bruto e dos demais tratamentos foi avaliado quanto ao seu efeito sobre o sistema radicular da planta *C. sativus*. Os resultados dos bioensaios de cada tratamento são apresentados nas Figuras 23, 24, 25 e 26.

Figura 23 - Média de comprimento das raízes utilizando como tratamento o caldo bruto (— média do controle).



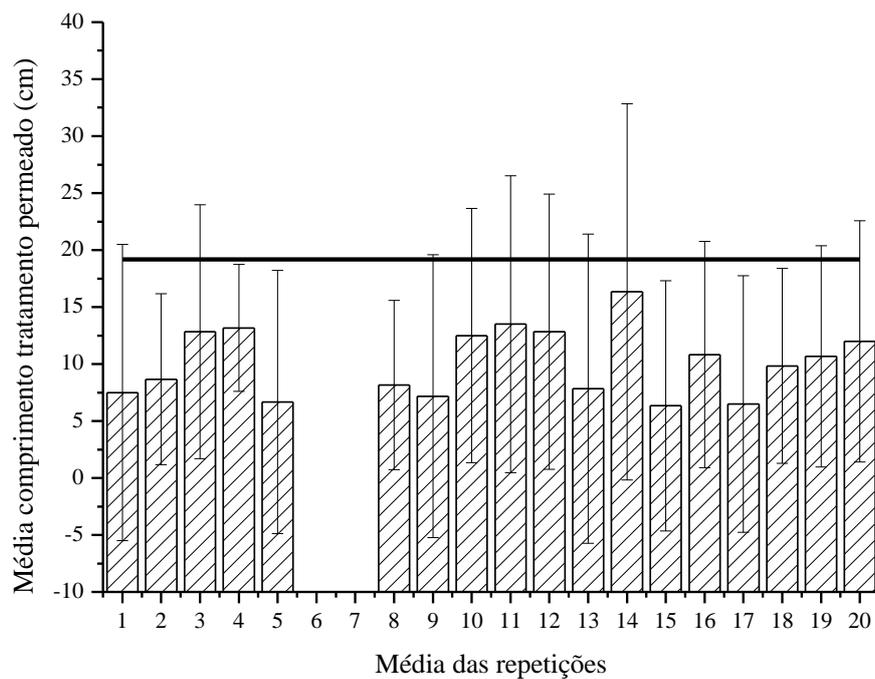
Fonte: A autora.

Figura 24 - Média de comprimento das raízes utilizando como tratamento o caldo liofilizado parcialmente (— média do controle).



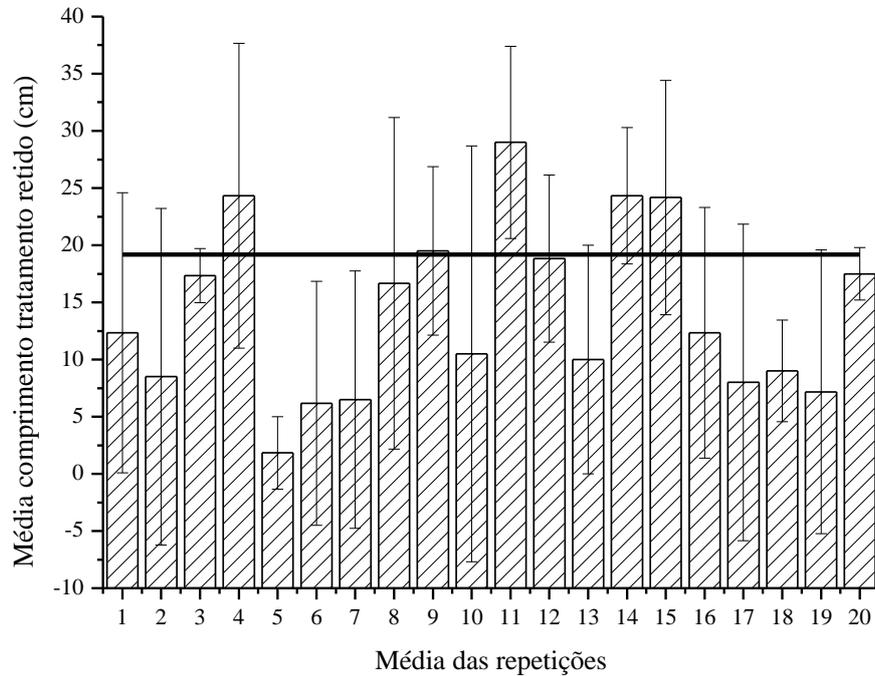
Fonte: A autora.

Figura 25 - Média de comprimento das raízes utilizando como tratamento o caldo microfiltrado da fração permeada (— média do controle).



Fonte: A autora.

Figura 26 - Média de comprimento das raízes utilizando como tratamento o caldo microfiltrado da fração retida (— média do controle).



Fonte: A autora.

Analisando-se a Figura 23, pode-se perceber que 75% das médias dos ensaios apresentaram um comprimento menor que a média do controle. O caldo liofilizado parcialmente (Figura 24) apresentou efeito reduzindo o crescimento das raízes de 85% das amostras e inibiu totalmente o crescimento de outras duas. As frações permeada (Figura 25) e retida (Figura 26) dos caldos microfiltrados tiveram efeito inibidor do crescimento das raízes em 100 e 80% dos ensaios, respectivamente.

A fim de comparação dos diferentes tratamentos quanto ao efeito sobre o crescimento radicular da planta *C. sativus* são apresentados na Tabela 10 os valores das médias de comprimento das raízes de plântulas de pepino para cada tratamento aplicado.

Tabela 10 - Médias de comprimento de raízes de plântulas de pepino (*Cucumis sativus*), submetidas a diferentes tratamentos.

Tratamentos	Média do comprimento das raízes (cm)
Controle	19,18±5,3 ^a
Caldo bruto	15,92±4,7 ^{ab}
Liofilizado parcialmente	9,55±4,4 ^c
MF - Permeado	9,17±4,1 ^c
MF - Retido	14,20±4,5 ^b

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 95% de confiança.

MF-microfiltração

Fonte: A autora.

Na Tabela 10, observa-se que a média dos comprimentos das raízes para os diferentes tipos de tratamento aplicados variou entre 9,17 e 19,18 cm. Os ensaios utilizando caldo bruto apresentaram um valor de média que não diferiu significativamente do valor da média do controle. Isto confirma a necessidade de um tratamento a fim de concentrar os compostos bioativos no caldo antes de sua aplicação na planta. Ambos os valores das médias dos tratamentos de liofilização parcial e microfiltração (permeado e retido) apresentaram diferença significativa do valor de média do controle. Logo, pode-se afirmar que o caldo resultante da fermentação submersa do fungo *Fusarium graminearum*, quando concentrado por algum dos tratamentos utilizados, apresenta efeito inibidor sobre o crescimento e desenvolvimento das raízes de *C. sativus*.

Segundo trabalho de Pakdaman et al. (2011), isolados de *Fusarium graminearum* que produziram maiores quantidades da toxina semipurificada de desoxinivalenol inibiram consideravelmente a germinação de sementes de trigo. As fitotoxinas semipurificadas não causaram somente efeitos inibidores em sementes germinadas, mas também influenciaram no crescimento de raízes devido à toxicidade dos extratos fúngicos.

Estudos de Buerstmayr et al. (1997) e Packa e Koczowska (1987), também demonstram a produção da toxina desoxinivalenol pelo fungo *Fusarium* em culturas de trigo e triticales inibindo a germinação e interferindo no crescimento da raiz primária e do caule.

5.4.4 Avaliação das massas fresca e seca da parte aérea e da raiz

De acordo com a Tabela 11 observa-se não haver diferença estatística significativa ($p < 0,05$) nos parâmetros de massa fresca e massa seca da haste e da raiz. Isso indica que o metabólito responsável pela ação bioherbicida não tem efeito sobre as massas fresca e seca da haste e da raiz das plantas de pepino, mostrando que o efeito fitotóxico acontece por outras vias.

Tabela 11 - Médias dos efeitos dos tratamentos na parte aérea e raiz sobre plântulas de pepino (*Cucumis sativus*).

Tratamento	Haste		Raiz	
	Massa Fresca (g)	Massa Seca (g)	Massa Fresca (g)	Massa Seca (g)
Controle	22,64 ^a	5,14 ^a	20,42 ^a	0,76 ^a
Caldo bruto	28,82 ^a	5,62 ^a	32,03 ^a	0,74 ^a
Liofilizado parcialmente	29,68 ^a	5,79 ^a	23,47 ^a	0,72 ^a
MF – permeado	19,83 ^a	4,74 ^a	21,55 ^a	0,32 ^a
MF – retido	33,20 ^a	6,15 ^a	31,33 ^a	0,73 ^a

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 95% de confiança.

MF-microfiltração

Fonte: A autora.

Nesse sentido, escolheu-se o tratamento com a fração permeada para as extrações líquido-líquido com solvente, pois apresentou o menor crescimento e maior efeito nas plantas teste. Além disso, as operações utilizando o processo de separação por membranas em geral são mais simples e de fácil escalonamento (HABERT et al., 2006).

5.5 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS

Após o fracionamento dos compostos por extração líquido-líquido com etanol e acetato de etila foi feita a caracterização química através de CG-MS dos extratos.

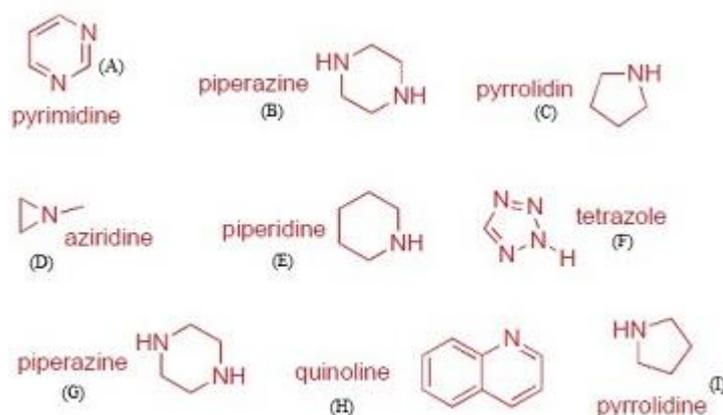
O tratamento escolhido para a identificação dos compostos foi aquele que se destacou melhor em relação ao maior número de critérios analisados como menor comprimento das raízes e maior fitotoxicidade, sendo selecionado o caldo permeado. Também foi escolhido o

tratamento do caldo bruto para a identificação dos compostos, pois este não passou por nenhum processo de concentração, apenas foi separado da biomassa.

Além disso, foi realizada a caracterização química dos compostos presentes somente no meio sintético apenas como parâmetro de comparação entre os tratamentos, pois neste não houve a inoculação do fungo, a fim de que se garanta que a toxina com potencial bioherbicida provem do metabolismo do fungo.

Observando a Tabela 12, para o caldo bruto fracionado no extrato etanólico, foi identificada a presença de 12 substâncias, entre elas: pirimidinas (Figura 27.A), piperazinas (Figura 27.B), pirrolidinas (Figura 27.I), piperidinas (Figura 27.E) e aziridinas (Figura 27.D). Os compostos detectados em maior quantidade (área do cromatograma) foram: Piperidine, 3,5-dimethyl- (6,94%), L-Phenylalanine (6,88%) e 3-Pyrrolidin-2-yl-propionic acid (4,46%). Já no tratamento permeado fracionado no extrato etanólico observou-se a presença de 9 substâncias, entre elas também foram encontradas piperazinas, pirrolidinas, e pirimidinas, também detectadas no caldo bruto. Alguns aparecem em maiores quantidades, entre eles: 2-(e)-heptensaeure, (4s)-4-[(r)-alanyl]amino]-6-methyl- (12,59%), 2-amino-3-phenyl-propionic acid (5,01%), 3-Pyrrolidin-2-yl-propionic acid (4,46 e 4,06%) e 2-(Dimethylamino)-3-methyl-1-butene (4,10%).

Figura 27 - Exemplos de alguns grupos de compostos heterocíclicos nitrogenados.



Fonte: A autora.

Pyridin-2(1H)-ones são conhecidas por possuir uma gama de atividades biológicas, entre elas: ação analgésica, antifúngica, antimalárica, anti-inflamatória, anti-bacteriana, anti-HIV, anti-tumoral, propriedades antivirais e fitotóxicas (ÖZTÜRK et al., 2001; COCCO et al., 2003). As Pyridin-2(1H)-ones têm sido utilizadas como intermediários versáteis na síntese de

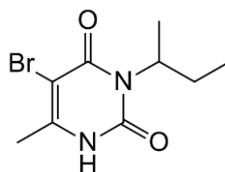
uma grande variedade de heterocíclicos contendo nitrogênio, tais como: piridina, quinolizidina, e alcalóides indolizidínicos (TORRES et al., 2005; JAUASINGHE et al., 2006). Alguns estudos relatam suas atividades fitotóxicas contra *Sorghum bicolor*, *Cucumis sativus* e *Ipomoea grandifolia* (DEMUNER et al., 2009).

Resultados de Goshaev (1993) mostraram que o composto 3-Butylpyridine é o agente causador da murcha do *Fusarium* no algodão, tomate, e outras culturas agrícolas. Também foi relatada que a capacidade do 3-Butylpyridine em provocar o surgimento dos sintomas de podridão era 22 vezes superior a do ácido fusárico. Derivados de pirazinas, além de fitotóxicos, com atividades herbicidas e fungicidas, nos casos de produtos farmacêuticos, possuem propriedades anti-virais, anti-cancerígenas e anti-micobacterianas. Também são encontrados naturalmente em muitos vegetais, insetos, vertebrados terrestres, e organismos marinhos e são produzidos por micro-organismos durante seus metabolismos primários ou secundários (DOLEZAL & KRALOVA, 2011).

Dentre as substâncias, a 2,4(1H,3H)-Pyrimidinedione, pertencente ao grupo das pirimidinas, é conhecida por fazer parte da composição do herbicida químico Bromacil (Figura 28), cujo nome químico é 5-bromo-6-methyl-3-(1-methylpropyl)-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione. É um herbicida seletivo sendo rapidamente absorvido pelas raízes e pouco absorvido através das folhas, sendo moderadamente solúvel em acetona, bases aquosas fortes, acetonitrila, e álcool etílico e ligeiramente solúvel em hidrocarbonetos (MEISTER, 1992).

Metabólitos contendo em sua composição o ácido propiônico também se destacam na Tabela 12, tanto no caldo bruto como no permeado. No caldo bruto os dois compostos 3-Pyrrolidin-2-yl-propionic acid, apresentaram tempos de retenção de 6,303 e 6,523 mim e picos de área de 4,46 e 1,75% respectivamente. WU et al. (2003) avaliaram o efeito fitotóxico do ácido propiônico e ácido ρ -cumárico extraídos de palha de trigo em 2 variedades de azevém resistentes a herbicidas químicos. Os bioensaios mostraram que o ácido ρ -cumárico e o ácido propiônico inibiram significativamente o crescimento das duas variedades de azevém. Os dois compostos inibiram completamente o crescimento radicular em concentrações superiores a 5,0 mM. Em comparação com ácido ρ -cumárico, o ácido propiônico foi o que melhor inibiu a germinação das sementes e crescimento radicular de ambas as variedades de azevém.

O ácido propiônico é conhecido também por fazer parte de alguns herbicidas químicos já existentes. Dentre eles o 2-(4-chlorophenoxy) propionic acid de nome comum 4-CPP e o 2,2,3-trichloropropionic acid de nome comum 2,2,3-TPA, ambos aprovados pela Sociedade Americana de plantas daninhas.

Figura 28 - Estrutura química do herbicida Bromacil.

Fonte: <http://www.worldofchemicals.com/chemicals/chemical-properties/bromacil.html>

Tabela 12 - Caracterização química dos compostos presentes na fração etanólica do caldo bruto e permeado resultante da extração líquido-líquido do sobrenadante produzido pelo fungo *Fusarium graminearum*.

Composto	TR* (min)	% Área Total
Caldo bruto – Etanol		
2,4(1H,3H)-Pyrimidinedione	4,538	1,98
3-methyldioxopiperazine	4,621	1,82
L-Phenylalanine	4,731	6,88
Butanedioic acid, 2-isopropenyl-2-methyl-	5,955	1,13
3-Pyrrolidin-2-yl-propionic acid	6,303	4,46
3-Pyrrolidin-2-yl-propionic acid	6,523	1,75
1-methoxy-2,2-di(aminocarbonyl)-1-aza-cyclopropane	8,135	1,33
di-2-benzothiazole disulfane	8,290	1,14
Piperidine, 3,5-dimethyl-	8,525	6,94
3,9-diazatricyclo[7.3.0.0(3,7)]dodecan-2,8-dione	8,575	1,85
Piperidine, 3,5-dimethyl-	8,650	2,38
1-Aziridinepropanoic acid, 2-methyl-3-(1-methylethyl)-, ethyl Ester,	8,710	1,66
Hexahydro-2(1H)-azocinone	8,838	1,30
Hexahydro-2(1H)-azocinone	8,969	2,71
5,10-Diethoxy-2,3,7,8-tetrahydro-1H,6H-dipyrrolo[1,2-a:1',2'-d]pyrazine	12,079	1,72
Permeado – Etanol		
Cycloglycylalanine	4,350	2,40
2,4(1H,3H)-Pyrimidinedione	4,525	2,92
3-methyldioxopiperazine	4,615	2,59
2-amino-3-phenyl-propionic acid	4,715	5,01
3-Pyrrolidin-2-yl-propionic acid	6,304	4,46
2-(e)-heptensaeure, (4s)-4-[(r)-alanyl]amino]-6-methyl-,	8,526	12,59
5,10-Diethoxy-2,3,7,8-tetrahydro-1H,6H-dipyrrolo[1,2-a:1',2'-d]pyrazine	8,590	3,16
2-(Dimethylamino)-3-methyl-1-butene	8,655	4,10
Hexahydro-2(1H)-azocinone	8,967	2,47
3-Pyrrolidin-2-yl-propionic acid	11,098	4,06

*TR: Tempo de retenção

Fonte: A autora.

Observando a Tabela 13 o caldo bruto fracionado com acetato de etila, identificou a presença de 8 substâncias, entre elas: piperazinas (Figura 27.B), quinolinas (Figura 27.H), pirrolidinas (Figura 27.I) e tetrazóis (Figura 27.F). Os compostos majoritários (% de área) identificados foram: 2,5-Piperazinedione, 3,6-bis(2-methylpropyl)- (8,86%), 2,5-dioxo-3-isopropyl-6-methylpiperazine (7,89%), Quinoline, 4-chloro-6-methoxy-2-methyl-(7,42%) e 3-benzyl-1,4-diaza-2,5 dioxobicyclo[4.3.0]nonane (6,99 e 6,49%). Já no tratamento permeado fracionado no extrato de acetato de etila observou-se a presença de outras 5 substâncias. Alguns aparecem em maiores quantidades (% de área), entre eles: Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)- (9,46%) e Pentadecane, 8-hexyl- (7,54%).

Estudos de Rasekhi et al., (2014) utilizando o fungo *Fusarium proliferatum*, onde os filtrados da cultura foram submetidos a extração de metabólitos com acetato de etila. Os resultados da CG-MS revelaram a presença de diferentes metabólitos, dentre eles: Pyridine, 3-butyl-; Pyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl-; Palmitic acid; Stearic acid; Oleic acid; Adipic acid; Piperitenone oxide e Phthalic acid, butyl isobutyl ester, identificadas como fitotoxinas e compostos tóxicos contra fungos e bactérias, possuindo atividades biológicas.

A toxina 1-(1-pirrolidinil)-(2E, 4E)-2,4-decadien-1-ona (sarmentine) é uma amida natural isolada a partir dos frutos de espécies Piper (o nome Piper é originário da palavra árabe que designa pimenta). O composto tem um número de propriedades biológicas interessantes, incluindo a sua atividade de largo espectro em plantas daninhas agindo como um herbicida de contato. Estudos destacam uma semelhança na resposta entre plantas tratadas com sarmentine e herbicidas, tais como sabões de ácido pelargônico (ácido nonanóico) (DAYAN, 2015; DYER e PALMER, 2004; JARAMILLO et al., 2001).

Tabela 13 - Caracterização química dos compostos presentes na fração de acetato de etila do caldo bruto e permeado resultante da extração líquido-líquido do sobrenadante produzido pelo fungo *Fusarium graminearum*.

Composto	TR* (min)	% Área Total
Caldo bruto – Acetato de Etila		
2,5-dioxo-3-isopropyl-6-methylpiperazine	6,427	7,89
5.alpha.,3.alpha.-formoxyandrostan-11-ene-17-one	8,785	5,86
Quinoline, 4-chloro-6-methoxy-2-methyl-	8,989	7,42
3-benzyl-1,4-diaza-2,5-dioxobicyclo[4.3.0]nonane	9,229	5,92
4-[5-(4-Fluoro-phenyl)-tetrazol-2-yl]-butyramide	9,869	5,83
2,5-Piperazinedione, 3,6-bis(2-methylpropyl)-	10,768	8,86
Benzoic acid, 3-methoxy-, 4-benzyloxyphenyl ester	10,893	5,51
3-benzyl-1,4-diaza-2,5 dioxobicyclo[4.3.0]nonane	13,139	6,49
1-[2-(adamantan-1-yloxy)-ethyl]-2-(4-bromo-phenyl)	13,329	4,22
3-benzyl-1,4-diaza-2,5-dioxobicyclo[4.3.0]nonane	13,781	6,99
Permeado – Acetato de Etila		
Pentadecane, 8-hexyl-	4,176	7,54
Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	4,361	9,46
Cycloalanylleucine	6,432	4,41
1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) Ester	7,751	5,53
Docosane	7,840	5,41

*TR: Tempo de retenção.

Fonte: A autora.

A maioria dos compostos encontrados fazem parte do grupo dos compostos heterocíclicos nitrogenados que se caracterizam por conter um elemento diferente do carbono em sua estrutura. Essas substâncias desempenham papel importante em diversas áreas, apresentando uma grande diversidade de exemplos de origem natural com atividade biológica, principalmente no desenvolvimento de agroquímicos (MELO et al., 2006)

Arnone (2002) avaliando compostos extraídos em acetato de etila obtido do fungo *Cryphonectria parasitica* (Murr.), isolou vários metabólitos secundários dentre eles o ácido crifonétrico, componente majoritário do extrato, que apresenta comprovada atividade fitotóxica, sendo capaz de inibir completamente o crescimento de sementes de tomate.

Fazendo uma comparação entre as Tabelas 12 e 13, nas extrações com o tratamento permeado, visualiza-se que na fração etanólica houve a identificação de mais metabólitos que na fração com acetato de etila, totalizando a presença de 10 substâncias, ao qual se destacam 2-(e)-heptensaeure, (4s)-4-[(r)-alanyl]amino]-6-methyl- e 2-amino-3-phenyl-propionic acid. Já na fração de acetato de etila extraiu-se apenas 5 metabólitos, com destaque para Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)- (9,46%) e Pentadecane, 8-hexyl- (7,54%), porém não há semelhança entre nenhuma delas. Assim, os principais, por apresentarem os maiores picos, pode(m) ser o(s) responsável(is) pelo efeito fitopatológico, como também, pode ter ocorrido um efeito sinérgico entre eles.

Talvez o composto bioativo tenha permanecido na fração orgânica, sendo necessário a extração com outros solventes mais apolares para garantir a quantificação total das substâncias presentes.

Alguns metabólitos secundários têm aplicações benéficas e funções muitas vezes desconhecidas do organismo que os produz, porém com notável importância para as indústrias médica, farmacêutica e agrícola (SIDDIQUEE, 2015).

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados pode-se concluir que:

- O fungo previamente isolado do Bioma Mata Atlântica foi identificado como *Fusarium graminearum*;
- As condições de fermentação submersa foram otimizadas para a produção de um bioherbicida utilizando o fungo *Fusarium graminearum*. Dentre as variáveis independentes testadas a peptona foi a única que apresenta efeito significativo em relação a biomassa, entretanto analisando-se a eficiência fitopatogênica dos caldos fermentados, em experimentos realizados em casa de vegetação, verificou-se que não existia correlação entre aumento de biomassa e aumento de fitotoxicidade;
- Ao avaliar a eficiência dos diferentes tratamentos aplicados no bioensaio em casa de vegetação, o tratamento com a fração permeada após a microfiltração apresentou o melhor resultado frente aos parâmetros de altura das plantas, fitotoxicidade e comprimento das raízes;
- A partir da extração e caracterização das frações contendo os metabólitos secundários produzidos por fermentação submersa de *Fusarium graminearum* foram identificados principalmente compostos heterocíclicos nitrogenados, entre eles: pirimidinas, piperazinas, pirrolidinas, piperidinas, aziridinas, quinolinas e tetrazóis.

O micro-organismo *Fusarium graminearum* isolado do bioma Mata Atlântica produziu compostos secundários que apresentaram efeito fitotóxico sobre as plantas teste, dentre os principais efeitos observados pode-se destacar lesões foliares, como amarelecimento, manchas e necroses.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Otimização da produção do fungo *Fusarium graminearum* em meio industrial;
- Realização dos bioensaios também em pré-emergência e em folhas destacadas;
- Realização da extração líquido-líquido com um maior número de solventes orgânicos de diferentes polaridades;
- Concentração dos metabólitos produzidos através da utilização de colunas de separação (cromatográficas).

REFERÊNCIAS

- ABBAS, H. K. et al. Phytotoxicity and mammalian cytotoxicity of macrocyclic trichothecene mycotoxins from *Myrothecium verrucaria*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 3, p. 309-13, Feb 2002. ISSN 0031-9422 (Print) 0031-9422 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11830139> >.
- ABBAS, H. K. et al. Phytotoxicity of australifungin, AAL-toxins and fumonisin B 1 to *Lemna pausicostata*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 1509–1514, 1998.
- ABBASHER, A. A.; SAUERBORN, J. *Fusarium nygamai*, a potential bioherbicide for *Striga hermonthica* control in sorghum. **Biological Control**, v. 2, p. 291-296, 1992.
- ALVES, M. C. S. et al. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39 p. 1083-1086, 2004.
- ANDERSON, R. C.; GARDNER, D. E. An evaluation of the wilt-causing bacterium *Ralstonia solanacearum* as a potential biological control agent for the alien kahili ginger (*Hedychium gardnerianum*). **Hawaiian forests Biological Contro**, v. 15, p. 89–96, 1999.
- ANTOSIK, M.; STRYJEK, R. Liquid-liquid equilibria in ternary-pinene + 3-carene + polar compound systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 71, p. 321-331 1992.
- ARCE, A. et al. A. Liquid-liquid equilibria of limonene + linalool + diethylene glycol system at different temperaturas. **Chemical Engineering Journal**, v. 89, p. 223-227, 2002.
- ARCE, A. et al. Citrus essential oil deterpenation by liquid-liquid extraction. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 83, p. 366-370, 2005.
- ARCE, A. et al. Citrus essential oil terpenless by extraction using 1-ethyl-3-methylimidazolium ethylsulfate ionic liquid: Effect of the temperature. **Chemical Engineering Journal**, v. 133, p. 213-218, 2007.
- ARCE, A., M. A., RODRÍGUEZ, O., SOTO, A.,. Essential oil terpenless by extraction using organic solvents or ionic liquids. **AIChE Journal**, v. 52, p. 2089-2097, 2006.
- ARCE, A.; MARCHIARO, A.; SOTO, A. Liquid-liquid equilibria of linalool + ethanol + water, water + ethanol + limonene, and limonene + linalool + water systems. **Journal of Solution Chemistry**, v. 33, p. 561-569, 2004a.
- ARCE, A.; MARCHIARO, A.; SOTO, A. Phase stability of the system limonene + linalool + 2-aminoethanol. **Fluid Phase Equilibria**, v. 226, p. 121-127, 2004b.
- ARCE, A.; MARCHIARO, A.; SOTO, A. Propanediols for separation of citrus oil: liquid-liquid equilibria of limonene + linalool + (1,2-propanediol or 1,3-propanediol). **Fluid Phase Equilibria**, v. 211, p. 129-140, 2003.
- ARNONE, A. et al. Cryphonectric acid and other minor metabolites from a hypovirulent strain of *Cryphonectria parasitica*. **J Nat Prod.**, v. 65, p. 48-50, 2002.

BANDURSKA, H.; CHELKOWSKI, J.; WISNIEWSKA, H. Free proline accumulation in wheat seedlings influenced by *Fusarium culmorum* infection and the pathogen metabolite deoxynivalenol. **Acta Physiol. Plant**, v. 16, p. 111–116, 1994.

BARUAH, N. C. et al. Seed germination and growth cadinenes from *Eupatorium adenophorum* Spreng. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, n. 8, p. 1885-1892, 1994.

BECKER, P. et al. Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase producing thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 o olive oil. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 48, p. 184-190, 1997.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Biocontrole de doenças de plantas. Uso e perspectivas. **Embrapa Meio Ambiente**, p. 332, 2009.

BHASKAR, V. et al. Optimization of production of subtilisin in solid substrate fermentation using response surface methodology African. **Journal of Biotechnology**, p. 2286–2291, 2008.

BORGES, N. C. R.; PITELLI, R. A. Adjuvantes e herbicidas e a infectividade de *Fusarium graminearum*, agente potencial de biocontrole de *Egeria densa* e *Egeria najas*. **Planta Daninha, Viçosa**, v. 22, p. 77-83, 2004.

BORGES NETO, C. R.; GORGATI, C. Q.; PITELLI, R. A. Influência do fotoperíodo e da temperatura na intensidade de doença causada por *Fusarium graminearum* em *Egeria densa* e *E. najas*. **Planta daninha, Viçosa**, v. 23, p. 449-456, 2005.

BORGES NETO, C. R. **Estudo do potencial de *Fusarium graminearum* como agente de controle biológico de *Egeria densa* e *E. najas***. 2003. 126 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

BOTTALICO, A.; LEARIO, P.; VISCONTI, A. Some experimental data on the phytotoxicity of mycotoxins. **Phytopath. Medit.**, v. 19, p. 196-198, 1980.

BRAMORSKI, A. **Caracterização do crescimento e produção de metabólitos voláteis por fungos filamentosos cultivados sobre substratos agroindustriais**. 1997. 112 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Paraná 1997.

BRIERE, S. C., WATSON, A. K., HALLETT, S. G. Oxalic acid production and mycelial biomass yield of *Sclerotinia minor* for the formulation enhancement of a granular turf bioherbicide. **Biocontrol Sci. Technol.**, v. 10, p. 281–289, 2000.

BRUN, T. **Produção de herbicida por fermentação submersa a partir do fungo *Phoma* sp. em biorreator**. 2016. 55 p. Dissertação (Mestrado – Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

BRUSSAARD, L., et al. Reconciling biodiversity conservation and food security: scientific challenges for a new agriculture. **Curr. Opin. Environ. Sustainability**, v. 2, p. 34–42, 2010.

BUERSTMAYR, H. et al. Breeding for scab resistance in wheat: Inheritance of resistance and possibilities for in vitro selection. In: **Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects**. Edited by DUBIN, H.J.; GILCHRIST, L.; REEVES, J.; MCNAB, A. CIMMYT. 1997.

CANTRELL, C. L.; DAYAN, F. E.; DUKE, S. O. Natural products as sources for new pesticides. **J. Nat. Prod.**, v. 75, p. 1231–1242, 2012.

CAST (Council for Agriculture Science and Technology). **Mycotoxins Risks in Plant, Animal, and Human Systems**, Ames, IA, USA, 2003.

CHÁFER, A. et al. Liquid-liquid equilibria of the mixture linalool + ethanol + water at different temperatures. **Fluid Phase Equilibria**, v. 238, p. 72-76, 2005.

CHÁFER, A. et al. The influence of the temperature on the liquid-liquid equilibria of the mixture linalool + ethanol + H₂O. **Fluid Phase Equilibria**, v. 224, p. 251-256, 2004.

CHARUDATTAN, R. The mycoherbicide approach with plant pathogens. In: TEEBEST (Ed.). **Microbial control of weeds**. New York: Chapman and Hall, 1991. p. 24-57.

CHARUDATTAN, R. The use of natural and genetically altered strain of pathogens for weed control. In: HOY, M. A.; HERZOG, D. C. **Biological control in agricultural IPM systems**. New York: Academic Press, 1985. p. 347-372.

CHARUDATTAN, R.; HIEBERT, E. A plant virus as a bioherbicide for tropical soda apple, *Solanum viarum*. **Outlooks on Pest Management**, v. 18, p. 167–171, 2007

CHARUDATTAN, R. Current status of biological control of weeds. In: KENNEDY, C.G., SUTTON, T.B. (Eds.), **Emerging Technologies for Integrated Pest Management: Concepts, Research, and Implementation**. APS Press, St. Paul, MN, 2000, p. 269–288.

CHEEKE, P. R. **Natural Toxicant in Feeds, Forages, and Poisonous Plants**; Interstate Publishers Inc.: Danville, IL, USA, 1998.

CHRISTOFOLETTI, J. C. Considerações sobre tecnologia de aplicação de defensivos agrícolas. **Diadema: Spray Systems do Brasil**, p. 14, 1997.

CIMMINO, A. et al. Fungal phytotoxins with potential herbicidal activity: chemical and biological characterization. **J. Nat. Prod.**, v. 32, p. 1629-1653, 2015.

CIOTOLA, M.; DITOMMASO, A.; WATSON, A. K. Chlamyospore production, inoculation methods and pathogenicity of *Fusarium oxysporum* M12-4A, a biocontrol for *Striga hermonthica* **Biocontrol Science and Technology**, v. 10, p. 129–145, 2000.

CIOTOLA, M.; WATSON, A. K.; HALLETT, S. G. Discovery of an isolate of *Fusarium oxysporum* with potential to control *Striga hermonthica* in Africa. **Weed Research**, v. 35, p. 303-309, 1996.

CLARKE, N. et al. The spaces and ethics of organic food. **Journal of Rural Studies**, v. 24, p. 219-230, 2008.

CLIQUET, S.; ASH, G.; COTHER, E. Production of chlamydospores and conidia in submerged culture by *Rhynchosporium alismatis*, a mycoherbicide of Alismataceae in rice crops **Biocontrol Science and Technology**, v. 14, p. 801–810, 2004.

CLIQUET, S.; ZEESHAN, K. Impact of nutritional conditions on yields, germination rate and shelf-life of *Plectosporium alismatis* conidia and chlamydospores as potential candidates for the development of a mycoherbicide of weeds in rice crops **Biocontrol Science and Technology**, v. 18, p. 685-695, 2008.

COCCO, M. T.; CONGIU, C.; ONNIS, V. New bis(pyridyl)methane derivatives from 4-hydroxy-2-pyridones: synthesis and antitumoral activity. **Eur J Med Chem**, v. 38, n. 1, p. 37-47, Jan 2003. ISSN 0223-5234 (Print) 0223-5234 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12593915> >.

COPPING, L. G.; MENN, J. J. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Manag. Sci.**, v. 56, p. 651–676, 2000.

COSSETTE, F.; MILLER, J. D. Phytotoxic effect of deoxynivalenol and gibberella ear rot resistance of corn., v. 3, p. 383–388, 1995.

CUTLER, H. G. Trichothecenes and their role in the expression of plant disease. In: HEDIN, P. A., MENN, J. J., HOLLINGWORTH, R. M. **Biotechnology for Crop Protection**. Eds.; Maple Press: York, PA, USA, 1988; p. 50–72.

DAIGLE, D. J.; CONNICK, W. J.; BOYETCHKO, S. M. Formulating a weed-suppressive bacterium in “Pesta”. **Weed Technology**, v. 16, p. 407-413, 2002.

DANIEL, J. T. et al. Biological control of northern jointvetch in rice with an endemic fungal disease. **Weed Sci.**, v. 21, p. 303-307, 1973.

DAYAN, F. E. et al. Sarmentine, a natural herbicide from Piper species with multiple herbicide mechanisms of action. **Front. Plant Sci**, v. 6, 2015.

DAYAN, F. E. et al. Manuka oil, a natural herbicide with preemergence activity. **Weed Sci.**, v. 59, p. 464–469, 2011.

DAYAN, F. E.; DUKE, S. O. Natural compounds as next-generation herbicides. **Plant Physiol**, v. 166, p. 1090–1105, 2014.

DAYAN, F. E.; OWENS, D. K.; DUKE, S. O. Rationale for a natural products approach to herbicide discovery. **Pest Manag Sci**, v. 68, n. 4, p. 519-28, Apr 2012. ISSN 1526-4998 (Electronic) 1526-498X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22232033> >.

DEMAIN, A. L.; FANG, A. The natural functions of secondary metabolites. **Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology**, v. 69, p. 1-39, 2000.

DEMUNER, A. J. et al. Synthesis and phytotoxic activity of new pyridones derived from 4-hydroxy-6-methylpyridin-2(1H)-one. **Molecules**, v. 14, n. 12, p. 4973-86, 2009. ISSN 1420-

3049 (Electronic) 1420-3049 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20032871> >.

DESJARDINS, A. E. Natural product chemistry meets genetics: when is a genotype a chemotype? **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, p. 7587-7592, 2008.

DESJARDINS, A. E. Trichothecenes: from yellow rain to green wheat. **ASM News**, v. 69, p. 182-185, 2003.

DESJARDINS, A. E.; HOHN, T. M. Mycotoxins in plant pathogenesis. **Molecular PlantMicrobe Interactions**, v. 10, p. 147-152, 1997.

DEVALERIO, J. T.; CHARUDATTAN, R. Field testing of *Ralstonia solanacearum*[Smith] Yabuuchi et al. as a biocontrol agent for tropical soda apple (*Solanum viarum* Dunal). **Weed Science Society of America Abstracts**, v. 39, p. 70, 1999.

DEWHURST, I. C. Toxicological assessment of biological pesticides. **Toxicol. Lett.**, v. 120, p. 67-72, 2001.

DOLEZAL, M.; KRALOVA, K. Synthesis and evaluation of pyrazine derivatives with herbicidal activity. **Herbicides, Theory and Applications**, p. 581- 610, 2011.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin** v. 19, p. 11-15, 1991.

DOZ, M. B. G.; CASES, A. M.; SÓLIMO, H. N. (Liquid + liquid) equilibria for (water + linalol + limonene) ternary system at T = (298.15, 308.15 and 318.15) K. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 112, p. 1575-1579, 2008.

DOZ, M. B. G. et al. (Liquid + liquid) equilibria for water + ethanol + citral multicomponent system at 303,15 K. **Journal of Chemical Engineering Data**, v. 52, p. 1710-1714, 2007.

DUKE, S. O.; DAYAN, F. E. Bioactivity of Herbicides. **Comprehensive Biotechnology**, v. 4, p. 23-35, 2011.

DUKE, S. O.; ROMAGNI, J.G.; DAYAN, F. E. Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. **Crop Protection**, v. 19, p. 583-589, 2000.

DYER, L. A.; PALMER, A. D. N. **Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology and evolution**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2004.

EMBRAPA Milho e Sorgo. **Sistema de Produção**. Versão eletrônica – 2^a ed., 2006. <
http://www.sistemaproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_2ed/plantasaninhas.htm> acesso 17 de setembro de 2015.

EMBRAPA: **Bioprospecção microbiana**. 2015. Disponível em:
 <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1034948>>. Acesso em: 4 fev. 2016.

EVIDENTE, A. et al. Phyllostictines A-D, oxazatricycloalkenones produced by *Phyllosticta cirsii*, a potential mycoherbicide for *Cirsium arvense* biocontrol. **Tetrahedron**, v. 64, p. 1612-1619, 2008.

FENICE, M. et al. Repeated-batch production of pigments by immobilized *Monascus purpureus*. **Journal of Biotechnology**, v. 80, p. 271-276, 2000.

FERRELL, J. et al. Effects of selected herbicides on the efficacy of tobacco mild green mosaic virus to control tropical soda apple (*Solanum wrightii*). **Weed Science**, v. 56, p. 128–132, 2008.

FERREIRA, T. A. et al. Produção de mudas de chambá (*Justicia pectoralis* Jacq) em diferentes tipos de substratos e tamanhos de recipientes. **Agropecuária científica no semiárido**, v. 11, n.1, p. 93 - 96, 2015.

FRANS, R.; CROWLEY, H. Experimental design and techniques for measuring and analyzing plant responses to weed control practices. **Southern Weed Science Society**, v. Research methods in weed science, Clemson, 3^a ed, p. 29-45, 1986.

FRANTZEN, J.; PAUL, N. D.; MÜLLER-SCHÄRER, H. The system management approach of biological weed control: Some theoretical considerations and aspects of application. **BioControl**, v. 46, p. 139–155, 2001.

FREEMAN, T. E. Biological control of aquatic weed with plant pathogens. **Aquat. Bot**, v. 3, p. 175-184, 1977.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; Instituto Nacional De Pesquisas Espaciais, Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período 2013-2014: Relatório técnico, São Paulo, 2015. Disponível em: http://mapas.sosma.org.br/site_media/download/atlas_2013-2014_relatorio_tecnico_2015.pdf. Acesso em 03 de Fevereiro de 2016.

GERWICK, B. C. et al. Mevalocidin: a novel, phloem mobile phytotoxin from *Fusarium DA056446* and *Rosellinia DA092917*. **J Chem Ecol**, v. 39, p. 253-61, 2013.

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 20, p. 17-48, 2000.

GIRONI, F.; FARIAS, I. G.; LAMBERTI, L. Liquid-liquid equilibria for the water + ethanol + citral and water + ethanol + limonene systems at 293 K. . **Journal of Chemical Engineering Data**, v. 40, p. 578-581, 1995.

GOSHAEV, M. Synthesis of 3-n-butylpyridine— A toxic metabolite of the fungus *Fusarium oxysporum* and its homologues. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 29, p. 391-393, 1993.

GRANITI, A.; DURBIN, R. D.; BALLIO, A. Phytotoxins and Plant Pathogenesis, Springer-Verlag, Berlin, NATO ASI Series. **Series H**, v. 2, 1989.

GREEN, S. A review of the potential for the use of bioherbicides to control forest weeds in the UK. **UK. Forestry**, v. 76, p. 285–298, 2003.

GRUSZYNSKI, C. **Produção comercial de crisântemos: vaso, corte e jardim**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 166 p.

HABERT, A. C., BORGES, C.; NOBREGA, R. **Processos de Separação com membranas**. E-pappers, 2006, p. 180.

HARLEY, K. L. S.; FORNO, I. W. Biological control of weeds: a handbook for practitioners and students. **Sydney: Inkata Press**, p. 74, 1992.

HARRIS, L. J. et al. Possible role of trichothecenes mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* on maize. **Plant Dis.**, v. 83, p. 954–960, 1999.

IBF – Instituto Brasileiro de Florestas, **Bioma Pampa**. 2015. Disponível em: <http://www.ibflorestas.org.br/bioma-pampa.html>. Acesso em 03 de Fevereiro de 2016.

IMAIZUMI, S. et al. Biological control of annual bluegrass (*Poa annua* L.) with a Japanese isolate of *Xanthomonas campestris* pv *poae* (JT-P482). **Biological Control**, v. 8, p. 7–14, 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Vocabulário Básico de Recursos Naturais e Meio Ambiente**. 2ª ed. Rio de Janeiro: IBGE, 2004.

JACKSON, M. A. et al. Growth requirements for production of stable cells of the bioherbicide bacterium *Xanthomonas campestris*. **Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology**, v. 21, p. 237–241, 1998.

JACKSON, M. A.; SCHISLER, D. A. Liquid culture production of microsclerotia of *Colletotrichum-truncatum* for use as bioherbicide propagules. **Mycological Research**, v. 99, p. 879–884, 1995.

JAMAL, C. M. et al. O uso de extratos vegetais no controle alternativo da podridão pós-colheita da banana. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO CERRADO, IX, 2008, ParlaMundi. Anais... Brasília, DF: EMBRAPA Cerrados, 2008.p. 1-9.

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **Am. J. Bot.**, v. 88, p. 706–716, 2001.

JAUASINGHE, L. et al. Nanayakkara, N.P.D. N-Methyl-4-hydroxy-2-pyridinone Analogues from *Fusarium oxysporum*. **J. Nat. Prod.**, v. 69, p. 439–442, 2006.

JOHNSON, J. Biological-control of annual bluegrass with *Xanthomonas-campestris* pv *poannua* in bermudagrass **Hortscience**, v. 29, p. 659–662, 1994.

KARAM, D.; MELHORANÇA, A.L. Plantas Daninhas. In: CRUZ, J.C., VERSIANI, R.P., FERREIRA, M.T.R. (Ed.). **Cultivo do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo. Sistema de produção, 2007. acesso em 28 de agosto de 2015.

KARAM, D.; MELHORANÇA, A. L.; OLIVEIRA, M. F. **Plantas daninhas na cultura do milho**. Embrapa Milho e Sorgo (Circular técnica 79) Sete Lagoas, MG. 2006.1. ed. 8p.

KLAIC, R. **Produção de bioherbicida por processos fermentativos a partir do fungo *Phoma* sp.** 2014. 90 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

LANOISELET, V. et al. Production, germination and infectivity of chlamydospores of *Rhynchosporium alismatis*. **Mycological Research**, v. 105, p. 441-446, 2001.

LAURANCE, W. F. Conserving the hottest of the hotspots. **Biol. Conserv.**, v. 142, p. 1137, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2008.10.011>>

LI, H.; TAMURA, K. Ternary and quaternary (liquid + liquid) equilibria for (water + ethanol + α -pinene, + β -pinene, or +limonene) and (water + ethanol + α -pinene + limonene) at the temperature 298.15 K. . **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 38, p. 1036-1041, 2006.

LI, H.; TAMURA, K. Ternary liquid–liquid equilibria for (water + terpene + 1-propanol or 1-butanol) systems at the temperature 298.15K. **Fluid Phase Equilibria**, v. 263, p. 223–230, 2008.

LI, H.; TAMURA, K. Ternary liquid–liquid) equilibria for (water + acetone + α -pinene, or β -pinene, or + limonene) mixures. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 42, p. 1400–1405, 2010.

LIMA, B. V.; SOARES, D. J; BARRETO, R. W. Inoculum density of *Plectosporium alismatis*, a potential mycoherbicide, in relation to control of the aquatic weed *Sagittaria montevidensis*. **Trop. plant pathol.**, v. 35, p. 236-240, 2010.

LIU, C. L. et al. Separation of proteins and viruses using two-phase aqueous micellar systems. . **Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications**, v. 711, p. 127–38, 1998.

LORENZI, H. Plantas daninhas do Brasil: Terrestres, Aquáticas, Parasitas, Tóxicas e Medicinais. **Nova Odessa, SP: Plantarum**, v. 2, p. 440, 1991.

LORI, G. et al. Pathogenic and toxicogenic behavior of *Fusarium graminearum* populations in Argentina. **Cereal Research Community**, v. 25, p. 367-368, 1997.

LU, M. Y.; MADDOX, I. S.; BROOKS, J. D. Application of a multi-layer packedbed reactor to citric acid production in solid state fermentation Systems: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 117-123, 1998.

MATSUMOTO, K. et al. Race 1 *Fusarium* wilt tolerance on banana plants selected by fusaric acid. **Euphytica**, v. 84, p. 67-71, 1995.

MEISTER, R. T. **Farm Chemicals Handbook**. Meister Publishing Company, Willoughby, Ohio, 1992.

MELO, J. O. F. et al. Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 569-579, 2006.

MELLO, S. C. M.; RIBEIRO, Z. M. A. Fitopatógenos como agentes de controle biológico de plantas daninhas. In: MELLO, I. S., AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, p. 97-128, 1998.

MENEZES, V. O. **Inoculação de *Fusarium moniliforme* (Sheld.) em sementes de duas cultivares de pepino através da técnica de restrição hídrica e sua influência sobre a qualidade fisiológica**. 2009. 85 p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

MORIN, L.; GIANOTTI, A. F.; LAUREN, D. R. Trichothecene production and pathogenicity of *Fusarium tumidum*, a candidate bioherbicides for gorse and broom in New Zealand. **Mycol. Res.**, v. 104, p. 993-999, 2000.

MÜLLER-STÖVER, D. et al. Chlamydospores of *Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp orthoceras (Appel e Wollenw.) Bilai as inoculum for wheat-flour-kaolin granules to be used for the biological control of *Orobanche cumana* Wallr European. **Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 221–228, 2002.

MUZIK, T. J. **Weed Biology and Control**. New York, EUA: McGraw-Hill, 1970. 273 p.

NACHTIGAL, G. F.; PITELLI, R. A. *Fusarium* sp. as a potential biocontrol agent for *Egeria densa* and *Egeria najas*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL CONTROL OF WEEDS. **Anais Montona, Bozeman**, v. 10, p. 68, 1999.

NESMITH, D. S.; DUVAL, J. R. The effect of container size. **HortTechnology**, v. 8, p. 495-498, 1998.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Mol. Phylogenet. Evol.** , v. 7, p. 103-116, 1997.

OHRA, J. et al. Production of two phytotoxic metabolites by the fungus *Alternaria-cassiae*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, p. 1782-1783, 1995.

ÖZTÜRK, G. et al. Synthesis of 4(1H)-pyridinone derivatives and investigation of analgesic and antiinflammatory activities. **Farmaco**, v. 56, p. 251–256, 2001.

PACKA, D.; KOCZOWSKA, I. The effect of *Fusarium culmorum* and *Fusarium nivale* metabolites on germination, seedling growth and cytological disturbances of rye, wheat and triticale. **Pathogenicity**, v. Mycotoxin research, special edition. European seminar, *Fusarium* mycotoxins, taxonomy, p. 82-85, 1987.

PAKDAMAN, B. S. et al. A. Production of deoxynivalenol by *Fusarium graminearum* Schwabe in culture and its toxicity to wheat germlings in relation to virulence. **African Journal of Agricultural Research.**, v..8, n.27, p. 3598-3603, 2011.

PRAKASH, G.; SRIVASTAVA, A. K. Statistical elicitor optimization studies for the enhancement of azadirachtin production in bioreactor *Azadirachta indica* cell cultivation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 218-226, 2008.

PROCTOR, R. H. et al. Genetic analysis of the role of trichothecenes and fumonisin mycotoxins in the virulence of *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 691-698, 2002.

RASEKHI, F. et al. Some of phytotoxic and antimicrobial compounds extracted from culture filtrates of *Fusarium proliferatum* FP85. **Journal of Biodiversity and Environmental Sciences**, v. 4, p. 245-251, 2014.

RIBEIRO, M. C. et al. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? implications for conservation. **Biol. Conserv.**, v. 142, p. 1141-1153, 2009.

RICE, M. J., LEGG, M. POWELL, K. A. Natural products in agriculture—a view from the industry. **Pestic. Sci.**, v. 52, p. 184–188, 1998.

ROCHA, O.; ANSARI, K.; DOOHAN, F. M. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. **Food Additives e Contaminants**, v. 22, n. 4, p. 369-378, 2005.

RODRIGUES, C. E. C.; PEIXOTO, E. C. D.; MEIRELLES, A. J. A. Phase equilibrium for systems composed by refined soybean oil + commercial linoleic acid + ethanol +water, at 323.2K. . **Fluid Phase Equilibria**, v. 261, p. 122-128, 2007.

ROMAN, E. S. Resistência de plantas daninhas a herbicidas. **Revista Plantio Direto**, p.8-9, 2002.

ROVEDA, M.. **Produção de lipases por microrganismos isolados de efluentes de laticínios através de fermentação submersa**. 2007. 86 p. Dissertação (Mestrado). Universidade de Passo Fundo, 2007.

SARVER, B. A. et al. Novel *Fusarium* head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance. **Fungal Genet Biol**, v. 48, n. 12, p. 1096-107, Dec 2011. ISSN 1096-0937 (Electronic) 1087-1845 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22004876> >.

SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Anal Biochem**, v. 354, n. 2, p. 311-3, Jul. 2006. ISSN 0003-2697 (Print) 0003-2697 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16725102> >.

SCHROEDER, D. Biological control of weeds: A review of principles and trends. **Pesquisa Agropec. Bras., Brasília**, v. 27, p. 191-212, 1992.

SCHUEFFLER, A.; ANKE, T. Fungal natural products in research and development. **Nat Prod Rep**. p. 1425-1248, 2014.

SEIBER, J. N. et al. Biopesticides: state of the art and future opportunities. **J Agric Food Chem**, v. 62, n. 48, p. 11613-9, Dec 3 2014. ISSN 1520-5118 (Electronic) 0021-8561 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25406111> >.

- SEVGILI, L. M.; SAHIN, S.; KIRBASLAR, S. I. Liquid-liquid equilibria of (limonene + linalool + ethylene glycol or diethylene glycol or triethylene glycol or 1,2-propylene glycol) ternary systems. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 53, p. 737–741, 2008.
- SHIMADA, T.; OTANI, M. Effects of *Fusarium* mycotoxins on the growth of shoots and roots at germination in some Japanese wheat cultivars. **Cereal Res. Commun.**, v. 18, p. 229–232, 1990.
- SIDDIQUEE, S. et al. Separation and identification of hydrocarbons and other volatile compounds from cultures of *Aspergillus niger* by GC–MS using two different capillary columns and solvents. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 19, p. 243–256, 2015
- SILVA, A. A.; VARGAS, L.; FERREIRA, E. A. Herbicidas: Resistência de plantas. In: SILVA, A. A.; SILVA, J. F. **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. (Eds.). Viçosa: Editora UFV, p. 279-324, 2007.
- SINGHANIA, R. R. et al. Advancement and comparative profiles in the production Technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 541-549, 2010.
- SOUZA, A. R. C. **Obtenção de isolados a partir de recursos biológicos do bioma pampa com potencial no controle de plantas**. 2015. p.75. Tese. (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.
- TABARELLI, M. et al. Prospects for biodiversity conservation in the Atlantic Forest: lessons from aging human-modified landscapes. **Biol. Conserv.**, v. 143, p. 2328-2340, 2010.
- TAMURA, K.; LI, H. Mutual solubilities of terpene in methanol and water and their multicomponent liquid-liquid equilibria. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 50, p. 2013-2018, 2005.
- TAMURA, K.; LI, X.; LI, H. Temperature dependence on mutual solubility data of the binary (methanol + α -pinene or β -pinene) systems and ternary liquid-liquid equilibria for the (methanol + ethanol + α -pinene or β -pinene) systems. **Journal of Chemical Engineering Data**, v. 53, p. 2417-2421, 2008.
- TAMURA, K.; LI, X.; LI, H. Temperature dependence on mutual solubility of binary (methanol + limonene) mixture and (liquid-liquid) equilibria of the ternary (methanol + ethanol + limonene) mixture. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 41, p. 564–568, 2009.
- TANAKA, T.; ABBAS, H. K.; DUKE, S. O. Structure–dependent phytotoxicity of fumonisins, and related compound in a duckweed bioassay. **Phytochemistry**, v. 33, p. 779–785, 1993.
- TEBEEST, D. O. Additions to host range of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. aescynomene. **Plant Dis., St. Paul**, v. 72, p. 16-18, 1988.
- TEBEEST, D. O.; YANG, X. B.; CISAR, C. R. The status of biological control of weeds with fungal pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 30, p. 637-657, 1992.

- TESSMANN, D. J., Controle Biológico: Aplicações na área de ciência de plantas daninhas. In: OLIVEIRA JÚNIOR, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H., eds. **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**. s.l.:Omnipax, p. 85-86, 2011.
- THOMAS, M. B.; WILLIS, A. J. Biocontrol-Risky but necessary? **TREE**, v. 13, p. 325-329 1998.
- TORRES, M.; GIL, S.; PARRA, M. New synthetic methods to 2-Pyridone rings. **Curr. Org. Chem.**, v. 17, p. 1757-1779, 2005.
- TREYBAL, R. E. **Mass-transfer operations**. 3.ed. New York: Mc Graw-Hill, 1980.
- TURATI, D. F. M. **Influência de parâmetros nutricionais e físicos sobre a produção de lipase por *Penicillium janthinellum***. 2012. 42 p. - Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2012.
- UENO, Y. **Trichothecenes: Chemical, Biological, and Toxicological Aspects**; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1983.
- VAN DEN BOSCH, R.; MESSENGER, P. S.; GUTIERREZ, A. P. **An introduction to biological control**. New York: Plenum, 1982. 247 p.
- VAN RENSBURG, J. C. J.; LABUSCHAGNE, N.; NEMEC, S. Occurrence of *Fusarium*-produced naphthazarins in citrus tree and sensitivity of rootstocks to isomartecin in relation to citrus blight. **Plant Pathology**, v. 50, p. 258-265, 2001.
- VAREJÃO, E. V. V. The search for new natural herbicides – Strategic approaches for discovering fungal phytotoxins. **Crop Protection**, v. 48, p. 41–50, 2013.
- VERSTRAETE, W. et al. Anaerobic bioprocessing of organic wastes. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 12, p. 221-238, 1996.
- WAKULINSKI, W. Phytotoxicity of the secondary metabolites of fungi causing wheat head fusariosis (head blight). **Acta Physiol. Plant**, v. 11, p. 301–306, 1989.
- WANG, H. et al. Trichothecenes and aggressiveness of *Fusarium graminearum* causing seeding blight and root rot in cereals. **Plant Pathol.**, v. 55, p. 224–230, 2006.
- WEISSMANN, R.; UGGLA, C.; GERHARDSON, B. Field performance of a weed-suppressing *Serratia plymuthica* strain applied with conventional spraying equipment. **Biocontrol**, v. 47, p. 725–742, 2003.
- WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p. 315-322, 1990. In: **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**, eds. Innis, M. A. et al. (Eds.). London, Academic Press.
- WU, H.; PRATLEY, J.; HAIG, T. Phytotoxic Effects of Wheat Extracts on a Herbicide-Resistant Biotype of Annual Ryegrass (*Lolium rigidum*). **J. Agric. Food Chem.** v, 51, p. 4610-4616, 2003

ZHANG, J. M. et al. Effects of lignin-derived phenolic compounds on xylitol production and key enzyme activities by a xylose utilizing yeast *Candida athensensis* SB18. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 369-378, 2012.

ZITTER, T. A.; HOPKINS, D. L.; THOMAS, C. E. Compendium of cucurbit diseases. Saint Paul, Minnesota **American Phytopathological Society - APS**, p. 87, 1996.

ZONNO, M. C.; VURRO, M. Effect of fungal toxins on germination of *Striga hermonthica* seeds. **Weed Research**, v. 39, p. 15-20, 1999.

ZONNO, M. C.; VURRO, M. Inhibition of germination of *Orobanche ramosa* seeds by *Fusarium* toxins. **Phytoparasitica**, v. 30, p. 519-524, 2002.