

MARIA CECÍLIA FERNANDES DIAS

**EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE REGULADORA DO CRESCIMENTO
DE PLANTAS POR COMPOSTOS PRODUZIDOS POR *Trichoderma* spp.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título *Magister Scientiae*.

VIÇOSA

MINAS GERAIS- BRASIL

2014

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

D541e
2014
Dias, Maria Cecília Fernandes, 1990-
Extração e avaliação da atividade reguladora do
crescimento de plantas por compostos produzidos por
Trichoderma spp / Maria Cecília Fernandes Dias. – Viçosa, MG,
2014.
x, 76f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Antônio Jacinto Demuner.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.42-47.

1. Crescimento (Plantas). 2. Plantas - Desenvolvimento. 3.
Trichoderma spp. 4. Controle biológico. I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Química. Programa de
Pós-graduação em Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 571.2

MARIA CECÍLIA FERNANDES DIAS

**EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE REGULADORA DO CRESCIMENTO
DE PLANTAS POR COMPOSTOS PRODUZIDOS POR *Trichoderma* spp.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título *Magister Scientiae*.

APROVADA: 24 de fevereiro de 2014.

Prof. Eduardo Vinícius Vieira Varejão

Dra. Marliane de Cássia Soares da Silva

Prof. Luiz Cláudio de Almeida Barbosa
(Coorientador)

Prof. Antônio Jacinto Demuner
(Orientador)

Aos meus pais, Ana Maria e José Eugênio por todo amor e dedicação. À minha irmã Letícia pelo apoio em todos os momentos e a Diego por estar sempre presente mesmo estando tão longe.

Dedico.

Vá firme na direção da sua meta.

Porque o pensamento cria...

O desejo atrai e a Fé realiza!”

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e pela fé inabalável que em muitos momentos me sustentou para que os obstáculos do caminho não me fizessem desistir.

Aos meus pais, Ana Maria e José Eugênio, o meu alicerce. Sem vocês eu nada seria. Agradeço por estarem sempre ao meu lado, me orientando e apoiando em todos os momentos da minha vida, tudo que sou é reflexo de todo o amor e carinho que vocês dedicaram para me educar.

À minha mais que irmã Letícia que me incentivou a enfrentar novos desafios e esteve sempre ao meu lado me dando apoio emocional, afetivo e também estatístico.

A Diego por ter permanecido do meu lado, mesmo sendo muito grande a distância e maior ainda a saudade. Obrigada por ter ficado por horas me ouvido nos momentos mais difíceis e me apoiado sempre que precisei. Te amo muito.

À minha amiga Cristielle que dividiu comigo, nestes últimos dois anos, muitas alegrias, descobertas e também momentos de desesperos, choro, desilusões. Sua amizade tornou mais fácil a caminhada. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

Ao professor Antônio J. Demuner pela orientação e apoio durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Associações Micorrízicas (MIC) pelos bons momentos vividos. Especialmente ao José Maria, por todo o apoio, atenção e disposição em me auxiliar sempre que precisei.

À professora Maria Catarina por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório onde me fez sentir em casa. Agradeço também pelo apoio e incentivo.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA). Em especial a Eva e Paula por todo apoio dado durante os bioensaios. À Juliana, à Daiane, ao Alex e à Ângela (que mudou de laboratório, mas continuou

sendo uma grande amiga que vou levar para sempre em minha vida) e tantos outros que me ajudaram com uma palavra amiga nos momentos de aflição.

Ao técnico do Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA) José Luiz pela disposição em fazer minhas análises. Aos técnicos do BIOAGRO, em especial Cíntia e Camila pela atenção e carinho. A todos os técnicos dos demais laboratórios que me auxiliaram em alguma etapa do meu trabalho pela assistência quanto solicitado.

À Capes pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que de alguma forma, seja com uma palavra amiga, um conselho ou um sorriso me ajudaram a fazer desta caminhada uma jornada mais tranquila e de muito aprendizado.

Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

MARIA CECÍLIA FERNANDES DIAS, filha de Ana Maria Fernandes Dias e José Eugênio Dias, nascida em Diamantina, MG em 2 de maio de 1990 .

Em 2008 ingressei no curso de Licenciatura em Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, MG diplomando-me em dezembro de 2011.

Durante esse período foi bolsista por dois anos do Programa de Bolsa de Incentivo à Docência (PIBID) e bolsista de iniciação científica por um ano do programa de bolsas do CNPq, onde desenvolvi minha paixão pela área de Produtos Naturais.

Em março de 2012 ingressei no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração Química Orgânica, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, MG.

Em fevereiro de 2014 submeti-me à defesa da dissertação para obter o título de *Magister Scientiae*.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO..... | ix |
| ABSTRACT | x |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 4 |
| 2.1 Objetivos Gerais..... | 4 |
| 2.2 Objetivos Específicos..... | 4 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 5 |
| 3.1 <i>Trichoderma</i> spp. | 5 |
| 3.2 <i>Trichoderma</i> sp. como agente de biocontrole e promotor do crescimento de plantas | 6 |
| 3.2.1 Mecanismos de ação | 7 |
| 3.3 Metabólitos Voláteis | 8 |
| 3.3.1 A lactona 6-Pentilpiran-2-ona | 11 |
| 3.4 Determinação dos Metabólitos Secundários..... | 13 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 15 |
| 4.1 Micro-organismos e sua manutenção | 15 |
| 4.2 Seleção da Temperatura ótima e Meios de Cultivo..... | 15 |
| 4.3 Extração dos Metabólitos Voláteis | 17 |
| 4.4 Identificação dos Compostos Voláteis | 19 |
| 4.5 Ensaio Biológicos..... | 20 |
| 4.5.1 Preparo das Soluções..... | 20 |
| 4.5.2 Ensaio biológicos para a avaliação dos extratos sobre o crescimento radicular e a germinação de sementes de pepino (<i>Cucumis sativus</i> L.) e de sorgo (<i>Sorghum bicolor</i> L.) em placa de Petri..... | 20 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.5.3 | Ensaio biológico para a avaliação dos extratos sobre o crescimento radicular de plantas em teste em pote | 21 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 23 |
| 5.1. | Condições de Cultivo | 23 |
| 5.2 | Identificação e Quantificação dos Compostos Voláteis..... | 24 |
| 5.3 | ENSAIOS BIOLÓGICOS..... | 30 |
| 5.3.1 | Ensaio biológico para a avaliação dos extratos sobre o crescimento radicular e a germinação de sementes pepino (<i>Cucumis sativus</i> L.) e sorgo (<i>Sorghum bicolor</i> L.) em teste em placa de Petri..... | 30 |
| 4.3.2 | Ensaio biológico para a avaliação dos extratos sobre o crescimento radicular de plantas em teste de pote | 34 |
| 6. | CONCLUSÕES | 41 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 42 |
| | APÊNDICE | 48 |

RESUMO

DIAS, Maria Cecília Fernandes, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Extração e Avaliação da Atividade reguladora do crescimento de plantas por compostos produzidos por *Trichoderma* spp.** Orientador: Antônio Jacinto Demuner. Co-orientadores: Maria Catarina Megumi Kasuya e Luiz Cláudio de Almeida Barbosa.

Micro-organismos têm se mostrado como uma das fontes mais ricas e promissoras de novos compostos com atividade fitotóxica e reguladora do crescimento de plantas. Os *Trichoderma* spp. vêm se destacando como agentes de biocontrole bem como na promoção do crescimento de plantas. A atividade biológica desses fungos pode estar associada aos diferentes metabólitos voláteis produzidos por eles. Este trabalho teve como objetivo a avaliação dos extratos de *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma pseudokonigii*, *Trichoderma viride* e *Trichoderma virens* sobre a promoção o crescimento de plantas. A partir dos extratos obtidos do meio de mineral foi possível detectar metabólitos voláteis pela técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Foram identificados diversos compostos, dentre eles ácido desidroacético, 2-feniletanol e ciclo prolina-isoleucina, o qual, até o presente momento, nunca havia sido descrito para *Trichoderma* sp. A lactona 6-pentilpiran-2-ona foi identificada em *T. asperellum*, *T. harzianum* e *T. viride*. As atividades fitotóxicas dos extratos foram avaliadas sobre o crescimento radicular e a germinação de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) e pepino (*Cucumis sativus* L.) nas concentrações de 31,25; 62,50; 125; 500 e 1000; ppm. Os extratos não afetaram a germinação das sementes de pepino, mas influenciaram na germinação das sementes de sorgo. Os extratos induziram o crescimento radicular tanto do pepino quanto do sorgo, sendo que os extratos de *T. pseudokoningii* e *T. asperellum* aumentaram esse crescimento em 366 e 249% e em 43 e 33%, respectivamente. Em casa de vegetação, os extratos de *T. viride* e de *T. virens* foram os que aumentaram mais o crescimento radicular nas plântulas de pepino, em 95 e 88% respectivamente, e de sorgo em 44 e 41%, enquanto o extrato de *T. virens* aumentou em até 334% o crescimento da corda de viola (*Ipomoea grandifolia*). Verifica-se, portanto, que as espécies de fungo estudadas apresentam substâncias que promovem o crescimento vegetal.

ABSTRACT

DIAS, Maria Cecília Fernandes, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2014. **Extraction and Evaluation of Regulatory Activity of Plant Growth by Compounds Produced by *Trichoderma* spp.** Adviser: Antônio Jacinto Demuner. Co-advisers: Maria Catarina Megumi Kasuya and Luiz Cláudio de Almeida Barbosa.

Microorganisms have been shown to be one of the richest and most promising sources of new compounds with phytotoxic activity and regulating plant growth. *Trichoderma* spp. have been highlighted as biocontrol agents and promoting plant growth. The biological activity of these fungi can be associated with different volatile metabolites produced by them. This study aimed to evaluate the extracts *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma pseudokonigii*, *Trichoderma viride* and *Trichoderma virens* on promoting the growth of plants. From the extracts of the mineral medium volatile metabolites could be detected by the technique of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Various compounds, among them were identified dehydroacetic acid, 2 - phenylethanol and isoleucine-proline cycle, which, until now, had never been described for *Trichoderma* sp. The lactone 6- pentilpiran -2-one was identified in *T. asperellum*, *T. harzianum* and *T. viride*. The phytotoxic activities of the extracts were evaluated on root growth and germination of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.) at concentrations of 31.25 ; 62.50; 125 ; 500 and 1000 ; ppm. The extracts did not affect the germination of cucumber, but influenced the germination of sorghum seeds. The extracts induce root growth of cucumber so as sorghum, and extracts from *T. pseudokoningii* and *T. asperellum* this growth increased 366 and 249 % and in 43 and 33%, respectively. In the greenhouse, the extracts of *T. viride* and *T. virens* were increased more than root growth in cucumber seedlings at 95 and 88 % respectively, and sorghum in 44 and 41%, while the extract of *T. virens* increased by up to 334% growth string viola (*Ipomoea grandifolia*) . It is apparent, therefore, that the fungus species have studied substances which promote plant growth.

1. INTRODUÇÃO

Por décadas os pesticidas sintéticos têm sido utilizados para proteger as culturas agrícolas das mais diversas pragas que podem atingi-la. Entretanto, o uso excessivo de tais produtos tem se tornado um problema ambiental e social importante. Ao mesmo tempo o aumento da produtividade a partir de áreas limitadas de cultivo é um aspecto importante na agricultura.

O desenvolvimento de pesticidas microbianos, utilizando micro-organismos presentes na natureza, é aceito como um meio para reduzir a poluição ambiental, e o risco de acumulação de resíduos químicos na cadeia alimentar garantindo a manutenção da produção agrícola (WIJESINGHE *et al.*, 2011). Com isso, novas técnicas de controle têm sido estudadas, visando reduzir todos os danos causados pelas técnicas para controle de patógenos utilizadas até então.

A partir da década de 80 os micro-organismos fitopatogênicos começaram a ser melhor estudados, descobrindo-se diversas substâncias com atividade herbicida, sendo algumas delas já comercializadas. Porém, uma maior atenção ao uso de toxinas com ação herbicidas produzidas por esses micro-organismos só foi dada a partir da década de 90, isto porque estes compostos são caracterizados pela alta especificidade, alta seletividade e principalmente por serem biodegradáveis (VISCHETTI & ESPOSITO, 1999).

Micro-organismos como fungos e bactérias têm se mostrado como uma das fontes mais ricas e promissoras de novos compostos com atividade fitotóxica e reguladora do crescimento de plantas (KIMURA *et al.*, 1998, 2002; PILLMOOR *et al.*, 1998; VYVYAN *et al.*, 2002).

Trichoderma sp. e seus metabólitos têm sido o foco de uma atenção considerável ao longo dos últimos anos, devido ao potencial como agentes de controle biológico de uma variedade de patógenos de plantas (DAOUBI *et al.*, 2009).

Juntamente com outros micro-organismos benéficos, *Trichoderma* sp. ajudam a manter a supressividade geral de doença e da fertilidade dos solos. No século passado sua importância se estendeu além da agricultura, abrangendo áreas como

tratamento enzimático, indústria alimentar, papel e celulose, biorremediação, dentre outras, o que aumentou a atividade destes fungos (LORITO *et al.*, 2011). É evidente que a capacidade de *Trichoderma* sp. para inibir o crescimento de outros fungos e estimular o crescimento de plantas é devido à ação de produzir diferentes metabólitos secundários. Os metabólitos secundários com atividade antibiótica produzida por *Trichoderma* têm sido classificados em diferentes grupos com base na sua origem biossintética ou a sua estrutura química (DAOUBI *et al.*, 2009).

Os compostos produzidos por *Trichoderma* sp. constituem um grupo diverso no que diz respeito a estruturas e funções, podendo ser tanto compostos com baixa massa molecular (pironas, compostos aromáticos e seus derivados, terpenos, aminoácidos, lactonas, compostos bicíclicos e tricíclicos, entre outros) (LARSEN *et al.*, 2003; LIEBERMANN *et al.*, 1997, 2000; NUSSBAUM *et al.*, 1999), quanto de alta massa molecular (proteínas, glicoproteínas e polissacarídeos). Dentre estas classes de compostos são enquadradas novos fungicidas, fitotoxinas, reguladores do crescimento de plantas e também algumas micotoxinas.

Muitas dessas classes contêm o núcleo 2-pirona (Figura 1-A) um éster cíclico insaturado de seis membros com propriedades físicas e químicas intermediárias entre alquenos e aromáticos (FAIRLAMB *et al.*, 2005). Compostos apresentando a função 2-pirona são encontrados em sistemas bacterianos, microbianos, plantas e insetos. Estes compostos tem mostrado ação antifúngica, antibiótica, citotóxica, neurotóxica e fitotóxica (FAIRLAMB *et al.*, 2004).

O 6-pentilpiran-2-ona (6PP) (Figura 1-B), composto que apresenta o núcleo 2-pirona, foi um dos primeiros compostos isolados de *Trichoderma viride*. O 6PP é responsável pela produção do 'aroma de coco' associado ao crescimento micelial de *Trichoderma* sp., e tem ação inibitória sobre o crescimento de uma gama de fitopatógenos, tais como *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Armillaria mellea*, *Penicillium expansum* e *Fusarium graminearum* (DAOUBI *et al.*, 2009; FAIRLAMB *et al.*, 2004).

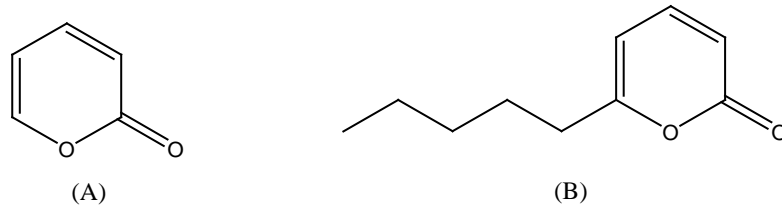


Figura 1: Compostos com propriedade bioativa: 2-pirona (A) e 6-pentilpiran-2-ona (B).

Trichoderma spp. também mostram grande eficácia no controle de outros patógenos que atacam culturas importantes tais como *Nectria galligena* e *Botrytis cinerea* em maçã, *Sclerotium rolfsii* em tabaco e feijão e *Rhizoctonia solanii* em rabanete, morango, pepino, batata e tomate (REINO *et al.*, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Desenvolver metodologias que possibilite o cultivo dos fungos e a extração e avaliação dos metabólitos secundários produzidos por: *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma harzarium*, *Trichoderma pseudokoningii*, *Trichoderma viride* e *Trichoderma virens*, bem como realizar bioensaios para avaliar a fitotoxicidade desses extratos.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Selecionar as espécies de os fungos a serem analisadas e também o melhor meio de cultura para seu crescimento e desenvolvimento.
- b) Desenvolver metodologias para a extração e caracterização dos compostos voláteis produzidos.
- c) Realizar bioensaios para testar a atividade promotora do crescimento de plantas dos extratos obtidos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Trichoderma* spp.

Trichoderma sp. pertencem à classe Deuteromicetos a sub-classe hifomicetos, da ordem Moniales e a família *Moniliaceae*, presentes com mais frequência em solos de regiões de clima temperado e tropical (MACHADO *et al.*, 2012; DAOUBI *et al.*, 2009).

O gênero *Trichoderma* conta com mais de 30 espécies e mais de 100 subespécies. As espécies mais amplamente representadas são: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma pubescens*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma virede* e *Trichoderma virens* (CALASANS, 2012).

Em meio de cultura, as colônias de *Trichoderma* sp. crescem rapidamente, apresentando inicialmente uma superfície lisa e quase translúcida e tornando-se, posteriormente, flocosas e compactas. A coloração da colônia em vários tons de verde (Figura 2) é, normalmente, devido à pigmentação dos conídios e à quantidade de conídios produzidos, podendo ainda ser influenciada pelo pH do meio de cultura (PARZIANELLO, 2012).



Figura 2: Aparência típica de *Trichoderma* sp. crescendo em placa de Petri e madeira.

Fonte: <http://www.shroomery.org>

Cada espécie de fungo apresenta condições específicas que garantem seu maior desenvolvimento. Para *Trichoderma* sp. essas condições são de temperatura de crescimento ótima em torno de 25 °C, condições de umidade em torno de 70%; pH entre 6,0 e 6,5 (CALASANS, 2012).

Algumas espécies colonizam e penetram nos tecidos das raízes, conduzindo uma resistência sistemática nos vegetais. Além de colonizarem raízes, atacam e parasitam outros fungos através de inúmeros mecanismos, produzindo compostos que favorecem o crescimento das plantas. Assim, *Trichoderma* sp. têm sido utilizados como estimuladores do crescimento de plantas e como de agentes de biocontrole de fitopatógenos.

Um agente de biocontrole ideal é aquele que coloniza e compete no microambiente. Dentre os muitos agentes potenciais de biocontrole, o gênero *Trichoderma* tem sido um dos mais estudados, dado as suas características peculiares de antagonismo em condições naturais, principalmente no solo (PARZIANELLO, 2012).

3.2 *Trichoderma* sp. como agente de biocontrole e promotor do crescimento de plantas

O sucesso espécies do gênero *Trichoderma* como agentes de biocontrole é devido sua elevada capacidade de reprodução, de sobrevivência sob condições muito desfavoráveis, à eficiência na utilização de nutrientes, a capacidade de modificar a rizosfera, à agressividade forte contra fungos fitopatógenos e a eficiência na promoção do crescimento de plantas e desenvolvimento de mecanismos de defesa de plantas. Estas propriedades fizeram com que esses fungos se tornassem onipresentes em qualquer habitat e em alta densidade populacional (BENÍTEZ *et al.*, 2004). Os agentes de biocontrole mais comuns são as cepas de *T. virens*, *T. viride* e *T. harzianum*.

Algumas linhagens de *T. harzianum*, *T. virens*, *T. asperellum* e *T. spirale* foram descritas como eficientes no controle da podridão parda que acomete as plantações de cacau por *Phytophthora megakarya* e *Phytophthora palmivora* (MPIKA *et al.*, 2009). O *T. asperellum* também se destaca no controle do fungo *Thielaviopsis paradoxa* que causam a podridão do abacaxi (WIJESINGHE *et al.*, 2011).

Muitas cepas de *Trichoderma* principalmente de *T. harzianum*, *T. viride* e *T. virens*, foram identificadas como tendo potenciais aplicações em controle biológico e uma lista parcial dos gêneros de fungos fitopatogênicos afetadas por *Trichoderma* inclui: *Armillaria*, *Botrytis*, *Chondrostereum*, *Colletotrichum*, *Dematophora*, *Diaporthe*,

Endothia, Fulvia, Fusarium, Fusicladium, Helminthosporium, Macrophomina, Monilia, Nectria, Phoma, Phytophthora, Plasmopara, Pseudoperonospora, Pythium, Rhizoctonia, Rhizopus, Sclerotinia, Sclerotium, Venturia, Verticillium (MONTE & LOBELL, 2003).

Além de serem utilizados em controle de patógenos os fungos do gênero *Trichoderma* são também empregados como agentes promotores do crescimento de plantas. Esse mecanismo se refere ao desenvolvimento das plantas de forma geral, incluindo os efeitos benéficos na germinação das sementes, emergência e desenvolvimento das plântulas e produção de grãos e frutos. A promoção do crescimento proporcionada por esses micro-organismos pode ocorrer através da produção de hormônios vegetais pelas plantas, da disponibilização de nutrientes, da absorção e translocação de minerais e do controle de patógenos. Os nutrientes solubilizados tornam-se disponíveis para a absorção pelas raízes, desta forma, reduzindo a necessidade de adubação, fenômeno que desperta o interesse para ampliar as pesquisas com estes fungos (SANTOS, 2008).

Contudo, o sucesso do controle de fitopatógenos e da promoção de crescimento vegetal por bioagentes dependerá das propriedades e mecanismos de ação desenvolvidos pelo micro-organismo.

3.2.1 Mecanismos de ação

Os mecanismos de ação pelos quais *Trichoderma* sp. pode atuar no controle biológico são basicamente: competição, antibiose, parasitismo e predação. O antagonista pode agir por um ou mais mecanismos de interações antagonísticas. Inclusive quando age por mais de um mecanismo, as chances do sucesso da capacidade de biocontrole são aumentadas.

A competição é um processo referente à interação entre dois ou mais organismos, empenhados na mesma ação. Os organismos competem entre si para obter nutrientes, água, luz, espaço, fatores de crescimento, oxigênio, entre outros. A competição por nutrientes é um mecanismo importante, pois muitos fungos fitopatogênicos são sensíveis à falta de alguns nutrientes (BENÍTEZ *et al.*, 2004).

A antibiose é definida como a interação onde um ou mais metabólitos produzidos por um organismo têm efeito danoso sobre o outro (STADNIK &

BETTIOL, 2000). Segundo HARMAN (2000) muitas espécies de *Trichoderma* sp. já estudadas produzem metabólitos secundários tóxicos, como antibióticos e enzimas líticas capazes de inibir e destruir propágulos de fungos fitopatogênicos (MACHADO, 2012). Esses metabólitos podem ser voláteis e não-voláteis. Cerca de 40 substâncias produzidas por *Trichoderma* sp. possuem atividade antibiótica.

O parasitismo envolve a interação direta de um fungo com outro. Esse processo reflete a hostilidade química, resultando na inibição de um e no aproveitamento dos restos celulares pelo sobrevivente. Caracteriza-se por ser um processo complexo e compreende várias etapas. Primeiramente ocorre o reconhecimento do alvo pelo antagonista, a transmissão de sinais que resulta na interação entre antagonista e fitopatógeno. Posteriormente ocorre a indução e produção de metabólitos (enzimas) pelo antagonista, e por último, a digestão da célula alvo (PARZIANELLO, 2012).

Os mecanismos de ação dos micro-organismos são específicos e podem variar conforme a cultura, o ambiente, com a interferência de outros micro-organismos, substrato, temperatura e umidade.

3.3 Metabólitos Voláteis

Compostos orgânicos voláteis possuem baixa massa molecular e, geralmente, são compostos hidrofóbicos com alta pressão de vapor, isto é, eles evaporam facilmente à temperatura ambiente. Os compostos voláteis aparecem como produtos intermediários e finais de diversas vias metabólicas (HUNG *et al.*, 2013; SIDDIQUEE *et al.*, 2012).

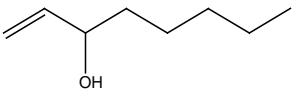
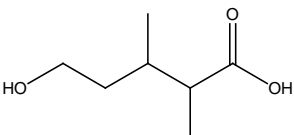
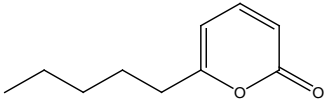
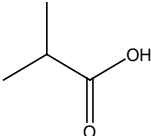
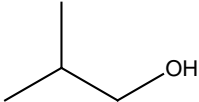
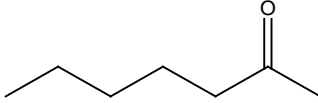
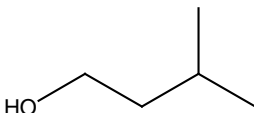
Os metabólitos voláteis possuem vantagens sobre aqueles não voláteis, como a capacidade de difusão em interstícios e de solubilização entre as partículas do solo, sendo que não são sujeitos à absorção e biodegradação como também não tem seu efeito limitado pela diluição. A sua ação pode atingir microorganismos fisicamente distantes dos sítios de produção (LOBO JUNIOR & ABREL, 2000; FIALHO, 2012).

Como as plantas e bactérias, os fungos produzem um grande número de COV que pertencem a diferentes classes de estruturas tais como: álcoois, cetonas,

ésteres, alcanos, monoterpenos, sesquiterpenos e derivados (Tabela 1) (STOPPACHER *et al.*, 2010; MORATH *et al.*, 2012).

A atividade microbiana e os fatores ambientais estão interligados e a produção dos COVs irá depender da dinâmica de todo o ecossistema. Os tipos, proporções e concentrações de compostos voláteis podem variar com as espécies que produzem, a sua idade, o substrato, interações com outras espécies e as condições ambientais em que se encontra.

Tabela 1: Estrutura e atividade de compostos voláteis produzidos por fungos.

| Molécula | Estrutura | Atividade |
|---------------------------------------|---|--------------------------------------|
| Oct-1-en-3-ol |  | Semioquímico |
| Ácido 3,4-dimetil-1-hidroxi-butanóico |  | Antifúngico |
| 6-pentilpiran-2-ona |  | Antibiótico, promotor de crescimento |
| Ácido Isobutírico |  | Antifúngico |
| 2-metilpropan-1-ol |  | Atrativo fungico |
| Heptan-2-ona |  | Semioquímico |
| 3-metilbutan-1-ol |  | Semioquímico |

Estes COVs estão envolvidos em diferentes processos biológicos, sendo que os produzidos a partir de fungos apresentam potencial para aplicações biotecnológicas na agricultura, na indústria e na medicina.

Na agricultura, o interesse nos compostos voláteis é devido ao seu elevado potencial como agente de controle biológico contra fungos patogênicos a fim de se empregar uma estratégia de manejo mais sustentável para o controle de pragas e reduzir o uso de controle químico nas lavouras (MORATH *et al.*, 2012; HUNG *et al.*, 2013).

Os compostos voláteis produzidos por *Trichoderma* sp, por exemplo, agem como antibióticos contra fungos patogênicos e podem apresentar efeito de promoção do crescimento de plantas, bem como a aumentar a resistência sistêmica das plantas, tornando-os, assim, as plantas menos suscetíveis ao ataque por fungos patógenos (SIDDIQUEE *et al.*, 2012). Os metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma* spp. desempenham um papel-chave no micoparasitismo e em suas interações com as plantas.

Vários compostos voláteis são fisiologicamente ativos e desenvolvem papéis de sinalização importantes no reino microbiano. A 6-pentilpiran-2-ona (6PP) é um produto volátil bem descrito do metabolismo secundário em espécies de *Trichoderma* e atua como fungicida e também apresenta atividade antimicrobiana. Além disso, os compostos voláteis oct-1-en-3-ol, octan-3-ona, octan-3-ol e oct-1-en-3-ona funcionam como atraentes de insetos e exibem efeitos fungistáticos e fungicidas.

3.3.1 A lactona 6-Pentilpiran-2-ona

A maioria das lactonas são produzidas por sínteses químicas, mas a utilização de micro-organismos para a sua produção pode ter várias vantagens em comparação com a síntese, uma vez que para sínteses de alguns desses compostos são necessárias várias etapas o que pode vir a encarecer o produto final (Janssens *et al.*, 1992).

O metabólito secundário 6-pentilpiran-2-ona (6PP) (Figura 3) é uma lactona insaturada e sua presença é caracterizada pelo forte aroma de coco. A 6PP foi detectado pela primeira vez em culturas de *Trichoderma virede*. Deste então tem sido detectada em culturas de outras espécies de *Trichoderma*, como por exemplo: *T. harzianum* e também em *Aspergillus* sp.

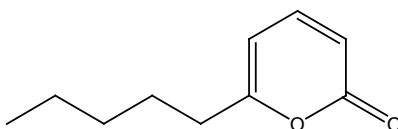


Figura 3: 6-pentilpiran-2-ona metabólito produzido por *Trichoderma* sp.

A lactona 6PP obtida por processo fermentativo é bastante desejada, despertando o interesse para a otimização das condições de fermentação uma vez que sua síntese química requer sete etapas, sendo um processo difícil e custoso (SARHY-BAGNON *et al.*, 2000).

Poucos trabalhos tem se dedicado ao estudo dos caminhos metabólicos envolvidos na formação de lactonas cíclicas insaturadas a partir de ácidos graxos. A formação de lactonas, como a de outros compostos aromáticos, está relacionada com o mecanismo dos lipídios. Alguns ácidos graxos de cadeia longa (ácidos oléico, linoléico e ricinoléico) podem ser transformado em 6PP por algumas linhagens de *Trichoderma* sp. (SILVA, 2002).

Segundo SERRANO-CARREON *et al.* (1993) foi possível verificar o acúmulo de lipídios na biomassa de *T. harzianum* e *T. viride*, os quais são produtores de 6PP.

A produção de metabólitos varia em função de fatores químicos, físicos e biológicos. A temperatura e o pH devem ser conservados durante a fermentação em torno de 25 °C a 30 °C e em torno de 5 a 6 respectivamente. A natureza das fontes de carbono e nitrogênio determinam a quantidade de compostos voláteis produzido, visto que elevada relação carbono/nitrogênio favorece a biossíntese de 6PP e o contrário ocorre para a formação da biomassa (SERRANO-CARREON *et al.*, 1993).

O composto 6PP também apresenta atividade antifúngica e baixa toxicidade para mamíferos, uma alternativa interessante para o controle biológico de fungos fitopatogênicos.

A concentração desta substância quando produzida por micro-organismos é geralmente baixa, provavelmente devido ao efeito inibitório causado no metabolismo fúngico. Estudos sugerem a remoção da lactona durante o processo de fermentação para superar o problema de toxicidade e aumentar o rendimento (CALANSAS, 2012).

3.4 Determinação dos Metabólitos Secundários

A técnica de cromatografia gasosa tem sido utilizada para a identificação de centenas de componentes presentes em vários sistemas naturais e biológicos. Esse procedimento permite caracterizar os componentes responsáveis pelo odor e sabor de alimentos além de ser capaz de identificar metabólitos produzidos por diversos micro-organismos.

MELO & FAULL (2000) relataram a separação e determinação quantitativa de uma ampla variedade de componentes orgânicos e inorgânicos em micro-organismos detectados através de métodos cromatográficos.

A determinação de metabólitos fúngicos voláteis geralmente é feita por cromatografia em fase gasosa (CG). Este método já foi descrito para a identificação de metabólitos de fungos como *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp. e *Trichoderma* sp., sendo que o mesmo é bem empregado para identificação de compostos voláteis e termicamente estáveis.

As técnicas de separação estão sempre acopladas a uma técnica de identificação dos COVs, assim é possível detectar, quantificar e identificar cada uma das substâncias que estão eluindo da coluna cromatográfica.

Atualmente têm-se utilizado para detecção dos compostos voláteis as técnicas de detector de ionização de chama (DIC) e de espectrometria de massa (EM). Na detecção por EM, há a possibilidade de identificar compostos voláteis individuais da mistura complexa. A estrutura, caracterização e confirmação da identidade dos compostos é geralmente obtida através da comparação dos

espectros de massa com biblioteca de espectros e determinação de índices de retenção cromatográfica.

Um conhecimento mais aprofundo do caráter e quantidade de moléculas presentes em micro-organismos facilita uma compreensão dos processos bioquímicos que são explorados em diversos processos biotecnológicos. A análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-EM) é essencial para a identificação e quantificação de COVs produzidos por *Trichoderma* sp..

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos e sua manutenção

Os micro-organismos utilizados para as extrações e avaliação da atividade fitotóxica foram: *Trichoderma pseudokoningii* (CCT 7418), *Trichoderma virede* (CCT 0333), *Trichoderma virens* (CCT 1211) provenientes da Fundação de Pesquisa e Tecnologia André Tosello e *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma asperellum* pertencentes ao Laboratório de Associações Micorrizicas do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Os fungos foram cultivados em placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura batata-dextrose- ágar (BDA, SIGMA) e incubadas à temperatura de 25 °C durante sete dias. Em seguida, essas cepas foram transferidas para tubos de culturas contendo BDA. Após sete dias de incubação, as culturas foram armazenadas sob refrigeração (4 °C) e transferidas para novas culturas periodicamente.

4.2 Seleção da Temperatura ótima e Meios de Cultivo

Foram testados três meios de cultura líquidos: Meio Fries, Meio Mínimo e Batata-dextrose (BD, SIGMA), o qual foi preparado à metade da concentração sugerida pelo fabricante (24 g L⁻¹). Os mesmos foram testados a fim de se escolher aquele onde as espécies analisadas crescessem e desenvolvessem de forma a aumentar o rendimento dos extratos. A composição dos meios de cultivo: Meio Fries e Meio Mínimo foi bastante variada, tanto em componentes quanto em concentração (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2: Composição do Meio Fries

| Componentes | Concentração (g/L) |
|--------------------------------------|---------------------------|
| NH ₄ NO ₃ | 1,0 |
| KH ₂ PO ₄ | 1,0 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,5 |
| NaCl | 0,1 |
| CaCl ₂ | 0,1 |
| Sucrose | 30 |
| Tartarato de amônio | 5,0 |
| Extrato de levedura | 0,5 |

Tabela 3: Composição do Meio Mínimo

| Composição | Concentração (mg/L) |
|--|----------------------------|
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 731 |
| KNO ₃ | 80 |
| KCl | 65 |
| Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O | 288 |
| Fe.EDTA | 8,0 |
| MnCl ₂ .4H ₂ O | 6,0 |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 2,65 |
| H ₃ BO ₃ | 1,5 |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,13 |
| NaMoO ₄ .2H ₂ O | 0,0024 |
| Glicina | 3,0 |
| Tiamina | 0,1 |
| Piridoxina | 0,1 |
| Ácido Nicotínico | 0,5 |
| Inositol | 50 |
| Glicose | 10000 |

Após sete dias de incubação dos fungos em placas de Petri (9 cm de diâmetro por 3 cm de altura) contendo 20 mL de BDA, 380 mg de micélio foram transferidos para Erlenmeyers contendo um volume inicial de 50 mL de meio de cultura ficando incubados neste volume por sete dias.

Em seguida, o material obtido foi transferido para Erlenmeyers contendo 450 mL de meio. Após sete dias de incubação, o volume da etapa anterior foi transferido para Erlenmeyers contendo 2500 mL de meio (Figura 4). Esse procedimento foi realizado a fim de garantir que o fungo se adaptasse às condições oferecidas pelo meio de cultura, tendo um aumento no rendimento dos extratos.

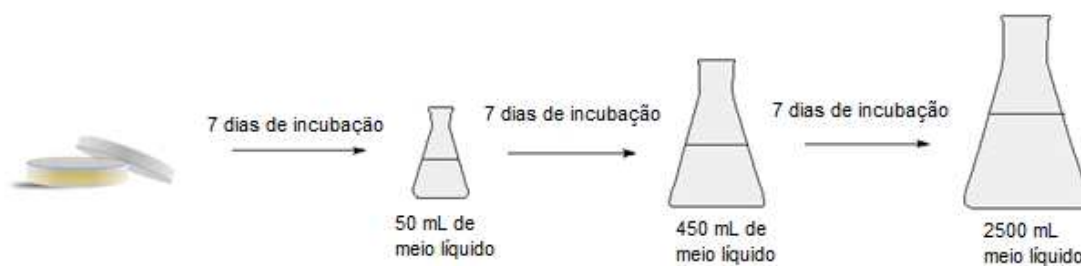


Figura 4: Etapas incubação de *Trichoderma* sp. em meio líquido.

Antes de cada inoculação, os Erlenmeyers contendo o meio de cultura foram autoclavados a 120 °C durante 20 minutos. E os Erlenmeyers foram incubados, na ausência de luz, a 25 °C e 150 rpm durante 7 dias

4.3 Extração dos Metabólitos Voláteis

Decorridos os sete dias de incubação em meio líquido, o micélio fúngico foi filtrado a vácuo e a solução armazenada a 4 °C. A extração líquido-líquido foi realizada de forma sequencial utilizando-se como solvente o acetato de etila de grau analítico. Foram realizadas duas repetições para cada extração utilizando um volume de 500 mL de solvente por etapa (Figura 5).

Da fase orgânica obtida foi retirada a umidade com sulfato de sódio anidro e posteriormente, a fase orgânica foi filtrada para retirar qualquer resíduo de sulfato de sódio anidro e em seguida foi concentrada em evaporador rotatório. Os extratos obtidos foram armazenados a 4 °C até o momento da análise por cromatografia gasosa.

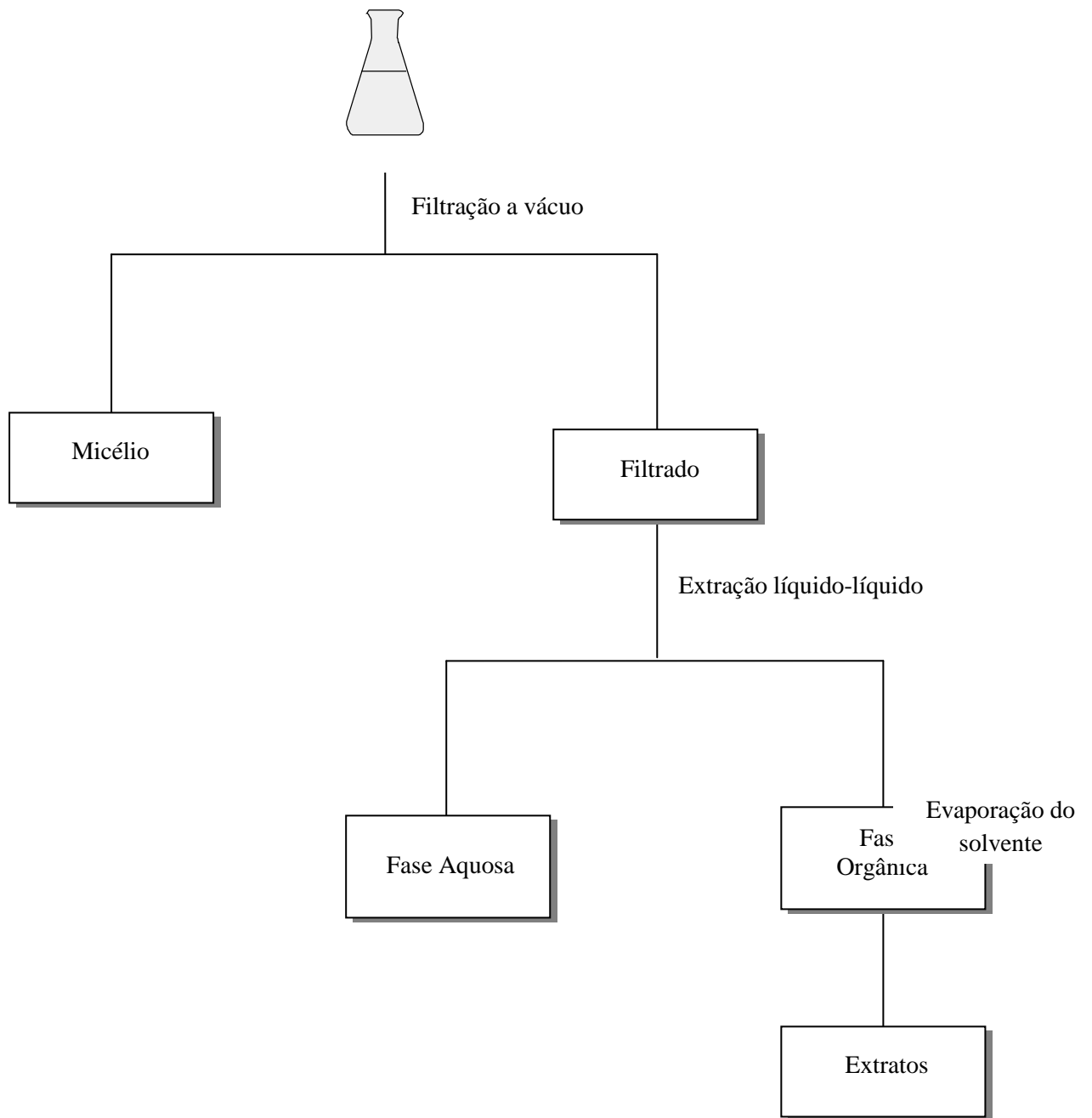


Figura 5: Processo de filtração e obtenção dos extratos de *Trichoderma* spp.

4.4 Identificação dos Compostos Voláteis

Para a identificação dos compostos voláteis de *Trichoderma* spp. foi utilizado um cromatógrafo a gás (Shimadzu GC-17A, Japão) equipado com coluna de sílica fundida RTX-5 (30 m × 0,25 mm, espessura do filme de 0,25 μm) e acoplado a um espectrômetro de massas (Shimadzu GCMS-QP5050A, Japão). O gás de arraste utilizado foi o hélio com fluxo de 1 mL min⁻¹. A temperatura do injetor foi de 280 °C, sendo a temperatura inicial da coluna 40 °C mantida por 2 minutos, seguido de aquecimento a 10 °C min⁻¹ até 200 °C, 10 °C/min a 200 °C, 25 °C/min a 260 °C (mantida por 5 min). A injeção foi realizada em modo *splitless* durante toda a análise. Com relação ao espectrômetro de massas, o processo de ionização foi por impacto de elétrons (70 eV) fonte 230 °C, quadrupolo 150 °C, atraso do solvente: 2.2 min, escâner total (45-400 amu).

As identificações dos componentes foram realizadas pela comparação de seus tempos de retenção, relativos à série de alcanos (C9 – C27), e pela comparação dos espectros de massas com o banco de dados da biblioteca Nist (Nist 05) ou com a literatura (ADAMS, 2007; <http://www.nist.gov>, POLIZZI *et al.* 2011; SARHY-BAGNON *et al.*, 2000).

Foi utilizado como padrão interno o Tetracosano (3 mg). Esse composto foi adotado como referência a fim de tornar possível a comparação das concentrações dos compostos obtidos nos extratos analisados. As porcentagens obtidas para os compostos encontrados foram calculadas pela razão entre a área do pico referente ao padrão interno e a área do pico de cada composto.

4.5 Ensaios Biológicos

4.5.1 Preparo das Soluções

A massa utilizada dos extratos (Tabela 4) foi calculada para o preparo da solução estoque. As soluções estoque (1000 ppm) de cada extrato testado foram preparadas em solução aquosa de dimetilsufóxido (DMSO) 0,5% (v/v). Da solução estoque obtida (30 mL) foram utilizados para o teste de maior concentração e o restante utilizado na diluição para a obtenção das outras concentrações (31,25, 62,5, 125, 250 e 500 ppm).

Tabela 4: Massas utilizadas para o preparo das soluções estoque 1000 ppm dos extratos.

| Espécie | Massa (mg) |
|-----------------------------------|-------------------|
| <i>Trichoderma virens</i> | 75,8 |
| <i>Trichoderma virede</i> | 73,0 |
| <i>Trichoderma pseudokoningii</i> | 78,7 |
| <i>Trichoderma harzianum</i> | 72,0 |
| <i>Trichoderma asperullum</i> | 70,5 |

4.5.2 Ensaios biológicos para a avaliação dos extratos sobre o crescimento radicular e a germinação de sementes de pepino (*Cucumis sativus* L.) e de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) em placa de Petri

O bioensaio para a avaliação do crescimento do sistema radicular e a porcentagem de germinação das sementes foi realizado com extratos obtidos nas concentrações de 0, 31,25; 62,5; 125; 500 e 1000 ppm, com três repetições.

Para cada tratamento, foram preparadas três placas de Petri (9 cm de diâmetro por 3 cm de altura) recobertas com papel de germinação (Germitest®). Em seguida, 20 sementes de pepino (*Cucumis sativus* L.) foram espalhadas sobre as placas e umedecidas uniformemente com 5,0 mL das soluções obtidas dos extratos nas concentrações descritas no item 3.5.1. As placas foram seladas com plástico filme e incubadas em câmara de germinação a 25 °C ± 0,5 °C por sete dias. O

mesmo procedimento foi realizado para o preparo das placas contendo as sementes de sorgo (*Sorghum bicolor* L.).

Após este período, as plântulas foram documentadas por fotos digitais. Essas fotos foram utilizadas para avaliação da porcentagem de germinação e também para medir o crescimento do sistema radicular das sementes com o auxílio do software Fitomed®. Para a comparação das médias utilizou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.5.3 Ensaio biológico para a avaliação dos extratos sobre o crescimento radicular de plantas em teste em pote

Foi também conduzido um bioensaio, em casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia da UFV. As plantas utilizadas foram pepino (*Cucumis sativus* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* L.) e corda de viola (*Ipomoea grandifolia*). Esta espécie de planta daninha foi escolhida devido à disponibilidade na época dos testes

O experimento foi conduzido com os extratos dos fungos nas concentrações de 50, 100 e 500 ppm, controle (água) e herbicida Dual com três repetições em delineamento inteiramente casualizado. As soluções utilizadas nos teste foram preparadas de acordo com a mesma metodologia descrita no item 4.5.1.

Cada tratamento foi composto por três potes de plásticos (50 mL) contendo 60 g de areia previamente lavada com ácido sulfúrico de concentração analítica. Cinco sementes pré-germinadas de cada planta foram transplantadas para cada pote e adicionadas de 5,0 mL da solução com os extratos ou herbicida Dual nas concentrações testadas (500, 100 e 50 ppm).

As plantas foram cultivadas em estufa durante 21 dias, sendo regadas com água de torneira, conforme a necessidade, para manter a umidade, de acordo com o nível de insolação e evapotranspiração das plantas. A cada três dias as plantas recebiam 5 mL de nutrientes através da aplicação da solução de Hoagland à meia força.

Após 21 dias, as plantas foram colhidas. As raízes e os caules foram separados e acondicionados em sacos de papel. Esse material foi mantido em estufa de ventilação forçada a 70 °C até que se obtivesse a massa constante

A porcentagem de inibição do crescimento da raiz foi calculada em relação à biomassa do controle. As médias foram comparadas pelo teste Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Condições de Cultivo

A fim que se estabelecessem as condições ideais para o crescimento e desenvolvimento de *Trichoderma* spp., bem como obter um maior rendimento dos extratos para o desenvolvimento das etapas posteriores do trabalho foi realizada uma seleção previa em 50 mL de meio de cultura. Nessa pré-seleção, foi estabelecida a temperatura ótima, uma vez que a temperatura influencia na absorção de nutrientes, no crescimento e na sobrevivência das diversas espécies de fungo. *Trichoderma* spp. apresentam melhor crescimento na temperatura de 25 °C ± 2 °C. A temperatura ótima encontrada para o crescimento dos fungos vem corroborar com estudos de temperatura de crescimento de *Trichoderma* sp. realizados por JAILL e colaboradores (2006) onde a faixa de temperatura ótima foi entre 25 °C e 28 °C. Eles também verificaram que em temperaturas entre 10 °C e 17 °C os isolados não apresentam um crescimento micelial satisfatório.

Durante a pré-seleção também se avaliou a influência do meio de cultivo sobre o desenvolvimento de *Trichoderma* sp.. Dentre os meios líquidos testados, o meio Mínimo foi aquele que apresentou as melhores condições nutricionais para o desenvolvimento das espécies propiciando um maior crescimento micelial bem como maior rendimento de extratos (Tabela 5).

Tabela 5: Massa seca do micélio (M.S) e massa de extrato (M.E) obtido de *Trichoderma* spp. nos meios de cultura Fries (M.F), Meio Mínimo (M.M) e Batata-dextrose (B.D).

| Fungo | M.F | | M.M | | B.D | |
|-----------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | M.S (mg) | M.E (mg) | M.S (mg) | M.E (mg) | M.S (mg) | M.E (mg) |
| <i>Trichoderma asperellum</i> | 46,8 | 1,5 | 100,8 | 6,7 | 86,2 | 2,8 |
| <i>Trichoderma harzianum</i> | 77,6 | 3,5 | 81,2 | 6,5 | 14,6 | 1,9 |
| <i>Trichoderma pseudokoningii</i> | 83,9 | 1,1 | 117 | 2,8 | 64,6 | 1,9 |
| <i>Trichoderma virede</i> | 40,7 | 2,6 | 43,6 | 3,0 | 52,9 | 2,4 |
| <i>Trichoderma virens</i> | 106,4 | 1,4 | 155,0 | 3,3 | 125 | 2,3 |

O *T. virens* e *T. pseudokoningii* foram os que produziram maior quantidade de micélio quando cultivado no meio Mínimo, sendo que o *T. asperellum* e *T. harzianum* são os que produzem maior rendimento de extrato neste mesmo meio de cultura.

Pode-se perceber que o *T. viride* não sofreu influência expressiva do meio de cultura uma vez que não houve alterações significativas na massa de micélio, nem tão pouco na massa de extrato produzidas por esse fungo nos três meios de cultura analisados.. A agitação do meio de cultura contendo o fungo do gênero *Trichoderma* spp. é necessária uma vez que este fungos realizam respiração aeróbica necessitando, portanto, de oxigênio para desenvolver as suas atividades metabólicas. Como a solubilidade de oxigênio é baixa em água a agitação permite uma troca gasosa eficiente entre o meio de cultura e o meio externo.

5.2 Identificação e Quantificação dos Compostos Voláteis

Os extratos obtidos no processo de extração utilizando-se o meio Mínimo do volume final de 3000 mL foram submetidos à análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), os cromatogramas referentes aos extratos encontram-se no Apêndice.

Os metabólitos voláteis detectados nos extratos de *Trichoderma* sp. obtidos do meio Mínimo são apresentados na tabela 6. Esses compostos são membros das classes de alcanos, álcoois, cetonas, pironas (lactonas), monoterpenos e sesquiterpenos. A variedade de voláteis, bem como a proporção entre os diferentes componentes da mistura produzida pode representar as distintas conversões metabólicas realizadas pelos micro-organismos (FIALHO, 2008).

Tabela 6- Compostos metabólicos detectados nos extratos obtidos a partir de culturas de *Trichoderma asperillum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma pseudokoningii*, *Trichoderma viride* e *Trichoderma virens* cultivados no meio mínimo.

| Metabólitos | Tempo Retenção (min) | Índice Aritmético | | Extratos | | | | | |
|--|----------------------|-------------------|------|----------|-----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | T.R | I.A* | I.A | <i>T. asperillum</i> ¹ | <i>T. harzianum</i> ¹ | <i>T. pseudokoningii</i> ¹ | <i>T. viride</i> ¹ | <i>T. virens</i> ¹ |
| 1 2-feniletanol | 10,79 | 1115 | 1116 | - | 30,65 | 5,79 | - | - | |
| 2 Ácido desidroacético | 14,87 | 1388 | | 13,03 | 13,67 | 52,35 | 11,94 | - | |
| 3 Tirosol | 15,53 | 1436 | 1435 | - | 23,56 | 17,10 | | - | |
| 4 6-Pentilpiran-2-ona | 16,39 | 1499 | | - | - | - | 11,00 | - | |
| 5 α -cardinol | 18,63 | 1682 | 1652 | - | - | - | | 7,14 | |
| 6 4-hidroxi-6-pentilpiran-2-ona | 19,17 | 1736 | | - | - | - | 4,24 | - | |
| 7 Sesquiterpeno (NI) | 19,67 | 1791 | | 41,94 | 22,00 | 19,59 | - | - | |
| 8 3-Isobutilhexahidropirrolol[1,2-a]-piperazina-1,4-diona | 20,99 | 1955 | | 10,17 | 5,77 | - | - | - | |
| 9 4-(6,6-dimetil-1-ciclohexen-1-il)-3-buten-2-ona | 21,08 | 1978 | | - | - | - | 56,96 | 11,65 | |
| 10 Triancontano | 22,71 | 2194 | | | | | | | |
| 11 3,6-Diisobutilpiperazina-2,5-diona | 22,74 | 2198 | | 18,16 | - | - | - | - | |
| 12 Tetracosano (Padrão Interno) | 24,66 | 2399 | 2400 | 79,22 | 56,62 | 82,34 | 89,94 | 83,57 | |
| 13 3-Benzilhexahidropirrolol[1,2-a]pirazina-1,4-diona | 25, 06 | 2431 | | 7,00 | - | - | - | 27,76 | |

IA* - Índice Aritmético Calculado

IA- Índice Aritmético da Literatura

¹ Porcentagem dos compostos obtidos para cada espécie calculada em relação à área do padrão interno (Tetracosano)

Dentre os compostos detectados nos extratos obtidos do meio de cultura Mínimo o ácido desidroacético (Figura 6-C), 2-feniletanol (Figura 6-D) e 3-isobutilhexahidropirrollo [1,2- α]-piperazina-1,4-diona (ciclo prolina-isoleucina) (Figura 6-E) são alguns dos compostos que apareceram com maior frequência nos extratos analisados.

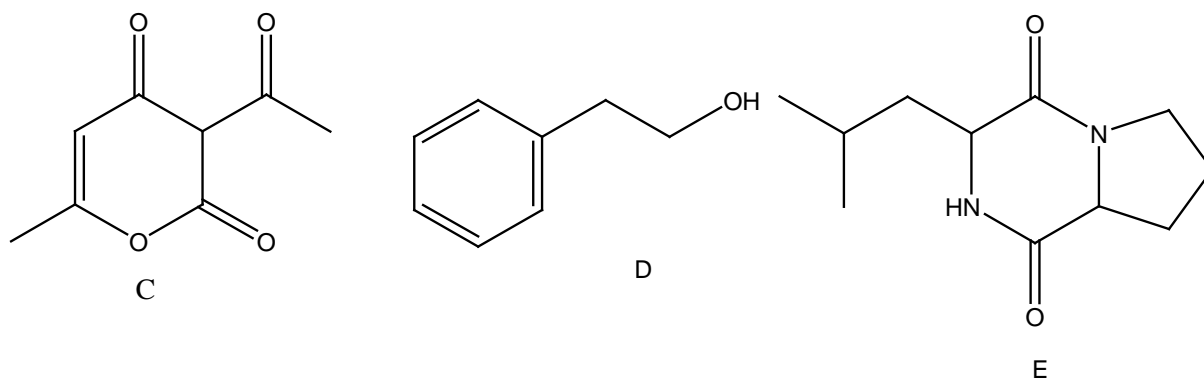


Figura 6: Estrutura química dos metabólitos identificados em *Trichoderma sp.*

O ácido desidroacético (Figura 6-C) é um composto utilizado na indústria de alimentos como conservante por apresentar potente atividade fungicida e antibacteriana garantindo assim a preservação de alimentos contra o ataque de fungos. Esse composto é proveniente da rota metabólica do acetato sendo, portanto, considerado como um derivado do núcleo 2-pirona (Figura 1-A) e foi descrito por ser produzido por *Trichoderma sp.* e apresentar atividade antifúngica (REINO *et al.*, 2008). Diante da ampla utilização desse composto, a descoberta de novas fontes naturais e renováveis para sua obtenção faz-se necessária e os *Trichoderma spp.* mostram-se como uma fonte promissora para a sua obtenção.

O 2-feniletanol (Figura 6-D) é um álcool aromático com uma fragrância de rosa que é considerada como um importante componente de diversos produtos tais como cosméticos e perfumes. Esse composto pode ser encontrado em inúmeros produtos obtidos por fermentação, principalmente em alimentos. Sua fonte natural é o óleo essencial de flores e plantas, tais como jacintos, jasmims, narcisos e pinho, mas é encontrado principalmente nas pétalas de rosa (GARAVAGLIA, 2006).

O 2-feniletanol é produzido através de rotas metabólicas usando glicose como fonte de carbono ou então pela adição de *L*-fenilalanina, seu precursor natural, processo conhecido como via de Ehrlich (HUA & XU, 2011). STOPPACHER *et al.* (2010) relatam a produção desse composto por *T. artrovirede* e FIEDLER *et al.*

(2001) também descrevem esse composto sendo um dos metabólitos voláteis identificados em culturas de *T. harzianum*. Além de ser um composto de aroma importante o 2-feniletanol tem apresentado importantes atividades biológicas sendo descrito como um composto com ação antibacteriana.

O ciclo prolina-isoleucina (Figura 6-E) ainda não havia sido descrito como sendo um composto produzido por *Trichoderma* sp.. Esse composto tem sido relatado por apresentar atividade antibacteriana e também como um antifúngico agindo contra o *Pyricularia oryzae*, o qual causa severas doenças em arroz (BORTHWICK, 2012). Possivelmente, esse composto está relacionado à atividade antifúngica apresentada por *Trichoderma* sp., mas novos estudos deverão ser feitos para a confirmação dessa atividade biológica.

Nos extratos de *T. asperellum*, *T. harzianum* e *T. pseudokoningii* foi detectado um composto com rendimento de 41,94; 22 e 19,59%, respectivamente.

A separação desse composto foi feita pela TLC preparativa utilizando 1 g de extrato, uma vez que o rendimento dos extratos que continham o mesmo era muito baixo o que inviabilizou que esse composto fosse isolado utilizando-se outras técnicas como, por exemplo, a separação por meio de coluna de sílica. Não foi possível a identificação desse composto por seu espectro de massas. Novas técnicas, tais como, ressonância magnética de hidrogênio e carbono e infravermelho serão utilizadas em estudos futuros para possibilitar a identificação deste composto.

O 6PP é um composto descrito na literatura por ser produzido em porcentagem elevadas por *Trichoderma* sp. (STROPPACHER *et al.*, 2010; VINALE *et al.*, 2008; MORATH *et al.*, 2012). Diante das análises realizadas observou-se que não são todas as espécies de *Trichoderma* ssp. que apresentam a capacidade de produção desse metabólito. Apenas no extrato de *T. viride* foi identificado a sua produção o que pode ser confirmado pelo cromatograma (Figura 7) e também pelo espectro de massa obtido por impacto de elétrons (70 eV) o qual revela os picos referentes ao íon molecular em $m/z=166$ e o pico base em $m/z=95$ (Figura 8).

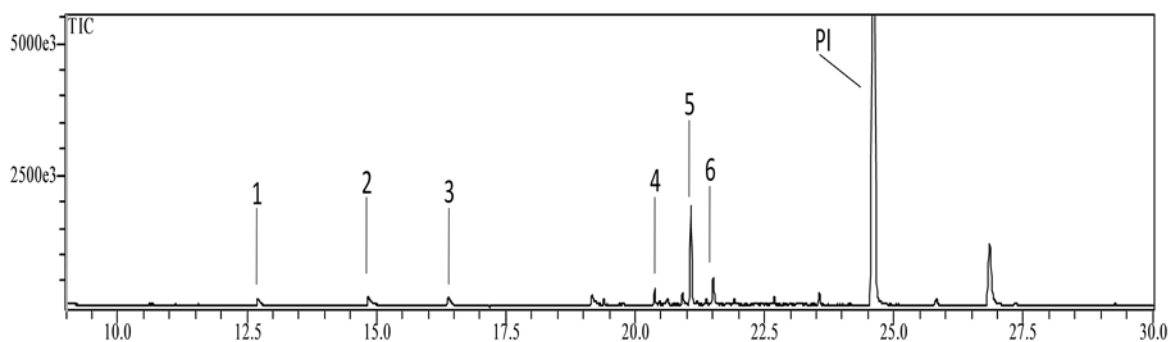


Figura 7: Cromatograma obtido por cromatografia gasosa (CG) do extrato do fungo *T. viride*. Os picos são referentes à: (1) 2-feniletanol; (2) ácido desidroacético; (3) 6-pentilpiron-2-ona, (4) sesquiterpeno e (PI) padrão interno.

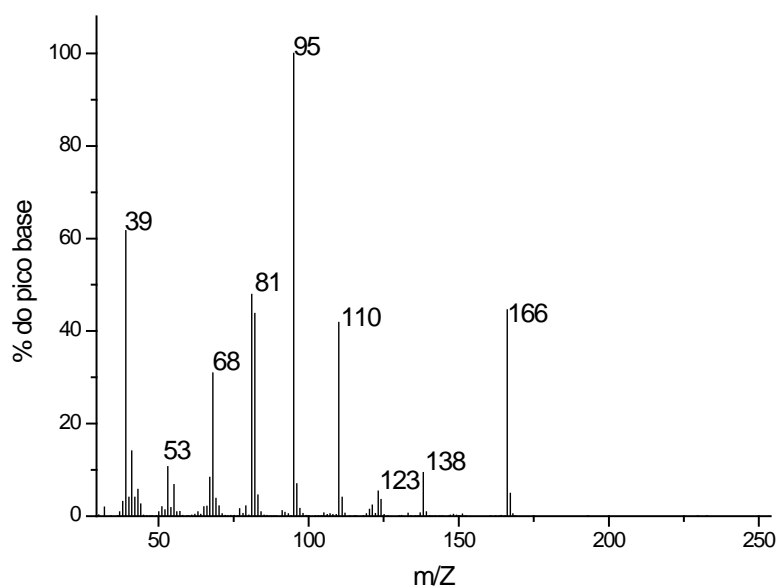


Figura 8: Espectro de massas da lactona 6PP, obtido a partir do cromatograma de *T. viride*.

Os dados encontrados corroboram com aqueles obtidos por POLIZZI *et. al* (2011) e SARHY-BAGNON *et. al.* (2000) onde confirmam a produção da lactona por *Trichoderma* sp., relatando principalmente a presença deste composto em culturas de *T. viride* e havendo também relatos em culturas de *T. harzianum* cuja a principal característica é o seu aroma adocicado de coco.

Os efeitos biológicos de 6PP são numerosos, sendo que esse composto vem se destacando devido à sua capacidade de inibir o crescimento de fungos

fitopatógenos tais como: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, *Phytophthora megasperma* e *Botrytis cinérea*, os quais atacam culturas importantes como a do arroz, milho, feijão, tomate, entre outras (STOPPACHER *et al.*, 2010; RUBIO *et al.*, 2009; POLIZZI *et al.*, 2011).

A 6PP tem um efeito regulador sobre plântulas de trigo, promovendo o crescimento de planta em baixas concentrações e inibindo em altas concentrações (VINALE *et al.*, 2008). Esses autores observaram que, em comparação com plantas de controle, as plantas de tomate apresentaram desenvolvimento melhor e com mais vigor e tinham um sistema radicular mais extenso após suas folhas terem sido pulverizadas com 6PP.

Foi possível avaliar, ao longo do estudo, que nas condições de cultivo estabelecidas, *T. asperillum* e *T. harzianum* perderam a habilidade de produzirem a lactona 6PP. Uma possível explicação para o ocorrido fundamenta-se no fato dessas espécies terem se adaptado às condições de temperatura, meio de cultivo e agitação impostas, sendo que as mesmas já não apresentavam as condições necessárias para sua produção, uma vez que por ser um metabólito secundário ele não é um metabólito essencial para a sobrevivência do fungo sendo sintetizado apenas quando o mesmo encontra-se sobre algum estresse biótico ou abiótico.

Esses dados vem ratificar que a capacidade de *Trichoderma* sp. em produzir compostos e o seu efeito fungicida pode variar entre espécies e até mesmo entre isolados da mesma espécie (MATA, 2008). Além disso, os tipos, proporções e concentrações de compostos voláteis variam com as espécies que os produzem, a sua idade, o substrato, interações com outras espécies e outras condições ambientais, como temperatura e pH (HUNG *et al.*, 2012).

Assim, a mistura complexa de metabólitos secundários produzida por *Trichoderma* spp. varia muito em composição e constituintes majoritários de acordo com as condições de cultivo adotada e também com as espécies estudada.

5.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

5.3.1 Ensaios biológicos para a avaliação dos extratos sobre o crescimento radicular e a germinação de sementes pepino (*Cucumis sativus* L.) e sorgo (*Sorghum bicolor* L.) em teste em placa de Petri

Os extratos obtidos a partir do meio de cultura Mínimo crescidos com *Trichoderma* spp. mostraram diferentes nível de efeito sobre a germinação da semente e do crescimento do sistema radicular de pepino (Tabela 7) e de sorgo (Tabela 8).

Os extratos de *T. pseudokoningii* na concentração de 1000 ppm e *T. asperellum* na concentração de 125 ppm foram aqueles que mais induziram o crescimento radicular de pepino em 366 e 249%, respectivamente, em relação ao controle (Tabela 7).

As altas taxas de indução do crescimento para a semente de pepino já vem sendo relatado com frequência na literatura, sendo que algumas espécies de *Trichoderma* sp. produzem compostos capazes de promover o crescimento destas plantas em até 300% (BROTMAN *et al.*, 2009).

Os procedimentos moleculares e bioquímicos relacionados ao processo de indução do crescimento de plantas, por *Trichoderma* sp. ainda não foram totalmente elucidados, mas acredita-se que a promoção do crescimento ocorra devido esses fungos serem capazes produzir diferentes metabólitos secundários, os quais estimulam o crescimento e os mecanismos de defesa sistêmica da planta contra estresses bióticos e abióticos (VINALE *et al.*, 2008, SHORESH *et al.*, 2010).

Tabela 7: Efeitos das diferentes concentrações dos extratos obtidos no meio de cultura Mínimo de *Trichoderma asperillum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma pseudokoningii*, *Trichoderma viride* e *Trichoderma virens* sobre a germinação e o crescimento radicular pepino (*Cucumis sativus*) após 7 dias de semeadura.

| | Concentrações dos extratos (ppm) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------------|----------------------|----------------------|
| | 1000 ppm | | | 500 ppm | | | 250 ppm | | | 125 ppm | | | 62,5 ppm | | | 31,25 ppm | | |
| | Comprimento ¹ (cm) | % CR ² | % GE ³ | Comprimento ¹ (cm) | % CR ² | % GE ³ | Comprimento ¹ (cm) | % CR ² | % GE ³ | Comprimento ¹ (cm) | % CR ² | % GE ³ | Comprimento ¹ (cm) | % CR ² | % GE ³ | Comprimento ¹ (cm) | % CR ² | % GE ³ |
| Controle | 1,00 ± 0,83 b | 100 | 100 | 1,00 ± 0,83 b | 100 | 100 | 1,00 ± 0,83 b | 100 | 100 | 1,00 ± 0,83 b | 100 | 100 | 1,00 ± 0,83 b | 100 | 100 | 1,00 ± 0,83 b | 100 | 100 |
| <i>T. asperillum</i> | 9,13 ± 3,04 ab | 303 | 100 | 10,46 ± 2,29 a | 347 | 98 | 6,18 ± 0,84 a | 205 | 87 | 10,52 ± 3,56 a | 349 | 98 | 6,28 ± 0,29 a | 208 | 97 | 7,36 ± 0,63 ab | 244 | 100 |
| <i>T. harzianum</i> | 7,73 ± 0,43 ab | 256 | 100 | 9,55 ± 2,71 ab | 317 | 97 | 5,90 ± 2,11 a | 196 | 92 | 10,15 ± 0,41 a | 337 | 98 | 9,44 ± 5,23 a | 313 | 98 | 10,20 ± 1,41 a | 338 | 98 |
| <i>T. pseudokoningii</i> | 14,05 ± 8,47 a | 466 | 100 | 5,84 ± 4,69 ab | 194 | 93 | 7,13 ± 4,51 a | 237 | 100 | 9,55 ± 0,66 a | 371 | 98 | 7,74 ± 4,67 a | 257 | 97 | 5,69 ± 0,40 ab | 189 | 95 |
| <i>T. viride</i> | 8,67 ± 0,27 ab | 288 | 98 | 7,87 ± 0,56 ab | 261 | 96 | 6,81 ± 0,27 a | 226 | 97 | 7,46 ± 0,96 ab | 247 | 100 | 6,84 ± 1,21 a | 227 | 100 | 5,56 ± 2,89 ab | 184 | 100 |
| <i>T. virens</i> | 8,10 ± 0,98 ab | 269 | 96 | 7,59 ± 0,88 ab | 252 | 98 | 6,25 ± 1,15 a | 208 | 92 | 6,63 ± 0,98 ab | 220 | 100 | 6,59 ± 0,71 a | 219 | 100 | 6,41 ± 1,98 ab | 213 | 100 |

¹ Medidas seguidas por uma mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

² CR- porcentagem de crescimento radicular em relação ao controle

³ GE- porcentagem de germinação das sementes em relação ao controle.

As análises dos metabólitos secundários voláteis produzidos por *T. harzianum* associados às sementes e plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) e canola (*Brassica napus*) mostram que esses compostos apresentam efeito positivo nas plantas estimulando os mecanismos de defesa sistêmica contra os fungos fitopatogênicos como, por exemplo, o *Botrytis cinerea* (VINALE *et al.*,2008).

Também no sorgo, observou-se efeitos dos extratos dos *Trichoderma* spp. sobre a germinação e o crescimento do sistema radicular de sorgo (Tabela 8).

O extrato de *T. pseudokoningii* na concentração de 250 ppm e *T. virens* na concentração de 125 ppm foram os mais ativos uma vez que inibiram o crescimento radicular de sorgo em 60 e 65% respectivamente em relação ao controle.

Os dados obtidos para o bioensaio com sementes de sorgo nas concentrações 62,5 e 31,25 ppm vem confirmar o já dito por NAWROCKA e MALOLEPSZA (2013) onde mostram a capacidade apresentada por *Trichoderma* sp. em induzir o crescimento radicular de espécies de *Gramineae* em concentrações mais baixas. Esses dados estão de acordo com aqueles encontrados por VINALE *et al.* (2008) onde em concentrações mais baixas aumenta-se a probabilidade de ocorrer a indução do crescimento radicular das sementes enquanto que em concentrações mais elevadas predomina o efeito inibitório.

Tabela 8: Efeitos das diferentes concentrações dos extratos obtidos no meio de cultura Mínimo de *Trichoderma asperillum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma pseudokoningii*, *Trichoderma viride* e *Trichoderma virens* sobre a germinação e o crescimento radicular sorgo (*Sorghum bicolor*), após 7 dias de semeadura

| | Concentrações dos extratos (ppm) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------------|----------------------|----------------------|
| | 1000 ppm | | | 500 ppm | | | 250 ppm | | | 125 ppm | | | 62,5 ppm | | | 31,25 ppm | | |
| | Comprimento ¹ (cm) | % CR ² | % GE ³ | Comprimento ¹ (cm) | % CR ² | % GE ³ | Comprimento ¹ (cm) | % CR ² | % GE ³ | Comprimento ¹ (cm) | % CR ² | % GE ³ | Comprimento ¹ (cm) | % CR ² | % GE ³ | Comprimento ¹ (cm) | % CR ² | % GE ³ |
| Controle | 0,84±0 a | 100 | 85 | 0,84±0 a | 100 | 85 | 0,84±0 a | 100 | 85 | 0,84±0 a | 100 | 85 | 0,84±0 a | 100 | 85 | 0,84±0 a | 100 | 85 |
| <i>T. asperillum</i> | 1,75±0,87 a | 130 | 93 | 2,34±0,18 a | 108 | 91 | 2,86±0,12 a | 113 | 95 | 2,69±0,76 a | 106 | 73 | 2,85 ± 0,79ab | 113 | 85 | 3,36± 0,16 a | 133 | 85 |
| <i>T. harzianum</i> | 1,56±0,43 a | 62 | 77 | 2,70 ± 0,52a | 106 | 83 | 2,36±0,31 a | 93 | 86 | 2,68±0,13 a | 106 | 81 | 2,73 ± ab | 108 | 75 | 2,37±0,15 a | 94 | 75 |
| <i>T. pseudokoningii</i> | 1,39±0,18 a | 55 | 87 | 2,08±0,96 a | 82 | 87 | 1,00±1,73a | 40 | 100 | 1,97±1,72 a | 78 | 62 | 3,62 ± 0,66ab | 143 | 93 | 2,98±1,12 a | 117 | 93 |
| <i>T. viride</i> | 2,26±0,88 a | 89 | 87 | 2,13±0,71 a | 84 | 91 | 2,10±0,81 a | 83 | 85 | 2,28±0,28 a | 90 | 80 | 1,91± 0,68ab | 75 | 73 | 1,61± 0,56a | 63 | 73 |
| <i>T. virens</i> | 1,67±0,20 a | 68 | 67 | 1,97±0,40a | 78 | 86 | 1,13± 1,19 a | 45 | 88 | 0,89±0,18 a | 35 | 86 | 2,71±0,24 ab | 107 | 90 | 2,90±1,58 a | 114 | 90 |

¹ Medidas seguidas por uma mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

²CR- porcentagem de crescimento radicular em relação ao controle

³GE- porcentagem de germinação das sementes em relação ao controle

Os dados deste estudo confirmam o envolvimento de metabólitos secundários de *Trichoderma* spp. na regulação da germinação de semente agindo possivelmente como auxinas, grupo de hormônios que é caracterizado pela sua capacidade de induzir o alongamento celular, sendo que esses compostos atuam desde a semente até o crescimento do caule, folhas e raiz (RODRIGUES *et al.*, 2004).

De acordo com os resultados deste bioensaio, nenhum dos extratos avaliados teve efeito significativo na germinação de pepino, mas a germinação do sorgo sofreu influência dos extratos, sendo que os extratos causam até 15% de germinação das sementes em relação ao controle (Tabelas 7 e 8).

Esses dados são confirmados por aqueles obtidos por KLEIFELD & CHET (1992) onde eles mostram que há uma maior porcentagem da germinação quando sementes de feijão, rabanete, tomate, pimentão e pepino foram tratadas com *T. harzianum*. Semelhante a isso, ALMANÇA (2008) verificou que a aplicação de *T. harzianum* antecipou a germinação de sementes de pimentão em dois dias e também proporcionou diferença no peso seco de pimentão, pepino e tomate, quando comparados a testemunha.

4.3.2 Ensaio biológico para a avaliação dos extratos sobre o crescimento radicular de plantas em teste de pote

Observou-se também a atividade dos extratos de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento do sistema radicular de pepino (Tabela 9), sorgo (Tabela 10) e corda de viola (Tabela 11), em casa de vegetação

Os extratos de *T. viride* (100 ppm) e o *T. virens* (50 ppm) foram os mais ativos uma vez que induziram o crescimento do sistema radicular nas plântulas de pepino em 99 e 88% respectivamente (Tabela 9).

Os resultados encontrados para os extratos de *T. viride* vem confirmar os estudos realizados por HUNG *et al.* (2013) onde eles avaliaram a ação dos compostos voláteis produzidos por *T. viride* sobre sementes e plântulas de *Arabidopsis thaliana* constatando que em comparação com ao controle, as plantas

cultivadas na presença de compostos voláteis produzidos por esse fungo tinha o seu crescimento estimulado tornando-se mais altas, floresciam mais cedo e tinham mais raízes laterais. Essa observação é reforçada por estudos de RESENDE *et al.* (2004) onde plantas de milho tratadas com *Trichoderma* sp. apresentam aumento do peso seco das raízes.

Tabela 9: Massa seca do sistema radicular (MS) e percentagem de crescimento relativo (CR*) das plântulas de pepino (*Cucumis sativus*) crescidos em potes de areia, em condição de casa de vegetação, após 21 dias de semeadura.

| | Concentrações dos Extratos | | | | | | | | |
|--------------------------|----------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|
| | 500 ppm* | | | 100 ppm | | | 50 ppm | | |
| | M. S ¹ (g) | % CV ² | % CR ³ | M. S ¹ (g) | % CV ² | % CR ³ | M. S ¹ (g) | % CV ² | % CR ³ |
| Controle | 0,22 ±0,06 ab | 29,50 | 100 | 0,22 ±0,06 ab | 29,50 | 100 | 0,22 ±0,06 ab | 29,50 | 100 |
| <i>T. asperellum</i> | 0,29 ± 0,07 ab | 24,25 | 135 | 0,30 ± 0,11 ab | 37,67 | 140 | 0,39 ± 0,13 ab | 34,00 | 178 |
| <i>T. harzianum</i> | 0,40 ± 0,13 ab | 34,06 | 182 | 0,23 ± 0,01 ab | 3,68 | 109 | 0,24 ± 0,18 ab | 74,68 | 110 |
| <i>T. pseudokoningii</i> | 0,20 ± 0,07 ab | 36,87 | 90 | 0,18 ± 0,16 ab | 86,56 | 115 | 0,23± 0,05 ab | 19,40 | 110 |
| <i>T. viride</i> | 0,34 ± 0,11 ab | 31,64 | 158 | 0,43 ± 0,06 a | 13,36 | 199 | 0,42 ± 0,09 a | 21,39 | 195 |
| <i>T. virens</i> | 0,41 ± 0,18 a | 43,12 | 187 | 0,28 ± 0,11 ab | 40,16 | 130 | 0,41 ± 0,02 a | 4,77 | 188 |
| Herbicida | 0 ± 0 b | 0 | 0 | 0,01 ± 0,01b | 90,28 | 2 | 0,02 ± 0,02 b | 9,45 | 3 |

¹Valores na coluna seguida de mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

²CV%- coeficiente de variação

³CR% Porcentagem do crescimento radicular

CR*= 100-[100x(Média tratamento/Média do controle)]

Os extratos de *T. viride* na concentração de 500 ppm e *T. virens* na concentração de 50 ppm foram os mais ativos para as plântulas de sorgo uma vez que induziram o crescimento dessas em 44 e 41% respectivamente. E apenas o extrato de *T. asperellum* causou inibição no crescimento do sistema radicular, sendo que a maior inibição de 27% foi observada para o extrato *T. asperellum* na concentração de 100 ppm.

A resistência ou tolerância aos metabólitos secundários é uma característica espécie-específica, existindo aquelas mais sensíveis como *Lactuca sativa* L. (alface), *Lycopersicon esculentum* Miller (tomate) e *Cucumis sativus* L. (pepino), consideradas plantas indicadoras de atividade biológica (ALVES *et al.*, 2004; SHORESH *et al.*, 2005).

Diante dos resultados encontrados para os dois bioensaios de germinação e crescimento do sistema radicular, pode-se perceber que o tanto a semente quanto as plântulas pepino são mais sensível aos extratos testados do que sementes e plântulas de sorgo.

Nas plântulas de corda de viola apenas o extrato de *T. viride* na concentração de 500 ppm causou a inibição do crescimento radicular em 19%. Os demais extratos analisados causaram a indução do crescimento radicular, sendo que o extrato de *T. virens* na concentração de 100 ppm foi aquele mais induziu o crescimento em 334% seguido do *T. viride* na concentração de 50 ppm que causou um indução de 307% (Tabela 11).

Os resultados encontrados para este bioensaio com plântulas de pepino, sorgo e corda de viola mostram que a utilização de extratos de *Trichoderma* spp. é extremamente benéfica para as plantas uma vez que elas irão apresentar um maior crescimento comparados com o controle. Podendo, portanto, serem mais resistentes a ataques de fitopatôgenos bem como apresentar maior capacidade de competição por nutrientes, espaço e luminosidade o que irá aumentar a taxa de sobrevivência das plantas no ecossistema.

Tabela 10: Massa seca do sistema radicular (MS) e percentagem de crescimento relativo (CR*) das plântulas de sorgo (*Sorghum bicolor*) crescidos em potes de areia, em condição de casa de vegetação, após 21 dias de semeadura.

| | Concentrações dos Extratos | | | | | | | | |
|--------------------------|----------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|
| | 500 ppm* | | | 100 ppm* | | | 50 ppm* | | |
| | M. S ¹ (g) | % CV ² | % CR ³ | M. S ¹ (g) | % CV ² | % CR ³ | M. S ¹ (g) | % CV ² | % CR ³ |
| Controle | 0,15 ± 0,02 ab | 15,77 | 100 | 0,15 ± 0,02 ab | 15,77 | 100 | 0,15 ± 0,02 ab | 15,77 | 100 |
| <i>T. asperullum</i> | 0,16 ± 0,0 ab | 2,09 | 78 | 0,15 ± 0,01 a | 8,78 | 73 | 0,16 ± 0,03 ab | 17,99 | 76 |
| <i>T. harzianum</i> | 0,15 ± 0,01 ab | 9,6 | 99 | 0,18 ± 0,05 a | 27,04 | 122 | 0,15 ± 0,02 ab | 12,51 | 102 |
| <i>T. pseudokoningii</i> | 0,17 ± 0,04 ab | 23,45 | 115 | 0,17 ± 0,07 a | 44,46 | 111 | 0,15 ± 0,03 ab | 22,07 | 102 |
| <i>T. viride</i> | 0,22 ± 0,04 a | 18,83 | 144 | 0,20 ± 0,04 a | 18,97 | 132 | 0,19 ± 0,04 ab | 21,60 | 129 |
| <i>T. virens</i> | 0,16 ± 0,03 ab | 20,14 | 106 | 0,18 ± 0,05 a | 28,24 | 119 | 0,21 ± 0,06 a | 28,78 | 140 |
| Herbicida | 0,021 ± 0,04 b | 173,20 | 10 | 0,05 ± 0,02 a | 42,20 | 21 | 0,03 ± 0,02 b | 81,24 | 15 |

¹Valores na coluna seguida de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

²CV%- coeficiente de variação

³Porcentagem do crescimento radicular

CR*= 100-[100x(Média tratamento/Média do controle)]

Tabela 11: Massa seca do sistema radicular (MS) e percentagem de crescimento relativo (CR*) das plântulas de corda de viola (*Ipomoea grandifolia*) crescidos em potes de areia, em condição de casa de vegetação, após 21 dias de semeadura.

| | Concentrações dos Extratos | | | | | | | | |
|--------------------------|----------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|
| | 500 ppm* | | | 100 ppm* | | | 50 ppm* | | |
| | M. S ¹ (g) | % CV ² | % CR ³ | M. S ¹ (g) | % CV ² | % CR ³ | M. S ¹ (g) | % CV ² | % CR ³ |
| Controle | 0,04 ± 0,06 a | 137,52 | 100 | 0,04 ± 0,06 abc | 137,52 | 100 | 0,04 ± 0,06 a | 137,52 | 100 |
| <i>T. asperullum</i> | 0,01 ± 0,13 a | 133,05 | 214 | 0,16 ± 0,07 a | 46,09 | 355 | 0,11 ± 0,01 a | 8,8 | 247 |
| <i>T. harzianum</i> | 0,08 ± 0,06 a | 74,48 | 188 | 0,09 ± 0,08 abc | 86,82 | 206 | 0,16 ± 0,05 a | 35,88 | 357 |
| <i>T. pseudokoningii</i> | 0,14 ± 0,10 a | 69,77 | 319 | 0,12 ± 0,06 abc | 53,76 | 262 | 0,11 ± 0,02 a | 17,09 | 242 |
| <i>T. viride</i> | 0,01 ± 0,01 a | 96,07 | 19 | 0,15 ± 0,04 ab | 25,71 | 344 | 0,18 ± 0,16 a | 89,35 | 407 |
| <i>T. virens</i> | 0,16 ± 0,06 a | 38,68 | 365 | 0,19 ± 0,04 a | 19,02 | 435 | 0,15 ± 0,06 a | 37,41 | 341 |
| Herbicida | 0 ± 0 a | 0 | 0 | 0 ± 0 c | 0 | 0 | 0 ± 0 c | 0 | 0 |

¹Material seca em gramas as medidas seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

²CV%- coeficiente de variação

³Porcentagem do crescimento radicular

CR*= 100-[100x(Média tratamento/Média do controle)]

A promoção de crescimento ocasionada por micro-organismos ocorre devido à ação de vários fatores ainda pouco esclarecidos, podendo envolver produção de hormônios vegetais, produção de vitaminas ou conversão de materiais a uma forma útil para a planta, absorção e translocação de minerais e controle de patógenos. Diversos trabalhos mostram o efeito benéfico de *Trichoderma* sp. no desenvolvimento vegetal (MARTINS *et al.* , 2013).

Assim, as interações entre plantas e micro-organismos são de extrema importância para a humanidade, uma vez que uma parte da economia mundial tem por base a utilização de espécies vegetais. O *Trichoderma* sp. vem se destacando, pois são capazes de produzir diferentes metabólitos secundários capazes estimular o crescimento de plantas de importantes culturas e também diminuir o uso de técnicas mais agressivas.

A utilização dos extratos de *Trichoderma* sp. mostram-se como uma alternativa eficaz para a substituição dos adubos químicos utilizados os quais agem, assim como os extratos testados, proporcionando o crescimento das plantas. Sendo que os extratos são menos agressivos ao meio ambiente uma vez que diminuem os resíduos tóxicos possibilitando uma agricultura mais sustentável.

6. CONCLUSÕES

O meio de cultivo onde o fungo é inoculado afeta a produção de metabólitos voláteis bem como o seu crescimento micelial e rendimento de extratos. O meio Mineral mostrou ser o melhor meio de cultura para a inoculação de *Trichoderma* spp. uma vez que aumenta o rendimento dos extratos.

A avaliação cromatográfica dos extratos permitiu a detecção de importantes metabólitos voláteis produzidos pelas espécies do fungo *Trichoderma* sp., sendo que foi possível verificar a produção da lactona 6-pentilpiran-2-ona pelos fungos *T. asperillum*, *T. harzarium* e *T. viride*. Também foram detectados outros compostos com importantes atividades biológicas sendo eles: o ácido desidroacético e 2-fenietanol e bem como a ciclo prolina-isoleucina, o qual até então não havia sido descrito para *Trichoderma* sp.

Os extratos de *Trichoderma* sp. não afetam de forma considerável a germinação das sementes de pepino, mas tem forte influência na germinação das sementes de sorgo causando um aumento de até 15% em relação ao controle. Os resultados dos testes de inibição do crescimento do sistema radicular das sementes de sorgo e pepino mostraram que os extratos são capazes de induzir o crescimento das plântulas em 366% para o pepino e em 43% para o sorgo.

Para os bioensaios, realizados em condições de casa de vegetação, os extratos de *T. viride* e *T. virens* foram aqueles que mostraram melhores resultados quando testados em baixas concentrações.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, A. R.; MACHADO, D. F. M.; PARANHOS, J. T.; SILVA, A. C. F. Selection of isolates of *Trichoderma* spp. in promoting the growth of seedlings of bean cv. Carioca and control *Sclerotinia sclerotiorum*. v. 34, n. 2, p. 47-58. 2013.

ALMANÇA, M. A. K. Aspectos da interação Arooz-*Trichoderma* spp. em solos alagados. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 69 p. Tese. 2008

ALVES, M. C. S.; FILHO, S. M.; INNECCO, R.; Torres, S. B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 39, n.11, p.1083-1086, 2004.

ADAMS, R. Identification of Essencial Oil components by gás Chromatography/Mass spectrometry. 4th Ed. Illinois, USA: **Allured Publishing Corporation**; 2007.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**. v. 7, p. 249-260, 2004.

BORTHWICK, A. D. 2,5-Diketopiperazines: Synthesis, Reactions, Medicinal Chemistry, and Bioactive Natural Products. **Chemical Reviews**. v. 112, p. 3641–3716, 2012.

BROTMAN, Y.; KAPUGANTI, J. G.; VITERBO, A. *Trichoderma*. **Current Biology**. v.20 No.9. R390. Disponível www.sciencedirect.com.

CALASANS, P. N. Produção de Aroma de coco por *Trichoderma harzianum* utilizando bagaço de cana. **Universidade Federal de Sergipe**. 143p. 2012. (Dissertação de Mestrado).

DAOUBI, M.; PINEDO-RIVILLA, C.; RUBIO, M. B.; HERMOSA, R.; MONTE, E., ALEU, J.; COLLADO, I.G. Hemisynthesis and absolute configuration of novel 6-pentyl-2-pyran-2-one derivatives from *Trichoderma* spp. **Tetrahedron**, v. 65, p. 4834-4840, 2009.

FAIRLAMB, I. J. S.; MARRISON, L.R.; DICKINSON, J.M.; FENG-JU LU; SCHMIDT, J. P. 2-Pyrones possessing antimicrobial and citotoxic activities. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 4285-4299, 2004.

FAIRLAMB, I. J. S.; McGLACKEN, G. P. 2-Pyrone natural products and mimetics: isolation, characterisation and biological activity. **Natural Products Review**, v. 22, p. 369-385, 2005.

FIALHO, M. B. Mecanismos de ação de compostos orgânicos voláteis antimicrobianos produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* sobre o desenvolvimento de *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros. **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, Tese. 2008.

FIEDLER, K; SCHÜTZ, E. GEH, S. Detection of microbial volatile organic compounds (MVOCs) produced by moulds on various materials. **International Journal Hygiene and Environmental Health**. v. 204, p. 111- 121, 2001.

GARAVAGLIA, J. Bioconversão de L-fenilalanina em 2-feniletanol por *Kluyveromyces marxianus* em mosto de uva. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre. 104p. Dissertação. 2006.

Harman, G.E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**. v. 84, n. 4, p. 376–393, 2000.

HUA, D.; XU, P. Recent advances in biotechnological production of 2-phenylethanol. **Biotechnology Advances**. v. 29, p.654–660, 2011.

HUNG, R.; LEE, S.; BENNETT, J. W. Arabidopsis thaliana as a model system for testing the effect of Trichoderma volatile organic compounds. **Fungal Ecology**. v. 6, p.19-26, 2013.

JANSSENS, L.; DE POOTER, H. L.; SCHAMP, N. M.; VANDAMME, E. J. Production of Flavours by Microorganisms. **Process Biochemistry**. v. 27, p.195-215, 1992.

KIMURA, Y.; MISUNO, T.; SHIMADA, A.; KAWANO, T. Penidienone, a plant growth regulators produced by the fungus *Penicillium sp.*. **Phytochemistry**, v.47, n. 13, p.323-325, 1998.

KIMURA, Y.; SHIMADA, A.; KUSANO, M.; YOSHII, K.; MORITA, A.; NISHIBE, M.; FUJIOKA, S.; KAWANO, T. Myxostiolide, myxostiol and clavatoic acid, plant growth regulators from the fungus *Myxotrichum stipitatum*. **Journal Natural Products**, v. 65, p. 621-623, 2002.

KLEIFELD, G. R.; CHET, I. *Trichoderma harzianum* – interaction with plants and effect on growth. **Plant and Soil**. v. 144, n. 2, p. 267-272, 1992.

LARSEN, T. O.; PERRY, N. B.; ANDERSEN, B. Infectopyrone, a potential mycotoxins from *Alternaria infectoria*. **Tetrahedron Letters**, v. 44, p. 4511-4513, 2003.

LIEBERMANN, B.; ELLINGER, R.; GÜNTHER, W.; IHN, W.; GALLANDER, H. Tricycloalternarenes produced by *Alternaria alternata* to ACTG-toxins. **Phytochemistry**, v. 46, p. 297-303, 1997.

LIEBERMANN, B.; NUSSBAUM, R. P.; GÜNTHER, W. Bicycloalternarenes produced by the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 987-992, 2000.

LOBO JUNIOR, M.; ABREU, M. S. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's. **Ciências Agrotec.**, Lavras. v. 24, n.2, p.521-526, 2000.

LORITO, M.; WOO, S. L.; HARMAN, G.E.; MONTE, E. Translational Research on *Trichoderma*: From 'Omics to the Field. **Annual Reviews Further**, p. 396-399, 2011.

MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, F. R.; SILVA, A. C. F.; ANTONIOLLI, Z.I. *Trichoderma* in Brazil: the fungus and the bioagent. **Revista de Ciências Agrárias**. v. 35, n. 26, p. 274-288, 2012.

MELO, I. S.; FAULL, J. L. Parasitismo *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. **Scientia Agricola**. v. 57, p. 55-59. 2000.

MENEZES, M. E. L.; NASCIMENTO, K. L.; ERLO, R.; BRITO, E. S.; MOTA, E. F.; GAVA, C. **Growth of *Trichoderma* sp. isolates on different nitrogen sources and concentrations.** 2008

MILLER, G. L.; Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. vol. 31, n. 3, 1959.

MONTE, E; LOBELL, A. *Trichoderma* in organic agriculture. **V Congreso Mundial del Aguacate**. p. 725-733. 2003.

MORATH, S. U.; HUNG, R.; BENNETT, J. W. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. **Fungal Biology Reviews**. v. 26, p. 73-83, 2012.

MPIKA, J.; KÉBÉ, I. B.; ISSALI, A. E.; N'GUESSAN, F. K.; DRUZHININA, S.; KOMON-ZÉLAZOWSKA, M.; KUBICEK, C.P.; AKÉ, S. Antagonist potential of *Trichoderma* indigenous isolates for biological control of *Phytophthora palmivora* the causative agent of black pod disease on cacao (*Theobroma*

cacao L.) in Côte d'Ivoire, African. **Journal of Biotechnology**. v. 8, n. 20, p. 5280-5290, 2009.

NAWROCKA, J.; MALOLEPSZA, U. Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. **Biological Control**, v. 67, p. 149–156, 2013.

NUSSBAUM, R. P.; GÜNTHER, W.; HEINZE, S.; LIEBERMANN, B. New tricycloalternarenes produced by the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 593-599, 1999.

PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**. V. 23, p. 23-54, 1985.

PARZIANELLO, F. R. Uso de polímeros em formulações para armazenamento de *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma virede*. **Universidade Federal de Santa Maria**. 61p. 2012. Dissertação .

PEREIRA, F. F. O. Produção, purificação e caracterização da atividade proteolítica produzida por *Trichoderma harzianum*. **Universidade Católica de Brasília**. 79p. 2011. Dissertação.

PILLMOOR, J. B. Carbocyclic coformycin: a case study of the opportunities and pitfalls in the industrial search for new agrochemicals from nature. **Pesticide Science**. v. 52, p. 75-80, 1998.

POLIZZI, V.; ADAMS, A.; PICCO, A. M.; ADRIAENS, E.; LENOIR, J.; PETEGHEM; C. V.; SAEGER, S. D.; KIMPE, N. D. Influence of environmental conditions on production of volatiles by *Trichoderma atroviride* in relation with the sick building syndrome. **Building and Environment**, 46, 945-954, 2011.

REINO, J. R.; GUERRERO, R. F.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R.; COLLADO, I. G. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. **Phytochemistry Review**. v. 7, p. 89-123, 2008.

RESENDE, M. L. *et al.* Inoculação de sementes de milho utilizando *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciências Agrotécnica**. v. 28, n. 4, p. 793-798., 2004.

SANTELMANN, P. W. **Herbicide bioassay**. In: Truelove, B (Ed). *Research methods in weed science*. 2ed. Auburn, Auburn Printing. p. 79-88, 1977.

SANTOS, H. A. *Trichoderma* spp. como promotores de crescimento em plantas e como antagonista a *Fusarium oxysporum*. **Universidade de Brasília**. 89 p. Dissertação. 2008.

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

SERRANO-CARREON, L.; HATHOUT, Y.; M. BENSOUSSAN, M.; BELIN, J. M. **Applied Environmental Microbiology**. v. 59, n. 9, p. 2945-2950, 1993.

SILVA, A. R. Biotransformação do ácido ricinoléico e do recinoleato de metila na presença das leveduras *Candida oleophila* e *Candida guilliermondii*. **Univeridade Federal de Santa Catarina**. 108 p. Dissertação.

STADNIK, M.J. E BETTIOL, W. Controle biológico de oídeos. *In*: Melo, I.S. Azevedo, J.L. (Ed.) - *Controle biológico*. Jaguariúna, **Embrapa Meio Ambiente**. v.3 p. 95–112, 2000.

STOPPACHER, N.; KLUGER, B.; ZEILINGER, S.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. **Journal of Microbiological Methods**, v. 81, p. 187-193, 2011.

SHORESH, M.; YEDIDIA, I.; CHET, I. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. **Phytopathology**. v. 95, p. 76-81, 2005.

SHORESH, M.; HARMAN, G.E.; MASTOURI, F. Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. **Annual Review Phytopathol**, v. 48, p. 21-43, 2010.

SIDDIQUEE, S.; CHEONG, B. E.; TASLIMA, K.; KAUSAR, H. MAINUL HASAN, M. Separation and Identification of Volatile Compounds from Liquid Cultures of *Trichoderma harzianum* by GC-MS using Three Different Capillary Columns. **Journal of Chromatographic Science**. v. 50, p. 358–367, 2012.

STOPPACHER, N.; KLUGER, B.; ZEILINGER, S.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. **Journal of Microbiological Methods**. v. 81, p. 187-193, 2010.

VINALE, F.; MARRA, R.; SCALA, F.; GHISALBERTI, E.; LORITO, M.; SIVASITHAMPARAM, K. Major secondary metabolites produced by two

commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, p. 143-148, 2006.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; E.L. GHISALBERTI, E.L.; R. MARRA, R.; BARBETTI, M.J.; LI, H.; WOO, S.L.; LORITO, M. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 72, p. 80–86, 2008.

VISCHETTI, C.; ESPOSITO, A. Degradation and transformation of a potential natural herbicide in three soils. *J. Agric. Food Chemistry.*, v. 47, p. 3901-3904, 1999.

VYVYAN, J. R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. **Tetrahedron**, v. 58, p. 1631-1646, 2002.

WIJESINGHE, C.J.; WIJERATNAM, R.S.; SAMARASEKARA, J.K.R.R.; WIJESUNDERA, R. L.C. Development of a formulation of *Trichoderma asperellum* to control black rot disease on pineapple caused by (*Thielaviopsis paradoxa*). **Crop Protection**, v. 30, p. 300-306, 2011.

YANG, Z.; YU, Z.; LEI, L.; XIA, Z., LI, S.; ZHANG, K.; LI, G. Nematicidal effect of volatiles produced by *Trichoderma* sp. **Journal of Asia-Pacific Entomology**. v.15, p.647–650, 2012.

APÊNDICE

A-1 Tabela dos constituintes do extrato de *Trichoderma asprerellum*

| Constituintes | TR | IA* | IA | % |
|--|-----------|------------|-----------|----------|
| 6. Ácido dehidroacético | 14,87 | 1388 | | 2,05 |
| 2. Sesquiterpeno desconhecido | 19,67 | 1791 | | 30,20 |
| 3. Ciclo prolina-isoleucina | 20,99 | 1961 | | 7,30 |
| 4. 3,6-Diisobutilpiperazina-2,5-diona | 22,74 | 2198 | | 18,16 |
| 5. 3-Benzilhexahidropirrolo[1,2-a]pirazina-1,4-diona | 25,06 | 2431 | | 7,00 |

| Não Identificados | TR | IA* | % |
|--------------------------|-----------|------------|----------|
| 1.NI | 11,93 | 1193 | 0,82 |
| 2. NI | 12,37 | 1221 | 1,70 |
| 3. NI | 12,59 | 1235 | 5,60 |
| 4. NI | 13,52 | 1295 | 1,14 |
| 7. NI | 14,14 | 1338 | 5,34 |
| 9. NI | 15,28 | 1417 | 2,50 |
| 10.NI | 16,16 | 1482 | 1,46 |
| 11. NI | 16,28 | 1491 | 5,20 |

| | | |
|-------------|------------------|-----------------|
| 1.NI | TR. 11,93 | IA*.1193 |
|-------------|------------------|-----------------|

EM, m/z (%) M⁺ 205 (1), 148 (2), 143 (22), 126 (2), 115 (13), 101 (3), 100 (16), 88 (44), 81 (2), 73 (6), 71 (60), 69 (22), 60 (3), 59 (12), 58 (20), 57 (8), 55 (12), 43 (100), 42 (4), 41 (81).

2.NI **TR. 12,37** **IA*.1221**

EM, m/z (%) M⁺ 157 (10), 142 (7), 129 (16), 114 (4), 102 (18), 100 (4), 87 (11), 86 (53), 85 (44), 74 (18), 57 (100), 56 (9), 54 (14), 50 (11), 49 (44), 46 (8), 44 (50), 43 (32), 42 (12), 41 (58), 39 (73).

3.NI **TR. 12,59** **IA*. 1235**

EM, m/z (%) M⁺ 184 (1), 157 (24), 142 (10), 116 (3), 115 (41), 114 (15), 102 (30), 100 (10), 86 (6), 85 (74), 72 (21), 71 (7), 69 (5), 60 (33), 59 (5), 58 (28), 57 (100), 56 (12), 55 (5), 44 (8), 43 (38), 42 (16), 41 (77), 39 (4), 157 (24), 142 (10), 115 (15), 102 (30), 100 (10), 88 (3), 86 (6), 85 (74), 72 (21), 71 (7), 60 (32), 57 (100), 56 (12), 55 (5), 43 (38), 43 (17), 41 (77).

4.NI **TR. 13,52** **IA*. 1295**

EM, m/z (%) M⁺ 157 (6), 128 (3), 128 (5), 114 (2), 101 (8), 100 (22), 87 (41), 85 (17), 85 (5), 83 (21), 73 (19), 72 (4), 71 (55), 60 (3), 58 (18), 57 (12), 55 (20), 50 (9), 49 (31), 44 (58), 43 (100), 41 (63), 39 (88).

7.NI **TR. 14,14** **IA*. 1338**

EM, m/z (%) M⁺ 171 (14), 156 (10), 142 (9), 129 (31), 115 (10), 114 (33), 102 (54), 100 (10), 86 (18), 85 (97), 83 (10), 73 (42), 72 (26), 71 (18), 70 (11), 69 (6), 60 (21), 58 (37), 57 (100), 55 (21), 53 (5), 49 (9), 44 (45), 43 (7042 (22), 41 (93), 40 (45).

| | | |
|-------------|------------------|------------------|
| 9.NI | TR. 15,28 | IA*. 1417 |
|-------------|------------------|------------------|

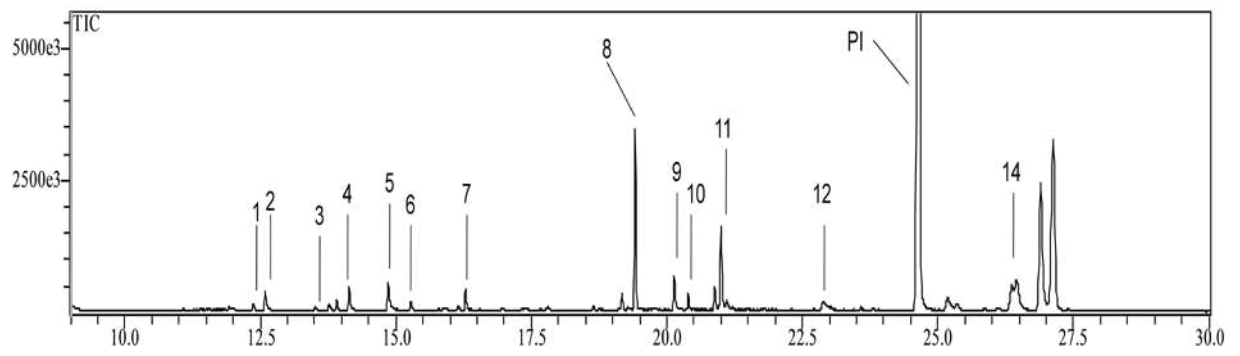
EM, m/z (%) M⁺ 169 (9), 154 (4), 140 (4), 113 (5), 112 (7), 99 (16), 83 (100), 57 (5), 55 (46), 54 (5), 53 (9), 43 (4), 41 (13).

| | | |
|--------------|------------------|------------------|
| 10.NI | TR. 16,28 | IA*. 1482 |
|--------------|------------------|------------------|

EM, m/z (%) M⁺ 166 (12), 157 (5), 151 (64), 138 (14) 123 (13), 109 (4), 107 (67), 95 (19), 94 (9), 93 (52), 91 (38), 84 (7), 82 (9), 81 (12), 80 (5), 79 (42), 78 (11), 77 (35), 69 (13), 67 (17), 65 (6), 57 (4), 56 (3), 54 (30), 53 (17), 51 (24), 49 (10), 44 (54), 43 (23), 41 (38), 40 (100).

| | | |
|--------------|------------------|------------------|
| 11.NI | TR. 16,16 | IA*. 1491 |
|--------------|------------------|------------------|

EM, m/z (%) M⁺ 185 (7), 156 (11), 142 (7), 130 (6), 129 (41), 128 (10), 116 (38), 114 (10), 107 (12), 101 (3), 100 (13), 99 (43), 86 (14), 84 (5), 80 (3), 77 (6), 73 (28), 72 (21), 71 (49), 70 (14), 68 (7), 60 (21), 58 (27), 57 (11), 56 (8), 55 (26), 53 (4), 51 (4), 49 (5), 44 (31), 43 (100), 42 (21), 41 (59), 40 (33).



Cromatograma obtido por cromatografia gasosa (CG) do extrato do fungo *T. asperellum* obtido a partir do meio de cultura mínimo.

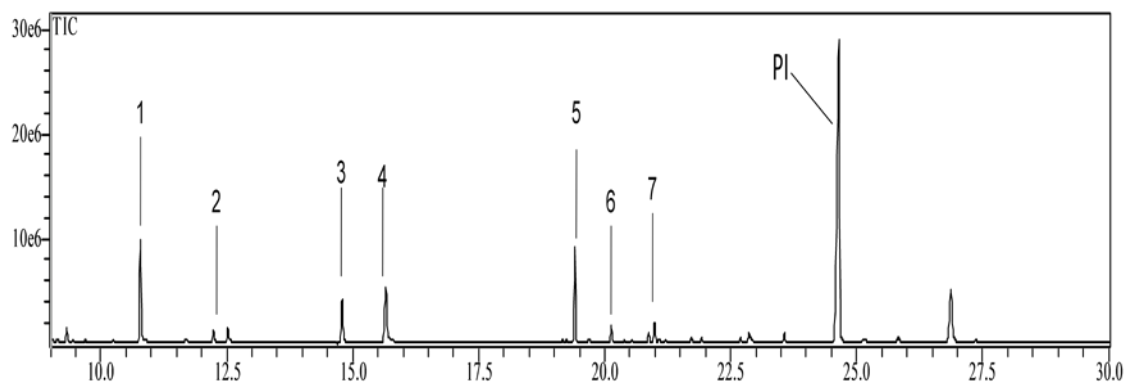
A-2 Tabela dos constituintes do extrato de *Trichoderma harzianum*

| Constituintes | TR | IA* | IA | % |
|-------------------------------|-----------|------------|-----------|----------|
| 1.2-feniletanol | 10,65 | 1115 | | 30,65 |
| 3. Ácido dehidroacético | 14,74 | 1379 | | 13,67 |
| 4. Tirosol | 15,53 | 1436 | | 23,56 |
| 5. Sesquiterpeno desconhecido | 19,32 | 1753 | | 22 |
| 6. Ciclo prolina-isoleucina | 20,92 | 1955 | | 5,77 |

| Não Identificados | TR | IA* | % |
|--------------------------|-----------|------------|----------|
| 2.NI | 12,17 | 1208 | 4,35 |

| | | |
|-------------|------------------|-------------|
| 2.NI | TR. 12,17 | IA*. |
|-------------|------------------|-------------|

EM, m/z (%) M⁺ 115 (4), 87 (5), 86 (92), 85 (100), 83 (3), 69 (3), 58 (37), 57 (36), 53 (2), 45 (74), 43 (36), 42 (23), 41 (14) 40 (4).



Cromatograma obtido por cromatografia gasosa (CG) do extrato do fungo *T. harzianum* obtido a partir do meio de cultura mínimo.

A-3 Tabela dos constituintes do extrato de *Trichoderma pseudokoningii*

| Constituintes | TR | IA* | IA | % |
|-------------------------------|-------|------|----|-------|
| 1. 2-feniletanol | 10,85 | 1127 | | 5,79 |
| 2. Ácido dehidroacético | 14,83 | 1385 | | 52,35 |
| 5. Sesquiterpeno desconhecido | 19,45 | 1767 | | 19,59 |

| Não Identificados | TR | IA* | % |
|-------------------|-------|------|------|
| 3.NI | 18,83 | 1700 | 8,74 |
| 4. NI | 19,09 | 1728 | 6,15 |
| 6. NI | 19,77 | 1802 | 7,38 |

| | | |
|-------------|------------------|------------------|
| 3.NI | TR. 18,83 | IA*. 1700 |
|-------------|------------------|------------------|

EM, m/z (%) M⁺ 223 (3), 222 (30), 204 (10), 189 (2), 179 (12), 166 (17), 165 (10), 162 (7), 161 (33), 152 (19), 151 (100), 139 (13), 138 (89), 137 (19), 134 (4), 129 (2), 128 (2), 124 (4), 123 (12), 120 (13), 119 (83), 11 (21), 109 (27), 107 (13), 106 (6), 105 (59), 103 (3), 95 (38), 94 (11), 93 (19), 92 (9), 84 (79), 83 (17), 81 (30), 80 (5), 78 (5), 77 (16), 71 (9), 69 (40), 67 (23), 65 (9), 57 (19), 56 (13), 55 (43), 53 (8), 51 (3), 45 (5), 43 (52), 42 (14), 41 (75).

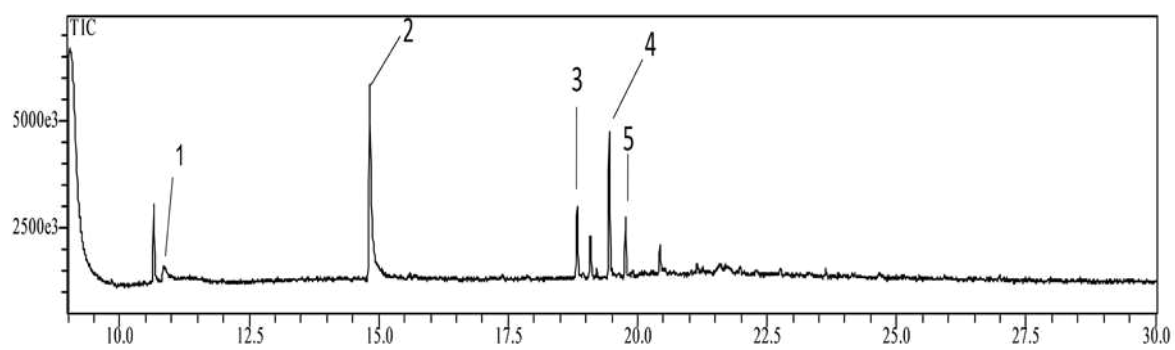
| | | |
|-------------|------------------|------------------|
| 4.NI | TR. 19,09 | IA*. 1728 |
|-------------|------------------|------------------|

EM, m/z (%) M⁺ 223 (3), 221 (6), 220 (33), 207 (3), 205 (5), 187 (2), 178 (6), 179 (39), 168 (2), 165 (5), 164 (24), 163 (19), 161 (9), 159 (4), 156 (5), 152

(9), 151 (8), 150 (67), 149 (51), 148 (7), 147 (4), 145 (7), 143 (41), 136 (52), 135 (100), 133 (7), 131 (5), 127 (6), 125 (12), 124 (6), 123 (25), 121 (52), 117 (9), 115 (7), 110 (9), 109 (73), 108 (44), 107 (30), 106 (6), 96 (6), 95 (12), 93 (36), 91 (28), 85 (23), 83 (13), 82 (72), 81 (28), 79 (30), 77 (30), 75 (4), 73 (6), 71 (6), 69 (24), 67 (23), 65 (12), 59 (12), 57 (12), 55 (36), 54 (21), 53 (28), 47 (6), 43 (79), 41 (73), 40 (22), 39 (32),

| | | |
|-------------|------------------|------------------|
| 6.NI | TR. 19,77 | IA*. 1802 |
|-------------|------------------|------------------|

EM, m/z (%) M⁺ 484 (1), 177 (21), 167 (17), 166 (8), 163 (6), 159 (19), 153 (8), 151 (19), 150 (8), 149 (30), 147 (5), 138 (8), 137 (12), 136 (13), 135 (29), 133 (5), 127 (3), 125 (33), 123 (22), 122 (8), 121 (39), 119 (4), 117 (2), 111 (10), 109 (25), 105 (11), 101 (4), 97 (16), 95 (33), 94 (9), 93 (25), 92 (5), 91 (12), 87 (11), 85 (13), 83 (11), 81 (29), 79 (22), 77 (11), 72 (8), 71 (18), 70 (8), 69 (22), 67 (19), 65 (5), 57 (35), 55 (42), 53 (17), 44 (9), 43 (100), 41 (68), 39 (17).



Cromatograma obtido por cromatografia gasosa (CG) do extrato do fungo *T. pseudokoningii* obtido a partir do meio de cultura mínimo.

A-4: Tabela dos constituintes do extrato de *Trichoderma virede*

| Constituintes | TR | IA* | IA | % |
|----------------------------------|-------|------|----|-------|
| 2. Ácido dehidroacético | 14,84 | 1386 | | 11,94 |
| 3. 6-pentilpiron-2-ona | 19,17 | 1736 | | 11 |
| 4. 4-Hidroxi-6-pentilpiran-2-ona | 20,63 | 1907 | | 4,24 |
| Não Identificados | TR | IA* | | % |
| 1. NI | 12,72 | 1243 | | 7,11 |
| 5. NI | 20,92 | 1927 | | 8,09 |
| 6. NI | 21,08 | 1939 | | 57,65 |

| | | |
|-------------|------------------|------------------|
| 1.NI | TR. 12,72 | IA*. 1243 |
|-------------|------------------|------------------|

EM, m/z (%) M⁺ 170 (11), 152 (4), 142 (21), 127 (32), 100 (4), 85 (10), 84 (10), 83 (7), 69 (11), 67 (8), 59 (6), 56 (24), 55 (18), 53 (11), 44 (4), 43 (100), 41 (8), 39 (5).

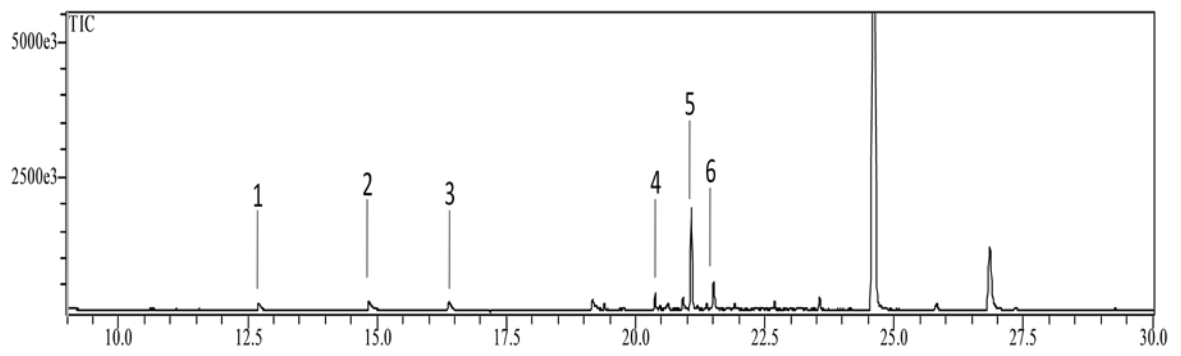
| | | |
|-------------|------------------|------------------|
| 5.NI | TR. 20,92 | IA*. 1927 |
|-------------|------------------|------------------|

EM, m/z (%) M⁺ 310 (9) 281 (4), 267 (4), 253 (7), 252 (26), 237 (16), 235 (9), 225 (4), 224 (10), 223 (38), 210 (6), 209 (25), 207 (16), 205 (5), 197 (4), 196 (10), 184 (12), 183 (100), 169 (12), 157 (6), 149 (11), 139 (4), 137 (5), 129 (4), 125 (7), 121 (9), 115 (4), 113 (4), 111 (11), 109 (10), 107 (4), 99 (7), 97 (14), 96 (5), 95 (15), 91 (16), 86 (5), 85 (16), 83 (22), 80 (14), 79 (22), 77 (26), 74

(72), 73 (14), 71 (27), 69 (33), 67 (22), 65 (13), 59 (19), 57 (36), 56 (11), 55 (64), 53 (16), 51 (9), 45 (12), 44 (53), 43 (98), 41 (75), 39 (94).

| | | |
|-------------|------------------|------------------|
| 6.NI | TR. 21,08 | IA*. 1939 |
|-------------|------------------|------------------|

EM, m/z (%) M⁺ 281 (1), 250 (12), 223 (6), 222 (18), 207 (7), 180 (5), 179 (34), 165 (7), 163 (10), 161 (10), 151 (9), 150 (7), 149 (56), 137 (9), 136 (10), 135 (60), 133 (6), 123 (19), 122 (6), 121 (37), 120 (7), 119 (5), 108 (6), 107 (12), 105 (8), 98 (8), 97 (7), 96 (7), 95 (12), 93 (11), 91 (13), 83 (27), 81 (11), 79 (17), 77 (18), 71 (5), 69 (13), 67 (18), 65 (10), 55 (57), 53 (19), 51 (7), 44 (22), 43 (100), 42 (9), 41 (45), 40 (20).



Cromatograma obtido por cromatografia gasosa (CG) do extrato do fungo *T. viride* obtido a partir do meio de cultura mínimo.

A-5: Tabela dos constituintes do extrato de *Trichoderma virens*

| Constituintes | TR | IA* | IA | % |
|----------------------|-----------|------------|-----------|----------|
| 3. α -cadinol | 18,63 | 1682 | 1652 | 7,14 |
| 5. Tricosano | 21,94 | 2095 | | 4,59 |
| 7. Triancontano | 22,71 | 2194 | | 7,67 |

| Não Identificados | TR | IA* | % |
|--------------------------|-----------|------------|----------|
| 1. NI | 17,97 | 1624 | 6,54 |
| 2. NI | 18,48 | 1669 | 5,19 |
| 4. NI | 19,50 | 1773 | 2,48 |
| 6. NI | 22,42 | 2157 | 15,80 |
| 8. NI | 23,51 | 2286 | 33,61 |
| 9. NI | 25,80 | 2489 | 47,07 |

| | | |
|-------------|------------------|-------------|
| 1.NI | TR. 17,97 | IA*. |
|-------------|------------------|-------------|

EM, m/z (%) M⁺ 222 (2), 204 (24), 175 (8), 164 (7), 162 (13), 161 (55), 148 (15), 147 (15), 136 (7), 135 (12), 133 (16), 125 (5), 123 (8), 122 (16), 121 (24), 119 (22), 117 (6), 115 (6), 109 (36), 107 (11), 105 (39), 97 (9), 96 (15), 95 (20), 93 (43), 91 (46), 83 (14), 82 (15), 79 (41), 77 (28), 71 (20), 69 (51), 66 (43), 65 (17), 57 (11), 55 (33), 53 (18), 43 (100), 41 (83).

| | | |
|-------------|------------------|-------------|
| 2.NI | TR. 18,48 | IA*. |
|-------------|------------------|-------------|

EM, m/z (%) M⁺ 222 (2), 204 (5), 204 (29), 164 (15), 161 (68), 149 (6), 121 (23), 119 (22), 109 (10), 105 (30), 95 (57), 93 (24), 93 (25), 92 (11), 90 (41), 84 (10), 80 (34), 79 (35), 77 (24), 71 (20), 67 (18), 64 (9), 58 (17), 54 (36), 53 (13), 49 (13), 43 (100), 41 (57), 39 (89).

| | | |
|-------------|------------------|-------------|
| 4.NI | TR. 19,50 | IA*. |
|-------------|------------------|-------------|

EM, m/z (%) M⁺ 238 (5), 177 (10), 175 (5), 153 (62), 149 (9), 147 (20), 135 (55), 121 (7), 119 (7), 111 (9), 105 (11), 95 (8), 93 (8), 91 (22), 78 (11), 71 (20), 69 (11), 67 (15), 65 (8), 57 (8), 55 (8), 53 (8), 44 (11), 43 (100), 41 (40), 39 (13).

| | | |
|-------------|------------------|-------------|
| 6.NI | TR. 22,42 | IA*. |
|-------------|------------------|-------------|

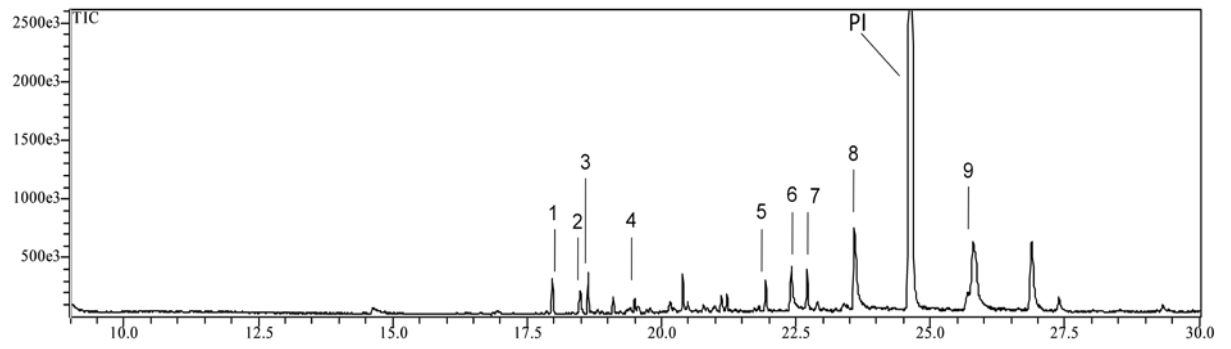
EM, m/z (%) M⁺ 432 (1), 232 (10), 206 (26), 204 (4), 190 (6), 189 (42), 165 (8), 161 (16), 151 (6), 149 (11), 147 (13), 145 (10), 143 (18), 137 (7), 136 (45), 135 (11), 133 (15), 131 (16), 128 (8), 127 (10), 121 (26), 118 (7), 117 (17), 115 (14), 109 (13), 106 (17), 105 (27), 97 (23), 95 (19), 94 (8), 93 (39), 92 (12), 91 (62), 84 (12), 84 (32), 83 (14), 81 (28), 79 (42), 77 (41), 73 (9), 71 (16), 70 (8), 69 (39), 67 (23), 65 (16), 57 (27), 55 (50), 52 (22), 51 (11), 45 (8), 44 (37), 43 (79), 41 (100), 40 (66).

| | | |
|-------------|------------------|-------------|
| 8.NI | TR. 23,51 | IA*. |
|-------------|------------------|-------------|

EM, m/z (%) M⁺ 327 (1), 227 (16), 225 (100), 213 (4), 206 (7), 198 (9), 170 (6), 169 (13), 157 (8), 155 (5), 144 (24), 143 (67), 130 (6), 128 (26), 116 (7), 115 (53), 114 (17), 113 (5), 99 (7), 97 (6), 89 (12), 88 (20), 85 (25), 82 (8), 71 (34), 69 (12), 63 (9), 62 (10), 57 (47), 56 (9), 55 (44), 54 (20), 44 (16), 43 (53), 42 (9), 41 (30), 39 (29).

| | | |
|-------------|------------------|-------------|
| 9.NI | TR. 25,80 | IA*. |
|-------------|------------------|-------------|

EM, m/z (%) M⁺ 405 (1), 243 (17), 241 (100), 229 (13), 213 (7), 212 (13), 185 (11), 160 (12), 159 (66), 144 (24), 130 (20), 117 (6), 116 (6), 103 (22), 102 (6), 89 (10), 77 (7), 76 (36), 74 (11), 63 (6), 56 (20), 54 (13), 50 (7), 49 (11), 42 (14).



Cromatograma obtido por cromatografia gasosa (CG) do extrato do fungo *T. virens* obtido a partir do meio de cultura mínimo.