

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**

**EFICÁCIA DE EXTRATOS PIROLENHOSOS DE CANA-  
DE-AÇÚCAR (*Saccharum officinarum* L.) E EUCALIPTO  
(*Eucalyptus* spp.) NO CONTROLE  
*in vitro* DE PATÓGENOS DA SOJA**

**SUELEN PIETA**

**DOURADOS  
MATO GROSSO DO SUL  
2017**

**EFICÁCIA DE EXTRATOS PIROLENHOSOS DE CANA-DE-  
AÇÚCAR (*Saccharum officinarum* L.) E EUCALIPTO (*Eucalyptus*  
spp.) NO CONTROLE  
*in vitro* DE PATÓGENOS DA SOJA**

SUELEN PIETA  
Engenheira agrônoma

Orientador: PROF. Ph. D. WALBER LUIZ GAVASSONI

Co-orientadora: PROF. DR<sup>a</sup>. LILIAN MARIA ARRUDA BACCHI

Co-orientador: PROF. DR. RODRIGO APARECIDO JORDAN

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Dourados  
Mato Grosso do Sul  
2017

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

P613e Pieta, Suelen.  
Eficácia de extratos pirolenhosos de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) e eucalipto (*Eucalyptus* spp.) no controle *in vitro* de patógenos da soja. / Suelen Pieta. – Dourados, MS : UFGD, 2017.  
59f.

Orientador: Prof. Ph. D. Walber Luiz Gavassoni.  
Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. *Glycine max*. 2. Ácido pirolenhoso. 3. Bio-óleo. I.  
Título.

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.**

**©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.**

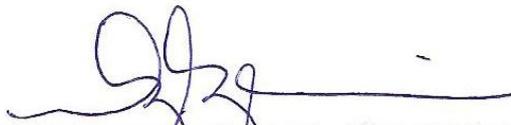
EFICÁCIA DE EXTRATOS PIROLENHOSOS DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum officinarum* L.) E EUCALIPTO (*Eucalyptus* spp.) NO CONTROLE *in vitro* DE PATÓGENOS DE SOJA

por

Suelen Pieta

Dissertação apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de MESTRE EM AGRONOMIA

Aprovada em: 08/02/2017



---

Dr. Walber Luiz Gavassoni  
Orientador - UFGD/FCA



---

Dra. Maria do Carmo Vieira  
UFGD/FCA



---

Dr. Heber Ferreira dos Reis  
AGRAER

**DEDICO**

A Deus

Aos meus pais Silvia e Elton

Meus avós Pedro, Edite, Mauricio e Loivi

Meu noivo Ricardo

Minha tia Dionara.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre comigo, iluminando e guiando meu caminho.  
Agradeço também por ele ter colocado pessoas tão especiais a meu lado.

À Universidade Federal da Grande Dourados, pela oportunidade de realização desta pesquisa.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro e científico.

Ao meu orientador Prof. Dr. Walber Luiz Gavassoni, pela sua orientação, confiança e oportunidade.

À Prof. Dr<sup>a</sup> Lilian Maria Arruda Bacchi e Prof. Dr. Rodrigo Aparecido Jordan, pela co-orientação, apoio e colaboração em todos os momentos.

À empresa Bioware Tecnologia, pelo fornecimento dos extratos.

Aos meus pais Silvia e Elton, pelo amor incondicional, apoio e incentivo.

Aos meus avós Pedro, Edite, Maurício e Loivi, por todos os conselhos e carinho.

Ao meu noivo Ricardo, por sempre estar ao meu lado me apoiando e incentivando. Por todo seu amor e compreensão.

À minha tia Dionara, pelo carinho e conselhos.

Aos meus amigos Jerusa, Cassia, Bruno, Paulo, Jaqueline, Cláudia, Gabrielli, Anderson e Pedro, pela amizade, companheirismo, ideias, disposição e colaboração nas atividades desenvolvidas.

À minha amiga Francine Talia Panisson, por todo o carinho e estímulo.

Aos meus professores do Instituto Federal do Paraná, Prof. Dr<sup>a</sup> Natasha Akemi Hamada, Prof. Me. Frank Silvano Lagos, Prof. Dr<sup>a</sup> Silvia Leticia Zanmaria e Prof. Dr<sup>a</sup> Patricia Cambrussi Bortolini, por contribuírem na minha formação e por incentivarem meu instinto de pesquisadora.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado.

## SUMÁRIO

	PÁGINA
<b>RESUMO</b> .....	XIII
<b>ABSTRACT</b> .....	XIV
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1 Doenças na cultura da soja .....	3
2.2 Extrato pirolenhoso .....	7
2.2.1 Pirólise.....	11
2.2.2 Coleta do extrato em forno artesanal.....	11
2.2.3 Eliminação do alcatrão e outras impurezas .....	12
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	13
3.1 Obtenção dos extratos pirolenhosos .....	13
3.2 Solução estoque .....	13
3.3 Teste de solidificação do meio batata-dextrose-ágar (BDA).....	13
3.4 Obtenção, multiplicação e manutenção dos isolados fúngicos .....	14
3.4.1 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Sclerotium rolfsii</i> .....	14
3.4.2 <i>Macrophomina phaseolina</i> e <i>Colletotrichum truncatum</i> .....	14
3.5 Produção de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	15
3.6 Produção de escleródios de <i>Sclerotium rolfsii</i> .....	15
3.7 Avaliação da eficácia dos extratos pirolenhosos de cana-de-açúcar e eucalipto no controle <i>in vitro</i> de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Macrophomina phaseolina</i> e <i>Colletotrichum truncatum</i> .....	16
3.8 Avaliação da germinação carpogênica de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> sob o extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar .....	18

3.9 Avaliação da eficácia do extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar na inibição do desenvolvimento micelial em diferentes formas de inóculo de <i>Sclerotium rolfsii</i> .....	18
3.10 Análise estatística .....	19
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	20
4.1 Avaliação da eficácia dos extratos pirolenhosos de cana-de-açúcar e eucalipto no controle <i>in vitro</i> de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Macrophomina phaseolina</i> e <i>Colletotrichum truncatum</i> .....	20
4.2 Avaliação da eficácia do extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar na inibição do desenvolvimento micelial em diferentes formas de inóculo de <i>Sclerotium rolfsii</i> .....	42
4.3 Avaliação da germinação carpogênica de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> sob o extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar .....	52
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	59
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	60

## LISTA DE QUADROS

PÁGINA

QUADRO 1. Caracterização de extrato pirolenhoso pela Associação de Produtores de Agricultura Natural (APAN).....	10
QUADRO 2. Concentração do extrato pirolenhoso, volumes da solução estoque e meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA).....	16
QUADRO 3. Inibição do crescimento fúngico (%) na primeira avaliação, submetidos a diferentes concentrações do extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar ( <i>Saccharum officinarum</i> ), Dourados-MS, 2016.....	39
QUADRO 4. Inibição do crescimento fúngico (%) na última avaliação, submetidos a diferentes concentrações do extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar ( <i>Saccharum officinarum</i> ), Dourados-MS, 2016.....	39
QUADRO 5. Inibição do crescimento fúngico (%) na primeira avaliação, submetidos a diferentes concentrações do extrato pirolenhoso de eucalipto ( <i>Eucalyptus</i> spp.), Dourados-MS, 2016.....	40
QUADRO 6. Inibição do crescimento fúngico (%) na última avaliação, submetidos a diferentes concentrações do extrato pirolenhoso de eucalipto ( <i>Eucalyptus</i> spp.), Dourados-MS, 2016.....	40

## LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

- FIGURA 1. Crescimento micelial (mm) do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), avaliados por 48 e 72 horas, Dourados-MS, 2016. .... 20
- FIGURA 2. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), avaliados por 48 e 72 horas, Dourados-MS, 2016..... 21
- FIGURA 3. Crescimento micelial (mm) do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de eucalipto (*Eucalyptus* spp.), avaliados por 24 e 48 horas, Dourados-MS, 2016. .... 22
- FIGURA 4. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de eucalipto (*Eucalyptus* spp.), avaliados por 24 e 48 horas, Dourados-MS, 2016..... 23
- FIGURA 5. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de eucalipto (*Eucalyptus* spp.), Dourados-MS, 2016. .... 24
- FIGURA 6. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), Dourados-MS, 2016. .... 25
- FIGURA 7. Crescimento micelial (mm) do fungo *Macrophomina phaseolina* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), avaliados por 48 e 72 horas, Dourados-MS, 2016. .... 26
- FIGURA 8. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo *Macrophomina phaseolina* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), Dourados-MS, 2016. .... 27

- FIGURA 9. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do fungo *Macrophomina phaseolina* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), avaliados por 48 e 72 horas, Dourados-MS, 2016. .... 28
- FIGURA 10. Crescimento micelial (mm) do fungo *Macrophomina phaseolina* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de eucalipto (*Eucalyptus* spp.), avaliados por 24, 48 e 72 horas, Dourados-MS, 2016. .... 29
- FIGURA 11. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo *Macrophomina phaseolina* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de eucalipto (*Eucalyptus* spp.), Dourados-MS, 2016. .... 30
- FIGURA 12. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do fungo *Macrophomina phaseolina* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de eucalipto (*Eucalyptus* spp.), avaliados por 24, 48 e 72 horas, Dourados-MS, 2016. .... 31
- FIGURA 13. Crescimento micelial (mm) do fungo *Colletotrichum truncatum* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), avaliados por 48, 72, 96 e 120 horas, Dourados-MS, 2016. .... 32
- FIGURA 14. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do fungo sob *Colletotrichum truncatum* influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), avaliados por 48, 72, 96 e 120 horas, Dourados-MS, 2016. .... 33
- FIGURA 15. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo *Colletotrichum truncatum* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), Dourados-MS, 2016. .... 34
- FIGURA 16. Crescimento micelial (mm) do fungo *Colletotrichum truncatum* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de eucalipto (*Eucalyptus* spp.), avaliados por 24, 48, 72 e 96 horas, Dourados-MS, 2016. .... 35
- FIGURA 17. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do fungo *Colletotrichum truncatum* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de eucalipto (*Eucalyptus* spp.), avaliados por 24, 48, 72 e 96 horas, Dourados-MS, 2016. .... 36

- FIGURA 18. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo *Colletotrichum truncatum* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de eucalipto (*Eucalyptus* spp.), Dourados-MS, 2016. .... 37
- FIGURA 19. Crescimento micelial (mm) do fungo *Sclerotium rolfsii* a partir de discos de micélio sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), avaliados por 48, 72, 96 e 120 horas, Dourados-MS, 2016. .... 43
- FIGURA 20. Desenvolvimento radial do fungo *Sclerotium rolfsii* a partir de discos de micélio sob meio batata-dextrose-ágar (BDA) (0 ppm) e desenvolvimento apical na concentração de 5000 pmm de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), período de avaliação 72 horas, Dourados-MS, 2016. .... 44
- FIGURA 21. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do fungo *Sclerotium rolfsii* a partir de discos de micélio sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), avaliados por 48, 72, 96 e 120 horas, Dourados-MS, 2016. .... 45
- FIGURA 22. Aspecto geral do crescimento micelial *in vitro* dos discos de micélio de *Sclerotium rolfsii* na presença de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), no terceiro período de avaliação (96 horas), Dourados-MS, 2016. .... 46
- FIGURA 23. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo *Sclerotium rolfsii* a partir de discos de micélio sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), Dourados-MS, 2016. .... 47
- FIGURA 24. Crescimento micelial (mm) do fungo *Sclerotium rolfsii* a partir de escleródios sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), avaliados por 48, 72, 96 e 120 horas, Dourados-MS, 2016. .... 48
- FIGURA 25. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do fungo *Sclerotium rolfsii* a partir de escleródios sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), avaliados por 48, 72, 96 e 120 horas, Dourados-MS, 2016. .... 49

- FIGURA 26. Aspecto geral do crescimento micelial *in vitro* do fungo *Sclerotium rolfsii* a partir de escleródios na presença de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), no terceiro período de avaliação (96 horas), Dourados-MS, 2016..... 50
- FIGURA 27. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo *Sclerotium rolfsii* a partir de escleródios sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), Dourados-MS, 2016. .... 52
- FIGURA 28. Porcentagem de escleródios germinados com formação de apotécios sob efeito de diferentes concentrações do extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), Dourados-MS, 2016..... 53
- FIGURA 29. Número de estipes formadas por escleródio sob efeito de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), Dourados-MS, 2016. .... 54
- FIGURA 30. Número de apotécios formados por escleródio sob efeito de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), Dourados-MS, 2016. .... 55
- FIGURA 31. Estipes com ramificações em escleródios submetidos à concentração de 5000 ppm de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar nos diferentes períodos de avaliação após a instalação do experimento (DAI), Dourados-MS, 2016. .... 56
- FIGURA 32. Germinação carpogênica de escleródios de *Sclerotina sclerotiorum*, aos 56 dias após a instalação do experimento (DAI), submetidos a diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar, Dourados-MS, 2016..... 57

**EFICÁCIA DE EXTRATOS PIROLENHOSOS DE CANA-DE-AÇÚCAR  
(*Saccharum officinarum* L. ) E EUCALIPTO (*Eucalyptus* spp.) NO CONTROLE  
*in vitro* DE PATÓGENOS DA SOJA**

**RESUMO:** O Brasil é segundo maior produtor mundial de soja [*Glycine max* (L.) Merr.], que possui grande importância no mercado pela expressiva participação no contexto socioeconômico do País. Perdas na produção ocorrem devido ao ataque de patógenos de etiologias variadas, destacando-se o mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), antracnose (*Colletotrichum truncatum*), podridão de carvão (*Macrophomina phaseolina*) e a murcha de *Sclerotium* (*Sclerotium rolfsii*). O presente estudo teve por objetivo avaliar a eficácia dos extratos pirolenhosos (EP) de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e eucalipto (*Eucalyptus* spp.) em diferentes concentrações no controle *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum truncatum* e *Sclerotium rolfsii*. Os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos e seis repetições para cada patógeno. As concentrações testadas foram 0, 1000, 2000, 3000, 4000 e 5000 ppm, avaliando-se o crescimento micelial em milímetros (mm), índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM), inibição do crescimento (%) para as quatro espécies de fungos e a germinação carpogênica para *Sclerotinia sclerotiorum*. O EP de eucalipto nas concentrações de 1000, 2000 e 3000 ppm favoreceu o desenvolvimento micelial do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. As concentrações de 4000 e 5000 ppm, para ambos os extratos, apresentaram atividade antifúngica. Os extratos, em geral, apresentaram fungitoxicidade nas diferentes concentrações e o efeito foi maior nas primeiras horas de contato com o fungo. Para o crescimento e velocidade de crescimento micelial houve redução à medida que se elevaram as doses. Na germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*, o EP de cana-de-açúcar na concentração de 5000 ppm promoveu redução na porcentagem de escleródios germinados. O EP dificultou e modificou o desenvolvimento de estipes, conseqüentemente, reduziu a formação de apotécios.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Glycine max*, ácido pirolenhoso, bio-óleo.

**EFFICACY OF SUGAR-CANE (*Saccharum officinarum*) AND EUCALYPTUS  
(*Eucalyptus* spp.) PYROLIGNEOUS EXTRACT *in vitro* CONTROL OF  
SOYBEAN PATHOGENS**

**ABSTRACT:** Brazil is the third largest soybean producer in the world [*Glycine max* (L.) Merr.], which has great importance in business because of its significant participation in the socioeconomic context of the country. Production losses occur due to the attack of pathogens from different kinds of etiologies, highlighting the white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*), anthracnose (*Colletotrichum truncatum*), charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) and Sclerotium wilt (*Sclerotium rolfsii*). This study aimed to evaluate the efficacy of pyroligneous extracts (PE) of sugarcane (*Saccharum officinarum*) and eucalyptus (*Eucalyptus* spp.) in different concentrations for the *in vitro* control of *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum truncatum* and *Sclerotium rolfsii*. The experiments were conducted in a completely randomized design with six treatments and six repetitions for each pathogen. The concentrations 0, 1000, 2000, 3000, 4000 and 5000 ppm were tested in order to evaluate mycelial growth in millimeters (mm), mycelial growth rate index (IVCM), growth inhibition (%) for the four species of Fungi and carpogenic germination for *Sclerotinia sclerotiorum*. The eucalyptus PE at concentrations of 1000, 2000 and 3000 ppm favored the mycelial development of the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. For both extracts, concentrations of 4000 and 5000 ppm showed antifungal activity. The extracts, in general, presented fungitoxicity at different concentrations and the effect was higher in the first hours of contact with the fungus. Growth and mycelial growth velocity decreased as the doses increased. In the carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum*, sugarcane PE at 5000 ppm promoted a reduction in the percentage of germinated sclerotia. The PE hindered and modified the development of stapes and consequently reduced the formation of apothecia. *In vivo* research should be performed in order to prove the efficacy of the PE, assessing the responses when there is environmental interaction in the field.

**KEY-WORDS:** *Glycine max*, pyroligneous acid, bio-oil.

## 1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merr.] é uma cultura de grande importância para o mercado brasileiro devido à expressiva participação no contexto socioeconômico do País. O Brasil é segundo maior produtor mundial de soja e os índices de produção são destaque no cenário agrícola internacional (PRANDO, 2014).

A soja é uma das oleaginosas mais produzidas e consumidas mundialmente (CARVALHO et al., 2012). Esse fato se justifica pela importância do produto tanto para o consumo animal, por meio do farelo da soja, quanto para o consumo humano, com o óleo (SILVA et al., 2011). De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), no primeiro levantamento da safra 2016/17, há projeção de crescimento de 6,7 a 9% na produção, podendo atingir de 101,8 a 104 milhões de toneladas (CONAB, 2016).

Das limitações impostas à produção de soja, as doenças se apresentam como uma das principais ameaças à cultura. A importância econômica de cada doença varia de acordo com o ano e região, dependendo das condições climáticas de cada safra (GOMES, 2014). As perdas anuais de produção por doenças são estimadas em 15% a 20%, entretanto, algumas podem ocasionar perdas de 100% (EMBRAPA, 2011).

Dentre as doenças que atacam a cultura da soja, afetando hastes, vagens e sementes, interferindo na produtividade, destacam-se o mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) e a antracnose (*Colletotrichum truncatum*) (HENNING, 2009). As doenças radiculares como a podridão de carvão (*Macrophomina phaseolina*) e a murcha de *Sclerotium* (*Sclerotium rolfsii*), são doenças que também ocasionam perdas na produção (GRIGOLLI, 2014).

Como forma de controle das doenças, novas tecnologias têm sido estudadas e desenvolvidas. Dentre essas tecnologias, os produtos oriundos de fontes renováveis são alternativas promissoras. Um produto com grande potencial de exploração originado de fontes renováveis (madeira) é o carvão vegetal. Porém, durante o processo de produção do carvão, a queima da madeira libera gases que contribuem para a poluição ambiental (SILVEIRA, 2010).

O Brasil é o maior produtor mundial de carvão vegetal e as carbonizações normalmente são efetuadas sem a recuperação dos gases. Através da recuperação e da condensação dos gases voláteis, além de se obter o produto carvão vegetal, há

possibilidade de aproveitamento do seu subproduto, o extrato pirolenhoso (EP), também chamado de ácido pirolenhoso ou vinagre da madeira, que, dependendo das características, pode representar alto valor agregado (SOUZA JUNIOR e KUPPER, 2013). O EP é composto por uma parte ácida (extrato ácido ou pirolenhoso) e uma parte composta por hidrocarbonetos aromáticos, o chamado alcatrão (VIERA et al., 2014).

Devido sua atividade antimicrobiana e a crescente necessidade da substituição dos agroquímicos, a utilização do EP vem sendo estudada para a melhoria da produtividade na área agrícola (JUNG, 2007). O extrato possui ação fungicida, nematicida e também pode ser utilizado como fertilizante orgânico. Apesar dos efeitos preconizados, existe escassez de informações científicas que possam dar suporte à utilização deste produto e à compreensão dos mecanismos pelos quais funciona, especialmente no que se refere à proteção das plantas contra doenças de grande importância econômica (ALVES et al., 2007).

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia de diferentes concentrações dos extratos pirolenhosos da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e do eucalipto (*Eucalyptus* spp.) no desenvolvimento *in vitro* dos fungos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum truncatum* e *Sclerotium rolfsii*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Doenças na cultura da soja

A soja é uma cultura de grande importância econômica para o Brasil. Ao longo dos anos, a produção brasileira apresentou um avanço, impulsionada não somente pelo aumento de área semeada, mas também pela melhoria na aplicação de técnicas de manejo avançadas que permitiram o aumento na produtividade (FREITAS, 2011). De acordo com a CONAB (2016) há expectativa de incremento de área para o cultivo nas principais regiões produtoras em razão da maior liquidez e rentabilidade. Contudo, a expansão da cultura vem sendo acompanhada pelo aumento do ataque de doenças, um dos principais fatores que limitam a sua produtividade (ANDRADE et al., 2016). A Organização Mundial para Alimentação e Agricultura (FAO) estima que os fitopatógenos são responsáveis por 13,3% de perdas na produção agrícola e merecem atenção especial, devido às dificuldades para o diagnóstico correto das doenças e dos danos provocados às culturas (KREYCI e MENTEN, 2013).

Aproximadamente quarenta patógenos atacam a cultura da soja. Dentre os patógenos estão os fungos, vírus, nematoides e bactérias, todos capazes de acarretar grandes perdas na produção e com perspectivas de aumento da incidência a cada safra pela expansão das áreas de cultivo da soja e da monocultura. Os impactos financeiros destas doenças variam de ano para ano em função das regiões e das condições climáticas, pois sua incidência pode se dar de modo restrito, esporádico ou generalizado (ABAG, 2015).

O mofo branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, é uma das doenças que afeta a cultura da soja e interfere diretamente na sua produtividade. A incidência desse patógeno acarreta danos expressivos na produção e na qualidade dos grãos, podendo atingir perdas de até 80% (CUNHA, 2010). É uma doença de importância para a cultura da soja em muitas regiões do Centro-Sul do Brasil. Isto se deve principalmente à alta precipitação pluvial durante a safra, aliada a temperaturas amenas, rotação de culturas com espécies altamente suscetíveis e ao uso de sementes contaminadas (GARCIA et al., 2012).

*Sclerotinia sclerotiorum* pertence ao filo Ascomycota, classe Discomycetes, ordem Helotiales e família Sclerotiniaceae. É um fungo polífago e ataca 408 espécies de plantas dentro de 278 gêneros e 75 famílias. Patógeno muito agressivo, causa

sintomas em diversas partes da planta (AGRIOS, 2004). Na soja, os sintomas ocorrem geralmente no terço médio, atingindo a haste principal, pecíolos, folhas e vagens (BUENO, 2004; LEITE, 2005). Os primeiros sintomas são manchas aquosas que evoluem para coloração castanho-clara e logo desenvolvem abundante formação de micélio branco e denso. Ocasionalmente, nas folhas, podem ser observados sintomas de murcha e seca. A fase mais vulnerável da planta vai do estágio da floração plena ao início da formação das vagens (EMBRAPA, 2011).

O controle de *S. sclerotiorum* é dificultado devido à formação de estruturas de resistência, permitindo a sua sobrevivência no solo por longos períodos, sendo em média de 6 a 8 anos (SILVA et al., 2011). A estrutura de resistência denominada escleródio, é uma massa negra e rígida com tamanho variável, e é produzida no interior e na superfície dos tecidos colonizados, retornando ao solo com os restos culturais. Os escleródios são compostos por múltiplas hifas agregadas e são desenvolvidos em três fases: inicialmente ocorre à agregação das hifas, posteriormente, o desenvolvimento é em relação ao tamanho, com a exsudação de gotículas na sua superfície, em seguida vem a maturação, com o delineamento e deposição de melanina, seguido da consolidação interna. A melanina promove a proteção dos escleródios e reduz a permeabilidade dos mesmos (AGRIOS, 2004).

Os escleródios desempenham papel importante no ciclo de vida do fungo, pois sob condições favoráveis e na presença de hospedeiro suscetível, o escleródio germina e produz micélio (germinação miceliogênica), penetrando diretamente nos tecidos da base da planta, ou forma apotécios (germinação carpogênica), que emergem na superfície do solo e liberam os ascósporos (inóculo primário). Ambos podem resultar em infecções nas plantas, porém, o maior potencial epidêmico é verificado pelos ascósporos liberados na germinação carpogênica. A ocorrência da germinação é determinada pelos fatores ambientais, como temperatura, umidade e luminosidade. A germinação carpogênica ocorre em condições de alta umidade relativa, acima 70%, e temperatura de 20°C, com a liberação dos ascósporos. Para germinação miceliogênica, a temperatura ótima para o desenvolvimento do micélio situa-se entre 18°C e 25°C (LEITE, 2005; BOLTON et al., 2006; VENTUROSIO, 2012). A disseminação do patógeno, a longas distâncias, ocorre principalmente via semente, através de escleródios misturados a elas ou de micélio existente nos tecidos internos (HENNEBERG et al., 2012).

Outra doença comum em áreas onde se cultiva a soja é a podridão negra das raízes ou podridão de carvão, causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi)

Goidanish. É uma espécie polífaga, capaz de infectar mais de 500 culturas econômicas. O fungo pertence ao filo Ascomycota, classe Coelomycetes, ordem Spharopsidales e família Botryosphaeriaceae (AMBRÓSIO, 2003).

O fungo é habitante natural dos solos e causa o apodrecimento de raízes e morte das plantas. Os danos são variáveis conforme o ano, sendo mais severos em anos secos, quando ocorrem veranicos e, especialmente, em solos compactados ou rasos, que dificultam a penetração das raízes (HENNING, 2009). As condições ambientais que favorecem a ocorrência da doença incluem altas temperaturas e baixa umidade do solo (LINHARES et al., 2016).

A persistência dos fungos habitantes de raízes e de solo na ausência de hospedeiro ou em condições ambientais desfavoráveis é comumente prolongada pela formação de estruturas de resistência. *Macrophomina phaseolina* sobrevive na forma de microescleródios (principal fonte de inóculo), multicelulares e de tamanho variável, produzidos em grande número no tecido hospedeiro infectado. Os microescleródios são produzidos a partir do micélio, consistindo uma estrutura dura e resistente a condições adversas. São facilmente encontrados sob a epiderme das raízes ou na camada externa do córtex e na região do colo da planta. Pela decomposição dos tecidos, os microescleródios são liberados no solo e, quando em contato com a região do colo ou da raiz da planta, germinam e infectam as raízes (VIANA e SOUZA, 2002). A longevidade das estruturas de resistência tende a diminuir com o tempo no solo e, quando úmidos, a sobrevivência é reduzida, devido à baixa oxigenação (EMBRAPA, 2011).

Os sintomas variam de acordo com a idade da planta no momento da infecção. Quando ocorre durante a emergência, causa lesões de coloração marrom-escura na região do colo. Com baixa umidade do solo e alta temperatura, a infecção é mais severa. As plantas infectadas ocorrem aleatoriamente nas fileiras ou em reboleiras, em decorrência da desuniformidade de distribuição dos microescleródios no solo. Após a infecção inicial, as plantas vão apresentar sintomas de amarelecimento na época de formação de vagens, similar à maturação normal. O amarelecimento é progressivo, levando à murcha. As folhas permanecem aderidas, porém ficam caídas ao longo das hastes, posteriormente, tornam-se secas e de coloração marrom-escura. Nessas plantas as raízes apresentam a epiderme solta, deixando à mostra os microescleródios. Quando esses estão incrustados na camada externa do córtex é comum se ver a medula com micélio cotonoso e escuro (ALMEIDA et al., 2014).

Uma das principais doenças da soja é a antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum truncatum* (Schw.) Andrus & Moore. A infecção nos ramos e nas vagens, em anos com condições climáticas favoráveis à doença, diminui o rendimento da cultura, podendo causar perda total na produção em função da alta redução do número de vagens (EMBRAPA, 2011).

Todos os estádios de desenvolvimento da cultura são afetados pela doença, podendo causar morte de plântulas, necrose nos pecíolos e manchas marrons de formato irregular nas folhas, hastes e vagens. Em condições de alta umidade e altas temperaturas (28 a 34°C), pode ocorrer o apodrecimento e a queda das vagens, abertura das vagens imaturas e germinação dos grãos em formação. As vagens infectadas adquirem coloração castanho-escura a negra, ficando retorcidas. Além das vagens, o patógeno infecta a haste e outras partes da planta (GALLI et al., 2007; EMBRAPA, 2011). O fungo também pode causar infecção nas sementes, tornando-as o principal veículo de disseminação e introdução da doença em novas áreas de cultivo, além de causar uma redução considerável da sua germinação. As sementes infectadas apresentam manchas deprimidas de coloração castanho-escura. Quando o fungo é transmitido pela semente, os primeiros sintomas são observados durante a germinação, causando tombamento em pré ou pós-emergência. Nos cotilédones das plântulas que emergem, aparecem lesões necróticas deprimidas de cor cinza a negra, podendo ocasionar a morte da plântula (BARROS, 2008).

Embora o fungo consiga sobreviver em outros hospedeiros as duas principais fontes de inóculo da antracnose são as sementes e os restos culturais, agravando ainda mais a sua ocorrência (PESQUEIRA, 2013). As fontes de inóculo para ciclos secundários de infecção são os conídios produzidos em acérvulos quando o fungo está na fase anamórfica e os ascósporos nos peritécios, na fase teleomórfica. As sementes infectadas são o principal veículo para disseminar esses patógenos a longas distâncias (BARROS, 2008).

O fungo *Sclerotium rolfsii* Sacc. é um importante fitopatógeno habitante do solo, responsável por podridões do colo e raízes, murcha e tombamento de plântulas em inúmeras espécies economicamente importantes, dentre elas, a soja (AULER et al., 2013). Pertencem ao filo Basidiomycota, classe Agaricomycetes, ordem Atheliales e a família Atheliaceae. Apresenta extensa gama de hospedeiros, cerca de 200 espécies pertencentes a quase 100 famílias botânicas, incluindo dicotiledôneas e

monocotiledôneas, distribuindo-se em todas as regiões agrícolas do Brasil (MARCUIZZO e SCHULLER, 2014).

Este fungo é caracterizado pela produção de micélio vigoroso. O diagnóstico da doença é feito pelos sintomas na planta hospedeira que apresenta lesões marrons e aquosas no colo e, através do crescimento micelial branco, com a formação de esclerócios (PACHECO, 2012).

*Sclerotium rolfsii* é um patógeno de difícil controle pela formação dos escleródios, os quais se apresentam globosos, pequenos, com 0,5-1,5 mm de diâmetro e coloração branca a castanha (AGRIOS, 2004). Os escleródios são formados por uma massa compactada e melanizada de micélio, possuindo capacidade de sobreviver por longos períodos no solo em condições adversas. A sobrevivência do fungo também ocorre através do micélio em matéria orgânica. Condições de temperaturas e umidades do ar elevadas favorecem o desenvolvimento e a sobrevivência do patógeno (AULER et al., 2013).

## 2.2 Extrato pirolenhoso

Produto de origem natural, derivado dos extratos de fumaça, conhecido como extrato pirolenhoso (EP), ácido pirolenhoso, vinagre de madeira, licor pirolenhoso, fumaça líquida e bio-óleo. É um subproduto obtido a partir da produção do carvão vegetal, resultante da condensação dos vapores sob a forma de fumos, originados durante o processo de pirólise lenta. Apresenta-se como um líquido translúcido, de coloração amarela a marrom, com odor amadeirado (ENGASP, 2014).

A fabricação do EP é muito antiga. Existem relatos da sua utilização para embalsamar múmias no Egito Antigo e, na Índia e na China, foram atribuídos poderes medicinais para curar doenças. Na Europa, no século XVII, já havia destilação seca de madeira para produção de alcatrão, com aproveitamento do líquido pirolenhoso. A produção em larga escala teve início na Inglaterra em 1813, onde o produto era utilizado na coloração do linho (CAMPOS, 2007).

As primeiras pesquisas sobre o EP iniciaram no Japão e as publicações de resultados são datadas em 1874. Em 1893, as pesquisas experimentais visavam à construção de fornos e técnicas de obtenção de óleo de terebentina e alcatrão. Após a Segunda Guerra Mundial, iniciou-se o uso de EP na agricultura. Em 1945, foi lançado o

primeiro livro intitulado: “Fabricação e Utilização do Extrato Pirolenhoso”, por Tatsujiro Fukuda, apresentando relatos do produto, sua eficiência na cultura do arroz, no combate a pragas e na utilização nos processos de compostagem e esterilização (ENGASP, 2014).

Em documento de 1987, da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação, o EP bruto foi descrito como um condensado cru composto principalmente de água. Descrevem-no como líquido corrosivo, nocivo e altamente poluente. As recomendações técnicas para a sua produção devem ser seguidas de forma a evitar alta concentração de alcatrão e outros compostos tóxicos, os quais inviabilizam o produto para utilização na agricultura (CAMPOS, 2007).

De acordo com a instrução normativa - MAPA Nº 25, de 23 de Julho de 2009 (BRASIL, 2009) o EP é classificado como agente quelante e complexante orgânico e aditivo estabilizante autorizado para fertilizantes orgânicos e organominerais (MENECALE, 2013).

Pode ser obtido de diferentes espécies vegetais, como bambu, eucalipto, pinus e cana-de-açúcar. É composto por água em sua maior parte (80%) e uma mistura complexa de mais de 200 compostos orgânicos, como ácido acético, álcoois, cetonas, ésteres, furanos, fenol, guaicol, siringol, pirocatecol e seus derivados (MAEKAWA, 2002). A composição caracteriza-se em função da espécie utilizada e da temperatura com que o material é submetido durante o processo de fabricação. A temperatura pode inibir ou ativar compostos bioativos e assim influenciar na composição e na qualidade do produto (SILVEIRA, 2010).

A biomassa consiste em grande parte de celulose, hemicelulose e lignina, biopolímeros complexos que são submetidos a várias transformações com o aumento da temperatura. A grande maioria dos extratos pirolenhosos constitui-se de ácidos, especialmente o ácido acético. Em temperaturas acima de 180°C, o complexo de celulose, hemicelulose e polímeros de lignina se rompem, liberando uma mistura de gases não condensáveis e vapores condensáveis (MENECALE, 2013). Os compostos fenólicos e seus derivados são geralmente formados pela degradação da lignina enquanto os ácidos acéticos, metanol, aldeídos e cetonas se originam a partir da hemicelulose. Geralmente, a quantidade de compostos fenólicos aumenta com o aumento da temperatura de pirólise (ALMEIDA, 2012; KARTAL et al., 2004 ). Porém, em condições de altas temperaturas, o produto principal é o carvão vegetal e o EP

coletado possui grande quantidade de alcatrão, não recomendado para utilização na agricultura (SILVEIRA, 2010).

Wei et al. (2010) avaliaram os constituintes do ácido pirolenhoso obtido em três intervalos de temperatura, 90-230°C, 230-370°C e 370-450°C. Os componentes químicos do ácido pirolenhoso coletados na temperatura de 230 a 370°C foram os que mostraram a maior atividade antimicrobiana. Cinquenta compostos foram encontrados no ácido pirolenhoso coletado nesta faixa de temperatura, sendo ácidos orgânicos, fenóis, cetonas, furanos e derivados de pirano, outros com menor conteúdo foram álcoois, ésteres e compostos nitrogenados. Os fenóis e os ácidos orgânicos representaram 63,46% dos constituintes totais detectados.

Estudo realizado por Higashino et al. (2005), em um total de 551 amostras de EP, as proporções e a reprodutibilidade dos constituintes do extrato produzido por método de destilação controlada mostraram 15 compostos padrão. Os resultados sugerem a possibilidade de estabelecer uma especificação oficial para a produção de EP destilado, possibilitando maior controle de qualidade associada à faixa de temperatura para sua obtenção.

Vieira et al. (2014) realizaram a caracterização química do EP proveniente da carbonização de madeira da espécie *Eucalyptus grandis* em um forno tipo mufla. Pela análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), os autores identificaram a presença de ácidos orgânicos e compostos fenólicos que são componentes característicos do extrato. Os mais abundantes foram guaiacol, cresol e siringol, pelo fato do material utilizado como fonte para o preparo do extrato ter sido proveniente do eucalipto, apresentando altas concentrações de ligninas. Os resultados indicam que a formação dessas substâncias deve-se a decomposição térmica da lignina em altas temperaturas, ou seja, superiores a 300°C.

Os principais países produtores de extrato pirolenhoso são o Japão, China, Indonésia, Malásia, Brasil e Chile, incluindo outros no Sudeste Asiático e na América do Sul (CAMPOS, 2007).

Até o momento, não existe controle de qualidade para a produção dos extratos pirolenhosos, não há definições na especificação dos componentes e, principalmente, na tecnologia utilizada. Porém, algumas condições básicas são determinadas pela Associação de Produtores de Agricultura Natural (APAN), como a densidade, pH, acidez, cor, transparência, entre outras características (Quadro 1). As normas aplicam-se a extratos pirolenhosos oriundos de fornos de carbonização de madeira ou bambu, feitos

de barro ou de tijolos, coletados processados e comercializados sob orientação da APAN, visando melhorar a qualidade do produto disponibilizado ao mercado consumidor.

**QUADRO 1.** Caracterização de extrato pirolenhoso pela Associação de Produtores de Agricultura Natural (APAN)

CARACTERÍSTICAS	EXTRATO PIROLENHOSO	
	DECANTADO	DESTILADO
pH	3,5 +- 1,2	3,0 +- 0,4
Densidade	1,007 ~ 1,020	1,002 ~ 1,010
Acidez (%)	2,9 ~ 6,0	1,5 ~ 3,0
Cor	Amarelo claro a vermelho achocolatado	Incolor
Transparência	Transparente, sem material em suspensão	Transparente, sem material em suspensão
Condutividade elétrica (mS/cm)	> 3,0	-
Teor de açúcar (°Brix)	> 3,0	-
Temperatura de coleta- fumaça (°C) (saída chaminé)	80 ~ 120	80 ~ 120
Condição de decantação (após coleta)	Acima de 6 meses	Acima de 6 meses
Matéria prima carbonização (tempo de estocagem após corte)	Dentro de 6 meses	Dentro de 6 meses

Fonte: APAN, 1990.

O EP pode ser utilizado para diversos fins na agricultura, tais como esterilizante, desinfectante do solo e do ambiente, possuindo propriedades anti-sépticas, inseticida, fungicida, nematocida, bactericida e herbicida. Além disso, há estudos realizados em países como o Brasil, Japão e China que demonstram os efeitos benéficos da utilização do extrato no aumento do açúcar nos frutos, tornando-se um aditivo de alimentos. Os exemplos referidos nos estudos relatam a sua utilização como fertilizante orgânico em culturas de arroz, sorgo, melão e batata-doce, ambas culturas existentes nos países acima descritos. Do mesmo modo, o extrato é utilizado na composição de adubos orgânicos e na compostagem e, em alguns casos, na pulverização de hortaliças e de frutos, tornando-os mais vigorosos quer no tamanho e no sabor como na cor e na durabilidade (ENGASP, 2014).

### 2.2.1 Pirólise

Pirólise é a decomposição térmica de materiais contendo carbono na ausência parcial ou total de oxigênio. É um processo constituído por uma série de reações químicas e físicas. Através do calor, a estrutura molecular da biomassa é fracionada, liberando os compostos de carbono na forma sólida, líquida e gasosa, que poderão ser utilizados como combustíveis ou insumos químicos (ALMEIDA, 2012). A fase sólida constitui o carvão vegetal, a gasosa, compreende os gases voláteis não condensáveis e a líquida é designada como a fração pirolenhosa, o bio-óleo. Este subproduto líquido é subdividido em uma parte ácida (extrato ácido ou pirolenhoso) e uma parte composta por hidrocarbonetos aromáticos, o chamado alcatrão (VIERA et al., 2014). A proporção relativa das fases varia em função da temperatura do processo, da espécie da madeira e do tipo de equipamento empregado na produção (CAMPOS, 2007).

A pirólise recebe diferentes denominações dependendo das condições utilizadas. Na pirólise lenta, ou carbonização, são empregadas baixas temperaturas (inferior a 500°C) e longos tempos de residência favorecendo a produção de carvão vegetal, como ocorre nos fornos de alvenaria. A pirólise rápida é considerada um processo avançado, onde se controla todos os parâmetros do processo (indústria), obtendo elevadas quantidades de líquidos. As temperaturas utilizadas neste caso variam entre 550°C e 650°C, processo conduzido para obtenção de elevados rendimentos de bio-óleo. Para esse tipo de pirólise, observa-se um melhor rendimento na recuperação de carvão e gás, baixo impacto ambiental e aplicabilidade do bio-óleo em escala industrial (ALMEIDA, 2008; GOMEZ et al., 2003).

### 2.2.2 Coleta do extrato em forno artesanal

Para coleta do extrato, em forno artesanal, deve-se atentar para a temperatura das chaminés e a coloração da fumaça. Quando a cor inicial da fumaça for branca opaca, significa que a quantidade de água presente no líquido é alta, desta forma a coleta do EP deve ser evitada. Após a mudança de cor da fumaça para amarela acinzentada clara, deve-se iniciar a coleta. Nesse momento, o líquido obtido possui menor teor de água e pouca quantidade de alcatrão (CAMPOS, 2007).

Segundo Miyasaka et al. (1999), no Brasil, a produção de EP tem como recomendação a observação da temperatura nos 5 cm abaixo do topo no interior da chaminé, que deve estar em torno de 85 a 90°C para início da coleta. Porém, quando as temperaturas estiverem acima de 160°C, deve-se encerrar o processo. Em condições de altas temperaturas, o produto principal é o carvão vegetal e o EP coletado possui grande quantidade de alcatrão (SILVEIRA, 2010).

### 2.2.3 Eliminação do alcatrão e outras impurezas

A partir do líquido pirolenhoso, pelo processo de decantação ou destilação, é separado o alcatrão e o bio-óleo, obtendo-se o extrato pirolenhoso livre de toxicidade e pronto para ser usado na agricultura (ALMEIDA, 2012). O líquido deve ser mantido por um período de 3 a 6 meses em repouso, para que ocorra a decantação das impurezas. Após este período, o líquido ficará separado em três camadas distintas, sendo a primeira camada (10%) composta por óleos vegetais e água, a segunda (60 a 75%) o líquido pirolenhoso e a terceira (20-30%) o alcatrão. Posteriormente à decantação, pode ser realizada a filtração e/ou também a destilação do extrato pirolenhoso, para purificação do produto (CAMPOS, 2007).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia (LAMAF), da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA), da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) e conduzidos em diferentes períodos, entre abril de 2015 e setembro de 2016.

#### 3.1 Obtenção dos extratos pirolenhosos

Os extratos pirolenhosos (EPS) destilados de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) foram fornecidos pela empresa Bioware Tecnologia de Campinas-SP. Os frascos contendo os EPS, após devidamente identificados, foram armazenados no laboratório em condições de temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

#### 3.2 Solução estoque

Por questões de praticidade e minimização de erro foram preparadas soluções estoques de cada EP. As soluções foram feitas de modo a obter-se uma concentração de 200.000 ppm. Cada extrato foi dissolvido em um béquer contendo água destilada e esterilizada, na proporção de 20 mL de extrato pirolenhoso para 80 mL de água. A partir dessas soluções estoques foram retiradas alíquotas para instalação dos experimentos.

#### 3.3 Teste de solidificação do meio batata-dextrose-ágar (BDA)

Foram conduzidos testes preliminares para determinar se os EPS comprometeriam a solidificação do BDA, meio de cultura que seria utilizado nos experimentos. A partir da solução estoque de concentração de 200.000 ppm, 5 mL foram transferidos para 195 mL de meio BDA fundente, correspondendo à concentração de 5.000 ppm, a maior utilizada no experimento. Posteriormente, o meio foi vertido em placas de Petri para verificação da sua solidificação.

### 3.4 Obtenção, multiplicação e manutenção dos isolados fúngicos

#### 3.4.1 *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii*

O inóculo do patógeno *S. sclerotiorum* foi obtido em área naturalmente infestada da Fazenda Experimental de Ciências Agrárias (FAECA), da UFGD, em área cultivada com cártamo (*Carthamus tinctorius* L.). Escleródios foram removidos de plantas de cártamo e armazenados em refrigerador a 5°C. Os escleródios de *S. rolfsii* foram coletados no Horto de Produção e Pós-Colheita de Hortaliças FCA-UFGD. Foram retirados da cultura de mandioquinha salsa (*Arracacia xanthorrhiza*) e armazenados sob refrigeração a 5°C.

Para multiplicação, os escleródios de ambos os patógenos foram desinfestados superficialmente em solução de álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio a 1% por 2 minutos, seguido por lavagem em água destilada e esterilizada por mais 1 minuto. Posteriormente, os escleródios foram transferidos para placas de Petri estéreis e descartáveis com 80 mm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA. As placas foram vedadas com filme PVC e levadas à câmara de incubação do tipo BOD (demanda bioquímica de oxigênio) à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas durante cinco dias.

Após germinação miceliogênica, para obtenção de colônias puras, discos de micélio da margem das colônias foram retirados e transferidos para novas placas de Petri contendo meio BDA. As placas permaneceram incubadas novamente por cinco dias. Após esse período, para armazenamento do isolado, discos de micélios com aproximadamente 5 mm de diâmetro foram retirados das bordas das placas e acondicionados em microtubos do tipo eppendorfs (2 mL) contendo óleo mineral previamente esterilizado. Em cada microtubo foram acondicionados cinco discos de micélio. Posteriormente, os mesmos foram identificados e armazenados em refrigerador a 5°C. Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar.

#### 3.4.2 *Macrophomina phaseolina* e *Colletotrichum truncatum*

Isolados de *M. phaseolina* e *C. truncatum* foram obtidos da micoteca do LAMAF-FCA-UFGD.

Para multiplicação dos patógenos, discos de micélios das colônias armazenadas na micoteca foram transferidos para placas de Petri, descartáveis e esterilizadas, contendo meio de cultura BDA. As placas foram vedadas, identificadas e incubadas em câmara BOD, submetidas a fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25°C. Após cinco dias de incubação, para armazenamento dos isolados, discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram retirados das bordas das colônias e transferidos para *eppendorfs* (2 mL) contendo óleo mineral esterilizado. Foram depositados cinco discos de micélio por microtubo. Após a identificação, os mesmos foram acondicionados em refrigerador a 5°C. Os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar.

### 3.5 Produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*

Para avaliação da germinação carpogênica de escleródios, houve a necessidade de produzir tais estruturas. Os escleródios foram produzidos pela produção massal em discos de cenouras esterilizados em autoclave (120°C/1atm/30min) (NASSER et al., 1995).

Primeiramente, o patógeno foi cultivado em placas de Petri contendo meio BDA. Após o período de 5 dias de incubação, foi repicado para erlenmeyers de 500 mL contendo discos de cenoura em camadas previamente esterilizados. Após a repicagem, para a completa colonização do substrato e formação de escleródios, os frascos foram incubados a 25°C, em escuro pleno, por aproximadamente 40 dias. Posteriormente ao período de incubação, os escleródios produzidos foram coletados em peneira de 40 “mesh” (abertura de 0,42 mm) e em seguida lavados em água corrente, secos em temperatura ambiente e armazenados a 5°C até o momento da instalação dos experimentos.

### 3.6 Produção de escleródios de *Sclerotium rolfsii*

Os escleródios de *S. rolfsii* foram obtidos de maneira artificial, com a produção induzida a partir de um escleródio. No centro de placas de Petri contendo meio BDA, um escleródio foi alocado, as placas foram vedadas e acondicionadas por 10 dias em câmara de crescimento do tipo BOD a 25° C e fotoperíodo de 12 horas. Após a produção dos escleródios, com auxílio de pinças, os mesmos foram recolhidos das

placas, secos em temperatura ambiente, por dois dias, e armazenados em refrigerador a 5°C.

### 3.7 Avaliação da eficácia dos extratos pirolenhosos de cana-de-açúcar e eucalipto no controle *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina* e *Colletotrichum truncatum*

Para a avaliação da eficácia dos EPS de cana-de-açúcar e eucalipto no controle *in vitro* de *S. sclerotiorum*, *M. phaseolina* e *C. truncatum* foram utilizados discos de micélios das colônias dos patógenos.

Os experimentos foram realizados separadamente e em períodos diferentes para avaliação de cada extrato. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com seis repetições e seis tratamentos para cada patógeno. As concentrações testadas foram 0, 1000, 2000, 3000, 4000 e 5000 ppm. Para a testemunha, utilizou-se apenas o meio de cultura BDA.

A partir das soluções estoques, com uma pipeta automática, foram retirados os diferentes volumes das soluções adicionando-as no meio de cultura BDA fundente (Quadro 2). Realizou-se a homogeneização por 3 minutos com auxílio de um bastão de vidro. Posteriormente, os meios foram vertidos em placas de Petri descartáveis estéreis de 80 cm de diâmetro. Após a solidificação do meio, discos de micélios (5 mm) de colônias puras dos isolados, previamente incubadas em meio BDA (por três dias para *S. sclerotiorum* e por cinco dias *M. phaseolina* e *C. truncatum*) foram transferidos para o centro das placas, as quais foram vedadas com filme PVC e incubadas em câmara BOD à temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 12 horas. Todos os procedimentos foram realizados em ambiente asséptico, na câmara de fluxo laminar.

**QUADRO 2.** Concentração do extrato pirolenhoso, volumes da solução estoque e meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA)

Concentração do extrato pirolenhoso (ppm)	Solução estoque (mL)	Meio de cultura BDA (mL)
0	0	400
1000	2	398
2000	4	396
3000	6	394
4000	8	392
5000	10	390

As avaliações iniciaram a partir do momento em que a testemunha de cada patógeno apresentou crescimento micelial. No experimento com o extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar, para os três patógenos, as avaliações iniciaram 48 horas após a implantação e foram realizadas diariamente. Para *S. sclerotiorum* e *M. phaseolina*, as avaliações foram encerradas no momento em que os tratamentos testemunha atingiram as bordas das placas, 72 horas após a implantação. Para *C. truncatum*, as avaliações encerram 120 horas após a implantação. No experimento com o extrato pirolenhoso de eucalipto, para os três patógenos, as avaliações iniciaram 24 horas após a implantação do experimento, encerrando após 48 horas para *S. sclerotiorum*, 96 horas para *M. phaseolina* e 120 horas para *C. truncatum*.

Na avaliação do crescimento micelial, foram realizadas medições do diâmetro das colônias (média de duas medidas diametralmente opostas) usando paquímetro digital. Os valores obtidos do crescimento micelial foram utilizados para o cálculo do IVCM (índice de velocidade de crescimento micelial), conforme Oliveira (1991). Este índice foi determinado através da equação:

$$IVCM = \sum (D - D_a) / N$$

Sendo:

D= diâmetro médio atual da colônia;

D<sub>a</sub>= diâmetro médio da colônia do dia anterior;

N= número de dias após a inoculação.

A inibição do crescimento do patógeno (%) foi obtida pela relação do diâmetro médio, em cm, entre as colônias sob os tratamentos e a testemunha, pela fórmula:

$$PIC = [(diâmetro da testemunha - diâmetro do tratamento) / diâmetro da testemunha] \times 100.$$

### 3.8 Avaliação da germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* sob o extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar

Na avaliação da germinação carpogênica em meio com extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar, os tratamentos constaram das mesmas concentrações testadas nos ensaios de inibição de crescimento micelial (0, 1000, 2000, 3000, 4000 e 5000 ppm).

Os escleródios foram selecionados por tamanho e separados em seis grupos, cada um com 120 escleródios. Padronizou-se o tamanho dos escleródios dentro de cada grupo. Os escleródios foram desinfestados superficialmente em solução de álcool a 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio a 1% por 2 minutos, seguido por lavagem em água destilada e autoclavada por mais 1 minuto. As estruturas de resistência foram secas em papel filtro estéril.

Os diferentes volumes do EP de cana-de-açúcar foram retirados a partir da solução estoque com auxílio de uma pipeta automática, e adicionados ao meio ágar-água fundente. Foi realizada a homogeneização com bastão de vidro por 3 minutos e, em seguida, o meio foi vertido em caixas tipo gerbox previamente desinfestadas. Após a solidificação do meio, 20 escleródios foram distribuídos de forma equidistante em cada caixa. As mesmas foram vedadas com filme plástico PVC e incubadas a 18°C com fotoperíodo de 12 horas.

As avaliações iniciaram a partir da emissão de estipes na testemunha, 39 dias após a implantação do experimento. Foram quantificados o número total de escleródios com emissão de estipes e apotécios, total de escleródios com emissão de estipes e o total de escleródios com apotécios formados (germinação carpogênica). As avaliações foram encerradas quando a germinação dos escleródios foi estabilizada.

### 3.9 Avaliação da eficácia do extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar na inibição do desenvolvimento micelial em diferentes formas de inóculo de *Sclerotium rolfsii*

Para avaliar o desenvolvimento micelial a partir de diferentes formas de inóculo de *S. rolfsii* sob a ação do extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar, foram realizados dois experimentos, simultaneamente, sendo um, utilizando discos de micélio do patógeno e o outro, escleródio.

As concentrações de extrato utilizadas foram 1000, 2000, 3000, 4000 e 5000 ppm e, para testemunha, utilizou-se apenas o meio de cultura. Nos dois experimentos, o

delineamento foi inteiramente casualizado com seis repetições. Utilizou-se um disco de micélio ou um escleródio por repetição.

No primeiro experimento, os escleródios produzidos nas placas de Petri foram submetidos à assepsia conforme descrito em 3.4.1. Após desinfestação cada escleródio foi alocado no centro das placas de Petri, descartáveis e estéreis com 80 mm de diâmetro, contendo 10 mL do meio de cultura BDA com adição do extrato pirolenhoso nas devidas concentrações. No segundo experimento, discos de micélio das bordas das colônias obtidas do isolamento foram transferidos para o centro das placas de Petri contendo o meio BDA juntamente com o extrato nas mesmas concentrações. As placas foram vedadas com filme plástico PVC, identificadas e acondicionadas em câmara do tipo BOD à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas.

Após 24 horas da incubação, o desenvolvimento fúngico foi avaliado medindo-se o diâmetro da colônia (média de duas medidas diametralmente opostas na placa), com auxílio de um paquímetro digital, durante quatro dias. A partir dos resultados obtidos foram avaliados o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), o crescimento micelial médio por diâmetro e a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC).

### 3.10 Análise estatística

Foi realizada análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey, com o auxílio do programa SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2003). Constatada a significância pelo teste F, a análise de regressão foi realizada para o fator concentração para cada tempo de avaliação, dias após início da incubação, com o programa SigmaPlot 12.5. Os dados expressos em porcentagem foram transformados em arco seno da  $\sqrt{(x+1)}/100$  e os demais em  $\sqrt{x+1}$ , para análise de variância. Para comparação do efeito das concentrações dos extratos nos patógenos foi utilizado o programa Assistat 7.7 beta. Para todas as medidas analisadas o intervalo de confiança foi considerado 5%.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação da eficácia dos extratos pirolenhosos de cana-de-açúcar e eucalipto no controle *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina* e *Colletotrichum truncatum*

Concentrações crescentes de extratos pirolenhosos de cana-de-açúcar e eucalipto afetaram negativamente o desenvolvimento dos fungos *S. sclerotiorum*, *M. phaseolina* e *Colletotrichum truncatum* (Figura 1). Na análise de variância, houve diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre as concentrações dos extratos para o controle do desenvolvimento dos patógenos.

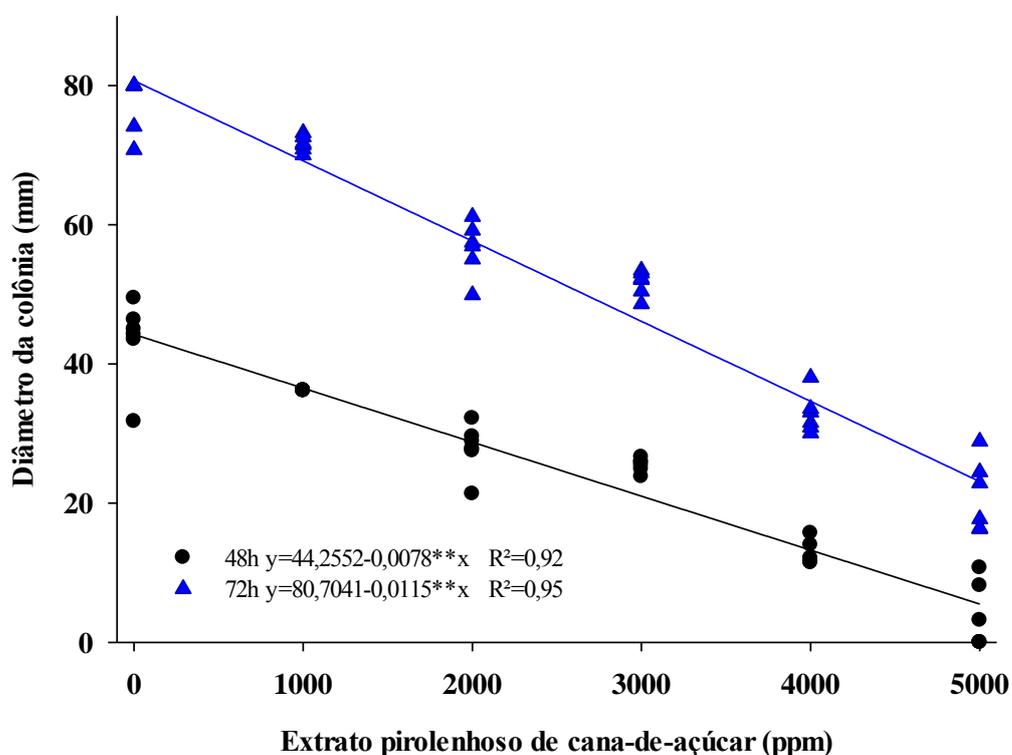


FIGURA 1. Crescimento micelial (mm) do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), avaliados por 48 e 72 horas. Dourados-MS, UFGD, 2016.

Foram realizados dois períodos de avaliações, 48 e 72 horas após incubação. Verificou-se que o extrato promoveu redução linear sobre o diâmetro das colônias com o aumento das concentrações. Todas as concentrações testadas do EP de cana-de-açúcar

limitaram o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*. Observou-se que, mesmo a partir da menor concentração, 1000 ppm, houve inibição de 16,0% e 7,0% em relação à testemunha, para o primeiro e segundo período de avaliação, respectivamente. A maior porcentagem de inibição do patógeno foi de 91,0%, na primeira avaliação após incubação (48 horas), submetidos à concentração de 5000 ppm (Figura 2). No período de 72 horas, os tratamentos de 4000 e 5000 ppm não diferiram estatisticamente entre si para a inibição do desenvolvimento fúngico.

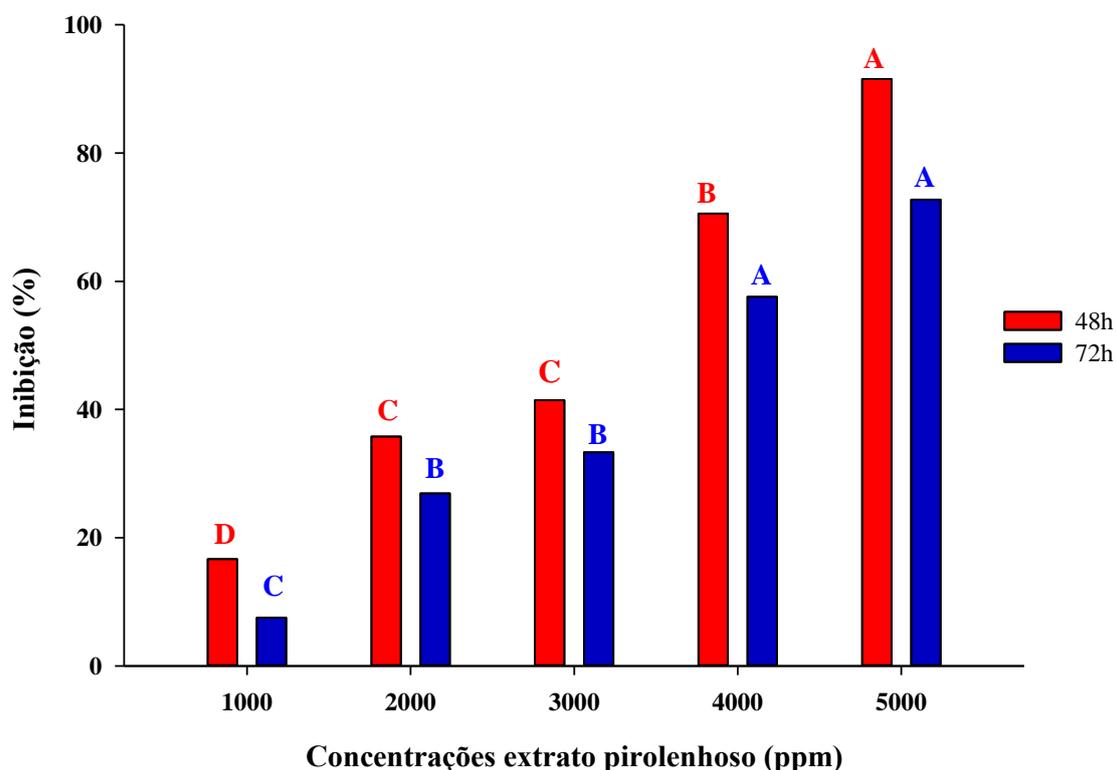


FIGURA 2. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), avaliados por 48 e 72 horas. Dourados-MS, UFGD, 2016. Barras seguidas pela letra maiúscula em colunas de mesma cor indicam que as médias não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5 %.

Pelos diâmetros das colônias de *S. sclerotiorum* submetidos a diferentes concentrações de EP de eucalipto (Figura 3) observou-se que para o primeiro período de avaliação (24 horas) as concentrações de 1000, 2000 e 3000 ppm favoreceram o desenvolvimento fúngico. A partir das concentrações de 4000 e 5000 ppm, o patógeno apresentou menor crescimento micelial, resultando em colônias com diâmetros

menores. Na segunda avaliação (48 horas) todas as concentrações do EP de eucalipto contiveram o crescimento fúngico. As maiores concentrações (5000 e 4000 ppm) resultaram em maior porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) não diferindo estatisticamente entre si. A máxima inibição foi de 33% para a concentração de 5000 ppm, em relação à testemunha (Figura 4).

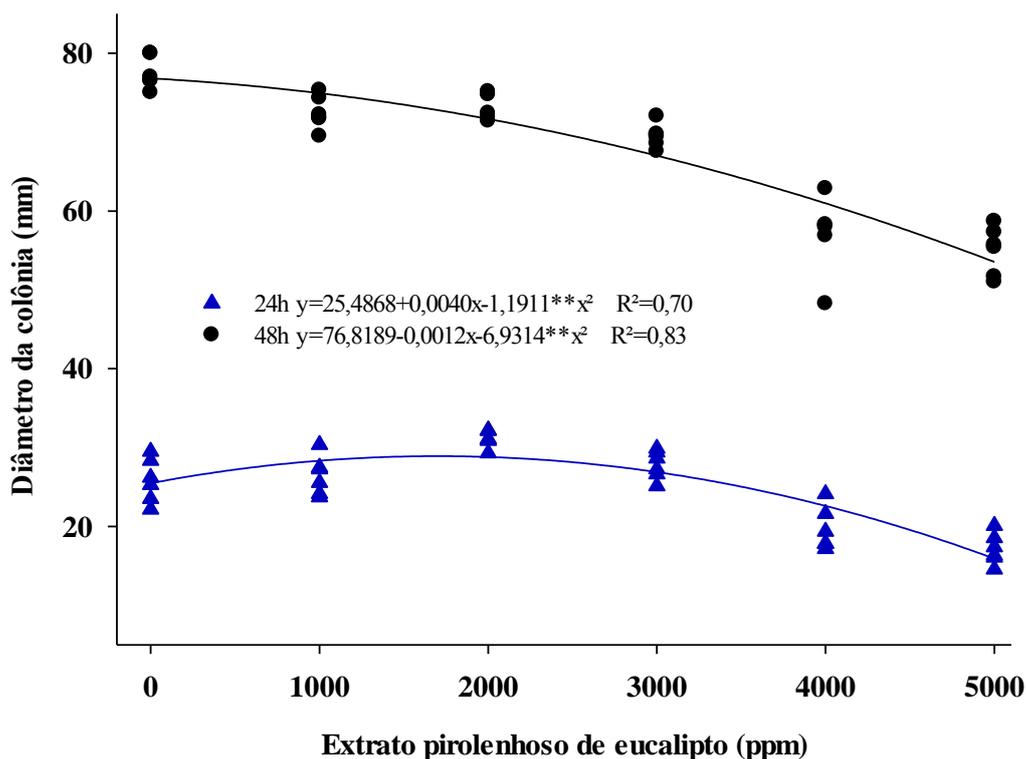


FIGURA 3. Crescimento micelial (mm) do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de eucalipto (*Eucalyptus* spp.), avaliados por 24 e 48 horas. Dourados-MS, UFGD, 2016.

O EP de eucalipto, para *S. sclerotiorum*, promoveu controle fúngico a partir das concentrações de 4000 e 5000 ppm em ambos os períodos de avaliações (24h e 48h). As menores concentrações (1000, 2000 e 3000 ppm) apresentaram ação de controle fúngico somente no período de 48 horas. Desta forma, a velocidade do crescimento micelial foi inicialmente favorecida nas menores concentrações (1000 e 2000 ppm) com rápido crescimento do patógeno, e índices superiores ao da testemunha (4,30), sendo 4,40 e 5,18, respectivamente. Na concentração de 2000 ppm, houve o maior índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM). A partir da concentração de 3000 ppm a

velocidade do crescimento fúngico começou a sofrer redução, caindo para 2,6 na concentração de 5000 ppm (Figura 5).

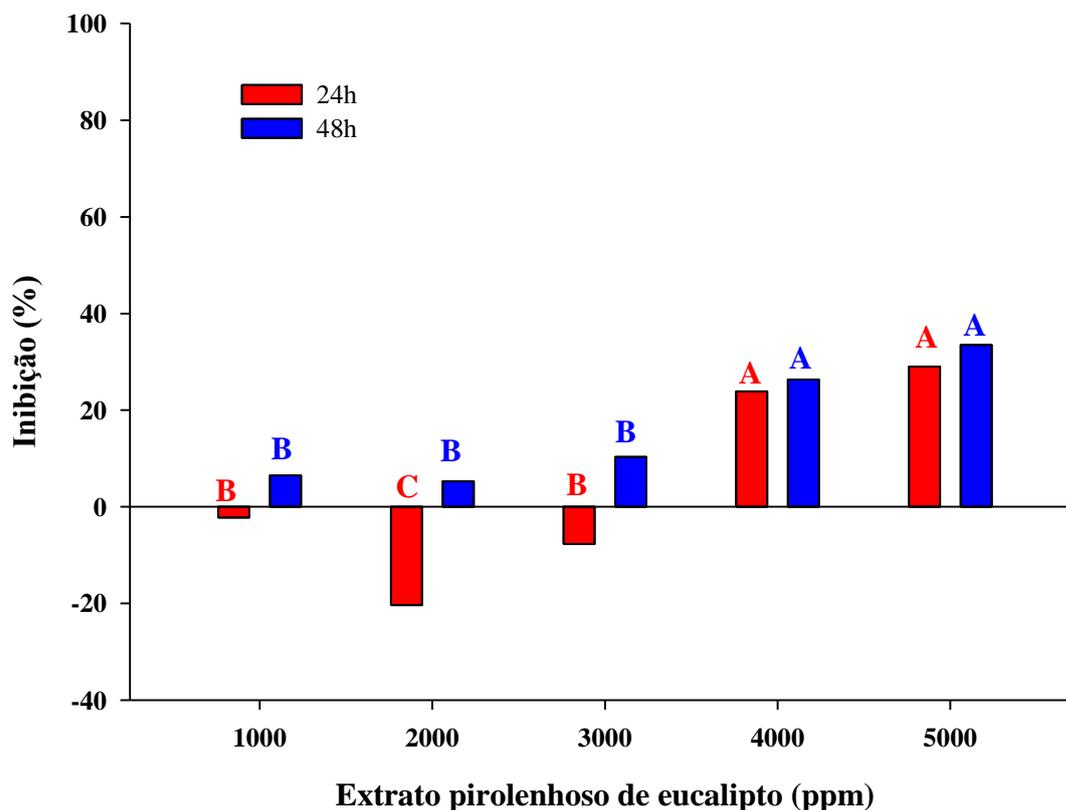


FIGURA 4. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de eucalipto (*Eucalyptus* spp.), avaliados por 24 e 48 horas. Dourados-MS, UFGD, 2016. Barras seguidas pela letra maiúscula em colunas de mesma cor indicam que as médias não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5 %.

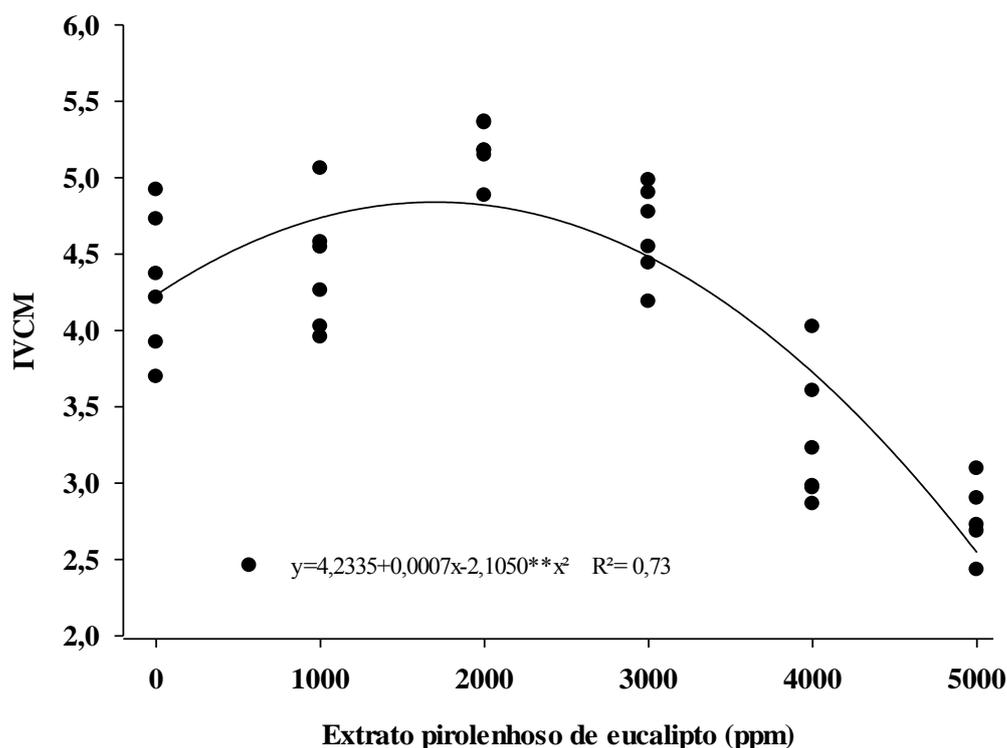


FIGURA 5. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de eucalipto (*Eucalyptus* spp.). Dourados-MS, UFGD, 2016.

Na velocidade do crescimento micelial do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* submetido a diferentes concentrações de EP de cana-de-açúcar, verificou-se que com o aumento da concentração ocorreu a redução da velocidade do crescimento fúngico (Figura 6). Não houve aumento no desenvolvimento do patógeno como ocorreu com o EP de eucalipto nas menores concentrações (1000 e 2000 ppm). Na testemunha, ocorreu a colonização de toda a placa 72 horas após a incubação, com IVCM de 7,23. As maiores concentrações (4000 e 5000 ppm) apresentaram IVCM de 2,12 e 0,61 respectivamente. A ação do EP de cana-de-açúcar foi significativa na diminuição da velocidade de desenvolvimento do patógeno. Quando comparado com a testemunha, a redução foi de 92% na concentração de 5000 ppm. Esses valores corroboram com as taxas de crescimento micelial, evidenciando que o extrato de cana-de-açúcar apresenta fungitoxidade nas diferentes concentrações, inibindo o desenvolvimento do patógeno, interferindo na velocidade de colonização do meio.

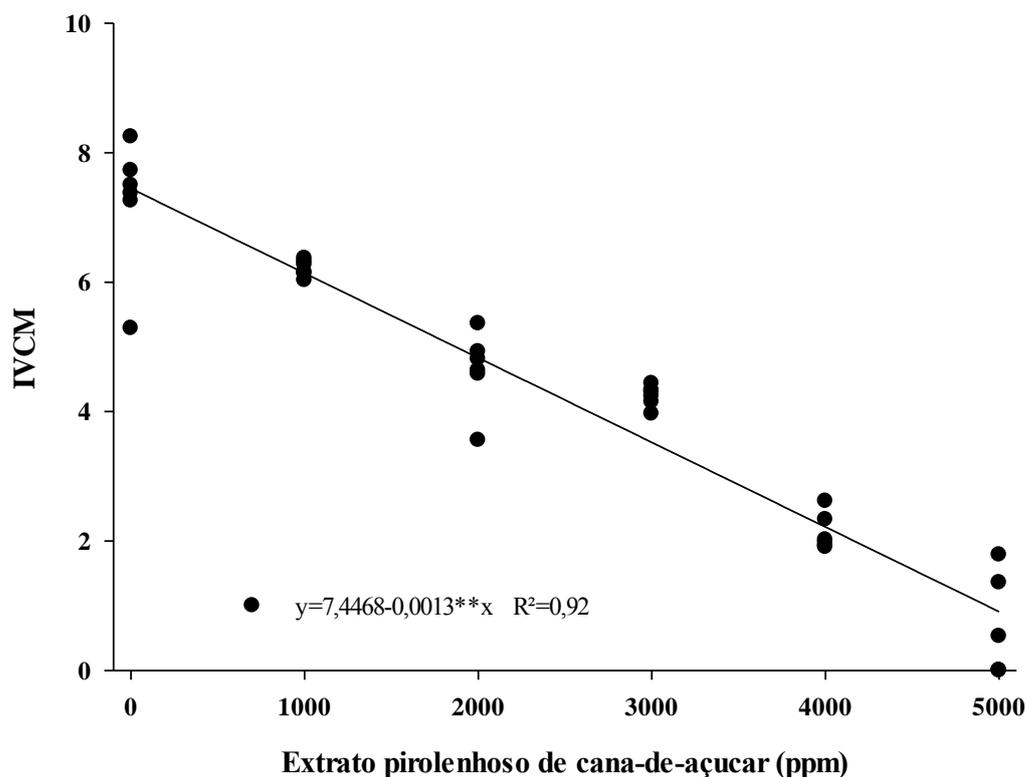


FIGURA 6. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). Dourados-MS, UFGD, 2016.

À medida que as concentrações do EP de cana-de-açúcar aumentaram, o crescimento micelial de *M. phaseolina* (Figura 7) nos dois períodos de avaliações (48 e 72 horas) diminuíram, resultando em colônias com menor diâmetro. No primeiro período (48 horas), comparando com a testemunha (60,48 mm), a maior redução ocorreu na concentração de 5000 ppm, com média de 44,98 mm de diâmetro. Na avaliação de 72 horas, os discos de micélio submetidos à concentração de 5000 ppm também apresentaram crescimento micelial inferior a testemunha, a qual colonizou toda a placa. Os diâmetros médios reduziram de 80 para 69,07 mm.

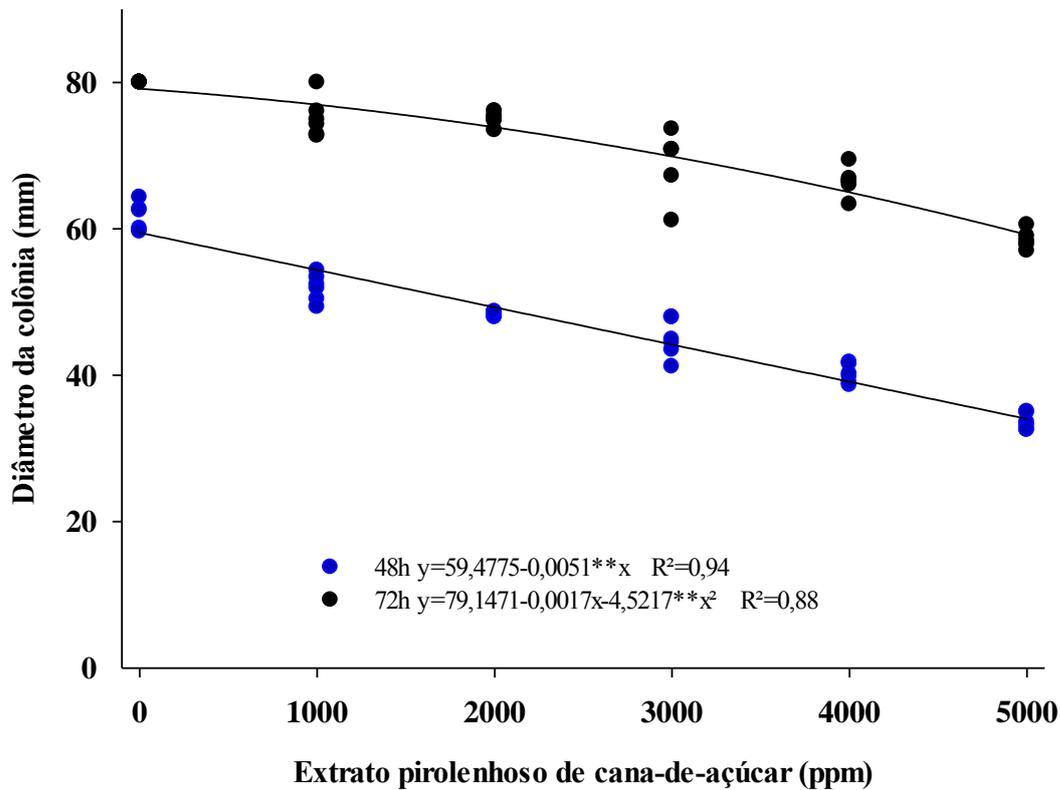


FIGURA 7. Crescimento micelial (mm) do fungo *Macrophomina phaseolina* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), avaliados por 48 e 72 horas. Dourados-MS, UFGD, 2016.

Na velocidade de crescimento micelial do fungo *Macrophomina phaseolina*, submetido a diferentes concentrações de EP de cana-de-açúcar, foi observado que todas proporcionaram velocidade de crescimento micelial inferior à testemunha. A concentração de 5000 ppm promoveu menor velocidade do crescimento fúngico em relação aos demais tratamentos (Figura 8). O índice no tratamento testemunha foi de 10,24, reduzindo a 5,60 na maior concentração.

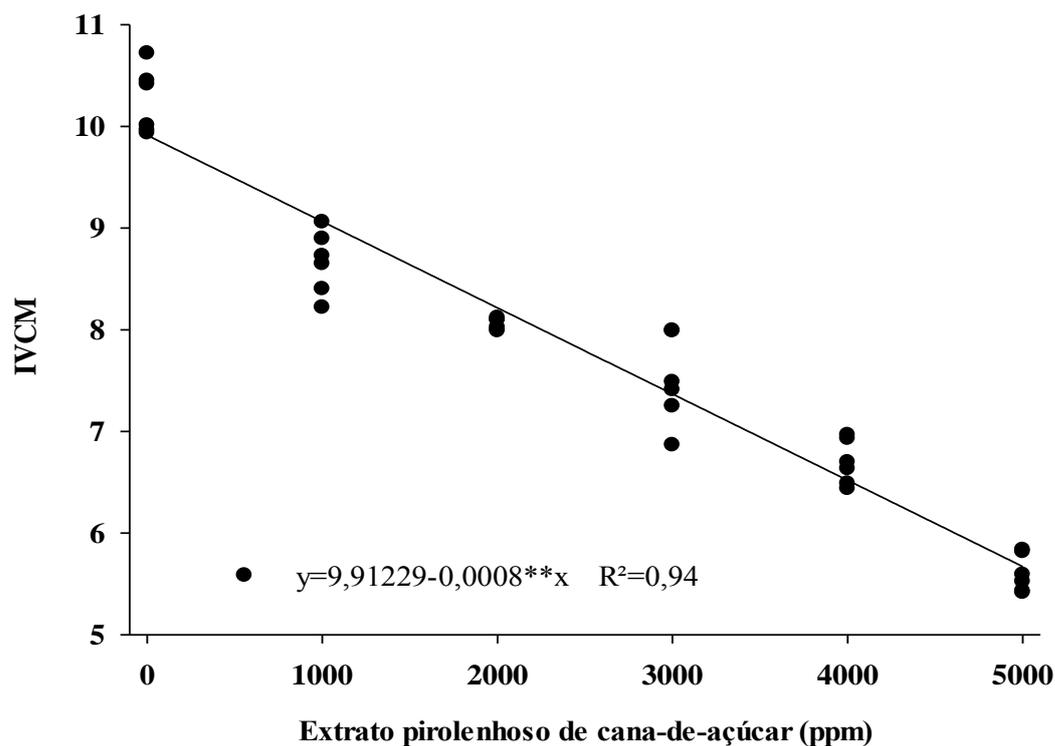


FIGURA 8. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo *Macrophomina phaseolina* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). Dourados-MS, UFGD, 2016.

Os resultados para a porcentagem de inibição fúngica, mostram que o EP de cana-de-açúcar foi eficiente nos dois períodos de avaliações (48 e 72 horas), promovendo redução expressiva nas primeiras 48 horas. A maior inibição no desenvolvimento fúngico foi observada na concentração de 5000 ppm em relação à testemunha e aos demais tratamentos, com 50,0 e 25,0% nos períodos de 48 e 72 horas, respectivamente (Figura 9).

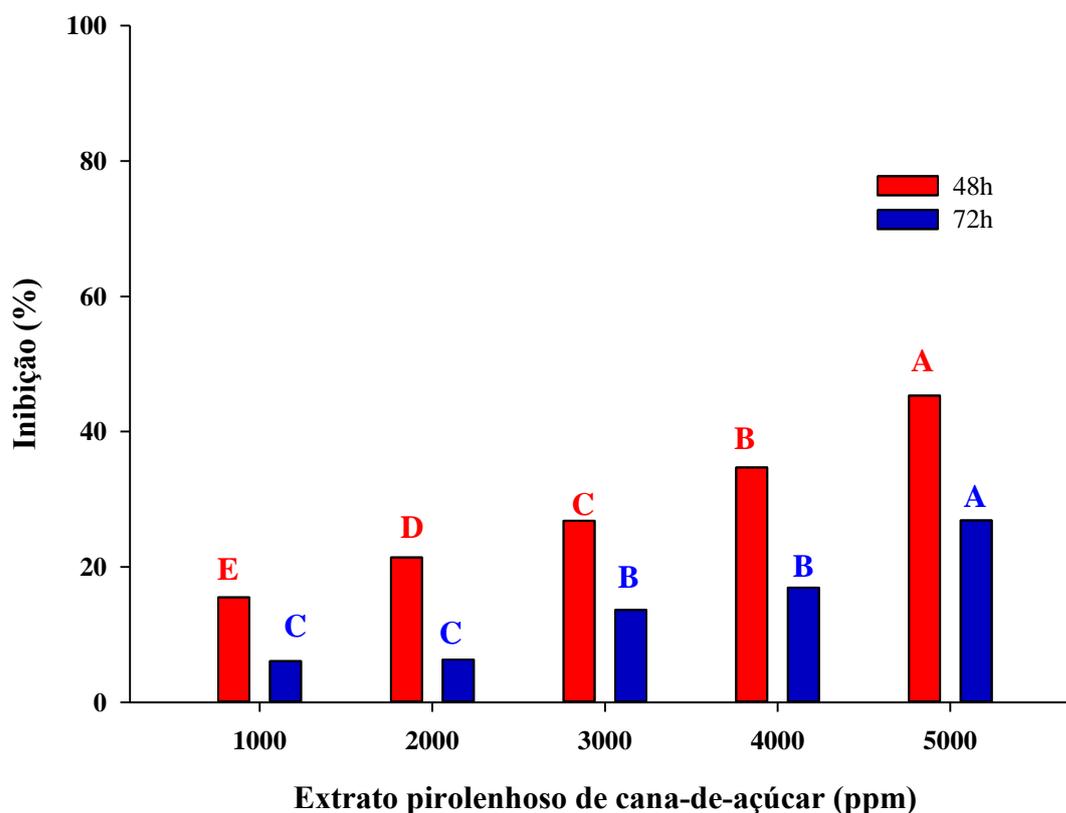


FIGURA 9. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do fungo *Macrophomina phaseolina* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), avaliados por 48 e 72 horas. Dourados-MS, UFGD, 2016. Barras seguidas pela letra maiúscula em colunas de mesma cor indicam que as médias não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5 %.

Verificou-se que houve redução no diâmetro das colônias do fungo *M. phaseolina* conforme as concentrações aumentaram e, para a concentração de 5000 ppm, não foi observado desenvolvimento fúngico na avaliação das 24 horas (Figura 10). Para avaliações seguintes (48 e 72 horas), à medida em que as concentrações foram aumentadas, houve diminuição no diâmetro das colônias. Quanto a variável índice de velocidade de crescimento micelial, com o aumento das concentrações a velocidade do desenvolvimento fúngico também diminuiu (Figura 11). Para a testemunha foi observado um IVCM de 2,65 enquanto que para a maior concentração (5000 ppm) a velocidade de crescimento foi nula.

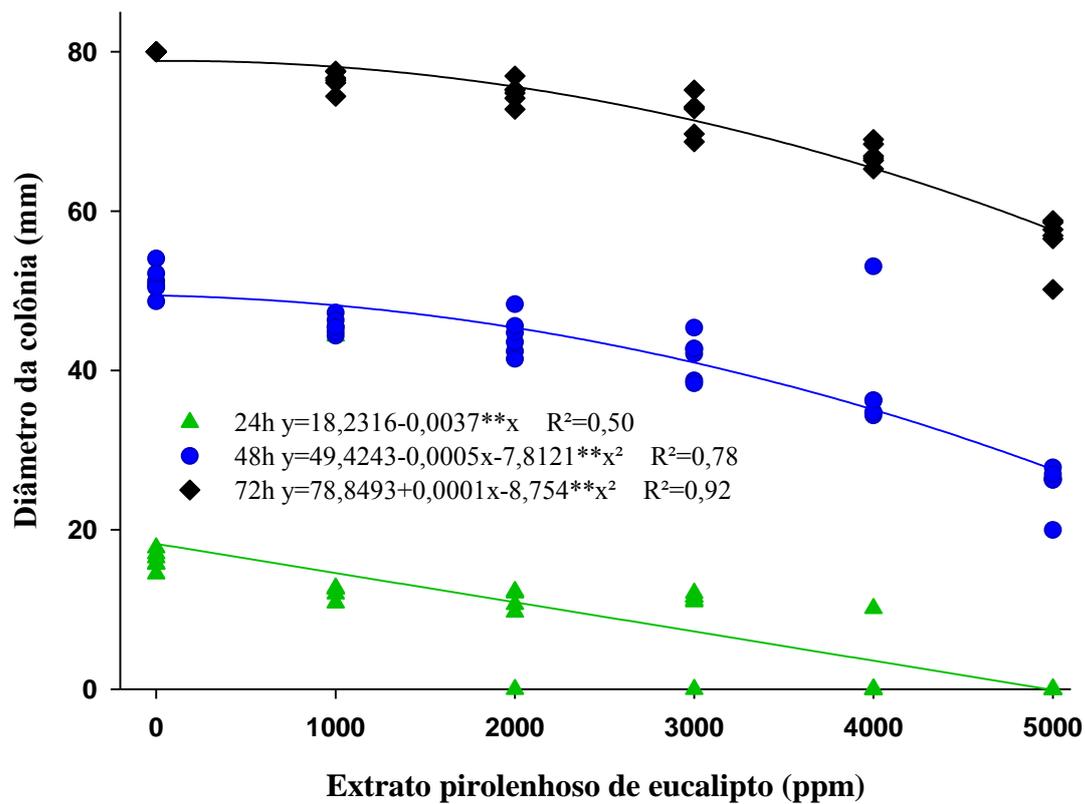


FIGURA 10. Crescimento micelial (mm) do fungo *Macrophomina phaseolina* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de eucalipto (*Eucalyptus* spp.), avaliados por 24, 48 e 72 horas, Dourados-MS, UFGD, 2016.

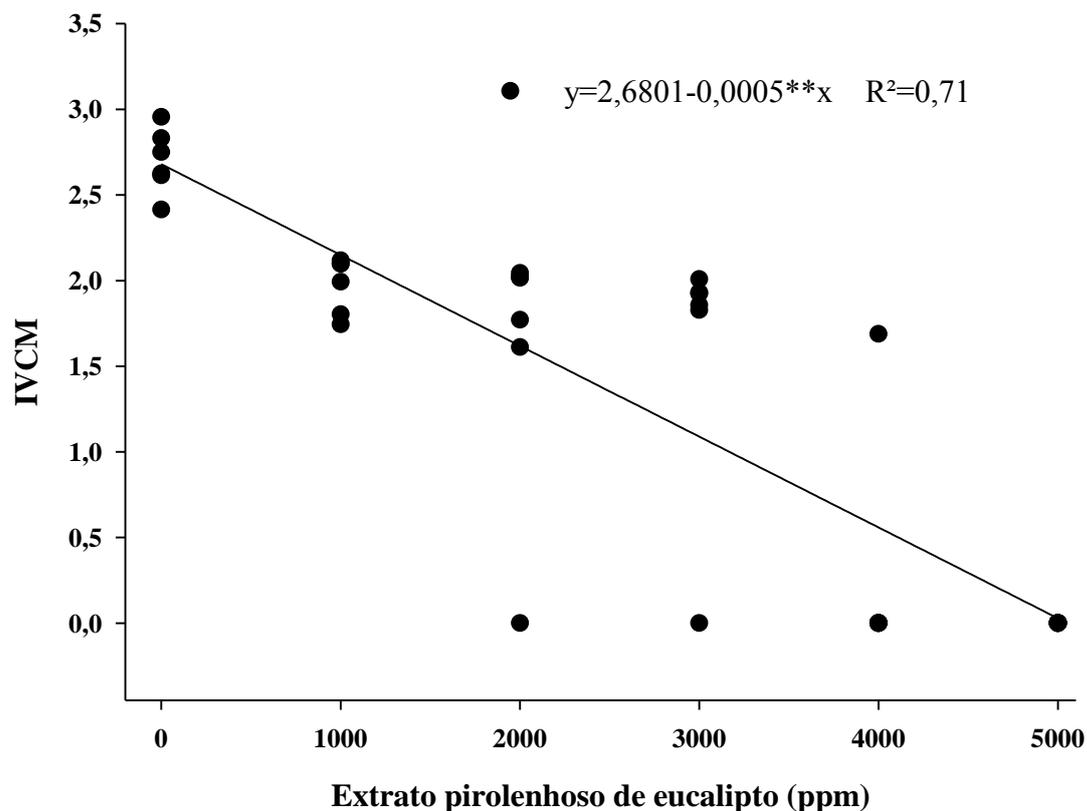


FIGURA 11. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo *Macrophomina phaseolina* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de eucalipto (*Eucalyptus* spp.). Dourados-MS, UFGD, 2016.

No primeiro período de avaliação (24 horas), as concentrações de 4000 e 5000 ppm, foram significativamente eficientes na inibição do crescimento fúngico (Figura 12). As concentrações de 5000 e 4000 ppm promoveram as maiores porcentagens de inibição fúngica, nos períodos de 24 e 48 horas. O desenvolvimento do patógeno foi inibido em 100% na concentração de 5000 ppm e 89% na de 4000 ppm, resultado para as primeiras 24 horas. As concentrações menores, também promoveram inibição no desenvolvimento do fungo, porém, não diferiram estatisticamente entre si em todos os períodos de avaliações. Observou-se que nas primeiras horas de avaliação (24 horas) o extrato apresentou maior poder inibidor e nos períodos seguintes foi perdendo gradativamente o seu poder de ação inibidora.

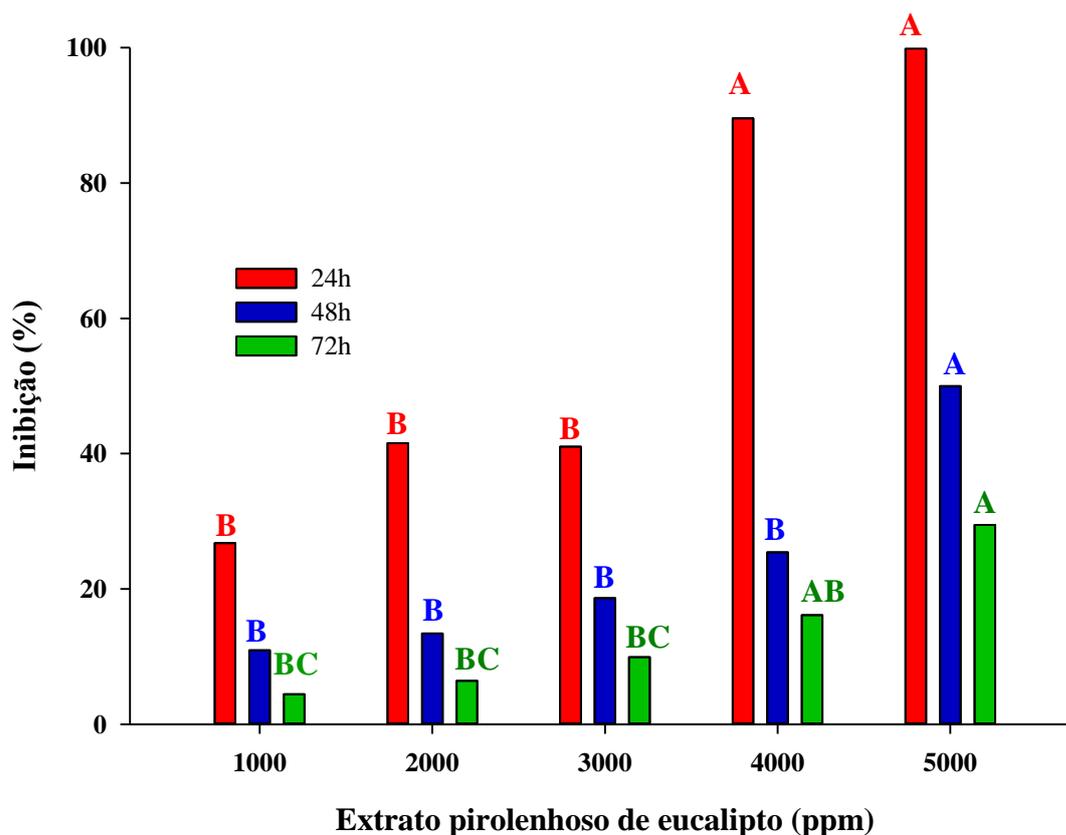


FIGURA 12. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do fungo *Macrophomina phaseolina* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de eucalipto (*Eucalyptus* spp.), avaliados por 24, 48 e 72 horas. Dourados-MS, UFGD, 2016. Barras seguidas pela letra maiúscula em colunas da mesma cor indicam que as médias não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5 %.

Santos Junior et al. (2013), avaliando *in vitro*, a fungitoxicidade de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de teca (*Tectona grandis*), sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, fitopatógeno do solo, assim como *Macrophomina phaseolina*, também observaram que em todas as concentrações utilizadas, o EP proporcionou ação fungitóxica sobre o fungo. As concentrações de 100, 75 e 50% inibiram totalmente o desenvolvimento do patógeno. Não foram encontrados estudos da avaliação de EP na inibição do desenvolvimento fúngico de *Macrophomina phaseolina*.

Para o patógeno *C. truncatum*, submetido a diferentes concentrações de EP de cana-de-açúcar, foram realizados quatro períodos de avaliações, 48, 72, 96 e 120 horas. Houve redução gradativa linear no crescimento micelial à medida que a concentração do EP foi aumentada (Figura 13). A testemunha apresentou os maiores diâmetros de

colônia em todos os períodos avaliados, ocorrendo redução significativa na colonização fúngica quando submetidos à maior concentração, 5000 ppm.

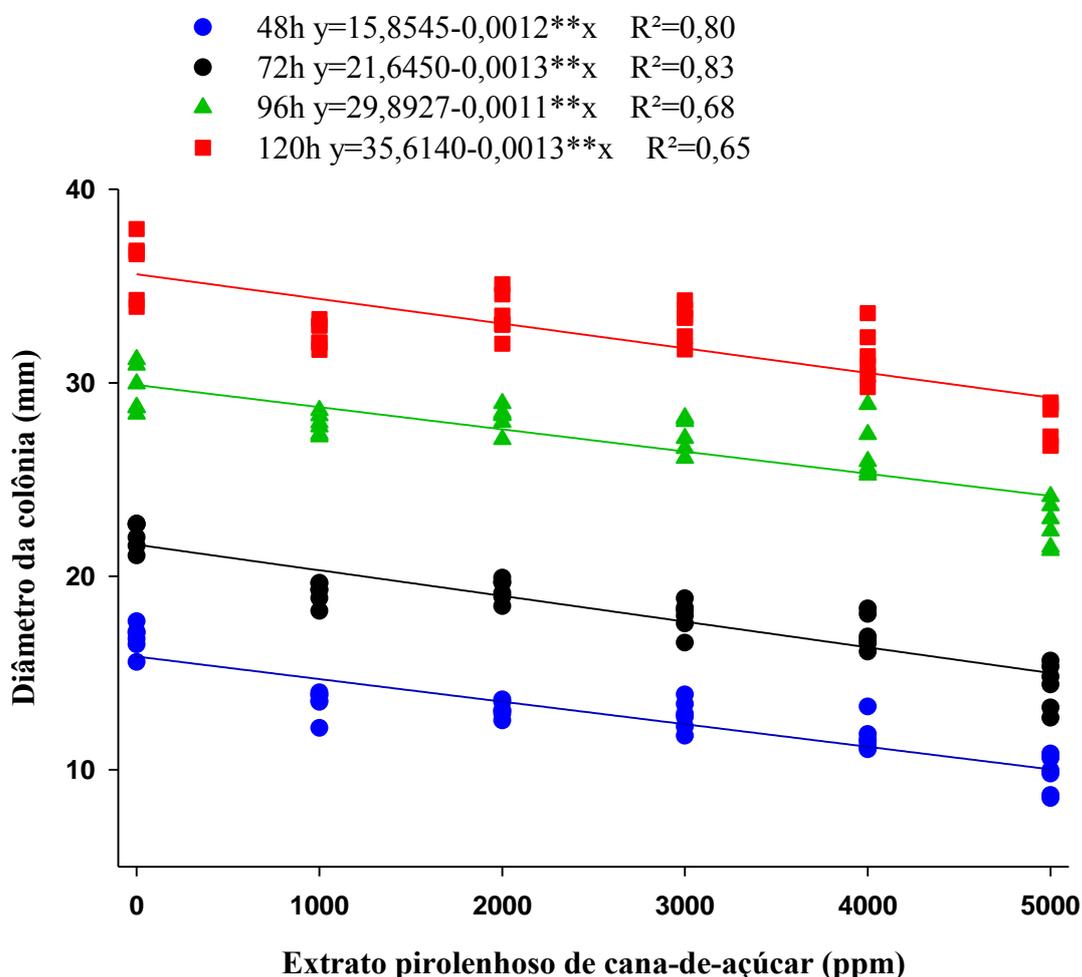


FIGURA 13. Crescimento micelial (mm) do fungo *Colletotrichum truncatum* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), avaliados por 48, 72, 96 e 120 horas. Dourados-MS, UFGD, 2016.

Todas as concentrações promoveram inibição na atividade fúngica. A maior porcentagem de inibição foi observada na primeira avaliação, 48 horas, na concentração de 5000 ppm, com 42% de inibição do desenvolvimento fúngico. A menor inibição ocorreu no tratamento de 1000 ppm, as colônias apresentaram redução de 20% no diâmetro em relação à testemunha, porém, não diferiu estatisticamente das concentrações de 2000, 3000 e 4000 ppm nos períodos de 48 e 72 horas (Figura 14).

Observou-se que o EP de cana-de-açúcar perdeu gradualmente a sua capacidade na inibição fúngica com o passar do tempo das avaliações. Este fato pode ser explicado pela estabilização do crescimento das colônias que ocorreu entre os períodos de 96 e 120 horas (Figura 14).

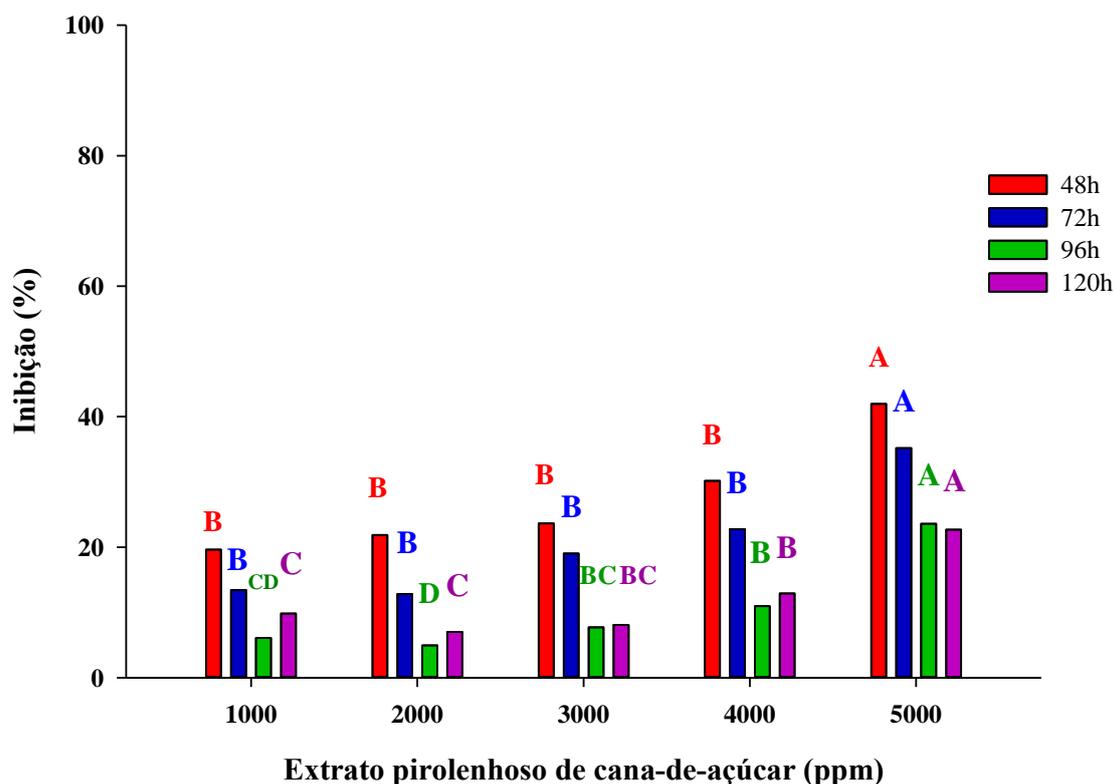


FIGURA 14. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do fungo sob *Colletotrichum truncatum* influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), avaliados por 48, 72, 96 e 120 horas. Dourados-MS, UFGD, 2016. Barras seguidas pela letra maiúscula de mesma cor indicam que as médias não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5 %.

Houve redução linear na velocidade de crescimento micelial de *C. truncatum* submetido a diferentes concentrações de EP de cana-de-açúcar (Figura 15). O IVC do fungo na testemunha apresentou índice de 13,33 e na maior dose, 9,52, havendo redução de 29%.

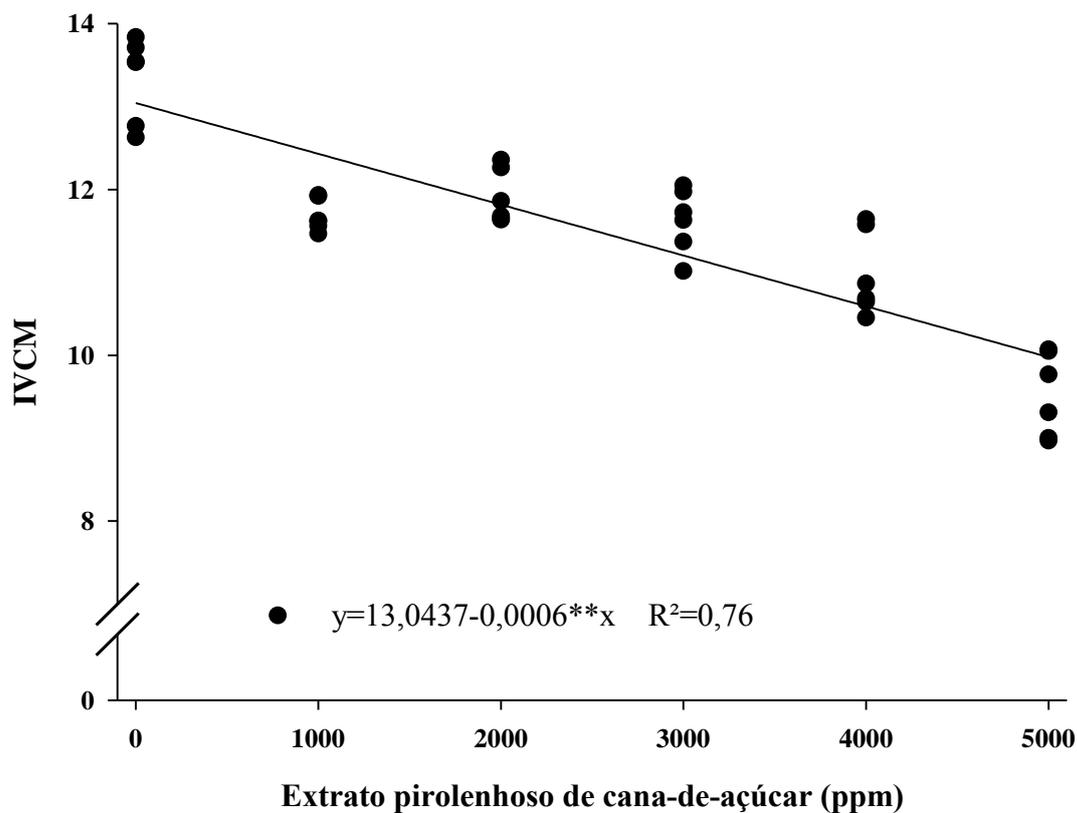


FIGURA 15. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo *Colletotrichum truncatum* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). Dourados-MS, UFGD, 2016.

O crescimento micelial do fungo *C. truncatum* sob a ação de diferentes concentrações de EP de eucalipto, estão apresentados na Figura 16. No primeiro período de avaliação (24 horas), os discos de micélio submetidos às doses de 3000, 4000 e 5000 ppm, apresentaram o desenvolvimento micelial totalmente suprimido. Nos períodos seguintes (48, 72 e 96 horas), também foi constatada a redução nos diâmetros das colônias pelo aumento das concentrações, porém menos acentuada.

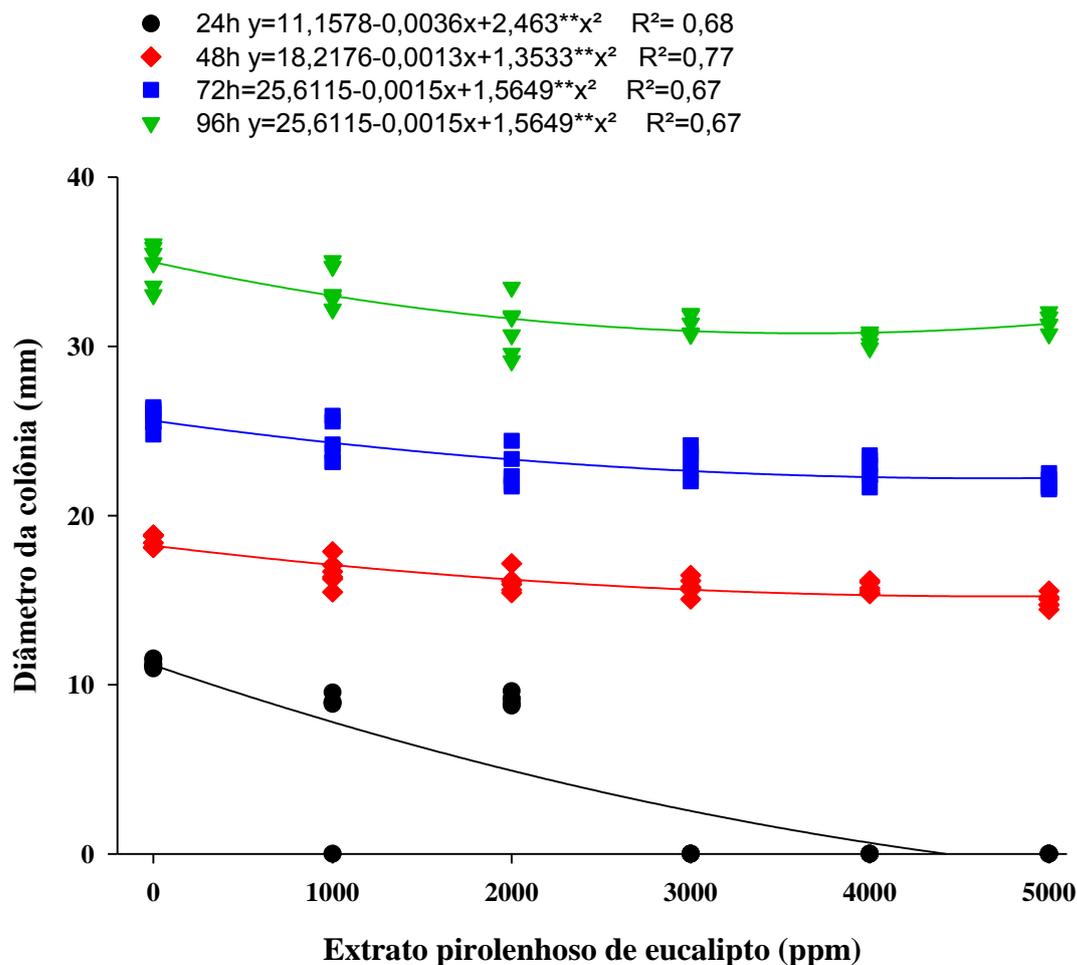


FIGURA 16. Crescimento micelial (mm) do fungo *Colletotrichum truncatum* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de eucalipto (*Eucalyptus* spp.), avaliados por 24, 48, 72 e 96 horas. Dourados-MS, UFGD, 2016.

Os resultados para a porcentagem de inibição do crescimento micelial do fungo *Colletotrichum truncatum* sob efeito do EP de eucalipto corroboram com os resultados encontrados para o crescimento micelial, evidenciando que o extrato estudado apresenta fungitoxidade nas diferentes concentrações e seu efeito é maior nas primeiras 24 horas de exposição ao fungo (Figura 17). As concentrações de 3000, 4000 e 5000 ppm inibiram 100% o desenvolvimento do patógeno no primeiro período de avaliação. Nos outros períodos (48, 72 e 96 horas) também houve inibição, porém, não foi expressiva como nas primeiras 24 horas.

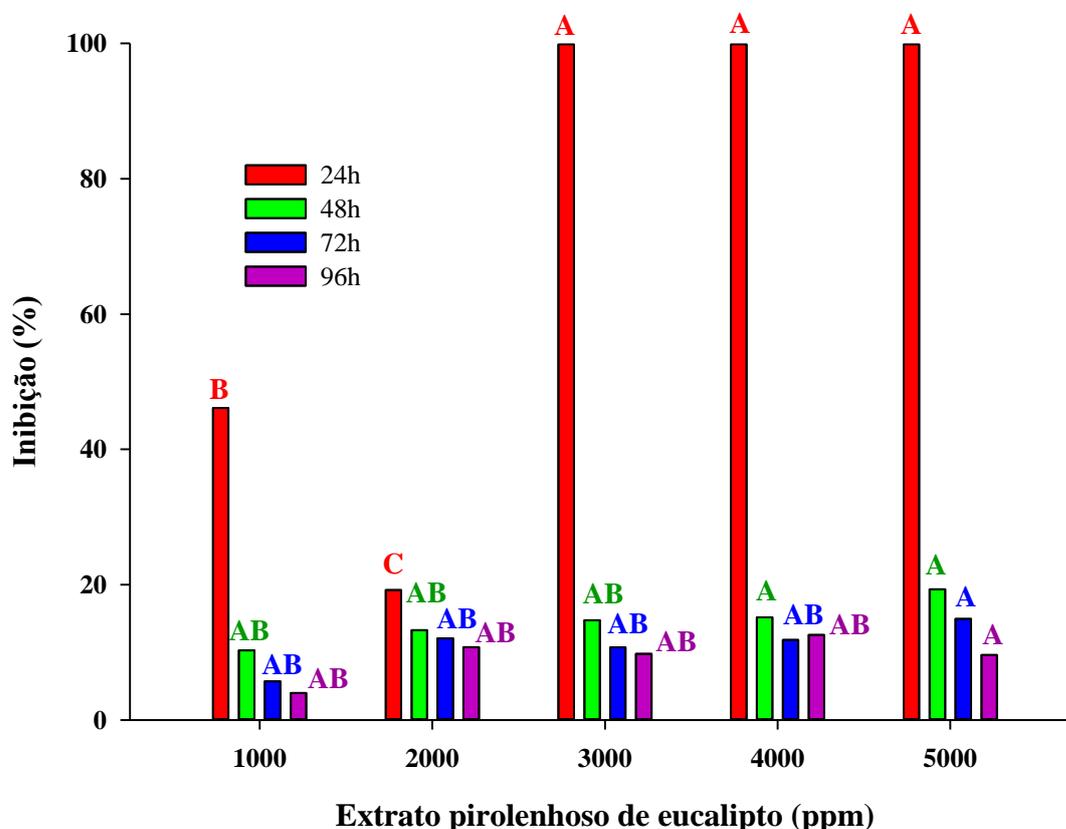


FIGURA 17. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do fungo *Colletotrichum truncatum* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de eucalipto (*Eucalyptus* spp.), avaliados por 24, 48, 72 e 96 horas. Dourados-MS, UFGD, 2016. Barras seguidas pela letra maiúscula de mesma cor indicam que as médias não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5 %.

Para a velocidade de crescimento micelial houve diminuição à medida que as concentrações foram aumentadas, promovendo redução significativa no IVCM do fungo *Colletotrichum truncatum* (Figura 18). A velocidade de crescimento dos discos de micélio submetidos à concentração de 5000 ppm foi nula.

Resultados semelhantes foram encontrados por Rodrigues (2014), avaliando o potencial de cinco doses (0, 25, 50, 100 e 150 mL L<sup>-1</sup>) de extrato pirolenhoso de teca (*Tectona grandis*) no crescimento micelial *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*. Houve redução no crescimento micelial de acordo com a elevação das doses e a maior eficiência foi obtida na de maior valor (150 mL L<sup>-1</sup>). Na avaliação do IVCM, a

velocidade de desenvolvimento do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* na testemunha (0,55) foi duas vezes superior do que na maior dose (0,28), observando redução significativa para o crescimento micelial.

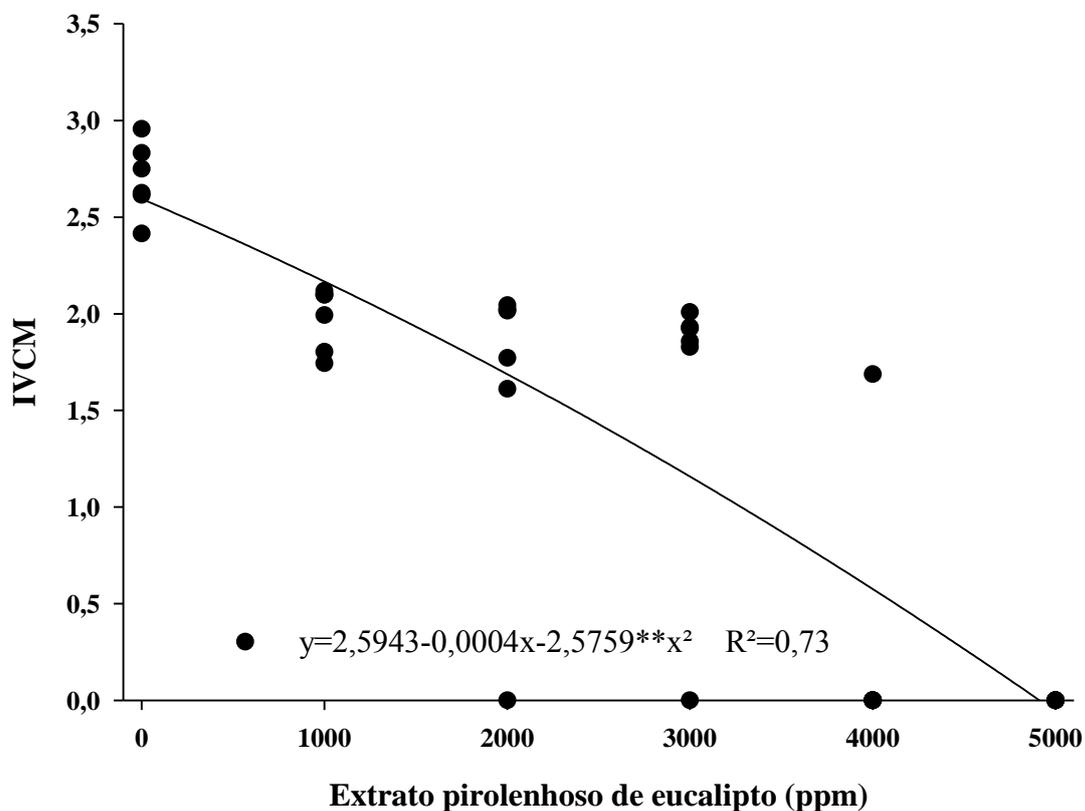


FIGURA 18. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo *Colletotrichum truncatum* sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de eucalipto (*Eucalyptus* spp.), Dourados-MS, 2016.

Ribeiro et al. (2016), avaliando o efeito de diferentes produtos naturais, dentre eles o extrato pirolenhoso de nome comercial Biopirol<sup>®</sup> (40 e 60 mL L<sup>-1</sup>), no controle *in vitro* e *in vivo* da antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de mamão (*Carica papaya*) na pós-colheita, verificaram que o EP nas duas concentrações obteve destaque, pois promoveu a inibição total do desenvolvimento do fungo *in vitro*.

No presente estudo, observou-se que tanto o EP, de cana-de-açúcar quanto o de eucalipto, com o passar das horas, foram perdendo o seu efeito de inibição no crescimento fúngico. Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho realizado por Ribeiro et al. (2016) para a redução dos sintomas da antracnose. Na avaliação *in*

*vivo*, os autores constataram que o produto Biopiról® (40,0 mL L<sup>-1</sup>), resultou em menores lesões em relação aos demais tratamentos (Acadian®, 40,0 e 60,0 mL L<sup>-1</sup>; Trichodermil®, 0,2 e 0,4 g L<sup>-1</sup>; Rocksil®, 15 e 30 g L<sup>-1</sup>; Protego FL®, 3,0 e 6,0 g L<sup>-1</sup>) na primeira época de aplicação, ou seja, 48 horas antes da inoculação. Para a segunda época de aplicação, 72 horas antes da inoculação, o extrato mostrou-se eficiente, porém, as lesões foram maiores quando comparadas com as da primeira época de aplicação.

Sousa Junior e Kupper (2013) avaliaram o efeito preventivo e curativo de diferentes concentrações de EP, no controle do bolor verde (*Penicillium digitatum*) em frutos de laranja lima. Verificaram que o extrato favoreceu o desenvolvimento da doença nos frutos que foram tratados de forma preventiva. Para o tratamento curativo os melhores resultados foram observados nas maiores concentrações (17,5 e 20%) as quais não diferiram estatisticamente do tratamento com o produto químico Imazalil®. Os autores concluem que a utilização do EP é viável para o controle do bolor verde, porém, de forma curativa.

A perda na capacidade fungicida ou fungistática dos extratos com o passar do tempo pode ser explicada pelo fato de os extratos vegetais, de maneira geral, possuírem instabilidade química na presença do ar, luz e altas temperaturas, levando a rápida evaporação e degradação dos componentes, assim, são necessárias várias aplicações para se conseguir controle satisfatório. Outro fator é por não possuírem moléculas sintéticas e serem instáveis, com baixo poder residual (LORENZETTI, 2009; AZEVEDO et al., 2013).

O presente estudo com os extratos pirolenhosos de cana-de-açúcar e eucalipto foi realizado em condições de laboratório (*in vitro*), porém, as placas de Petri contendo os extratos e os fungos, foram submetidas a fotoperíodos de 12 horas, o que pode ter provocado a fotodegradação das moléculas e a diminuição gradativa do poder inibidor. Outro fator é em relação à adaptação do fungo ao meio, que também pode ter ocorrido.

Diferente do que ocorre em testes *in vitro*, em condições de campo (*in vivo*), ao longo do ciclo de desenvolvimento da cultura são realizadas frequentes aplicações de produto. Além disso, em condições *in vivo* pode ocorrer indução de resistência. Segundo Ribeiro et al. (2016), a resistência induzida envolve a ativação de vários processos, incluindo o aumento de síntese de fitoalexinas. De acordo Tsuzuki et al. (2000), o EP é capaz de ativar as substâncias do metabolismo secundário, induzindo a resistência das plantas ao ataque de pragas. Azevedo et al. (2005) afirmam que a aplicação de EP no decorrer do desenvolvimento da cultura funciona como um ativador

fisiológico. Campos et al. (2005), relatam que a aplicação de EP em morango, promove aumento na concentração de compostos fenólicos nos frutos. Segundo os autores, a utilização de ácido pirolenhoso contribui na indução de resistência do morangueiro a fitopatógenos.

Vale ressaltar que as pesquisas realizadas *in vitro* são os primeiros passos para a identificação do potencial dos produtos oriundos de vegetais no controle de fitopatógenos, tendo importância para a definição das doses e as concentrações inibitórias mínimas, possibilitando assim posteriores testes *in vivo*.

Outra observação é em relação às diferentes potencialidades dos extratos na diminuição ou inibição do desenvolvimento de determinada espécie de fungo. Foi possível verificar que os patógenos apresentaram sensibilidade diferenciada quando submetidos a determinado extrato (Quadros 3, 4, 5 e 6).

QUADRO 3. Inibição do crescimento fúngico (%) na primeira avaliação, submetidos a diferentes concentrações do extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). Dourados-MS, UFGD, 2016

Patógeno	Inibição crescimento fúngico (%)				
	Concentração extrato pirolenhoso (ppm)				
	1000	2000	3000	4000	5000
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	16,67a	35,77a	41,43a	70,57a	91,54a
<i>Macrophomina phaseolina</i>	15,50a	21,40a	26,84a	34,71b	45,34b
<i>Colletotrichum truncatum</i>	19,62a	21,85a	23,63a	30,15b	41,96b
<b>C.V (%)</b>	19,98				

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

QUADRO 4. Inibição do crescimento fúngico (%) na última avaliação, submetidos a diferentes concentrações do extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). Dourados-MS, UFGD, 2016

Patógeno	Inibição crescimento fúngico (%)				
	Concentração extrato pirolenhoso (ppm)				
	1000	2000	3000	4000	5000
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	7,52a	26,91a	33,32a	57,58a	72,75a
<i>Macrophomina phaseolina</i>	6,07a	6,3b	13,65b	16,95b	26,89b
<i>Colletotrichum truncatum</i>	9,84a	7,02b	8,07b	12,92b	22,69b
<b>C.V (%)</b>	16,20				

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

QUADRO 5. Inibição do crescimento fúngico (%) na primeira avaliação, submetidos a diferentes concentrações do extrato pirolenhoso de eucalipto (*Eucalyptus* spp.). Dourados-MS, UFGD, 2016

Patógeno	Inibição crescimento fúngico (%)				
	Concentração extrato pirolenhoso (ppm)				
	1000	2000	3000	4000	5000
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	-2,23b	-20,35b	-7,68b	23,92b	29,07b
<i>Macrophomina phaseolina</i>	26,778a	41,538a	41,013a	89,572a	100a
<i>Colletotrichum truncatum</i>	46,122a	19,209a	100a	100a	100a
<b>C.V (%)</b>	30,62				

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

QUADRO 6. Inibição do crescimento fúngico (%) na última avaliação, submetidos a diferentes concentrações do extrato pirolenhoso de eucalipto (*Eucalyptus* spp.), Dourados-MS, UFGD, 2016

Patógeno	Inibição crescimento fúngico (%)				
	Concentração extrato pirolenhoso (ppm)				
	1000	2000	3000	4000	5000
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	6,48a	5,26b	10,33a	26,36a	33,5a
<i>Macrophomina phaseolina</i>	4,439a	6,432b	9,907a	16,125b	29,44b
<i>Colletotrichum truncatum</i>	3,981a	10,773a	9,77a	12,582b	9,612c
<b>C.V (%)</b>	19,31				

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Na primeira avaliação, não houve diferença significativa na ação do extrato entre os patógenos estudados para as concentrações de 1000, 2000 e 3000 ppm. Para as concentrações de 4000 e 5000 ppm, houve diferença significativa na porcentagem de inibição de crescimento. O fungo *S. sclerotiorum*, foi o que apresentou maior sensibilidade às propriedades fungistáticas do extrato, com 70,57% e 91,54% de desenvolvimento inibido nas maiores concentrações (4000 e 5000 ppm) (Quadro 3). No último período de avaliação, observou-se que a partir da concentração de 2000 ppm houve inibição do crescimento fúngico, sendo que o patógeno *S. sclerotiorum* foi o mais afetado pelo extrato (Quadro 4).

Para o EP de eucalipto, em relação à primeira avaliação, os fungos *M. phaseolina* e *C. truncatum* foram os mais afetados no seu desenvolvimento, não diferindo entre si em todas as concentrações avaliadas (Quadros 5). Observou-se na avaliação final, que na concentração de 2000 ppm a maior inibição ocorreu no patógeno

*C. truncatum*. Nas concentrações de 4000 e 5000 ppm a maior inibição foi verificada em *S. sclerotiorum* (Quadro 6).

Estudo realizado por Theisen et al. (2010) na avaliação dos efeitos de duas formulações de EP, uma destilada e outra bruta decantada, na supressão de doenças da fase inicial de plântulas de soja, mostra que as melhores respostas foram obtidas com a formulação destilada. O extrato suprimiu alguns fungos frequentes da fase inicial do desenvolvimento da soja, como *Alternaria* e *Penicillium*, destacando a supressão para *Sclerotinia sclerotiorum*. Os autores, pelo fato do EP ser composto por diversos componentes de ação biológica, propõem algumas hipóteses para as diferentes ações nos fungos. Cada espécie fúngica possui sensibilidade diferenciada aos componentes químicos do extrato. Entre os componentes do licor pirolenhoso alguns podem inibir ou favorecer o desenvolvimento fúngico.

Mello et al. (2005), avaliando o efeito *in vitro* de produtos alternativos na inibição de *Sclerotinia sclerotiorum*, constataram que o meio de cultura preparado com licor pirolenhoso permitiu o desenvolvimento micelial e a produção de escleródios similarmente a testemunha. Para os autores a eficácia do EP também varia em relação ao patógeno e a sua composição.

De acordo com Kartal et al. (2004), a composição do EP depende das condições do processo como a temperatura, o processo de fabricação e a composição do material utilizado. Em temperaturas superiores a 180°C, ocorre um rompimento do complexo de celulose, hemicelulose e polímeros de lignina, produzindo uma mistura de gases não condensáveis e vapores condensáveis (MENEGALE, 2013). O líquido resultante pode conter açúcares fermentáveis, compostos de furano, vários compostos fenólicos, ácidos orgânicos, entre outros. Os compostos fenólicos, geralmente, são formados pela degradação da lignina e os ácidos acéticos se originam a partir da hemicelulose.

Na avaliação de diferentes EP (madeira de acácia e sugi) contra fungos degradadores de madeira e cupins, Kartal et al. (2004) verificaram que as propriedades físicas dos extratos não sofreram alterações decorrentes da espécie de madeira e da temperatura do processo de produção. No entanto, a composição química dos filtrados apresentou variabilidade com o aumento da temperatura. No processo de produção de extrato da madeira sugi, as concentrações dos compostos fenólicos aumentaram e as de ácidos orgânicos diminuíram. Também constataram que o extrato da madeira de acácia resultou em maiores concentrações de compostos fenólicos quando comparado com o da madeira sugi.

Baimark et al. (2008) analisaram os componentes do extrato bruto (sem destilação) e do extrato destilado (sem alcatrão) e concluíram que os compostos fenólicos estão presentes em maior quantidade no extrato bruto quando comparado com o extrato destilado. Para eles, é possível que alguns compostos fenólicos possam ter sido removidos durante o processo de extração do alcatrão.

Segundo Saigusa (2002), o efeito ativador ou inibidor do EP sobre os organismos vivos depende de sua concentração. Para Yatagai et al. (2002), são os componentes dos vinagres de madeira os responsáveis pelas diferenças nas atividades germicidas. Baimark et al. (2008), em estudos realizados para verificação da ação antifúngica de EP de *Eucalyptus globulus*, relatam que o ácido acético e os compostos fenólicos presentes no extrato promovem a inibição do crescimento fúngico. Marumoto et al. (2012), demonstrando a atividade germicida do EP de bambu contra o vírus da encefalomiocardite (EMCV), concluíram que a combinação do ácido fenólico e do ácido acético é boa para a inativação do EMCV. Enfatizam ainda a atividade do EP contra uma ampla gama de vírus patogênicos. Ma et al. (2011) também sugerem que os fenóis e os ácidos orgânicos são os componentes ativos para a inatividade microbiana.

Os resultados encontrados pelos autores citados podem explicar a diferente ação dos EP de cana-de-açúcar e eucalipto nos fungos analisados neste estudo. Apesar das diferentes respostas, ambos os extratos exerceram ação fungitóxica direta sobre o crescimento *in vitro* dos fungos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina* e *Colletotrichum truncatum*, sendo o primeiro passo para identificar o potencial desse produto no controle de fitopatógenos. Pesquisas *in vivo* devem ser realizadas para a comprovação de sua eficiência, avaliando a resposta dos mesmos quando em interação com fatores ambientais em situações de cultivo a campo.

#### 4.2 Avaliação da eficácia do extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar na inibição do desenvolvimento micelial em diferentes formas de inóculo de *Sclerotium rolfsii*

De acordo com a análise de variância, o diâmetro das colônias, a velocidade de crescimento micelial e a porcentagem de inibição do fungo *Sclerotium rolfsii* nas duas formas de inóculo (disco de micélio e escleródio) foram influenciados significativamente ( $P < 0,001$ ) pelas concentrações do EP de cana-de-açúcar.

Os resultados para o crescimento micelial (mm) a partir de discos de micélio sob influência de diferentes concentrações de EP de cana-de-açúcar, estão apresentados na Figura 19. Foram realizados quatro períodos de avaliações, 48, 72, 96 e 120 horas após a incubação.

Para o primeiro período de avaliação (48 horas) a testemunha apresentou maior diâmetro de colônia (16,28 mm). Nos tratamentos de 3000 e 4000 ppm, o desenvolvimento fúngico foi menor, 10,95 e 7,9, respectivamente. Na concentração de 5000 ppm, o desenvolvimento do fungo *Sclerotium rolfsii* inicialmente foi suprimido. No segundo período de avaliação (72 horas) houve redução no crescimento micelial com o aumento das concentrações.

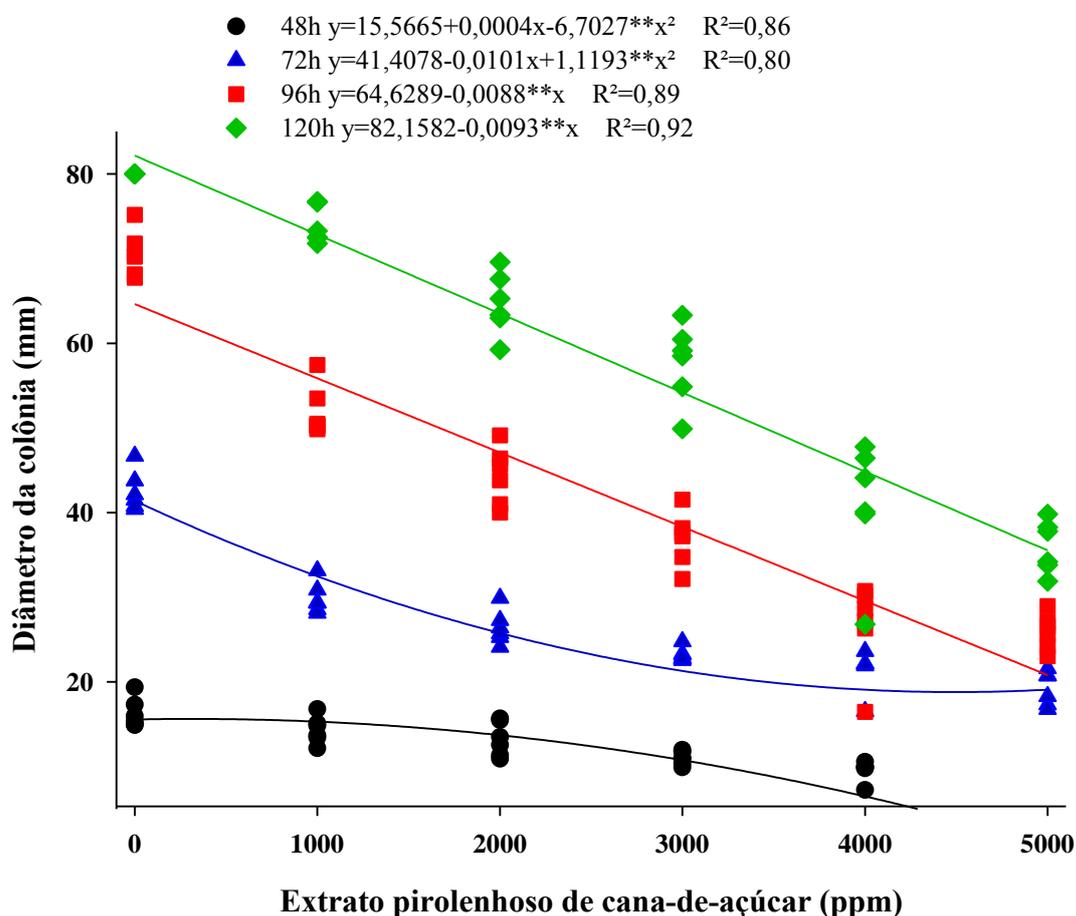


FIGURA 19. Crescimento micelial (mm) do fungo *Sclerotium rolfsii* a partir de discos de micélio sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), avaliados por 48, 72, 96 e 120 horas. Dourados-MS, UFGD, 2016.

Durante as primeiras avaliações (48 e 72 horas), observou-se que o fungo apresentou crescimento radial nas menores concentrações (0, 1000 e 2000 ppm) e nas

maiores, 3000, 4000 e 5000 ppm, como mecanismo de defesa, seu desenvolvimento foi aéreo, formando grande quantidade de hifas (Figura 20). Neste caso, para o seu desenvolvimento inicial, aparentemente o patógeno nutriu-se das reservas presentes no disco de micélio no qual foi multiplicado. Assim, o fungo conseguiu se desenvolver por um determinado tempo em meio livre do EP, o que justifica a porcentagem entre 20 e 40% de inibição fúngica do extrato no primeiro período de avaliação (24 horas) nas concentrações de 1000, 2000, 3000 ppm (Figura 21).

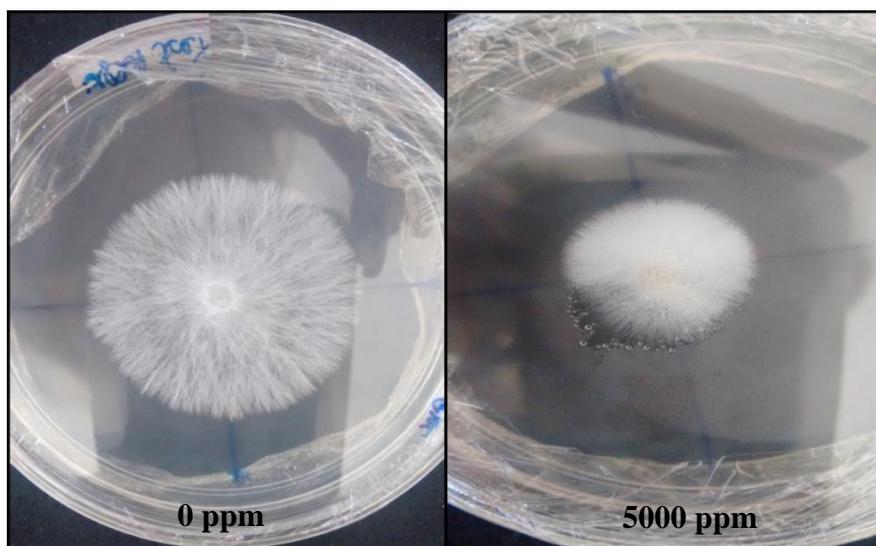


FIGURA 20. Desenvolvimento radial do fungo *Sclerotium rolfsii* a partir de discos de micélio sob meio batata-dextrose-ágar (BDA) (0 ppm) e desenvolvimento apical na concentração de 5000 ppm de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), período de avaliação 72 horas. Dourados-MS, UFGD, 2016.

De acordo com Silva (2014), os sinais que controlam a germinação e o crescimento apical incluem a percepção das condições ambientais e a presença de fontes de nutrientes. Considerando a diversidade dos fungos, é plausível a existência de mecanismos de percepção e controle, bem como o envolvimento de vias diversas de sinalização celular e variedade nas respostas. Para Bahn et al. (2007) os fungos possuem mecanismos de detecção e respostas a diferentes tipos de estresse, incluindo choque osmótico, temperatura, variações no pH, radiação ultravioleta, danos oxidativos e exposição a antifúngicos, mecanismos estes que são necessários para a sua sobrevivência.

Resultados semelhantes foram encontrados por Loureiro et al. (2011), na avaliação do desenvolvimento micelial em diferentes formas de inóculo de *S. rolfsii*

sobre a ação do pó de cúrcuma (*Curcuma longa*), o qual apresenta ação antimicrobiana. O estudo também foi delineado com dois experimentos, um com discos de micélio (0,5cm de diâmetro) em meio de cultura, e o outro, com escleródios do patógeno. Foram realizadas cinco avaliações, sendo a última 120h após a instalação dos experimentos. Os autores observaram que quando foram utilizados discos de micélio, a partir da quinta avaliação, os resultados não diferiram ao da quarta avaliação, pois o patógeno passou a ter desenvolvimento micelial aéreo, devido às condições inóspitas do meio de cultura. Concluem que, em função desse experimento, é possível afirmar que a cúrcuma interfere negativamente no crescimento micelial do *S. rolfsii*.

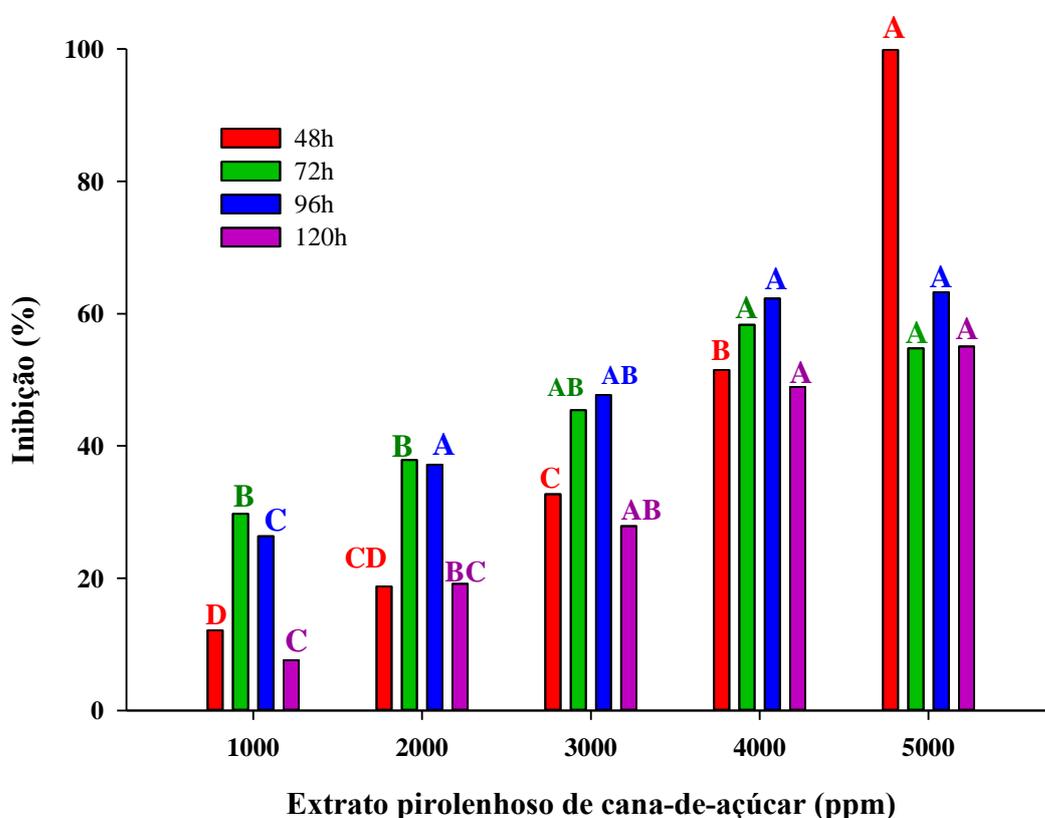


FIGURA 21. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do fungo *Sclerotium rolfsii* a partir de discos de micélio sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), avaliados por 48, 72, 96 e 120 horas. Dourados-MS, UFGD, 2016. Barras seguidas pela letra maiúscula de mesma cor indicam que as médias não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5 %.

Com o passar do tempo, devido à limitação dos nutrientes, o patógeno iniciou o crescimento radial, desenvolvendo-se no meio de cultura em que foram adicionadas as diferentes concentrações do EP. Segundo Silva (2014), a ramificação das hifas é um fenômeno importante, pois aumenta a superfície da colônia e, desta forma, aumenta a assimilação dos nutrientes. Assim, nos períodos de avaliações seguintes (96 e 120 horas) verificou-se que, com o aumento das concentrações, houve redução linear no diâmetro das colônias. Nos tratamentos de 4000 e 5000 ppm, o crescimento micelial foi menor, resultando em colônias de menor diâmetro, comprovando a ação fungistática do extrato, o qual dificultou o desenvolvimento do fungo. O aspecto geral do crescimento micelial diário dos discos de micélio de *S. rolfii* em diferentes concentrações de EP de cana-de-açúcar pode ser observado na Figura 22.

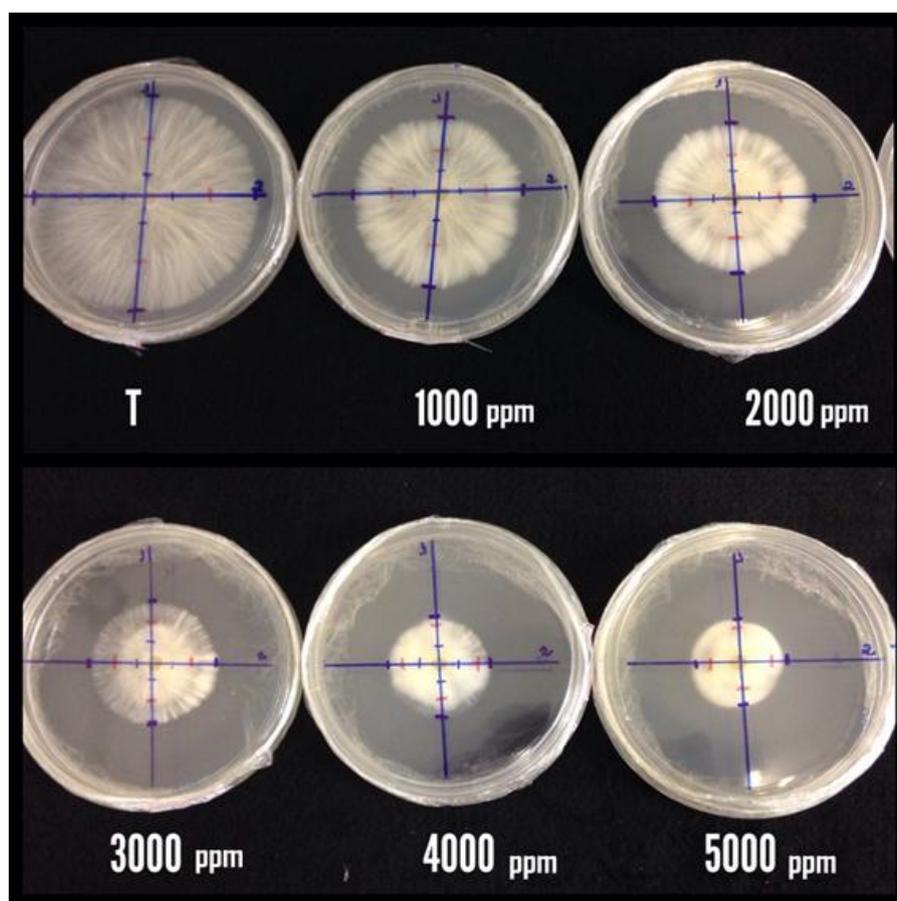


FIGURA 22. Aspecto geral do crescimento micelial *in vitro* dos discos de micélio de *Sclerotium rolfii* na presença de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), no terceiro período de avaliação (96 horas). Dourados-MS, UFGD, 2016.

Para a variável velocidade de crescimento micelial houve redução linear conforme as concentrações aumentaram (Figura 23). A testemunha apresentou índice médio de 25,70 e nas doses de 4000 e 5000 ppm o índice reduziu para 12,29 e 10,09, respectivamente, redução de 52 e 61% na velocidade de desenvolvimento do fungo.

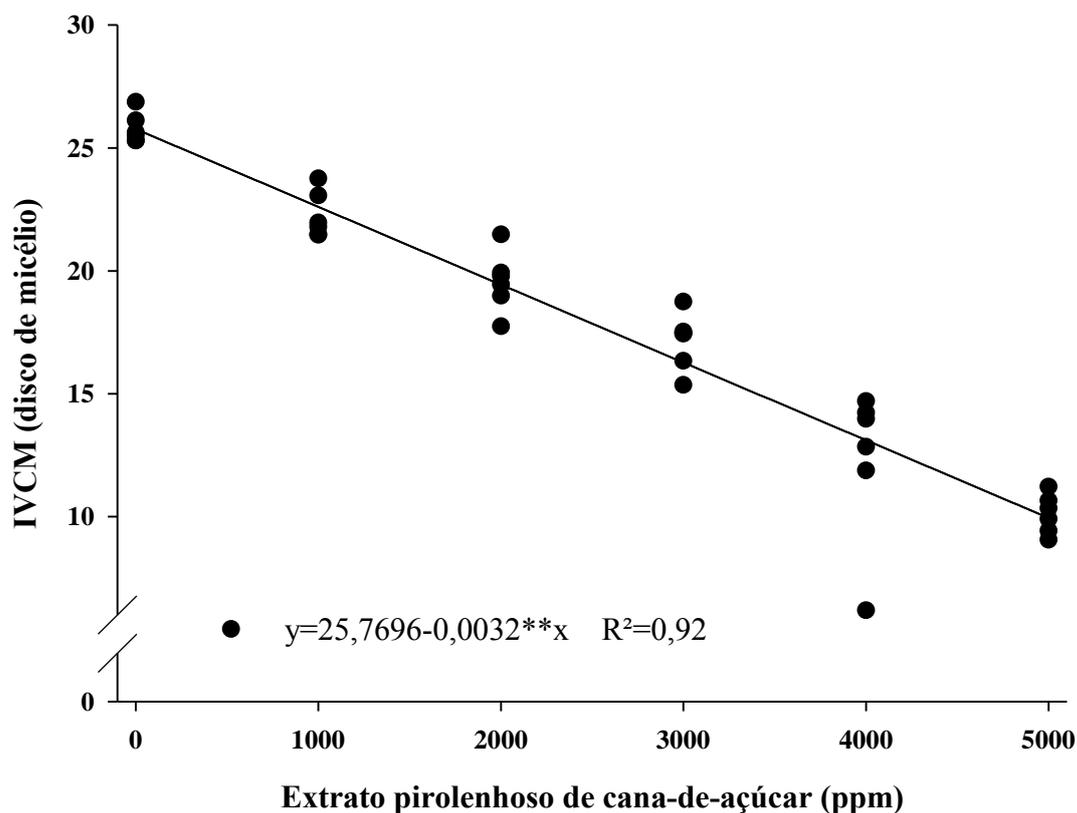


FIGURA 23. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo *Sclerotium rolfii* a partir de discos de micélio sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). Dourados-MS, UFGD, 2016.

Resultados semelhantes foram encontrados por Donde et al. (2013), na avaliação do efeito *in vitro* de extratos vegetais sobre o crescimento micelial do fungo *Phytophthora* sp.. Dentre os extratos vegetais avaliados, os autores analisaram diferentes concentrações do EP de teca (*Tectona grandis*) e também verificaram que a maior velocidade de crescimento micelial ocorreu na dose 0 (zero), com índice de 0,74, enquanto que para a dose de maior concentração (2 mL) o índice reduziu para 0,19, ou seja, redução significativa no desenvolvimento do patógeno sob a ação do EP. Para a

variável crescimento micelial constataram que, em todos os tratamentos, houve redução do crescimento médio micelial à medida que as doses foram elevadas, sendo a maior dose (2 mL) a mais fungitóxica. Desta forma, os autores concluem que o EP de teca e o extrato aquoso de gengibre (*Zingiber officinale*) foram os extratos vegetais que obtiveram os melhores resultados na inibição do crescimento micelial do fungo *Phytophthora* sp. apresentando grande potencial de exploração na área fitossanitária.

Na avaliação do desenvolvimento micelial a partir de escleródios, igualmente ao resultado para os discos de micélio, verificou-se que na maior concentração, 5000 ppm, no primeiro período de avaliação 48 horas, não houve crescimento micelial (Figura 24). Nos demais períodos de avaliações o crescimento aconteceu em todas as concentrações, porém reduzindo-se nas maiores, 4000 e 5000 ppm.

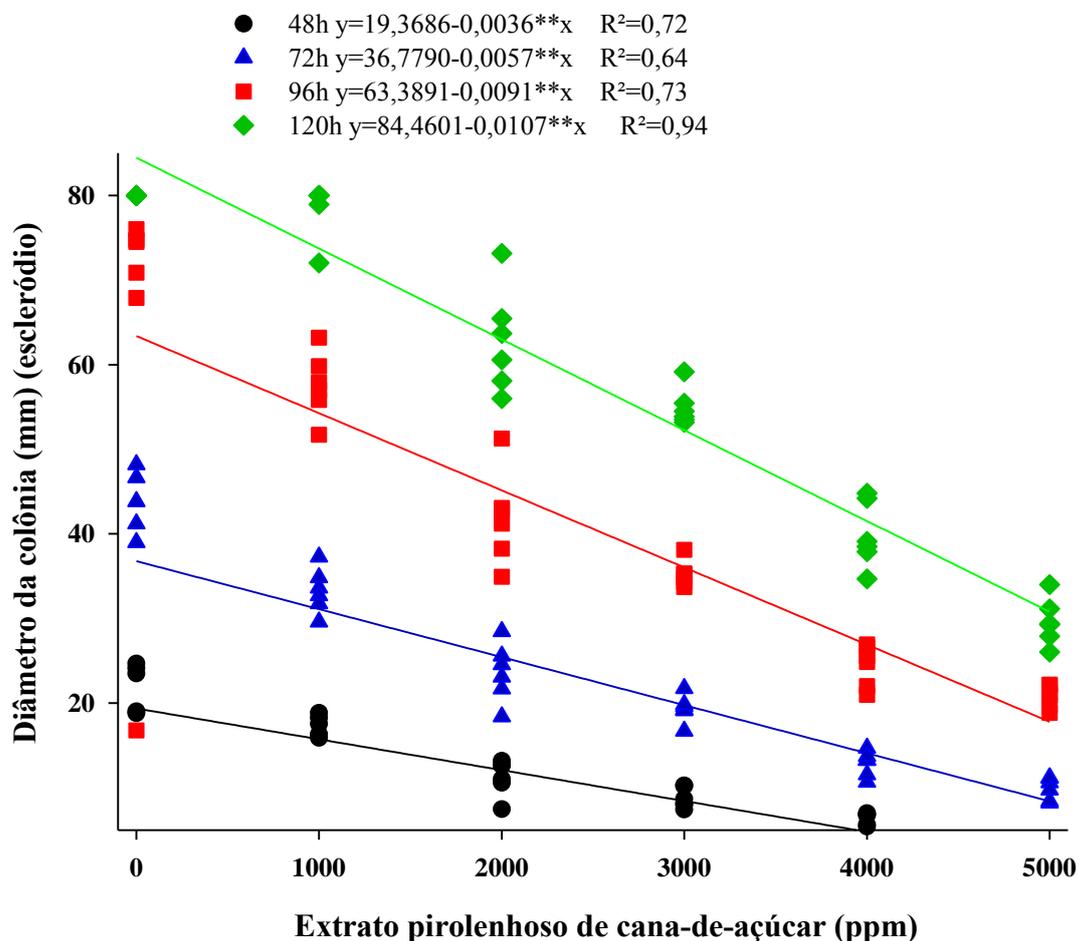


FIGURA 24. Crescimento micelial (mm) do fungo *Sclerotium rolfsii* a partir de escleródios sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), avaliados por 48, 72, 96 e 120 horas, Dourados-MS, UFGD, 2016.

No segundo período de avaliação, 72 horas, o maior diâmetro de colônia foi observado no tratamento testemunha (36,49 mm) e os menores diâmetros foram obtidos nas concentrações de 4000 e 5000 ppm, com valores de 12,86 e 9,88 mm, respectivamente. Para o último período de avaliação (120 horas), no tratamento testemunha, houve completa colonização das placas pelo patógeno (80 mm), reduzindo o diâmetro para 39,87 e 29,61 mm nas maiores concentrações (4000 e 5000 ppm).

Para a porcentagem de inibição do desenvolvimento micelial das colônias a partir de escleródios, observou-se que na primeira avaliação (48 horas) todas as concentrações inibiram o desenvolvimento do patógeno, sendo que a de maior valor, 5000 ppm, foi mais expressiva, promovendo 100% de inibição fúngica (Figura 25).

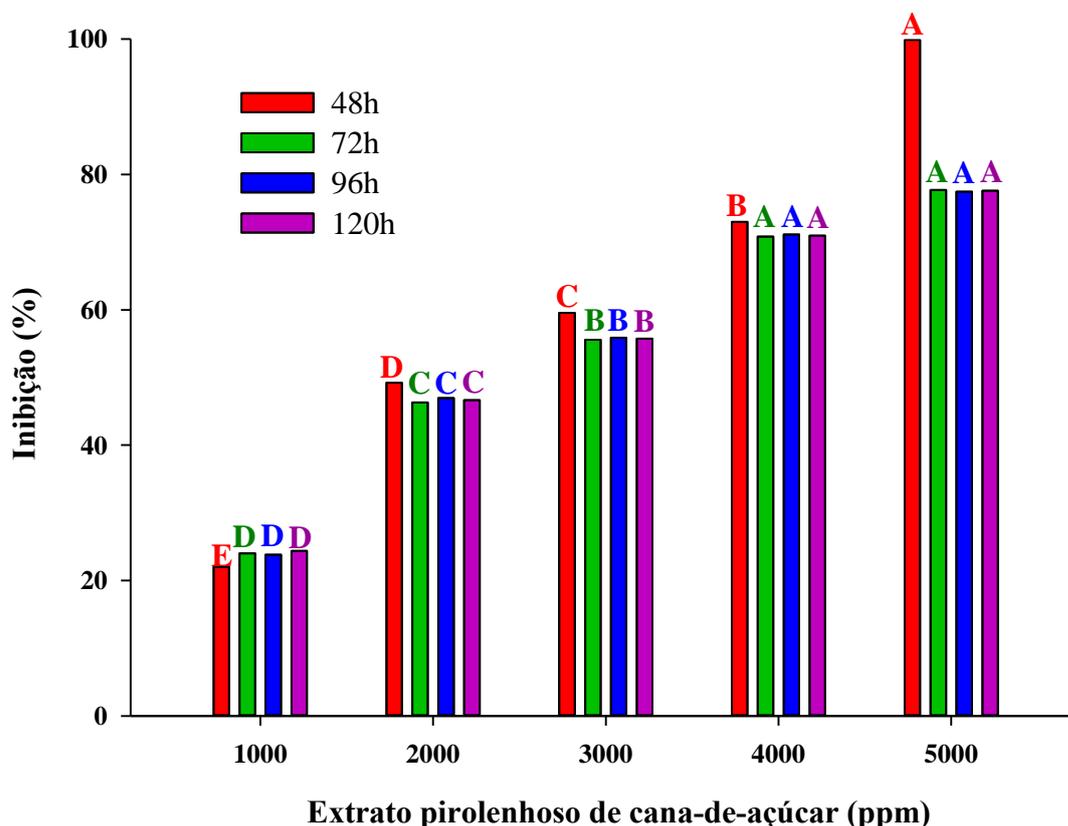


FIGURA 25. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do fungo *Sclerotium rolfisii* a partir de escleródios sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), avaliados por 48, 72, 96 e 120 horas. Dourados-MS, UFGD, 2016. Barras seguidas pela letra maiúscula de mesma cor indicam que as médias não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5 %.

Nas concentrações de 4000, 3000 e 2000 ppm a inibição do crescimento do fitopatógeno foi de 73%, 59% e 49%, respectivamente (primeiro período de avaliação). A concentração de 1000 ppm produziu porcentagem de inibição de 21%. A partir de 72 horas houve redução na porcentagem de inibição do crescimento micelial nas concentrações de 2000, 3000, 4000 e 5000 ppm.

O desenvolvimento fúngico a partir de escleródios ocorreu de forma radial e aérea conforme foram submetidos às diferentes concentrações de EP de cana-de-açúcar (Figura 26). Nos tratamentos de 3000, 4000 e 5000 ppm, observou-se que o desenvolvimento do fungo tendeu ao aéreo, devido ao patógeno obter os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento a partir das reservas da estrutura de sobrevivência, o escleródio, sem se desenvolver no meio de cultura com adição do extrato. Este fato justifica a estabilização da porcentagem de inibição nos períodos de 72, 96 e 120 horas.

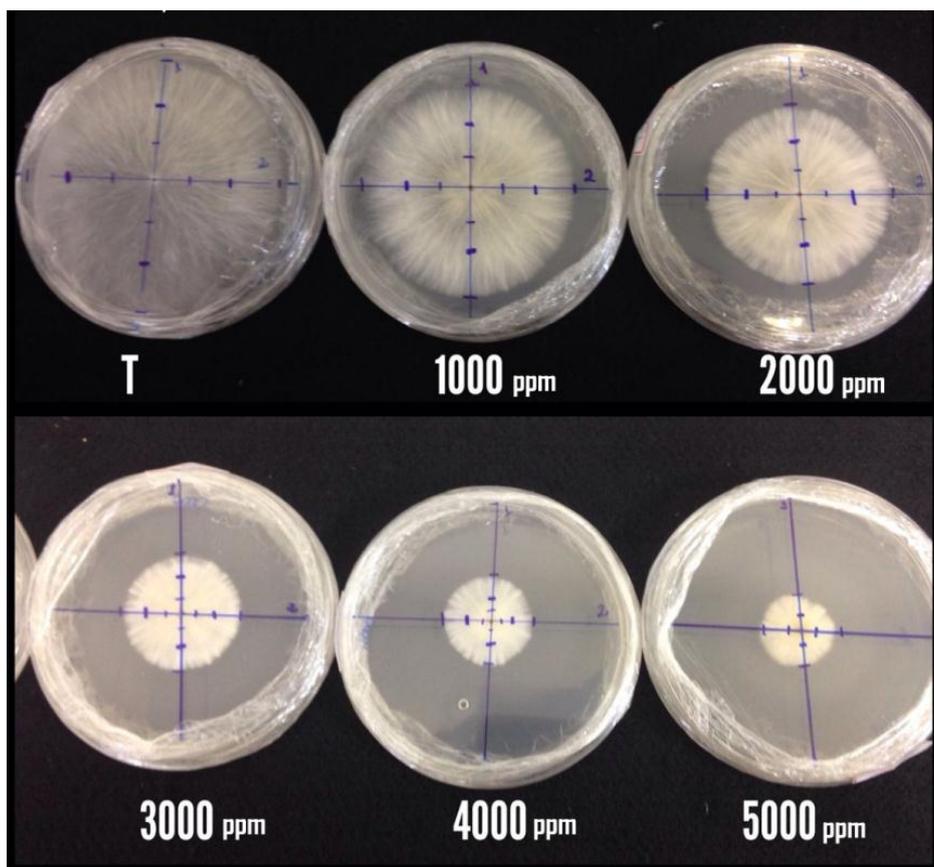


FIGURA 26. Aspecto geral do crescimento micelial *in vitro* do fungo *Sclerotium rolfsii* a partir de escleródios na presença de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), no terceiro período de avaliação (96 horas). Dourados-MS, UFGD, 2016.

Chagas (2012) avaliou produtos alternativos ao uso de fungicidas comerciais, como: extrato etanólico de melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* - folhas e caule); extrato etanólico de laranja (*Citrus sinensis*); extrato etanólico de nim (*Azadirachta indica*); extrato pirolenhoso; álcool 70% e hipoclorito de sódio a 2%, no controle *in vitro* do fungo *Amphobotrys ricini* e também encontrou resultados positivos com o uso do EP. O extrato etanólico do caule de *M. charantia* (melão-de-são-caetano) (1,66 cm) e o EP (1,58 cm) foram os que controlaram o crescimento micelial do isolado de *A. ricini*, quando comparados à testemunha (2,41 cm). Na concentração de 2000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , o extrato do caule de *M. charantia* e o EP mantiveram o efeito inibitório no controle do crescimento micelial do patógeno, apresentando valores de 0,5 cm e 0,61 cm, respectivamente. Para o autor, o tratamento com o produto comercial a base de EP foi o que apresentou os melhores resultados em todas as concentrações testadas.

Para a velocidade do crescimento micelial a partir de escleródios, igualmente ao experimento com discos de micélio, houve redução linear à medida que as concentrações aumentaram (Figura 27). A testemunha apresentou índice médio de 25,27 reduzindo para 7,78 na maior concentração, redução essa de 70%. O EP de cana-de-açúcar apresentou resultados satisfatórios na redução do IVC, uma vez que, na maior concentração os valores apresentaram-se próximos ao controle total do patógeno.

Na análise estatística para verificação de qual forma de inóculo sofreu maior inibição no desenvolvimento fúngico pela ação do EP de cana-de-açúcar, não houve diferença entre as formas de inóculo estudadas. Conclui-se que a forma de inóculo (disco de micélio e escleródio) não interfere na ação do EP, pois em ambos os experimentos o extrato produziu efeito significativo na redução da velocidade de crescimento, no diâmetro de colônia e maior porcentagem de inibição do patógeno na concentração de 5000 ppm.

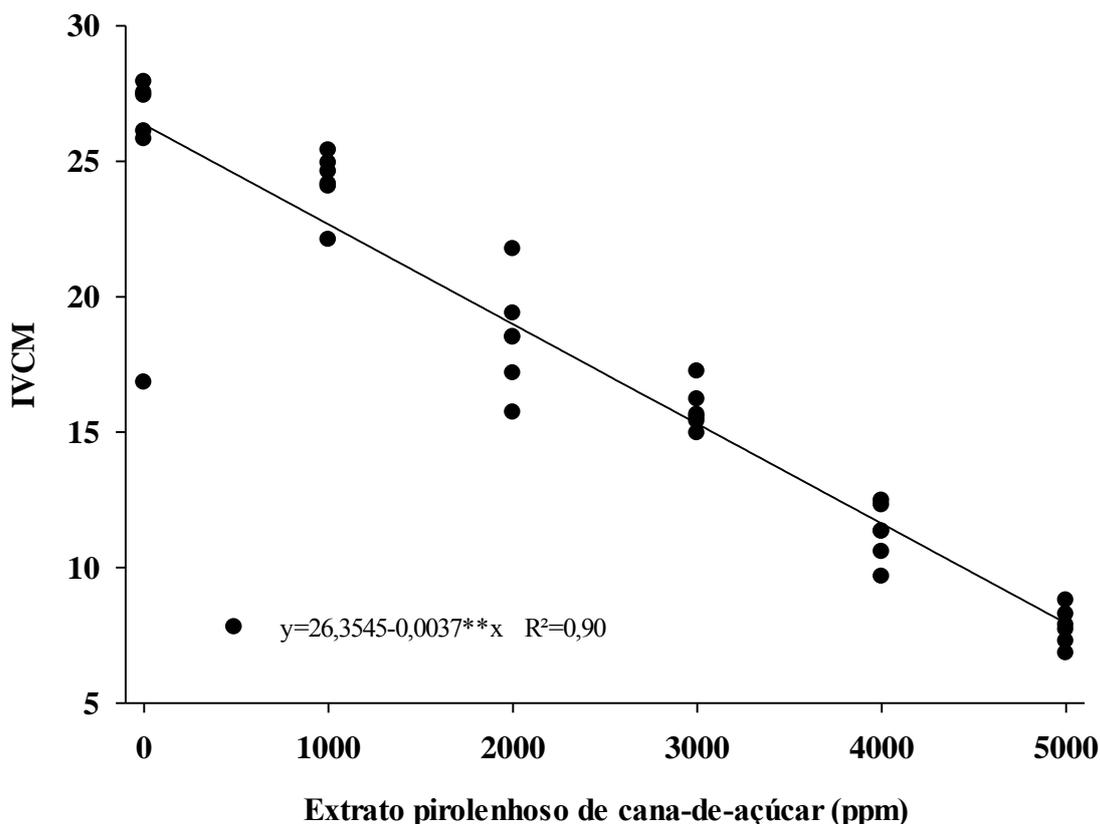


FIGURA 27. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo *Sclerotium rolfsii* a partir de escleródios sob influência de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). Dourados-MS, UFGD, 2016.

#### 4.3 Avaliação da germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* sob o extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar

A primeira avaliação iniciou 39 dias após a instalação do experimento (DAI), momento em que foi observada a formação de apotécios nos escleródios da testemunha ágar-água. Não houve efeito significativo nas concentrações testadas para a germinação carpogênica na avaliação dos 39 e 42 DAI (Figura 28). Para todas as avaliações a partir de 46 dias após incubação, foram observadas diferença significativa na germinação carpogênica entre os tratamentos avaliados. Houve redução linear à medida que a concentração do extrato aumentou.

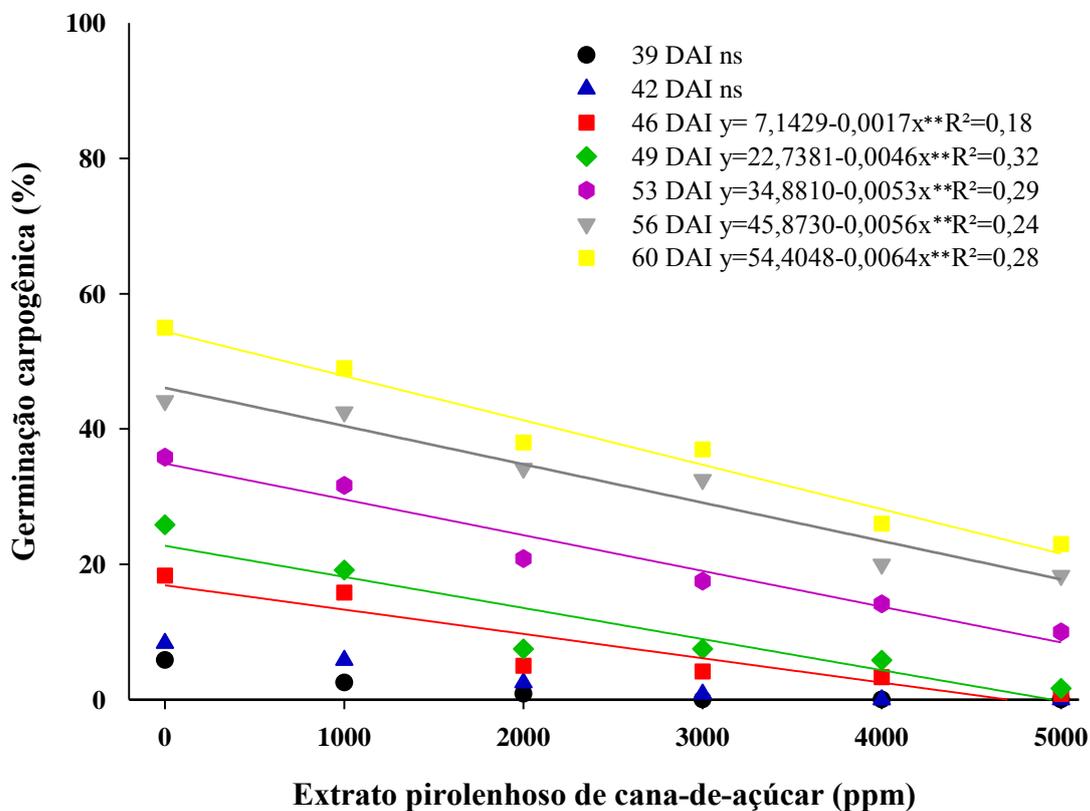


FIGURA 28. Porcentagem de escleródios germinados com formação de apotécios sob efeito de diferentes concentrações do extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). Dourados-MS, UFGD, 2016.

Silva et al. (2011), na avaliação da germinação carpopogênica de *S. sclerotiorum* sob diferentes resíduos de plantas cultivadas e seus extratos, encontraram resultados semelhantes aos deste estudo. Os autores verificaram que, independente se por resíduos ou extratos/partições, a supressão da germinação carpopogênica apresentou-se permanente, com caráter fungicida. Também constataram que todos os extratos dos resíduos das plantas com suas diferentes partições influenciaram negativamente na germinação carpopogênica.

Um padrão semelhante à porcentagem de germinação foi observado para o número de estipes por escleródio (Figura 29). Verificou-se que em ambos os períodos de avaliações houve redução gradual no número de estipes conforme as concentrações

do EP de cana-de-açúcar foram aumentadas. Na primeira avaliação, aos 39 dias após a incubação, verificou-se que as concentrações afetaram negativamente na formação dos primórdios. Os escleródios que foram submetidos à concentração de 5000 ppm, não apresentaram desenvolvimento de estipes. Aos 42, 46 e 49 DAI houve redução linear no número de estipes formadas por escleródio, conforme as concentrações do extrato foram aumentadas. Aos 53 dias após incubação, as menores concentrações (1000 e 2000 ppm) não apresentaram efeito de redução na formação de estipes nos escleródios. Nas concentrações 3000, 4000 e 5000 ppm, a formação de estipes foi menor. A partir de 56 e 60 DAI, não houve efeito significativo entre os tratamentos.

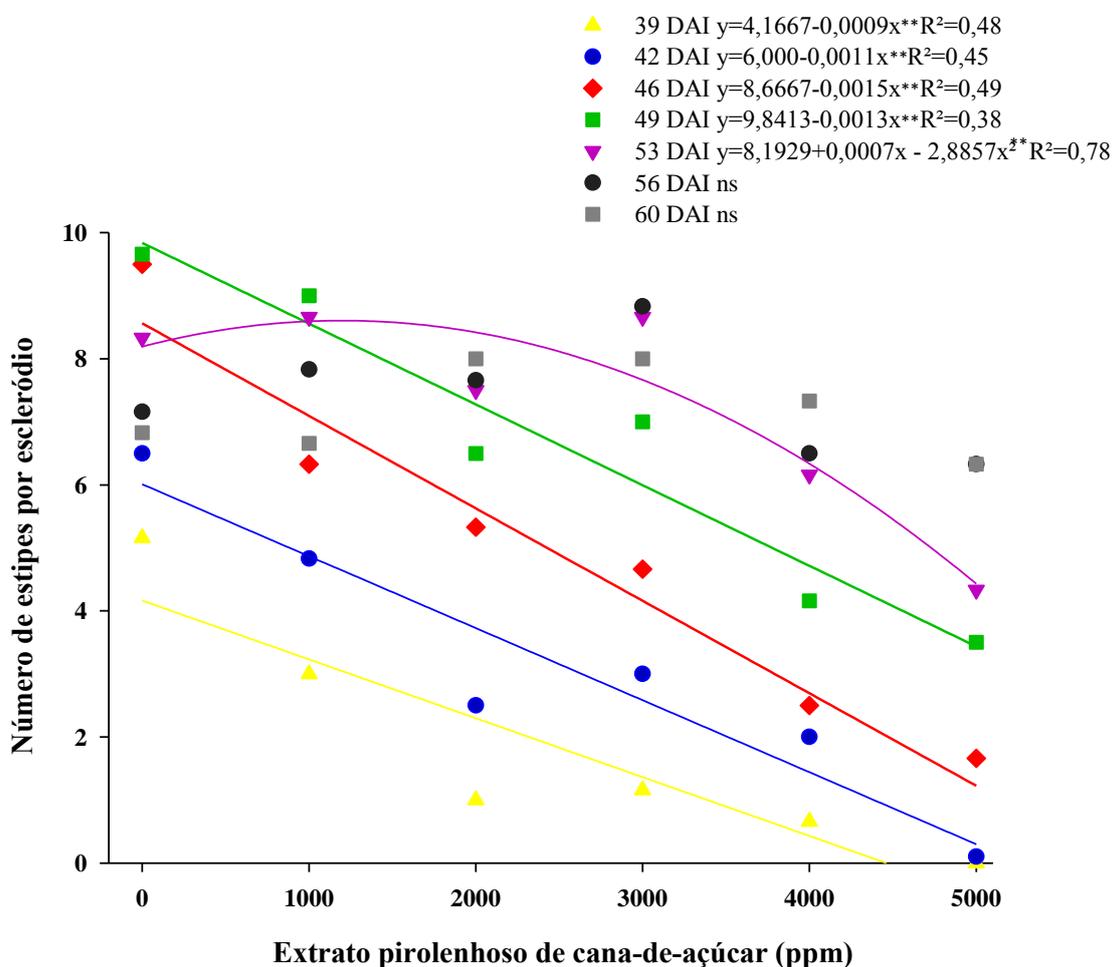


FIGURA 29. Número de estipes formadas por escleródio sob efeito de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). Dourados-MS, UFGD, 2016.

Com relação ao número médio de apotécios formados por escleródio, observou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos para a primeira avaliação (39 DAI). Para os demais dias, verificou-se que houve redução linear na formação de apotécios por escleródios com o aumento das concentrações. Aos 42, 46 e 49 dias após incubação, não houve desenvolvimento de apotécios nas concentrações de 4000 e 5000 ppm (Figura 30).

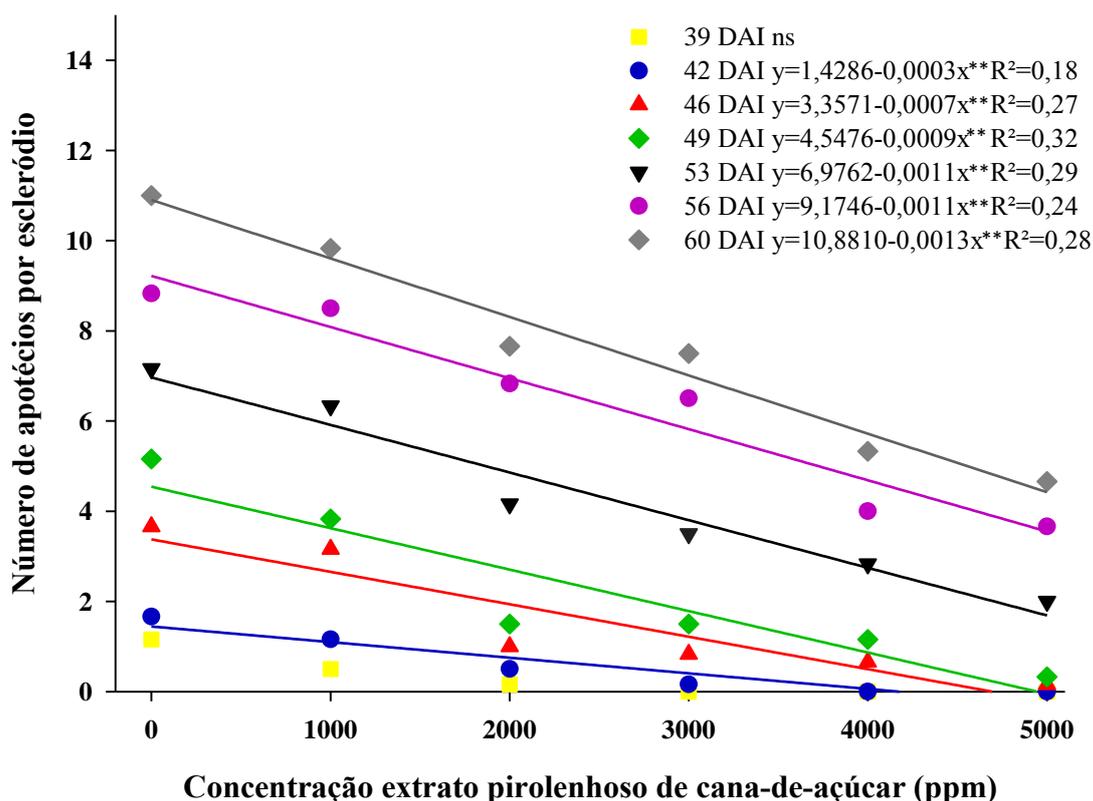


FIGURA 30. Número de apotécios formados por escleródio sob efeito de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). Dourados-MS, UFGD, 2016.

Observou-se que o EP de cana-de-açúcar não inibiu a formação de estipes, mas dificultou a sua diferenciação para apotécio principalmente na concentração de 5000 ppm. Verificou-se que em algumas unidades experimentais, onde os escleródios foram submetidos à concentração de 5000 ppm, ocorreu o desenvolvimento de estipes com ramificações (Figura 31). Constatou-se que, embora o EP não tenha inibido a formação de estipes na maior concentração, o mesmo não permitiu, em sua maioria, o desenvolvimento de apotécios conforme foram passando os dias após a instalação do

experimento (Figuras 31 e 32). Quando houve a formação dos apotécios, os mesmos entraram em senescência em seguida.

Resultados encontrados por Huang e Blackshaw (1995) corroboram com os achados neste estudo. Na avaliação do efeito de herbicidas na germinação carpogênica, os autores verificaram que o herbicida atrazina, apesar de promover emissão de estipes, provocou a formação de apotécios anormais. A estipe não se diferenciou em apotécio na forma discoide, mas sofreu ramificação em estipes secundárias. Estas deram origem a apotécios anormais, de forma globosa e filamentososa, as quais, de acordo com microscopia realizada, mostraram poucos ascos com ascósporos. Outros autores relataram que herbicidas do grupo das triazinas também levou ao desenvolvimento de apotécios anormais e que, na maioria dos casos, não houve a expansão do apotécio em sua forma discoide, evitando a disseminação do fungo (RADKE e GRAU, 1986). Oliveira (2005) também encontrou que o uso de herbicidas, embora não influenciando na formação de estipes, não permitiram o desenvolvimento de apotécios e ascósporos, prejudicando a propagação do fungo.

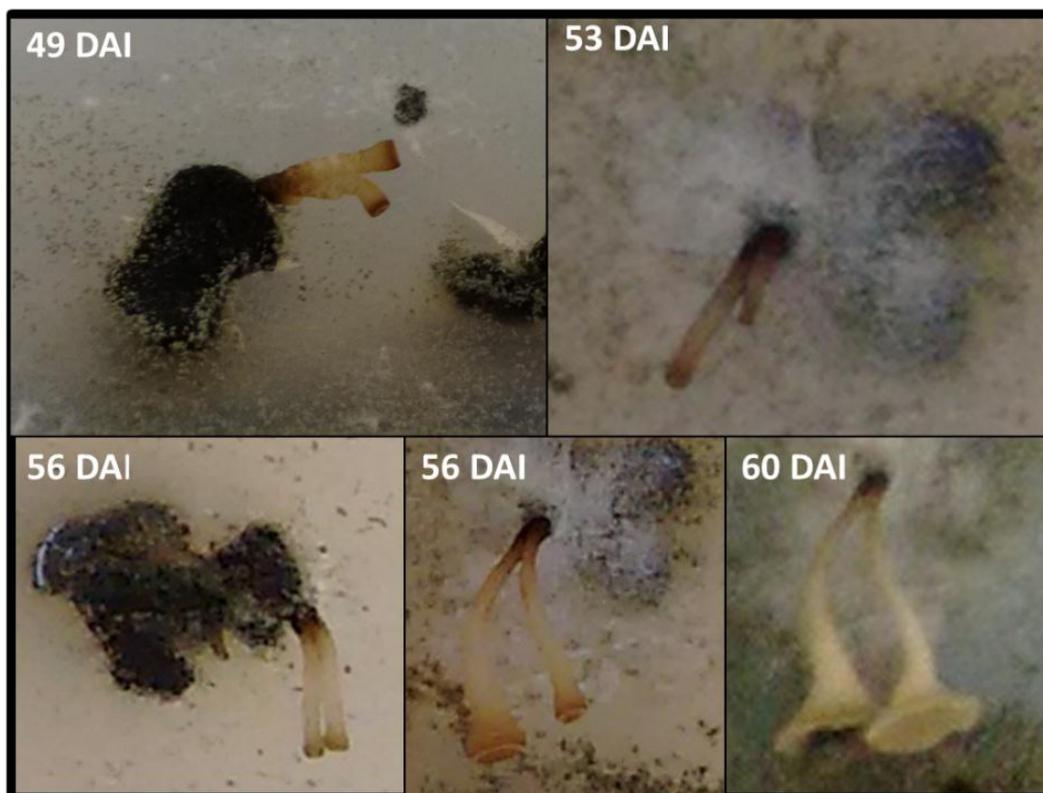


FIGURA 31. Estipes com ramificações em escleródios submetidos à concentração de 5000 ppm de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar nos diferentes períodos de avaliação após a instalação do experimento (DAI). Dourados-MS, UFGD, 2016.

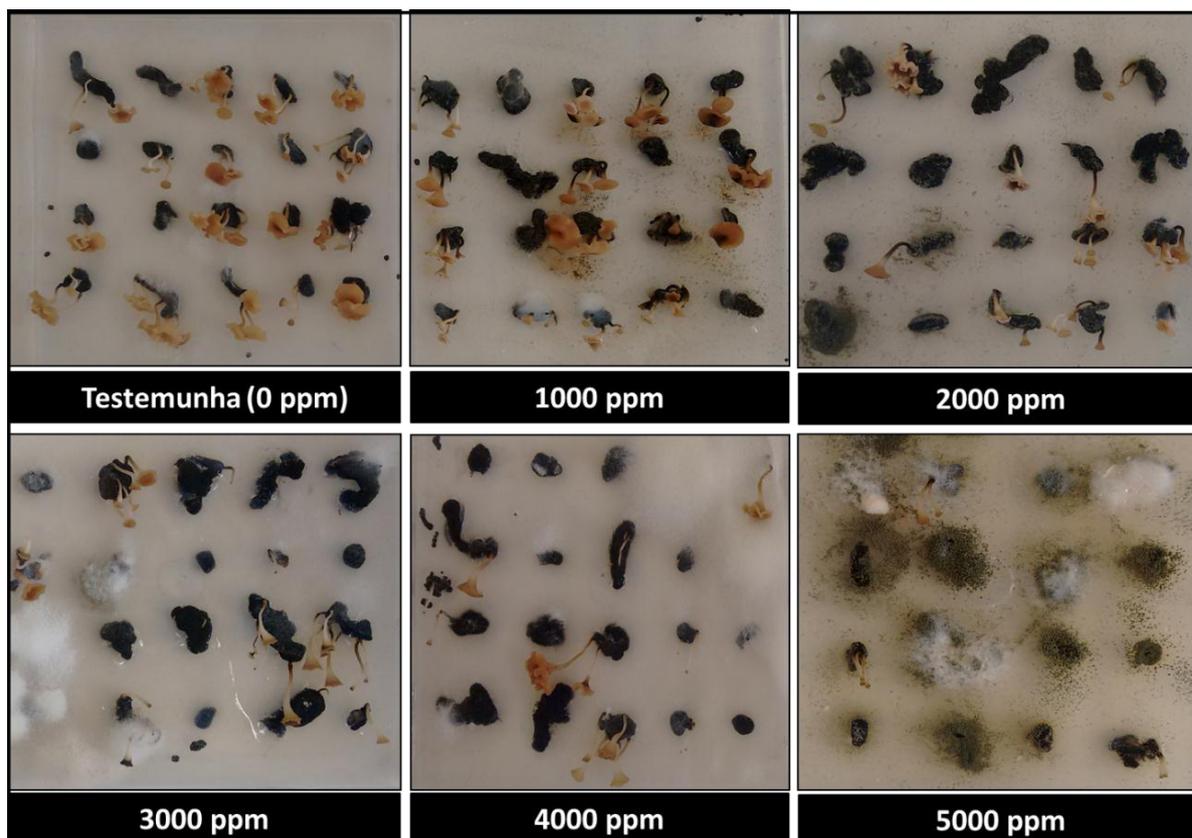


FIGURA 32. Germinação carpogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, aos 56 dias após a instalação do experimento (DAI), submetidos a diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar. Dourados-MS, UFGD, 2016.

Vrisman et al. (2014), avaliando o efeito inibitório de herbicidas e fungicidas sobre a germinação carpogênica de escleródios do fungo *S. sclerotiorum*, observaram que tanto os herbicidas quanto os fungicidas proporcionaram redução na germinação. Porém, os tratamentos com os fungicidas apresentaram as menores porcentagens de germinação dos escleródios e proporcionaram a maior formação de estipes inviáveis.

Costa e Costa (2004), na determinação do efeito de fungicidas sobre a germinação carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum* no solo, sob condições controladas, verificaram que dentre os fungicidas avaliados o vinclozolin foi o produto mais eficiente, apresentando 100% de inibição na formação de estipes e apotécios. O fungicida fluazinan permitiu apenas a formação de estipes inviáveis, resultando na ausência de apotécios. Desta forma, é importante ter conhecimento sobre o efeito dos

produtos que apresentam caráter fungicida sobre a viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum*, uma vez que o fungo é agressivo, com várias formas de infecção.

A eficiência desses produtos no ciclo biológico do fungo pode influenciar na redução da densidade de inóculo no solo, inibindo tanto a germinação miceliogênica quanto a carpogênica dos escleródios. Essas observações quando encontradas em condições de campo, são interessantes no sentido em que podem contribuir para a redução da fonte de inóculo na forma de ascósporos (COSTA e COSTA, 2004). No presente estudo, o EP na concentração de 5000 ppm apresentou atuação semelhante aos dos fungicidas citados. Não inibiu a formação de estipes, mas quando formadas, as mesmas apresentaram-se inviáveis. Desta forma, sugere-se que o EP de cana-de-açúcar apresenta componentes como o ácido acético e os compostos fenólicos, já mencionados anteriormente, que interferem na germinação carpogênica do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, dificultando e modificando o desenvolvimento de estipes, conseqüentemente, reduzindo a formação de apotécios, conferindo ao extrato o caráter de fungicida.

É importante ressaltar que pesquisas *in vivo* devem ser realizadas para a comprovação da eficiência dos extratos pirolenhosos de cana-de-açúcar e eucalipto. Sugere-se avaliar a resposta dos mesmos quando em interação com os fatores ambientais em situações de cultivo a campo.

## 5 CONCLUSÕES

Conclui-se que a concentração de 5000 ppm dos EP de cana-de-açúcar e eucalipto apresentaram atividade antifúngica sobre *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum truncatum* e *Sclerotium rolfsii*. Os extratos em geral apresentaram fungitoxicidade nas diferentes concentrações e seu efeito foi maior nas primeiras horas de contato com os fungos. Na germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* o EP de cana-de-açúcar na concentração de 4000 e 5000 ppm promoveu redução na porcentagem de escleródios germinados, bem como reduziu o número de apotécios por escleródio.

## REFERÊNCIAS

ABAG, Associação Brasileira do Agronegócio. **O futuro da soja nacional: Impactos socioeconômicos da ferrugem asiática na cadeia da soja nos próximos dez anos.** Instituto de estudos do agronegócio, p. 1-28, 2015.

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology.** 5. ed. California: Elsevier Academic Press, 2004. 948p.

ALMEIDA, A. M. R.; SEIXAS, C. D. S.; FARIAS, J. R. B.; OLIVEIRA, M. C. N.; FRANCHINI, J. C.; DEBIASI, H.; COSTA, J. M.; GAUDÊNCIO, C. A. **Macrophomina phaseolina em soja.** Londrina: Embrapa Soja, 2014. (Documento n. 246).

ALMEIDA, M. B. B. **Bio-óleo a partir da pirólise rápida, térmica ou catalítica, da palha da cana-de-açúcar e seu co-processamento com gásóleo em craqueamento catalítico.** 2008. 167 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro- RJ.

ALMEIDA, R. S. R. **Potencial do extrato pirolenhoso da madeira de eucalipto como agente conservante de cosméticos e saneantes.** 2012. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba- SP.

ALVES, M.; CAZETTA, J. O.; NUNES, M. A.; OLIVEIRA, C. A. L.; COLOMBI, C. A. Ação de diferentes preparações de extrato pirolenhoso sobre *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 2, p. 382-385, 2007.

AMBRÓSIO, M. M. Q. **Sobrevivência de *Macrophomina phaseolina* em solo incorporado com brócolos seguido de solarização.** 2003. 58 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu- SP.

ANDRADE, G. C. G.; MESQUINI, R. M.; FIGUEIREDO, A. Manejo de doenças na cultura da soja. **Monsoy: informativos técnicos**, n.1, p. 1-11, 2016.

APAN - Associação de produtores de agricultura natural. **Extrato Pirolenhoso Abrangência e objetivos da norma.** 1990. Disponível em:< <http://ecopirol.com.br/normapan.pdf>>. Acesso em: 21 nov. 2016.

AULER, A. C. V.; CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* a *Sclerotium rolfsii* nas culturas do feijoeiro e soja. **Revista Agro Ambiente**, v. 7, n. 3, p. 359-365, 2013.

AZEVEDO, F. R.; GUIMARÃES, J. A.; BRAGA SOBRINHO, R.; LIMA, M. A. A. Eficiência de produtos naturais para o controle de *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em meloeiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n.1, p. 73-9, 2005.

AZEVEDO, F. R.; SANTOS, C. A. M.; NERE, D. R.; MOURA, E. S.; GURGEL, L. S. Inseticidas vegetais no controle de *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) em pomar de goiaba. **Holos**, v. 4, p. 77- 86, 2013.

BAHN, Y.; XUE, C.; IDNURM, A.; RUTHERFORD, J. C.; HEITMAN, J.; CARDENAS, M. E. Sensing the environment: lessons from fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v.5, p. 58-69, 2007.

BAIMARK, Y.; THREEPROM, J.; DUMRONGCHAI, N.; SRISUWAN, Y.; KOTSAENG, N. Utilization of wood vinegars as sustainable coagulation and antifungal agents in the production of natural rubber sheets. **Journal of Environmental Science and Technology**, v. 4, p. 157-163, 2008.

BARROS, G. E. G. **Avaliação da resistência de genótipos de soja a *Colletotrichum truncatum* e estudo da diversidade genética de isolados utilizando a técnica molecular RAPD**. 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade de Rio Verde, Rio Verde-GO.

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v.11, p.1-16, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 25, de 23 de julho de 2009. Normas sobre as especificações e as garantias, as tolerâncias, o registro, a embalagem e a rotulagem dos fertilizantes orgânicos simples, mistos, compostos, organominerais e biofertilizantes destinados à agricultura. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 25, Anexo V, jul. 2009.

BUENO, C. J. **Produção e preservação de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo**. 2004. 116 f. Tese (Doutorado em agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.

CAMPOS, A. D. Técnicas para produção de extrato pirolenhoso para uso agrícola. **Circular Técnica**. Embrapa: Embrapa Clima Temperado, n. 65, p. 8, 2007.

CAMPOS, A. D.; ANTUNES, L. E. C.; FORTES, J.; OSÓRIO, V. A. Potencial do extrato de *Cymbopogon citratus* e extrato pirolenhoso para induzir resistência do morangueiro. In: CONGRESSO NACIONAL DE HORTIFRUTICULTURA, 10., 2005, Montevideo. **Anais...** Montevideo: Sociedad Uruguya Hortifruticultura, 2005.

CARVALHO, L. C.; FERREIRA, F. M. F.; BUENO, N. M. Importância econômica e generalidades para o controle da lagarta falsa-medideira na cultura da soja. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, p. 1022-1034, 2012.

CHAGAS, H. A. **Caracterização de *Amphobotrys ricini*, agente causal do mofo-cinzento da mamoneira (*Ricinus communis* L.), avaliação de genótipos, controle químico e alternativo**. 2012. 111 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira grãos safra 2016/17**. v. 4, n. 1, p. 1-162, 2016.

COSTA, G. R.; COSTA J. L. S da. Efeito da aplicação de fungicidas no solo sobre a germinação carpopôgica e miceliogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 34, n.3, p. 133-138, 2004.

CUNHA, W. G. **Resistência a *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de soja geneticamente modificadas para expressar o gene da oxalato descarboxilase de *Flammulina velutipes***. 2010. 96 f. Tese (Doutorado em biologia molecular) - Universidade de Brasília, Brasília.

DONDE, A. R.; RODRIGUES, C.; BAMBOLIM, A.; DAVID, G. C.; PERES, W. M. Avaliação *in vitro* de extratos vegetais no desenvolvimento micelial de *Phytophthora* sp. In: SEMINÁRIO DE BIODIVERSIDADE E AGROECOSSISTEMAS AMAZÔNICOS, 1., 2013, Alta Floresta. **Anais...** Alta Floresta, MT: PPGBioAgro, 2013, p. 1-7.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Tecnologias de Produção de Soja – Região Central do Brasil 2012 e 2013**. Sistemas de Produção, n. 15, 2011.

ENGASP. **Estudo para o aproveitamento dos extratos pirolenhosos e as suas aplicações agrícolas**. Ibero Massa Florestal: projeto, n. 34001, 2014. Disponível em:< <http://www.imflorestal.com/wp-content/uploads/2016/01/1.6.-Estudo-para-o-aproveitamento-dos-extractos-pirolenhosos-e-as-suas-aplicac%CC%A7o%CC%83es-agri%CC%81colas.pdf>>. Acesso em: 08 mai. 2015.

FERREIRA, D. F. Programa SISVAR: **Sistema de Análise de Variância**. Versão 5.6. Lavras: DEX/UFLA. 2003.

FREITAS, M. C. M. A cultura da soja no Brasil: o crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 12, p. 1-12, 2011.

GALLI, J. A.; PANIZZI, R. C.; VIERA, R. D. Resistência de variedades de soja à morte de plântulas causada por *Colletotrichum truncatum*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 2, p. 163-165, 2007.

GARCIA, R. A.; JULIATTI, F. C.; CASSEMIRO, T. A. Produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) de Bary em meio de cultura. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 1-7, 2012.

GOMES, C. J. A. ***Macrophomina phaseolina* em Soja – Padrão de Ocorrência, Danos e Aspectos Físico-Químicos e Biológicos do Solo Relacionados à Doença**. 2014. 48 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Norte do Paraná, Bandeirantes-PR.

GOMEZ, E. O.; CORTEZ, L. A. B.; PEREZ, J. M. M.; SEYE, O.; LINERO, F. A. B. Projeto de pirólise rápida contínua de biomassa com ar em reator de leito fluidizado atmosférico. **Encontro de Energia no Meio Rural** v.2, n.3, 2000. Disponível em:< [http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=MSC000000002200000200020&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=MSC000000002200000200020&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 01 fev. 2017.

GRIGOLLI, J. F. J. Manejo de Doenças na Cultura da Soja. **Tecnologia e Produção: Soja 2013/2014**. Fundação MS, 2014.

HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M. G.; JACCOUD FILHO, D. S.; PANOBIANCO, M. Incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja e sensibilidade dos testes de detecção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 6, p. 763-768, 2012.

HENNING, A. A. Manejo de doenças da soja (*Glycine max* L. Merrill). **Informativo ABRATES**, v. 19, n. 3, p. 09-12, 2009.

HIGASHINO, T.; SHIBATA, A.; YATAGAI, M. Basic study for establishing specifications for wood vinegar by distillation: study of regulations and reproducibility of compounds contained in distilled wood vinegar. **Journal of the Japan Wood Research Society**, v. 51, n. 3, p. 180-188, 2005.

HUANG, H. C.; BLACKSHAW, R. E. Influence of herbicides on the carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 36, p. 59-64, 1995.

JUNG, K. Growth inhibition effect of piroligneous acid on pathogenic fungus, *Alternaria mali*, the agent of alternaria blotch of apple. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 12, p. 318-322, 2007.

KARTAL, S. N.; IMAMURA, Y.; TSUCHIYA, F.; OHSATO, K. Preliminary evaluation of fungicidal and termiticidal activities of filtrates from biomass slurry fuel production. **Bioresource Technology**, v. 95, n.1, p. 41-47, 2004.

KREYCI, P. F.; MENTEN, J. O. M. Limitadoras de produtividade. **Revista cultivar grandes culturas**. Caderno técnico: soja, n. 167, 2013.

LEITE, R. M. V. B. C. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. **Comunicado técnico**. Londrina: Embrapa soja, n. 76, p. 1-3, 2005.

LINHARES, C. M. S.; FREITAS, F. C. L.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; CRUZ, B. L. S.; DANTAS, A. M. M. Efeito de coberturas do solo sobre a sobrevivência de *Macrophomina phaseolina* no feijão-caupi. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 2, p. 155-159, 2016.

LORENZETTI, E. R. **Interação patógeno – hospedeiro no patossistema capim limão – ferrugem das folhas e avaliação de ingredientes ativos naturais no controle da doença**. 2009. 89 F. Dissertação (Mestre em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.

LOUREIRO, C. F.; SILVA, F. A.; ACHILLES, K.; DORNELES, K.; ETHUR, L. Z. Desenvolvimento micelial em diferentes formas de inóculo de *Sclerotium rolfsii* sobre a ação de cúrcuma. In: SALÃO INTERNACIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 2., 2011, Bagé. **Anais...** Bagé, RS: Universidade Federal do Pampa, 2011.

MA, X.; WEI, Q.; ZHANG, S.; SHI, L.; ZHAO, Z. Isolation and bioactivities of organic acids and phenols from walnut shell pyroligneous acid. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 91, n. 2, p. 338-343, 2011.

MAEKAWA, K. Curso sobre produção de carvão, extrato pirolenhoso e seu uso na agricultura. Associação dos produtores de Agricultura natural-APAN. **Apostila**. 2002.

MARCUZZO, L.L.; SCHULLER, A. Sobrevivência e viabilidade de escleródios de *Sclerotium rolfsii* no solo. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 3, p. 281-283, 2014.

MARUMOTO, S.; YAMAMOTO, S. P.; NISHIMURA, H.; ONOMOTO, K.; YATAGAI, M.; YAZAKI, K.; WATANABE, T. Identification of a germicidal compound against picornavirus in bamboo pyroligneous acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 36, p. 9106-9111, 2012.

MELLO, A. F. S.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. Produtos alternativos na inibição de *Sclerotinia sclerotiorum* "in vitro". **Scientia Agricola**, v. 62, n. 2, p. 179-183, 2005.

MENEGALE, V. L. C. **Estudo do potencial do licor pirolenhoso como aditivo em condicionador de solo e no crescimento inicial de eucalipto**. 2013. 100 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.

MIYASAKA, S.; OHKAWARA, T.; UTSUMI, B. Ácido Pirolenhoso: uso e fabricação. **Boletim AgroEcológico**, n. 14, 1999.

NASSER, L. C. B.; BOLAND, G. J.; SUTTON, J. C. Meio de cultura semi-seletivo para detecção da viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, supl., p. 376, 1995.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus L.*) e pimentão (*Capsicum annuum L.*)**. 1991. 111p. Dissertação (Mestrado – Área de Concentração em Fitossanidade) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

OLIVEIRA, S. H. F. Manejo do mofo branco. **Revista DBO Agrotecnologia**. v. 2, n. 4, p. 6-7, 2005.

PACHECO, K. R. **Avaliação de *Trichoderma* e de fosfito no controle de *Sclerotium rolfsii* agente da murcha-de-esclerócio em feijoeiro**. 2012. 88 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Brasília, Brasília.

PESQUEIRA, A. S. **Controle químico da antracnose da soja e sanidade de sementes**. 2013. 66 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS.

PRANDO, M. B. **Efeito do tratamento químico na qualidade sanitária e fisiológica de sementes de soja infectadas por *Sclerotinia sclerotiorum***. 2014. 68 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.

RADKE, V. L.; GRAU, C. R. Effects of herbicides on carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 70, n.1, p. 19-23, 1986.

RIBEIRO, J. G.; SERRA, I. M. R. S.; ARAÚJO, M. U. P. Uso de produtos naturais no controle de antracnose causado por *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 2, p. 160-164, 2016.

RODRIGUES, C. **Uso de extrato pirolenhoso de teca (*Tectona grandis*) no controle alternativo in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides***. 2014. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos) - Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta- MT.

SAIGUSA, T. **Aplicação de extrato pirolenhoso na agricultura**: apostila Associação dos Produtores de Agricultura Natural - APAN, 2002.

SANTOS JUNIOR, A. C.; RODRIGUES, J. M. A.; OLIVEIRA, R.; RODRIGUES, C.; DAVID, G. Q.; PERES, W. M. Fungitoxidade do extrato pirolenhoso ao fungo *Rhizoctonia solani*. In: SEMINÁRIO DE BIODIVERSIDADE E AGROECOSSISTEMAS AMAZÔNICOS, 1., 2013, Alta Floresta. **Anais...** Alta Floresta, MT: PPGBioAgro, 2013.

SILVA, A. C.; LIMA, E. P. C.; BATISTA, H. R. A importância da soja para o agronegócio brasileiro: uma análise sob o enfoque da produção, emprego e exportação. In: ENCONTRO DE ECONOMIA CATARINENSE, 5., 2011, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, SC: UNESC, 2011.

SILVA, F. P. M. D.; GAVASSONI, W. L.; BACCHI, L. M. A.; GARCEZ, F. R. Germinação carpo-gênica de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes resíduos e extratos de plantas cultivadas. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 3, p. 131-136, 2011.

SILVA, T. J. **Crescimento apical e síntese de carboidrases em fungos filamentosos: uma análise bioquímica e morfológica**. 2014. 166 F. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina-MG.

SILVEIRA, C. M. S. **Influência do extrato pirolenhoso no desenvolvimento e crescimento de plantas de milho**. 2010. 93 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal-SP.

SOUZA JUNIOR, G. S.; KUPPER, K. C. Eficiência de extrato pirolenhoso no controle de patógenos de pós-colheita em frutos cítricos. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 7., 2013, Campinas, SP. **Anais...** 2013.

THEISEN, G.; CAMPOS, A. D.; NUNES, C. D.; LUCAS, M. K. Efeitos de extratos pirolenhosos utilizados como tratamento de sementes sobre doenças da fase inicial e crescimento de plântulas de soja. **Comunicado Técnico**. Embrapa: Embrapa Clima Temperado, n. 241, p. 1-4, 2010.

TSUZUKI, E.; MORIMITSU, T.; MATSUI, T. Effects of chemical compounds in pyroligneous acid on root rice plant. **Japan Journal Crop Science**, v. 66, n. 4, p. 15-16, 2000.

VENTUROSO, L. R. **Implicações da inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* em culturas bioenergéticas**. 2012. 68 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS.

VIANA, F. M. P.; SOUZA, N. L. Efeito da interação temperatura-tensão de água sobre a germinação de microescleródios de *Macrophomina phaseolina*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 3, p. 268-272, 2002.

VIEIRA, R. P.; MOKOCHINSKI, J. B.; PALMA, L. C.; LIDOINO, V. G.; HALASZ, M. R. T. Caracterização química do extrato pirolenhoso oriundo da carbonização. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 2014. Florianópolis, SC. Anais...** 2014.

VRISMAN, C.M.; HÜLLER, G.C.; SARTORI, F.F.; HENNEBERG, L.; WUTZKI, C.R.; JULIATTI, F.C.; JACCOUD FILHO, D.S. Influência de herbicidas e fungicidas na germinação carpogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (lib.) de Bary. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 2, p. 477- 483, 2014.

WEI, Q.; MA, X.; DONG, J. Preparation, chemical constituents and antimicrobial activity of pyroligneous acids from walnut tree branches. **Journal Anal Appl Pyrolysis**, v. 87, p. 24–28, 2010.

YATAGAI, M.; NISHIMOTO, M.; HORI, K.; OHIRA, T.; SHIBATA, A. Termiticidal activity of wood vinegar, its components and their homologues. **Journal of Wood Science**. v. 48, n. 4, p. 338-342, 2002.