



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
SUBSTÂNCIAS DO METABOLISMO DE
FUNGOS TÓXICAS A *Meloidogyne incognita*.

GERALDO HUMBERTO SILVA

2001

GERALDO HUMBERTO SILVA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
SUBSTÂNCIAS DO METABOLISMO DE FUNGOS
TÓXICAS A *Meloidogyne incognita*.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Agroquímica/Agrobioquímica, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador
Prof. Dr. Denilson Ferreira de Oliveira

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2001

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Silva, Geraldo Humberto

Purificação e caracterização de substâncias do metabolismo de fungos tóxicas a
Meloidogyne incognita / Geraldo Humberto Silva. -- Lavras : UFLA, 2001.
72 p. : il.

Orientador: Denilson Ferreira de Oliveira
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Fungo. 2. Nematóide. 3. *Meloidogyne incognita*. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD-632.6257

GERALDO HUMBERTO SILVA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
SUBSTÂNCIAS DO METABOLISMO DE FUNGOS
TÓXICAS A *Meloidogyne incognita*.

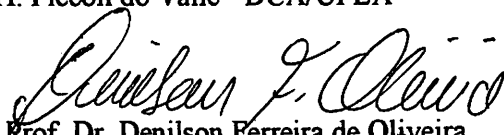
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Agroquímica/Agrobioquímica, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 23 de fevereiro de 2001.

Prof. Dr. Vicente Paulo Campos - DFP/UFLA

Prof. Dr. Itamar Ferreira de Souza - DAG/UFLA

Profa. Dra. Roberta H. Piccoli do Valle - DCA/UFLA



Prof. Dr. Denilson Ferreira de Oliveira
Orientador
DQI/UFLA

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2001

A Deus.

A minha esposa, Quênia;
minha filha, Gabriela; meu
enteado, Douglas; meus pais,
Salvador e Maria; meus
irmãos, Paulo, Maria, Marisa,
Rodrigo e Cristiano; a minha
sogra, Elza e todos os meus
sobrinhos

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Química DQI e à Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade de realização do curso;

Ao CNPq e CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Ao orientador Professor Dr. Denilson Ferreira de Oliveira, pela orientação, conhecimentos transmitidos e amizade.

Ao professor Dr. Vicente Paulo Campos, pela orientação e conhecimentos transmitidos.

Ao Departamento de Fitopatia, onde foram realizados os testes biológicos.

Aos professores do Departamento de Química, que disponibilizaram laboratórios e equipamentos para realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa e Universidade Federal de Minas Gerais, pela realização dos espectros de RMN.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Química, cuja convivência ajudou na minha formação profissional e pessoal.

Ao colegas do Laboratório de Nematologia, Tarley, Cléber, João, Fernando, Anderson, Rose, Marcos e Fábio;

Aos colegas Mauro, Daniel, Valdinei, Márcio, pela amizade e contribuição a este trabalho.

A Annamaria Alvarenga, amiga de todas as horas

Aos demais amigos.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Relações entre nematóides e fungos	3
2.2 Substâncias nematicidas isoladas de fungos	4
2.3 Efeito de filtrados fúngicos sobre nematóides	11
2.4 Métodos para obtenção de filtrados fúngicos	13
2.5 Testes <i>in vitro</i> dos filtrados	14
2.6 Separação de substâncias a partir de processos fermentativos	15
2.6.1 Métodos usados na purificação de substâncias com atividade nematicida	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Microrganismos utilizados nesse trabalho	20
3.2 Obtenção de inóculo, condições de cultivo e obtenção dos filtrados	20
3.3 Fracionamento dos filtrados fúngicos	21
3.3.1 Fracionamento dos filtrados obtidos de culturas <i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Fusarium sp.</i> , <i>Paecilomyces lilacinus</i> , e <i>P. variotii</i>	21
3.3.1.1 Purificação do extrato de acetato de etila obtido do filtrado de <i>Fusarium sp.</i>	23
3.3.2 Fracionamento biodirecionado de <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> isolados 2 e 25 e <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	26

3.3.2.1 Purificação da fração solúvel em metanol obtida do precipitado P1 de <i>Fusarium moniliforme</i> isolado 25	28
3.4 Testes <i>in vitro</i> dos extratos e frações	29
3.4.1 Obtenção de ovos de <i>Meloidogyne incognita</i>	29
3.4.2 Teste de mobilidade de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i> em placa de Petri	30
3.4.3 Teste de mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i> em placa de Petri	30
3.4.4 Teste de mobilidade de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i> em placa Elisa	31
3.4.5 Teste de mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i> em placa Elisa	31
3.5 Análise físico-químicas das substâncias ativas	32
3.5.1 Análise da substância ativa de <i>Cunninghamella elegans</i> : Precipitado A2.	32
3.5.2 Análise das substâncias ativas de <i>Fusarium moniliforme</i> isolado 25	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Fracionamento biodirecionado dos filtrados de <i>Fusarium sp</i> , <i>Cunninghamella elegans</i> <i>Paecilomyces lilacinus</i> e <i>P. variotii</i>	33
4.1.1 Análises da substância ativa de <i>Cunninghamella elegans</i>	37
4.2 Fracionamento biodirecionado dos filtrados <i>Fusarium moniliforme</i> isolados 2 e 25, de <i>F. oxysporum</i> e <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	38
4.2.1 Análise das substâncias ativas obtidas de <i>Fusarium moniliforme</i> isolado 25	41
5 CONCLUSÕES	46
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

ANEXOS.	55
ANEXO A	56
ANEXO B	64
ANEXO C	65

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	percentagem
≤	menor ou igual
μL	microlitro
AcOEt	acetato de etila
CH₂Cl₂	diclorometano
cm	centímetro
DIC	delineamento inteiramente casualizado
DL₅₀	dose letal cinquenta
DL₉₀	dose letal noventa
DMSO	dimetilsufóxido
DQI	Departamento de Química
ed.	editor
et al.	e outros
etc.	et cetera (e assim por diante)
F	teste de F (análise de variância)
g	grama
G.L.	Grau de Liberdade
h	hora
H₂O	água
Hex.	hexano
IV	infravermelho
J2	juvenis do segundo estágio
KBr	brometo de potássio
L	litro
m/z	massa sobre carga

MeOH	metanol
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
NH₄OH	hidróxido de amônio
n°	número
nov.	novembro
°C	graus centígrados
p.	página
pH	potencial hidrogênio iônico
ppm	parte por milhão
Prob.>F	probabilidade maior que F
RMN	ressonância magnética nuclear
s	segundo
sp.	espécie
spp.	espécies
v.	volume

RESUMO

SILVA, Geraldo Humberto. **Purificação e caracterização de substâncias do metabolismo de fungos tóxicas a *Meloidogyne incognita***. Lavras: UFLA, 2001. 72p. (Dissertação - Mestrado em Agroquímica/ Agrobioquímica).

Objetivando o desenvolvimento de novas metodologias de controle de fitonematóides, este trabalho buscou identificar as substâncias nematocidas produzidas por *Cunninghamella elegans*, *Fusarium moniliforme* isolados 2 e 25, *F. oxysporum*, *Fusarium* sp, *Paecilomyces lilacinus*, *P. variotii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Para tanto, esses fungos foram cultivados em meio líquido Czapek-Dox durante 15 dias, a 25°C, em agitador orbital. Em seguida, as misturas foram filtradas, o que permitiu a obtenção de soluções que foram concentradas sob vácuo e submetidas à purificação direcionada por testes *in vitro* com juvenis de *Meloidogyne incognita*. Com isso, foi possível isolar três substâncias com atividades tóxicas a esse fitonematóide, sendo uma de *C. elegans* e duas de *Fusarium moniliforme* isolado 25. Por meio da análise dos espectros de massas, de infravermelho e de ressonância magnética nuclear, atribuiu-se a estrutura de um ciclopeptídeo formado por nove unidades de N-metilglicina a uma das substâncias isoladas a partir do filtrado de *Fusarium moniliforme* isolado 25.

Comitê orientador: Denilson Ferreira de Oliveira - UFLA (Orientador) e
Vicente Paulo Campos - UFLA (co-orientador).

ABSTRACT

SILVA, Geraldo Humberto. **Purification and identification of fungi metabolites toxic to *Meloidogyne incognita***. Lavras: UFLA, 2001. 72p. (Master in Science Dissertation in Agrochemistry/Agrobiochemistry).

Searching for new molecules toxic to plant parasitic nematode, procedures were set up to purify and identify nematode toxic molecules produced by *Cunninghamella elegans*, *Fusarium moniliforme* strain 2 and 25, *F. oxysporum*, *Fusarium* sp, *Paecilomyces lilacinus*, *P. variotii* and *Sclerotinia sclerotiorum*. Thus, those fungi were grown in Czapek-Dox liquid medium during 15 days, at 25° C, in an orbital shaker. After fungi mycelia removal by filtration, the solutions were concentrated under vacuum and submitted to purification guided by *in vitro* assays with *Meloidogyne incognita* juveniles. As a result, one substance toxic to that phytonematode was isolated from *C. elegans*, and two from *F. moniliforme* strain 25. Through mass, infrared, and nuclear magnetic resonance spectra interpretation, a nine N-methylglycine units cyclopeptide structure was attributed to one of the substances isolated from the *F. moniliforme* strain 25 filtrate.

Guide Committee: Denilson Ferreira de Oliveira - UFLA (supervisor) and Vicente Paulo Campos - UFLA.

1 INTRODUÇÃO

Nematóides são organismos filiformes que utilizam fontes variadas de nutrientes. Aqueles que se alimentam de plantas são conhecidos como fitonematóides, os quais causam extensos danos levando a grandes quedas na produção (Lordello, 1976; Lambert e Taylor, 1979; Campos, 1992)

Dentre as medidas de controle, pode-se usar substâncias tóxicas aos fitonematóides, chamadas de nematicidas, que normalmente são resultantes da indústria petroquímica (Campos, Sivaplan e Gnanapragasom, 1990; Campos, 1997). Esses nematicidas contaminam águas subterrâneas, intoxicam o aplicador e deixam resíduos nos alimentos, o que torna altamente atraente a possibilidade de uso futuro de substâncias biológicas menos tóxicas ao homem e de menor impacto sobre o ambiente. Para tanto, uma das alternativas consiste no emprego de fungos produtores de metabólitos tóxicos aos fitonematóides (Mankau, 1979). Tais substâncias podem afetar a mobilidade (Costa, 2000), capacidade de penetração na planta, atração do juvenil pelo hospedeiro e eclosão do juvenil do ovo (KERRY, Simonn e Rovira, 1984), podendo atuar como nematostáticas e nematicidas (Saifullah, 1996; Hallman e Sikora, 1996).

Sabendo do grande potencial dos fungos para o desenvolvimento de novas metodologias de controle de fitonematóides, Costa (2000) cultivou 21 isolados fúngicos em meio líquido, submetendo seus filtrados correspondentes a testes *in vitro* e *in vivo* contra *Meloidogyne incognita*. Dentre os filtrados fúngicos tóxicos a *M. incognita*, destacaram-se os de *Cunninghamella elegans*, *Fusarium moliforme* isolados 2 e 25, *F. oxysporum*, *Fusarium sp*, *Paecilomyces lilacinus*, *P. variotii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Para que tal trabalho tenha continuidade, faz-se necessário que as substâncias responsáveis pela atividade tóxica contra o referido fitonematóide sejam identificadas e caracterizadas.

Desta forma, objetivou-se, neste trabalho, fracionar biodirecionalmente os filtrados fúngicos citados até o isolamento das substâncias ativas contra *Meloidogyne incognita*, para elucidar suas estruturas por meio de métodos físico-químicos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Relações entre nematóides e fungos

Grande número de metabólitos fúngicos bioativos, de estruturas diversas, tem sido isolado e caracterizado nos últimos anos. Alguns desses foram de fundamental importância para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos e defensivos agrícolas. Classicamente, são obtidos por vários processos fermentativos e ultimamente de extratos de frutificações de fungos (Stadler e Sterner, 1998).

Como fungos e nematóides vivem no mesmo habitat (solos, madeira em decomposição, plantas, etc.), pressupõe-se uma coevolução ao longo do tempo, o que provavelmente induziu interações entre os dois grupos como a predação de nematóides por fungos e alimentação de nematóides com fungos. Nessas interações, acredita-se que metabólitos de origem fúngica podem ser de grande importância, uma vez que existe a possibilidade de que sejam empregados tanto no ataque quanto na defesa contra fitonematóides (Stadler, Anke e Sterner, 1993).

No caso dos fungos nematófagos, que vêm recebendo grande atenção por formarem um importante grupo de inimigos naturais dos nematóides (Barron, 1977 e 1992), observou-se que vários deles produzem toxinas que podem estar envolvidas na imobilização e morte dos nematóides (Barron e Thom, 1987). De forma análoga, também já se tem conhecimento de fungos que, para não serem ingeridos por nematóides, protegem suas hifas com substâncias tóxicas a tais animais (Hutchison, Madzia e Barron, 1996; Riffle, 1967 e 1971). Há ainda, fungos que aparentemente não interagem diretamente com nematóides fitoparasitas, mas que são capazes de produzir substâncias com propriedades nematicidas (Chen, Dickson e Mitchell, 2000).

2.2 Substâncias nematocidas isoladas de fungos

Várias substâncias nematocidas têm sido isoladas de fungos, principalmente dos filos ascomicota e basidiomicota (Stadler, Anke e Sterner, 1994). Como exemplo, pode-se citar a aspyrone (Figura 1), isolada do filtrado fúngico de *Aspergillus mellus*. Em experimentos *in vitro* com o nematóide *Pratylenchus penetrans* observou-se que tal substância promovia mortalidade de 39% e 80,8% nas concentrações de 100 ppm e 300 ppm, respectivamente (Kimura, Nakahara e Fujikoka, 1996).

Trabalhando com o fungo *Cladobotryum rubrobrunnescens*, cultivado no meio YMG, Wagner, Anke e Sterner (1998) isolaram a substância cladobotrin (Figura 1), que apresentou ação nematocida contra *Meloidogyne incognita* com DL₅₀ igual a 100 ppm.

Do fungo *Pleurotus ostreatus*, Kwok et al. (1991) isolaram o ácido *trans*-2-decenodióico (Figura 1), que também apresentou atividade nematocida, sendo desta vez ativo contra *Panagrellus redivivus* quando na concentração de 300 ppm.

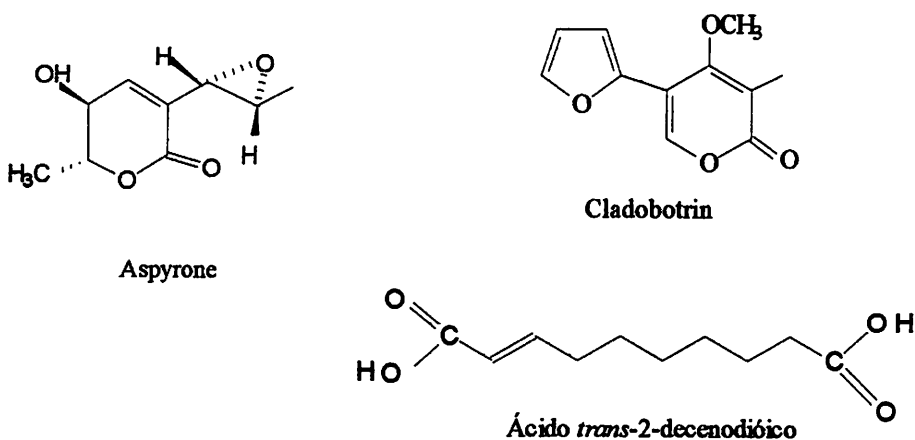


FIGURA 1: Estruturas das substâncias aspyrone, cladobotrin e ácido *trans*-2-decenodióico.

As substâncias bursaphelocida A e B (Figura 2), análogas das destruxinas, foram isoladas de filtrados do fungo imperfeito isolado D1084 da ordem Mycelia sterilia, por apresentarem atividade nematocida (Kawazu et al., 1993).

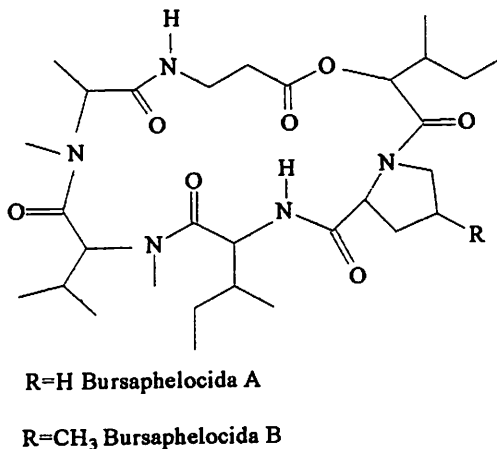
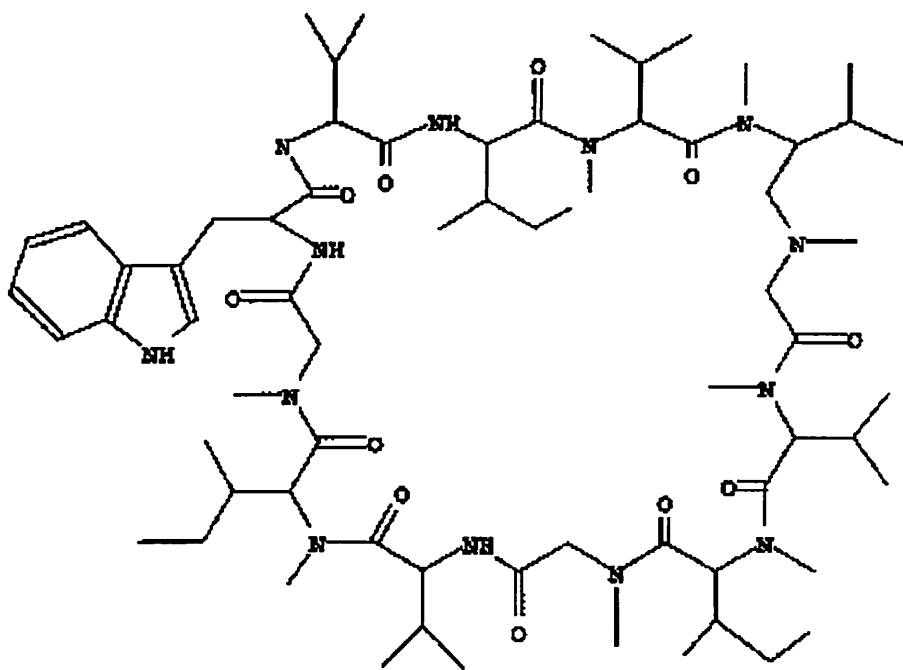


FIGURA 2 Estruturas das substâncias bursaphelocida A e B.

Mayer et al. (1999) observaram que a substância omphalotin A (Figura 3), um ciclododepsipeptídeo isolado de cultura submersa do basidiomiceto *Omphalotin olearius*, proporciona 50% de mortalidade de *Meloidogyne incognita in vitro* em 1 hora, na concentração de 2 ppm. Este fato levou ao patenteamento de tal substância (Anke et al., 1997 e 1999).



Omphalotin A

FIGURA 3 Estrutura da substância omphalotin A

Dos filtrados fúngicos de *Arthobotrys conoides* e *A. oligospora*, Anke et al. (1995) isolaram e identificaram como principal substância nematocida o ácido linoléico (Figura 4), que teve ação contra *Caenorhabditis elegans* e *Meloidogyne incognita*.

Do fungo *Daldinia concentrica* foram identificados os compostos 1-metoxi-8-hidroxi-naftaleno e 1,8-dimetoxinaftaleno (Figura 4), os quais já tinham sido relatados por Desembrock (1994). Ambos apresentaram atividade contra *Caenorhabditis elegans* (Anke et al., 1995).

Mayer et al. (1996), trabalhando com um fungo do filo dos ascomicetos denominado A4990, isolaram e identificaram a substância nematocida 5-pentil-2-

furaldeído (Figura 4), a qual já tinha sido encontrada no basidiomiceto *Irpex lactus*. Ela apresentou moderada atividade contra *Meloidogyne incognita*, *Caenorhabditis elegans* e *Aphlencoides besseyi*, sendo a DL_{90} igual a 100 ppm e 200 ppm para *M. incognita* e *A. besseyi*, respectivamente.

Uma das substâncias ativas de *Paecilomyces lilacinus* foi relatada por Djian et al. (1991) como sendo o ácido acético (Figura 4).

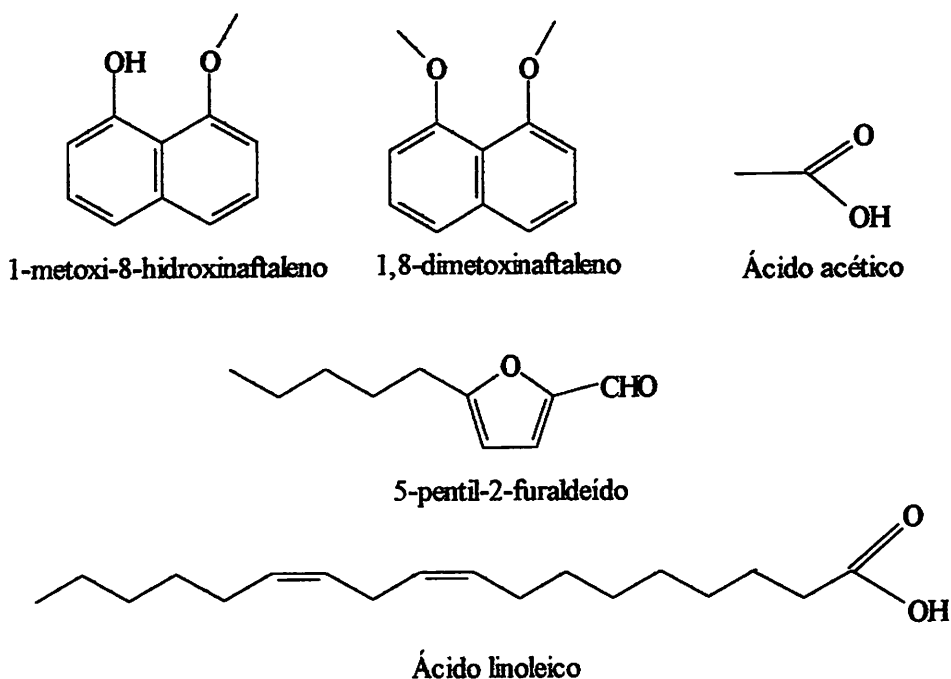
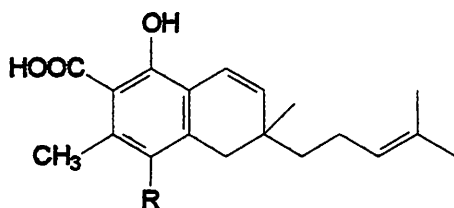


FIGURA 4: Estruturas das substâncias ácido acético, ácido linoléico, 5-pentil-2-furaldeído, 1-metoxi-8-hidroxinaftaleno e 1,8-dimetoxinaftaleno, tóxicas a nematóides.

Quaghebeur et al. (1994) isolaram duas substâncias com atividade nematicida do filtrado de *Cylindrocarpum olidum*: o ácido cannabiorcicromenic (CCBC) e o ácido 8-chlorocannabiorcicromenic (8-

CCBC), sendo que a mistura CCBC/8-CCBC (4:1) provocou mortalidade de 50% do nematóide *Heterorhadtis* sp. na concentração de 20 ppm.

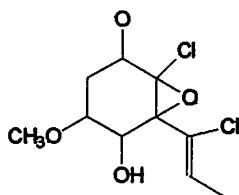


R= H ácido cannabiorchichromenic

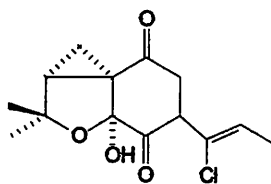
R= Cl ácido 8-chlorocannabiorchichromenic

FIGURA 5: Estruturas das substâncias isoladas de *Cylindrocarpon olidium*.

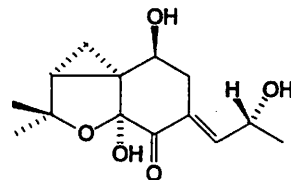
De culturas de isolados do ascomiceto *Lachnum papyraceum* Anke et al. (1995) identificaram mais de trinta novos metabólitos, sendo vários com atividade nematocida, como mostra o Quadro 1. A Figura 6 traz as fórmulas de algumas desas substâncias.



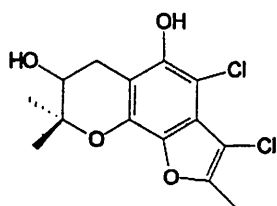
Lachnumon



Mycorrhizin



Papyracon



Chloromycorrhizinol

FIGURA 6 Estruturas de algumas das substâncias isoladas de culturas de *Lachnum papyraceum*.

QUADRO 1 Atividade nematicida de substâncias isoladas do fungo *Lachnum papyraceum*

Composto	DL ₅₀ (ppm)	
	<i>C. elegans</i>	<i>M. incognita</i>
Mycorrhizin A	1	100
(1 ¹ -E)-dechloromycorrhizin	2	>100
(1 ¹ -Z)- dechloromycorrhizin	2	>100
Chloroycorrhzim	1	>100
Mycorrhizin B1	2	>100
Mycorrhizin B2	5	100
Lachnumol	25	>100
Lachnumol A	5	100
Lachnumol B1	50	>100
Lachnumol B2	25	não testado
Papyracon A	25	>100
Chloromycorrhizinol	100	>100
Ivermectina (controle)	0.1	2

Stadler, Anke e Sterner, (1994) isolaram seis novas substâncias nematicidas e antimicrobianas de extratos obtidos de cultura submersa do basidiomiceto *Cheimonophyllum candidissimum* (Fig 7). As quais apresentaram efeito antagonista ao nematóide *Caenorhabditis elegans*.

Trabalhando com corpos de frutificação de fungos, com e sem injúrias, Stadler e Sterner (1998) isolaram o isovaleral (Figura 8) de espécies dos gêneros *Russula* e *Lactarius*. Tal substância apresentou DL₅₀ de 10 ppm contra *Caenorhabditis elegans*. Os autores também extraíram três sesquiterpenóides furanosídicos (Figura 8) de corpos de frutificação do fungo *Lactarius*

mitissimus. Para esses, a DL_{50} foi de aproximadamente 100 ppm para *Caenorhabditis elegans*.

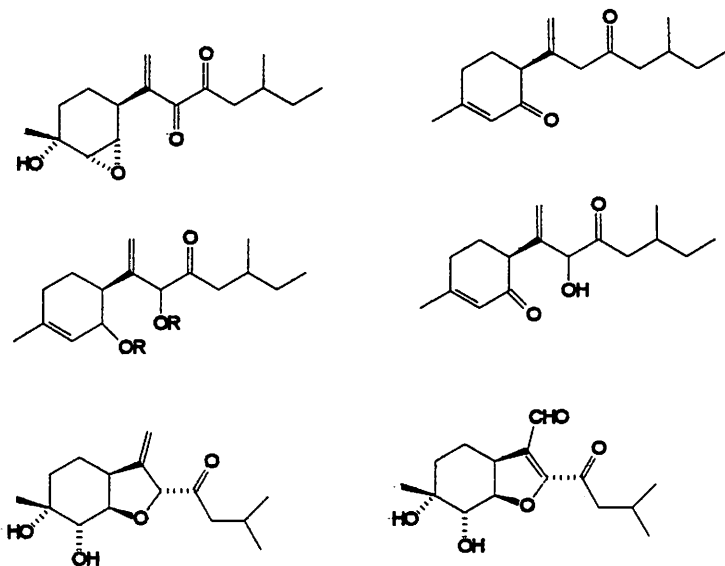


FIGURA 7 Estruturas das substâncias nematocidas isoladas de culturas de *Cheimonophyllum candidissimum*

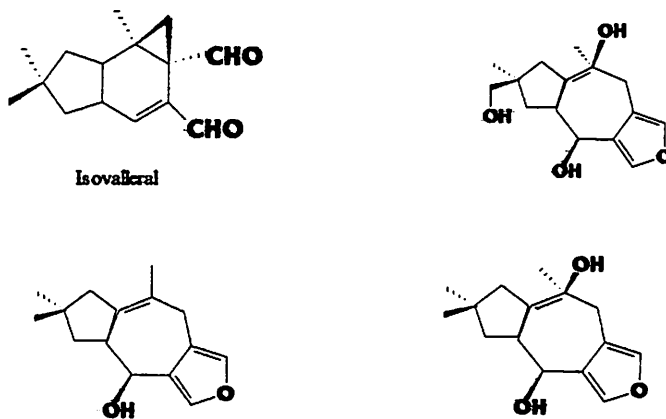


FIGURA 8 Estruturas das substâncias isovalleral e três sesquiterpenóides furanosídicos

2.3 - Efeito de filtrados fúngicos sobre nematóides

Buscando detectar compostos antagonistas a nematóides, Nitao, Meyer e Chitwood (1999) observaram que o filtrado fúngico de *Fusarium equiseti* foi ativo contra o nematóide *Meloidogyne incognita*. De forma análoga, Hallman e Sikora (1996) obtiveram filtrados de vários isolados de *Fusarium oxysporum* tóxicos a nematóides. Estes reduziram a mobilidade de *M. incognita* em 10 minutos de exposição, sendo que após 60 minutos, 98% dos juvenis do segundo estágio (J2) eram inativados. Com exposição de 5 horas, 50% dos J2 foram mortos e em 24 horas ocorreu 100% de mortalidade. As toxinas de *F. oxysporum* foram altamente efetivas contra os endoparasitas migradores, porém, menos efetivas contra os parasitas sedentários.

Efeitos nematostáticos e nematicidas foram observados nos filtrados de *Verticillium chlamydosporium* em meio líquido. Empregando diluições de 1:1 (filtrado:água destilada), observou-se 100% de mortalidade em machos dos nematóides *Globodera pallida* e de *Panagrellus redivivus*, além de forte contração muscular, como retração dos espículos. Em diluição de 1:10 (filtrado:água destilada), os nematóides ficaram paralisados, mas se recuperaram quando colocados em água. Diluições maiores não tiveram efeito (Saifullah, 1996).

A viabilidade de *Heterodera glycines* expostos a filtrados fúngicos foi avaliada por Chen, Dickson e Mitchell (2000). Filtrados de *Fusarium solani*, *Neocosmospora vasinfecta*, *Paecilomyces lilacinus* e *Stagonospora heteroderae*, mostraram grande atividade nematicida, tendo *P. lilacinus* sido o mais tóxico, paralisando 47% dos J2 de *H. glycines* após 4 horas de exposição. Na diluição 1:1 (filtrado: água), todos os nematóides foram paralisados com 24 horas de exposição. Também se observou 100% de inativação de J2 de *Meloidogyne arenaria* com filtrados de *P. lilacinus* (Cayrol, Djian e Pijarowski, 1989). Já

com J2 de *Meloidogyne javanica*, apenas após 72 horas de exposição houve imobilização total, tendo alguns nematóides recuperado parcialmente a mobilidade quando colocados em água. Inibição irreversível só ocorreu em 47% a 62% dos nematóides submetidos a esse filtrado (Zaki, 1994).

Também foram observados efeitos tóxicos de filtrados fúngicos de *P. lilacinus* contra *Meloidogyne incognita* (Khan e Khan, 1992) e *M. hapla* (Fitters et al., 1993). Especificamente com *M. hapla*, os efeitos do filtrado de *P. lilacinus* na embriogênese de ovos foram estudados, colocando-se ovos axenizados em solução de agarose estéril, com ou sem filtrados, numa placa de microtitulação. A seguir, a agarose se solidificou, fixando os ovos individualmente. Desta forma, pôde-se observar, durante três semanas, o desenvolvimento embrionário de ovos em condições estéreis. Ovos embrionários tratados com filtrados tiveram um retardamento embrionário de 2 a 4 dias e 88% de morte embrionária. Contudo, os ovos que já continham juvenis desenvolvidos no momento do estabelecimento do ensaio, apresentaram eclosão de J₂, mesmo quando tratados com filtrados (Fitters et al., 1993).

Filtrados de *Rizoctonia solani* e de *Trichoderma viridae* afetaram a eclosão de J₂ de *M. incognita*, sendo que, ao serem misturados, a toxicidade relativa dos filtrados não foi afetada (Sharma e Saxena, 1992).

A mortalidade de juvenis de *Meloidogyne* spp., quando expostos a filtrados de *Aspergillus niger*, foi de 93,3% quando utilizou-se a diluição de 1:20 (filtrado:água), chegando a alcançar até 100% em concentrações maiores (Dahya e Singh, 1985). Tal filtrado também afetou a eclosão de juvenis significativamente em todas as diluições testadas tendo ainda, sido capaz de inibir a eclosão de juvenis de *M. incognita*. (Alan, Khan e Saxena, 1973).

Um isolado de *Aspergillus niger* (designado PD-42), apresentando bons resultados em laboratório, chegou a ser testado em casa-de-vegetação e em campo, para que a sua eficácia no controle de nematóides parasitas de plantas

fosse medida. Em casa-de-vegetação, o filtrado de PD-42 cultivado em meio líquido adicionado de farinha de aveia reduziu significativamente o número de galhas de *Meloidogyne incognita* em tomate. Em pimenta, além de reduzir o número de galhas, tal filtrado também proporcionou aumento da produção. Quando utilizado diretamente no campo para controle de *M. incognita* em tomate e pimenta, reduziu consideravelmente o número de galhas, mas não foi observado aumento significativo na produção (Zuckerman, Matheny e Acosta, 1994).

2.4 Métodos para obtenção de filtrados fúngicos

Filtrados fúngicos podem ser obtidos pelo cultivo de fungos em frascos contendo meio de cultura líquido. Os mais utilizados para produção de filtrados fúngicos com atividade nematicida são os meios Richards (Siddiqui e Mahmood, 1994), Czapek (Zaki, 1994; Jackson et al., 1997; Dahya e Singh, 1981 e Arya e Saxena, 1993), Gliotoxin (Hallman e Sikora, 1996), PDB (Nitao, Meyer e Chitwood, 1999) e extrato de malte (Chen, Dickson e Mitchell, 2000).

O tempo de cultivo tem sido variado. Vadhera, Skukla e Bhatt (1995), por exemplo, cultivaram os fungos por sete dias. Já Hallman e Sikora (1996) e Chen, Dickson e Mitchell (2000), os cultivaram por quinze dias. Saifullah (1996) cultivou os fungos por dezesseis dias, enquanto Arya e Saxena (1993) o fizeram por vinte dias. Em geral o crescimento fúngico tem sido realizado em incubadoras rotatórias (shaker) a 240 rpm, na temperatura de 25°C (Siddiqui e Mahmood, 1993; Zaki, 1994; Hallman e Sikora, 1996). Como inóculo fúngico têm sido empregados discos retirados de placas de cultura de sete dias de idade.

Após o crescimento fúngico o micélio pode ser separado do meio por filtração em papel Whatman nº 1, seguida de centrifugação (Siddiqui e Mahmood, 1993; Zaki, 1994). Uma alternativa consiste na utilização de

membranas com poros de 0,25 μm de diâmetro (Nitao, Meyer e Chitwood, 1999).

2.5 Teste *in vitro* dos filtrados fúngicos

Em geral, filtrados fúngicos podem ser testados em ovos ou juvenis do segundo estágio (J2) dos nematóides. Chen, Dickson e Mitchell (2000) utilizaram J2 de *Heterodera glycines* emergidos do cisto após dois dias de incubação. Para tanto, 0,1 mL de suspensão aquosa contendo 50 J2 foi colocada em uma das 24 células de uma placa de cultura, na qual foi colocado 1mL do filtrado. Várias repetições foram realizadas e como controle empregaram-se água e meio de cultura. As placas foram mantidas em sala com temperatura controlada (23° a 24°C), sendo a viabilidade dos J2 determinada após 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas, com a técnica descrita por Chen e Dickson (2000). Essa técnica consiste na adição de duas gotas de NaOH 1M em cada célula, avaliando a resposta dos J2 após três minutos, através de microscópio de lente invertida. Os juvenis com o corpo reto e imóvel foram considerados mortos, enquanto aqueles com o corpo retorcido foram considerados vivos.

Já em trabalhos realizados por Nitao, Meyer e Chitwood (1999) com filtrado de *Fusarium equiseti*, foram empregados ovos para os testes *in vitro*. Nesse caso, colocou-se 0,1 mL de suspensão contendo 215 ovos e 0,9 mL da amostra a ser testada em cada célula da placa. A leitura dos J2 eclodidos foi realizada após duas semanas em microscópio de lente invertida.

Para testar seus filtrados fúngicos, Hallman e Sikora (1996) empregaram J₂ e ovos de nematóides. No primeiro caso, juvenis contidos em 1mL de água esterilizada foram colocados em 1 mL de solução antibiótica (150 ppm de penicilina e 150 ppm de estreptomicina), para prevenir o crescimento bacteriano nos filtrados. Ensaios prévios demonstraram que essa mistura

antibiótica controlou eficientemente o crescimento bacteriano, sem afetar a atividade do nematóide. A seguir, colocaram-se os nematóides em placas de Petri esterilizadas juntamente com 10 mL do filtrado, para serem incubados entre 25 e 30°C. Durante 48 horas de exposição, a mobilidade dos nematóides foi avaliada. Aqueles aparentemente inativos, isto é, rígidos, com cabeça e calda relaxados, foram considerados imóveis. Para avaliação da mortalidade, os nematóides foram transferidos para peneira com poros de 20 µm e lavados em água de torneira até a remoção de todo o filtrado. A seguir, foram incubados em incubadora rotatória “shaker” durante 24 horas e classificados como mortos ou não. Foram considerados controle as placas contendo apenas água ou o meio de cultura líquido não repicado com os fungos.

2.6 - Separação de substâncias a partir de processos fermentativos

Segundo Paredes (1998), os métodos mais eficazes que foram desenvolvidos para a purificação de compostos biológicos podem ser considerados como operações seqüenciais. A característica fundamental dessas operações consiste na passagem da mistura de substâncias por várias etapas de purificação.

Especificamente em processos fermentativos, quando o produto desejado pode ser secretado para o meio de cultura, geralmente há uma série de substâncias indesejáveis a serem removidas durante o processo de purificação (Calton, Cobbs e Hamman, 1986). No caso em que a molécula pode ser isolada por meio de extração, o desenvolvimento do método é simplificado. Maior dificuldade é observada na recuperação de misturas complexas com mais de uma molécula com o mesmo grupo funcional ou retenção cromatográfica característica. Uma seqüência de operações para extração e purificação de

produtos de meios fermentativos é apresentada na Figura 9 (Calton, Cobbs e Hamman, 1987).

Inicialmente, os microrganismos são removidos do meio, o que pode ser feito por centrifugação, como apresentado na Figura 9, ou por filtração em material apropriado (Paredes, 1996). A seguir, dá-se início ao processo de partição líquido-líquido, o que se faz com CH_2Cl_2 , que é imiscível com água e tem polaridade relativamente baixa. Isso permite a remoção de substâncias com características apolares da fase aquosa. Também podem ser empregadas em tal etapa solventes como éter etílico e acetato de etila.

A fase aquosa resultante é, então, extraída com um solvente mais polar, sendo 1-butanol o escolhido pelo autor. Com isso, têm-se, ao final, três grupos de substâncias com polaridades distintas: apolares (extrato de CH_2Cl_2), semi-polares (extrato de 1-butanol) e polares (resíduo aquoso).

As frações apolares e semi-polares podem ser diretamente submetidas a processos cromatográficos usuais, como cromatografia em coluna de sílica (Calton, Cobbs e Hamman, 1986)

Quanto à fase aquosa, em princípio há duas possibilidades. Uma delas consiste na separação dos componentes por tamanho, o que é realizado com sephadex[®], por exemplo. A outra se baseia na utilização de resinas básicas e ácidas, que devem reter substâncias ácidas e básicas, respectivamente.

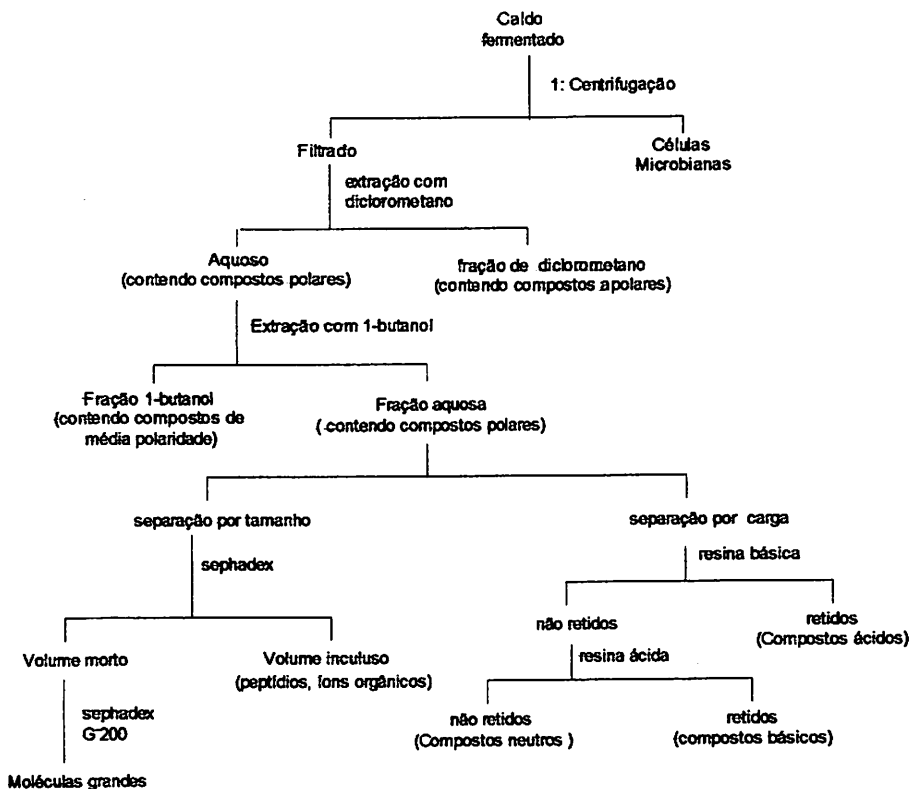


FIGURA 9: Esquema de purificação de substâncias de origem microbiana excretadas para o meio de cultura (Carrington, Cobbs e Hamman, 1987)

Em vários casos, o processo inicial de partição pode não apresentar a eficiência desejada. Quando isso ocorre, tem-se como alternativa a concentração da fase aquosa até determinada parte do seu volume ou até secura. Assim, a solubilização de diversos componentes da fase aquosa em vários solventes orgânicos se torna mais fácil (Grob, 1983). Para tal concentração, o método mais eficiente consiste na liofilização, que permite a remoção de água a baixas temperaturas, evitando, assim, a decomposição de materiais termossensíveis.

2.6.1 Métodos usados na purificação de substâncias com atividade nematicida

Para purificação da substância nematicida cladobotrin (Figura 1) partindo da cultura líquida do fungo *Cladobotryum rubrobrunnescens*, Wagner, Anke e Sterner (1997) inicialmente filtraram-na separando a massa micelial, que não continha nenhuma substância nematicida. O filtrado foi extraído com resina de troca iônica a qual, em seguida, foi lavada consecutivamente com água e eluída com metanol. Assim, obteve-se o extrato bruto, que foi submetido à cromatografia com sílica gel, utilizando acetato de etila e cicloexano como eluente. Mayer et al. (1996) empregaram processo semelhante para isolar a substância 5-pentil-2-furaldeído partindo do filtrado fúngico, sendo que, nesse caso, a resina foi lavada seqüencialmente com água, metanol e acetona.

Trabalhando com o fungo *Aspergillus mellus*, Kimura, Nakahara e Fujikoka (1996) isolaram a substância aspyrone (Figura 1) de seu filtrado pela extração com acetato de etila e purificação por cromatografia. Quaghebeur et al. (1994) usaram o mesmo processo para isolar duas substâncias nematicidas do filtrado da cultura de *Cylindrocarpon olidum*. De forma análoga, Kawazu et al. (1993) obtiveram as substâncias nematicidas bursaphelocida A e B (Figura 2) do filtrado fúngico isolado D1084.

Em alguns casos também é possível isolar a substância ativa partindo do micélio, como mostrado por Buchel et al. (1998). Esses autores filtraram 50 L de cultura de *Omphalotus olearius* separando o filtrado do micélio, o qual foi liofilizado e submetido a extração com metanol. A fase alcoólica foi concentrada e submetida a métodos cromatográficos, o que permitiu isolar as substâncias omphalotin B, C, D (Figura 3).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

Notas importantes para todo este ítem:

- 1- Para todas as separações cromatográficas em coluna, utilizou-se sílica-gel 60 (70 - 230 Mesh - ASTM, Merck).
- 2- Para as análises cromatográficas em camada delgada, utilizaram-se placas Kieselgel 60 (0,25 mm de sílica-gel)
- 3- Como reveladores, foram utilizadas soluções de ácido fosfomolibdico, *p*-anisaldeído, permanganato de potássio em meio ácido e solução de ninidrina preparadas de acordo com Krebs, Heuser e Wimmewh (1969). Também se empregou radiação ultravioleta para visualização das substâncias.
- 4- Todas as amostras dissolvidas em solventes orgânicos foram concentradas sob baixa pressão, utilizando evaporador rotatório.
- 5- A não ser quando explicitamente mencionado de outra forma, os seguintes reagentes apresentavam grau analítico: metanol, diclorometano, éter etílico, clorofórmio, acetato de etila, dimetilsulfóxido, hidróxido de amônio, hexano, ácido clorídrico, hidróxido de sódio.
- 6- Os pontos de fusão foram determinados em aparelho Buchi modelo 535 e não foram corrigidos.
- 7- Os espectros no infravermelho foram obtidos em espectrômetro Shimadzu FTIR 8210 A-Fourier Transform, na faixa de 500 a 4000 cm^{-1} , no Departamento de Química da UFLA, Lavras. Os espectros foram obtidos em pastilhas de KBr.
- 8- Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos no Departamento de Química da UFV, Viçosa.

9- O espectro de massas foi registrado em um espectrômetro Finningam Mat Ion Trap, na Central Analítica do Departamento de Química da UFP, Recife, Pernambuco.

3.1 - Microrganismos utilizados nesse trabalho

Os fungos *Cunninghamella elegans*, *Fusarium moniliforme* isolados 2 e 25, *F. oxysporum*, *Fusarium* sp, *Paecilomyces lilacinus*, *P. variotii*, e *Sclerotinia sclerotiorum*, os quais apresentavam maior potencial para a produção de substâncias tóxicas a *Meloidogyne incognita*, de acordo com Costa (2000)

3.2 - Obtenção de inóculo, condições de cultivo e obtenção dos filtrados.

Os fungos *Cunninghamella elegans*, *Fusarium moniliforme* isolados 2 e 25, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium* sp, *Paecilomyces lilacinus*, *Paecilomyces variotii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, conservados em água em geladeira no Laboratório de Nematologia da Universidade Federal de Lavras, foram repicados em placas de Petri contendo o meio batata dextrose ágar. Após sete dias de incubação a 27°C, discos de 5 mm de diâmetro dessas culturas foram colocados em frascos de 500 mL contendo 200 mL de meio líquido Czapek-Dox (0,5 g de KCl, 1 g de KH₂PO₄, 2g de NaNO₃, 30 g de sacarose, 0,01 g de FeSO₄.H₂O e 0,5 g de MgSO₄.7 H₂O por 1000 mL de água destilada), tendo o meio sido previamente esterilizado a 120°C por 20 minutos. Inoculou-se, em cada frasco, seis discos de cada cultura. Esses foram incubados a 25°C em incubadora com agitação orbital por 15 dias. Após esse período, a cultura foi filtrada em papel Whatman nº 1 duas vezes, com o auxílio de uma bomba de vácuo, obtendo-se, assim, as fases líquidas denominadas de filtrados fúngicos.

Cerca de 1L de cada filtrado foi liofilizado e mantido sob refrigeração a 4°C, até sua utilização.

3.3 Fracionamento dos filtrados fúngicos

3.3.1 Fracionamento dos filtrados obtidos de culturas de *Cunninghamella elegans*, *Fusarium sp*, *Paecilomyces lilacinus* e *P. variotii*

Para o fracionamento, optou-se inicialmente pela partição líquido-líquido. Assim sendo, buscou-se reduzir o volume dos filtrados para aumentar a eficiência da extração, o que foi feito por meio de liofilização seguida de solubilização dos resíduos correspondentes em volume de água menor do que o inicial. Para isso, solubilizaram-se, em 30 mL de H₂O, os resíduos da liofilização de aproximadamente 1 L dos filtrados fúngicos de *Cunninghamella elegans*, *Fusarium sp*, *Paecilomyces variotii* e *P. lilacinus*, o que deu origem a soluções que foram submetidas quatro vezes à extração com acetato de etila (AcOEt; 4 x 20 mL). As fases de AcOEt de cada fungo foram combinadas, formando, assim, 80 mL de uma solução que foi tratada com Na₂SO₄ anidro. Aliquotas de 11,3 mL, retiradas das soluções de AcOEt resultantes, foram concentradas em evaporador rotatório sob vácuo e reconstituídas em 50 mL de Tween 80 a 1% para os testes *in vitro* (3.4.2 e 3.4.3). As frações aquosas dos quatro filtrados fúngicos foram novamente liofilizadas e extraídas com 80 mL de metanol. Doze mililitros das frações metanólicas foram concentrados em evaporador rotatório e reconstituídos em 50 mL de Tween 80 a 1%, para realização de testes *in vitro* (3.4.2 e 3.4.3) com *M. incognita*. A Figura 10 resume as operações:

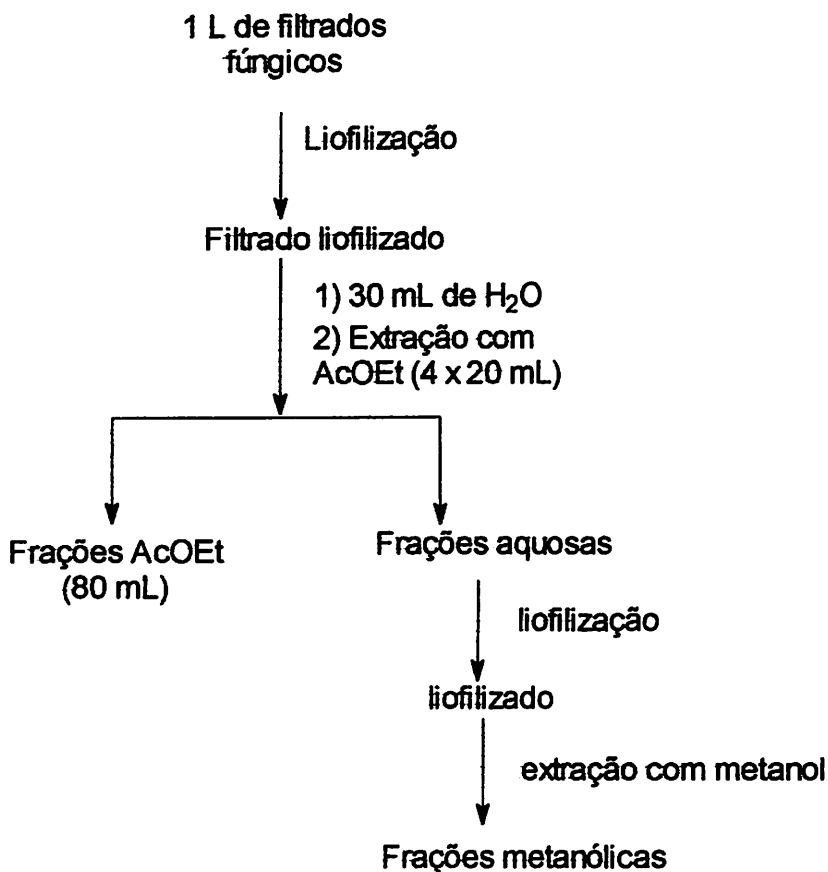


FIGURA 10 Fluxograma da extração dos filtrados fúngicos de *Cunninghamella elegans*, *Fusarium* sp, *Paecilomyces lilacinus* e *P. variotii*.

No caso específico de *C. elegans*, ao se adicionar AcOEt à solução aquosa do resíduo da liofilização do filtrado, houve a formação de precipitado (A1) que foi separado por centrifugação. Após a separação do precipitado (A1), o sobrenadante foi extraído conforme o processo descrito para os outros filtrados. O precipitado A1, um sólido amarelado, foi consecutivamente lavado com clorofórmio, metanol e HCl 2M. Após

concentração das frações clororofórmicas e metanólicas sob vácuo, solubilizou-se 1 mg de cada um dos resíduos correspondentes em 2 mL de Tween 80 a 1% para serem submetidos aos testes *in vitro* (3.4.4). Quanto à fração ácida aquosa, foi alcalinizada com NH_4OH concentrado, dando lugar a formação de um novo precipitado (A2), que foi separado por centrifugação. Um miligrama de A2 foi solubilizado em 2 mL de $\text{HCl } 10^{-5} \text{ M}$, para ser submetido ao teste *in vitro* (3.4.4). No trabalho com *C. elegans*, apenas o precipitado A2 apresentou toxidez a J2 de *M. incognita*.

3.3.1.1 Purificação do extrato acetato de etila obtido do filtrado de *Fusarium* sp

Por ter apresentado atividade contra *Meloidogyne incognita*, o extrato de acetato de etila obtido a partir de 4 L de filtrado de *Fusarium* sp conforme descrito em 3.3.1, foi submetido à cromatografia em coluna com 2 x 20 cm de sílica. Os solventes utilizados na eluição da coluna foram hexano, acetato de etila e metanol. Coletaram-se 51 frações, que foram combinadas de acordo com o observado por cromatografia de camada delgada. Com isso, ao final havia 12 frações: D1, Fs1-Fs11. As frações (40-50) saíram muito impuras, por isto foram combinadas, formando a nova Fração D1 que foi submetida a nova cromatografia. A Figura 11 mostra as operações realizadas:

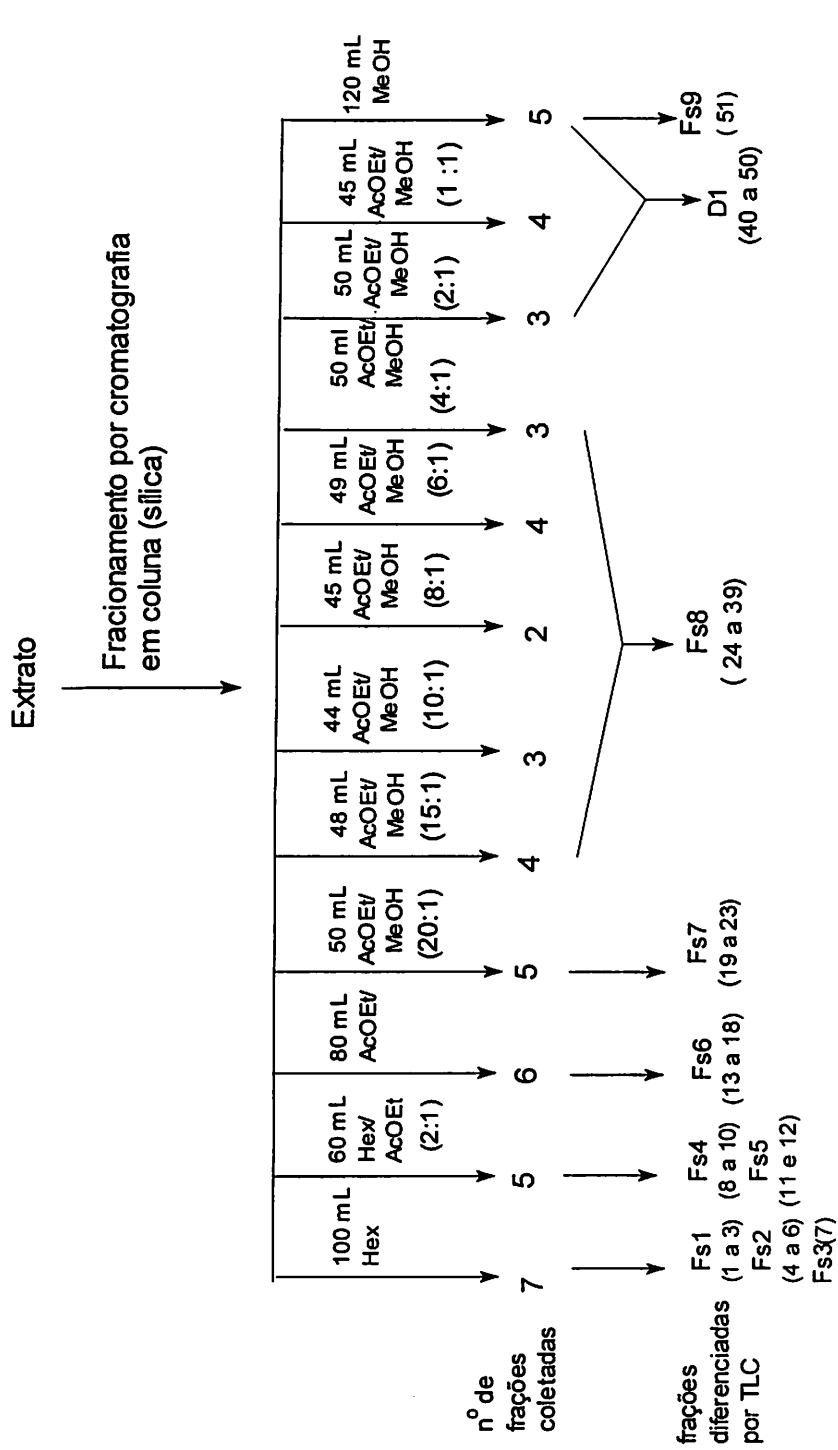


FIGURA 11 Fluxograma da 1ª separação do extrato em acetato de etila do filtrado do fungo *Fusarium* sp, por cromatografia em coluna.

Por acreditar que a substância ativa pudesse estar presente na amostra D1, esta foi submetida a nova cromatografia em coluna com 2 x 20 cm de sílica. Os solventes utilizados para eluição foram clorofórmio e metanol contendo hidróxido de amônio. Coletaram-se 24 frações, que foram combinadas de acordo com os resultados das análises por cromatografia em camada fina (Figura 12).

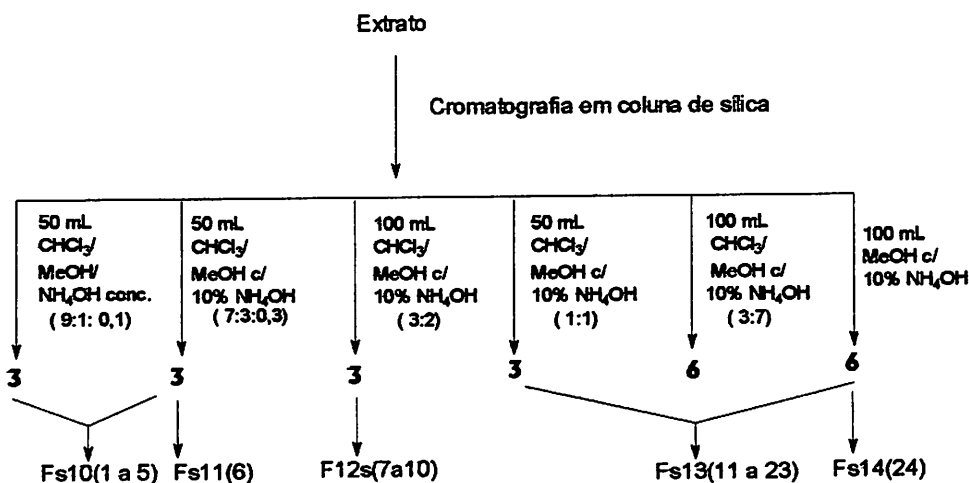


FIGURA 12 Fluxograma do fracionamento da amostra D1 por cromatografia em coluna.

Todas as amostras foram evaporadas em evaporador rotatório. Para o teste *in vitro* (3.4.4), solubilizou-se 1 mg de cada amostra em 2 mL de Tween 80 a 1% ou HCl 10^{-5} M, da seguinte forma:

Amostras: Fs1, Fs2, Fs3, Fs4, Fs5, Fs6, Fs7, Fs8, Fs9, Fs10 - Tween 80 a 1%

Amostras: Fs11, Fs12, Fs13, Fs14 - HCl 10^{-5} M

3.3.2 Fracionamento biodirecionado de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* isolados 2 e 25 e *Sclerotinia sclerotiorum*.

Visando à simplificação da etapa inicial de fracionamento das substâncias nematocidas presentes nos filtrados fúngicos de *Fusarium moniliforme* isolado 2 e 25, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum*, após a liofilização desses filtrados foi feita a lavagem dos resíduos obtidos com metanol/acetato de etila (1:1) (MeOH/AcOEt 1:1). Optou-se por estes solventes por julgar que assim seria evitada a solubilização de grande quantidade de açúcar residual do caldo fermentado, que não fora metabolizado pelos fungos.

Aos resíduos obtidos da liofilização de 1L de cada filtrado fúngico foram adicionados 100 mL de metanol e, após agitação por alguns minutos, 100 mL de acetato de etila. Filtraram-se as misturas em algodão, o que deu origem a soluções das quais foram removidas alíquotas de 10 mL para serem concentradas em evaporador rotatório até a retirada de todos os solventes. Os materiais insolúveis na mistura metanol/acetato de etila (1:1) foram solubilizados em 50 mL de água, resultando nas frações residuais aquosas. Destas retiraram-se alíquotas de 2,5 mL, às quais foram adicionados 47,5 mL de água para realização dos testes *in vitro* (3.4.3). As soluções restantes foram armazenadas em refrigerador.

Os resíduos, por apresentarem os melhores resultados, foram submetidos ao processo seguinte de fracionamento. Para tanto, optou-se por solubilizá-los em água e variar o pH das soluções resultantes para forçar a precipitação de algum material. Observou-se que tal precipitação ocorria quando se elevava o pH, o que era feito pela adição de NaOH 2M. Assim, obtiveram-se precipitados (precipitado P1), que foram separados por centrifugação. Descartaram-se os sobrenadantes, enquanto os resíduos foram lavados com hidróxido de amônio e secos em liofilizadora.

Lavaram-se esses resíduos com 15 mL de metanol, sendo que as frações metanólicas foram concentradas sob vácuo até a retirada de todo o solvente. Tanto as frações solúveis quanto as insolúveis nesse solvente foram submetidas a testes *in vitro* (3.4.4). Para isso, solubilizou-se 1 mg de cada amostra em 2 mL de HCl 10^{-5} M, obtendo-se assim uma concentração de 500 ppm. A Figura 13 resume as operações:

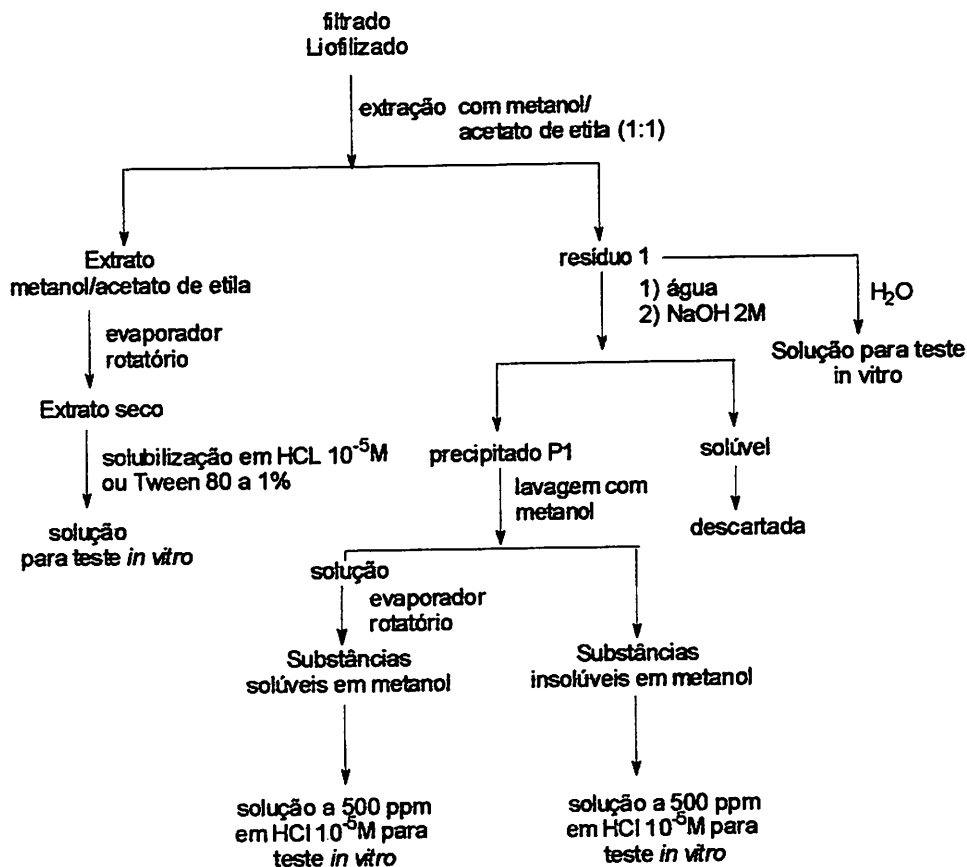


FIGURA 13 Fluxograma das operações de extração utilizadas nos filtrados de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* isolados 2 e 25 e *Sclerotinia sclerotiorum*.

3.3.2.1 Purificação da fração solúvel em metanol obtida do precipitado P1 de *Fusarium moniliforme* isolado 25

Uma vez que apenas com *Fusarium moniliforme* isolado 25 foi possível separar a substância ativa da grande quantidade de açúcar residual, tal fungo foi novamente cultivado em maior quantidade de meio líquido Czapek-Dox, para ser submetido ao mesmo procedimento até aqui descrito.

A fração P1 solúvel em metanol, obtida de 3 L do filtrado do fungo *Fusarium moniliforme* isolado 25, conforme descrito em 3.3.2, foi submetida a fracionamento em coluna de 2 x 20 cm de sílica. Os solventes utilizados na eluição das substâncias foram diclorometano, metanol, água e HCl 0,1 M. Das frações coletadas prepararam-se soluções aquosas a 1000 ppm para serem submetidas aos testes *in vitro* (3.4.4 e 3.4.5)

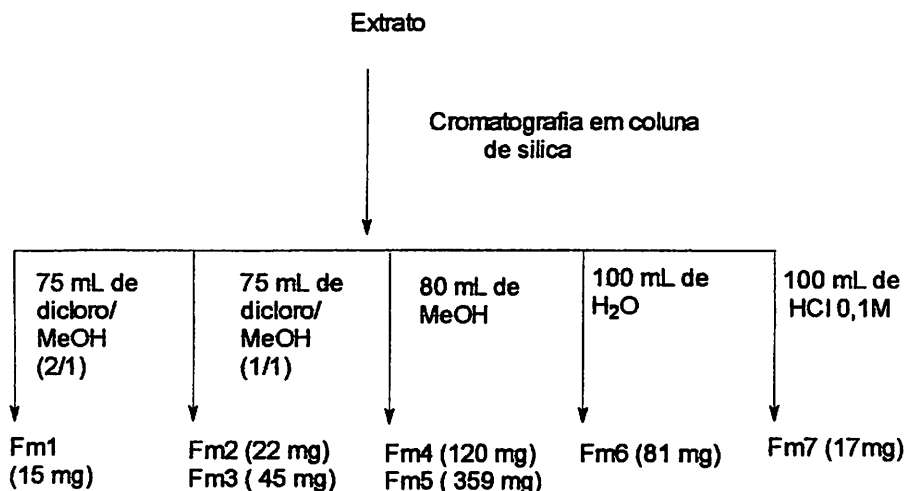


FIGURA 14: Cromatografia em coluna da fração solúvel em metanol obtida do precipitado P1.

As amostras foram solubilizadas em veículos aquosos da seguinte forma:

Amostras: Fm1, Fm2, Fm3 em tween 80 a 1% (v/v).

Amostras: Fm5, Fm6, Fm7 em HCl 10^{-5} M

As amostras Fm3 e Fm6, que apresentaram os melhores resultados nos testes *in vitro*, estavam homogêneas segundo análise por cromatografia em camada fina, não sendo submetidas a nenhum outro processo de separação.

3.4 Teste *in vitro* dos extratos e frações

3.4.1 Obtenção de ovos de *Meloidogyne incognita*

Ovos de *M. incognita* foram obtidos de raízes de tomate pela técnica de Hussey e Barker (1973), modificada por Bonneti e Ferraz (1981), que consiste em triturar raízes picotadas em liquidificador por 20 segundos, a baixa rotação, em solução de hipoclorito de sódio a 0,5%. A seguir, a suspensão obtida foi vertida em peneira de 0,075 mm de abertura, sobre outra de 0,025 mm, sendo lavada com água para eliminar o hipoclorito. As raízes foram expostas ao hipoclorito por tempo total inferior a 4 minutos. O material retido na peneira de 0,025 mm foi recolhido com o auxílio de jatos de água, em um béquer. Deixou-se a suspensão de ovos decantar por 30 minutos e, a seguir, eliminou-se parte do sobrenadante para realizar a desinfestação superficial pela técnica de Coolen e D'Herde (1972). Os ovos desinfestados foram contados em caixa plástica colocada em microscópio de objetiva invertida e a suspensão resultante foi calibrada para 300 ovos/mL.

3.4.2 - Teste de mobilidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* em placa de Petri

Os ovos obtidos foram colocados em uma câmara de eclosão formada com tela e papel de espessura fina, colocados em béquer esterilizado, sem aeração, evitando contaminação. Os juvenis (J2) obtidos a cada 24 horas eram contados até a obtenção de um número suficiente para a montagem do experimento. Em placa de Petri de 4,5 cm de diâmetro foi colocado 1 mL de suspensão contendo 100 J2 de *M. incognita* e 5 mL do tratamento. Exceto para os extratos de acetato de etila/metanol e as frações residuais obtidos de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* isolados 2 e 25 e *Sclerotinia sclerotiorum*, para os quais foram feitas três repetições, em todos os outros casos empregam-se cinco repetições em delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo testemunhas os veículos aquosos empregados nas solubilizações das amostras. As avaliações de mobilidade foram realizadas com 24 e 48 horas de exposição do J2 às amostras.

3.4.3 Teste de mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* em placa de Petri.

O teste de mortalidade foi conduzido como descrito no item 3.4.2, sendo que após a última avaliação de mobilidade, os J2 foram transferidos para água com o auxílio de uma peneira de 0,025 mm. Foram então, lavados com água corrente até a retirada da amostra e colocados novamente nas placas de Petri. Após 24 horas, foi realizada a avaliação de mortalidade. Todas as contagens foram feitas em microscópio de objetiva invertida, sendo os números obtidos transformados em percentagem para serem submetidos à análise estatística.

3.4.4 Teste de mobilidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* em placa Elisa

Aliquota de 20 µL da suspensão aquosa contendo 25 J2, obtidos conforme descrito em 3.4.2, e 100 µL da amostra a ser testada foram colocados em células de placa Elisa. Empregaram-se cinco repetições, sendo utilizadas como controles as soluções aquosas empregadas na dissolução das amostras. As avaliações consistiram na contagem de J2 móveis e imóveis com o auxílio de microscópio de objetiva invertida. Os dados foram transformados para percentagem e submetidos à análise de variância.

Com as amostras provenientes de *Fusarium* sp, as avaliações foram efetuadas com 24, 48 e 72 horas. Para as amostras de *C. elegans*, as avaliações foram realizadas com 24, 36 e 48 horas; já com as amostras de *Fusarium moniliforme* isolado 25, as avaliações foram feitas com 24, 36, 48 e 60 horas.

3.4.5 Teste de mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* em placa Elisa.

Após 72 horas de exposição dos J2 de *M. incognita* às amostras (3.4.4), foi realizado o teste de mortalidade pela adição de uma a duas gotas de NaOH 0,1M a cada célula, conforme metodologia descrita por Chen e Dickson (2000). Consideraram-se mortos os nematóides retos e imóveis, e vivos os retorcidos. A contagem foi realizada em microscópio de objetiva invertida, sendo os resultados transformados em percentagem para serem submetidos à análise estatística. Empregaram-se cinco repetições, sendo utilizados como controles as soluções aquosas empregadas na dissolução das amostras.

3. 5 Análises físico-químicas das substâncias ativas

3.5.1 Análise da substância ativa de *Cunninghamella elegans*, precipitado A2

Rf: 0,47 (SiO₂, CH₂Cl₂ / MeOH = 2:1, ninidrina)

Ponto de fusão: 195°C (dec.)

IV(KBr): bandas 3330, 1654, 1402, 1082, 1008, 887, 565 e 540 cm⁻¹ (anexo B)

3.5.2 Análise das substâncias ativas de *Fusarium moniliforme* isolado 25

Fração Fm3 apresentou as seguintes características:

Rf: 0,8 (SiO₂, CH₂Cl₂ / MeOH = 3,5:1, iodo) não revelando com ninidrina.

Ponto de fusão: 145°C (dec.)

IV (KBr): Bandas em 3460, 1629, 1544, 1458, 1417, 1384, 1340 cm⁻¹ (anexo B)

Massas (m/z): 624, 623, 484, 467, 443, 425, 283 (anexo B)

RMN ¹H (DMSO, 300 MHz): 1,72 (s, 3H), 3,5 (s, 2H) ppm (anexo B)

RMN ¹³C (DMSO, 75 MHz): 178,4 (C=O), 63,4 (CH₂) e 25,0 (CH₃) ppm (anexo B)

Fração Fm 6 apresentou as seguintes características:

Rf : 0,53 (SiO₂ , MeOH , p/ anisaldeído)

Ponto de fusão: 135°C (dec.)

IV (KBr): 3400, 1633, 1182, 1109, 1067, 620 cm⁻¹ (anexo B)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fracionamento biodirecionado de filtrados de culturas de *Cunninghamella elegans*, *Fusarium* sp, *Paecilomyces lilacinus* e *P. variotii*.

A motilidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* só foi reduzida ($P \leq 0,05$) no extrato de acetato de etila (AcOEt) do filtrado concentrado de *Fusarium* sp. Tanto os extratos de acetato de etila dos outros filtrados concentrados quanto os extratos metanólicos apresentaram valores estatisticamente idênticos aos das testemunhas (Tabela 1). Com acetato de etila, Nitao, Meyer e Chitwood (1999), Kimura, Nakahara e Fujikoka (1996), Kawazu et al. (1993) e Quaghebeur et al. (1994) também conseguiram recuperar substâncias nematicidas de filtrados fúngicos.

O aumento do tempo de exposição ao extrato de acetato de etila de *Fusarium* sp (Tabela1) diminuiu ainda mais a motilidade, o que está de acordo com os resultados obtidos por Hallman e Sikora (1996), os quais utilizaram filtrado de *Fusarium oxysporum* contra *M. incognita*. A mortalidade só foi estatisticamente diferente das testemunhas ($P \leq 0,05$) no extrato de acetato de etila de *Fusarium* sp. Para os demais extratos, o emprego de acetato de etila e metanol não se mostrou eficiente (Tabela 1). Resultado semelhante foi obtido por Nitao, Meyer e Chitwood (1999), que utilizou acetato de etila para extrair uma substância nematicida do filtrado de *Fusarium equiseti*.

No caso específico de *Paecilomyces lilacinus*, cujo filtrado promoveu até 99% de mortalidade de J2 de *Meloidogyne incognita* em trabalho realizado por Costa (2000), o ácido acético já tinha sido caracterizado como a substância responsável por tal atividade (Djian et al., 1991). Como tal substância é

relativamente volátil, provavelmente foi perdida durante a etapa de liofilização (Tabela 1). Talvez o mesmo tenha ocorrido com *P. variotii*, cujo filtrado também apresentava atividade contra *M. incognita* no trabalho realizado por Costa, (2000).

A tentativa de extração da substância tóxica a *M. incognita* do fungo *Cunninghamella elegans* pelo acetato de etila proporcionou um precipitado A1, o que talvez tenha ocorrido devido a retirada de substâncias surfactantes por este solvente. Os extratos em acetato de etila e metanol obtidos do sobrenadante testados não afetaram a motilidade de J2 (Tabela 1).

TABELA 1- Efeito de extratos fúngicos em metanol e acetato de etila na motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*.

Tratamento	(% J2 móveis)		(% J2 vivos)
	24 horas	48 horas	72 horas
Extratos em acetato de etila de:			
<i>Cunninghamella elegans</i>	84 b	83 b	81 b
<i>Fusarium sp</i>	56 a	5 a	12 a
<i>Paecilomyces lilacurus</i>	94 b	90 b	84 b
<i>Paecilomyces variotii</i>	96 b	82 b	85 b
Extratos em metanol de:			
<i>Cunninghamella elegans</i>	91 b	85 b	87 b
<i>Fusarium sp</i>	90 b	90 b	90 b
<i>Paecilomyces lilacurus</i>	91 b	77 b	88 b
<i>Paecilomyces variotii</i>	92 b	78 b	93 b
Testemunhas			
água	93 b	91 b	87 b
Tween 80 a 1%	90 b	87 b	87 b

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nos testes com as frações obtidas do precipitado A1 de *Cunninghamella elegans*, o precipitado A2 testado nas concentrações de 500 e 250 ppm, promoveu redução significativa na motilidade dos J2 de *M. incognita* com 36 e 48 horas, respectivamente ($P \leq 0,05$; Tabela 2). Com 36 horas A2 na concentração de 500 ppm reduziu o número de J2 móveis a apenas 8%, e com 48 horas este valor passou para 1%. Na concentração de 250 ppm, observou-se menor motilidade dos J2 após 36 horas; mas, após 48 horas de exposição ao extrato, as diferentes da concentrações do extrato não diferiram significativamente ($P \leq 0,05$). O aumento do tempo de exposição de A2 nas duas concentrações testadas reduziu significamente a motilidade (Tabela 2). O efeito nematocida observado nesta fração confirma os resultados obtidos por Costa (2000), que encontrou efeito tóxico a *M. incognita* no filtrado deste fungo.

A mobilidade de J2 foi levemente reduzida após 48 horas de contato com o extrato metanólico do precipitado A1 ($P \leq 0,05$; Tabela 2), indicando pequena capacidade desse solvente em solubilizar a substância tóxica a *M. incognita* produzida por *C. elegans*.

TABELA 2 Efeito das frações obtidas do precipitado A1 de filtrado de *Cunninghamella elegans* na motilidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*

Tratamento	(% de J2 móveis)		
	24 horas	36 horas	48 horas
Testemunhas			
HCl 10 ⁻⁵ M	94 a	93 c	91 c
Tween 80 a 1%	95 a	92 c	90 c
Água	96 a	95 c	94 c
Frações de <i>C. elegans</i>			
Precipitado A2 500ppm	94 a	8 a	1 a
Precipitado A2 250ppm	93 a	54 b	6 a
Extrato MeOH de A1 a 500ppm	92 a	92 c	78 b
Extrato CHCl ₃ de A1 a 500ppm	93 a	92 c	92 c

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5%.

Nenhuma das frações obtidas por cromatografia em coluna de sílica do extrato de acetato de etila de *Fusarium sp.* reduziu a motilidade de J2 de *M. incognita* (Tabela 3), indicando a instabilidade da substância tóxica a esse nematóide nas condições empregadas. Nitao, Meyer e Chitwood (1999), ao contrário, obtiveram resultados positivos utilizando sílica para fracionamento de um extrato em acetato de etila obtido de filtrado de cultura fúngica de *Fusarium equiseti*.

TABELA 3 Efeito das frações obtidas por cromatografia em coluna de sílica de extrato em acetato de etila do filtrado de *Fusarium sp* na motilidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*.

Tratamento	(%) J2 móveis			
	12 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Testemunhas				
água	97 a	94 a	94 b	92 a
tween 80 a 1%	95 a	95 a	86 a b	84 a
HCl 10 ⁻⁵ M	94 a	93 a	87 a b	86 a
Frações obtidas por cromatografia				
1ª coluna				
Fs 1	95 a	95 a	86 a b	85 a
Fs 2	92 a	92 a	89 a b	88 a
Fs3	92 a	95 a	85 a b	83 a
Fs4	91 a	90 a	78 a b	74 a
Fs 5	92 a	91 a	82 a b	76 a
Fs 6	90 a	90 a	86 a b	78 a
Fs 7	96 a	95 a	94 b	92 a
Fs 8	96 a	95 a	93 a b	83 a
Fs 9	96 a	96 a	86 a b	86 a
2ª coluna				
Fs 10	94 a	91 a	80 a b	80 a
Fs 11	93 a	93 a	81 a b	80 a
Fs 12	98 a	92 a	77 a	77 a
Fs 13	94 a	90 a	88 a b	80 a
Fs 14	92 a	95 a	82 a b	77 a

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.1.1 Análise da substância ativa de *Cunninghamella elegans*

O precipitado A2, obtido do filtrado de *C. elegans* conforme processo descrito em 3.3.1 e discutido em 4.1, foi considerado puro, uma vez que se apresentava homogêneo quando analisado por cromatografia em camada fina. Buscou-se corroborar tal interpretação dessa análise cromatográfica por meio do ponto de fusão de A2, mas isso não foi possível, pois A2 começou a decompor-se antes de fundir.

O fato desse material ser solúvel em soluções aquosas fortemente ácidas e insolúvel naquelas com pH acima de 5, indica que possui átomos de nitrogênios cujos pares de elétrons não se encontram tão disponíveis como em uma amina simples, que geralmente não precisa de valores de pH tão baixos para ser solubilizada em soluções aquosas (Shriner et al., 1983). A presença de um átomo de nitrogênio é uma proposta amparada na revelação de A2 com ninidrina durante as análises por cromatografia em camada fina, já que isso é o que tende a ocorrer quando a substância analisada possui grupamentos NH_2 (Shriner et al., 1983).

Quanto ao espectro de infravermelho, vale destacar as bandas em 1654 cm^{-1} , que podem ser provenientes de ligações $\text{C}=\text{O}$ de grupo amida. Esta suposição é suportada pela banda em 1082 cm^{-1} , que pode ser decorrente de ligação $\text{C}-\text{N}$. Também se deve mencionar a banda em 565 cm^{-1} , que indica presença de um átomo de cloro na molécula (Lambert et al., 1998).

Ainda é importante relatar que A2 se mostrou insolúvel em metanol, diclorometano, éter etílico, acetato de etila, piridina, ácido acético, acetona, clorofórmio e dimetil sulfóxido, o que é uma característica relativamente comum de bases purínicas ou pirimidínicas sem ou com substituintes pequenos (Harborne, 1998).

4.2 Fracionamento biodirecionado dos filtrados de culturas de *Fusarium moniliforme* isolados 2 e 25, *F. oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

As substâncias insolúveis na mistura de metanol/acetato de etila (1:1), oriundas dos filtrados liofilizados, reduziram drasticamente a motilidade de J2 quando comparadas com as testemunhas (Tabela 4). Já com as substâncias solúveis em metanol/acetato de etila (1:1), houve redução significativa na motilidade para aquelas provenientes dos fungos *Fusarium moniliforme* isolados 2 e 25 e *Sclerotinia sclerotiorum* (Tabela 4; $P \leq 0,05$). No entanto, mesmo após 48 horas, os valores de J2 móveis ainda estavam em torno de 40%.

TABELA 4 Efeito das substâncias solúveis e insolúveis em metanol/acetato de etila (1:1), oriundas dos filtratos fúngicos, sobre a motilidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*

Tratamento	(% de J2 móveis)	
	24 horas	48 horas
Testemunhas		
água	91 d	81 c
Czapek	74 b c	74 c
Solúveis em MeOH/AcOEt (1:1)		
<i>Fusarium moniliforme</i> 2	68 b	38 b
<i>Fusarium oxysporum</i>	70 b c	73 c
<i>Fusarium moniliforme</i> 25	91 d	40 b
<i>Sclerotinea sclerotiorum</i>	81 c d	40 b
Insolúveis em MeOH/AcOEt (1:1)		
<i>Fusarium moniliforme</i> 2	1,0 a	1.0 a
<i>Fusarium oxysporum</i>	1,0 a	1.0 a
<i>Fusarium moniliforme</i> 25	1,0 a	1.0 a
<i>Sclerotinea sclerotiorum</i>	1,0 a	1.0 a

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Dos resíduos ativos contra *M. incognita* (Tabela 4) obteve-se o precipitado P1, insolúvel em NaOH 2M, cujas frações solúveis e insolúveis em metanol também foram submetidas aos testes *in vitro* (Tabela 5). Apenas a fração solúvel em metanol obtida do filtrado de *Fusarium moniliforme* isolado 25 reduziu ($P \leq 0,05$) a mobilidade de J2 de *M. incognita*, indicando que as substâncias ativas contra *Meloidogyne incognita* presentes nos filtrados fúngicos de *Fusarium moniliforme* 2, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum* estavam sendo decompostas durante o processo ou não precipitaram com a variação de pH.

TABELA 5 - Efeito das frações solúveis e insolúveis em metanol, obtidas dos precipitados P1 dos fungos *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme* isolados 2 e 25 e *Sclerotinia sclerotiorum* na motilidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita*.

Tratamento	(% J2 móveis)	
	24 horas	48 horas
Fração solúvel em metanol de:		
<i>Fusarium moniliforme</i> 2	93 b	80 b
<i>Fusarium moniliforme</i> 25	1,0 a	1,0 a
<i>Fusarium oxysporum</i>	91 b	89 b
<i>Sclerotinea sclerotiorum</i>	91 b	89 b
Fração insolúvel em metanol de:		
<i>Fusarium moniliforme</i> 2	91 b	90 b
<i>Fusarium moniliforme</i> 25	94 b	83 b
<i>Fusarium oxysporum</i>	97 b	93 b
<i>Sclerotinea sclerotiorum</i>	91 b	83 b
Testemunhas		
HCl 10 ⁻⁵ M	96 b	92 b
água	97 b	94 b

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Através da cromatografia em coluna, obtiveram-se sete frações, partindo da amostra de *Fusarium moniliforme* isolado 25 insolúvel em NaOH e solúvel em metanol. Dessas, apenas as frações 2, 3 e 6 reduziram ($P \leq 0,05$) a motilidade de J2 de *M. incognita* (Tabela 6), destacando-se a fração 6, desde 24 horas de contato com os J2.

De fato, com 24 horas de experimento, a fração 6 apresentava 70% de J2 móveis, o que já era um valor estatisticamente diferente dos observados para as testemunhas. Aumentando-se o tempo de exposição, a percentagem de J2 móveis diminuiu, chegando a apenas 1% após 60 horas. Com 72 horas observou-se que 89% dos J2 estavam mortos, o que corroborou os resultados de motilidade (Tabela 6). Quanto à fração 3, mesmo após 48 horas continuava a fornecer valores estatisticamente idênticos aos das testemunhas. No entanto, é interessante mencionar que, desde 24 horas de exposição, a movimentação de J2 já parecia ser diferente da observada para as testemunhas. Após 60 horas, tal fração reduziu ($P \leq 0,05$) o número de J2 de *M. incognita* móveis a 21% e, com 72 horas, provocou a morte de 89% deles. Hallman e Sikora (1996), de forma análoga, obtiveram melhores resultados trabalhando com filtrado de *Fusarium oxysporum* contra *M. incognita* quando aumentavam o tempo de exposição. A fração 2 também apresentou redução significativa ($P \leq 0,05$) na motilidade dos J2 de *M. incognita* com 60 horas de exposição, mas todos os J2 de *M. incognita* se apresentaram vivos no teste de mortalidade após 72 horas de exposição.

Como as frações 3 e 6 se apresentaram homogêneas segundo análise por cromatografia em camada fina, considerou-se que correspondiam a substâncias puras e, em decorrência, não foram mais submetidas a nenhum outro tipo de fracionamento.

TABELA 6 - Efeito das frações obtidas por cromatografia em coluna de sílica do material solúvel em metanol, oriundo do precipitado P1 de *Fusarium moniliforme* isolado 25, na motilidade e mortalidade juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*.

Tratamento	(% J2 móveis)				% J2 vivos
	24 horas	36 horas	48 horas	60 horas	72 horas
Frações obtidas por cromatografia					
Fm 1	96 b	95 b	95 b	90 c	90 b c
Fm 2	100 b	99 b	100 b	34 b	99 c
Fm 3	100 b	100 b	95 b	21 b	11 a
Fm 4	99 b	98 b	85 b	85 c	85 b
Fm 5	87 a b	88 b	82 b	81 c	81 c
Fm 6	70 a	26 a	10 a	1,0 a	11 a
Fm 7	100 b	100 b	94 b	93 c	83 b c
Testemunhas					
Tween 80 a 1%	98 b	98 b	99 b	95 c	95 b c
HCl 10 ⁻⁵ M	97 b	96 b	97 b	97 c	85 b c
Água	98 b	97 b	97 b	96 c	95 b c

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.2.1 Análise das frações ativas obtidas de *Fusarium moniliforme* isolado 25

O sólido Fm3 (item 3.3.2.1), correspondente à fração 3 do item 4.2, se mostrou homogêneo pela análise por cromatografia em camada fina, sendo assim, considerado puro. De forma análoga ao precipitado A2, este se decompôs antes de fundir.

Como o sólido Fm3 se mostrou solúvel em soluções aquosas ácidas, mas não formou qualquer coloração quando submetido à reação com ninidrina, pôde-se supor que possui um átomo de nitrogênio, mas que este não deve corresponder a um grupo NH₂ (Shriner et al., 1983).

No espectro de RMN ^{13}C foram observados três átomos de carbono diferentes: uma carbonila, a qual pareceu ser de grupamento amida (178 ppm); um grupo CH_2 , que, por estar em torno de 63,4 ppm, deveria estar ligado a heteroátomos; e um grupo CH_3 , que se encontrava em campo um pouco mais baixo do que o esperado para um sistema alifático (Lambert et al., 1998)

O resultado acima está de acordo com o espectro de RMN ^1H . Neste, observa-se que o grupo CH_3 produz um singlete em 1,72 ppm, enquanto o CH_2 acarreta outro singlete em 3,5 ppm.

Como o espectro de massas de Fm3 tinha relações massa/carga até 624, a única proposta razoável consistia em um peptídeo cíclico contendo apenas unidades da N-metilglicina. No entanto, como não foi possível montar tal peptídeo com massa molecular igual a 624, propôs-se que esse valor de massa/carga não deveria corresponder ao pico do íon molecular (M^{++}), mas aquele proveniente da perda de um grupo CH_3 ($\text{M}^{++} - 15$) (Lambert et al., 1998). Com isso, chegou-se à proposta para a fórmula estrutural apresentada na Figura 15.

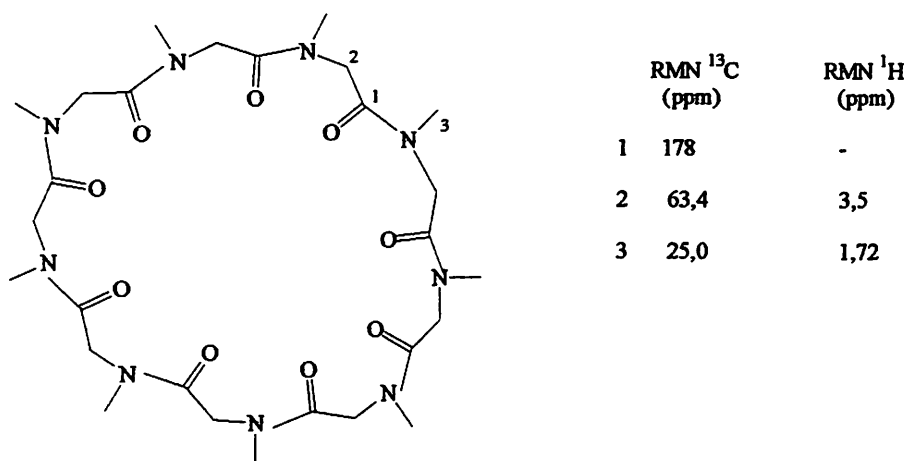


FIGURA 15 Fórmula estrutural do sólido Fm3 (ciclonona-N-metilglicina).

O espectro de infravermelho também está de acordo com a proposta acima. Observou-se uma banda em 1629 cm^{-1} que foi atribuída à carbonila de amida (Lambert et al., 1998).

Quanto ao pico em 425 (m/z), propõe-se que seja devido à perda de três unidades de aminoácido mais um átomo de hidrogênio, como demonstrado na Figura 16. Tal proposta está de acordo com Lambert et al. (1998), que citam a transferência de hidrogênio durante a quebra de peptídeos.

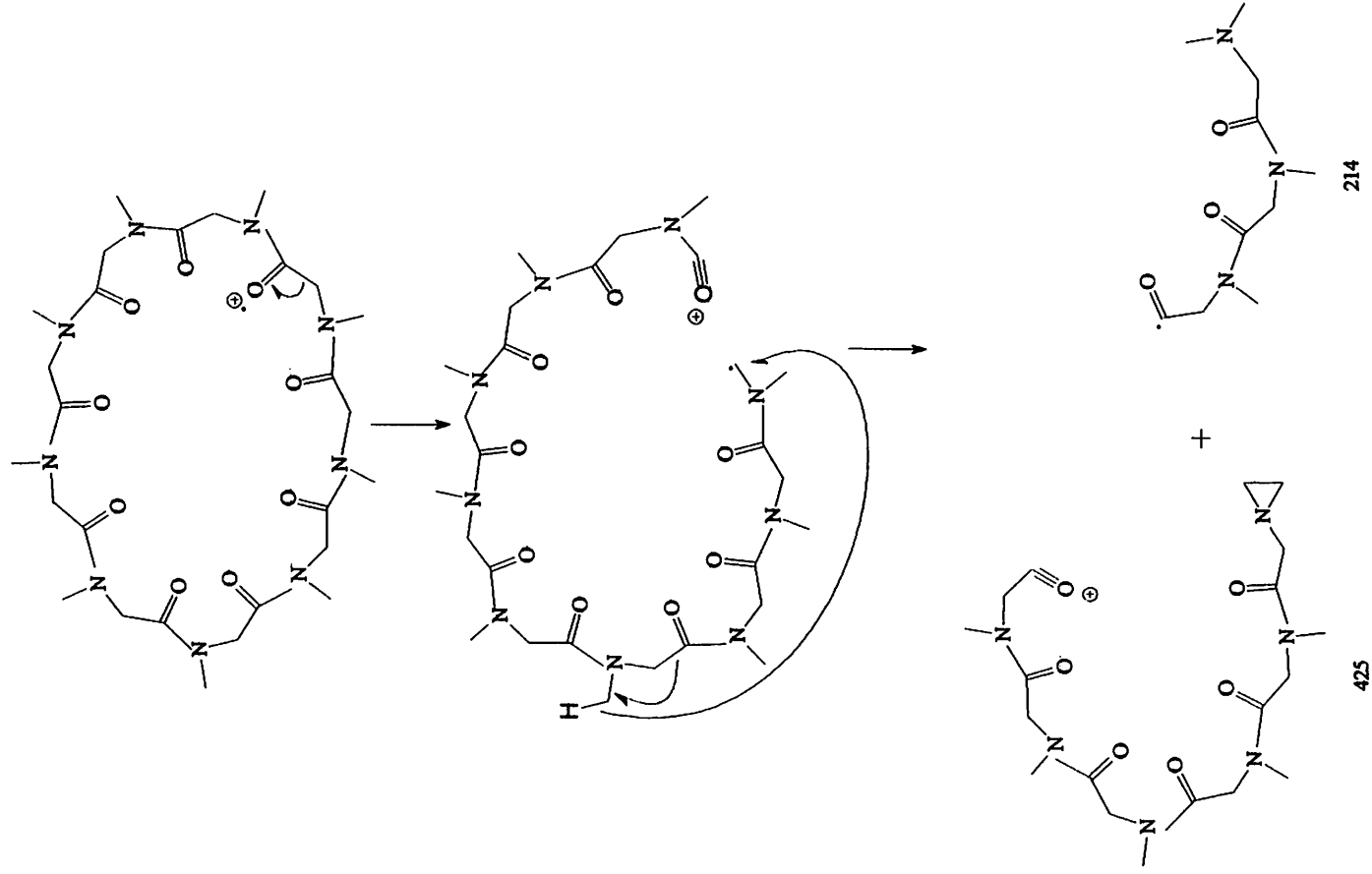


FIGURA 16 Proposta para explicar o pico a 425 (m/z) no espectro de massas de Fm3.

O sólido Fm6 também se mostrou homogêneo pela análise em cromatografia em camada fina, sendo assim, considerado puro. Da mesma forma que Fm3, esse sólido decompôs-se antes de fundir.

O sólido Fm6, ao contrário das substâncias anteriores, mostrou-se solúvel em água, o que sugere uma estrutura bastante polar.

Quanto ao espectro de infravermelho, vale destacar as bandas em 1633 cm^{-1} , que podem ser provenientes de ligações $\text{C}=\text{O}$ de grupo amida. Esta suposição está de acordo com a banda em 1109 cm^{-1} , que pode ser decorrente de ligação $\text{C}-\text{N}$. Este espectro também fornece uma banda larga em 3400 cm^{-1} , que pode ser proveniente de grupamentos $\text{O}-\text{H}$, já que este composto revelou-se muito bem com *p*-anisaldeído durante as análises por cromatografia em camada fina, o que é muito comum com os açúcares (Krebs, Heuser e Winner, 1969).

5 CONCLUSÕES

- 1- As substâncias ativas produzidas por *Paecilomyces lilacinus* e *P. variotii* são instáveis ou voláteis.
- 2- Não foi possível isolar a substância tóxica a *Meloidogyne incognita* produzida por *Fusarium* sp por meio de cromatografia em coluna de sílica.
- 3- *Cunninghamella elegans* produz uma substância com atividade nematocida, solúvel em soluções fortemente ácidas e insolúvel em H₂O, H₂O/NaOH, MeOH, AcOEt, éter etílico, diclorometano, clorofórmio, hexano, dimetilsufóxido e ácido acético.
- 4- *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* isolado 2 e *Sclerotinia sclerotiorum* produzem substâncias nematocidas de alta polaridade.
- 5- *Fusarium moniliforme* isolado 25 produz duas substâncias nematocidas, sendo que uma delas corresponde a ciclonona-N-metilglicina, um peptídeo com nove unidades de N-metilglicina.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAM, M. M.; KHAN, M. W.; SAXENA, S. K. Inhibitory effect of culture filtrates of some rhizosphere fungi of okra on the mortality and larval hatching of certain plant parasitic nematodes. *Indian Journal of Nematology*, New Delhi, v.3, p.94-98, 1973.
- ANKE, H.; ETZEL, W.; GAU, W.; HAIN, R.; KILIAN, M.; MAYER, A.; STERNER, O. New macrocyclic compound omphalotin - for control of insects, nematodes, fungi and bacteria. JP2000502250-W; DE19545463-A1; WO9720857-A1; AU9676282-A; EP865447-A1 BAYER AG (FARB) 1997. <http://dii.derwent.com>
- ANKE, H.; STADLER M.; MAYER, A.; STERNER, O. Secondary metabolites with nematocidal and antimicrobial activity from nematophagous fungi and ascomycetes. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique*, Ottawa, v. 73, p 932-939, 1995 (suplemento).
- ANKE, H.; HARDER, A.; JESCHKE, P.; KILIAN, M.; MARTINI, U.; MAYER, A.; STERNER, O.; WACHENDORFF-NEUMANN, U. New omphalotin derivatives are insecticides, acaricides and nematocides - used for pest control on crops, trees, stored produce and in the hygiene sector DE19881869-T; DE19754298-A1; WO9929714-A2; AU9920497-A BAYER AG (FARB), 1999. <http://dii.derwent.com>
- ARYA, R.; SAXENA, S. K. Effect of culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* grown on different amino acids on hatching of *Meloidogyne incognita*. *Indian Phytopathology*, New Delhi, v. 46, n. 1/4, p. 167-168, 1993.

- BARRON, G. L., Lignolytic and cellulolytic fungi as predators and parasites. In: Carrol, G. C.; Wicklow, D.T. (ed.) **The fungal community**, New York, Marcel Dekker 1992, p. 311-326.
- BARRON, G. L. The nematode-destroying fungi. **Canadian Biological Publications**, Ottawa, 1977. 140 p.
- BARRON, G. L.; THORN, R. G. Destruction of nematodes by species of *Pleurotus*. **Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique**, Ottawa, v.65 n. 4, p. 774-778. 1987.
- BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S.. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.6, p.553, 1981.
- BUHEL, E.; MARTINE, U.; MAYER, A.; ANKE, H.; STERNER, O. Omphalotins B, C and D, nematicidal cyclopeptides from *Omphalotus olearius*. Absolute configuration of omphalotin A. **Tetrahedron**, England, v.54, n.20, p.5345-5352, 1998.
- CALTON, G. J.; COBBS, C. S.; HAMMAN, J. P. Product Recovery In: PRAVE, P.; FAUST, U.; SITTING, W.; DIETER, SUKATSCH, D. A. (ed.). **Fundamentals of Biotenology**, John Wiley & Son Ltd, 1987. p. 437-445
- CAMPOS, V. P. Controle de doenças: Doenças causadas por nematóides In VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (ed.). **Controle de doenças de plantas**. Viçosa: UFV, v.1., 544p. 1997.
- CAMPOS, V.P. Implicação da sobrevivência dos nematóides em solos e raízes de plantas no controle dos fitopatógenos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.16, n.172, p.15-16, 1992.
- CAMPOS, V. P.; SIVAPALAN, P.; GNANAPRAGASAM, N.C. Nematode parasites of coffee, cocoa and ceia In: LUC. M.; SIKORA R. A.; BRIDGE, J. (ed.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford; CABI Publishing, CAB International; 1990. 629 p.

- CAYROL, J. C.; DIJAN, C.; PIJAROWSKI, L. Study of the nematocidal properties of the culture filtrate of the nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus*. *Revue Nématology*, Auburn, v.12, p.331-336, 1989.
- CHEN, S.Y.; DICKSON, D.W.; MITCHELL, D.J. Viability of Heterodera glycines exposed to fungal filtrates *Journal of Nematology*, Raleigh, v.32, n.1, p.190-197, 2000.
- CHEN, S.Y.; DICKSON, D.W. A technique for determining live second-stage juveniles of Heterodera glycines. *Journal of Nematology*, Raleigh, v.32, n.1, p.117-121, 2000
- COMSTOCK, M. J. Conference Proceedings Series In Frontiers In: *Bioprocessing II*, Boulder, Colorado. 1990.
- COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Ghent: State Agriculture Research Centre, 1972. 77 p.
- COSTA, M. J. N. da. Filtrados de culturas fúngicas e esterco animais, com ação antagonista a *Meloidogyne incognita*(Kofoid & White) Chitwood. Lavras: UFLA, 2000. 115 p. Dissertação de Mestrado em fitopatologia.
- DAHYA, J. S.; SINGH, D.P. Inhibitory effects of *Aspergillus niger* culture filtrate on mortality and hatching of larvae of *Meloidogyne* sp. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.86, nº.1, p.145-146, Jan, 1985.
- DESENBROCK, J. Isolierung und structuraufkarung neuer wirkstoffaus hoheren pilzen. Bonn, Germany: University of Bonn- Department of chemistry, 1994. (Ph.D. Thesis)
- DIJAN, C.; PIJAROWSKI, L.; PONCHET, M.; ARPIN, N.; BONVIN, F. J. Acetic acid: a selective nematocidal metabolite from culture filtrates of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson and *Trichoderma longibrachiatum* Rifai. *Nematologica*, Leiden, v.7, n.1, p.101-112, July/Dec. 1991.

- FITTERS, P. F. L.; BELDER, E.; DEN E DEN BELDER, E. A time lapse technique to study the effect of fungal products on embryogenesis of nematode eggs. **Medelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Universiteit Gent, Wageningen**, v.58, n.2B, p.751-756, 1993.
- GROB, R. L. **Chromatographic Analysis of the Environment**, 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1983. 724p.
- HALLMAN, J.; SIKORA, R. A. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soilborne plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, The Netherlands, v.102, n.2, p.155-162, 1996.
- HARBORNE, J. B.. **Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plant analysis** 3. ed. Chapman & Hall, 1998. 295 p.
- HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, Washington, v.57, n.12, p.1025-1028, 1973.
- HUTCHISON, L. J.; MADZIA, S. E.; BARRON, G. L. The presence and antifeedant function of toxin producing secretory cells on hyphae of the lawn-inhabiting agaric *Conocybe lactea*. **Canadian Journal of Botany- Revue Canadienne de Botanique**, Ottawa, v.74, n.3, p.431-434, 1996.
- JACKSON, A. M.; MCGUIRE, M. R.; LACEY, L. A.; WRAIGHT, S. P. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. **Mycology Research**, Cambridge, v.101, n.1, p.35-41, 1997.
- KAWAZU, K.; MURAKAMI, T.; ONO, Y.; KANZAKI, H.; KOBAYASHI, A.; MIKAWA, T.; YOSHIKAWA, N. Isolation and characterization of two novel nematocidal dipeptides from an imperfect fungus, strain D1084. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tottori, v.5, n.1, p.98-101, 1993.

- KERRY, B. R.; SIMONN, A.; ROVIRA, A. D. Observations on the introductions of *Verticillium chlamydosporium* and other parasitic fungi into soil for control of the cereal cyst-nematode *Heterodera avenae*. **Annals of Applied Biology**, Australia, v.105, n.3, p.509-516, 1984.
- KHAN, S.T.; KHAN, T. A. Effect of culture filtrates of soil fungi on the hatching and mortality of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). **Currenty Nematology**, Allahabad, v.3, n.1, p.53-60, 1992.
- KIMURA, Y.; NAKAHARA, S.; FUJIKOKA, S. Aspyrone, a nematocidal compound isolated from the fungus, *Aspergillus mellus*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tottori, v.60, n.8, p.1375-1376, 1996
- KWORK, O.C.H.; PLATTNER, R.; WEISLEDER. D.; WICKLOW, D.T. A nematocidal toxin from *Pleurotus ostreatus* NRRL 3526. **Journal of Chemical Ecology**, New york, v.18, n.2, p.127-136, 1991.
- KREBS, K.G.; HEUSSER, D.; WIMMEWH. Z. Spray Reagents In: STHAL E. (ed.). **Thin-Layer Cromatography- A Laboratory Handbook 2.ed**: New York, 1969.
- LAMBERT, F. ; TAYLOR, C. E. Root-knot nematodes (*Meloiodygne spp.*) systematics, biology and control. London: Academic Press:, 1979. 477 p.
- LAMBERT, J. B.; SHURVELL, H. F.; LIGHTNER, D. A.; COOKS, R. G.. Organic Structural Spectroscopy. New Jersey: Prentice Hall, 1998. 556 p.
- LORDELLO, L. G. E. Perdas causadas por nematóides. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v.51, n.3-4, 1976.
- MANKAU, R. Biocontrol: fungi as nematode control agents. **Journal of Nematology**, Raleigh, v.12, p.1- 4, Dec. 1979.
- MAYER, A.; KILIAN, M.; HOSTER, B.; STERNER, O.; ANKE, H. *In-vitro* and *in-vivo* nematocidal activities of the cyclic dodecapeptide omphalotin A **Pesticide Science**, England, v.55, n.1, p.27-30, 1999.

- MAYER, A., KOPKE, B., ANKE, H., STERNER, O. Dermatolactone, a cytotoxic fungal sesquiterpene with a novel skeleton. *Phytochemistry*, England, v.43 n.2, p.375-376, 1996.
- NITAO, J. K.; MEYER, S. L. F.; CHITWOOD, D. J. "In vitro" assays of *Meloidogyne incognita* and *Heterodera glycines* of detection of nematode-antagonistic fungal compounds. *Journal of Nematology*, Raleigh, v.31, n.2 p.172-183, 1999.
- PAREDES, R. R. Modelagem e simulação de purificação de cefalosporina C em de coluna de leito fixo, Campinas: UNICAMP, 1996. 97 p. (Dissertação de Mestrado)
- PERIN, D.D.; ARMAREGO, W. L. F. "Purification of Laboratory Chemicals", 3 ed. Oxford: Pergamon Press, 1988: 391 p.
- QUAGHEBEUEUR, K.; COOSEMANS, J.; TOPPET, S.; COMPERNOLEE, F. Cannabioci- and 8-Chlorocannabiorcichromenic acid as fungal antagonists from *Cylindrocarpom olidum*. *Phytochemistry*, England, v.37, n.1, p.159-161, 1994.
- REKHA, A.; SAXENA, S. K.; ARYA, R. Effect of culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* grown on different amino acids, on hatching of *Meloidogyne incognita*. *Indian Phytopathology*, Aligarh, v.46, n.2, p.167-168, 1993.
- RIFFLE, J. W. Effect of an *Aphelenchoides* species on growth of a mycorrhizal and a pseudomycorrhizal fungus, *Phytopathology*, Saint Paul, v.57, n.6, p.541-544, 1967.
- RIFFLE, J. W.; In Mycorrhizae: Proc. 1st North American Conference on Mycorrhizae , ed. E. Hacskaylo.USDA Forest Service Misc. Publ. 1189, Washington, D. C., p.97-113, 1971.

- SAIFULLAH, N. Nematicidal and nematostatic effect of cell-free culture filtrates of *Verticillium chlamydosporium* Goddard in vitro. *Afro Asian Journal of Nematology*, Cairo, v. 6, n.1, p.32-35, 1996.
- SHARMA, M.; SAXENA, S. K. Effect of culture filtrates of *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma viridae* on hatching of larvae of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). *Current Nematology*, Allahabad, v.3, n.1, p.61-64, 1992.
- SHRINER, R. L.; FUSON, R. C.; CURTIN, D. Y.; MORRILL, T. C. Identificação sistemática dos compostos orgânicos, 6. ed. Portland: Book News, Inc.®, 1983. 517 p.
- SIDDIQUI, Z. A.; MAHMOOD, I. Integrated control of a root-rot disease complex of chickpea by fungal filtrates and green manuring. *Nematologia Mediterranea*, Bari, v.21, n.2, p.161-164, 1993.
- SIDDIQUI, Z. A.; MAHMOOD, I. Management of *Meloidogyne incognita* race 3 and *Macrophomina phaseolina* by fungus culture filtrates and *Bacillus subtilis* in chickpea. *Fundamental and Applied Nematology*, Montrouge Cedex, v.18, n.1, p.71-76, Mar. 1994.
- STADLER, M., ANKE, H., STERNER, O. Linoleic-acid-the nematocidal principle of several nematophagous fungi and its production in trap-forming submerged cultures. *Archives of Microbiology*, New York, v.160, n.5, p.401-405, 1993
- STADLER, M.; ANKE, H.; STERNER, O. New nematocidal and antimicrobial compounds from the basidiomycetes *Cheimonophyllum candidissimum* (berk and curt) sing .l. producing organism, fermentation, isolation, and biological-activities. *Journal of Antibiotics*, Tokio, v.47, n.11, p.1284-1289, 1994.

- STADLER, M.; STERNER, O. Production of bioactive secondary metabolites in the fruit bodies of macrofungi as a response to injury. **Phytochemistry**, England, v.49, n.4, p.1013-1019, Oct. 1998.
- VADHERA, I.; SHUKLA, B. N.; BHATT, J. Interaction between reniform nematode (*Rotyleculus reniformis*) and *Fusarium solani* causing root-rot of French bean (*Phaseolus vulgaris*). **Indian Journal of Agricultural Sciences**, New Delhi, v.65, n.10, p.774-777, 1995.
- WAGNER, C. ANKE, H. STERNER, O. Rubrobramide, cytotoxic and phytotoxic metabolite from *Cladobotryum rubrobunnesens*, **Journal of Natural Products**, Washington, v.61, n.4, p.501-502, 1998.
- ZAKI, F. A. Effect of culture filtrates of *Paecilomyces lilacinus* on *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v.22, n.1, p.41-43, 1994.
- ZUKERMAN, B. M.; MATHENY, M.; ACOSTA, N. Control of plant-parasitic nematodes by a nematicidal strain of *Aspergillus niger*. **Journal of Chemical Ecology**, Wageningen, v.20, n.1, p.33-43, Aug. 1994.

ANEXOS

ANEXO A

Tabelas

Página

- 1A Resumo da análise de variância dos dados relativos ao efeito de extratos fúngicos em metanol e acetato de etila na motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*..... 58
- 2A Resumo da análise de variância dos dados relativos ao efeito das frações obtidas do precipitado A1 de filtrado de *Cumminghamella elegans* na motilidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*. 59
- 3A Resumo da análise de variância dos dados relativos ao efeito das frações obtida durante cromatografia em coluna de sílica de extrato acetato de etila do fungo *Fusarium* sp na motilidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*. 60
- 4A Resumo da análise de variância dos dados relativos ao efeito das substâncias solúveis e insolúveis em metanol/acetato de etila (1:1), oriundas de filtrados fúngicos, sobre a motilidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*..... 61

5A Resumo da análise de variância dos dados relativos ao efeito das frações solúveis e insolúveis em metanol, obtidas dos precipitados P1 dos fungos *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme* isolados 2 e 25 e *Sclerotinia sclerotiorum* na motilidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita*..... 62

6A Resumo da análise de variância dos dados relativos ao efeito das frações obtidas por cromatografia em coluna de sílica do material solúvel em metanol, oriundo do precipitado P1 de *Fusarium moniliforme* isolado 25, na motilidade e mortalidade juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*..... 63

TABELA 1A - Resumo da análise de variância dos dados relativos ao efeito de extratos fúngicos em metanol e acetato de etila na motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*.

Motilidade 24 horas					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc*
Estratos MeOH e AcOEt	9	6220.48	691.16	20.0	0.0000
Repetições	4	313.48	78.37		
Erro	36	1238.92	34.41		
Total	49	7772.88			
Média geral: 86.32	CV (%) = 6.80		DMS: 12,5		

Motilidade 48 horas					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc*
Estratos MeOH e AcOEt	9	30592.72	3399.19	4 0.7	0.00
Repetições	4	404.72	101.18		
Erro	6	3005.68	83.49		
Total	49	34003.12			
CV (%) = 11.68	Média geral: 78.24		DMS: 19,47		

Mortalidade 72 horas					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc*
Estratos MeOH e AcOEt	9	26448.32	2938.70	122.5	0.00
Repetições	4	94.32	23.60		
Erro	36	863.28	23.98		
Total	49	27405.92			
CV (%) = 6.12	Média geral: 80.04		DMS: 10,43		

* P ≤ 0,05

TABELA 2A - Resumo da análise de variância dos dados relativos ao efeito das frações obtidas do precipitado A1 de filtrado de *Cunninghamella elegans* na motilidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*.

Motilidade 24 horas					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc*
Frações	6	283.26	47.21	1.7	0.01
Repetições	6	454.12	75.68		
Erro	36	1001.87	27.82		
Total	48	1739.26			
CV (%) = 5.68		Média geral: 92.8	DMS: 8,8		

Motilidade 36 horas					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc*
Precipitados	6	45538.28	7589.71	524.2	0.0
Repetições	6	74.57	12.42		
Erro	36	521.14	14.47		
Total	48	46134.00			
CV (%) =	5.06	Média geral:	75.14	DMS: 6,34	

Motilidade 72 horas					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc*
Precipitados	6	76017.83	12669.63	266.79	0.00
Repetições	6	122.69	20.44		
Erro	36	1709.59	47.48		
Total corrigido	48	77850.12			
CV (%) =	10.53	Média geral:	65.44	DMS: 11,49	

* P ≤ 0,05

TABELA 3A - Resumo da análise de variância dos dados relativos ao efeito das frações obtida durante cromatografia em coluna de sílica de extrato acetato de etila do fungo *Fusarium* sp na motilidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*.

Motilidade 12 horas					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc*
Frações	16	379.17	23.69	2.3	0.0073
Repetições	4	120.98	30.24		
Erro	64	635.41	9.92		
Total corrigido	84	1135.57			
CV (%) =	3.35	Média geral:	94.07	DMS: 7,17	

Motilidade 24 horas					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc*
Frações	16	1273.81	79.61	5.39	0.00
Repetições	4	151.48	37.87		
Erro	64	943.71	14.74		
Total corrigido	84	2369.01			
CV (%) =	4.11	Média geral:	93.44	DMS: 8,7	

Motilidade 48 horas					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc*
Frações	16	2263.95	141.49	2.68	0.0027
Repetições	4	164.94	41.23		
Erro	64	3377.45	52.77		
Total	84	5806.35			
CV (%) =	8.46	Média geral:	85.82	DMS: 16,54	

Motilidade 72 horas					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc*
Frações	16	6509.01	406.81	4.53	0.00
Repetições	4	615.36	153.84		
Erro	64	5740.63	89.69		
Total	84	12865.01			
CV (%) =	11.63	Média geral:	81.44	DMS: 21,57	

* P ≤ 0,05

TABELA 4A - Resumo da análise de variância dos dados relativos ao efeito das substâncias solúveis e insolúveis em AcOEt/metanol (1:1), oriundas de filtrados fúngicos, sobre a motilidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*

Motilidade 24 horas					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc*
Extrato em AcOEt/MeOH	9	45595.36	5066.15	317.14	0.00
Repetições	2	9.80	4.90		
Erro	18	287.53	15.97		
Total	29	45892.70			
CV (%) = 8.34	Média geral: 47.90		DMS: 11,70		

Motilidade 48 horas					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc*
Extrato em AcOEt/MeOH	9	29394.80	3266.08	99.20	0.00
Repetições	2	290.06	145.03		
erro	18	592.60	32.922		
Total	29	30277.46			
CV (%) = 16.33	Média geral:		35.13	DMS: 16,80	

* P ≤ 0,05

TABELA 5A - Resumo da análise de variância dos dados relativos ao efeito das frações solúveis e insolúveis em metanol, obtidas dos precipitados P1 dos fungos *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme* isolados 2 e 25 e *Sclerotinia sclerotiorum* na motilidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita*.

Motilidade 24 horas					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc*
Precip. sol. e insol. em MeOH	9	31012.22	3445.80	279.66	0.00
Repetições	3	48.07	16.02		
Erro	27	332.67	12.32		
Total	39	31392.97			
CV (%) = 4.17	Média geral:		84.22	DMS: 8,5	

* P ≤ 0,05

Motilidade 48 horas					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc*
Precip. sol. e insol. em MeOH	9	29034.50	3226.05	71.96	0.00
Repetições	3	2.70	0.90		
erro	27	1210.30	44.82		
Total	39	30247.50			
CV (%) = 8.34	Média geral:		80.25	DMS: 16,28	

* P ≤ 0,05

TABELA 6A - Resumo da análise de variância dos dados relativos ao efeito das frações obtidas por cromatografia em coluna de sílica do material solúvel em metanol, oriundo do precipitado de *Fusarium moniliforme* isolado 25, na motilidade e mortalidade juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*.

Motilidade 24 horas					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc*
Frações ext. MeOH do precip.	9	3957.68	439.74	7.11	0.00
Repetições	4	491.48	122.87		
erro	36	2224.52	61.79		
Total	49	6673.68			
CV (%) = 8.36	Média geral: 94.08		DMS: 16,75		

Motilidade 36 horas					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc*
Frações ext. MeOH do precip.	9	23250.10	2583.34	42.18	0.00
Repetições	4	153.60	38.40		
erro	36	2204.80	61.24		
Total	49	25608.50			
CV (%) = 8.74	Média geral: 89.50		DMS: 16,67		

Motilidade 48 horas					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc*
Frações ext. MeOH do precip.	9	33822.02	3758.00	61.19	0.00
Repetições	4	820.52	205.13		
Erro	36	2210.68	61.40		
Total	49	36853.22			
CV (%) = 9.15	Média geral: 85.66		DMS: 16,708		

* P ≤ 0,05

Continuação Tabela 6A

Motilidade 60 horas					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc*
Frações ext. MeOH do precip.	9	58917.92	6546.43	84.04	0.00
Repetições	4	179.12	44.78		
erro	36	2804.08	77.891		
Total	49	61901.12			
CV (%) = 12.75	Média geral: 69.24		DMS: 18,80		

Mortalidade 72 horas					
Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc*
Frações ext. MeOH do precip.	9	49787.70	5531.96	59.59	0.00
Repetições	4	444.63	111.15		
Erro	36	3341.59	92.82		
Total	49	53573.93			
CV (%) = 13.25	Média geral: 72.72		DMS: 20,53		

* P ≤ 0,05

ANEXO B

Meios de cultura

Empregaram-se os códigos de uso internacional para evitar equívocos.

CZAPEK-DOX

FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01 g
KCl	0.5 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
NaNO ₃	2 g
Sacarose	30 g
Água	1000 mL

CZAPEK

FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
KCl	0,5 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
NaNO ₃	3 g
Sacarose	30 g
Água	1000 mL

PDA(POTATO-DEXTROSE- AGAR, BATATA-DEXTROSE-ÁGAR)

Batata	20 g
Glicose	20 g
Ágar	18 g
Água	1.000 mL

EXTRATO DE MALTE

Extrato de malte	20 g
Água	1000 m L

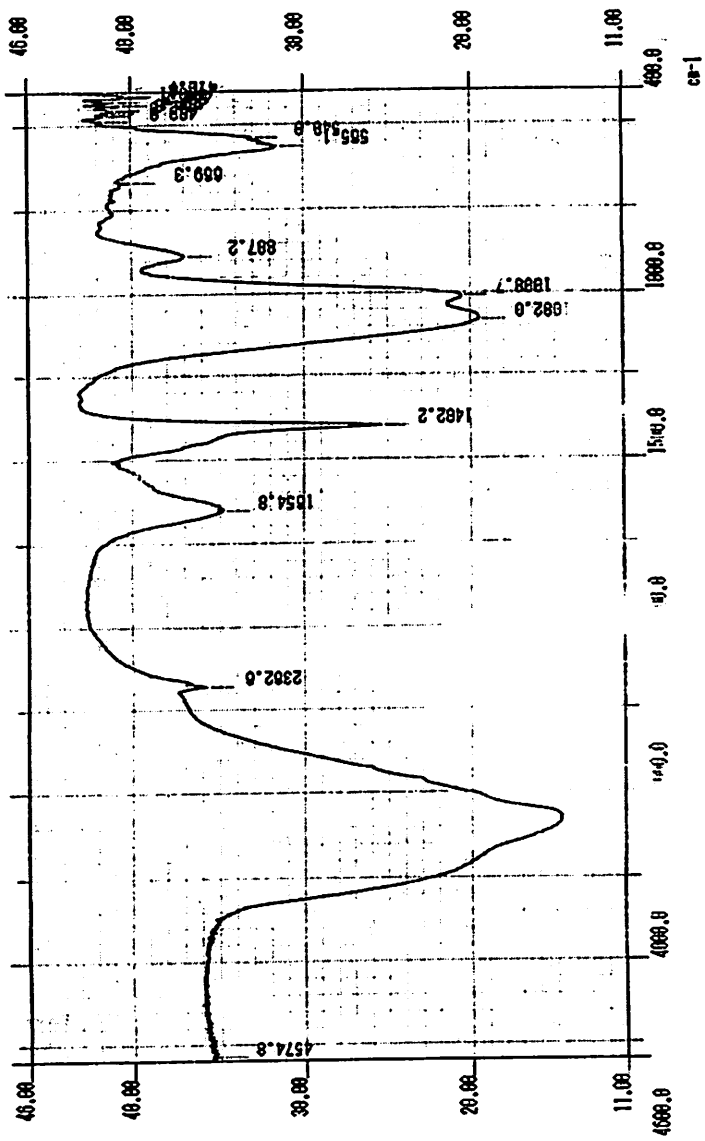
RICHARD SOLUTION

FeCl ₂	0,02 g
KH ₂ PO ₄	5 g
KNO ₃	10 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,5 g
Sucrose	50 g
Água	1.000 mL

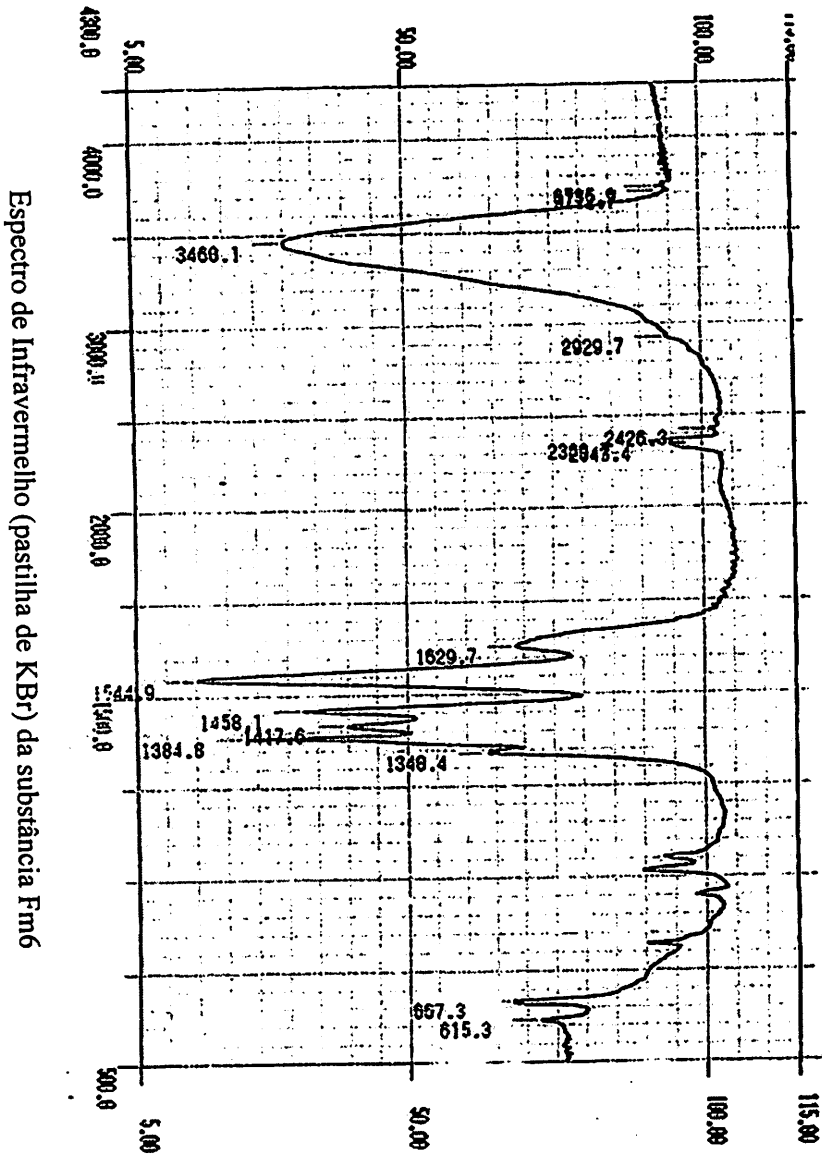
ANEXO C

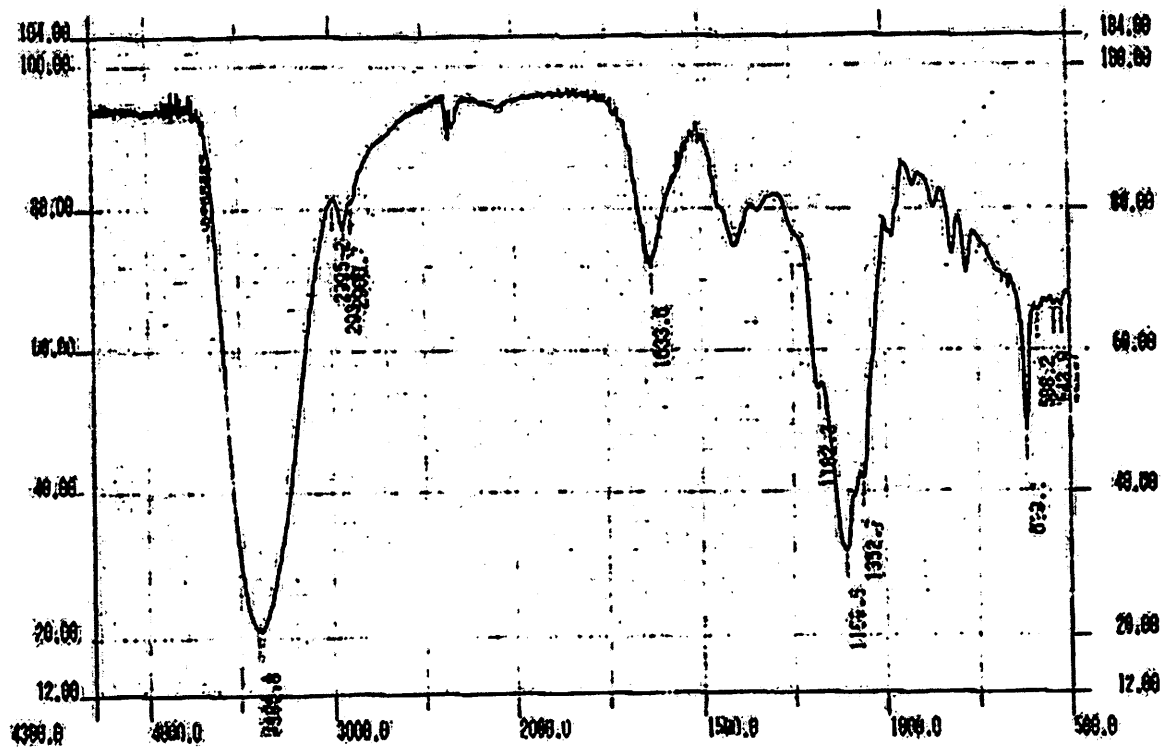
Espectros das substâncias purificadas

Espectro de Infravermelho (pastilha de KBr) da substância A2	66
Espectro de Infravermelho (pastilha de KBr) da substância Fm6	67
Espectro de Infravermelho (pastilha de KBr) da substância Fm3	68
Espectro de massas da substância Fm3	69
Espectro de RMN ^1H (DMSO, 300 MHz) da substância Fm3	70
Espectro de RMN ^{13}C (DMSO, 75 MHz) da substância Fm3	71
DEPT 90° (DMSO, 75 MHz) da substância Fm3	72

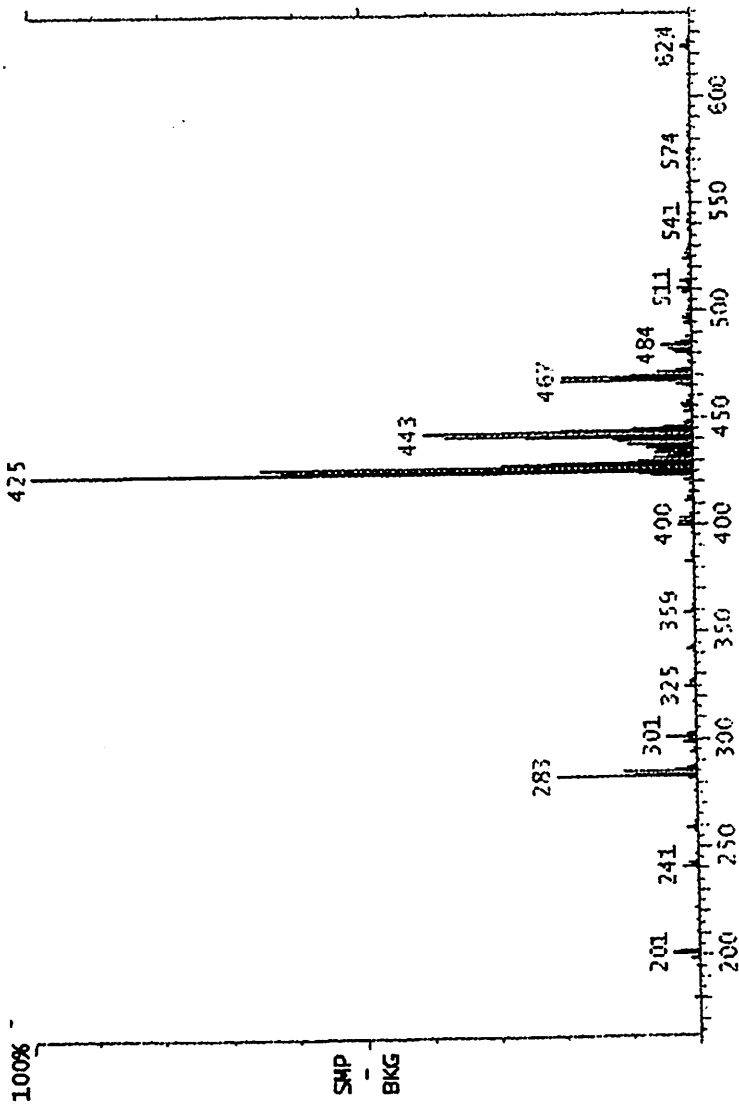


Espectro de Infravermelho (pastilha de KBr) da substância A2

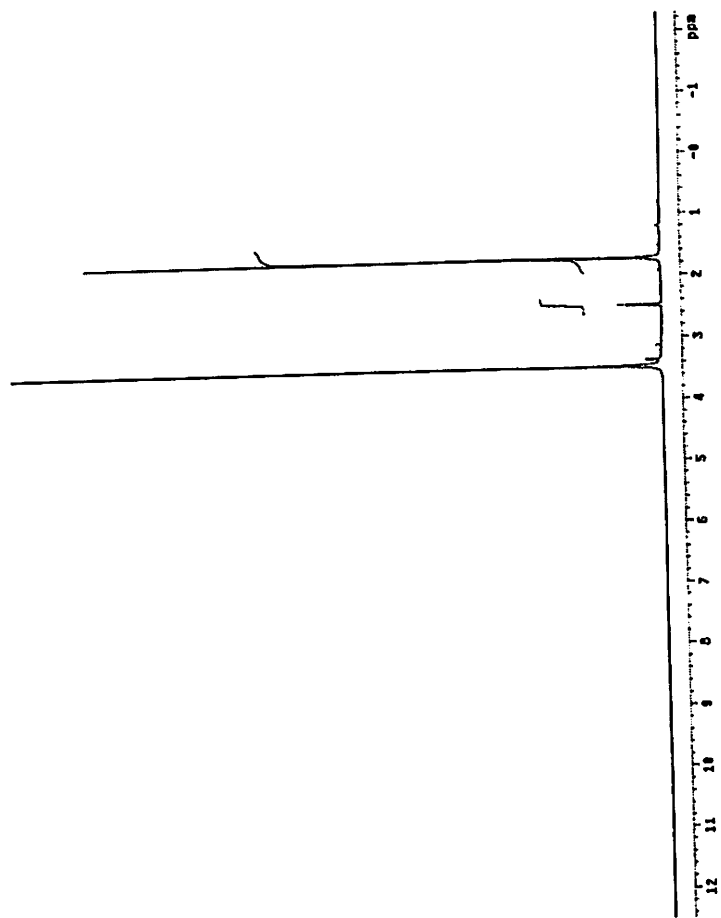




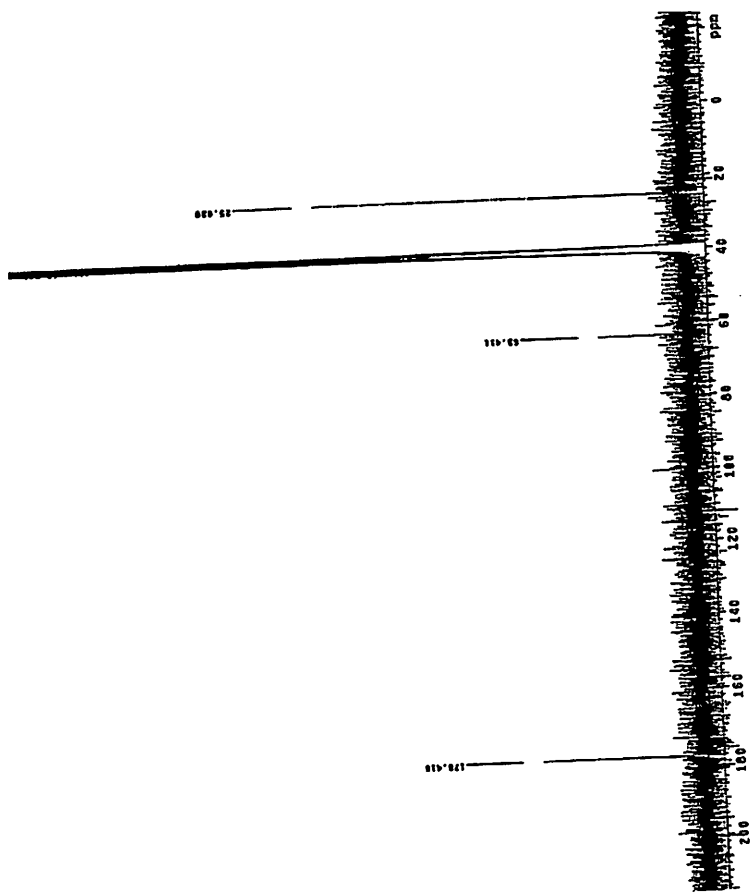
Espectro de Infravermelho (pastilha de KBr) da substância Fm3



Espectro de massas da substância Fm3



Espectro de ^1H (DMSO, 300 MHz) da substância Fm3



Espectro de ^{13}C RMN (DMSO, 75 MHz) da substância Fm3



DEPT 90° (DMSO, 75 MHz) da substância Fm3