

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

**FORMULAÇÃO E AVALIAÇÃO DE UM BIOHERBICIDA A
PARTIR DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA DO FUNGO**
Diaporthe sp.

TESE

THIAGO CASTRO DE ALMEIDA

Santa Maria, RS, Brasil
2019

**FORMULAÇÃO E AVALIAÇÃO DE UM BIOHERBICIDA A
PARTIR DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA DO FUNGO
*Diaporthe sp.***

THIAGO CASTRO DE ALMEIDA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Agrícola, Área de Concentração Engenharia Agroambiental,
da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito
para a obtenção do grau
Doutor em Engenharia Agrícola

Dr. MARCIO ANTONIO MAZUTTI

**Santa Maria, RS, Brasil
2019**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova o
Tese de Doutorado

**FORMULAÇÃO E AVALIAÇÃO DE UM BIOHERBICIDA A
PARTIR DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA DO FUNGO
*Diaporthe sp.***

elaborado por:
Thiago Castro de Almeida

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Engenharia Agrícola

Comissão Examinadora:

Marcio Antonio Mazutti, Dr. (Presidente/Orientador)

Sylvio Henrique Bidel Dornelles, Dr. (UFSM)

Jonas Arnemann, PhD. (UFSM)

Altemir José Mossi, Dr. (UFFS)

Danie Martini Sanchotene, Dr. (URI)

Santa Maria, RS, 15 de março de 2019.

Agradecimentos

Agradeço a meus pais, Orlofe Tomas Pereira de Almeida e Maria Elena Castro de Almeida, aos meus irmãos Carla D. Castro de Almeida e Tomas Antônio Castro de Almeida, e aos meus sobrinhos Mateus Castro de Almeida Isaia Enzo Castro de Almeida Bortoloto. Assim como agradeço toda minha família por sempre estar ao meu lado apoiando e ajudando, com uma especial lembrança, a minha tia/dinda Maria de Lourdes Ramos Castro, que hoje está no céu me iluminando e ajudando, como sempre fez quando presente na terra. Jamais esquecerei o amor, carinho e ensinamentos de minha dinda.

Agradeço a minha noiva e companheira Gabriela Brambatti, por todo seu carinho, amor, compreensão e incentivo desde o dia em que nos conhecemos.

Agradeço em especial ao professor Marcio Antônio Mazutti pela orientação, conselhos ao longo do mestrado e amizade.

Agradeço a todos os amigos da Biomonte. Em especial ao Danie Sanchotene por toda amizade e ensinamento.

Agradeço ao restante do corpo docente e aos funcionários pela amizade e apoio.

Agradeço a todos os amigos e amigas que ajudaram de alguma forma.

Agradeço a UFSM (Universidade Federal de Santa Maria) e a PPGEA (Pós Graduação em Engenharia Agrícola) pela estrutura física disponibilizada.

Almeida, Thiago

Formulação e avaliação de um bioherbicida a partir de fermentação submersa do fungo Diaporthe sp. / Thiago Almeida.- 2019.

76 p.; 30 cm

Orientador: Marcio Antonio Mazutti
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Engenharia Agrícola, RS, 2019

1. Diaporthe sp 2. bioherbicida 3. enzimas antioxidantes 4. Spray drying I. Antonio Mazutti, Marcio II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

RESUMO

**Tese de Doutorado Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Agrícola Universidade Federal de Santa Maria**

**FORMULAÇÃO E AVALIAÇÃO DE UM BIOHERBICIDA A
PARTIR DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA DO FUNGO
*Diaporthe sp.***

AUTOR: THIAGO CASTRO DE ALMEIDA

ORIENTADOR: Dr. MARCIO ANTONIO MAZUTTI

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 15 de março de 2019.

A busca por novas ferramentas que auxiliem no manejo de plantas daninhas pode ser através de biomoléculas em bioherbicidas produzidos por microrganismos, capazes de controlar as plantas daninhas com baixa toxicidade ao meio ambiente. As biomoléculas são metabólitos liberados durante o crescimento microbiano na fermentação, sendo assim, encontradas em baixa concentração e de fácil degradação. Neste sentido, o trabalho teve como por objetivo estudar a formulação em spray drying de um bioherbicida produzido em fermentação submersa do fungo *Diaporthe sp.* Assim, primeiro realizou se o estudo para otimizar a fermentação em biorreator de tanque agitado continuamente (STR) através de um planejamento delineamento composto central rotacional DCCR para as variáveis agitação (rpm) e aeração (vvm), avaliando o controle de cada tratamento sobre a germinação e a inibição de crescimento de sementes de pepino. O tratamento 1 com as variáveis 47,5 rpm 1,9 vvm obteve os melhores resultados. Para avaliação da formulação sólida em spray drying foi estudado a influência da vazão de alimentação ($L.h^{-1}$) e vazão de ar ($L.min^{-1}$) do ingrediente inerte (surfactante + agente adsorvente). Onde através de um DCCR para as variáveis vazão de alimento e de ar, obteve se que o tratamento 7 (0,2 L/h e 2,5 L/min) apresentou o maior rendimento para realização da formulação. A eficiência da formulação em spray drying foi avaliada através de um delineamento inteiramente casualizado DIC com os fatores tipo de formulação (líquida e sólida), presença de adjuvante (com ou sem) e porcentagem do caldo fermentado (5, 25 e 100 % v/v) sobre a planta teste alface (*Lactuca sativa*), através de um tri factorial 2 x 2 x 3, mais um testemunha sem aplicação. Onde avaliou se a porcentagem de fitotoxicidade (%), massa seca (g) e atividade das enzimas guaiacol peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD). Avaliação de porcentagem de fitotoxicidade (%) sobre a planta teste alface (*Lactuca sativa*) entre os fatores estudados mostrou que no melhor resultado foi com a utilização da formulação em spray drying (sólida), com adjuvante e 100 v/v% de caldo fermentado. O tratamento de maior porcentagem de fitotoxicidade (%) apresentou alta atividade das enzimas antioxidantes SOD e POD. Neste sentido, observou se que as biomoléculas promoveram estresse oxidativo nas plantas, e quando utilizado o caldo fermentado na maior concentração de biomoléculas 100 v/v%, as plantas não conseguiram

evitar através das enzimas antioxidantes SOD e POD a degradação e lesões da planta teste alface. O resultado demonstrou que a técnica para formulação sólida em spray drying foi viável sem degradar as biomoléculas com ação herbicida e que no fungo *Diaporthe* sp produziu biomoléculas com ação.

Palavras-Chave: *Diaporthe* sp, bioherbicida, enzimas antioxidantes, Spray drying.

ABSTRACT

**Doctoral Thesis Agricultural Engineering Post Graduation Program
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil**

FORMULATION AND EVALUATION OF A BIOHERBICIDE FROM FUNGUS SUBMERSE FERMENTATION *Diaporthe* sp.

AUTHOR: THIAGO CASTRO DE ALMEIDA

ADVISOR: Dr. MARCIO ANTONIO MAZUTTI

Santa Maria, 15th March, 2019.

The search for new tools that help in the management of weeds can be through biomolecules in bioherbicides produced by microorganisms, capable of controlling weeds with low toxicity to the environment. Biomolecules are metabolites released during microbial growth in fermentation, being thus found in low concentration and easy degradation. In this sense, the objective of this work was to study the spray drying formulation of a bioherbicide produced in submerged fermentation of the fungus *Diaporthe* sp. Thus, the study of the variables agitation (rpm) and aeration (vvm) in the fermentation in a bioreactor continuously stirred tank (STR) was carried out through a planning design of the central rotational compound DCCR for the variables agitation (rpm) and aeration (vvm), evaluating the control of each treatment on germination and growth inhibition of cucumber seeds. Treatment 1 with the variables 47.5 rpm 1.9 vvm obtained better results. In the evaluation of the solid formulation in spray drying the influence of the feed rate ($L.h^{-1}$) and air flow ($L.min^{-1}$) of the inert ingredient was studied. In the evaluation of the solid formulation in spray drying the influence of the feed rate ($L.h^{-1}$) and air flow ($L.min^{-1}$) of the inert ingredient was studied. Where through a DCCR for the variables food flow and air flow, treatment 7 (0.2 $L.h^{-1}$ and 2.5 $L.min^{-1}$) showed the highest yield for the formulation. The efficiency of the spray drying formulation was evaluated through a completely randomized DIC design with the type factors (liquid and solid), presence of adjuvant (with or without) and percentage of the fermentative broth (5, 25 and 100% v/v) on the test plant lettuce (*Lactuca sativa*), through a tri factorial 2 x 2 x 3, plus one control without application. The percentage of phytotoxicity (%), dry mass (g) and activity of the enzymes guaiacol peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD) were evaluated. The percentage of phytotoxicity (%) on the test plant lettuce (*Lactuca sativa*) among the studied factors showed that the best result was with the use of the spray formulation (solid), with adjuvant and 100 v/v% fermented broth. The treatment of higher percentage of phytotoxicity (%) showed high activity of the antioxidant enzymes SOD and POD. In this sense, it was observed that the biomolecules promoted oxidative stress in the plants, and when the fermented broth was used in the highest concentration of 100 v/v% biomolecules, the plants could not avoid through the antioxidant enzymes SOD and POD the degradation and lesions of the

test plant lettuce. The results demonstrated that the technique for solid spray drying formulation was viable without degrading biomolecules with herbicidal action and that the fungus *Diaporthe* sp produced biomolecules with action.

Keywords: *Diaporthe* sp, bioherbicide, antioxidant enzymes, spray drying.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Algumas biomoléculas com ação herbicida.....	21
Tabela 2: Delineamento composto central rotacional (DCCR) para duas variáveis independentes.....	32
Tabela 3: Delineamento composto central rotacional (DCCR) para duas variáveis independentes.....	35
Tabela 4: Tratamentos para avaliação do rendimento % da formulação spray drying junto ao ingrediente ativo.	35
Tabela 5: Método de avaliação de fitotoxicidade em plantas (FRANS and CROWLEY, 1986).	39
Tabela 6: Matriz experimental para avaliar a influência na fermentação do fungo <i>Diaporthe</i> sp em biorreator STR, após sete dias de fermentação.....	42
Tabela 7: Matriz experimental para avaliar a influência do agente adsorvente no rendimento da formulação em spray drying.....	45
Tabela 8: Rendimento % da formulação spray drying nos tratamentos junto ao ingrediente ativo.....	48
Tabela 9: Avaliação de matéria seca (g) e porcentagem de controle com relação aos fatores estudados (Santa Maria – RS).....	50
Tabela 10: Médias do acúmulo de massa seca da planta, aos 7 DAA. Santa Maria/RS, 2019.....	51
Tabela 11: Médias do controle dos tratamentos, aos 7 dias após a aplicação. Santa Maria/RS, 2019.....	53
Tabela 12: Avaliação de POD e SOD com relação aos fatores estudados (Santa Maria – RS).....	56
Tabela 13: Valores médios do efeito dos tratamentos sobre a enzima SOD, aos 2 dias após a aplicação. Santa Maria/RS, 2019.....	57
Tabela 14: Valores médios do efeito dos tratamentos sobre a enzima POD, aos 2 dias após a aplicação. Santa Maria/RS, 2019.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Placa de meio BDA com o microrganismo <i>Diaporthe</i> sp.....	31
Figura 2: Biorreator STR.....	34
Figura 3: Spray Dryer Modelo LM MSDi 1.0.....	36
Figura 4: Agitador mecânico turrax.....	37
Figura 5: Comparação entre a testemunha absoluta, ensaio 1 e ensaio 4, mais momento de desenvolvimento das sementes PRÉ aplicação.....	41
Figura 6: Gráfico de Pareto mostrando os efeitos de termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes sobre a DCCR para a controle de germinação (%).	43
Figura 7: Gráfico de Pareto mostrando os efeitos de termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes sobre a DCCR para a inibição de crescimento (%).	44
Figura 8: Gráfico de Pareto mostrando os efeitos de termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes sobre a DCCR para o rendimento (%).	46
Figura 9: Influência dos fluxos de alimentação e ar no rendimento sólido após o processo de secagem.....	48
Figura 10: Comparação tratamento 3 (liquida, sem, 100%) vs tratamento 9 (sólida, sem, 100%) e tratamento 6 (liquida, com, 100 %) vs tratamento 12 (sólida, com, 100%).	54
Figura 11: Direito: Comparação entre a testemunha absoluta, tratamento 9 (Sólida, sem, 100%) e tratamento 12 (sólida, com, 100%), aos 7 DAA. Esquerdo: Lesão de necrose causado pelo herbicida natural.....	54

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

CE - Concentrado emulsionável.
CS – Concentrado soluvel.
DAA – Dias após aplicação.
DCCR – Delineamento composto central rotacional.
DIC – Delineamento inteiramente casualizado.
DHAD – Di-hidroxiácido desidratase
EROs – Espécies reativas de oxigênio
GS – Glutamina sintase.
H₂O₂ – Peroxido de hidrogênio.
MS – Massa seca.
1 O₂ - oxigênio singlet
O₂- - radicais superóxido
OH - radicais hidroxila
POD – guaiacol peroxidase
SC – Suspensão concentrada.
SOD – superóxido dismutase
STR – Tanque agitado continuamente.
WP – Pó molhável.
WG – Granulo dispersivel.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo geral.....	17
2.2. Objetivo específicos.....	17
3. REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 Herbicidas produzidos por biomoléculas de microrganismos.....	18
3.2. <i>Diaporthe</i> sp.....	22
3.3. Formulação e estabilização de biomoléculas.....	23
3.3.1. Spray drying	25
3.4. Atividade de enzimas antioxidantes de plantas em estresse oxidativo.....	27
4. MATERIAL E MÉTODO.....	30
4.1. Microrganismos e pré inóculo.....	31
4.2. Otimização da fermentação em biorreator STR.....	31
4.2.1. Bioensaio germinação.....	33
4.2.2. Bioensaio inibição de crescimento.....	33
4.3. Formulação e estabilização.....	34
4.3.1. Formulação sólida.....	34
4.3.2. Formulação líquida.....	36
4.4. Avaliações das formulações.....	37
4.4.1. Avaliação de massa seca (g) e porcentagem de fitotoxicidade (%).....	38
4.4.2. Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes.....	39
4.4.3. Estatística.....	40
5. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	41
5.1. Avaliação da fermentação submersa para produção das biomoléculas com ação herbicida.....	41
5.2. Avaliação da formulação sólida por spray drying.....	44
5.3. Avaliação da eficiência das formulações.....	49
5.3.1. Avaliação da massa seca (ms) e de fitotoxicidade %.....	49
5.3.2. Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes.....	55
6. CONCLUSÃO.....	61
7. REFERENCIAL TEÓRICO.....	62

1. INTRODUÇÃO

O método de controle de plantas daninhas mais utilizado nas últimas décadas é o método químico, ou seja, com o uso de herbicidas. Seu papel de protagonista está ligado a praticidade de aplicação dos herbicidas e eficiência comprovada quando aplicado em condições adequadas (CHRISTOFFOLETI et al., 2008). Porém, o uso indiscriminado tem implicado em diversos aspectos negativos, como: a redução da qualidade do solo e da água, efeitos prejudiciais sobre organismos não alvos e plantas daninhas resistentes (CARVALHO, 2013; OLIVEIRA JR. et al., 2011).

A resistência de plantas daninhas à herbicidas é a capacidade natural que alguns biótipos de uma determinada população possuem de sobreviver mesmo após serem submetidos à aplicação de um determinado herbicida, sendo esta aplicação letal para os demais biótipos desta mesma população (CHRISTOFFOLETI & LÓPEZ-OVEJERO, 2008). Atualmente, existem mais de 449 casos de plantas daninhas resistentes, sendo no Brasil relatada a existência de 19 casos de espécies de plantas daninhas resistentes a diferentes mecanismos de ação (HRAC-BR, 2015). Apenas para o herbicida glifosato se têm o conhecimento 32 casos de espécies de planta daninha que apresentem resistência a este ingrediente ativo (HEAP, 2015).

A busca por métodos alternativos que possam auxiliar em conjunto dos métodos químicos o manejo de plantas daninhas é de suma importância para o futuro do controle de plantas daninhas. Dentre estes métodos alternativos está a busca e utilização de produtos naturais, ou seja, a utilização de metabólitos secundários de extratos vegetais (FAVARETTO et al., 2011) ou de microrganismos (DUKE et al., 2000; EVIDENTE et al, 2009) que possam servir como herbicidas naturais para aplicação ou para descoberta de novas moléculas com potencial herbicida.

Alguns autores definem o metabolismo primário como universal, uniforme, conservativo e indispensável, enquanto que o metabolismo secundário é singular, diverso, adaptativo, dispensável para o crescimento e desenvolvimento do

organismo, porém indispensável para a sua sobrevivência (HARTMANN et al., 1996). Os metabólitos primários estão envolvidos na produção de biomassa e geração de energia e estão presentes em todas as células vivas, enquanto que os metabólitos secundários são produzidos por poucas espécies. Os metabólitos secundários servem para aumentar a capacidade de sobrevivência dos organismos produtores – “por ação de receptores específicos que competem com estes organismos”. (WILLIAMS et al., 1989).

As pesquisas com estas biomoléculas, metabólitos secundários, como fonte de herbicidas naturais além de eventuais vantagens ambientais, têm como principal atrativo a possibilidade de descoberta de novos mecanismos/sítios de ação de herbicidas, importante, pois nas últimas duas décadas houve uma escassez de classes químicas de herbicidas verdadeiramente inovadoras (DUKE et al., 2000). Os microrganismos se destacam pela produção de um vasto número de metabólitos secundários bioativos através de processos fermentados ou por derivação de seus compostos, que ainda são descobertos graças à grande variedade de linhagens de microrganismos existentes e que ainda não foram estudadas (DONADIO et al., 2002).

As fitotoxinas são produtos do metabolismo secundário de fitopatógenos (fungos ou bactérias) capazes de causar danos nos tecidos vegetais e são responsáveis pelo aparecimento e desenvolvimento de doenças em plantas, não sendo toxinas produzidas por plantas. Alguns microrganismos não patogênicos (actinomicetos) também podem produzir fitotoxinas, porém são mais raramente encontradas (BECKIE et al., 1993). A maioria das fitotoxinas com potencial para aplicação herbicida são produzidas por microrganismos, onde, possuem vantagens significativas frente aos herbicidas sintéticos, tais como: tempo de meia vida relativamente curto, são mais facilmente biodegradáveis, deixam menos resíduos tóxicos no meio ambiente podendo, muitas vezes, ser utilizadas como modelo para o desenvolvimento de novos herbicidas menos agressivos. Pode-se afirmar que a probabilidade de contaminação de alimentos, do solo e da água é menos provável de ocorrer com os herbicidas naturais do que com os sintéticos (SAXENA et al., 2001).

O principal desafio na produção de produtos com biomoléculas é o de manter sua estabilidade em solução aquosa, pois tem se uma variedade de inconvenientes como a possibilidade de contaminação por outros microrganismos e degradações químicas e físicas durante as etapas de transporte, armazenamento e aplicação. Sendo assim, formulações concentradas e desidratadas apresentam vantagens em relação as formulações aquosas, proporcionando aumento da vida útil e praticidade no manuseio (COSTA-SILVA, 2010, LIAO et al., 2003). A técnica de secagem por atomização, conhecida como spray drying, pode ser uma alternativa viável de desidratação de produtos que são termosensíveis. A utilização desta operação vem sendo amplamente utilizada em diversas aplicações, tais como na indústria de alimentos, para produção de proteína de leite, ovos, sucos, café instantâneo, sopas e aromas em pó, por exemplo, e na indústria farmacêutica, na produção de antibióticos, enzimas, vitaminas e suspensões sólidas, dentre várias outras aplicações (ESTEVES, 2006; RIELLY e STAPLEY, 2007).

Neste sentido, o presente trabalho busca avaliar a utilização da técnica spray drying na formulação de bioherbicida à base de biomoléculas produzidas pelo fungo *Diaporthe* sp, em fermentação submersa por biorreator STR.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo estudar a utilização da técnica spray drying para formulação de um bioherbicida à base de biomoléculas produzidas pelo fungo *Diaporthe* sp. por fermentação submersa em biorreator STR.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os parâmetros de agitação e aeração na fermentação submersa no biorreator STR.
- Avaliar o ingrediente inerte (agente adsorvente + surfactante) no processo de formulação sólida em spray drying nos parâmetros de vazão de alimentação ($L.h^{-1}$) e vazão de ar ($L.min^{-1}$).
- Avaliar a eficiência da formulação líquida e sólida para o bioherbicida à base de biomoléculas através dos resultados obtidos de porcentagem de fitotoxicidade (0-100%) e massa seca (g) sobre a planta teste alface (*Lactuca sativa*).
- Avaliar a influência do bioherbicida à base de biomoléculas na atividade enzimática das enzimas antioxidantes SOD POD sobre a planta teste alface (*Lactuca sativa*).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 HERBICIDAS PRODUZIDOS POR BIOMOLÉCULAS DE MICRORGANISMOS

Os microrganismos produzem diversas biomoléculas com diferentes características estruturais e biológicas, que em certos casos podem causar patogenicidade em plantas hospedeiras, destruindo a sua estrutura e causando lesões necróticas ou cloróticas. Neste sentido, as biomoléculas podem ser uma fonte promissora para a produção de novos herbicidas naturais ou na descoberta de novas moléculas para serem sintetizadas (DUKE et al., 2000; HOAGLAND, 2001; DAYAN & DUKE et al., 2014).

A utilização de herbicidas à base de metabólitos biossintetizados por microrganismos podem apresentar um menor impacto ao meio ambiente, pois, de modo geral são mais biodegradáveis. A grande maioria destes compostos possuem estruturas não-halogenadas, o que os torna menos tóxicos quando comparados a algumas classes de herbicidas sintéticos (SAXENA et al., 2001). Outra vantagem, os herbicidas naturais a partir das biomoléculas (metabólitos secundários) quando comparados aos bioherbicidas (organismos vivos) apresentam algumas vantagens importantes como logística de estocagem, aplicação, formulação e tempo de meia vida (GREAIVES, 1996).

Diversos gêneros de fungos como os *Aspergillus*, *Alternaria*, *Diaporthe*, *Drechslera*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Strachybotrys*, *Myrothecium*, *Phoma* e *Diplodia* são exemplos de espécies patogênicas produtoras de metabólitos secundários estudados com potencial herbicida por serem fitotóxicos para determinadas plantas (Tabela 1). A colaboração entre pesquisadores de diversas áreas vem fornecendo mais respostas e ajudando no progresso das pesquisas ligadas à herbicidas naturais, pois, as pesquisas em conjunto vêm favorecendo a elucidação de estruturas químicas, síntese das mesmas e modos de ação, buscando

estabelecer novas estratégias para o controle de plantas daninhas (EVIDENTE et al., 2002; BRUM et al., 2016).

As biomoléculas são consideradas há muito tempo como ótimo potencial para descoberta de novos agroquímicos ou ainda no uso de pesticidas naturais, por exemplo, herbicidas naturais. YAN et al. (2018) buscaram o desenvolvimento de compostos que interrompem a via biossintética dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), pois a mesma desempenha funções de "manutenção" em plantas e fungos, mas é inexistente em animais. Assim, pode ser uma abordagem eficiente para eliminar o crescimento das plantas sem efeitos colaterais em animais. Entre as enzimas envolvidas nessa via, a Di-hidroxiácido desidratase (DHAD) é essencial e altamente conservada em uma ampla gama de espécies de plantas, portanto, poderia servir como um alvo desejado para novos herbicidas. Os autores rastrearam diversas biomoléculas produzidas por fungos, onde descobriram no fungo *Aspergillus terreus* a produção do ácido aspártico. O mesmo é um inibidor da DHAD provou ser efetivo quando utilizado como herbicida natural.

Os estudos atuais estão focados em microrganismos patógenos de plantas, como fungos e bactérias, por produzirem uma variedade de fitotoxinas potentes e muitas vezes específicas para certas plantas, provocando lesões, inibindo crescimento e em alguns casos levando à morte as plantas alvo (DUKE et al., 2000; STRANGE 2007; EVIDENTE et al., 2013; CIMMINO et al., 2014). Porém, microrganismos não patogênicos produzem também metabólitos fitotóxicos com potencial herbicida, e grande parte dos estudos com esses organismos tem sido feitos com microrganismos de solo, principalmente os actinomicetos (Tabela 1).

Durante trabalhos de levantamento de fungos fitopatogênicos (VAREJÃO et al., 2013), foi encontrado na espécie *Alternaria euphorbiicola* um potencial agente herbicida para o controle de *Euphorbia heterophylla*. O fracionamento do caldo filtrado guiado por bioensaios demonstrou por fração cromatográfica uma constituição majoritariamente de ácidos graxos de cadeia longa, sugerindo assim sua participação de ácidos graxos no processo infeccioso na associação *A. euphorbiicola* x *E. heterophylla*. *Alternaria sonchi* é um fungo patogênico isolado a partir da planta daninha *Sonchus arvensis*, e verificado por alguns autores o seu potencial como agente de controle biológico desta planta daninha (GANNIBAL et al.,

2006). Diferentes metabólitos fitotóxicos estão presentes nos caldos fermentados, e entre estes, estão os denominados alternethanoxins A e B. Estes metabólitos fitotóxicos foram testados em folha de *Sonchus arvensis*, mostrando-se fitotóxicos e com potencial herbicida natural (EVIDENTE et al., 2009).

Embora a maioria dos fitopatógenos estudados como herbicidas naturais à base de biomoléculas tenham sido fungos, existem também pesquisas utilizando fitopatógenos bacterianos. Por exemplo, as rizobactérias, como a *Pseudomonas fluorescens*, mostraram ter ação supressora contra certas gramíneas. Uma formulação granular contendo células de *P. fluorescens* foi avaliada como um bioherbicida aplicado ao solo para o controle do fungo verde (*Setaria viridis* L.) (CALDWELL et al., 2012). Biomoléculas, metabólitos secundários, de certas cepas de *P. fluorescens* (GURUSIDDAIAH et al., 1994) e *Pseudomonas syringae* (GEALY et al., 1996) inibiram a germinação e o crescimento inicial das raízes da gramínea *Bromus tectorum*. Cepas bacterianas de várias *Xanthomonas* spp. também foram avaliados como bioherbicidas. *Xanthomonas campestris* é um bioherbicida ou herbicida natural bacteriano que foi registrado para controlar gramíneas anuais em gramados (HOAGLAND et al., 2007). O isolamento e caracterização de uma fitotoxina de *Xanthomonas campestris* pv. *retroflexus* identificou alguns compostos moleculares, incluindo ácidos orgânicos e ciclo- (prolina-fenilalanina) que agiria como herbicida sobre sementes de caruru-gigante (*Amaranthus reflexus*) (MINGZHI et al., 2007). Quando as plântulas foram tratadas com metabólitos fitotóxicos, detectou-se uma respiração excessiva e consequentemente um excessivo da energia interna. Ao mesmo tempo, no interior da membrana da mitocôndria o ATP não pode ser sintetizado, resultando em murcha das plantas.

Atividade herbicida dos compostos metabólitos pelo grupo *Streptomyces* / *Actinomyces* entrou no centro das atenções com a descoberta de Bialafos, isolado a partir de *Streptomyces hygroscopicus* e *S. viridochromogenes*, e comercializado no Japão como primeiro herbicida de origem microbiana introduzido no mercado, denominado Herbiace®. O Bialafos é constituído pela fosfinotricina (PPT), um aminoácido análogo ao ácido L-glutâmico, ligado a dois grupos L-alanil. Em plantas, Bialafos é convertida em fosfinotricina, atuando como um pró-herbicida, onde o

mecanismo aqui é para ser metabolizado a fosfinotricina na planta e, em seguida fosfinotricina inibe a glutamina síntese (GS) (DUKE et al., 2000, HOAGLAND, 2001), e é amplamente utilizado para controlar plantas daninhas de folhas largas ou também gramíneas perenes (LI et al., 2003). Baseado nas estruturas dessa fitotoxina natural, a indústria Hoechst AG desenvolveu o herbicida sintético, comercializado com o nome de glufosinato. Pois esse herbicida é um potente inibidor da enzima glutamina sintase (GS), responsável pela assimilação de amônia. Além disso, o Biolafos como citado anteriormente é metabolizado produzindo as Fosfinotricinas, que apresentam atividade de inibição da GS. A partir das Fosfinotricinas foi desenvolvido Roundup®, herbicida sintético largamente empregado.

Tabela 1- Algumas biomoléculas com ação herbicida.

	Fonte microbiana Fungos	Biomoléculas	Plantas controladas	Autores
1	<i>Alternaria alternata</i>	Tentoxina	<i>Datura inoxia</i>	BLAND et al. 1993 e EDWARDS et al. 1988
2	<i>Alternaria alternata</i>	Ácido tenuazônico	Gramíneas e plantas daninhas de folhas largas	BRZONKALIK et al. 2011
3	<i>Alternaria alternata</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	ALL-Toxina	<i>Lepidium sativum</i>	ABBAS et al, 1993, 1995.
4	<i>Alternaria sonchi</i>	Alternethanoxins A e B	<i>Sonchus arvensis</i>	EVIDENTE et al., 2009
5	<i>Alternaria alternata</i> f. sp. <i>Maculosa</i>	Maculosin-2	Canadá cardo (<i>Cirsium arvense</i>)	BOBYLEV et al., 2000.
6	<i>Alternaria euphorbiicola</i>	ácidos graxos de cadeia longa	<i>Euphorbia heterophylla</i> .	VAREJÃO et al., 2013.
7	<i>Alternaria zinniae</i>	Zinniol	<i>Lactuca sativa</i>	
8	<i>Cercospora kikuchii</i>	Cercosporin	-----	SAXENA et al., 2001.
9	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Ferricina	<i>Aeschynomene</i> , <i>Amaranthus retroflexus</i> e <i>Desmodium tortuosum</i>	OHRA et al., 1995.
10	<i>Drechslera avenae</i>	Pyrenophorin	<i>Avena sterilis</i>	ALIFARIS et al., 2006
11	<i>Drechslera avenae</i> (Eidam) Scharif	macrodiolide pyrenophorol	<i>Avena sterilis</i> , <i>A. fatua</i> , <i>A. sativa</i> , <i>Triticum aestivum</i> e <i>Hordeum vulgare</i>	KASTANIAS et al., 2000, 2005.
12	<i>Drechslera siccans</i>	Drazepinone	<i>Urtica dioica</i> , <i>Euphorbia helioscopia</i> e <i>Mercurialis annua</i>	EVIDENTE et al., 2005.
13	<i>Fusarium sp.</i>	Ácido fusárico	<i>Datura stramonium</i>	ABBAS et al., 1999.
14	<i>Paecilomyces variotii</i>	Cornexistina	Gramíneas e plantas	NAKAJIMA, 1991.

SANK 21086				daninhas de folhas largas
15	<i>Phoma macrostoma</i>	Macrocidina	<i>Helianthus annuus</i> L. e corda-de-viola <i>Ipomoea hederifolia</i> L.	GRAUPNER et al., 2003.
16	<i>Phoma exigua</i>	Ascosonchine	<i>Cirsium arvense</i> e <i>Sonchus arvensis</i>	CIMMINO et al., 2009.
17	<i>Phyllosticta cirsii</i>	Phyllostoxin	<i>Cirsium arvense</i>	EVIDENTE et al., 2008.
Bactérias				
18	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	Tabotoxina		STEWARD, 1971, DUKE et al., 2000.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2- (hydroxymethyl) phenol	<i>Amaranthus hybridus</i>	OLUWASEUN et al., 2018
19	<i>Pseudomonas seringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Phaseolotoxin	<i>Glycine wightii</i> e <i>Macrophilium atropurpureum</i>	MOORE et al., 1984.
20	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Retroflexus</i>	ácidos orgânicos e ciclo-(prolina-fenilalanina)	<i>Amaranthus reflexus</i>	MINGZHI et al., 2007.
Actinomicetos				
21	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Polyethrin A	<i>Lepidium sativum</i>	NAKAJIMA et al., 1991.
22	<i>S. hygroscopicus</i> var. <i>geldanus</i>	Geldanamycin	<i>Lepidium sativum</i>	HEISY et al., 1986.
23	<i>Streptomyces</i> sp..	Anisomicina	<i>Echinochloa crusgalli</i> e <i>Digitaria spp</i>	MUNAKATA et al., 1973; LYDON, 1987.
24	<i>S. suganonensis</i>	Herbicidins A/B	Gramíneas e plantas daninhas de folhas largas	LYDON, 1988.

3.2 *Diaphorte* sp.

O gênero *Diaporthe* sp. vêm sendo estudado e descrito por diversos pesquisadores como um gênero de fungo com alto potencial biotecnológico (UDAYANGA et al., 2011). Pois já foi descrito como produtor de enzimas e metabólitos secundários (DAI et al., 2005) com potencial antibiótico (LIN et al., 2005); fungicida (WU et al., 2008); anticancerígeno (KUMARAN, 2009); assim como no controle biológico de ervas daninhas (ASH et al., 2010; BASTOS, 2016; PES, 2015; SOUZA, 2015).

O gênero *Diaporthe*, anamorfo *Phomopsis* pertence ao filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotin, classe Sordariomycetes, subclasse Sordariomycetidae, ordem Diaporthales, família Valsaceae. Algumas espécies do gênero *Diaporthe* são micoherbicidas potenciais para controlar plantas daninhas invasivas e destrutivas, devido ao seu modo de vida hemibiotrófico a necrotrófico, extensiva esporulação e persistência no ambiente (ROSSKOPF et al., 2000).

Várias plantas do gênero *Amaranthus* são plantas daninhas em sistemas de cultivo em todo o mundo, e podem reduzir a produção de algodão e outras culturas por competição. Além de apresentar rápido crescimento e abundante produção de sementes, alguns biótipos de *Amaranthus* desenvolveram resistência a um número de famílias de herbicidas e o controle biológico tem sido uma alternativa. *Phomopsis amaranthicola* pode infectar e matar *Amaranthus* spp. e, portanto, tem sido utilizado como um agente bioherbicida. Esta espécie foi patenteada (Patente dos EUA n º s 5510316 e 5393728) para o controle de *Amaranthus* spp. (ROSSKOPF; YANDOC, 2005; MORAN, 2007).

Através da bioprospecção de diversos fungos fitopatogénicos de diferentes plantas daninhas, SOUZA (2015) selecionou um fungo com maior potencial herbicida, identificando o mesmo como um fungo do gênero *Diaporthe* sp. Em fermentação submersa, este isolado apresentou efeito herbicida sobre *Cucumis sativus*, causando manchas, amarelecimento e crestamento nas folhas. O mesmo isolado foi estudado por PES (2015), avaliando o efeito herbicida do produto obtido por fermentação submersa de *Diaporthe* sp. sobre sementes de soja, pepino, trigo, arroz e azevém em pré-emergência encontrou inibição de 100% na germinação destas sementes, demonstrando assim, o potencial de uso como herbicida dos metabólitos produzidos por este microrganismo, quando obtido por fermentação submersa.

3.3 FORMULAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

As formulações dos produtos fitossanitários em geral apresentam o ingrediente ativo e os ingredientes inertes. Dentre os ingredientes inertes temos os chamados adjuvantes, que podem em certos casos fazer parte das formulações, ou em outros casos utilizados em mistura de calda. KISSMANN, (1998) definiu de maneira mais complexa os adjuvantes, como sendo qualquer substância ou composto sem propriedade fitossanitária, exceto a água, que é acrescido em conjunto à calda com produto fitossanitário para facilitar a aplicação, aumentar a eficiência ou diminuir os riscos. Outra definição importante citada por diversos

autores seria a importância desta classe em melhorar a performance dos produtos devido à alteração das propriedades físico química.

Diversos são os fatores que os adjuvantes interferem no resultado das aplicações dos produtos fitossanitários, por exemplo, no momento da mistura no tanque (compatibilidade e estabilidade da mistura, a qualidade da água, o pH, a formação de espuma, a dispersão e a agitação), na hora da aplicação (forma do jato e a abertura das pontas de pulverização, calibração, pressão, volume perdido por evaporação, vento e velocidade de deslocamento), na deposição do produto sobre o alvo (espalhamento das gotas, chuvas, orvalho, umidade, emissão de raios U.V. e superfície do alvo), na retenção (velocidade, ângulo e tamanho da gota, superfície das folhas, arquitetura da planta, tensão superficial e viscosidade), na penetração (idade e densidade das folhas, composição e estrutura da planta, propriedades físico-químicas e solubilidade das gotas e condições ambientais) e na translocação (espécie da planta, estádio de crescimento, fisiologia e fitotoxicidade) (GREEN, 2001).

Existem diferentes tipos de formulações para os produtos fitossanitários, como: formulações líquidas (suspenção concentrada (SC), concentrado emulsionável (CE) e concentrado solúvel ou solução homogênea (CS ou SL)) e formulações sólidas (pó molhável (WP) e grânulos dispersíveis (WG)). Cada formulação tem suas características específicas (Tabela 2):

Quadro 1 – Formulações de agroquímicos.

Estado Físico	Tipo	Sigla	Descrição resumida
Líquidas	Concentrado Solúvel ou solução homogênea	CS ou SL	O Ingrediente ativo (IA) é dissolvido em água ou em solvente orgânico miscível em água.
	Concentrado emulsionável	CE	O IA é dissolvido em um solvente orgânico apolar. A formulação contém aditivos que garantem a emulsificação do produto no momento da aplicação.
	Suspensão concentrada	SC	O IA é praticamente insolúvel no solvente utilizado como diluente. No processo de formulação, o IA é moído já disperso no diluente. O produto é estabilizado pela ação de agentes dispersantes, umectantes, espessantes, anticongelantes e biocidas.

	Emulsão	EO e EW	A formulação é composta de duas fases, uma fase aquosa e outra orgânica, estabilizadas em uma única fase pela ação de agentes emulsificantes. Estas podem ser de dois tipos: diluente água (EW) e diluente orgânico (EO).
	Suspo-emulsão	SE	A formulação contém partículas sólidas e líquidas em suspensão no meio diluente. É estabilizada pela ação de aditivos.
Sólidas	Pós Solúveis	SP	O IA é solúvel em água.
	Pós molháveis	WP	O IA é insolúvel em água. Aditivos garantem a umectação do produto no momento da aplicação.
	Grânulos dispersíveis	WG	Formulação granulada com altos teores de ingrediente ativo. Contém agentes dispersantes que garantem a dispersão no momento da aplicação do produto.

Um dos grandes desafios na produção de biomoléculas é manter sua estabilidade em solução aquosa, pois ocorrem uma variedade de inconvenientes como a possibilidade de contaminação por microrganismos e degradações químicas e físicas durante as etapas de transporte, armazenamento e aplicação. Neste sentido, formulações desidratadas apresentam vantagens em relação aos extratos enzimáticos aquosos, proporcionando aumento da vida útil e praticidade no manuseio (COSTA-SILVA, 2010; LIAO et al. 2003). É muito importante que a técnica de secagem selecionada seja capaz de preservar as biomoléculas durante o processo. Dentre as técnicas de secagem mais utilizadas para biomoléculas (enzimas, proteínas e metabólitos em geral), estão a secagem convectiva, a liofilização, o spray drying, o leito fluidizado, dentre outros (MARQUES, 2008).

3.3.1 SPRAY DRYING

Diversas técnicas de secagem com a capacidade de remover uma grande quantidade de água de produtos são conhecidas, incluindo secadores em bandeja, túnel, tambor, fluidização e spray drying (CAGLAYAN; CALISKAN, 2017). O uso da secagem por spray drying é conhecida há muitos anos, e é utilizada em diversos produtos tais como: pigmentos naturais, probióticos, vitaminas, fármacos em geral, pesticidas e inseticidas, aditivos naturais, aromas e produtos alimentícios, como

leite, café, sopas e chás (CHEN et al., 2015; JOYE e MCCLEMENTS, 2014; SINGH e DIXIT, 2014).

A utilização do spray drying vem sendo muito comum em processos que envolvem microencapsulação devido à sua facilidade de operação, boa relação custo benefício, reduzir o custo de armazenamento e transporte, além de obter um produto com propriedades específicas como, por exemplo, solubilidade instantânea (MURUGESAN e ORSAT, 2012, CALISKAN e DIRIM, 2013; COUTO et al., 2012; GHARSALLAOUI et al., 2007; MISHRA et al., 2014; SINGH e DIXIT, 2014). O processo de secagem por aspersão consiste de três etapas fundamentais. Na primeira fase, o fluído é disperso como gotículas, produzindo uma grande área superficial. Na segunda, ocorre contato destas com uma corrente de ar aquecido, havendo transferência de calor. Na terceira etapa acontece a evaporação do solvente e a formação da partícula sólida (SHAW, 1997; RANKELL et al., 2001).

Alguns fatores são determinantes na eficiência do processo de secagem por spray drying, como, temperatura de entrada, vazão de ar, vazão de alimentação, tipo de produto, tipo de material adsorvente, entre outros. São utilizados como agentes adsorventes neste processo: amido, ciclodextrinas, dióxido de silício coloidal, fosfato tricálcico, gelatina, goma arábica, lactose, maltodextrina entre outros (VASCONCELOS et al., 2005; SILVA JÚNIOR et al., 2006). O dióxido de silício coloidal, que apresenta elevada superfície específica e alto poder sorvente, tem sido amplamente empregado, apresentando excelentes resultados na obtenção de produtos secos por aspersão a partir de soluções extrativas de diferentes espécies vegetais (DE CAMPOS, 1996; DE SOUZA, 1997).

O principal desafio na produção de biomoléculas produzidas em meio aquoso é o de manter sua estabilidade, pois tem se uma variedade de inconvenientes como a possibilidade de contaminação por microrganismos e degradações químicas e físicas durante as etapas de transporte, armazenamento e aplicação (COSTA SILVA, 2010). Sendo assim, formulações enzimáticas desidratadas com a técnica de spray drying apresentam vantagens em relação aos extratos enzimáticos aquosos, proporcionando aumento da vida útil e praticidade no manuseio (LIAO et al. 2003). JESUS, et al. (2013) observou grande viabilidade da formulação de amilase produzida por *Bacillus* sp por spray drying. A secagem por pulverização tem sido

amplamente utilizada para muitas enzimas industriais, como, a alfa-amilase de *Aspergillus oryzae*, a alkaline protease de *Bacillus subtilis* recombinante (BGSC-1A751) e a protease alcalina de *Bacillus licheniformis* RP11 (KAMOUN A, et al. 2008).

3.4 ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES DE PLANTAS EM ESTRESSE OXIDATIVO

Os sistemas biológicos, incluindo os vegetais, por sofrer diversos estresse oxidativos resultando na superprodução das espécies reativas do metabolismo de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como radicais superóxido (O_2^-), radicais hidroxila (OH), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlet (1O_2) (SCANDALIOS,1993; SMIRNOFF, 1993; FOYER et al., 1994; THÉROND et al., 2000). Os fatores ambientais capazes de produzir estresse oxidativo, podem se classificar em abióticos: alta irradiação, seca, hiperoxia, hipoxia, abnôxia, deficiência mineral, baixas e altas temperaturas; bióticos: infestação bacteriana, fúngica ou viral; e xenobióticos: herbicidas, fungicidas, contaminantes atmosféricos (SO_2 , NO , NO_2 , ozônio) e metais pesados. Estes últimos são de características antropogênicas (CARRILLO; VALLE, 2005).

Quando as plantas sofrem algum estresse, abiótico ou biótico, os principais pontos de produção das EROs são os cloroplastos e as mitocôndrias, pois são organelas com alta atividade de oxidação metabólica ou com intenso fluxo de elétrons. O sistema enzimático desempenha um papel importante na defesa da planta contra o estresse oxidativo, onde uma variedade de enzimas oxidativas irão decompor as espécies reativas de oxigênio EROs. Dentre as enzimas oxidativas temos superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APDO), guaiacol peroxidase (POD) glutationa redutase (GSH), peroxiredoxina (Prx), catalase (CAT), polifenol oxidase (PPO), entre outras (MITTLER, 2002). Alterações nos níveis destas enzimas oxidativas nas plantas têm sido relatadas entre a primeira resposta das plantas ao ataque de insetos, aplicação de herbicida, estresse hídrico entre outros (RANI & PRATYUSHA, 2013; SIGH et al., 2013). Em condições fisiológicas ótimas, a

produção e a degradação de EROs existem em equilíbrio devido a diversos mecanismos de detoxificação celular (ALSCHER et al., 1997).

A degradação de $\cdot\text{O}_2^-$ é catalisada pela SOD, entretanto H_2O_2 é degradado pela CAT e peroxidases (POXs). CAT e SOD são dismutases e não requerem cofatores enzimáticos tanto que também não estão associadas a consumo energético. As peroxidases são redutases que necessitam de algum cofator doador de elétrons como ascorbato ou glutathiona. Estes cofatores podem ser regenerados posteriormente por NADPH produzido em outras vias metabólicas (CHAUDIÈRE; FERRARI-ILIOU, 1999).

Dentre as enzimas antioxidantes, a superóxido dismutase (SOD) é considerada umas das principais do sistema, visto que elimina radicais superóxido (O_2^-), o qual é o primeiro a ser produzido pela adição de um elétron ao oxigênio molecular (O_2), caracterizando o burst oxidativo (FERREIRA E ABREU, 2007; AYDIN et al., 2013). SOD são isoenzimas classificadas como metaloproteínas que catalisam a dismutação de radicais superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (GILL e TUTEJA, 2010).

As peroxidases estão presentes em todos os compartimentos celulares e catalisam a transferência de elétrons ao H_2O_2 usando diferentes substratos reduzidos como doadores. As POXs de plantas aumentam em resposta a vários estresses bióticos e abióticos, participam no catabolismo de auxinas e em processos de síntese de parede celular como a oxidação de fenóis, suberização e lignificação em plantas hospedeiras durante a reação de defesa contra patógenos (SYROS et al., 2004). O aumento de peroxidases tem sido correlacionado com mecanismos de resistência em um grande número de interações plantas-microrganismos (MOHAMMADI; KAZEMI, 2002).

Determinados herbicidas causam estresse oxidativo (PEIXOTO et al., 2006; SONG et al., 2007) como produto da sua ação, a fim de controlar plantas indesejadas por meio do acúmulo de EROs que levam a peroxidação celular e ao dano molecular (YIN et al., 2008; CHEN et al., 2009). WU et al. (2009) avaliando a atividade enzimática causada pelo herbicida fluroxypyr sobre plantas de arroz observou um aumento da atividade das enzimas SOD e POD. A maior atividade das enzimas antioxidantes está relacionada ao estresse oxidativo causado pelo herbicida

na cultura do arroz, afetando no crescimento/desenvolvimento da cultura. NOHATTO et al. (2016) estudando o comportamento fisiológico de defesa de plantas submetidas à aplicação de herbicidas bentazona, penoxsulam e cialofope-butílico. Assim, observou que Bentazona e penoxsulam aumentaram o nível de H₂O₂, peroxidação lipídica e atividade da SOD, indicando condição de estresse oxidativo nas plantas de arroz. O herbicida cialofope-butílico não alterou a atividade antioxidante, sinalizando menor capacidade de causar estresse à cultura.

4. MATERIAL E MÉTODOS

1º ETAPA	2º ETAPA	3º ETAPA		4º ETAPA
Microrganismo	Otimização da fermentação	Formulações e estabilização		Avaliações das formulações
Preparo do pré inóculo	Avaliações	Líquida	Sólida	Massa seca (g) Fitotoxicidade (%) Atividade das enzimas antioxidantes
			Otimização do spray drying Avaliação	
	Inibição de germinação Inibição crescimento		Rendimento (%)	

4.1. MICRORGANISMOS E PRÉ INÓCULO

Foi utilizado o fungo *Diaporthe* sp., isolado a partir de amostras infectadas da planta *Solanum americanum* Mill. coletadas no bioma Pampa em trabalho de SOUZA (2015) (Figura 1).



Figura 1- Placa de meio BDA com o microrganismo *Diaporthe* sp.

Para o pré inóculo foi utilizado dois discos de 15 mm de *Diaporthe* sp., onde foram adicionados ao erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de fermentação previamente autoclavado a $121\pm1^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. O meio de fermentação constituído: 10 g.L⁻¹ de glicose, 10 g.L⁻¹ de peptona, 7,5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 2,0 g.L⁻¹ de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), 1,0 g.L⁻¹ de sulfato ferroso (FeSO₄.7H₂O), 1,0 g.L⁻¹ de sulfato de manganês (MnSO₄.H₂O) e 0,5 g.L⁻¹ de sulfato de magnésio (MgSO₄). Os erlenmeyers foram mantidos em agitador orbital a 120 rpm por 7 dias, a uma temperatura de 28°C.

4.2. OTIMIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR STR

A fermentação submersa foi realizada em um biorreator em batelada do tipo STR com volume útil de 4,5 L. O meio utilizado será constituído: 33% (v/v) de água de maceração de milho (AMM) 18 g. L⁻¹ de sacarose, 2 g.L⁻¹ de sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄, 0,5 g.L⁻¹ de sulfato de magnésio (MgSO₄.7H₂O), 1 g.L⁻¹ de sulfato

ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e 1 g.L⁻¹ de sulfato de manganês ($\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) seguindo a metodologia proposta por SOUZA (2015).

O inóculo foi retirado da estufa bacteriológica após 7 dias, onde foi macerado os micélios. Parâmetros utilizados na fermentação biorreator STR: temperatura de 28 °C, pH de 5,8 e tempo de fermentação de 5 dias. Para o ajuste do pH, soluções de ácido acético de 2 M e hidróxido de sódio 2 M foram acopladas às bombas peristálticas do processador do aparelho. Já para a redução de espuma foi utilizado o produto Agrotox AG229. Ao final do cultivo, a biomassa foi separada do caldo fermentado por processo de filtração com uma peneira de polietileno.

Os parâmetros de aeração (vvm) e agitação (rpm) foram otimizados através de um delineamento composto rotacional (DCCR) 2².

Tabela 2: Delineamento composto central rotacional (DCCR) para duas variáveis independentes.

	-1,41	-1	0	1	1,41
Rotação (rpm)	30,0	47,5	90,0	132,5	150,0
Aeração (vvm)	1,0	1,9	4,0	6,1	7,0

Para investigação preliminar da produção *in vitro* das biomoléculas com potencial herbicida produzidos pelo fungo *Diaporthe* sp, os tratamentos dos 11 ensaios do planejamento DCCR foram submetidos a ensaios de testes de inibição de germinação (transformado em % controle) e inibição de crescimento (Macias et al., 2000). Foram realizados os ensaios biológicos com plântulas e sementes de *Cucumis sativus* L. var. wisconsin (pepino) por ser uma espécie sensível aos herbicidas sintéticos e de uso frequente em bioensaios. As sementes dessas espécies possuem germinação rápida, uniforme e não apresentam dormência.

4.2.1. BIOENSAIO GERMINAÇÃO

Na avaliação de inibição de germinação das sementes para cada tratamento foram dispostas 50 sementes de Pepino entre duas folhas de papel Germitest esterilizadas, com três repetições, num total de 150 sementes de pepino. Foi utilizado um total de 35 ml de solução para cada tratamento. Os tratamentos foram realizados durante 7 dias em BOD á 28°C, para depois ser realizada a contagem das sementes. As sementes foram separadas em não germinadas e germinadas.

4.2.2. BIOENSAIO INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO

A análise inibição de crescimento das plântulas foi realizada com as sementes já pré-germinadas de pepino por 72 horas, nas mesmas condições dos testes de germinação (Macias et al., 2000). Após as 72 horas foi medida o comprimento de cada plântula (comprimento de radícula e hipocótilo) com o auxílio de um paquímetro e aplicado os 11 ensaios. Assim, 94 horas após aplicação dos ensaios foi medido os seus comprimentos das plântulas novamente. Para cada ensaio utilizou se 5 sementes de pepino em cada caixa gerbox, realizando triplicata. Para o cálculo da inibição foi relacionado a medida da testemunha absoluta.

$$\% \text{ inib cres} = \left(\left(\text{comp.} \frac{\text{ensaio } xi}{\text{testemunha}} \right) \times 100 \right)_{(1)}$$



Figura 2: Biorreator STR.

As análises estatísticas nesta etapa foram realizadas utilizando o software Statistica® 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA), considerando-se um nível de significância de 90%.

4.3. FORMULAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO

4.3.1. FORMULAÇÃO SÓLIDA

Para realização das formulações sólidas foi utilizado um equipamento Spray Drying modelo LM MSDi 1.0. O parâmetro fixado foi a temperatura de entrada de ar em 125 °C. Os parâmetros avaliados para otimização da formulação com dióxido de silício + o biosurfactante AgRho® FKC 1500 como ingrediente inerte foi a vazão de alimentação (L/h) e a vazão do ar (L/min) através de um delineamento composto rotacional (DCCR) ². As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica® 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA), considerando-se um nível de significância de 90%.

Tabela 3: Delineamento composto central rotacional (DCCR) para duas variáveis independentes.

	-1,41	-1	0	1	1,41
Vazão de ar (l/min)	1,0	1,4	2,5	3,6	4,0
Vazão de alimentação (l/h)	0,2	0,5	1,1	1,7	2,0

Para avaliação do rendimento % do ingrediente inerte foram adicionados 30g de dióxido de silício + 3 ml do biosurfactante em 300 ml de calda (297 ml de água destilada + 3 ml do biosurfactante), onde posteriormente cada formulação foi pesada em balança de precisão.

Para a avaliação da influência do ingrediente ativo na formulação em spray drying junto ao ingrediente foram realizados os seguintes tratamentos:

Tabela 4: Tratamentos para avaliação do rendimento % da formulação spray drying junto ao ingrediente ativo.

Ensaio	Tratamento
1	I.I*
2	I.I + 0,5% IA**
3	I.I + 25,0 % IA
4	I.I + 100,0% IA

*I.I = Ingrediente inerte

**I.A = Ingrediente ativo

O cálculo do rendimento percentual foi feito com base no teor de sólidos presente na formulação inicial (30 g) e no pó seco obtido após a secagem.

$$\%Rend = (\text{massa de salda} / \text{massa de entrada}) \times 100$$

(2)

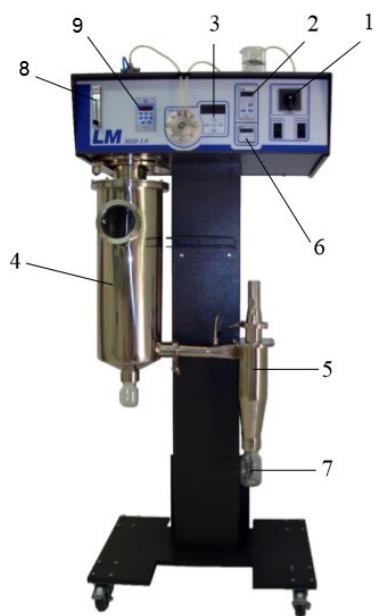


Figura 3- Spray Dryer Modelo LM MSDi 1.0

Legenda: 1 – Chave geral; 2 – Controle de aquecimento; 3 – Controle de bombeamento de líquido; 4 – Câmara de secagem; 5 – Separador de pó seco; 6 – Indicador de temperatura; 7 – Frasco coletor de produto seco; 8 – Rotâmetro; 9 – Controlador da vazão do soprador.

4.3.2. FORMULAÇÃO LÍQUIDA

As formulações líquidas foram realizadas através do misturador turrax. As formulações eram misturadas durante 30 minutos até perfeita homogeneidade das misturas.



Figura 4 - Agitador mecânico turrax.

4.4. AVALIAÇÕES DAS FORMULAÇÕES

Para avaliação da influência das formulações sobre a eficiência do herbicida natural à base de biomoléculas foi montado um experimento trifatorial 2 x 2 x 3. Onde os parâmetros estudados foram: formulação (líquida e sólida), adjuvante (sem e com) e caldo fermentado (5 v/v%, 25 v/v% e 100 v/v%) mais uma testemunha absoluta sem aplicação. O adjuvante utilizado foi o Ag-RHO FKC 1500 na dose de 1,0% v/v.

Quadro 2: Proporção utilizada para realização das formulações líquidas e sólidas em volume de 1000 ml (1 L).

Tratamento	Caldo fermentado (ml)	Surfactante (g)	Massa seca do caldo fermentado (g.L ⁻¹)	Silício (g)	Total de sólidos (g)
1	50	0	0,62	-	-
2	250	0	3,10	-	-
3	1000	0	12,40	-	-
4	50	10	0,62	-	-
5	250	10	3,10	-	-
6	1000	10	12,40	-	-
7	50	0	0,62	99,38	100
8	250	0	3,10	96,90	100
9	1000	0	12,40	85,60	100

10	50	10	0,62	89,38	100
11	250	10	3,10	86,90	100
12	1000	10	12,40	75,60	100

Para aplicação das formulações em sólido utilizou-se a proporção de 100 g da formulação sólido para 1000 ml de volume de calda.

Para a aplicação dos tratamentos utilizou-se um pulverizador costal pressurizado a CO₂, dotado de uma barra com quatro pontas do modelo Teejet DG 11002 com pressão de 2,8 bar e espaçamento entre pontas de 0,5 metros. A velocidade de deslocamento foi de 1 m s⁻¹ e o volume de calda utilizado foi 150 L ha⁻¹. Os tratamentos foram aplicados no momento em que as plantas se encontravam no estádio de duas a três folhas.

4.4.1. AVALIAÇÃO DE MASSA SECA (g) E PORCENTAGEM DE FITOTOXICIDADE (%).

As avaliações de massa seca (g) e porcentagem de fitotoxicidade (%) foram realizadas 7 dias após a aplicação (7 DAA) dos tratamentos, pois um dos tratamentos apresentou 100% neste momento. A avaliação de porcentagem de fitotoxicidade % aos 7 DAA foi realizada visualmente através da porcentagem de danos, utilizando uma escala de 0 - 100% (zero significa ausência de danos causados pelo herbicida e 100 morte total das plantas) adaptada de FRANS and CROWLEY, 1986) (Tabela 5).

Para a avaliação da massa seca, as plântulas foram cortadas rentes ao substrato, acondicionadas em sacos de papel e levadas a estufa a 60°C até atingirem massa constante. Posterior, cada repetição foi pesada em balança analítica.

Tabela 5: Método de avaliação de fitotoxicidade em plantas (FRANS and CROWLEY, 1986).

Fitotoxicidade	Categorias	% de controle
Sem injuria.	Sem efeito	0,0
Ligeira descoloração ou atrofia.	Baixo efeito	10,0
Alguma descoloração ou atrofia.		20,0
Lesão mais pronunciada, mas não duradoura.		30,0
Lesão moderada, geralmente com recuperação.	Moderado efeito	40,0
Lesão mais duradoura, recuperação duvidosa.		50,0
Lesão duradoura sem recuperação.		60,0
Lesão pesada, redução do suporte.	Severo efeito	70,0
Próxima destruição de safra.		80,0
Raramente algumas plantas permanecem.		90,0
Destrução completa da cultura.	Total efeito	100,0

4.4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES.

Avaliação da atividade enzimas antioxidantes foram realizadas a partir das amostras de parte aérea das plantas de alface coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. As mesmas foram armazenadas em ultrafreezer - 80°C até o momento das análises. Para as análises, as amostras (0,5 g para cada tratamento e repetição) foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 3,0 mL de tampão fosfato de sódio (pH 7,8) 0,05 M, contendo 1 mM de EDTA e 2% (w/v) de polivinilpirrolidona (PVP). Após o homogeneizado foi centrifugado a 13.000 x g por 20 min. a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade das enzimas (ZHU et al., 2004).

Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD): A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método espectrofotométrico, descrito por

Giannopolitis; Ries (1977). A mistura de reação continha tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 13 mM, riboflavina 2 µM, nitrobluetetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 0,1 mM, e 100 µL de extrato enzimático. A produção fotoquímica da formazana azul a partir do NBT foi monitorada pelo incremento da absorbância a 560 nm. A reação foi realizada em tubos de ensaio a 25°C, dentro de uma câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W. Como controle, tubos com a mistura de reação foram mantidos no escuro. A reação teve início ligando-se a luz e após 15 minutos de iluminação, a reação foi paralisada, desligando-se a luz. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima que inibe a fotorredução do NBT em 50% (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971). No ensaio, a riboflavina fotoquimicamente excitada é reduzida pela metionina em semiquinona, que doa um elétron ao oxigênio, formando o radical superóxido que por sua vez converte NBT em formazana azul. A superóxido dismutase catalisa a reação: $2O_2^{..} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$.

Atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD): A atividade da enzima POD foi determinada segundo Zeraik et al. (2008), utilizando-se o guaiacol como substrato. A mistura de reação continha 1,0 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 6,5), 1,0 mL de guaiacol (15 mM) e 1,0 mL de H_2O_2 (3 mM). Após homogeneização, foi adicionado 50 µL do extrato da planta a esta solução. A atividade da enzima foi medida através da oxidação do guaicol a tetraguaiacol através do aumento na absorbância a 470 nm. Os resultados foram expressos em unidade de enzima por mg de proteína ($U\ mg^{-1}$ proteína). Para o cálculo, foi utilizado o coeficiente de extinção molar de $26,6\ mM^{-1}\ cm^{-1}$.

4.4.3. ESTATISTICA.

Procedeu-se à análise de variância (ANOVA) e o teste de Scott-Knott para agrupamento das médias, em 5% de probabilidade de erro ($p < 0,05$), utilizando-se o programa estatístico Sisvar® 5.3 (Ferreira, 2011).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. AVALIAÇÃO DA FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA PRODUÇÃO DAS BIOMOLÉCULAS COM AÇÃO HERBICIDA

A utilização do planejamento experimental visou determinar as melhores condições da fermentação submersa em biorreator STR do fungo *Diaporthe* sp para produção de biomoléculas com ação herbicida, através da avaliação do controle de germinação (%) e a inibição de crescimento (%) do caldo fermentado sobre a cultura teste pepino (*Cucumis sativus*), e seus resultados podem ser visualizados na Tabela 6.

Pela tabela 6 podemos observar que o controle de germinação (%) variou de 94,56 % até 40,31 %, e a inibição de 88,52 % até 22,52 %, evidenciando que as variáveis influenciaram na otimização da fermentação submersa em biorreator STR. Em ambas as avaliações o ensaio 1 (47,5 rpm e 1,9 vvm) apresentou melhor resultado e o ensaio 4 (132,5 rpm e 6,1 vvm) o pior resultado das variáveis controle de germinação % e inibição de crescimento % (figura 5). O uso de teste de germinação e de inibição de crescimento são bastante comuns na avaliação de

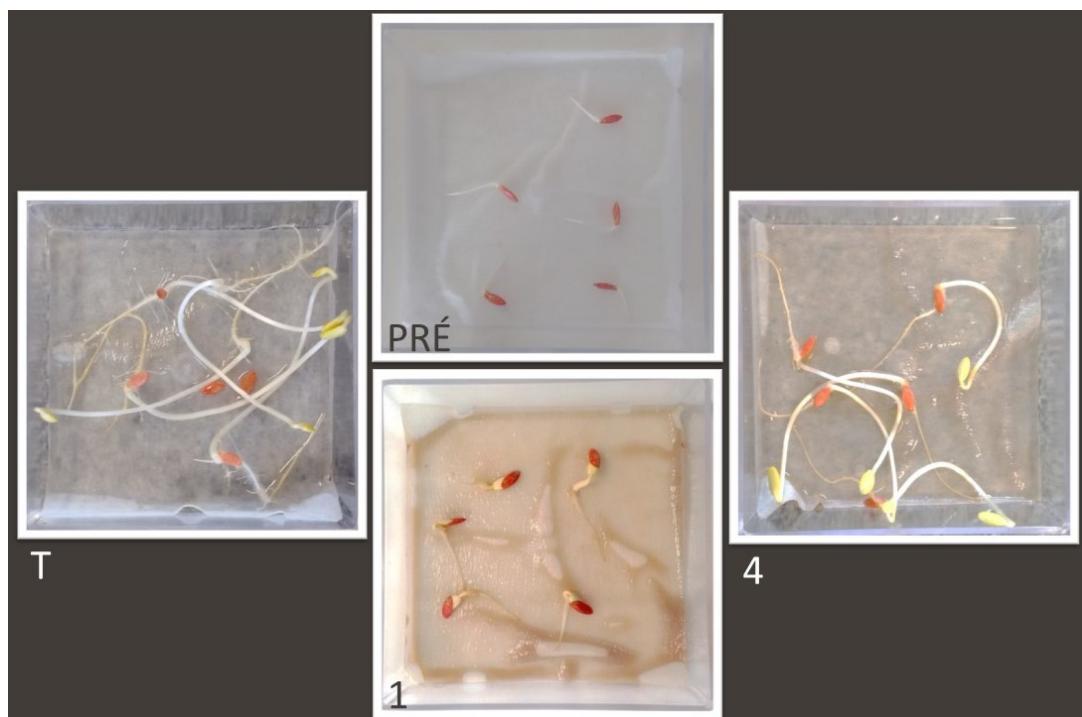


Figura 5: Comparação entre a testemunha absoluta, ensaio 1 e ensaio 4, mais momento de desenvolvimento das sementes PRÉ aplicação.

Tabela 6: Matriz experimental para avaliar a influência na fermentação do fungo *Diaporthe* sp em biorreator STR, após sete dias de fermentação.

Ensaio	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	Controle de germinação (%)	Inibição de crescimento (%)
1	47,5 (-1)	1,9 (-1)	94,56	88,52
2	132,5 (1)	1,9 (-1)	45,66	45,03
3	47,5 (-1)	6,1 (1)	64,38	56,23
4	132,5 (1)	6,1 (1)	40,31	22,52
5	90 (0)	1,0 (-1,41)	65,85	51,98
6	90 (0)	7,0 (1,41)	57,62	43,83
7	30,0 (-1,41)	4,0 (0)	89,08	80,98
8	150 (1,41)	4,0 (0)	40,91	25,96
9	90 (0)	4,0 (0)	46,27	53,03
10	90 (0)	4,0 (0)	59,97	51,08
11	90 (0)	4,0 (0)	52,98	42,456

Os dados da tabela 6 foram usados para calcular os efeitos das variáveis independentes (agitação e aeração) no valor final do controle de germinação % e da inibição de crescimento % (variáveis dependentes), onde os dados estão apresentados na figura 6 e figura 7 sob a forma de gráfico de Pareto. Pode-se observar que ambas as variáveis independentes estudadas influenciaram significativamente nas variáveis dependentes. Porém, a variável independente agitação (rpm) apresentou maior influência sobre os resultados finais.

Dentro de um intervalo de confiança de 90% podemos visualizar pelas figuras 6 e 7 que o aumento da agitação (rpm) e da aeração (vvm) acabam diminuindo o controle de germinação (%) e da inibição de crescimento (%), dentro dos níveis estudados. SOUZA et al. (2015) em trabalho que otimizou a fermentação variando a

agitação (40 a 60 rpm) e aeração (1 a 3 vvm), observou que a medida que aumentava a velocidade de agitação a produção de biomassa do fungo *Diaphorte* sp apresentava redução. A fisiologia dos fungos é fortemente influenciada pelas condições de agitação empregadas. A agitação dependendo das condições de fermentação, cria forças de cisalhamento que podem ter uma variedade de efeitos em microrganismos filamentosos. Estes podem incluir ruptura da parede celular, alterações morfológicas e / ou fisiológicas e variação na síntese da taxa do produto, concentrações de biomassa e taxas de crescimento global (PAPAGIANNI, 2004; TINOCO-VALENCIA et al., 2014).

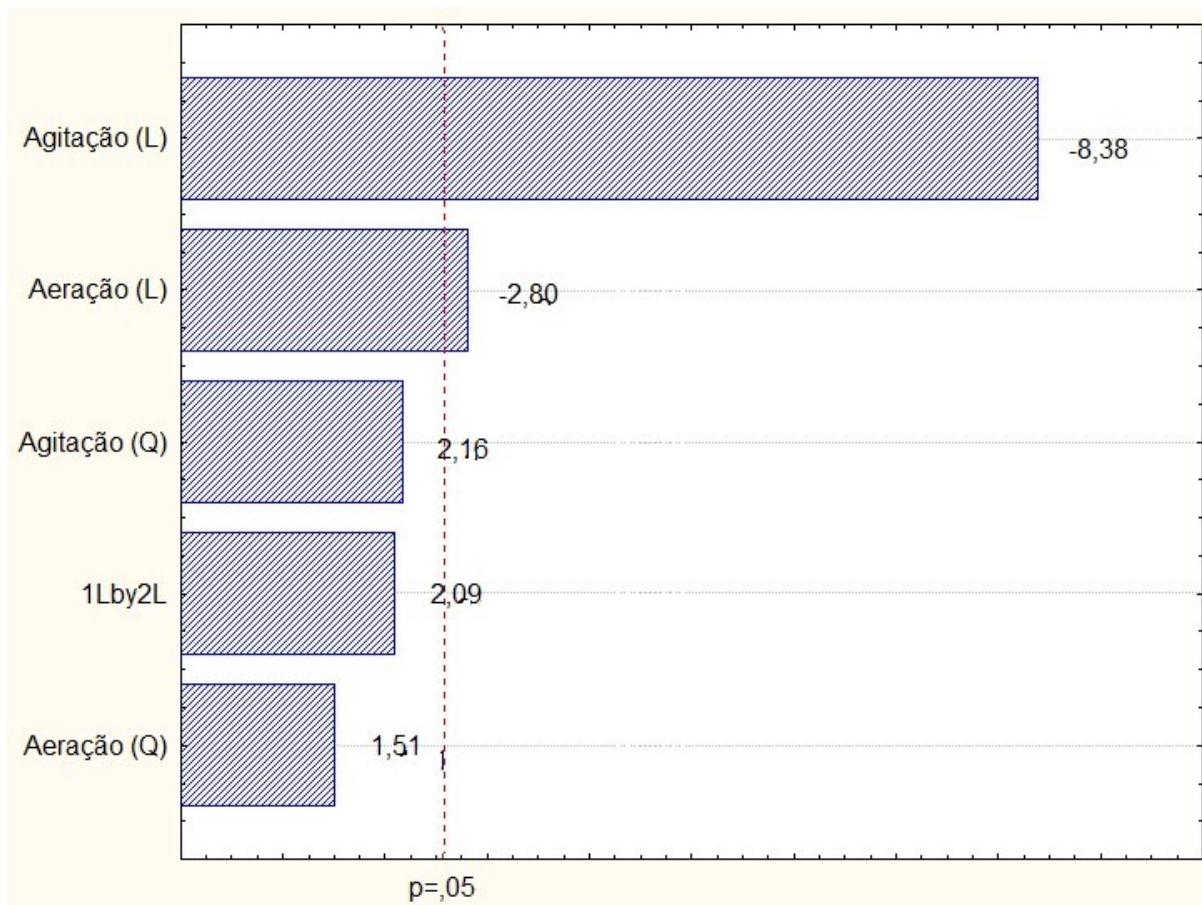


Figura 6: Gráfico de Pareto mostrando os efeitos de termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes sobre a DCCR para o controle de germinação (%).

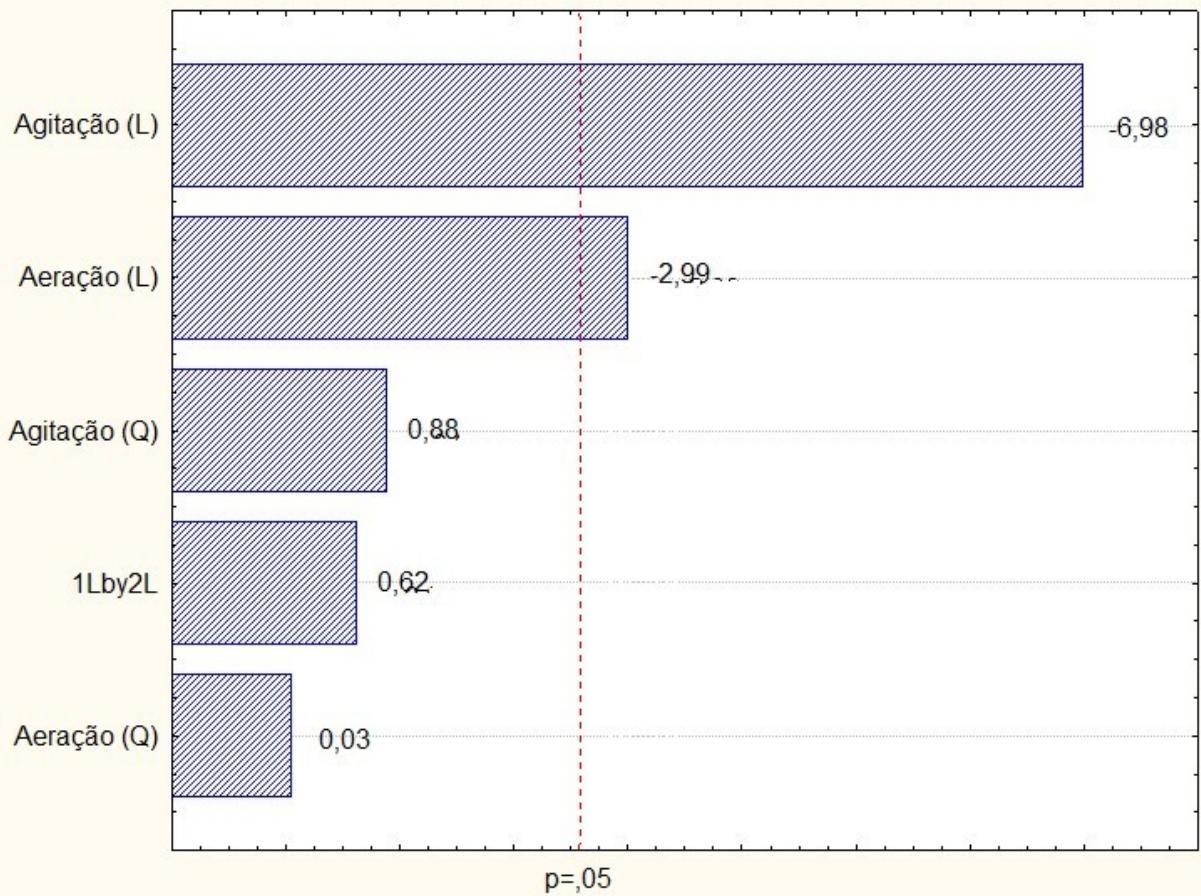


Figura 7: Gráfico de Pareto mostrando os efeitos de termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes sobre a DCCR para a inibição de crescimento (%).

5.2 AVALIAÇÃO DA FORMULAÇÃO SÓLIDA POR SPRAY DRYING

A avaliação do ingrediente inerte (dióxido de silício + biosurfactante) para as formulações em spray drying foi realizada com o estudo das variáveis da vazão de alimentação (L/h) e da vazão do ar (L/min). Conforme a tabela 7, pode se observar que os resultados de rendimento % variaram de 19,23 % a 9,22 %, respectivamente nos ensaios 7 (0,2 L/h e 2,5 L/min) e 2 (1,7 L/h e 1,4 L/min). Estes resultados mostraram influência das variáveis estudadas. Porém, o ensaio 1 (0,5 L/h e 1,4 L/min) apresentou resultado semelhante estatisticamente ao ensaio 7 (0,2 L/h e 2,5 L/min), quando comparado as médias pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade erro.

Assim, para verificar os efeitos da vazão de alimentação (L/h) e vazão do ar (L/min) no rendimento % da formulação com o ingrediente inerte, foi realizada a ANOVA com 90% de nível de confiança, podendo ser verificado na Figura 8.

Tabela 7 - Matriz experimental para avaliar a influência do agente adsorvente no rendimento da formulação em spray drying.

Run	Vazão de alimentação (L/h)	Vazão do ar (L/min)	Rendimento (%)
1	0,5 (-1)	1,4 (-1)	16,61 a*
2	1,7 (1)	1,4 (-1)	9,22 b
3	0,5 (-1)	3,6 (1)	11,70 b
4	1,7 (1)	3,6 (1)	11,39 b
5	1,1 (0)	1,0 (-1,41)	10,23 b
6	1,1 (0)	4,0 (1,41)	9,33 b
7	0,2 (-1,41)	2,5 (0)	19,23 a
8	2,0 (1,41)	2,5 (0)	10,46 b
9	1,1 (0)	2,5 (0)	13,59 b
10	1,1 (0)	2,5 (0)	11,02 b
11	1,1 (0)	2,5 (0)	12,28 b

* Médias não seguidas pelas mesmas letras nas colunas diferem entre si pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade erro.

A vazão de alimentação (L/h) apresentou efeito significativo $p<0,1$ no rendimento % da formulação com o ingrediente inerte, mostrando que a medida que aumentava a velocidade da vazão de alimentação (L/h), menor o rendimento %. O aumento dos valores de V proporciona a maior velocidade de escoamento do fluido no equipamento, o que reduz o tempo de contato entre o produto e o ar de secagem, tornando o processo de transferência de calor e massa menos eficiente, o que resulta em menor evaporação de água do produto e consequentemente, pós com maiores umidades (TONON et al., 2008).

Avaliando a figura 8 podemos observar um fator importante de interação das variáveis independentes, com efeito significativo $p<0,1$. Neste sentido, verifica-se que os efeitos ocorrem no rendimento % com a alteração das duas variáveis independentes. Pois a interação significativa apresentada na figura 8 expressa que, mesmo que a variável vazão de alimentação (L/h) tenha maior influência sobre o rendimento %, as duas variáveis independentes (vazão de alimentação e vazão de ar) estão relacionadas entre si.

O ajuste da vazão de alimentação é realizado com a finalidade de que o líquido presente nas gotículas evapore antes que estas entrem em contato com as paredes da câmara de secagem. Velocidades de alimentação excessivas conduzem à diminuição da temperatura de saída e ao acúmulo do material sobre as paredes da câmara (RANKELL et al., 2001).

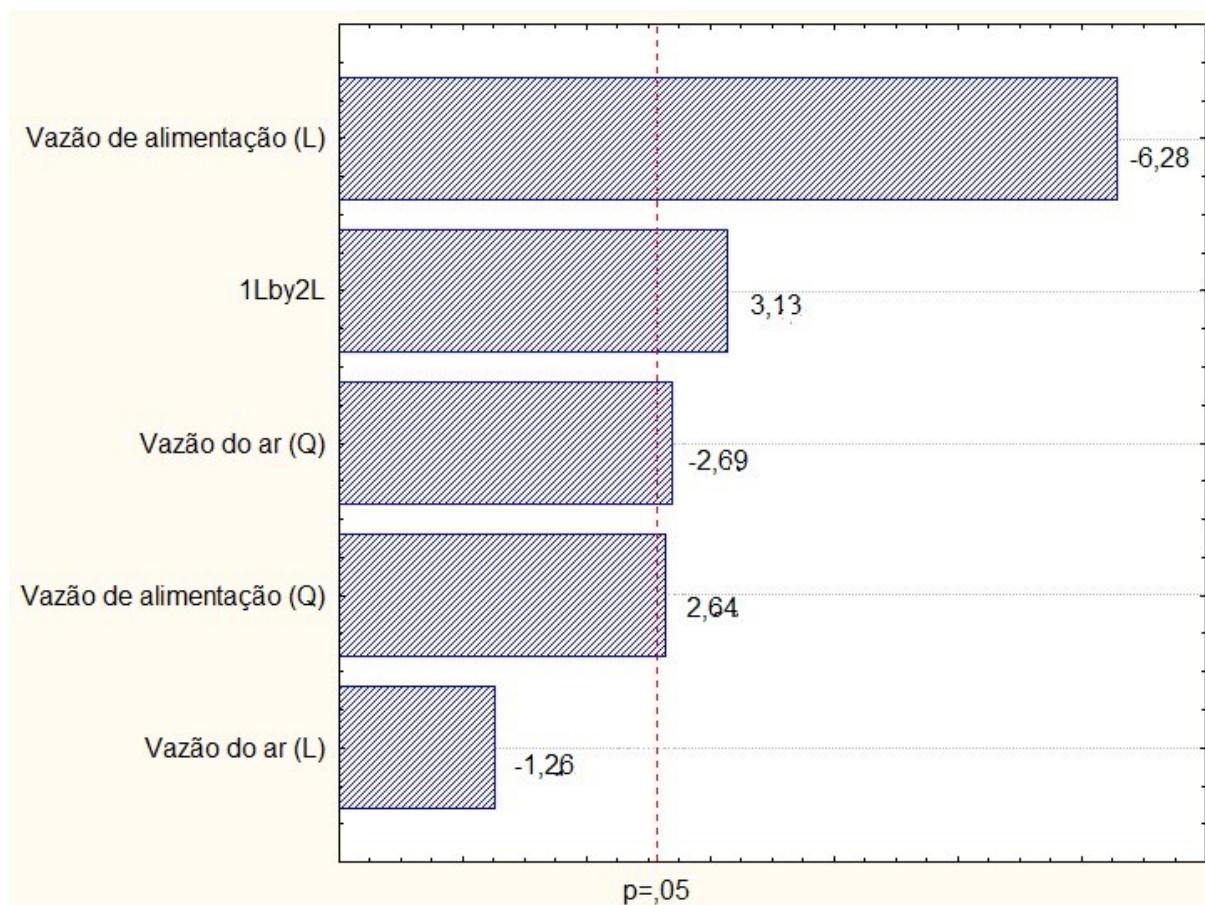


Figura 8: Gráfico de Pareto mostrando os efeitos de termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes sobre a DCCR para o rendimento (%).

Para verificar melhor a influência das variáveis de processo na produção sólida, os dados da Tabela 7 foram utilizados para gerar um modelo quadrático (Eq. 1), que apresentou alto coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9342$) e foi validado pela análise de variância (ANOVA) (F calculado foi 2,8 vezes maior que o valor crítico F encontrado em uma tabela em $p < 0,05$).

$$RS = 12.30 - 2.52 \times VAl + 1.26 \times VAl^2 - 0.50 \times VAr - 1.29 \times VAr^2 + 1.77 \times VAl \times VAr \quad (3)$$

onde RS é o rendimento sólido (% em peso), VAI e VAr são os valores codificados para vazão de alimentação e ar. O modelo validado foi utilizado para representar o gráfico de contorno apresentado na figura 9. O aumento do fluxo de alimentação apresentou um efeito negativo mais pronunciado no rendimento sólido que o aumento do fluxo de ar. Isto pode ser constatado analisando os coeficientes lineares da Eq. 1 para ambas as variáveis. Para vazão de alimentação, o coeficiente era de -2,52, enquanto para vazão de ar era de -0,50. O máximo rendimento sólido foi obtido para valores baixos de fluxo de ar e alimentação. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que, a alta vazão de alimentação, o tempo de permanência não foi suficiente para obter uma secagem satisfatória dos sólidos. Por outro lado, em altas vazões de ar, pode ocorrer o arrasto de partículas sólidas, diminuindo o rendimento. Com base nestes resultados, a condição operacional ótima para obter a fórmula sólida de bioherbicida foi definida como sendo fluxo de alimentação de $0,2 \text{ L.h}^{-1}$ e vazão de ar de $1,4 \text{ L.min}^{-1}$. Da Fig. 9, neste ponto é possível obter um rendimento sólido máximo após a secagem, isto é, em torno de 20% em peso.

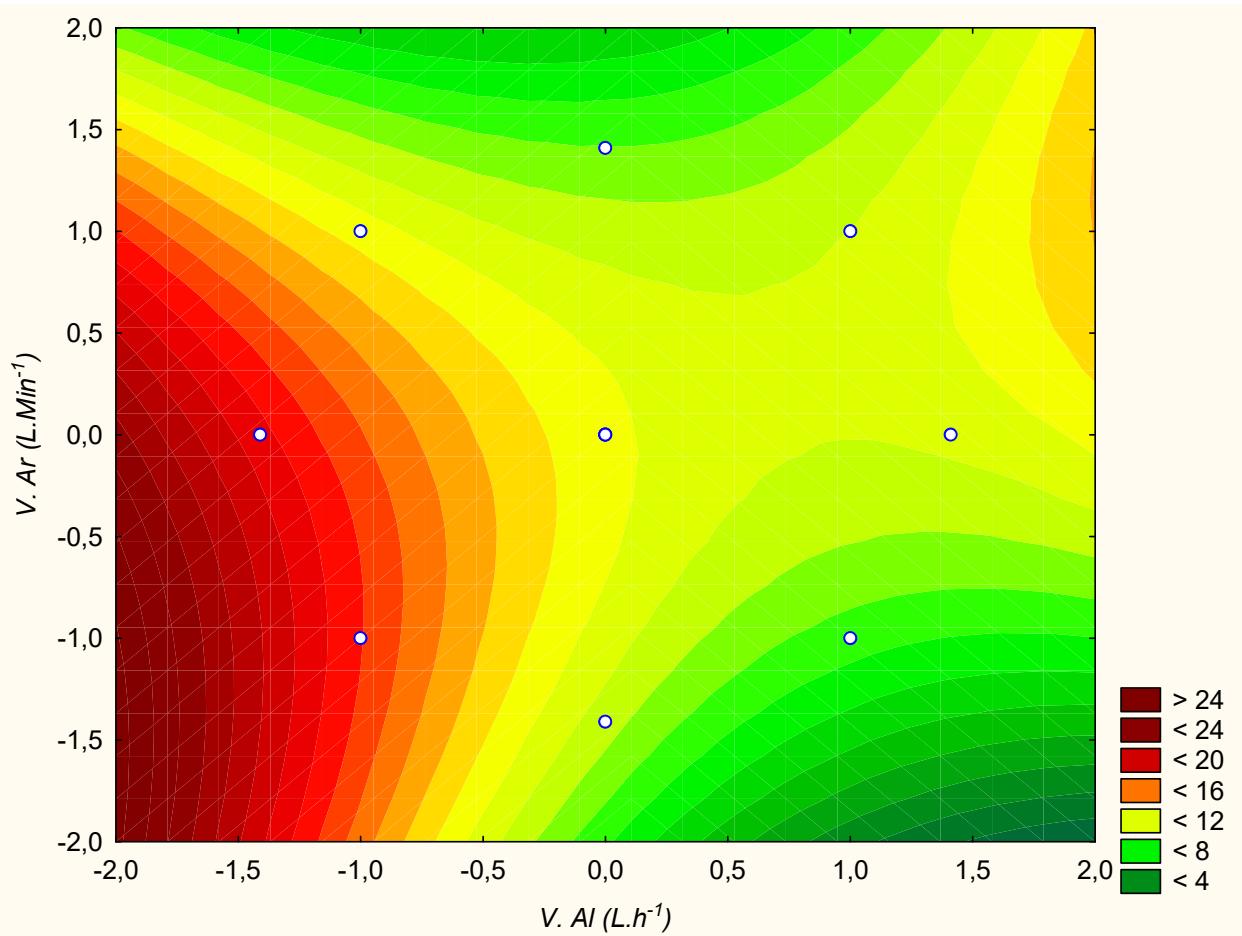


Figura 9: Influência dos fluxos de alimentação e ar no rendimento sólido após o processo de secagem.

Tabela 8 - Rendimento % da formulação spray drying nos tratamentos junto ao ingrediente ativo.

Ensaio	Tratamento	Rendimento (%)
1	I.I	17,09 a*
2	I.I + 0,5% IA	17,67 a
3	I.I + 25,0 % IA	14,79 a
4	I.I + 100,0% IA	10,28 b

* Médias não seguidas pelas mesmas letras nas colunas diferem entre si pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade erro.

A adição do ingrediente ativo (caldo fermentado com as biomoléculas) junto ao ingrediente inerte (dióxido de silício + biosurfactante) foi estudado para observar sua influência no rendimento da formulação em spray drying. Pode se observar através da tabela 8 que a adição no nível de 100 % do caldo fermentado diminuiu significativamente o rendimento da formulação. Este resultado deve se, provavelmente, pela composição do meio de fermentação com significativa concentração de ingredientes que aumentam a viscosidade e adesividade.

5.3 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DAS FORMULAÇÕES.

5.3.1 AVALIAÇÃO DA MASSA SECA (MS) E DE FITOTOXICIDADE %

Através da tabela 9 podemos observar uma diferença estatística entre os tratamentos quando avaliado os resultados de massa seca (MS) e fitotoxicidade %, pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro.

Os resultados obtidos para fitotoxicidade % demonstraram que há um efeito herbicida no caldo fermentado obtido a partir da fermentação em submerso utilizando o fungo *Diaporthe* sp. A tabela 9 apresenta os dados referentes à porcentagem de fitotoxicidade % causado nas folhas de alface (*Lactuca sativa*), onde variaram entre 0,0 até 96,7 %, respectivamente, testemunha absoluta e o tratamento “sólida, com, 100 %”. BASTOS, 2017, utilizando como cultura teste Pepino (*Cucumis sativus*) obteve em um dos seus tratamentos com o caldo fermentado do fungo *Diaporthe* sp resultado de mais de 80% das folhas destruídas.

Ao avaliar os resultados de MS (g) entre os tratamentos notou-se que os resultados variaram de 0,101 até 0,167 g, respectivamente, testemunha absoluta e o tratamento “sólida, com, 100 %”. Observa-se que o resultado de menor quantidade de massa seca (g) foi o que apresentou o melhor controle.

Tabela 9: Avaliação de matéria seca (g) e porcentagem de controle com relação aos fatores estudados (Santa Maria – RS).

Formulação	Adjuvante	Caldo	MS (g)	Controle %
		fermentado (%)		
Líquida		5	0,161 a*	0,0 c
	Sem	25	0,144 b	1,7 c
		100	0,126 c	6,7 c
		5	0,135 c	5,0 c
	Com	25	0,126 c	13,3 c
		100	0,112 c	40,0 b
Sólida		5	0,144 b	3,3 c
	Sem	25	0,125 c	20,0 b
		100	0,119 c	40,0 b
		5	0,138 c	11,7 c
	Com	25	0,123 c	25,0 b
		100	0,101 c	96,7 a
Testemunha absoluta			0,167 a	0,0 c

* Médias não seguidas pelas mesmas letras nas colunas diferem entre si pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade erro.

Pela tabela 10 verificou-se que não houve interação entre os fatores tipo de formulação, presença de adjuvante e porcentagem de caldo fermentado para a variável resposta MS (g), quando avaliado aos 7 DAA. Porém, os fatores isolados presença de adjuvante e porcentagem de caldo fermentado apresentaram resultados significativos para a variável resposta MS (g).

Tabela 10: Médias do acúmulo de massa seca da planta, aos 7 DAA. Santa Maria/RS, 2019.

Formulação	Adjuvante	Caldo fermentado (%)		
		5	25	100
Líquida	Sem	0,161 a A α	0,144 a A α	0,126 a A α
	Com	0,135 a A α	0,126 a A α	0,112 a A α
Sólida	Sem	0,144 a A α	0,125 a A α	0,119 a A α
	Com	0,138 a B α	0,123 a B α	0,101 a A α
Teste F_{Formulação (F)}				ns
Teste F_{Adjuvante (Ad)}				**
Teste F_{Caldo fermentado (CF)}				**
Teste F da interação F x Ad				ns
Teste F da interação F x CF				ns
Teste F da interação Ad x CF				ns
Teste F da interação F x Ad x CF				ns
CV (%)				12,04

Médias não seguidas pelas mesmas letras, minúsculas fator presença de adjuvante dentro do mesmo caldo fermentação % e tipo de formulação, maiúsculas fator caldo fermentado % dentro do mesmo tipo de formulação e presença de adjuvante, e, gregas fator tipo de formulação dentro do mesma presença de adjuvante e caldo fermentado %, pelo teste de Scott-Knott, em 5% de probabilidade (**).

Avaliando se os resultados da tabela 11 com a variável resposta porcentagem de fitotoxicidade % pode se observar uma interação entre os fatores estudados tipo de formulação, presença de adjuvante e porcentagem de caldo fermentado, quando comparados ao teste de Scott Knott em 5% de probabilidade de erro.

Os tratamentos com o fator porcentagem de caldo fermentatado de 5 % apresentou diferença estatística apenas na formulação sólida com adjuvante. Mesmo sendo valores bem baixos de controle % podemos destacar que a formulação sólida (em spray drying) conseguiu possivelmente concentrar as biomoléculas, e em conjunto o adjuvante possibilitou melhorias no momento de aplicação. Ao aumentar a concentração do caldo fermentado para 25 % notou-se que nos tratamentos “formulação líquida” obteve-se resultado diferente estatisticamente com a utilização de adjuvantes. Pode-se também observar uma

influência significativa da formulação sólida, quando comparado com os tratamentos em formulação líquida. Pois ao compararmos os tratamentos “líquida, sem, 25%” vs “sólida, sem, 25%” e os tratamentos “líquida, com, 25%” vs “sólida, com, 25%”, evidencia-se um aumento significativo na porcentagem de controle nas formulações sólidas.

Para os tratamentos utilizando a concentração de 100 % do caldo fermentado, ao compararmos os tratamentos “líquida, sem, 100%” vs “sólida, sem, 100%” e os tratamentos “líquida, com, 100%” vs “sólida, com, 100%”, pode-se avaliar uma influência significativa da formulação sólida (Figura 10). Este comportamento semelhante aos tratamentos com 25 % de caldo fermentado, pode ser explicado pelas baixíssimas concentrações de biomoléculas (metabólitos) dos fungos produzidas em meio aquoso de cultura, uma vez que o metabólito produzido se encontra diluído em um grande volume reacional (VAREJÃO, 2013). Neste sentido, podemos inferir que a formulação realizada com spray drying conseguiu concentrar as biomoléculas sem que mesmas fossem degradadas no processo de secagem. Diversos trabalhos estudando a formulação a seco com spray drying para produtos biológicos vem sendo realizados, e apresentando resultados bastante relevantes (MENG et al., 2014; OANCEA et al., 2016).

Outra influência significativa nos tratamentos com a porcentagem de 100 % de caldo fermentado foi a presença de adjuvante, onde verifica-se tanto nos tratamentos em formulação líquida quanto nos tratamentos com formulação sólida que a presença de adjuvante acarretou em resultados superiores estatisticamente (figura 11). A utilização de alface (*Lactuca sativa*) como planta teste pode ter influenciado, pois as folhas de alface são totalmente lisas sem pilosidades. Neste sentido, a utilização do adjuvante proporcionou maior adesividade e melhor distribuição das biomoléculas na superfície das folhas, aumentando o poder de ação herbicida sobre as plantas (HOAGLAND et al., 2007; PIYABOON et al., 2016). Diversos autores já realizaram trabalhos evidenciando o aumento da eficiência dos caldos fermentados com as biomoléculas através da utilização de diferentes adjuvantes (ALMEIDA, 2014; BASTOS, 2017; BRUM, 2016; TODERO, 2017; PES, 2015). Os autores BASTOS, 2017 e PES, 2015 estudaram a influência de adjuvantes em bioherbicidas formulados com metabólitos do fungo *Diaporthe* sp,

onde ambos observaram o aumento de eficiência dos bioherbicidas com a utilização de adjuvantes.

Nos resultados de fitotoxicidade %, quando comparados entre as concentrações de caldo fermentado, podemos avaliar que conforme aumenta a concentração do caldo fermentado maior é a fitotoxicidade %. Este comportamento comprova que o fungo *Diaporthe* sp têm a capacidade de produzir biomoléculas com fitotoxinas que apresentam atividade herbicida, ou seja, com habilidade de controlar determinadas plantas. PES, 2015 realizou a aplicação do caldo fermentado de *Diaporthe* sp. como bioherbicida em pós-emergência de duas plantas daninhas (*Echinochloa* sp., *Conyza* sp.), observando resultados de supressão de crescimento em ambas as espécies conforme aumentou se as doses utilizadas nos tratamentos.

Tabela 11: Médias do controle dos tratamentos, aos 7 dias após a aplicação. Santa Maria/RS, 2019.

		Caldo fermentado (%)		
Formulação	Adjuvante	5	25	100
Líquida	Sem	0,0 a A α	1,7 a A α	6,7 a A α
	Com	5,0 a A α	13,3 b B α	40,0 b C α
Sólida	Sem	3,3 a A α	20,0 a B β	40,0 a C β
	Com	11,7 b A α	25,0 a B β	96,7 b C β
Teste F_{Formulação (F)}		**		
Teste F_{Adjuvante (Ad)}		**		
Teste F_{Caldo fermentado (CF)}		**		
Teste F da interação F x Ad		**		
Teste F da interação F x CF		**		
Teste F da interação Ad x CF		**		
Teste F da interação F x Ad x CF		**		
CV (%)		24,14		

Médias seguidas pela mesmas letras não diferem estatisticamente%, pelo teste de Scott-Knott, em 5% de probabilidade. As letras minúsculas avaliam o fator presença de adjuvante dentro do mesmo caldo fermentação % e tipo de formulação, letras maiúsculas avaliam o fator caldo fermentado (v/v%) dentro do mesmo tipo de formulação e presença de adjuvante, e, as letras gregas o fator tipo de formulação dentro do mesma presença de adjuvante e caldo fermentado (v/v%) (**).



Figura 10: Comparação tratamento 3 (liquida, sem, 100%) vs tratamento 9 (sólida, sem, 100%) e tratamento 6 (liquida, com, 100 %) vs tratamento 12 (sólida, com, 100%).



Figura 11: Direito: Comparação entre a testemunha absoluta, tratamento 9 (Sólida, sem, 100%) e tratamento 12 (sólida, com, 100%), aos 7 DAA. Esquerdo: Lesão de necrose causado pelo herbicida natural.

5.3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Pode se observar diferença estatística nos resultados da atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD), avaliados aos 2 dias após a aplicação (DAA) dos tratamentos sobre a planta teste alface (tabela 12). Para a enzima POD nota se que houve diferença estatística dos resultados da formulação sólida com a testemunha, exceto o tratamento “sólida, sem, 5%”, quando comparados ao teste de Scott Knott com 5% de probabilidade de erro.

Ao avaliarmos os resultados de atividade da enzima SOD nota se que o tratamento “sólida, com, 100%” apresentou diferença estatística com todos os demais tratamentos avaliados. Quando comparamos a atividade da enzima SOD do tratamento “sólida, com, 100%” com a testemunha, verifica se que houve um aumento de 91,78 % desta atividade. Diversos trabalhos vêm demonstrando a relação do aumento da atividade da enzima SOD com aumento de determinados estresses que pode sofrer a planta, causado por fatores bióticos ou abióticos. EHSANI-MOGHADDAM et al. (2006) caracterizaram o envolvimento de SOD durante infecção do fungo *Mycosphaerella fragariae* em três cultivares de morango e observaram que o nível da concentração desta enzima antioxidante no segundo dia após a inoculação foi elevado em todas as plantas atacadas pelo fitopatógeno em comparação com os respectivos controles. Os autores observaram que as mais altas concentrações de SOD foram nos materiais resistentes, o poderia ser explicada como uma estratégia da planta para restringir o desenvolvimento do fungo pela ação desta enzima antioxidante.

Mesmo alguns herbicidas seletivos a determinada cultura pode desencadear a produção de espécies reativas de oxigênio e causar estresse oxidativo. Porém, as plantas resistentes equilibram as ROS e o sistema de enzimas antioxidante para que não ocorra a morte da cultura. Neste sentido, em determinado estudo foi observado que os herbicidas oxyfluorfen e oxadiazon resultaram em maior atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). Mesmo seletivos e registrados para controle de plantas daninhas na cultura do arroz, os herbicidas podem causar fitotoxicidade, reduzindo a estatura e alteram o metabolismo das plantas, gerando espécies

reativas de oxigênio, as quais ativam o sistema de defesa enzimático (LANGARO et al., 2017).

Tabela 12: Avaliação de POD e SOD com relação aos fatores estudados (Santa Maria – RS).

Formulação	Adjuvante	Caldo	POD	SOD
		fermentado (%)		
Líquida	Sem	5	7,5 b	224,9 b
		25	6,2 b	266,3 b
		100	9,3 b	256,0 b
	Com	5	10,1 b	244,8 b
		25	7,2 b	224,4 b
		100	7,4 b	244,3 b
Sólida	Sem	5	10,7 b	242,9 b
		25	16,8 a	213,9 b
		100	13,7 a	267,3 b
	Com	5	15,1 a	190,1 b
		25	20,0 a	254,3 b
		100	15,8 a	386,7 a
Testemunha absoluta			5,8 b	194,6 b

* Médias não seguidas pelas mesmas letras nas colunas diferem entre si pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade erro.

Pela tabela 13 verificou-se que não houve interação entre os fatores tipo de formulação, presença de adjuvante e porcentagem de caldo fermentado para a atividade da enzima SOD, quando avaliado aos 2 DAA. Porém, o fator isolado porcentagem de caldo fermentado apresentou resultado significativo para a variável resposta atividade da enzima SOD. Ao observarmos os resultados do tratamento

“sólida, com, 100 %” podemos inferir que o mesmo apresentou diferença estatística quando comparado com o tratamento “sólida, sem, 100%”.

Ao compararmos os tratamentos “sólida, com, 5 %”, “sólida, com, 25 % e “sólida, com, 100 %” observa se que o aumento da concentração das biomoléculas aumenta a atividade de defesa da planta teste alface. Está elevada atividade da enzima SOD pode explicar o ótimo controle realizado pelo tratamento “sólida, com, 100 %”, evidenciando a ação herbicida das biomoléculas produzidas pelo fungo *Diaporthe* sp. De FREITAS-SILVA et al. (2017) estudando os efeitos do herbicida glifosato sobre a planta teste *Arabidopsis thaliana* observou que o tratamento do herbicida promoveu aumento da atividade de SOD.

Tabela 13: Valores médios do efeito dos tratamentos sobre a enzima SOD, aos 2 dias após a aplicação. Santa Maria/RS, 2019.

Formulação	Adjuvante	Caldo fermentado (%)		
		5	25	100
Líquida	Sem	224,9 a A α	266,3 a A α	256,0 a A α
	Com	244,8 a A α	224,4 a A α	244,3 a A α
Sólida	Sem	242,9 a A α	213,9 a A α	267,3 a A α
	Com	386,7 a A α	386,7 a A α	386,7 b B β
Teste F_{Formulação (F)}			ns	
Teste F_{Adjuvante (Ad)}			ns	
Teste F_{Caldo fermentado (CF)}			**	
Teste F da interação F x Ad			ns	
Teste F da interação F x CF			ns	
Teste F da interação Ad x CF			ns	
Teste F da interação F x Ad x CF			ns	
CV (%)			19,78	

Médias não seguidas pelas mesmas letras, minúsculas fator presença de adjuvante dentro do mesmo caldo fermentação % e tipo de formulação, maiúsculas fator caldo fermentado % dentro do mesmo tipo de formulação e presença de adjuvante, e, gregas fator tipo de formulação dentro do mesma presença de adjuvante e caldo fermentado %, pelo teste de Scott-Knott, em 5% de probabilidade (**).

Os resultados da tabela 14 com a variável resposta atividade da enzima POD demonstram uma interação significativa entre os fatores estudados tipo de formulação e porcentagem de caldo fermentado, quando comparados ao teste de Scott Knott em 5% de probabilidade de erro. Os fatores isolados tipo de formulação, presença de adjuvante e porcentagem de caldo fermentado apresentaram resultados significativos. Comparando os resultados dos tratamentos “líquida” com tratamentos “sólida” destaca-se uma diferença estatística. E dentro dos tratamentos “sólida” tanto “sem ou com” adjuvante observamos que as concentrações 25 % e 100 % aumentaram a atividade da enzima POD. LAXM. S et al. (2018) estudando o efeito de herbicidas sobre a planta daninha *Portulaca oleracea* concluiu que o 2,4-D às 48 horas após sua aplicação causaram um aumento na atividade da enzima POD. Definindo que o aumento da atividade enzimática era indução do sistema antioxidante sob o estresse do herbicida.

Outro estudo avaliando a atividade enzimática em cultivares de soja convencionais e transgênicas sob aplicação do herbicida glifosato observou que a variedade convencional induziu o aumento da atividade da enzima POD, entretanto concluiu que a quantidade de POD na variedade transgênica já era alta e não necessita de ser induzida. Diante dos resultados, os autores inferiram que a atividade da enzima POD poderia ser utilizada como marcador bioquímico para distinguir entre variedades convencionais e transgênicas (MOLDES, 2006). Estudo realizado para discutir a influência das espécies reativas de oxigênio (ROS) sobre a ação do herbicida Glufosinato, observou que o acúmulo de amônia é uma consequência fisiológica da inibição da GS, não sendo a causa da fitotoxicidade, estabelecendo que as (ROS) podem ser a principal responsável pela rápida morte celular induzida pelo glufosinato (TAKANO et al., 2019).

Tabela 14: Valores médios do efeito dos tratamentos sobre a enzima POD, aos 2 dias após a aplicação. Santa Maria/RS, 2019.

Formulação	Adjuvante	Caldo fermentado (%)		
		5	25	100
Líquida	Sem	6,9 a A α	6,2 a A α	7,0 a A α
	Com	8,8 a A α	7,6 a A α	8,2 a A α
Sólida	Sem	9,8 a A β	15,8 a B β	14,6 a B β
	Com	12,6 b A β	16,0 a B β	16,6 b B β
Teste F_{Formulação (F)}		**		
Teste F_{Adjuvante (Ad)}		**		
Teste F_{Caldo fermentado (CF)}		**		
Teste F da interação F x Ad		ns		
Teste F da interação F x CF		**		
Teste F da interação Ad x CF		ns		
Teste F da interação F x Ad x CF		ns		
CV (%)		10,18		

Médias não seguidas pelas mesmas letras, minúsculas fator presença de adjuvante dentro do mesmo caldo fermentação % e tipo de formulação, maiúsculas fator caldo fermentado % dentro do mesmo tipo de formulação e presença de adjuvante, e, gregas fator tipo de formulação dentro do mesma presença de adjuvante e caldo fermentado %, pelo teste de Scott-Knott, em 5% de probabilidade (**).

O bioherbicida produzido através das biomoléculas do fungo *Diaphorte* sp apresentaram maior atividade herbicida quando utilizado a formulação sólida (spray drying), com a presença do adjuvante e utilizando 100% v/v do caldo fermentado. Mostrando assim que o aumento na concentração das biomoléculas proporcionou maior ação herbicida e que adjuvante auxiliou na tecnologia de aplicação. Pode se inferir também que a utilização da técnica de secagem por spray drying foi eficiente para aumentar a concentração das biomoléculas sem degradar durante o processo.

Os resultados encontrados para atividade das enzimas antioxidantes corroboraram com o resultado de fitotoxicidade %, evidenciando que o bioherbicida formulado com as biomoléculas proporcionou um estresse oxidativo na planta teste alface. Neste sentido, pode se observar que em pequenas concentrações das

biomoléculas, a planta através das enzimas POD e SOD pode eliminar e combater as biomoléculas com ação herbicida. Porém, quando utilizou se altas concentrações das biomoléculas (100 % v/v) nas formulações em conjunto da formulação spray drying e do adjuvante, a ação herbicida prevaleceu sobre alta atividade das enzimas antioxidantes, ocorrendo degradação da membrana e lesões sobre as folhas da planta teste.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo, foram testadas formulações sólidas e líquidas contendo biomoléculas com atividade herbicida. A formulação sólida apresentou a maior fitotoxicidade na planta teste (96,7%) e a fitotoxicidade foi diretamente relacionada à concentração de caldo fermentativo na fórmula. O uso de adjuvante melhorou a eficiência do bioherbicida. A matéria seca dos tratamentos foi menor que o controle e isso foi correlacionado com o aumento do estresse oxidativo, uma vez que a atividade das enzimas antioxidantes, como SOD e POD, aumentou no tratamento com alto nível de fitotoxicidade. A tecnologia de spray drying promete concentrar o bioherbicida sem perda de compostos bioativos, uma vez que um dos maiores desafios na produção de bioherbicidas é a baixa concentração de ingrediente ativo no caldo fermentado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYDIN SS, BÜYÜK I, ARAS S. Relationships among lipid peroxidation, SOD enzyme activity, and SOD gene expression profile in *Lycopersicum esculentum* L. exposed to cold stress. *Genet.Mol. Res.* 2013; 12(3):3220-3229.
- ABBAS, H.K.; DUKE, S.O.; TANAKA, T. Phytotoxicity of fumonisins and related compounds. *J. Toxicol.-Toxin Rev.* 1993, 12, 225–251.
- ABBAS, H.K.; DUKE, S.O. Phytotoxins from plant pathogens as potential herbicides. *Toxin Rev.* 1995, 14, 523–543.
- ALMEIDA, T. C. Formulação de um herbicida biológico produzido através da fermentação submersa em biorreatador. 2014. 91 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade Federal de Santa Maria, 2014.
- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, S.L. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v.53, n. 372, 1331-1341, 2002.
- ASH, G. J. The science art business of successful bioherbicides. *Biological Control*, v. 52, 230–240, 2010.
- BECKIE, H.J., MORRISON, I.N., 1993. Effect of ethalfluralin and other herbicides on trifluralin-resistant green foxtail (*setaria viridis*). *Weed Technol.* 7, 6–14. 1993.
- ALIFERIS, K.A.; CHRYSAYI-TOKOUSBALIDES, M.; On the mode of action of the phytotoxin (8R,16R)-(-)-pyrenophorin, *Pestic. Biochem. Physiol.* 86 (2006) 7–14.

BASTOS, B. O. Produção de herbicida por fermentação em estado sólido utilizando o fungo Diaporthe sp. 2016. 54 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Santa Maria, 2015.

BECKIE, H.J., MORRISON, I.N., 1993. Effect of ethalfluralin and other herbicides on trifluralin-resistant green foxtail (*setaria viridis*). Weed Technol. 7, 6–14. 1993.

BLAND, J.M.; EDWARDS, J.V.; EATON, S.R.; LAX, A.R. Potential of natural peptide compounds as leads for novel pesticides. Pesticide Science, n.39, p.331-340, 1993.

CALDWELL, C.J., HYNES, R.K., BOYETCHKO, S.M., and KORBER, D.R. Colonization and Bioherbicidal Activity on Green Foxtail by *Pseudomonas fluorescens* BRG100 in a Pesta Formulation, Canadian Journal of Microbiology. (2012).

CARVALHO, L. B. Plantas daninhas. Lages: Edição do Autor, 2013b. 82 p.

CAGLAYAN, H.; CALISKAN, H. Sustainability assessment of heat exchanger units for spray dryers. Energy. 2017. Acesso em: 04 set. 2017. DOI: 10.1016/j.energy.2017.02.097

CALISKAN, G.; DIRIM, S. N. The effects of the different drying conditions and the amounts of maltodextrin addition during spray drying of sumac extract. Food and Bioproducts Processing, Rugby, v. 91, n. 4, p. 539-548, oct. 2013.

CARRILLO, N.; VALLE, E.M. El lado oscuro del oxígeno. Revista de la Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal. Cordoba. v. 2, n. 2. Mar. 2005.

CIMMINO, A., ANDOLFI, A., BERETETSKIY, A., EVIDENTE, A., 2008. Production of phytotoxins by *Phoma exigua* var. *exigua*, a potential mycoherbicide against perennial thistles. Journal of Agricultural and Food Chemistry.

CHRISTOFFOLETI, P. J. et al. Glyphosate sustainability in South American cropping systems. Pest Manag. Sci., v. 64, n. 4, p. 422-427, 2008.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; LÓPEZ-OVEJERO, R. F. Resistência das plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P. J. (Coord.). Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas. 3.ed. Piracicaba: HRAC-BR, 2008. p. 3-3.

COSTA-SILVA, T. A. Caracterização bioquímica e secagem em “spray dryer” de lípases produzidas pelo fungo endofílico *Cercospora kikuchii*. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2010.

COUTO, R. O.; CONCEIÇÃO, E. C.; CHAUL, L. T; OLIVEIRA, E. M. S.; MARTINS, F. S.; BARA, M. T. F.; REZENDE, K. R.; ALVES, S. F.; PAULA, J. R. Spray dried Rosemary extracts: physicochemical and antioxidant properties. Food Chemistry, London, v. 131, n. 1, p. 99-105, mar. 2012.

CHEN, J.; SHIYAB, S.; HAN, F. X.; MONTS, D. L.; WAGGONER, C. A.; YANG, Z. M.; SU, Y. Bioaccumulation and physiological effects of Mercury in *Pteris vittata* and *Nephrolepis exaltata*. Ecotoxicology, v. 18, n. 1, p. 110-121, 2009.

CHEN, H.; ZHANG, Y.; ZHONG, Q. Physical and antimicrobial properties of spraydried zein-casein nanocapsules with co-encapsulated eugenol and thymol. Journal of Food Engineering, Essex, v. 144, p. 93–102, jan. 2015.

CHAUDIÈRE, J. Some chemical and biochemical constraints of oxidative stress in living cells. In: RICE EVANS, C.; BURDON, R.H. (Ed.). Free radical damage and its control. Amsterdam: Elsevier Science, 1994. chap. 2, p. 23-64.

DAI, J.; KROHN, K.; FLOERKE, U.; GEHLE, D.; AUST, H. J.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; RHEINHEIMER, J. Novel highly substituted biraryl ethers, phomopsines

D-G, isolated from endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Adenocarpus foliolosus*. European Journal of Organic Chemistry, v. 23, p. 5100–5105, 2005.

DE CAMPOS AM 1996. Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Ilex paraguariensis* St. Hill. Aquifoliaceae (erva-mate). Porto Alegre, 149p. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS.

DE FREITAS-SILVA L, RODRIGUEZ-RUIZ M, HOUMANI H, DA SILVA LC, PALMA JM. Glyphosate-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* affecting peroxisomal metabolism and triggers activity in the oxidative phase of the pentose phosphate pathway OxPPP involved in NADPH generation. J Plant Physiol. 2017; 218:196-205

De SOUZA KCB. 1997. Desenvolvimento de metodologia analíticas e tecnológicas na obtenção de extratos secos nebulizados de *Passiflora edulis* forma flavicarpa. Porto Alegre, 141p. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS.

DONADIO S., MONCIARDINI P., ALDUINA R., MAZZA P., CHIOCCHINI C., CAVALETTI L., SOSIO M., PUGLIA A.M.; Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites, Journal of Biotechnology 99, 187 – 198, 2002.

DUKE,S. O.; DAYAN, F. E.; ROMAGNI, J. G; RIMANDO, A. M.; Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. Weed Research; v. 40, p. 99-111. 2000.

EVIDENTE, A., ANDOLFI, A., VURRO,M., ZONNO, M.C., MOTTA, A., 2002. Cytochalasins Z1, Z2 and Z3, three 24-oxa[14]cytochalasans produced by *Pyrenophora semeniperda*. Phytochemistry.

EVIDENTE, A., CIMMINO, A., ANDOLFI, A., VURRO, M., ZONNO, M.C., CANTRELL, C.L., MOTTA, A., 2008. Phyllostictines A-D, oxazatricycloalkenones

produced by *Phyllosticta cirsii*, a potential mycoherbicide for *Cirsium arvense* biocontrol. *Tetrahedron* 64, 1612e1619.

EVIDENTE, A., PUNZO, B., ANDOLFI, A., BERESTETSKIY, A., MOTTA, A., 2009. *Alternethanoxins* A and B, polycyclic ethanones produced by *Alternaria sonchi*, potential mycoherbicides for *Sonchus arvensis* biocontrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57.

ESTEVES, B.N. Influência do processo de secagem por pulverização mecânica (spray dryer) no tamanho de partícula e densidade aparente do café solúvel. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Universidade de São Paulo, 2006.

FAVARETTO, A.; SCHEFFER-BASSO, S. M.; FELINI, V.; CARNEIRO, C. M.; NETO ZOCH, A. Seedling growth of white clover treated with root and leaf aqueous extract of tough lovegrass. *Revista Brasileira de Zootecnia / Brazilian Journal of Animal Science*, v. 40, p. 1168-1172, 2011.

FERREIRA, L. C. Ação protetora do óxido nítrico em plantas de soja (*Glycine Max L. Merril*) submetidas ao lactofen. 2007. 155 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*, v. 35, p. 1039-1042, 2011.

FOYER, C. H.; LELANDAIS, M.; KUNERT, K. J. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum*, Lund, v. 92, p. 696-717, 1994.

FLORIN OANCEA, IULIA RAUT, TATIANA EUGENIA ŞESAN, PETRUȚA CĂLINA CORNEA. Dry Flowable Formulation of Biostimulants *Trichoderma* Strains. *Agriculture and Agricultural Science Procedia Volume 10*, 2016, Pages 494-502.

GANNIBAL, PH. B.; EGOROVA, A. V.; BERESTETSKIY, A. Potential of the *Alternaria fungi* for biocontrol of sow thistle. In Proceedings of International Conference "Development of Environmentally Friendly Plant Protection", Pu::haj:a:rve, Estonia, Sept 5-7, 2006; p 27.

GEALY, D.R., GURUSIDDAIAH, S., and OGG, A.G., Jr. Isolation and characterization of metabolites from *Pseudomonas syringae*-Strain 3366 and their phytotoxicity against certain weed and crop species. *Weed Science*, 44, 383-392. (1996).

GURUSIDDAIAH, S., GEALY, D.R., KENNEDY, A.C., and OGG, A.G., Jr. Isolation and characterization of metabolites from *Pseudomonas fluorescens*-D7 for control of *Downy Brome (Bromus tectorum)*, *Weed Science*, 42, 492-501. (1994).

GRAUPNER, P.R., CARR, A., CLANCY, E., GILBERT, J., BAILEY, K.L., DERBY, J. A., GERWICK, B.C., 2003. The Macrocidins: novel cyclic tetramic acids with herbicidal activity produced by *Phoma macrostoma*. *Journal of Natural Products* 66, 1558–1561.

GREAVES, M. P.; Microbial herbicides: Factors in development,. In COPPING, L>G> Crop protection agents from nature. Cambridge: p. 444-467, 1996.

GREEN, J. M. Current state of herbicides in herbicide-resistant crops. *Pest Management Science*, v. 70, p.1351-1357, 2014.

GILL SS, TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010, 909-930.

HARTMANN T., Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view, *Entomologia Experimentalis et Applicata* 80, 177 – 188, 1996.

HEAP, I. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Weed Science Society of America 2019. Disponível em: <http://www.weedscience.org>.

HEISEY, R.M.; PUTNAM, A.R. Herbicidal effects of geldanamycin and nigericin, antibiotics from *Streptomyces hygroscopicus*. Journal of Natural Products, v.49, n.5, p.859-865, 1986.

HOAGLAND, R.E., C.D. BOYETTE AND M.A. WEAVER. 2007. Bioherbicides: Research and risks. Toxin Reviews. 26:313–342.

HOAGLAND R.E.; BOYETTE C.D.; ABBAS H.K. *Myrothecium verrucaria* isolates and formulations as bioherbicide agents for *kudzu*. Biocontrol Sci. Technol. v. 17, n. 7, p. 721–731, 2007.

HRAC-BR. Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas Daninhas aos Herbicidas. Assuntos Técnicos. São Paulo, 2019. Disponível em:
<http://www.hracbr.com.br/>

JESUS, S. S. DE, & MACIEL FILHO, R. (2013). Drying of α -amylase by spray drying and freeze-drying - a comparative study. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 31(3), 625–631.

JOYE, I. J.; McCLEMENTS, D. J. Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. Current Opinion in Colloid and Interface Science, Amsterdam, v. 19, n. 5, p. 417427, oct. 2014.

KAMOUN A S, HADDAR A, ALI N E, FRIKHA B G, KANOUN S & NASRI M. Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. Microbiol. Res, 163: 299-306 (2008).

KASTANIAS, M.A., CHRYSAYI-TOKOUSBALIDES, M., 2005. Bioactivity of the fungal metabolite (8R,16R)-(-)-pyrenophorin on graminaceous plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*

KISSMANN, K.G. Adjuvantes para caldas de produtos fitossanitario. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 21., 1997, Caxambu, MG. Palestras... Caxambu, MG: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, p. 61-77. 1997.

EHSANI-MOGHADDAM, KHANIZADEH, SHAHROKH (2007). The Effect of Leaf Spot Disease on Specific Antioxidant Activity of Strawberry. *Acta Horticulturae* 744: 329-334. 10.17660/ActaHortic.2007.744.35.

KUMARAN, R. S.; HUR, B. Screening of species of the endophytic fungus *Phomopsis* for the production of the anticancer drug taxol. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 54, p. 21–30, 2009.

LAXMI, S & CHAMBHARE, MAHADEV & KADLAG, S & AHIRE, MAHENDRA & NIKAM, Td. (2018). Herbicide effects on pigments and antioxidant enzymes of *Portulaca oleracea* L. 7.

LIAO, Y.H. et al. Investigation of the physical properties of spray-dried stabilized lysozyme particles. *Jounal of Pharmacy and Pharmacology*, v.55, p.1213-1223, 2003.

LIN, X.; HUANG, Y.; FANG, M.; WANG, J.; ZHENG, Z.; SU, W. Cytotoxic and antimicrobial metabolites from marine lignicolous fungi, *Diaporthe* sp. *FEMS Microbiology Letters*, v. 251, p. 53–58, 2005.

MARQUES, L.G. Liofilização de frutas tropicais. Tese Doutorado em engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos - São Carlos, 2008.

MINGZHI, L., X. LING AND S. ZILING. 2007. Isolation and Characterization of a phytotoxin from *Xanthomonas campestris* pv. *Retroflexus*. Chin. J. Chem. Eng. 15(5):639-642.

MISHRA, P.; MISHRA, S.; MAHANTA, C. L. Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla (*Emblica officinalis*) juice powder. Food and Bioproducts Processing, Rugby, v. 92, n. 3, p. 252-258, jul. 2014.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science, London, v. 7, p. 405-410, 2002.

MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. Plant Science, Clare, v. 162, n. 4, p. 491-498, Apr. 2002.

MOLDES, CARLOS ALBERTO. Resposta de enzimas antioxidantes à aplicação do herbicida glifosato em variedades de soja transgênica e não transgênica / Carlos Alberto Moldes. - Piracicaba, 2006. 92 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, 2006.

MOORE RE, Niemczura WP, Kwock OCH, Patil SS (1984) Inhibitors of ornithine carbamoyl transferase from *P. syringae* pv. *phaseolicola*. Revised structure of phaseolotoxin. Tetrahedron Lett 15:3931

MURUGESAN, R.; ORSAT, V. Spray Drying for the Production of Nutraceutical Ingredients - A Review. Food and Bioprocess Technology, New York, v. 5, n. 1, p. 3-14, jan. 2012.

NAKAJIMA, M.; ITOI, K.; TAKAMATSU, Y.; KINOSHITA, T.; OKAZAKI, T.; KAWAKUBO, K.; SHINDO, M.; HONMA, T.; TOHJIGAMORI, M.; HANEISHI, T. Hydantocydin: A new compound with herbicidal activity from *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Antibiot.* 1991, 44, 293–300.

NOHATTO, M. A., AGOSTINETTO, D., LANGARO, A. C., OLIVEIRA, C. DE, & RUCHEL, Q. (2016). Antioxidant activity of rice plants sprayed with herbicides. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 46(1), 28–34

OLIVEIRA Jr., R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. Biologia e manejo de plantas daninhas. Curitiba, PR: Editora Omnipax, 2011. 348p.

PAPAGIANNI, M., 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol. Adv.* 22, 189–259.

PEIXOTO, F.; ALVES-FERNANDES, D.; SANTOS, D.; FONTAINHAS-FERNANDES, A. Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Pesticide Biochem Physiol*, v. 85, n. 2, p. 91-96, 2006.

PES, M. P. Metabólitos secundários obtidos de *Diaporthe* sp. aplicados para o controle de plantas daninhas. 2015. 65 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Santa Maria, 2015.

PIYABOON, O. et al. Pathogenicity, host range and activities of a secondary metabolite and enzyme from *Myrothecium roridum* on water hyacinth from Thailand. *Weed Biology and Management*, v. 16, p.132–144, 2016.

RANKELL AS, LIEBERMAN HÁ, SCHIFFMAN RF 2001. SECAGEM. IN: LACHMAN L, LIEBERMAN HA, KANIG JL. Teoria e prática na indústria farmacêutica. Vol 1. Lisboa: Calouste Gulbenkian, p. 83-112.

RANI, P. U.; PRATYUSHA, S. Defensive role of *Gossypium hirsutum* L. anti-oxidative enzymes and phenolic acids in response to *Spodoptera litura* F. feeding. Journal of Asia Pacific Entomology, v. 16, p. 131-136, 2013.

RIELLY, C.D.; STAPLEY, A.G.F. Effects of process variables on the denaturation of whey proteins during spray drying. Drying Technology, v.25, p. 799–807, 2007.

ROSSKOPF E.N. et al. *Phomopsis amaranthicola*, a new species from *Amaranthus* sp. Mycologia, v. 92, p. 114–122, 2000.

SAXENA, S.; PANDEY, K. A.; Microbial metabolites as eco-friendly agrochemicals for the next millennium. Applied Microbiology and Biotechnology; v. 55, p. 395 – 403. 2001.

SINGH, H.; DIXIT, S.; VERMA, P. C.; SINGH P. K. Differential peroxidase activities in three different crops upon insect feeding. Plant Signaling & Behavior, v. 8, e. 25615-1 – e. 25615-7, 2013.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutases. Plant Physiology, Waterbury, v. 101, p. 7-12, 1993.

STRANGE, R.N. Phytotoxins produced by plant pathogens. Nat. Prod. Rep. 2007, 24, 127– 144.

SHAW FV 1997. Spray drying as an alternative granulation technique. In: Parikj DM. Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology. Nova York: Marcel Dekker, p. 75-96.

STEWARD WW (1971) Isolation and proof of structure of wildfire toxin. Nature 229:174– 178.

SINGH, S.; DIXIT, D. A review on spray drying: emerging technology in food industry. International Journal of Applied Engineering and Technology, Jaipur, v. 4, n. 1, p. 1-8, jan./mar. 2014.

SILVA JÚNIOR JOC, VIEIRA JLF, BARBOSA WLR, PEREIRA NL 2006. Caracterização físico-química do extrato fluido e seco por nebulização de *Symphytum officinale* L. Rev Bras Farmacogn 16(Supl.): 671-677.

SOUZA, A. R. C.; BALDONI, D. B.; LIMA, J.; PORTO, V. S.; MARCUZ, C.; FERRAZ, R. C.; KUHN, R.C.; JACQUES, R. J. S.; GUEDES, J. V. C.; MAZUTTI, MARCIO A. Bioherbicide production by *Diaporthe* SP. isolated from the Brazilian Pampa biome. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 4, p. 575-578, 2015.

SONG, N. H.; YIN, X.; CHEN, G. F.; YANG, H. Biological responses of wheat (*Triticum aestivum*) plants to the herbicide chloroturon in soils. Chemosphere, v. 68, n. 9, p. 1779-1787, 2007.

SYROS, T.; YUPSANIS, T.; ZAFIRIADIS, H.; ECONOMOU, A. Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in 59 cuttings of *Ebenuscretica* L. Journal of Plant Physiology, Jena, v. 161, n. 1, p. 69-77, Jan. 2004.

TAKANO, H.K., BEFFA, R., PRESTON, C., WESTRA, P., DAYAN, F.E. Reactive oxygen species trigger the fast action of glufosinate. Planta. 2019 Jun;249(6):1837-1849. doi: 10.1007/s00425-019-03124-3.

TINOCO-VALENCIA, R., GÓMEZ-CRUZ, C., GALINDO, E., SERRANO-CARREÓN, L., 2014. Toward an understanding of the effects of agitation and aeration on growth and lac-cases production by *Pleurotus ostreatus*. J. Biotechnol. 177, 67–73.

TONON, R. V.; BRABET, C.; HUBINGER, M. D. Influence of process conditions on the physicochemical properties of acai (Euterpe oleraceae Mart.) powder produced by spray drying. Journal of Food Engineering, v.88, p.411- 418, 2008.

THÉROND, P. et al. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, London, v. 3, p. 373-84, 2000.

UDAYANGA, D. et al. The genus Phomopsis: biology, applications, species concepts and names of common pathogens. Fungal Diversity, v. 50, p. 189–225, 2011.

VAREJÃO, E.V.V. ; DEMUNER, Antônio José ; BARBOSA, L. C. A. ; BARRETO, R. W. ; VEIRA, B. S. . Toxicidade de filtrados de cultura de *Alternaria euphorbiicola* em folhas de *Euphorbia heterophylla*. Planta Daninha (Impresso), v. 31, p. 1-9, 2013.

VASCONCELOS EAF, MEDEIROS MGF, RAFFIN FN, MOURA TFAL 2005. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil® 200 nas características dos Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn. 20(4): Ago./Set. 2010 extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). Rev Bras Farmacogn 15: 243249.

WILLIAMS D. H., STONE M. J., HAUCK P. R., RAHMAN S.K., Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? Journal of Natural Products 52 (6), 1189 – 1208, 1989.

WU, S. H.; CHEN, Y. W.; SHAO, S. C.; WANG, L. D.; LI, Z. Y.; YANG, L. Y.; LI, S. L.; HUANG, R. Ten-membered lactones from *Phomopsis* sp., an endophytic fungus of *Azadirachta indica*. Journal of Natural Products, v. 71, p. 731– 734, 2008.

WU, G. L.; CUI, J.; TAO, L.; YANG, H. Fluroxypyrr triggers oxidative damage by producing superoxide and hydrogen peroxide in rice (*Oryza sativa*). Ecotoxicology, v. 19, n. 1, p. 124-132, 2010.

YAN, Y., LIU, Q., ZANG, X., YUAN, S., BAT-ERDENE, U., NGUYEN, C., TANG, Y. (2018). Resistance-gene-directed discovery of a natural-product herbicide with a new mode of action. *Nature*, 559(7714), 415–418.

YIN, X. L.; JIANG, L.; SONG, N. H.; YANG, H. Toxic reactivity of wheat (*Triticum aestivum*) plants to herbicide isoproturon. *J Agri Food Chem*, v. 56, n. 12, p. 48254831, 2008.

XIANGKUN MENG, JUNJIE YU, MINA YU, XIAOLE YIN, YONGFENG LIU. Dry flowable formulations of antagonistic *Bacillus subtilis* strain T429 by spray drying to control rice blast disease. Biological Control, 2015

