

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

Thiarles Brun

**CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS COM BIOHERBICIDA
PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO DE *Diaporthe schini***

Santa Maria, RS

2020

Thiarles Brun

**CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS COM BIOHERBICIDA PRODUZIDO POR
FERMENTAÇÃO DE *Diaporthe schini***

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Santa Maria/RS (UFSM), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Engenharia Agrícola**

Orientador: Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti

Santa Maria, RS

2020

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Brun, Thiarles
CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS COM BIOHERBICIDA
PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO DE Diaporthe schini / Thiarles
Brun.- 2020.
77 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, 2020

1. Microrganismo 2. Fermentação 3. Bioherbicida 4.
Spray drying I. Mazutti, Marcio Antonio 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.


Declaro, THIARLES BRUN, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Thiarles Brun

**CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS COM BIOHERBICIDA PRODUZIDO POR
FERMENTAÇÃO DE *Diaporthe schini***

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do
Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Agrícola, Universidade Federal de Santa
Maria/RS (UFSM), como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Engenharia
Agrícola

Aprovado em 20 de fevereiro de 2020:



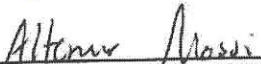
Marcio Antonio Mazutti, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Adriano Melo Arrué, Dr. (UFSM)



Giovani Leone Zabet, Dr. (UFSM)



Altemir José Mossi, Dr. (UFFS) - Videoconferência



Jair João Daniel Junior, Dr. (UFFS)

Santa Maria, RS

2020

AGRADECIMENTOS

Quero dedicar este trabalho primeiramente a Deus, por iluminar o meu caminho e a todas as pessoas que torceram pelo meu sucesso e ajudaram nesta trajetória.

Agradeço a toda minha família, especialmente meus pais Elcides José Brun e Simone Terezinha Avrella Brun, por todo o amor, confiança e pelo apoio durante o meu doutorado. E aos meus irmãos Willian e Reule, pelas brincadeiras, parceria. A minha namorada Jéssica Emilia Rabuske, pelo amor e apoio incondicional, principalmente na condução dos trabalhos e por me apoiar nos momentos difíceis. E a família da minha namorada, meu sogro e sogra, cunhada, concunhado e afilhados, que são minha família também e me ajudaram muito nessa fase da minha vida.

Agradeço ao meu orientador, professor Marcio Antonio Mazutti, pela confiança depositada em mim, paciência, conselhos e pela ótima orientação na condução dos trabalhos do doutorado.

Agradeço a todos os amigos e colegas, pela ajuda nos trabalhos do laboratório de bioprocessos, pelas novas amizades conquistadas durante o doutorado e pelo fortalecimento das amizades antigas. Obrigado pela companhia, conversas, risadas e pelo mate de cada dia. E saibam que podem sempre contar comigo para o que der e vier.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Maria ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Agrícola e a todos os professores e funcionários pelo apoio para a condução do trabalho.

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Ministério da Educação) pelo apoio financeiro.

RESUMO

CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS COM BIOHERBICIDA PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO DE *Diaporthe schini*

AUTOR: THARLES BRUN

ORIENTADOR: MARCIO ANTONIO MAZUTTI

O controle de plantas daninhas é fundamental para garantir a produtividade e qualidade da produção de alimentos. O controle químico é o mais utilizado, porém a demanda por alimentos mais saudáveis, a preocupação com o meio ambiente e a saúde dos agricultores e plantas resistentes, provocou aumento na busca por outros métodos de controle. Esse trabalho tem como objetivo melhorar a eficiência de bioherbicidas produzidos por fermentação em estado sólido e comparar esta técnica com a fermentação submersa utilizando o fungo *Diaporthe schini*, além de estudar o uso do *spray drying* para a secagem. Primeiramente, realizou-se fermentação em estado sólido determinando as melhores condições de cultivo do fungo com ação herbicida em teste de absorção em folha destacada de *Cucumis sativus*. O melhor resultado encontrado com ação herbicida na fermentação em estado sólido foi comparado com a fermentação submersa, realizado através da caracterização físico-química e efeito bioherbicida. Além disso, estudou-se diferentes aditivos para a secagem em *spray drying* e foram otimizados os parâmetros do equipamento. Todas as condições foram avaliadas conforme o efeito bioherbicida em pós-emergência de *Bidens pilosa*, *Amaranthus viridis*, *Echinochloa crusgalli* e *Lolium multiflorum*. A melhor condição de cultivo encontrada para a fermentação em estado sólido foi de 40% de umidade e sem suplementação de água de maceração de milho (AMM) e farelo de soja (FS), apresentando necrose em folhas de *C. sativus*. O caldo de *D. schini* obtido por fermentação submersa foi mais eficaz do que a fermentação em estado sólido para o controle de plantas daninhas, apresentando inibição do crescimento das plantas daninhas e melhores características físico-químicas. A secagem com aditivo lactose e na condição do ponto central do planejamento experimental, com temperatura do ar na entrada do *spray drying* de 100°C, vazão do ar de secagem 1,5 m³/min e vazão de alimentação de 0,22 L/min apresentou o maior efeito bioherbicida sobre plantas daninhas. A fermentação submersa aliada a secagem por *spray drying* mostrou ser uma importante ferramenta para a produção de bioherbicida de *D. schini*, podendo fornecer subsídios para novas pesquisas.

Palavras chave: Microrganismo, fermentação, bioherbicida, *spray drying*

ABSTRACT

CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS COM BIOHERBICIDA PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO DE *Diaporthe schini*

AUTHOR: THIAERLES BRUN
ADVISOR: MARCIO ANTONIO MAZUTTI

Weed control is essential to ensure the productivity and quality of food production. Chemical control is the most used, but the demand for healthier food, concern for the environment and the health of farmers, has increased the search for other control methods. This work aims to improve the herbicidal effect of bioherbicides produced by solid state fermentation and to compare this technique with submerged fermentation using the fungus *Diaporthe schini*, in addition to studying the use of spray drying for microencapsulation. First, solid state fermentation was carried out to determine the best conditions for cultivation of the fungus with herbicidal action in an absorption test on detached leaf of *Cucumis sativus*. The best result found with herbicidal action in solid state fermentation was compared with submerged fermentation, carried out through physical-chemical characterization and bioherbicidal effect. In addition, different adjuvants for spray drying microencapsulation were studied and the equipment parameters were optimized. All conditions were evaluated according to the post-emergence bioherbicidal effect of *Bidens pilosa*, *Amaranthus viridis*, *Echinochloa crusgalli* and *Lolium multiflorum*. The best cultivation condition found for solid state fermentation was 40% moisture and without corn maceration water (AMM) and soybean meal (FS) supplementation, presenting necrosis in *C. sativus* leaves. *D. schini* broth obtained by submerged fermentation was more effective than solid state fermentation for weed control, showing weed growth inhibition and better physicochemical characteristics. Microencapsulation with lactose adjuvant and in the condition of the central point of spray drying planning with an inlet temperature of 100°C, flow of drying air 1.5 m³/min and feed flow of 0.22 L/min showed the greatest effect bioherbicide on weeds. Submerged fermentation combined with microencapsulation by spray drying is an important tool for the production of *D. schini* bioherbicide, and may provide subsidies for further research.

Keywords: Microorganism, fermentation, bioherbicide, spray drying

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos conceitos aplicados às avaliações de toxicidade de acordo com o SBCPD.	31
Tabela 2 - Valores codificados das variáveis independentes utilizadas no DCCR.	35
Tabela 3 - Efeito inibitório do bioherbicida produzido por fermentação em estado sólido (FES) de <i>Diaporthe schini</i> sobre folhas destacadas de <i>Cucumis sativus</i> em diferentes substratos.	38
Tabela 4 - Comparação de diferentes técnicas de produção de um bioherbicida sobre a fitotoxicidade em plantas daninhas.	39
Tabela 5 - Caracterização do caldo obtido por fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS) de <i>Diaporthe schini</i> para produção de bioherbicida.	47
Tabela 6 - Seleção do aditivo para a formulação sólida por <i>spray drying</i> do bioherbicida produzido por fermentação submersa (FS) de <i>Diaporthe schini</i>	50
Tabela 7 - Seleção do aditivo para a formulação sólida por <i>spray drying</i> e seu efeito bioherbicida sobre altura, massa verde da parte aérea (MVPA), massa verde da raiz (MVR), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) de plantas daninhas.	56
Tabela 8 - Formulações sólidas de aditivos + água (controle) por <i>spray drying</i> e seu efeito bioherbicida sobre altura, Massa verde da parte aérea (MVPA), massa verde da raiz (MVR), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) de plantas daninhas.	57
Tabela 9 - Efeitos das condições experimentais do <i>spray drying</i> , temperatura (T_{in}), vazão do ar de secagem (V_s), vazão de alimentação (V_a) sobre as respostas temperatura de saída (T_{out}), umidade (U), rendimento (R) e eficiência energética (EE) da mistura do bioherbicida e lactose.	59
Tabela 10 - Efeitos das condições experimentais do <i>spray drying</i> , temperatura (T_{in}), vazão do soprador (V_s), vazão de alimentação (V_a) sobre a altura, massa verde parte aérea (MVPA), massa verde da raiz (MVR), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) de <i>Bidens pilosa</i> e <i>Amaranthus viridis</i>	61
Tabela 11 - Efeitos das condições experimentais do <i>spray drying</i> , temperatura (T_{in}), vazão do soprador (V_s), vazão de alimentação (V_a) sobre a altura, massa verde parte aérea (MVPA), massa verde da raiz (MVR), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) de <i>Echinochloa crusgalli</i> e <i>Lolium multiflorum</i>	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma	26
Figura 2 - Crescimento micelial em placa petri do fungo <i>Diaporthe schini</i>	27
Figura 3 - Câmara climática (A) e fermentação em estado sólido em tubos de vidro (B).	28
Figura 4 - Reator STR para fermentação submersa.....	29
Figura 5 - Teste em folha destacada de <i>Cucumis sativus</i>	30
Figura 6 – Casa de vegetação e disposição dos tratamentos para aplicação em plantas daninhas.	32
Figura 7 – Equipamento de secagem por <i>spray drying</i>	34
Figura 8 - Ação bioherbicida de <i>Diaporthe schini</i> produzido por fermentação em estado sólido (FES) em diferentes condições de cultivo.	37
Figura 9 - Comparação entre os tratamentos avaliados no efeito bioherbicida sobre <i>Bidens pilosa</i> , <i>Amaranthus viridis</i> , <i>Echinochloa crusgalli</i> e <i>Lolium multiflorum</i>	40
Figura 10 - Altura de plantas daninhas em função dos tratamentos testemunha (água), fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS), avaliados durante 14 dias após a aplicação.	42
Figura 11 - Massa verde da parte aérea de plantas daninhas em função da aplicação dos tratamentos testemunha (água), fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS).	44
Figura 12 - Massa verde da raiz de plantas daninhas em função da aplicação dos tratamentos testemunha (água), fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS).	44
Figura 13 - Massa seca da parte aérea de plantas daninhas em função da aplicação dos tratamentos testemunha (água), fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS).	45
Figura 14 - Massa seca da raiz de plantas daninhas em função da aplicação dos tratamentos testemunha (água), fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS).	45
Figura 15 - Comparação entre diferentes aditivos para a formulação sólida de bioherbicida por <i>spray drying</i> sobre <i>Bidens pilosa</i>	51
Figura 16 - Comparação entre diferentes aditivos para a formulação sólida de bioherbicida por <i>spray drying</i> sobre <i>Amaranthus viridis</i>	52
Figura 17 - Comparação entre diferentes aditivos para a formulação sólida de bioherbicida por <i>spray drying</i> sobre <i>Echinochloa crusgalli</i>	53

Figura 18 - Comparação entre diferentes aditivos para a formulação sólida de bioherbicida por <i>spray drying</i> sobre <i>Lolium multiflorum</i>	54
Figura 19 - Efeito das condições experimentais do <i>spray drying</i> na ação bioherbicida em <i>Bidens pilosa</i>	63
Figura 20 - Efeito das condições experimentais do <i>spray drying</i> na ação bioherbicida em <i>Amaranthus viridis</i>	64
Figura 21 - Efeito das condições experimentais do <i>spray drying</i> na ação bioherbicida em <i>Echinochloa crusgalli</i>	65
Figura 22 - Efeito das condições experimentais do <i>spray drying</i> na ação bioherbicida em <i>Lolium multiflorum</i>	65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVO GERAL	14
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1 PLANTAS DANINHAS	15
3.2 CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS	15
3.3 CONTROLE BIOLÓGICO DE PLANTAS DANINHAS	16
3.4 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	18
3.5 FERMENTAÇÃO SUBMERSA	20
3.6 <i>DIAPORTHE SP.</i>	21
3.7 <i>SPRAY DRYING</i>	23
3.8 BIOENSAIOS	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 LOCALIZAÇÃO	26
4.2 MICRORGANISMO	26
4.3 PRODUÇÃO DE BIOHERBICIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	27
4.4 PRODUÇÃO DE BIOHERBICIDA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA	28
4.5 BIOENSAIOS	29
4.5.1 Aplicação em folha destacada de <i>Cucumis sativus</i>	29
4.5.2 Aplicação em plantas daninhas	30
4.6 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	32
4.7 <i>SPRAY DRYING</i>	33
4.7.1 Seleção do aditivo transportador	34
4.7.2 Otimização do <i>spray drying</i>	35
4.7.3 Medição da temperatura do ar de saída, eficiência energética, rendimento de recuperação de pó e teor de umidade	35
4.7.4 Atividade biológica	36
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 DEFINIÇÃO DE VARIÁVEIS OPERACIONAIS PARA A PRODUÇÃO DO BIOHERBICIDA POR FES	37

5.2	COMPARAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO BIOHERBICIDA PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E SUBMERSA	39
5.2.1	Comparação da atividade biológica	39
5.2.2	Comparação físico-química	46
5.3	ESCOLHA DO ADITIVO PARA SECAGEM DO BIOHERBICIDA POR <i>SPRAY DRYING</i>	48
5.4	OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO <i>SPRAY DRYING</i>	58
6.	CONCLUSÕES	66
	REFERÊNCIAS	67

1. INTRODUÇÃO

As plantas daninhas possuem crescimento rápido e se adaptam a diversos habitats, interferindo no desenvolvimento de cultivos agrícolas e prejudicando as funções do ecossistema. Esta habilidade em competir por espaço, água, luz e nutrientes, interfere negativamente na produtividade das culturas e na qualidade do produto final (ADETUNJI et al., 2019), além de disseminar-se facilmente do seu ambiente natural para diferentes regiões do mundo (ALVARADO-SERRANO et al., 2019).

Vários métodos de controle de plantas daninhas são utilizados, como físico, cultural, biológico e químico. O controle químico é o mais utilizado e eficaz, porém quando utilizado de maneira indiscriminada resulta em riscos ao meio ambiente, pessoas e animais (KHALIQ et al., 2013) e acarreta em um aumento da incidência de plantas daninhas resistentes a herbicidas (BONNY, 2016).

Para minimizar os impactos negativos provocados pela aplicação de herbicidas sintéticos, diversas pesquisas estão sendo desenvolvidas nas últimas décadas visando à descoberta de novos herbicidas seletivos, obtidos por meio de rotas biotecnológicas, utilizando fungos (TRIOLET et al., 2019). Os fungos são os microrganismos mais abundantes e desempenham papel fundamental e representam boa alternativa no controle de plantas daninhas, devido ao seu potencial de produção de fitotoxinas de interesse, podendo servir como base para a produção de novos herbicidas (CIMMINO et al., 2015).

Estudos mostram que a atividade herbicida de isolados fúngicos está diretamente relacionada com a concentração da toxina presente em seu extrato bruto (ZHANG et al., 2006), sendo a escolha da melhor técnica de produção e das condições de cultivo primordiais para a produção de metabólitos com ação bioherbicida. Um dos processos mais utilizados para a produção de metabólitos secundários de fungos são os processos fermentativos. Estes podem ser realizados por cultivos em meio sólido ou submerso (BRUN et al., 2016).

O uso da fermentação em estado sólido (FES) proporciona acréscimo no rendimento de produtos, devido à similaridade de suas condições de cultivo quando comparados com seu habitat natural (PANDEY, 2003). Existem ainda, metabólitos secundários de fungos que são produzidos exclusivamente durante o crescimento em meio sólido. Por isso a FES é considerada uma alternativa viável na produção e descoberta de novos metabólitos produzidos por fungos (HÖLKER and LENZ, 2005). A fermentação submersa (FS) é uma das técnicas mais utilizadas na indústria e caracteriza-se pela presença de nutrientes dissolvidos no meio líquido. Nesta técnica é possível ter um maior controle do processo, como temperatura, pH,

aeração e agitação do meio de cultura, garantindo assim, maior homogeneidade do processo de produção dos metabólitos secundários (SINHA; SINHA, 2009).

Entre os fungos estudados, o gênero *Diaporthe* se destaca como potencial para a produção de metabólitos secundários com ação herbicida quando produzido em meio fermentativo controlado (BASTOS et al., 2017; de SOUZA et al., 2015; PES et al., 2016; SOUZA et al., 2017). Em trabalho realizado por Souza et al. (2017) foram coletados 39 fungos fitopatogênicos de tecidos de plantas daninhas, os quais foram isolados em laboratório para verificar a possível produção de metabólitos com ação herbicida. Entre eles, destaca-se o gênero *Diaporthe*, que foi selecionado devido ao efeito herbicida dos metabólitos secundários produzidos por fermentação submersa nas plantas-alvo. As condições de produção de metabólitos secundários de *Diaporthe schini* usando FS em um biorreator com agitação mecânica foram estudadas (SOUZA et al., 2015). Formulações contendo aditivos foram usadas para melhorar a ação herbicida de *D. schini* produzida por fermentação submersa (PES et al., 2016). As condições de produção de metabólitos com ação herbicida de *D. schini* por fermentação em estado sólido também foram estudadas, além do uso de formulações (BASTOS et al., 2017).

Para obter bom resultados sobre a ação bioherbicida é necessário os estudos das condições de fermentação, aumento da concentração de metabólitos produzidos por *Diaporthe* sp. além de manter inalteradas as características físico-químicas ao longo do tempo e mantendo sua eficiência. Uma das possibilidades para aumentar a estabilidade físico-química e/ou microbiana dos produtos bioativos é remover o conteúdo de água e convertê-los para pó (KHASHAYAR et al., 2020).

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver uma formulação sólida do bioherbicida produzido de *Diaporthe schini* com ação sobre planta daninhas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar diferentes substratos e suplementos para melhorar a ação do bio-herbicida sobre *Cucumis sativus* encontrada por Bastos et al. (2017) por FES de *Diaporthe schini*, sobre *Cucumis sativus*;
- ✓ Comparar o caldo produzido por FES com o caldo produzido por FS de *D. schini*, na melhor condição encontrada por Souza et al. (2017) sobre a fitotoxicidade e alguns parâmetros de crescimento de *Bidens pilosa*, *Amaranthus retroflexus*, *Echinochloa crusgalli* e *Lolium multiflorum*;
- ✓ Caracterização físico-química do caldo produzido por FES e FS;
- ✓ Comparar diferentes aditivos inertes para a secagem do bioherbicida produzido por FS de *D. schini* sobre a fitotoxicidade e parâmetros de crescimento de *Bidens pilosa*, *Amaranthus retroflexus*, *Echinochloa crusgalli* e *Lolium multiflorum*;
- ✓ Otimizar alguns parâmetros de operação *spray drying* para a secagem e ação bioherbicida sobre a fitotoxicidade e parâmetros de crescimento de *Bidens pilosa*, *Amaranthus retroflexus*, *Echinochloa crusgalli* e *Lolium multiflorum*;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PLANTAS DANINHAS

A alta capacidade de interferência nos sistemas agrícolas em geral é uma das características mais importantes de qualquer planta daninha (BAJWA et al., 2016). As plantas daninhas podem causar impactos negativos em algumas atividades humanas, tanto na área agrícola, florestal, pecuária, ornamental, náutica, produção de energia, etc. A incidência de plantas daninhas em áreas cultivadas causa a redução da produtividade, devido a interferência negativa causada no desenvolvimento da cultura de interesse. As perdas variam conforme a espécie cultivada e podem, inclusive, inviabilizar a colheita (FONTES et al., 2003). O nível de incidência pode variar conforme o tipo de vegetação infestante (espécie, densidade e distribuição), da cultura (cultivar, espaçamento e densidade), do ambiente (solo, clima e manejo) e do tempo de convivência da planta daninha com as plantas cultivadas (DUARTE et al., 2002).

Muitas plantas cultivadas, também podem ser consideradas daninhas, quando crescem de forma espontânea e interferem no crescimento da cultura de interesse, podendo ser denominada de planta voluntária. Já uma planta que cresce espontaneamente em meio a uma cultura de interesse e que apresenta características especiais que permitam sua sobrevivência no ambiente é denominada de planta daninha verdadeira (SILVA et al., 2007). O milho ou o trigo, em uma lavoura de soja, são plantas daninhas, denominadas comuns. Já a guanxuma, a trapoeraba ou outras espécies quaisquer são chamadas de plantas daninhas verdadeiras (ALMEIDA, 2014).

Estudos relatam que, as plantas daninhas podem reduzir em média até 34% a produtividade das culturas. As plantas daninhas podem causar reduções de produtividade em algumas culturas de grande interesse agrícola como: milho 40%, soja 37%, arroz 37%, algodão 36%, batata 30% e 23% de trigo (OERKE, 2006).

3.2 CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS

Desde o início da agricultura a capina manual, a mecânica e as aplicações de herbicidas, têm sido as mais utilizadas como métodos de controle de plantas daninhas (GRIEPENTROGE; DEDOUSIS, 2010; BERGIN, 2011; RUEDA-AYALA et al., 2011; CHAUVEL et al., 2012). Mesmo com a contribuição desses métodos de controle para o

aumento da produtividade das culturas, o controle de plantas daninhas na agricultura ainda apresenta desafios. Na capina manual, o principal desafio está na redução da disponibilidade de mão-de-obra, aumento dos custos de trabalho, além da baixa eficiência no controle (CARBALLIDO et al., 2013; GIANESSI, 2013; JABRAN et al., 2015). Já o controle mecânico de plantas daninhas, requer o revolvimento do solo, danificando a estrutura e reduzindo a fertilidade do mesmo (SMITH et al., 2011; JABRAN et al., 2015).

Os herbicidas químicos são muito utilizados na agricultura, pois desempenham papel importante na economia mundial. Estudos mostram que nos próximos anos a demanda global por alimentos deve dobrar, devido ao crescimento da população mundial, aumentando a demanda da produção de alimentos (FAO, 2050). Tal aumento deve ocorrer com mais intensidade em países em desenvolvimento e conseqüentemente os mais ricos em biodiversidade do planeta (BAUDRON; GILLER, 2014).

O uso sucessivo e indiscriminado dos herbicidas químicos aumenta o número de espécies de plantas daninhas resistentes a determinados herbicidas (ANNETT et al., 2014; HOPPIN, 2014; POWLES, 2008; STARLING et al., 2014). Além disso, o manejo de plantas daninhas com herbicidas químicos pode causar impactos ao meio ambiente e danos a saúde humana e animal. Mesmo com estes efeitos, o uso de agroquímicos aumentou mais de 40% em relação a 2002 (FAO, 2018), porém calcula-se que a perda de rendimento já alcance 30% (POPP et al., 2013). Devido aos novos padrões de toxicologia, alguns herbicidas mais antigos já foram banidos, devido a sua alta toxicidade (DUKE e DAYAN, 2018). Tais problemas podem ser minimizados com a criação de práticas mais sustentáveis para o controle de plantas daninhas (JABRAN et al., 2015).

3.3 CONTROLE BIOLÓGICO DE PLANTAS DANINHAS

O controle biológico de plantas daninhas vem sendo explorado em todo o mundo, sendo que a estratégia inundativa é a mais utilizada e considerada boa opção para o gerenciamento sustentável e econômico no manejo de plantas invasoras (MCFADYEN 1998; ZACHARIADES et al., 2017). Existem até o momento, cerca de 468 espécies de agentes de controle biológico estudados para o controle de diversas espécies de plantas invasoras, em diferentes condições climáticas, sendo que até o momento foram estudadas 175 espécies de plantas daninhas distribuídas em 48 famílias diferentes, como Asteraceae (44 espécies), Cactaceae (25 espécies) e Fabaceae (23 espécies) (WINSTON et al., 2014; (SCHWARZLÄNDER et al., 2018). Alguns autores ainda relatam que, um agente de controle

biológico quando aplicado no campo, possui movimento limitado no solo, pois os microrganismos estão sujeitos a adversidades ambientais (BAILEY; DERBY, 2001).

Os microrganismos podem produzir uma elevada gama de metabólitos secundários, principalmente os fungos e bactérias que habitam o solo, dada a complexidade dos ecossistemas que estes microrganismos interagem e competem com outros organismos. É provável que a evolução dos metabólitos secundários se deu a milhões de anos, quando os microrganismos utilizavam estes como sinais químicos para se comunicarem, defender seu habitat ou inibir o crescimento de competidores, sendo que, a maioria desses compostos são denominados de produtos naturais (BRAKHAGE, 2013).

A diversidade de sítios de ação dos metabólitos secundários dificulta a escolha de métodos padrão, para estabelecer o modo de ação dos compostos encontrados na natureza (ALMEIDA, 2014). Um dos métodos consiste em selecionar um composto específico e testá-lo em todos os sítios-alvos conhecidos para herbicidas, sendo que para herbicidas existem em torno de 30 sítios-alvos identificados para toxinas (DUKE et al., 1997).

As fitotoxinas podem causar danos através de sua absorção na planta, seguido da desestruturação da parede celular e consequente indução da formação de lesões necróticas ou halo clorótico em folhas, talos ou frutos. A seletividade da toxina para as plantas daninhas é variável, de uma espécie para outra, sendo que a toxina considerada mais promissora para ser utilizada como herbicida natural é aquela que apresenta a maior especificidade a uma determinada espécie ou grupo (CHARUDATTAN, 1991).

Muitos trabalhos de pesquisa foram conduzidos sobre herbicidas de origem fúngica, no entanto sua aplicação em grande escala apresenta limitações, como requisitos ambientais, baixo rendimento de produção, dificuldade no desenvolvimento da formulação, além dos requisitos rigorosos para o armazenamento (YANG et al., 2014).

Os metabólitos secundários produzidos por fungos, quando utilizados em mistura com herbicidas químicos, podem exercer um efeito sinérgico no controle de plantas daninhas, além de reduzir a dose do produto sintético (HOAGLAND, 1990; CAMARGO et al., 2019). Alguns estudos foram realizados, com relação a mistura de bioherbicidas por meio da aplicação inundativa de esporos de fitopatógenos (HOAGLAND, 1996). Desta forma, o isolamento de patógenos de plantas, bem como o estudo dos agentes de controle e produção de metabólitos secundários são os principais caminhos para desenvolvimento de herbicidas de origem microbiana (YANG et al., 2014).

3.4 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Dentre os processos fermentativos existentes, podemos destacar a fermentação submersa (FS) e fermentação em estado sólido (FES), nos quais são amplamente utilizados, principalmente em processos industriais. A principal diferença entre eles está na quantidade de água livre presente no substrato (MITCHELL et al., 2002).

A FES pode ser definida como o crescimento de microrganismos sobre materiais sólidos, ocorrendo na ausência ou quase ausência de água livre (PANDEY, 1992). Neste caso, o material deve possuir umidade suficiente para permitir o crescimento e a atividade metabólica do microrganismo (THOMAS et al., 2013). Segundo Rahardjo et al. (2006), os microrganismos podem crescer entre os fragmentos do substrato ou sobre a sua superfície, consumindo o substrato e secretando metabólitos e enzimas.

Algumas vantagens da FES em relação à FS são a obtenção de um produto mais concentrado depois da extração, menor quantidade de resíduos líquidos gerados após a fermentação, além das condições de cultivo que são mais semelhantes ao habitat natural dos fungos, assim, são capazes de crescer e excretar maiores quantidades de enzimas (CASTILHO et al., 2000). Na FES são utilizados resíduos agroindustriais, os quais são mais baratos, demandam menor consumo de energia, baixa produção de água residual, além da alta estabilidade dos produtos gerados (QUIROZ et al., 2015).

A FES se destaca, pois tem potencial econômico para o desenvolvimento de produtos para a alimentação humana, animal, indústrias farmacêutica e agrícola (OOIJKAAS et al., 2000). O controle do processo fermentativo pode ser uma ferramenta para obtenção de diversos produtos, tais como enzimas, biomassa microbiana, inóculos, além de alimentos, medicamentos, pigmentos, etc. (BIANCHI et al., 2011). A FES é utilizada em processos industriais, onde utilizada resíduos agroindustriais para a produção de alguns produtos, tais como enzimas, pigmentos, aromas, polissacarídeos, bio-pesticidas, ácidos orgânicos, etc. (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

Os substratos utilizados para a FES podem ser naturais ou sintéticos, e a escolha depende do processo que se deseja realizar, da disponibilidade de matéria-prima ou do produto final que se deseja obter. Geralmente, são utilizados produtos e/ou resíduos da agricultura e agroindústrias, pois apresentam menor custo (BIANCHI et al., 2001). Dentre os tipos de substratos utilizados, destaca-se a mandioca, a soja, batata doce, batata, resíduos de culturas como o farelo e palha de trigo e de arroz, casca de soja, milho e arroz, bagaço de cana

e mandioca, resíduos do processamento de frutas, espigas de milho, entre outros (PANDEY et al., 2000).

Para ter sucesso no processo de fermentação, é necessário definir alguns pontos básicos: o microrganismo, o meio de cultura, a forma de condução do processo fermentativo e as etapas de recuperação do produto (SCHMIDELL, 2001). Fatores ambientais, como temperatura, pH, disponibilidade de água, níveis de oxigênio e concentrações de nutrientes podem ter efeitos significativos sobre o crescimento microbiano e a formação do produto (RAIMBAULT, 1998). Em fermentações aeróbias, uma grande quantidade de calor é gerada, podendo influenciar no crescimento do microrganismo (GERVAIS; MOLIN, 2003). Outro item que deve ser observado é a qualidade do inóculo, pois pode ser o fator determinante nos resultados das fermentações (PAPAGIANNI; MOO-YOUNG, 2002).

O teor de umidade é um dos fatores mais importantes no processo fermentativo, sendo que, níveis elevados diminuem a porosidade do substrato, reduzindo a transferência de oxigênio, assim como a baixa umidade diminui a solubilidade do substrato sólido, dificulta a difusão de nutrientes e, portanto, reduz o crescimento de fungos, reduz o grau de inchaço e produz maior tensão de água (MAHADIK et al., 2002; MOLAVERDI et al., 2013). Segundo Gervais e Molin (2003), se a quantidade de água no substrato for insuficiente, a ponto de não permitir uma boa difusão de solutos e de gás, o metabolismo da célula microbiana diminui, ou pode parar, devido a falta de substratos ou pela elevada concentração de metabólitos inibitórios próximos das células.

A maior produção de compostos pela FES em comparação com a FS, foi descrita em alguns trabalhos. Um exemplo é a produção de iturina, um lipopeptídio surfactante produzido pela bactéria *Bacillus subtilis*, com atividade antibiótica e antifúngica (MIZUMOTO et al., 2006; OHNO, et al., 1995; OHNO, et al., 1993). A produção de iturina em FES foi aproximadamente dez vezes maior do que quando *B. subtilis* foi cultivado em meio líquido, além de suprimir a ocorrência de *Rhizoctonia solani*, agente causador de tombamento de plantas de tomateiro (MIZUMOTO et al., 2006).

Na produção de biopesticidas por FES, os esporos produzidos tendem a ser mais estáveis e tolerantes do que os produzidos em FS (KRISHNA, 2005). Autores encontraram 80% de controle da broca do milho no campo com biopesticida produzido a partir do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*, cultivado por FES, sendo esta eficiência semelhante aos inseticidas químicos (DESGRANGES et al., 1993). Sandhya et al. (2005) utilizando como substrato o farelo de trigo contendo 1% de quitina coloidal, sendo que a quitina produzida

alterou a morfologia das hifas do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, causando inchaço e a lise da parede de hifas.

Vários microrganismos, incluindo bactérias e fungos são capazes de produzir diversos compostos, sendo que a maioria são fabricados sinteticamente, tais como pigmentos, carotenoides, vitaminas, biosurfactantes, entre outros e nestes casos a FES tem sido aplicada com êxito. A oportunidade de produzir novos compostos bioativos por meio da manipulação das condições de cultivo, desenvolvimento de processos de fermentação, juntamente com processo de recuperação do produto torna-se um desafio na descoberta de novos bioprodutos (KRISHNA, 2005).

3.5 FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Na FS os microrganismos são cultivados em meio líquido onde estão os nutrientes que garantem seu desenvolvimento. Na FS, devido à facilidade de homogeneização por causa da agitação constante, cada parte do reator contém a mesma quantidade de microrganismos, metabólitos e nutrientes e é possível ter o controle da concentração de nutrientes desde o início da fermentação (BILITEWSKI, 2005).

A FS possui a vantagem de ser mais rápida e poder ser executada em grande escala e produzir grandes quantidades de biomassa de microrganismos de alta qualidade, em pequeno espaço físico (MASCARIN; JARONSKI, 2016). Na FS a propensão a contaminação é menor devido ao maior controle dos lotes. A FS tem sido preferida por ser fácil de expandir e controlar, sendo um processo bem estabelecido industrialmente com maior controle de fatores ambientais, como temperatura e pH (SIROHI et al., 2019). Além disso, na FS os nutrientes são absorvidos de maneira mais eficiente, a recuperação de metabólitos é melhor, e nessa a possibilidade de degradação do produto é menor (CASTRO, 2010).

Nos processos de FS em que o microrganismo cultivado é um fungo as condições mais utilizadas são: tempo de fermentação de 5 a 12 dias; temperatura entre 24 e 35°C e agitação entre 50 e 150 rpm. Para fungos a agitação deve ser mais branda em comparação com as bactérias, pois altas taxas de agitação acarretam em tensões de cisalhamento no bioreator, que prejudicam o crescimento micelial e conseqüentemente a biomassa final (KLAIC, 2014). Como meio de cultivo podem ser utilizados tanto meios sintéticos como industriais (SINGHANIA, 2010; ZHANG et al., 2012; BRUN et al., 2016).

O cultivo submerso de fungos é considerado um processo multicomponente, que envolve o crescimento de estruturas vegetativas e reprodutivas do fungo e no mesmo período

a formação de produtos de interesse, que são influenciados pelos parâmetros operacionais como: as características do fungo, a composição e o pH do meio de cultivo, temperatura, as forças de cisalhamento, disponibilidade de nutrientes, presença de indutores, agitação do meio de cultivo, etc (SINGHANIA et al., 2010). Para o conhecimento dos parâmetros mais adequados de cultivo, inicialmente deve-se proceder com a otimização da forma de cultivo, para tanto o processo é testado em frascos menores, para posteriormente se utilizar os fermentadores de bancada, e assim depois que as variáveis estiverem bem estudadas, passar o processo para a escala industrial (HOSOBUCH; YOSHIKAWA, 1999).

Os bioreatores de bancada mais utilizados são os agitadores mecânicos do tipo STR (*Stirred Tank Reactor*), também chamados de reatores de mistura ou tanque agitado, estes são considerados modelos de referência e são cerca de 90% dos reatores utilizados industrialmente. O reator STR é constituído por um tanque cilíndrico, equipado com chicanas ou aletas que impedem a livre circulação do fluido impedindo formação de movimentos espirais durante a agitação do líquido (OJEDA, 2009).

3.6 *Diaporthe* sp.

O gênero *Diaporthe*, teleomorfo de *Phomopsis* pertence ao Filo Ascomycota, inclui espécies fitopatogênicas de um grande número de hospedeiros lenhosos e herbáceos, sendo mais frequentemente encontradas no seu estado anamórfico (*Phomopsis*). Algumas espécies deste gênero podem causar prejuízos ao infectar plantas de interesse econômico, provocando lesões como cancrios, podridões, necroses, entre outras patologias, assim como podem viver como endófitos, sem causar qualquer dano ao hospedeiro, podendo tornar-se patogênicos quando o hospedeiro entrar em senescência ou em condições de stress (GOMES et al., 2013; SANTOS, 2008).

O gênero *Diaporthe* vem sendo relatado por pesquisadores, como um agente em potencial para o desenvolvimento biotecnológico, sendo que já existem descobertas importantes, incluindo novos metabólitos fúngicos estruturalmente significativos e fisiologicamente ativos (GOMES, 2012). Specian et al. (2012), observou atividade antibacteriana do extrato bruto e frações de metabólitos secundários de *Diaporthe helianthi*. Prada et al. (2009), relata atividade antifúngica de *Diaporthe* sp. sobre *Phytophthora infestans*. Santos et al. (2016), também encontraram efeito antifúngico de *Diaporthe endophytica* e *Diaporthe terebinthifolii* isolados de plantas medicinais para o controle de *Phyllosticta citricarpa* em citrus.

As espécies pertencentes ao gênero *Diaporthe* tem uma diversidade muito grande de hospedeiros a nível mundial (CHEPKIRUI; STADLER, 2017). *Phomopsis* é o estado assexual de *Diaporthe*, sendo que este é relatado como um dos gêneros fúngicos encontrados com maior frequência em vários hospedeiros vegetais (MURALI et al., 2006; BOTELLA; DIEZ, 2011). Este gênero foi investigado para o desenvolvimento de produtos naturais como uma variedade de metabólitos de baixo peso molecular, com potencial para ser utilizado como antibacteriano, anticâncer, antifúngico, antimalárico, antiviral, citotóxico e herbicida (GOMES et al., 2013).

Quando se fala em controle de plantas daninhas, Ash et al. (2010) relatam que os fungos do gênero *Diaporthe* possuem potencial herbicida, controlando plantas daninhas da família Asteraceae. Já Briscoe (2014) avaliou o fungo *Diaporthe eres* isolado de folhas de *Hedera helix* e encontrou dois compostos fitotóxicos, com controle sobre sementes de *Agrostis stolonifera*.

Souza et al. (2017) realizaram a bioprospecção de diversos fungos fitopatogênicos isolados de diferentes plantas daninhas, destas foi selecionado um isolado que apresentou maior potencial herbicida sobre plantas testes, cultivados em pequena escala em Shaker, no qual foi identificado como *Diaporthe schini*. Este apresentou maior efeito herbicida sobre *Cucumis sativus*, causando manchas, amarelecimento e crestamento nas folhas. Posteriormente foi realizado a otimização da produção de bioherbicidas de *D. schini* em bioreator de fermentação submersa (SOUZA et al., 2015). Foi avaliado o efeito herbicida do produto obtido por fermentação submersa de *D. schini* sobre sementes de soja, pepino, trigo, arroz e azevém em pré-emergência, obtendo inibição de 100% na germinação destas, demonstrando assim, o potencial de uso como herbicida dos metabólitos produzidos por este microrganismo, quando obtido por fermentação submersa (PES et al., 2016). Foram otimizadas as condições de cultivo deste mesmo isolado em pequena escala, para a produção de bioherbicida por fermentação em estado sólido, além do uso de formulações, apresentando efeito herbicida em *C. sativus* quando aplicados em pós-emergência, como descoloração, amarelecimento ou necrose (BASTOS et al., 2017).

3.7 SPRAY DRYING

Uma das possibilidades para aumentar a estabilidade físico-química e microbiana dos transportadores com carga bioativa é remover o conteúdo de água e convertê-los para pó (SARABANDI et al., 2020). A secagem do material pode ser realizado por congelamento (STARK et al., 2010) e pulverização (JAFARI et al., 2008) que são os métodos mais comuns de produção de pó e consequente aumento da estabilidade dos sistemas de entrega. Contudo, o processo de liofilização possui alto custo e o processo leva um longo tempo de processamento das amostras, dessa forma o uso do método de secagem por pulverização é considerado mais econômico, flexível e de alta velocidade podendo assim ser considerado uma alternativa adequada e eficiente (SARABANDI et al., 2019).

Na secagem por *spray drying*, a mistura homogeneizada de agente encapsulante, chamado também de material de parede e agente encapsulado (material do núcleo) são convertidos em pó. O material de parede envolve o agente encapsulado com pulverização e alto calor, sendo o calor responsável por volatilizar rapidamente o solvente (SUN, CAMERON, & BAI, 2019). Geralmente o agente encapsulado se trata de uma substância líquida, essa é alimentada por meio de um bico e é pulverizada na câmara de secagem e o contato dela com o solvente de secagem quente, resulta no fechamento da substância ativa no núcleo da microcápsula (HOYOS-LEYVA et al., 2019).

O estresse térmico e a desidratação durante o processo de secagem podem danificar o encapsulamento e causar perda dos compostos carregados (WANG et al., 2015). Portanto, o desenvolvimento de abordagens destinadas a aumentar a rigidez da membrana contra o calor durante o processo de secagem por pulverização é de grande importância, uma das formas conhecidas para tanto é a escolha do agente encapsulante adequado. Diversos materiais de parede têm sido utilizados, por exemplo, proteínas isoladas e concentradas (MOHAMMED et al., 2017), maltodextrinas (BAE & LEE, 2008; MUNOZ-IBANEZ et al., 2016), amidos (ANWAR & KUNZ, 2011; SHARIF et al., 2017; LEI et al., 2018).

As condições de trabalho do *spray drying*, entre eles a temperatura do ar de entrada e de saída, a taxa de alimentação, a pressão do ar e a vazão, as condições de aspiração, são fatores importantes que contribuem para a eficiência do processo de encapsulamento (REZVANKHAH et al., 2020). A temperatura do ar de entrada ideal leva a formação rápida da membrana semipermeável na superfície da gota, proporcionando uma boa retenção do núcleo. Por outro lado, uma temperatura mais alta do que a ideal pode causar danos térmicos ao produto bioativo e crescimento excessivo de bolhas com imperfeições na superfície

(DESOBRY et al., 1997). A temperatura de saída do ar sofre influência da temperatura de entrada do ar, do conteúdo sólido total da solução de alimentação, da taxa de alimentação e da umidade relativa do ar, e que por isso pode ser alterada, por meio da variação da taxa de alimentação e pela temperatura de entrada do ar (WURTH et al., 2018).

A formação de partículas e a qualidade da secagem, também são influenciadas pela viscosidade e a tensão superficial do material a ser encapsulado, que determinam o destino das gotículas atomizadas ao longo do processo de secagem e, dessa forma, a estrutura das partículas resultantes (REZVANKHAH et al., 2020). No processo que ocorre no *spray drying*, a atomização de fluidos com viscosidade muito alta pode ocasionar a obstrução dos bicos, no entanto, a obtenção de alto rendimento na produção de pó está diretamente relacionada ao tipo de material sólido, o que pode influenciar notavelmente a eficiência do encapsulamento (WÜRTH et al., 2018).

Segundo Harguindeguy & Fissore (2019) a viscosidade superficial durante o processo de secagem por pulverização depende do peso molecular dos materiais da solução de alimentação. Assim, materiais altamente higroscópicos e termoplásticos, aderem às paredes do secador, causando dificuldades no manuseio do material (CORRÊA et al., 2016). A aderência dos pós nas paredes do secador deve-se à presença de açúcares de baixa massa molar, como frutose, glicose e sacarose, gerando baixa eficiência de obtenção do pó (ADHIKARI et al., 2005).

Essa técnica de secagem por pulverização tem sido amplamente utilizada para muitas enzimas industriais, como A-amilase de *Aspergillus oryzae*, protease alcalina de *Bacillus subtilis* recombinante e protease alcalina de *Bacillus licheniformis* (KAMOUNA et al., 2008). A secagem por *spray drying* foi utilizada para formular a enzima α -amilase produzida a partir de *Bacillus* sp., onde mostrou ser uma alternativa viável para a secagem (JESUS et al., 2013). No entanto, a aplicação da tecnologia de secagem por pulverização para secagem um bioherbicida é nova na literatura.

3.8 BIOENSAIOS

Para a seleção da melhor condição de produção de herbicidas por fermentação, recomenda-se a realização de vários ensaios biológicos, com o uso de folhas, sementes e mudas de plantas de diferentes espécies, selecionando a mais sensível para orientar nos procedimentos de fracionamento (VAREJÃO et al., 2013).

Testes de germinação de sementes e crescimento radicular também podem ser utilizados para avaliar o controle de plantas por metabólitos secundários (PES et al., 2015). Bioensaios em pós-emergência são interessantes, pois simulam condições reais, semelhantes as encontradas no campo. Nestas, as aplicações na parte aérea das plantas, visam avaliar em tempos distintos variáveis como, controle de plantas, comprimento de parte aérea, comprimento de raiz e massa verde e seca da parte aérea (JAVOID; ALI, 2011, JAVOID et al., 2011).

Os testes em folhas destacadas são mais recomendados para o fracionamento dos compostos fitotóxicos, pois demandam baixo volume. Dentre eles está o teste de punctura, onde é depositado um pequeno volume da solução teste, sobre punções produzidos na superfície das folhas (face adaxial ou abaxial) e monitorando o desenvolvimento de lesões ao longo do tempo. Os furos são feitos utilizando uma agulha, lâmina de bisturi ou capilar de vidro. Após o cultivo de plantas as folhas destacadas ou discos de folhas são colocados em placas de Petri contendo ágar ou papel de filtro umedecido com água destilada. A partir daí estas são acondicionadas em uma câmara com controle de temperatura e iluminação e monitorados o aparecimento de lesões, como necrose, clorose ou amarelecimento (VAREJÃO et al, 2013).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCALIZAÇÃO

O presente trabalho foi conduzido no laboratório Biotec Factory e em casa de vegetação na Universidade Federal de Santa Maria, RS. Na figura 1, está o fluxograma, onde representa todas as etapas de desenvolvimento do trabalho, que vai desde a produção de bioherbicida por FES e FS por *Diaporthe schini* até a aplicação em plantas daninhas e secagem por *spray drying*.

Figura 1 - Fluxograma

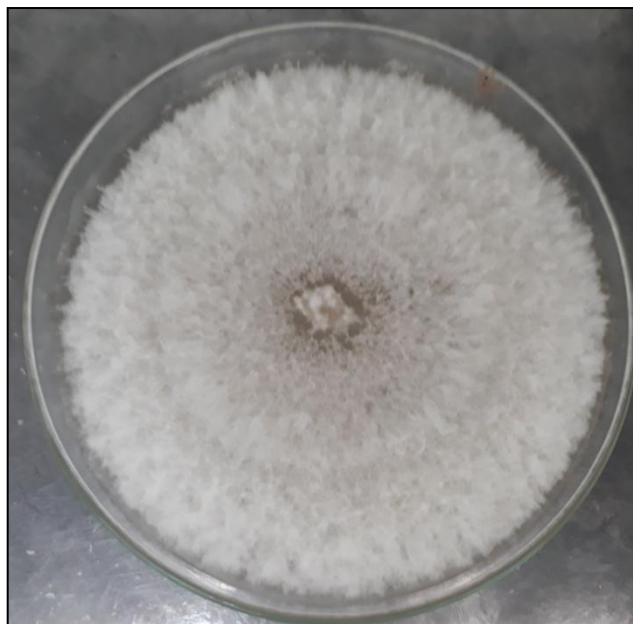


4.2 MICRORGANISMO

Para a produção do bioherbicida foi utilizado um isolado fúngico da espécie *Diaporthe schini* (figura 2) obtido do bioma Pampa por Souza et al. (2017). Após o isolamento, este microrganismo foi mantido em meio de cultura batata dextrose agar (BDA), previamente autoclavado a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 30 min e vertido em placas de Petri. Após cada repicagem, as placas inoculadas foram transferidas para estufa microbiológica e mantidas a temperatura de 28°C até o micélio preencher a superfície do meio de cultivo da placa de petri e em seguida

armazenadas em refrigerador a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$. Para as fermentações foi realizado a repicagem 7 dias antes da mesma.

Figura 2 - Crescimento micelial em placa petri do fungo *Diaporthe schini*.



Fonte: O autor

4.3 PRODUÇÃO DE BIOHERBICIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

As fermentações foram realizadas em frascos de vidro com volume utilizado de 50g de substrato. Foram avaliados diferentes tipos de substratos (arroz, farelo de arroz, casca de arroz, bagaço de cana e bagaço de malte), diferentes umidades (30, 40, 50%) e diferentes suplementos (água de maceração de milho e farelo de soja).

Após a esterilização do meio de cultivo, dois discos com 2 cm de diâmetro de micélio de *Diaporthe schini* foram adicionados, misturados ao meio de cultivo sólido e incubados em câmara climática (Modelo KK350, POL-EKO-APARATURA, Polônia), (figura 3) durante 7 dias a 28°C e umidade relativa de 90% conforme condição utilizada por Bastos et al. (2017). Após a fermentação, foi realizada a extração dos compostos bioativos presentes no meio sólido. Para isto, utilizou-se água destilada com relação sólido-líquido de 0,5 e alocadas em agitador orbital a 120 rpm e 28°C durante 30 min. O material extraído foi filtrado e avaliado quanto ao seu potencial herbicida.

Figura 3 - Câmara climática (A) e fermentação em estado sólido em tubos de vidro (B).



Fonte: O autor

4.4 PRODUÇÃO DE BIOHERBICIDA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Para a produção de bioherbicida por fermentação submersa de *D. schini* foi utilizado um bioreator do tipo STR (figura 4) com agitação de 40 rpm, aeração 1 vvm, 20 g/L de sacarose e 15% (v/v) de água de maceração de milho, condição descrita por Souza et al. (2015). Para a esterilização do biorreator, o mesmo foi acondicionado em autoclave a 121°C por 45 min.

Logo após a esterilização, todos os acessórios foram conectados, sendo estes as mangueiras de circulação de água, as mangueiras de aeração, o sensor de temperatura e o rotor de agitação. Após atingir a temperatura ajustada, foi colocado o inóculo e um anti-espumante siliconado, sendo que o primeiro foi bombeado manualmente por meio de bombas peristálticas e na presença de espuma era adicionado o anti-espumante.

Após cada fermentação de sete dias, realizou-se a separação da biomassa e do caldo fermentado contendo a fitotoxina. A biomassa foi esterilizada e descartada e o caldo fermentado foi filtrado com o auxílio de um papel filtro, eliminando qualquer forma viva de

fungo no caldo fermentado, como esporos e micélios. Estes foram armazenados em refrigerador a 4°C, para posterior avaliação do seu efeito nos bioensaios.

Figura 4 - Reator STR para fermentação submersa.



Fonte: O autor

4.5 BIOENSAIOS

4.5.1 Aplicação em folha destacada de *Cucumis sativus*

A aplicação em folha destacada de *Cucumis sativus* foi realizada apenas para a FES de *Diaporthe schini*, conforme metodologia descrita por Todero et al. (2018a), onde foram coletadas folhas jovens de *C. sativus*, seccionando na base de seu pecíolo, e dispostas em caixas gerbox previamente desinfetadas com álcool 70% e forradas com duas folhas de papel filtro (Germitest[®]) umedecidas (figura 5). No pecíolo da folha foi colocado um algodão embebido com 2 mL da solução obtida em cada tratamento.

Varejão et al. (2013) destacam que alguns metabólitos possuem atividade fitotóxica na presença e outros na ausência de luz, por isso os testes foram realizados sob iluminação alternada, evitando perdas na detecção de atividades fitotóxicas influenciada pela luz. A avaliação da eficácia do material extraído e filtrado foi realizada 72 horas após a aplicação

dos tratamentos observando a incidência e intensidade de lesões, conforme a metodologia descrita por Evidente et al. (2008).

Figura 5 - Teste em folha destacada de *Cucumis sativus*.



Fonte: O autor

4.5.2 Aplicação em plantas daninhas

O experimento foi constituído pela aplicação dos caldos fermentados de *Diaporthe schini* produzidos por fermentação em estado sólido e por fermentação submersa, mais uma testemunha com água. Somente a melhor condição de FES foi usada nesta etapa do trabalho. As plantas daninhas utilizadas foram: caruru (*Amaranthus viridis*), picão-preto (*Bidens pilosa*), capim arroz (*Echinochloa crusgalli*) e azevém (*Lolium multiflorum*). Estas plantas foram escolhidas em função da disponibilidade de sementes e facilidade de estabelecimento de plântulas, além de serem consideradas plantas daninhas importantes na agricultura. Ressalva-se que para todos os ensaios foi utilizado uma testemunha com água destilada.

As plantas daninhas foram previamente cultivadas em bandejas preenchidas com substrato comercial Macplant[®] em casa de vegetação com ambiente controlado (figura 6). Cada bandeja foi considerada um tratamento, com quatro espécies de plantas daninhas e cinco repetições cada. Ao atingirem o tamanho desejado de duas a três folhas, aplicou-se os tratamentos com auxílio de um pulverizador costal de CO₂ com volume de aplicação de 200 L/ha conforme metodologia descrita por Todero et al. (2018b).

Foram avaliados os seguintes parâmetros: Fitotoxicidade (%), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), massa verde da parte aérea (MVPA), massa verde da raiz (MVR) e altura de planta (cm). A fitotoxicidade sobre as plantas daninhas foi avaliada visualmente em comparação com a testemunha aos 14 dias após a aplicação e avaliados conforme os conceitos aplicados da Sociedade Brasileira de Ciência de Plantas Daninhas

(SBCPD), (tabela 1). Para a determinação da MVPA e MVR, as plantas foram coletadas, identificadas, pesadas e acondicionadas em estufa de secagem a 40°C, ao atingirem peso constante foi realizada a pesagem novamente para a determinação da MSPA e MSR. A altura das plantas foi monitorada diariamente durante 14 dias após a aplicação (DAA) dos tratamentos com auxílio de uma régua milimetrada.

Tabela 1 - Descrição dos conceitos aplicados às avaliações de toxicidade de acordo com o SBCPD.

%	Descrição
0 – 20	Nenhuma lesão ou efeito
20 – 40	Lesão leve e/ou redução do crescimento com recuperação rápida
40 – 60	Lesão moderada e/ou redução do crescimento com recuperação lenta ou definitiva
60 – 80	Lesão grave e/ou redução do crescimento não recuperável e/ou redução do suporte
80 – 100	Destruição completa de culturas ou apenas algumas plantas vivas

Fonte: (SBCPD, 1995)

Figura 6 – Casa de vegetação e disposição dos tratamentos para aplicação em plantas daninhas.



Fonte: O autor

4.6 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

A caracterização físico-química foi realizada para a melhor condição encontrada nos bioensaios em plantas daninhas para a fermentação em estado sólido e submersa. As análises realizadas foram pH, tensão superficial, densidade e viscosidade. A metodologia utilizada para determinação de tensão superficial, densidade e pH foi a descrita por Todero et al. (2019). A determinação da viscosidade foi realizada por meio do reômetro rotacional (RheoLabQC, Anton Paar, Austria). No equipamento foram instaladas placas paralelas de 50 mm de diâmetro (a inferior com controle de temperatura a 20°C plana e lisa, enquanto que a superior era lisa e com ângulo de 1°). Foi utilizado o volume de 1 mL de amostra para realização do teste com duração de 5 min e aquisição de 100 pontos para cada amostra.

4.7 *SPRAY DRYING*

O caldo bruto obtido por fermentação submersa foi submetido a secagem em um secador modelo LM MSDi 1.0 (Labmaq do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) com câmara de secagem e ciclone em aço inox e capacidade total de secagem de 1,0 L por hora (figura 7). A altura da câmara de secagem com a tampa é de 0,68 m, diâmetro da tampa de 0,24 m e diâmetro do corpo da câmara de 0,20 m. O ciclone possui altura total de 0,54 m e seu diâmetro maior é de 0,095 m. Foi utilizado um conjunto atomizador por nebulização duplo fluido (pneumático), composto pelo extensor e capa do bico atomizador tipo mistura interna e externa, construído em aço inox, da marca Labmaq do Brasil[®], com capa do bico atomizador de 1,0 mm. Após a secagem por pulverização, o pó seco formado em cada condição experimental foi coletado em frascos de vidro de 100 ml. A atividade bioherbicida, o teor de umidade, o rendimento de recuperação e a temperatura da saída de ar foram medidos durante os experimentos, de acordo com as seções a seguir do presente trabalho. O secador por pulverização foi limpo entre cada corrida.

Figura 7 – Equipamento de secagem por *spray drying*.



Fonte: O autor

4.7.1 Seleção do aditivo transportador

No primeiro estudo foram adicionados 10% (m/v) de diferentes aditivos em 50 mL de caldo obtido por fermentação submersa. A mistura foi constantemente agitada por um agitador magnético e alimentada ao pulverizador do secador por uma bomba peristáltica. Foram testados diferentes aditivos, como amido de milho (Konkreta, Santa Catarina, Brasil), amido solúvel (Dinâmica, São Paulo, Brasil), lactose (Dinâmica, São Paulo, Brasil), Talco Industrial (Dinâmica, São Paulo, Brasil), maltodextrina DE 20 (Konkreta, Santa Catarina, Brasil), fécula de mandioca (Konkreta, Santa Catarina, Brasil), sacarose (Labsynth, São Paulo, Brasil). Também foi realizada uma secagem utilizando somente o aditivo e água, para fins de comparação. Para este estudo, os parâmetros operacionais do equipamento foram fixados, sendo a temperatura de entrada de 100°C, vazão do ar de secagem de 1,1 m³/min, vazão de alimentação de 0,22 L/h, pressão de ar do pulverizador de 0,4 MPa e vazão de ar do pulverizador de 40 L/min.

4.7.2 Otimização do *spray drying*

Um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 foi utilizado para avaliar os parâmetros operacionais de secagem por pulverização. Foram três variáveis independentes: temperatura do ar de entrada (T_{in}), vazão do ar de secagem (V_s) e vazão de alimentação (V_a), avaliadas no desempenho das seguintes variáveis do secador: temperatura do ar de saída (T_{out}), eficiência energética (E), rendimento do pó (R) e propriedades do pó, como umidade (U) e atividade bioherbicida em plantas daninhas.

A tabela 1 apresenta as variáveis codificadas que foram utilizadas. Em todas as execuções do DCCR foi utilizado a lactose, aditivo que apresentou as melhores características e maior ação bioherbicida nos estudos anteriores. A mistura foi alimentada no bico secador do *spray* usando uma bomba peristáltica.

Tabela 2 - Valores codificados das variáveis independentes utilizadas no DCCR.

Variáveis independentes	Níveis				
	-1,68	-1	0	1	1,68
Temperatura de entrada (°C)	85	90	100	110	115
Vazão ar de secagem (m ³ /min)	0,50	0,85	1,40	1,95	2,30
Vazão de alimentação (L/min)	0,10	0,15	0,22	0,30	0,35

4.7.3 Medição da temperatura do ar de saída, eficiência energética, rendimento de recuperação de pó e teor de umidade

A temperatura de ar de saída (T_{out}) do *spray drying* foi determinada por uma sonda conectada na saída do secador, sendo os valores obtidos após a estabilização da temperatura. Para a determinação da eficiência energética (E) do *spray drying* foi utilizada a seguinte equação (1) (CORTÉS-ROJAS, et al., 2015):

$$E (\%) = \frac{T_{in} - T_{out}}{T_{in} - T_{room}} \times 100 \quad (1)$$

Onde: T_{in} , T_{out} e T_{room} são temperaturas de entrada, saída e ambiente, respectivamente.

Para a determinação do rendimento de pó produzido no *spray drying* (R) foi utilizada a seguinte equação (2) (O'RIORDAN et al., 2002):

$$R (\%) = \frac{M_{\text{pó spray}}}{M_{\text{pó total}}} \times 100 \quad (2)$$

Onde: $M_{\text{pó spray}}$ (g) é a massa dos sólidos recuperados após a secagem por pulverização e $M_{\text{pó total}}$ (g) é a massa de sólidos na solução de alimentação.

A determinação do teor de umidade do pó (U) após a secagem por pulverização foi determinada por um analisador de umidade por infravermelho (modelo IV 2500, Gehaka, São Paulo, Brasil).

4.7.4 Atividade biológica

Para a determinação da atividade biológica das amostras sólidas sobre plantas daninhas foram preparadas soluções contendo 10% (m/v) de pó previamente secado por *spray drying* de cada condição avaliada, diluídos em água destilada. Cabe ressaltar que a concentração de pó utilizado para a aplicação foi o mesmo usado para a adição de aditivos junto ao caldo bioherbicida. A aplicação em plantas daninhas e as avaliações foram realizadas conforme descritos no item 4.5.2 deste trabalho, porém a altura de plantas foi avaliada aos 14 dias.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

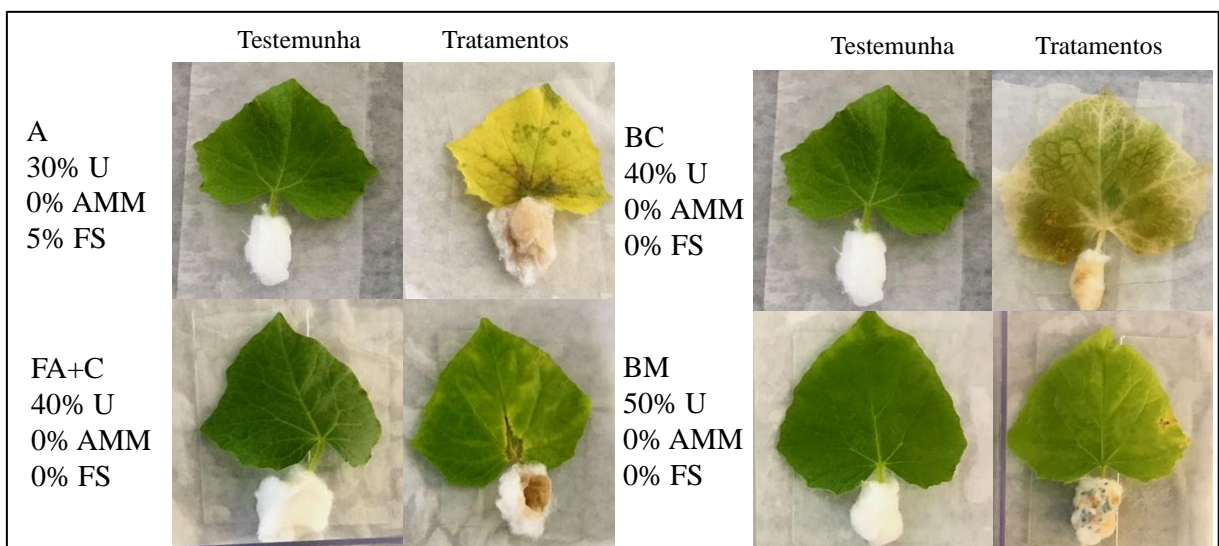
Os dados referentes a comparação das duas técnicas de fermentação sólida e submersa foram submetidos a análise estatística, utilizando o teste Tukey para comparação das médias. Para as variáveis analisadas no *spray drying* foi utilizado o teste Scott-Knott para comparar as médias, devido ao grande número de tratamentos presentes neste estudo. Em ambos os casos foi utilizando o software Sisvar[®] 5.0 (FERREIRA, 2011), considerando um nível de significância de 95%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DEFINIÇÃO DE VARIÁVEIS OPERACIONAIS PARA A PRODUÇÃO DO BIOHERBICIDA POR FES

A tabela 3 demonstra o efeito inibitório do caldo fermentado produzido por fermentação em estado sólido de *Diaporthe schini* em diferentes condições de cultivo sobre folhas destacadas de *Cucumis sativus*. Nota-se maior efeito inibitório do caldo fermentado para o substrato bagaço de cana, destacando a fermentação 29 com teor de umidade de 40% e sem adição de nutrientes. Essa condição apresentou necrose acentuada em folhas destacadas de *C. sativus* (figura 8). Para as demais condições de fermentação analisadas, como os substratos farelo de arroz+casca, arroz e bagaço de malte e fontes adicionais de nutrientes como farelo de soja e água de maceração de milho os danos encontrados nas folhas de *C. sativus* foram considerados baixos, variando desde ausência de lesão a leve necrose. Os resultados corroboram com os encontrados por Bastos et al. (2017), onde foram observados danos como clorose e amarelecimento em *C. sativus*, para o bioherbicida produzido por fermentação em estado sólido de *D. schini* com substrato bagaço de cana.

Figura 8 - Ação bioherbicida de *Diaporthe schini* produzido por fermentação em estado sólido (FES) em diferentes condições de cultivo.



*Arroz (A), Farelo de arroz + casa (FA+C), Bagaço de cana (BC), Bagaço de malte (BM); Umidade (U) de 30, 40 e 50%; Água de maceração de milho (AMM) de 0 e 5%; Farelo de soja (FS) de 0 e 5% e testemunha (água destilada).

Tabela 3 - Efeito inibitório do bioherbicida produzido por fermentação em estado sólido (FES) de *Diaporthe schini* sobre folhas destacadas de *Cucumis sativus* em diferentes substratos.

Fermentação	Substrato	Umidade (%)	AMM (%)	FS (%)	Inibição
1	A*	30	0	0	Leve amarelecimento
2	A	30	5	0	Amarelecimento acentuado
3	A	30	0	5	Leve necrose
4	A	30	5	5	Leve necrose
5	A	40	0	0	Amarelecimento acentuado
6	A	40	5	0	Amarelecimento acentuado
7	A	40	0	5	Amarelecimento acentuado
8	A	40	5	5	Leve amarelecimento
9	A	50	0	0	Leve amarelecimento
10	A	50	5	0	Leve amarelecimento
11	A	50	0	5	Amarelecimento acentuado
12	A	50	5	5	Leve amarelecimento
13	FA+C	30	0	0	Leve necrose
14	FA+C	30	5	0	Leve necrose
15	FA+C	30	0	5	Leve necrose
16	FA+C	30	5	5	Leve necrose
17	FA+C	40	0	0	Leve necrose
18	FA+C	40	5	0	Amarelecimento acentuado
19	FA+C	40	0	5	Leve necrose
20	FA+C	40	5	5	Leve amarelecimento
21	FA+C	50	0	0	Leve necrose
22	FA+C	50	5	0	Leve amarelecimento
23	FA+C	50	0	5	Amarelecimento acentuado
24	FA+C	50	5	5	Amarelecimento acentuado
25	BC	30	0	0	Necrose acentuada
26	BC	30	5	0	Necrose acentuada
27	BC	30	0	5	Leve necrose
28	BC	30	5	5	Necrose acentuada
29	BC	40	0	0	Necrose acentuada
30	BC	40	5	0	Necrose acentuada
31	BC	40	0	5	Leve necrose
32	BC	40	5	5	Leve necrose
33	BC	50	0	0	Leve necrose
34	BC	50	5	0	Necrose acentuada
35	BC	50	0	5	Leve necrose
36	BC	50	5	5	Necrose acentuada
37	BM	30	0	0	Leve amarelecimento
38	BM	30	5	0	Sem efeito
39	BM	30	0	5	Sem efeito
40	BM	30	5	5	Leve amarelecimento

Continua

Fermentação	Substrato	Umidade (%)	AMM (%)	FS (%)	Inibição
41	BM	40	0	0	Leve amarelecimento
42	BM	40	5	0	Leve amarelecimento
43	BM	40	0	5	Leve amarelecimento
44	BM	40	5	5	Amarelecimento acentuado
45	BM	50	0	0	Amarelecimento acentuado
46	BM	50	5	0	Sem efeito
47	BM	50	0	5	Sem efeito
48	BM	50	5	5	Amarelecimento acentuado

*Arroz (A), Farelo de arroz + casa (FA+C), Bagaço de cana (BC), Bagaço de malte (BM); Umidade (U) de 30, 40 e 50%; Água de maceração de milho (AMM) de 0 e 5%; Farelo de soja (FS) de 0 e 5% e testemunha (água destilada).

5.2 COMPARAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO BIOHERBICIDA PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E SUBMERSA

5.2.1 Comparação da atividade biológica

Conforme a tabela 4 pode-se observar os resultados da avaliação da fitotoxicidade após 14 dias da aplicação dos tratamentos em pós-emergência em quatro espécies de plantas daninhas. Como descrito anteriormente os tratamentos são compostos pela melhor condição da FES encontrada em *C. sativus*, FS e a testemunha (água).

Tabela 4 - Comparação de diferentes técnicas de produção de um bioherbicida sobre ao percentual de fitotoxicidade em plantas daninhas.

Trat	<i>Bidens pilosa</i>	<i>Amaranthus viridis</i>	<i>Echinochloa crusgalli</i>	<i>Lolium multiflorum</i>
Teste	0,0 a*	0,0 a	0,0 a	0,0 a
FES	2,0 a	4,0 a	2,0 b	0,0 a
FS	18,0 b	12,0 b	8,0 c	0,0 a
CV%	5,23	5,78	7,66	0

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

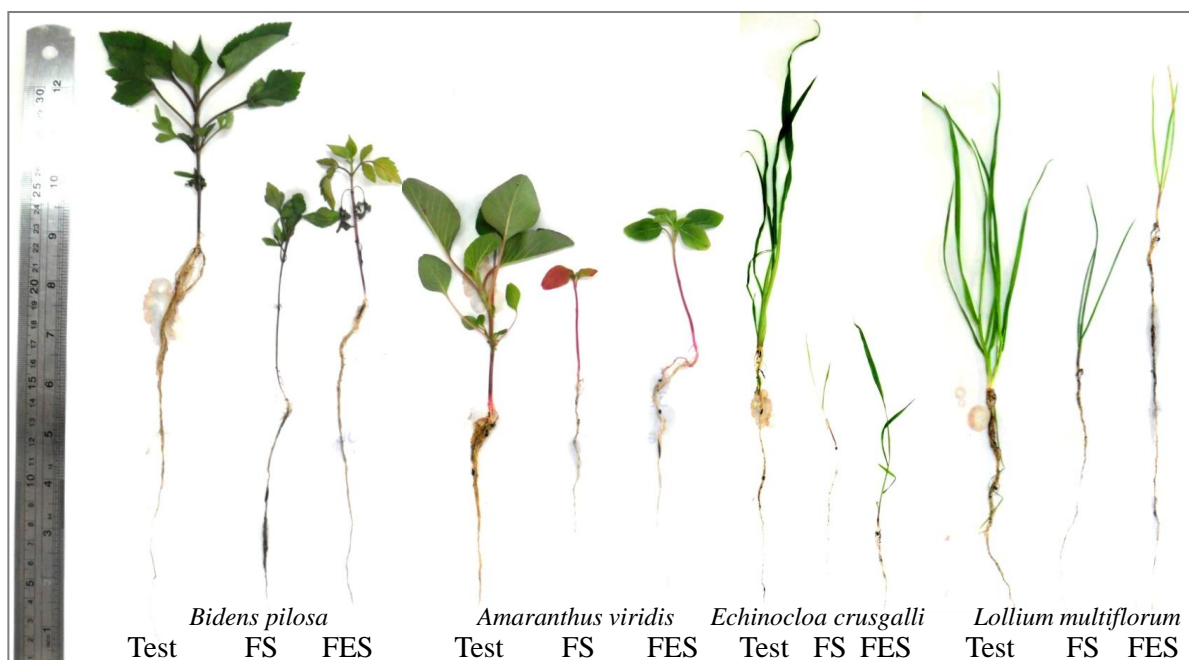
CV: Coeficiente de variação

Mesmo não apresentando índices elevados, houve diferença significativa da fitotoxicidade entre todos os tratamentos avaliados para *E. crusgalli*, sendo que o caldo obtido por FS apresentou o maior índice (8%), seguido da FES, com 2% de fitotoxicidade. *B. pilosa* e *A. viridis* apresentaram fitotoxicidade de 18 e 12%, respectivamente para FS, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Já para a FES, *Bidens pilosa* apresentou 2% de fitotoxicidade e *A. viridis* 4% de fitotoxicidade. Para a planta daninha *L. multiflorum* não houve

efeito fitotóxico em nenhum dos tratamentos avaliados. Convém ressaltar que a testemunha para todas as plantas daninhas não apresentou fitotoxidade.

A figura 9 demonstra a diferença visual entre os tratamentos avaliados, destacando-se a FS que apresentou maior inibição de crescimento em todas as espécies de plantas daninhas avaliadas. Quanto aos danos provocados pela aplicação de metabólitos de *Diaporthe schini* por FS ou FES foram predominantemente cloroses nas folhas das plantas daninhas ou sem sintomas em algumas espécies.

Figura 9 - Comparação entre os tratamentos avaliados no efeito bioherbicida sobre *Bidens pilosa*, *Amaranthus viridis*, *Echinochloa crusgalli* e *Lolium multiflorum*.



Resultados semelhantes foram encontrados em estudos anteriores, onde a aplicação dos metabólitos de *Diaporthe* sp. obtidos por FS causaram danos como leve clorose até necrose acentuada nas folhas de *C. sativus* (SOUZA et al., 2015; PES et al., 2016; SOUZA et al., 2017). Convém ressaltar que sintomas como estes, são comuns quando se utiliza caldos fermentados de microrganismos, pois normalmente os metabólitos de interesse encontram-se em baixas concentrações no meio (BRUN et al., 2016), exigindo portanto, algumas etapas de concentração (TODERO et al., 2018a).

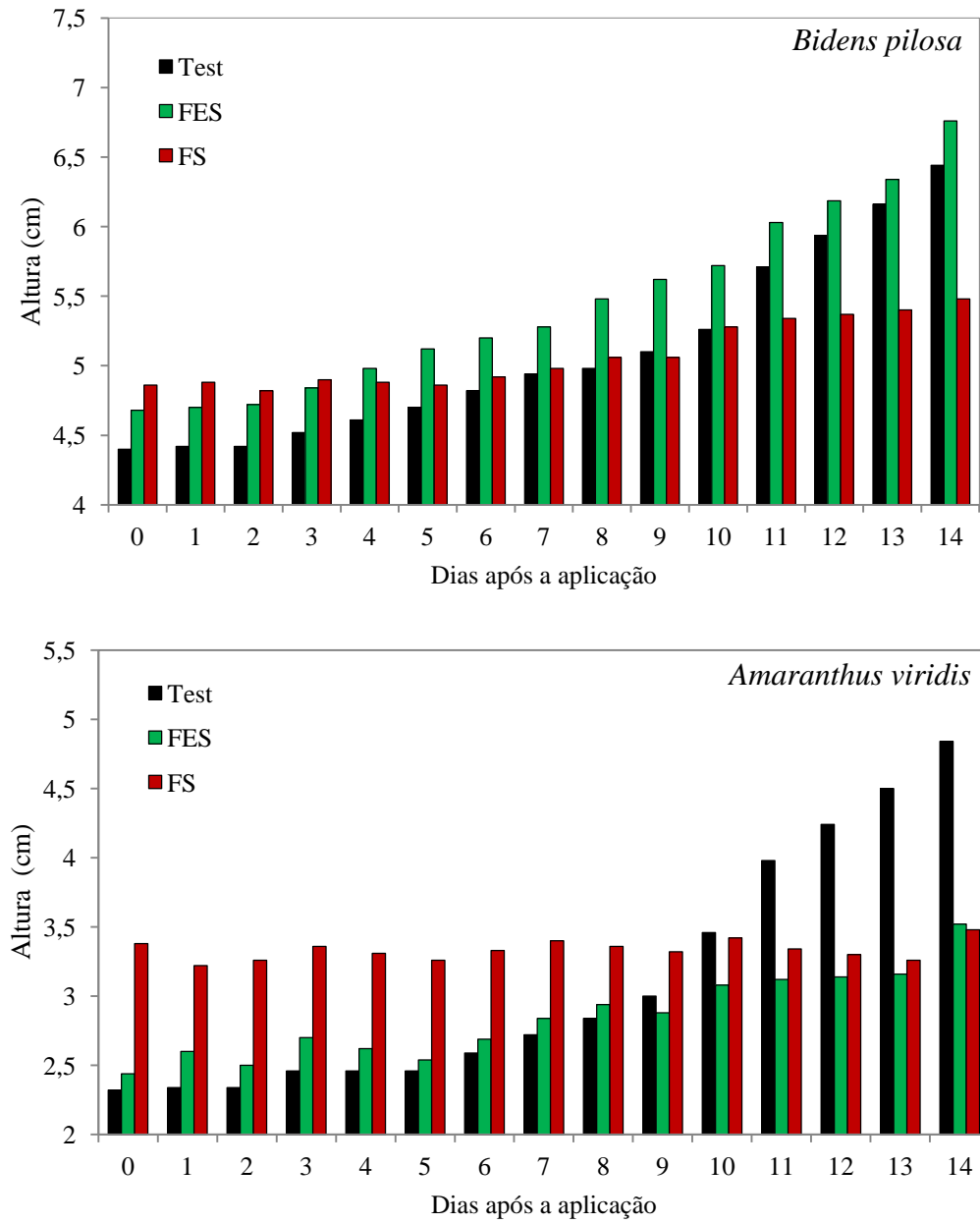
Trabalhos realizados com outras espécies de fungos, também apresentaram resultados de fitotoxidade. Todero et al., (2018b), aplicou metabólitos produzidos por FS de *Phoma* sp. em pós-emergência de *B. pilosa*, *A. retroflexus* e *Conyza canadensis*, obtendo efeitos como

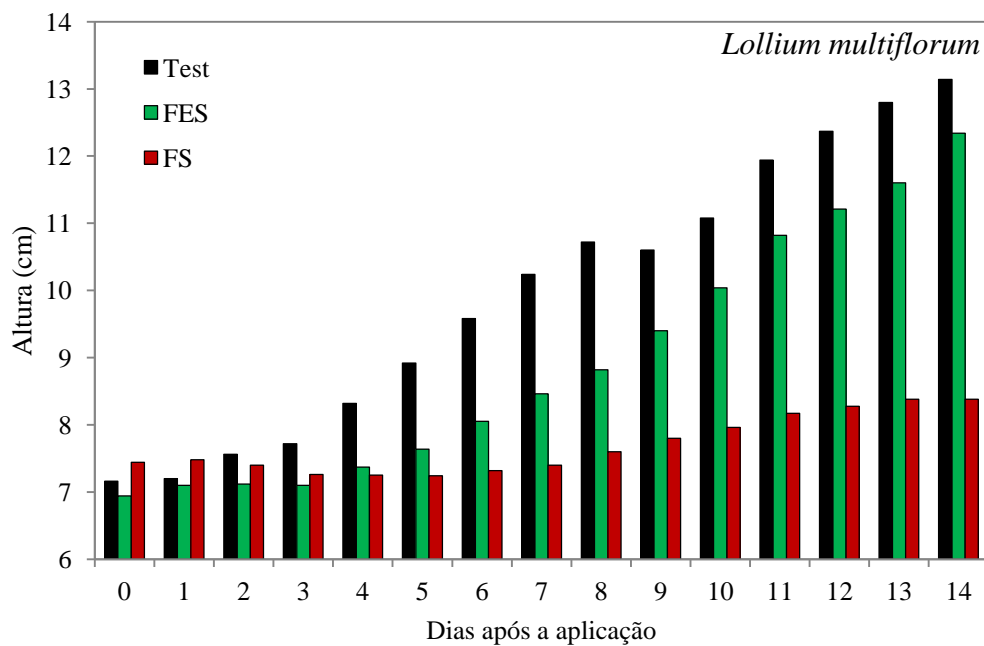
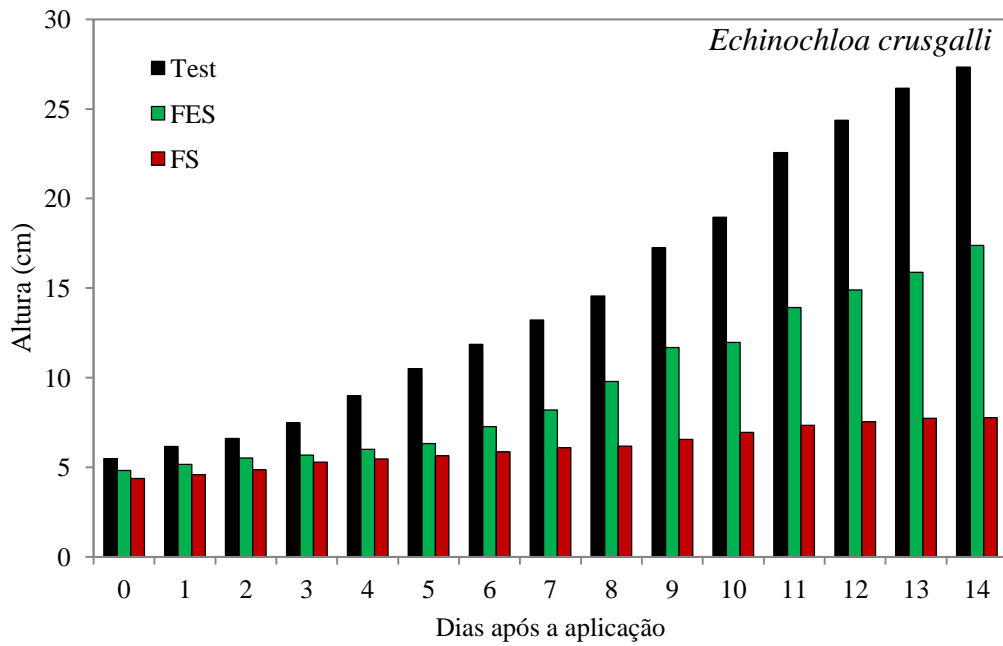
clorose ou leve necrose nas folhas. O mesmo foi encontrado por Varejão et al., (2013) em folhas de *Euphorbia heterophylla* ao aplicar metabólitos de *Alternaria euphorbicola*.

Na figura 10 estão representados resultados que demonstram que os tratamentos afetaram a altura das plantas daninhas avaliadas durante 14 dias. Em ambas as espécies avaliadas houve inibição do crescimento quando foram aplicados os tratamentos com FES e FS em comparação com a testemunha, porém a FS destacou-se dos demais tratamentos principalmente aos 14 dias de avaliação apresentando 15, 28, 71 e 36% de redução do crescimento das espécies *Bidens pilosa*, *Amaranthus viridis*, *Lolium multiflorum* e *Echinochloa crusgalli*, respectivamente em relação à testemunha.

Ao comparar os dados de fitotoxidade (tabela 4) e altura de plantas (figura 10), percebe-se que as espécies de gramíneas que apresentaram baixos índices de fitotoxidade tiveram o seu crescimento reduzido após a aplicação dos tratamentos. Isso fica evidenciado quando comparamos a fitotoxidade com a altura de *Lolium multiflorum* após 14 dias de aplicação dos tratamentos, onde mesmo apresentando 0% de fitotoxidade, houve redução de 36% da altura para o melhor tratamento em relação a testemunha. Outros trabalhos encontraram resultados semelhantes, como redução da altura de plantas bioindicadoras de *C. sativus* e *Sorghum bicolor* após a aplicação de bioherbicida produzido por FS de *Phoma* sp., mesmo não havendo resultados visíveis como lesão ou descoloração das folhas (BRUN et al., 2016). Redução significativa da altura de plantas de *C. sativus* foram observadas após a aplicação em pós-emergência de um bioherbicida produzido por FES de *Phoma* sp., além disso a inibição do crescimento foi observada em tratamentos que apresentaram menor fitotoxidade nas folhas (KLAIC et al., 2017). Foram encontradas reduções de 35-40% da altura de *C. sativus* após a aplicação do bioherbicida produzido por fermentação submersa de *Diaporthe* sp. Estes resultados demonstram que a existência de lesão pode não se traduzir em inibição do crescimento das plantas daninhas ou vice-versa, a redução do crescimento de plantas daninhas, traz inúmeras vantagens, uma delas é a menor capacidade de competição destas plantas daninhas com as plantas cultivadas, reduzindo a necessidade de aplicações de herbicidas sintéticos (SOUZA et al., 2017).

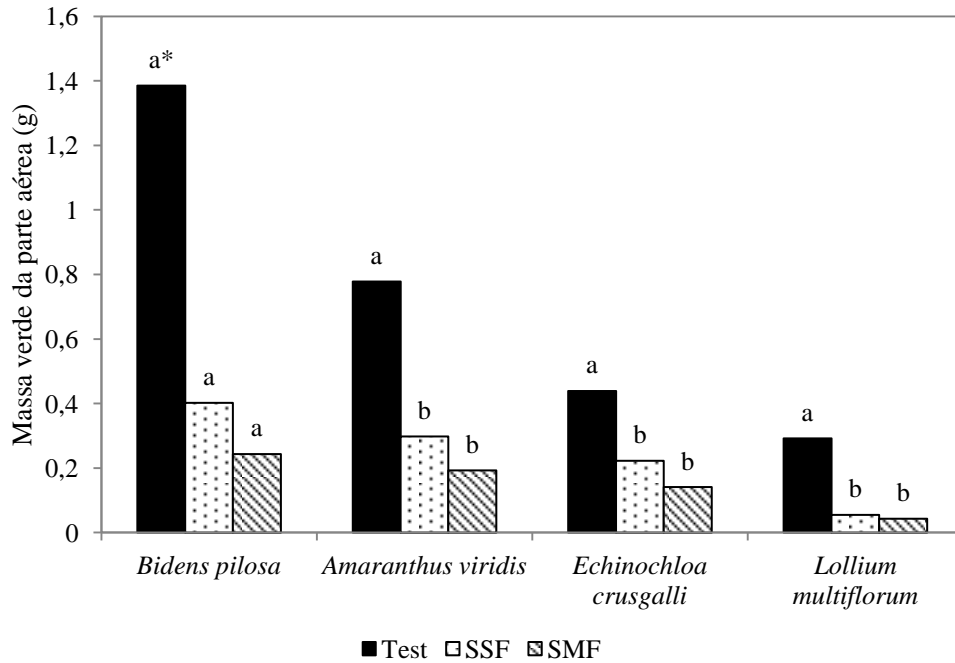
Figura 10 - Altura de plantas daninhas em função dos tratamentos testemunha (água), fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS), avaliados durante 14 dias após a aplicação.





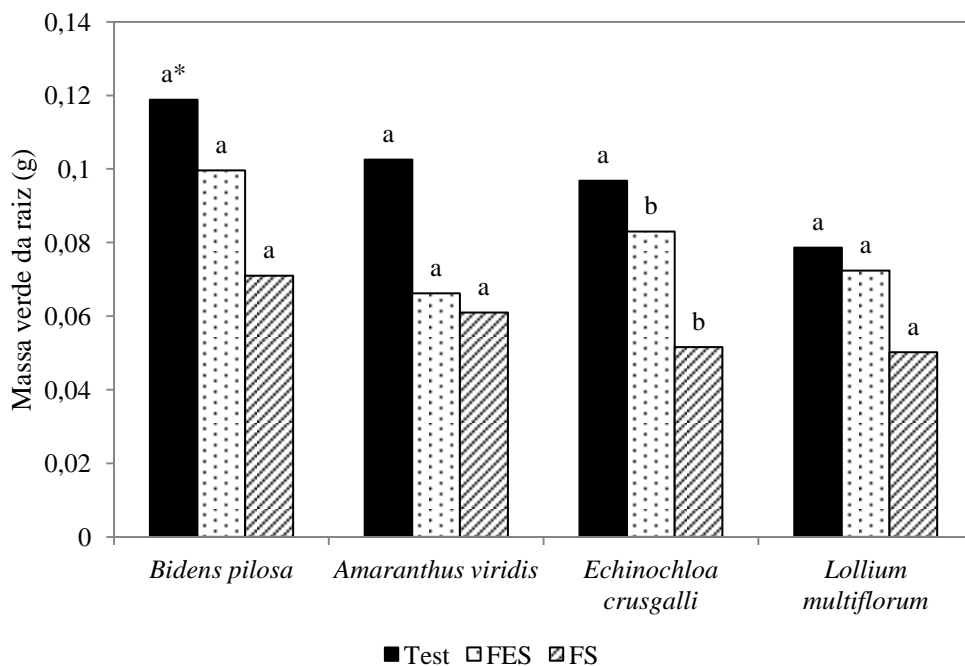
As figuras 11, 12, 13 e 14 apresentam os resultados de massa verde e massa seca da parte aérea e radicular de plantas daninhas, após 14 dias da aplicação dos tratamentos. Comparando com a testemunha, o tratamento que apresentou a maior inibição do desenvolvimento das plantas daninhas foi com a aplicação do caldo obtido por FS de *D. schini*, inibindo a produção de massa verde e massa seca da parte aérea e sistema radicular das plantas daninhas avaliadas, porém não diferiu significativamente do tratamento FES. Já comparando os resultados com a testemunha houve diferença significativa para a massa verde e massa seca da parte aérea para as espécies *B. pilosa* e *A. viridis*.

Figura 11 - Massa verde da parte aérea de plantas daninhas em função da aplicação dos tratamentos testemunha (água), fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS).



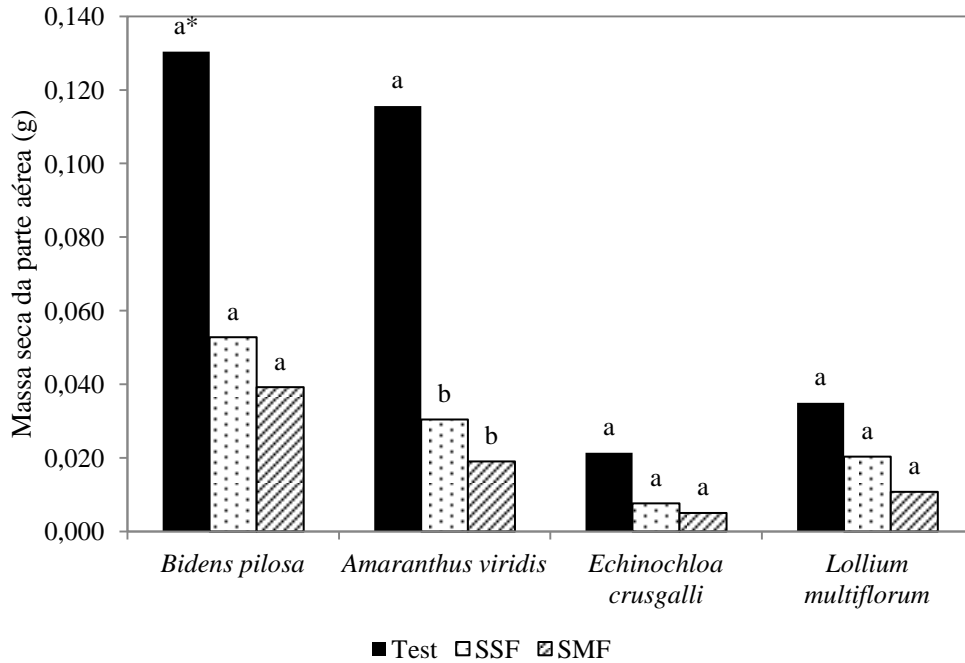
*Médias não seguidas pelas mesmas letras nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Figura 12 - Massa verde da raiz de plantas daninhas em função da aplicação dos tratamentos testemunha (água), fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS).



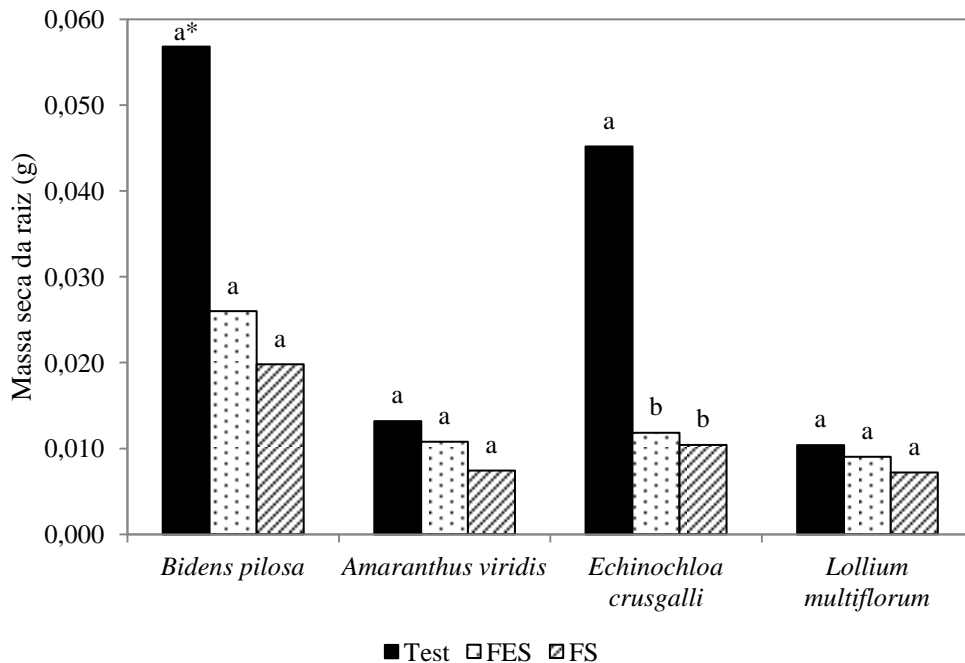
*Médias não seguidas pelas mesmas letras nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Figura 13 - Massa seca da parte aérea de plantas daninhas em função da aplicação dos tratamentos testemunha (água), fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS).



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

Figura 14 - Massa seca da raiz de plantas daninhas em função da aplicação dos tratamentos testemunha (água), fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS).



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

Não houve diferença significativa entre os tratamentos para os parâmetros massa verde e seca da raiz e da parte aérea para *B. pilosa* (figuras 11, 12, 13 e 14), já para a massa verde da parte aérea (figura 11) houve diferença significativa entre a testemunha e os caldos obtidos por FS e FES para as espécies *A. viridis*, *E. crusgalli* e *L. multiflorum*. Alguns autores encontraram resultados semelhantes, como redução de massa seca e altura de *Aeschynomene virginica*, *Azadirachta indica* e *Sesbania exaltata* após a aplicação de uma cepa fúngica de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium sp. aeschynomene* (BOYETTE et al., 2019). Redução de 35 a 40% da massa verde de *C. sativus* foram observados após a aplicação do caldo obtido por FS de *Diaporthe sp.* (SOUZA et al., 2017). Houve redução significativa da massa seca da parte aérea de *Glycine max*, *Triticum aestivum*, *Oriza sativa*, *Lolium multiflorum*, *Sorghum halepense*, *Conyza sp.*, *Echinochloa sp.* causadas pela aplicação do caldo fermentado de *Diaporthe sp.* (PES et al., 2016). Os mesmos autores, destacam a hipótese de que esta redução de desenvolvimento da planta pode estar relacionado a interferência da fitotoxina na biossíntese de aminoácidos essenciais ao crescimento das plantas, como leucina, isoleucine e valina.

Para todos os parâmetros avaliados, a FS apresentou-se como a melhor técnica para a produção de bioherbicida, mesmo apresentando baixa fitotoxicidade. No entanto, houve redução de altura de plantas, massa verde e seca da raiz e da parte aérea das plantas daninhas avaliadas. Ressalva-se que uma estratégia para aumentar a eficiência do bioherbicida sobre o alvo é o uso de formulações como observado no trabalho de Todero et al. (2018b), onde com o uso de aditivos em concomitante ao caldo fermentado de *Phoma sp.* houve aumento do efeito bioherbicida em plantas daninhas. O menor efeito bioherbicida observado para a FES pode estar relacionado à dificuldade da extração da molécula bioativa, a qual fica adsorvida ao material sólido e, em consequência, reduz a concentração do composto de interesse. Já na fermentação submersa a molécula bioativa encontra-se dissolvida no meio líquido, sem perdas durante o processo.

5.2.2 Comparação físico-química

Na tabela 5, é possível observar os dados de caracterização físico-química do caldo bruto obtido nas melhores condições obtidas nos bioensaios para FES, FS e testemunha (água destilada). Para a densidade não houve diferença significativa entre a testemunha e a FES apresentando 0,997 e 0,996 g/cm³, respectivamente. Já o tratamento FS diferiu dos demais apresentando uma densidade maior 1,028 g/cm³. A maior densidade encontrada no caldo

produzido por FS, pode estar relacionado a maior concentração de metabólitos de interesse no meio. Bueno et al. (2013), constataram que a maior densidade foi observada no maior volume de calda utilizado para a aplicação de glifosato, resultando em uma maior concentração e maior efeito herbicida.

Tabela 5 - Caracterização do caldo obtido por fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS) de *Diaporthe schini* para produção de bioherbicida.

Tratamentos	Densidade (g/cm ³)	Tensão superficial (mN.m ⁻¹)	Viscosidade (mPa.s)	pH
Test	0,997a	76,71a	0,973b	5,75a
FES	0,996a	67,11b	0,992b	5,62a
FS	1,028b	42,18c	1,329a	5,30a
CV%	0,32	4,11	2,05	6,62

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

CV: Coeficiente de variação

Considerando a tensão superficial, houve diferença estatística entre todos os tratamentos avaliados, sendo que o tratamento FS apresentou a menor tensão superficial do produto (42,18 mN/m), enquanto que a FES e a testemunha apresentaram tensão superficial de 67,11 mN/m e 76,71 mN/m, respectivamente. Observa-se que os resultados encontrados para tensão superficial corroboram com os encontrados para os bioensaios, visto que a técnica de produção de bioherbicida por FS foi considerada mais eficaz. Os resultados também corroboram com os relatados por Toderó et al. (2018b), onde o filtrado de cultura de *Phoma* sp. e a água apresentaram tensões superficiais de 49,72 mN/m e 69,00 mN/m, respectivamente. A redução da tensão superficial é uma característica interessante do ponto de vista da aplicação, permitindo que a gota espalhe-se pela folha e aumente sua área de contato. Taylor (2011) ressalta que, a eficácia biológica dos herbicidas depende da retenção do filtrado da cultura no alvo.

A tensão superficial possui relação direta com a produção de exopolissacarídeos, pois quanto maior a concentração deste maior a ação bioherbicida e menor a tensão superficial. Toderó et al. (2019) quantificaram os exopolissacarídeos produzidos por FS de *Phoma* sp. e observaram que nos maiores índices a tensão superficial foi menor e conseqüentemente maior ação bioherbicida em plantas testes. Na FES a extração da molécula bioherbicida é dificultada, já que esta fica adsorvida ao material sólido, reduzindo a concentração de exopolissacarídeos e a ação bioherbicida sobre as plantas daninhas.

Os dados obtidos da viscosidade dos tratamentos analisados, apresentou diferença significativa entre eles, sendo o tratamento com maior índice o caldo obtido por FS com 1,329 mPa/s, seguido de FES com 0,992 mPa/s e testemunha (água) com 0,973 mPa/s. O aumento da viscosidade para o tratamento FS pode estar relacionado a maior concentração de metabólitos com ação herbicida no meio. Ao avaliar diferentes volumes de calda de um herbicida sintético, alguns autores observaram que a maior viscosidade foi encontrada no tratamento com maior concentração do princípio ativo (BUENO et al., 2013).

Não houve diferença significativa entre o pH dos tratamentos avaliados, porém nota-se que o caldo obtido por FS apresentou o menor pH de 5,30, seguido da testemunha (água) e FES com 5,62 e 5,75, respectivamente. Todero et al. (2018b) encontrou pH de 6 para água e 5,4 para o caldo bruto produzido por FS de *Phoma* sp. para produção de bioherbicida. A redução do pH de uma solução, é uma característica interessante para um bioherbicida, pois pode manter a folha da planta úmida por mais tempo após a aplicação, devido a redução da taxa de hidrólise (CUNHA et al., 2010). A folha da planta possui pH em torno de 7, porém ao entrar em contato com o produto, ocorre a neutralização do pH, podendo aumentar ou diminuir dependendo das características da solução (TODERO et al., 2018a).

Todos os resultados encontrados na caracterização físico-química estão correlacionados com os resultados anteriores dos bioensaios, pois está diretamente ligada a eficácia do bioherbicida sobre o alvo, já que estas variáveis analisadas interferem na capacidade de absorção do princípio ativo pelas folhas, capacidade de espalhamento, aderência e tempo de contato com o alvo, fatores que interferem diretamente na capacidade de controle de plantas daninhas.

5.3 ESCOLHA DO ADITIVO PARA SECAGEM DO BIOHERBICIDA POR *SPRAY DRYING*

A tabela 6 demonstra os parâmetros do *spray drying* e fitotoxicidade sobre plantas daninhas utilizando diferentes aditivos transportadores para a secagem. Para os parâmetros do *spray drying* observa-se que nos tratamentos com aditivos + caldo bruto a temperatura de saída do equipamento variou de 67 a 70°C, umidade de 2,2 a 3,8%, rendimento de pó de 62,2 a 82% e eficiência energética de 39 a 42,8%. Já para os parâmetros do equipamento utilizando somente aditivo + água houve pouca variação na temperatura de saída e eficiência energética, porém os teores de umidade e rendimento de pó sofreram grandes alterações, sendo que não foi possível determinar a umidade do pó devido ao baixo rendimento encontrado após a

secagem no *spray drying*. Costa-Silva et al (2011) atribuíram os baixos rendimentos de pó (78 a 38,4%) à ineficiência do sistema na coleta de pó após a secagem, onde as partículas finas acabam sendo carregadas junto ao ar de exaustão. Além disso, a deposição do pó na câmara de exaustão contribui de forma significativa na redução dos rendimentos.

A fitotoxicidade foi avaliada para quatro espécies de plantas daninhas, obtendo uma variação de 0 a 30% entre os tratamentos avaliados e para ambas as espécies de plantas daninhas. O tratamento onde se utilizou o aditivo lactose, para a secagem do caldo bruto apresentou os maiores índices de fitotoxicidade: 22, 20, 30 e 10% de fitotoxicidade para *B. pilosa*, *A. viridis*, *E. crusgalli* e *L. multiflorum*, respectivamente. O tratamento com caldo bruto apresentou fitotoxicidade de 18, 12, 8 e 0% de fitotoxicidade para *B. pilosa*, *A. viridis*, *E. crusgalli* e *L. multiflorum*, respectivamente. Costa-Silva et al. (2011) avaliaram diferentes aditivos para a secagem de Lipase, destes apenas a lactose apresentou atividade enzimática maior que 100%, sendo que β -ciclodextrina, maltodextrina DE10, maltodextrina DE20, manitol, goma arábica e trealose apresentaram atividade abaixo de 90%. Estes autores avaliaram o tamanho médio de partículas, sendo que a lactose utilizada como aditivo apresentou formas arredondadas e bem definidas da superfície do pó.

A secagem da mistura de caldo bruto + aditivo aumentou a ação bioherbicida quando comparado ao caldo bruto e a testemunha, sendo que este resultado pode estar relacionado com o aumento da concentração dos metabólitos após a secagem, devido a redução da água presente no caldo bruto. Não houve fitotoxicidade para os tratamentos utilizando somente aditivo + água, mostrando que os aditivos são inertes e não causam danos em pós-emergência nas plantas daninhas avaliadas.

Tabela 6 - Seleção do aditivo para a formulação sólida por *spray drying* do bioherbicida produzido por fermentação submersa (FS) de *Diaporthe schini*.

Tratamentos/ Aditivos	Parâmetros <i>spray drying</i>				Fitotoxicidade (%)			
	T _{out} (°C)	U (%)	R (%)	EE (%)	<i>B.</i> <i>pilosa</i>	<i>A.</i> <i>viridis</i>	<i>E.</i> <i>crusgalli</i>	<i>L.</i> <i>multiflorum</i>
Aditivo + caldo bruto								
Testemunha	-	-	-	-	0 b*	0 b	0 d	0 b
Caldo bruto	-	-	-	-	18 a	12 a	8 c	0 b
Amido de milho	70	3,6	74,1	39,0	14 a	16 a	30 a	24 a
Amido solúvel	70	2,5	62,2	39,0	18 a	16 a	8 c	4 b
Lactose	69	2,3	80,7	39,0	22 a	20 a	30 a	10 a
Talco industrial	69	2,2	71,2	40,0	4 b	8 b	0 d	0 b
Maltodextrina	70	3,8	82,0	39,0	8 b	8 b	2 d	0 b
Fécula de mandioca	68	3,2	80,2	41,5	14 a	6 b	6 c	2 b
Sacarose	67	2,4	80,5	42,8	6 b	12 a	16 b	0 b
CV (%)					52,20	63,66	57,41	84,69
Aditivo + água (controle)								
Amido de milho	68	-	51,1	41,5	0	0	0	0
Amido solúvel	67	-	41,7	42,8	0	0	0	0
Lactose	69	-	9,4	40,0	0	0	0	0
Talco industrial	70	-	36,0	39,0	0	0	0	0
Maltodextrina	69	-	10,0	40,0	0	0	0	0
Fécula de mandioca	67	-	8,0	42,8	0	0	0	0
Sacarose	66	-	11,0	44,1	0	0	0	0

Ton- Temperatura de saída no *Spray drying*; U- Umidade do pó; R- Rendimento de pós; EE- Eficiência energética;

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

CV: Coeficiente de variação

As figuras 15, 16, 17 e 18, mostram a diferença entre os tratamentos para *B. pilosa*, *A. viridis*, *E. crusgalli* e *L. multiflorum*, respectivamente. Nestas figuras, lesões como amarelecimento ou necrose, são praticamente inexistentes, conforme observados na tabela 5. Comparando o desenvolvimento das plantas daninhas nas figuras 15, 16, 17 e 18 com a fitotoxicidade na tabela 6, nota-se que não existe uma correlação entre estes dados. Estes resultados corroboram com o que foi discutido e observado anteriormente neste trabalho, onde a existência de lesão pode não se traduzir em inibição do crescimento das plantas daninhas ou vice-versa.

Figura 15 - Comparação entre diferentes aditivos para a formulação sólida de bioherbicida por *spray drying* sobre *Bidens pilosa* aos 14 DAA.

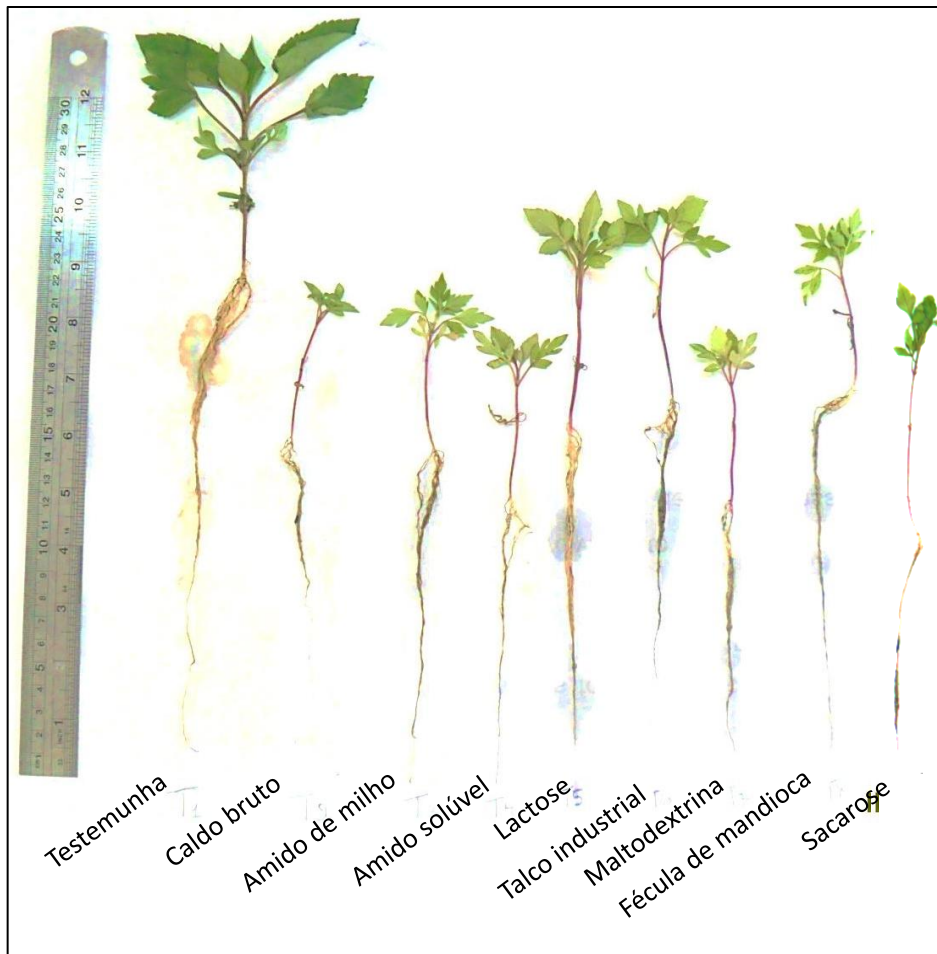


Figura 16 - Comparação entre diferentes aditivos para a formulação sólida de bioherbicida por *spray drying* sobre *Amaranthus viridis* aos 14 DAA.



Figura 17 - Comparação entre diferentes aditivos para a formulação sólida de bioherbicida por *spray drying* sobre *Echinochloa crusgalli* aos 14 DAA.

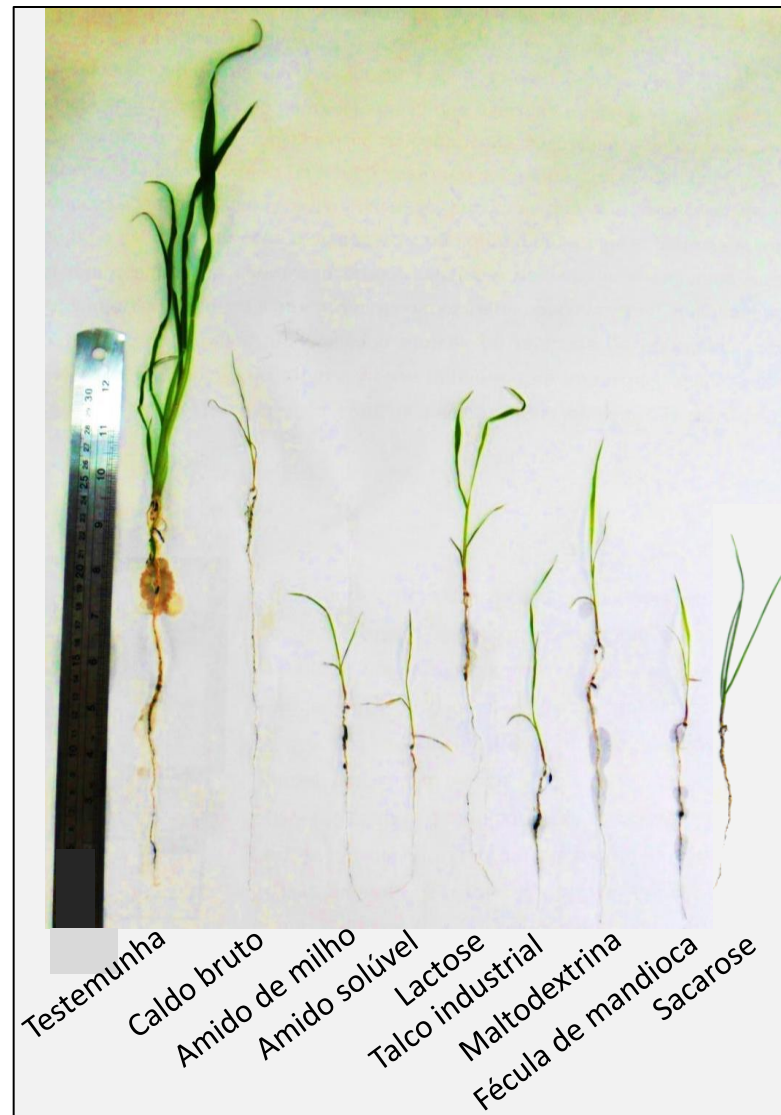


Figura 18 - Comparação entre diferentes aditivos para a formulação sólida de bioherbicida por *spray drying* sobre *Lolium multiflorum* aos 14 DAA.



Na tabela 7 é possível observar a influência do tipo de aditivo utilizado para a secagem do caldo fermentado de *D. schini* sobre alguns parâmetros de desenvolvimento de plantas daninhas, avaliados 14 dias após a aplicação. Para a altura da planta, o mesmo não apresentou diferença significativa entre os tratamentos com aditivos e caldo bruto para ambas as espécies de plantas daninhas avaliadas, porém estes diferiram da testemunha para as espécies *A. viridis*, *E. crusgalli* e *L. multiflorum*. Não houve diferença significativa na altura de planta para todos os tratamentos avaliados para a espécie *B. pilosa*.

Em todas as espécies de plantas daninhas avaliadas, a altura de planta foi maior para a testemunha quando comparados aos demais tratamentos. Ao comparar os tratamentos onde foram utilizados diferentes aditivos + caldo bruto para a secagem com o tratamento utilizando somente o caldo bruto, verificou que não houve diferença significativa entre eles. Este resultado é satisfatório, visto que o uso do *spray drying* aumentou ou manteve igual os índices de inibição do crescimento das plantas daninhas, mesmo após submetidos a altas temperaturas e pressão durante o processo de secagem. Este efeito pode estar relacionado a capacidade de

proteção que os aditivos transportadores desempenham durante a exposição a altas temperaturas no *spray drying*, reduzindo as perdas, garantindo a qualidade do produto final, além de facilitar o armazenamento. Uma das formas de aumentar a estabilidade físico-química e microbiana dos bioprodutos com carga bioativa é removendo a água e transformando-os em pó (SARABANDI et al., 2020). Na tabela 8, estão representados os dados de altura de planta, massa verde e massa seca da parte aérea e radicular das plantas daninhas avaliadas, submetidos a aplicação de aditivos + água (controle), neste não houve diferença significativa entre os aditivos avaliados e a testemunha, garantindo que os aditivos são inertes e não causam efeito herbicida quando aplicados isoladamente nas plantas daninhas.

Os dados de massa verde e massa seca da parte aérea e da raiz das plantas daninhas estão representados na tabela 7. Estes parâmetros apresentaram pouca variação entre os tratamentos avaliados, sendo que para a maioria deles não houve diferença significativa para os parâmetros citados anteriormente e as espécies analisadas. Para todos os parâmetros avaliados, a secagem do caldo utilizando a aditivo lactose, apresentou os maiores índices de inibição do crescimento das plantas daninhas e, baseado nos resultados apresentados na tabela 5, onde foram encontrados para este tratamento os maiores índices de fitotoxicidade. Este tratamento foi escolhido como o mais adequado para a secagem do caldo bruto de *D. schini* e utilizado para a otimização dos parâmetros do *spray drying*. A lactose é facilmente encontrada e amplamente utilizada, principalmente na indústria alimentícia, por isso a sua utilização como aditivo para a secagem é economicamente viável e passível de ser utilizada para a formulação de bioherbicidas. Além disso, alguns autores avaliaram o tamanho médio de partículas e identificaram que a lactose utilizada como aditivo apresentou formas arredondadas e bem definidas da superfície do pó produzido por *spray drying* (COSTA-SILVA et al, 2011).

Tabela 7 - Seleção do aditivo para a formulação sólida por *spray drying* e seu efeito bioherbicida sobre altura, massa verde da parte aérea (MVPA), massa verde da raiz (MVR), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) de plantas daninhas.

Tratamentos/ Aditivos	Respostas					Respostas				
	Altura (cm)	MVPA (g)	MVR (g)	MSPA (g)	MSR (g)	Altura (cm)	MVPA (g)	MVR (g)	MSPA (g)	MSR (g)
<i>Bidens pilosa</i>						<i>Amaranthus viridis</i>				
Testemunha	6,44 a	1,386 a	0,194 a	0,110 a	0,057 a	4,84 a	1,117 a	0,103 a	0,116 a	0,006 a
Caldo bruto	5,48 a	0,243 b	0,107 b	0,039 c	0,042 a	3,48 b	0,832 b	0,009 c	0,019 b	0,007 a
Amido de milho	6,12 a	0,133 b	0,073 b	0,017 c	0,039 a	3,00 b	0,766 b	0,071 b	0,006 b	0,008 a
Amido solúvel	5,38 a	0,264 b	0,112 b	0,034 c	0,033 a	2,72 b	0,806 b	0,005 c	0,016 b	0,003 a
Lactose	4,36 a	0,157 b	0,080 b	0,023 c	0,018 b	2,74 b	0,771 b	0,010 c	0,006 b	0,008 a
Talco industrial	6,66 a	0,565 b	0,119 b	0,065 b	0,044 a	3,38 b	0,777 b	0,016 c	0,037 b	0,015 a
Maltodextrina	5,50 a	0,140 b	0,080 b	0,035 c	0,003 b	3,40 b	0,799 b	0,011 c	0,017 b	0,009 a
Fécula de mandioca	5,60 a	0,132 b	0,079 b	0,019 c	0,003 b	3,52 b	0,849 b	0,009 c	0,013 b	0,006 a
Sacarose	4,36 a	0,172 b	0,085 b	0,022 c	0,003 b	2,66 b	0,820 b	0,005 c	0,012 b	0,002 a
CV (%)	10,12	16,53	3,13	2,87	1,97	8,94	9,13	1,54	2,25	0,76
<i>Echinochloa crusgali</i>						<i>Lolium multiflorum</i>				
Testemunha	27,34 a	0,439 a	0,097 a	0,021 a	0,032 a	14,14 a	0,292 a	0,123 a	0,035 a	0,010 a
Caldo bruto	7,76 b	0,141 b	0,010 c	0,019 a	0,010 a	8,38 b	0,068 b	0,098 b	0,013 b	0,010 a
Amido de milho	7,86 b	0,200 b	0,062 b	0,023 a	0,010 a	9,56 b	0,166 b	0,011 b	0,012 b	0,009 a
Amido solúvel	8,84 b	0,169 b	0,005 c	0,012 b	0,005 a	8,28 b	0,083 b	0,009 b	0,050 a	0,007 a
Lactose	8,14 b	0,121 b	0,011 c	0,012 b	0,010 a	7,38 b	0,077 b	0,015 b	0,010 b	0,012 a
Talco industrial	15,02 b	0,157 b	0,019 c	0,007 b	0,018 a	12,26 b	0,119 b	0,014 b	0,006 b	0,012 a
Maltodextrina	10,66 b	0,147 b	0,003 c	0,004 b	0,018 a	12,08 b	0,111 b	0,007 b	0,029 a	0,003 a
Fécula de mandioca	10,22 b	0,155 b	0,015 c	0,008 b	0,015 a	8,12 b	0,258 a	0,009 b	0,005 b	0,007 a
Sacarose	7,54 b	0,159 b	0,010 c	0,006 b	0,010 a	11,92 b	0,125 b	0,011 b	0,008 b	0,009 a
CV (%)	17,18	4,14	1,57	1,07	1,3	11,10	8,78	3,7	1,98	0,86

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

Tabela 8 - Formulações sólidas de aditivos + água (controle) por *spray drying* e seu efeito bioherbicida sobre altura, Massa verde da parte aérea (MVPA), massa verde da raiz (MVR), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) de plantas daninhas.

Tratamentos/ Aditivos	Respostas					Respostas				
	Altura (cm)	MVPA (g)	MVR (g)	MSPA (g)	MSR (g)	Altura (cm)	MVPA (g)	MVR (g)	MSPA (g)	MSR (g)
<i>Bidens pilosa</i>						<i>Amaranthus viridis</i>				
Testemunha	4,62 a	0,127 a	0,117 b	0,026 a	0,072 a	3,36 a	0,240 a	0,094 b	0,067 b	0,050 b
Amido de milho	4,08 a	0,221 a	0,101 b	0,083 a	0,052 a	2,44 b	0,208 a	0,118 b	0,081 a	0,067 a
Amido solúvel	4,34 a	0,176 a	0,134 a	0,059 a	0,033 a	2,46 b	0,247 a	0,127 b	0,092 a	0,045 b
Lactose	4,70 a	0,225 a	0,162 a	0,081 a	0,056 a	3,00 a	0,180 a	0,179 a	0,050 b	0,060 a
Talco industrial	3,82 a	0,233 a	0,096 b	0,088 a	0,056 a	2,52 b	0,187 a	0,085 b	0,040 b	0,032 b
Maltodextrina	4,30 a	0,225 a	0,101 b	0,073 a	0,054 a	3,00 a	0,190 a	0,102 b	0,020 b	0,055 b
Fécula de mandioca	3,66 a	0,223 a	0,086 b	0,059 a	0,050 a	2,30 b	0,162 a	0,073 b	0,021 b	0,047 b
Sacarose	3,84 a	0,228 a	0,118 b	0,069 a	0,056 a	2,28 b	0,163 a	0,106 b	0,018 b	0,045 b
CV (%)	6,37	4,19	1,81	3,82	1,92	6,99	4,17	2,28	2,56	1,23
<i>Echinochloa crusgalli</i>						<i>Lolium multiflorum</i>				
Testemunha	9,36 b	0,181 a	0,107 a	0,100 a	0,015 a	10,92 b	0,181 a	0,106 b	0,100 a	0,0664 a
Amido de milho	6,76 b	0,232 a	0,109 a	0,125 a	0,013 a	10,12 b	0,232 a	0,111 b	0,125 a	0,0616 a
Amido solúvel	11,76 a	0,282 a	0,103 a	0,112 a	0,020 a	17,06 a	0,282 a	0,191 a	0,112 a	0,0782 a
Lactose	14,64 a	0,182 a	0,151 a	0,086 a	0,050 a	14,34 a	0,182 a	0,156 a	0,086 a	0,0672 a
Talco industrial	9,48 b	0,231 a	0,156 a	0,061 a	0,028 a	15,06 a	0,231 a	0,104 b	0,061 a	0,0580 a
Maltodextrina	10,30 b	0,186 a	0,145 a	0,064 a	0,015 a	14,60 a	0,186 a	0,139 a	0,064 a	0,0598 a
Fécula de mandioca	9,68 b	0,172 a	0,138 a	0,038 a	0,012 a	11,68 b	0,172 a	0,096 b	0,012 a	0,0590 a
Sacarose	8,82 b	0,271 a	0,141 a	0,094 a	0,014 a	15,10 a	0,271 a	0,104 b	0,094 a	0,0626 a
CV (%)	12,3	5,45	3,9	4,36	2,36	11,73	5,45	2,72	4,36	2,43

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

5.4 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO *SPRAY DRYING*

Após a seleção do melhor aditivo para a secagem do caldo bruto produzido por FS de *Diaporthe schini* foi realizada a otimização de alguns parâmetros do *spray drying*. Na tabela 9 estão representados a influência das condições experimentais como temperatura de entrada, vazão do ar de secagem e vazão de alimentação sobre a temperatura de saída, umidade, rendimento e eficiência energética. A temperatura de saída é diretamente proporcional a temperatura de entrada e vazão do ar de secagem. Ao comparar o ensaio 1 com temperatura de entrada de 90°C com o ensaio 2 com temperatura de entrada de 110°C, nota-se que a temperatura de saída foi de 60 e 73°C, respectivamente, mantendo a vazão do ar de secagem constante em 0,85 m³/min. Já no ensaio 1 e 3 houve aumento da temperatura de saída de 60°C para 69°C quando a vazão do ar de secagem foi aumentada de 0,85 m³/min para 1,95 m³/min, mantendo a temperatura de entrada constante a 90°C em ambos os ensaios. Durante a evaporação das gotículas, um efeito de resfriamento é atingido, que impede que a temperatura do material de secagem aumente (NAMALDI et al (2006). Neste trabalho, a temperatura de saída do *spray drying*, manteve-se bem abaixo da temperatura de entrada em todos os ensaios avaliados, apresentando temperatura média de 70°C. Estes resultados corroboram com os encontrados por Costa-Silva et al. (2011) onde a temperatura média de saída foi de 69,3°C utilizando temperatura de entrada de 100°C para a secagem de enzimas por *spray drying*. Por isso, este método pode ser utilizado em processos onde há alto risco de degradação térmica do material, pois o tempo de exposição é baixo.

Conforme observados na tabela 9, a temperatura de saída foi influenciada negativamente pelo aumento da vazão de alimentação, este aumento de vazão reduz a temperatura do equipamento devido ao maior volume de mistura injetado na câmara de secagem. Esta é uma característica desejável, pois quanto menor a temperatura menor o risco de degradação dos metabólitos de interesse no meio.

Após a secagem em *spray drying*, a umidade do pó variou de 0,9 a 4,9% entre os tratamentos avaliados. A secagem por pulverização possui a capacidade de remover mais de 90% (p/p) da umidade, sendo que os valores ótimos de otimização dos experimentos, devem permitir que a umidade seja menor de 11% (p/p) para os biopesticidas (ALAMILLA-BELTRÁN et al., 2005). Com isso, os resultados encontrados neste trabalho, indicam que a secagem por *spray drying* nas condições avaliadas pode ser utilizada para a secagem de bioherbicidas. O rendimento de pó variou de 63,88 a 98,25%, apresentando valor médio de 82,84%. O aumento da temperatura do bico de pulverização causa maior aquecimento da

câmara de atomização, resultando em melhor evaporação do transportador (água) e reduzindo a umidade da micropartícula. Quanto menor a umidade das partículas, menor a adesão da partícula às paredes da câmara de secagem, aumentando o rendimento final (Camacho et al., 2015). As maiores perdas durante o processo ocorrem pela deposição do produto nas paredes da câmara de secagem e em outras partes do equipamento (BÜRKI et al., 2011). A eficiência energética variou de acordo com o ajuste da temperatura de entrada e saída do equipamento. Podemos observar na tabela 8 que a maior eficiência energética foi encontrada no ensaio 11, neste a diferença entre a temperatura de entrada e a de temperatura de saída do *spray drying* é menor quando comparada aos outros ensaios, resultando em maior aproveitamento na energia térmica para a secagem da mistura.

A fitotoxicidade também foi avaliada em todas as condições estudadas do *spray drying*, porém não houve nenhum tipo de lesão ou descoloração que resultasse em fitotoxicidade, por isso os dados não foram apresentados.

Tabela 9 - Efeitos das condições experimentais do *spray drying*, temperatura (T_{in}), vazão do ar de secagem (V_s), vazão de alimentação (V_a) sobre as respostas temperatura de saída (T_{out}), umidade (U), rendimento (R) e eficiência energética (EE) da mistura do bioherbicida e lactose.

Condições experimentais				Respostas			
Ensaio	T_{in} (°C)	V_s (m ³ /min)	V_a (L/h)	T_{out} (°C)	U (%)	R (%)	EE (%)
1	90 (-1)	0,85 (-1)	0,15 (-1)	60	4,9	81,88	46
2	110 (+1)	0,85 (-1)	0,15 (-1)	73	4,1	65,27	44
3	90 (-1)	1,95 (+1)	0,15 (-1)	69	1,5	91,37	32
4	110 (+1)	1,95 (+1)	0,15 (-1)	83	0,9	91,70	32
5	90 (-1)	0,85 (-1)	0,30 (+1)	60	5,4	66,54	46
6	110 (+1)	0,85 (-1)	0,30 (+1)	70	4,1	63,88	47
7	90 (-1)	1,95 (+1)	0,30 (+1)	67	2,2	98,25	35
8	110 (+1)	1,95 (+1)	0,30 (+1)	80	2,0	80,64	35
9	85 (-1,68)	1,4 (0)	0,22 (0)	61	4,5	84,67	40
10	115 (+1,68)	1,4 (0)	0,22 (0)	80	2,7	82,30	39
11	100 (0)	0,5 (-1,68)	0,22 (0)	61	4,9	65,68	52
12	100 (0)	2,3 (+1,68)	0,22 (0)	78	1,7	94,14	29
13	100 (0)	1,4 (0)	0,1 (-1,68)	72	2,4	87,88	37
14	100 (0)	1,4 (0)	0,35 (+1,68)	69	2,4	91,69	41
15	100 (0)	1,4 (0)	0,22 (0)	69	2,8	86,74	41
16	100 (0)	1,4 (0)	0,22 (0)	69	2,8	87,01	41
17	100 (0)	1,4 (0)	0,22 (0)	69	2,1	88,70	41

Conforme observado nas tabelas 10 e 11, alguns parâmetros de crescimento de plantas daninhas foram significativamente influenciados pelas condições de operação do *spray drying*, como temperatura de entrada, vazão do ar de secagem e vazão de alimentação da mistura. Estes parâmetros interferiram significativamente na altura das plantas daninhas, destacando-se o ponto central com temperatura de entrada de 100°C, vazão do ar de secagem de 1,4 m³/min e vazão de alimentação de 0,22 L/h, que inibiu o crescimento em altura de todas as espécies de plantas daninhas, após 14 dias da aplicação dos tratamentos. Estas mesmas condições de operação do *spray drying* também resultaram em menor acúmulo de massa verde e massa seca da parte aérea e radicular das espécies *B. pilosa* e *A. viridis*, quando comparados aos demais tratamentos e a testemunha (tabela 10). O mesmo foi observado para *E. crusgalli* onde o ponto central do delineamento, apresentou redução significativa para os parâmetros massa verde da parte aérea e radicular, já para a massa seca da parte aérea e da raiz, não houve diferença significativa para esta espécie de planta daninha. A espécie *L. multiflorum* não foi influenciada pelos parâmetros de crescimento avaliados, exceto a altura de planta (tabela 11).

Tabela 10 - Efeitos das condições experimentais do *spray drying*, temperatura (Tin), vazão do soprador (Vs), vazão de alimentação (Va) sobre a altura, massa verde parte aérea (MVPA), massa verde da raiz (MVR), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) de *Bidens pilosa* e *Amaranthus viridis*.

Tratamentos	Respostas					Respostas				
	Altura (cm)	MVPA (g)	MVR (g)	MSPA (g)	MSR (g)	Altura (cm)	MVPA (g)	MVR (g)	MSPA (g)	MSR (g)
<i>Bidens pilosa</i>						<i>Amaranthus viridis</i>				
Testemunha	6,12 c	0,804 b	0,061 e	0,113 a	0,015 d	9,10 a	1,896 b	0,324 a	0,241 a	0,020 b
1	5,42 d	0,039 g	0,084 e	0,032 d	0,042 a	8,44 b	2,091 a	0,239 b	0,237 a	0,011 b
2	5,38 d	0,555 d	0,157 d	0,142 a	0,031 b	4,52 g	0,488 i	0,135 d	0,090 c	0,035 a
3	5,50 d	0,289 e	0,059 e	0,027 d	0,008 b	8,02 c	1,393 c	0,185 c	0,186 b	0,009 b
4	6,26 c	0,723 c	0,245 c	0,098 b	0,073 a	7,84 c	0,643 g	0,125 d	0,031 d	0,009 b
5	5,70 d	0,770 b	0,128 d	0,081 b	0,006 b	8,66 b	0,265 j	0,229 b	0,075 c	0,046 a
6	6,74 b	0,754 c	0,132 d	0,082 b	0,019 b	5,98 e	0,655 g	0,143 d	0,012 d	0,022 b
7	4,56 f	0,307 e	0,042 e	0,062 b	0,019 b	5,38 f	0,738 f	0,026 f	0,079 c	0,012 b
8	8,06 a	0,967 a	0,169 d	0,027 d	0,049 a	7,34 d	0,538 h	0,109 e	0,148 b	0,016 b
9	3,70 g	0,167 f	0,085 e	0,061 b	0,019 b	7,44 d	0,885 e	0,100 e	0,033 d	0,012 b
10	4,36 f	0,155 f	0,242 c	0,007 d	0,030 b	7,84 c	0,724 f	0,094 e	0,022 d	0,012 b
11	4,70 f	0,125 f	0,004 f	0,078 b	0,009 b	2,84 h	0,719 f	0,141 d	0,110 c	0,016 b
12	4,90 e	0,060 g	0,346 b	0,042 c	0,008 b	6,66 e	0,051 k	0,072 f	0,018 d	0,010 b
13	3,88 g	0,159 f	0,459 a	0,033 c	0,025 b	6,46 e	0,752 f	0,091 e	0,054 d	0,012 b
14	4,50 f	0,037 g	0,147 d	0,015 d	0,012 b	6,36 e	0,978 d	0,219 b	0,098 c	0,014 b
15	1,90 h	0,027 g	0,066 e	0,013 d	0,009 b	2,34 h	0,060 k	0,043 f	0,016 d	0,013 b
16	1,98 h	0,039 g	0,041 e	0,009 d	0,006 b	2,66 h	0,088 k	0,025 f	0,041 d	0,016 b
17	1,85 h	0,024 g	0,053 e	0,015 d	0,010 b	2,95 h	0,064 k	0,027 f	0,022 d	0,009 b
CV (%)	7,75	0,51	22,95	2,58	9,82	6,09	4,63	22,79	40,40	2,51

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

Tabela 11 - Efeitos das condições experimentais do *spray drying*, temperatura (Tin), vazão do soprador (Vs), vazão de alimentação (Va) sobre a altura, massa verde parte aérea (MVPA), massa verde da raiz (MVR), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) de *Echinochloa crusgalli* e *Lolium multiflorum*.

Tratamentos	Respostas					Respostas				
	Altura (cm)	MVPA (g)	MVR (g)	MSPA (g)	MSR (g)	Altura (cm)	MVPA (g)	MVR (g)	MSPA (g)	MSR (g)
<i>Echinochloa crusgalli</i>						<i>Lolium multiflorum</i>				
Testemunha	14,32 a	2,558 b	1,004 c	0,281 a	0,094 c	15,30 a	0,075 a	0,100 a	0,007 b	0,042 a
1	11,95 c	0,882 n	0,086 p	0,043 e	0,006 g	13,66 a	0,243 a	0,213 a	0,034 a	0,019 b
2	11,08 d	0,587 m	0,270 l	0,055 e	0,012 g	17,38 a	0,170 a	0,096 a	0,064 a	0,010 b
3	10,53 d	0,537 o	0,286 k	0,074 e	0,053 d	15,22 a	0,151 a	0,124 a	0,038 a	0,016 b
4	13,71 a	1,552 f	0,630 e	0,156 c	0,044 e	16,58 a	0,104 a	0,113 a	0,021 b	0,007 b
5	12,87 b	1,845 d	0,443 i	0,231 b	0,036 e	14,08 a	0,108 a	0,119 a	0,008 b	0,008 b
6	11,10 d	1,072 i	0,468 h	0,110 d	0,053 d	15,52 a	0,094 a	0,092 a	0,024 b	0,010 b
7	13,38 b	1,523 f	0,572 f	0,144 c	0,046 e	13,44 a	0,073 a	0,084 a	0,010 b	0,013 b
8	12,14 c	1,371 g	0,535 g	0,141 c	0,049 d	14,50 a	0,120 a	0,096 a	0,033 a	0,011 b
9	12,85 b	0,835 k	0,156 n	0,096 d	0,008 g	15,64 a	0,097 a	0,058 a	0,005 b	0,018 b
10	13,02 b	2,429 c	1,434 a	0,215 b	0,128 a	15,46 a	0,078 a	0,078 a	0,020 b	0,015 b
11	11,55 c	2,680 a	1,278 b	0,252 a	0,111 b	13,02 a	0,083 a	0,114 a	0,009 b	0,038 a
12	11,13 d	1,694 e	0,260 l	0,186 b	0,029 f	13,16 a	0,038 a	0,119 a	0,015 b	0,047 a
13	11,26 d	1,313 h	0,800 d	0,135 c	0,087 c	12,14 a	0,031 a	0,058 a	0,010 b	0,008 b
14	13,10 b	0,663 l	0,226 m	0,055 e	0,028 f	16,16 a	0,095 a	0,098 a	0,035 a	0,015 b
15	11,40 d	0,983 j	0,331 j	0,104 d	0,044 e	11,50 b	0,035 a	0,058 a	0,015 b	0,015 b
16	10,93 d	0,954 j	0,345 j	0,101 d	0,048 e	12,10 b	0,088 a	0,066 a	0,012 b	0,021 b
17	11,55 d	0,898 j	0,315 j	0,111 d	0,035 e	12,80 b	0,103 a	0,075 a	0,016 b	0,019 b
CV	4,09	0,98	0,51	2,55	0,74	9,06	6,57	8,5	10,2	8,8

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

Nas figuras 19, 20, 21 e 22 estão representados a influência dos tratamentos no crescimento de *B. pilosa*, *A. viridis*, *E. crusgalli* e *L. multiflorum*. Conforme observado nas figuras, não houve lesão aparente em nenhuma das espécies de plantas daninhas avaliadas, porém nota-se variação de altura das plantas entre os tratamentos. Nas figuras 19, 20 e 21, para *B. pilosa*, *A. viridis* e *E. crusgalli*, nota-se que a testemunha apresentou maior desenvolvimento quando comparado aos demais tratamentos onde houve inibição, destacando o tratamento 15 que apresentou menor altura. Já na figura 22 para a espécie *L. multiflorum*, as plantas apresentaram crescimento similar entre os tratamentos.

Figura 19 - Efeito das condições experimentais do *spray drying* na ação bioherbicida em *Bidens pilosa*.



Figura 20 - Efeito das condições experimentais do *spray drying* na ação bioherbicida em *Amaranthus viridis*.



Figura 21 - Efeito das condições experimentais do *spray drying* na ação bioherbicida em *Echinochloa crusgalli*.

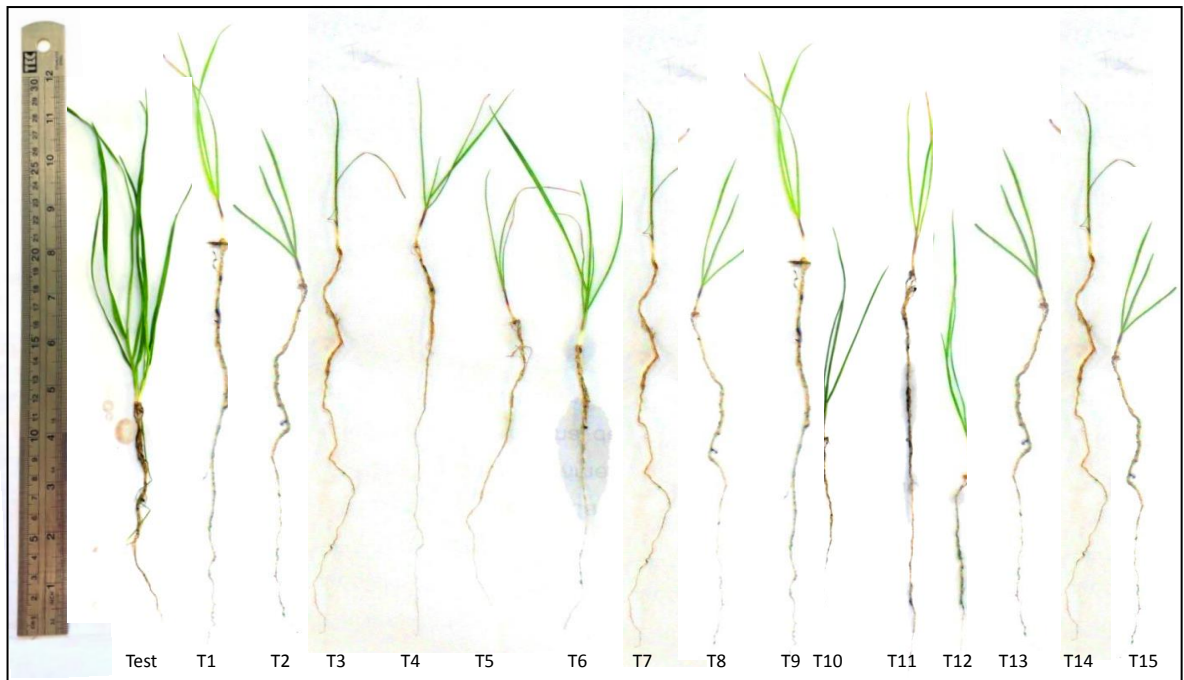
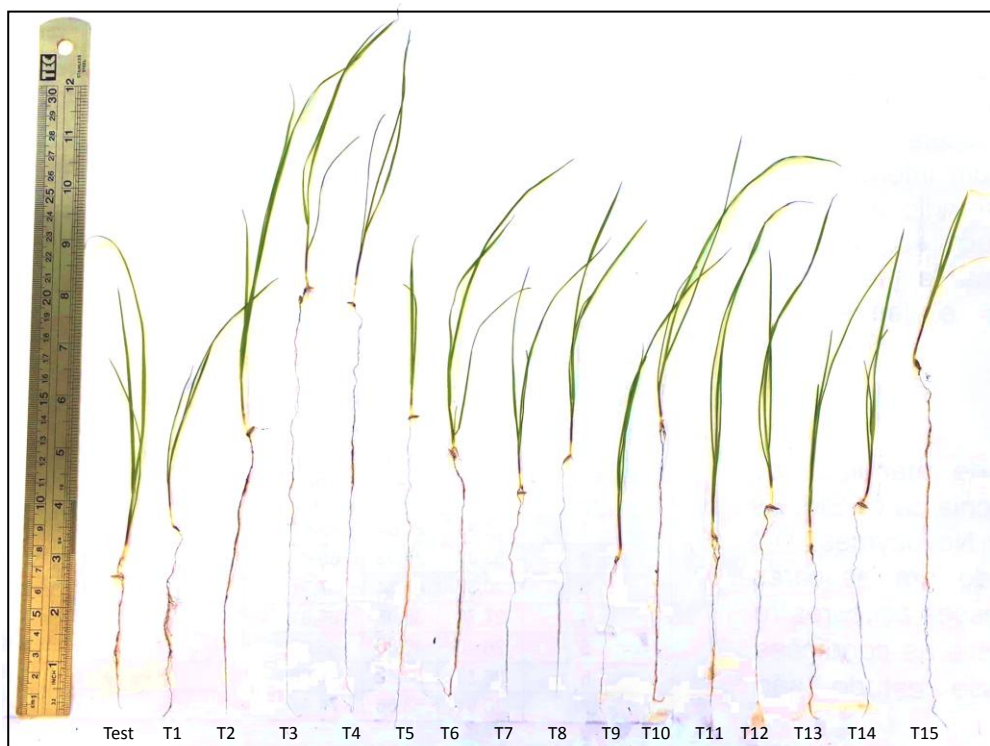


Figura 22 - Efeito das condições experimentais do *spray drying* na ação bioherbicida em *Lolium multiflorum*



6. CONCLUSÕES

A melhor técnica encontrada neste estudo para a produção de bioherbicida de *Diaporthe schini* foi FS, causando menor altura, massa verde e seca da parte aérea e da raiz de *B. pilosa*, *A. viridis*, *E. crusgalli* e *L. multiflorum* além de ocasionar fitotoxidade em *B. pilosa* e *A. viridis*. Além disso, a caracterização físico-química do caldo produzido por FS apresentou resultados desejáveis para a aplicação como bioherbicida, como redução da tensão superficial e pH, além do aumento da viscosidade e densidade, quando comparado aos demais tratamentos.

O maior efeito bioherbicida foi observado utilizando a lactose como aditivo para a secagem e as condições de temperatura do *spray drying* de 100°C, vazão do ar de secagem de 1,4 m³/min e vazão de alimentação de 0,22 L/h, causando redução da altura, massa verde e seca da parte aérea e da raiz de *B. pilosa*, *A. viridis*, *E. crusgalli*.

A secagem por *spray drying* é uma técnica promissora para a secagem de bioherbicida, mantendo ou aumentando a atividade bioherbicida sobre plantas daninhas. A FS aliada a técnica de secagem por *spray drying* foi considerada promissora para a produção de bioherbicida de *D. schini*, e pode ser estudada juntamente com novas formulações para aumentar a ação bioherbicida sobre plantas daninhas.

REFERÊNCIAS

- ADETUNJI, C.O. et al. Isolation, structural elucidation and bioherbicidal activity of an eco-friendly bioactive 2-(hydroxymethyl) phenol, from *Pseudomonas aeruginosa* (C1501) and its ecotoxicological evaluation on soil. **Environmental Technology & Innovation**, v. 13, p. 304–317, 2019.
- ADHIKARI, B. et al. A glass transition temperature approach for the prediction of the surface stickiness of a drying droplet during spray drying. **Powder Technology**, v. 149, n. 2-3, p. 168-179, 2005.
- ALAMILLA-BELTRÁN, L. *et al*, Description of morphological changes of particles along spray drying, **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1, p. 179–184, 2005.
- ALMEIDA, T. C. **Formulação de um herbicida biológico produzido através da fermentação submersa em biorreator**. 2014. 91 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.
- ALVARADO-SERRANO, D.F.; VAN ETTEN, M.L.; CHANG, S.M.; BAUCOM, R.S. The relative contribution of natural landscapes and human-mediated factors on the connectivity of a noxious invasive weed. **Heredity (Edinb)**, v. 122, p. 29–40, 2019.
- ANNETT, R.; HABIBI, H.R.; HONTELA, A. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. **Journal of Applied Toxicology**, v.34, 458-479, 2014.
- ANWAR, S.H.; KUNZ, B. The influence of drying methods on the stabilization of fish oil microcapsules: Comparison of spray granulation, spray drying, and freeze drying. **Journal of Food Engineering**, v. 105, n. 2, p. 367-378, 2011.
- ASH, G. J. The science, art and business of successful bioherbicides. **Biological Control**, v. 52 p. 230–240, 2010.
- BAE, E.K.; LEE, S.J. Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. **Journal of Microencapsulation**, v. 25, n.8, pp. 549-560, 2008.
- BAILEY, K.L.; DERBY, J. Fungal isolates and biological control compositions for the control of weeds. **US Patent Application** Serial No. 60/294475. Filed May 20, 2001.
- BAJWA, A.A.; SADIA, S.; ALI, H.H. Biology and management of two important *Conyza* weeds: a global review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 24, p. 24694–24710, 2016.
- BASTOS, B. de O. et al. Solid-state fermentation for production of a bioherbicide from *Diaporthe* sp. and its formulation to enhance the efficacy. **3 Biotech**, v. 7, p. 1–9, 2017.
- BAUDRON, F.; GILLER, K.E. Agriculture and nature: trouble and strife? **Biological Conservation**, v. 170, 232–245. 2014.

BERGIN, D. Weed Control Options for Coastal Sand Dunes: a Review. New Zealand, **Forest Research Institute LTD**, pp. 5-13, 2011.

BIANCHI, M. A. et al. Interferência de *Raphanus sativus* na produtividade de cultivares de soja. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 29, n. 4, p. 783-792, 2011.

BILITEWSKI, U. Chapter 11 Biosensors for bioprocess monitoring *Comprehensive, Analytical Chemistry*, 2005.

BONNY, S. Genetically Modified Herbicide-Tolerant Crops, Weeds, and Herbicides: Overview and Impact. **Environmental Management**, v. 57, p. 31–48, 2016.

BOYETTE, C.D.; HOAGLAND, R.E.; STETINA, K.C. Extending the host range of the bioherbicide fungus *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 29, p. 720–726, 2019.

BOTELLA, L.; DIEZ, J.J. Phylogenetic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. **Fungal Diversity**, v. 47, p. 9–18, 2011.

BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 21–32, 2013.

BRISCOE, W. E. **Identification of a Phytotoxic Fungus and an Investigation into the Isolation of its Phytotoxic Constituents**. Faculty of the University of Mississippi. Oxford, 2014.

BRUN, T. et al. Production of bioherbicide by *Phoma* sp. in a stirred-tank bioreactor. **3 Biotech**, v. 6, 2016.

BUENO, M.R.; ALVES, G.S.; CUNHA, J.P.A.R.; PAULA, A.D.M. Spray volume and adjuvant effects on weed control with glyphosate. **Planta Daninha**, v. 31, p. 705–713, 2013.

BÜRKI, K., JEON, I., ARPAGAUS, C., & BETZ, G. New insights into respirable protein powder preparation using a nano spray dryer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 408, p. 248–256, 2011.

CAMACHO, J.E. *et al.* Effect of spray dryer processing parameters on the insecticidal activity of two encapsulated formulations of baculovirus, **Biocontrol science and technology**, 2015.

CAMARGO, A.F. *et al.* Resistant weeds were controlled by the combined use of herbicides and bioherbicides. **Environmental Quality Management**, v. 29, n. 1, p. 37–42, 2019.

CARBALLIDO, J. et al. Field sprayer for inter and intra-row weed control: performance and labor savings. *Span. Journal Agricultural Research*, v. 11, 642-651, 2013.

CASTILHO, L. R.; ALVES, T. L. M.; MEDRONHO, R. A. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agro-industrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 45-50, 2000.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JUNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, [s.l.], v. 33, n. 1, p.181-188, 2010.

CHARUDATTAN, R. The mycoherbicide approach with plant pathogens, In: **Microbial Control of Weeds**, D. O. Tebeest, ed., New York, Chapman and Hall, p.24-57.1991.

CHAUVEL, B. et al. History of chemical weeding from 1944 to 2011 in France: changes and evolution of herbicide molecules. **Crop Protection**, v. 42, p. 320-326, 2012.

CHEPKIRUI, C., STADLER, M. The genus *Diaporthe*: a rich source of diverse and bioactive metabolites. **Mycol Progress**, v.16, p. 477–494, 2017.

CIMMINO, A.; MASI, M.; EVIDENTE, M.; SUPERCHI, S.; EVIDENTE, A. Fungal phytotoxins with potential herbicidal activity: Chemical and biological characterization. **Natural Product Reports**, v. 32, p. 1629–1653, 2015.

CORRÊA, J.L.G. et al. Spray drying of coffee leaf extract. **Coffee Science** - v.11, n.3, 2016.

CORTÉS-ROJAS, D.F.; SOUZA, C.R.F.; OLIVEIRA, W.P. Surfactant mediated extraction of antioxidants from *Syzygium aromaticum*. **Separation Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 207–213, 2015.

COSTA-SILVA, T.A. et al. Lipase Production by Endophytic Fungus *Cercospora kikuchii* : Stability of enzymatic activity after spray drying in the presence of carbohydrates. **Drying Technology**, v. 29, n. 9, p. 1112–1119, 2011.

CUNHA, J.P.A.R.; ALVES, G.S.; REIS, E.F. Efeito da temperatura nas características físico-químicas de soluções aquosas com aditivos de uso agrícola. **Planta Daninha**, v. 28, p. 665–672, 2010.

DESGRANGES, C. et al. Use of solid state fermentation to produce *Beauveria bassiana* for the biological control of European corn borer. **Biotechnology Advances**, v. 11, p. 577-587, 1993.

DESOBRY, S.A.; NETTO, F.M.; LABUZA, T.P. Comparison of Spray-Drying, Drum-Drying and Freeze-Drying for β -Carotene Encapsulation and Preservation. **Journal Food Science**, v. 62, p. 1158–1162, 1997.

DUARTE, N. F.; SILVA, J. B.; SOUZA, I. F. Competição de plantas daninhas com a cultura do milho no município de Ijaci, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, n.5, p. 983-992, 2002.

DUKE, S. O. et al. Natural products as leads for new herbicide modes of action. Proceedings, Brighton, **Crop Protection Conference Weeds**, v. 2, p. 579-586, 1997.

DUKE, S.O.; DAYAN, F.E. Herbicides. In **eLS, John Wiley & Sons, Ltd** , Chichester, 2018.

EVIDENTE, A. et al. Stagonolides G-I and modiolide A, nonenolides produced by *Stagonospora cirsii*, a potential mycoherbicide for *Cirsium arvense*. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1897–1901, 2008.

FAO. **Increasing food production without damaging the environment**. Disponível em: <http://www.fao.org/news/story/en/item/889671/icode/> Acessado em: 19 de julho de 2017.

FAO. **World Food and Agriculture – Statistical Pocketbook Rome**. P. 254. Licença, CC BY – NC – as 3.0 IGO, 2018.

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

FONTES, J. R. A. et al. **Manejo Integrado de Plantas Daninhas**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. (Documentos/Embrapa Cerrado) p. 48, 2003.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. “The role of water in solid state fermentation”. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 13, p. 85-101, 2003.

GIANESSI, L. P. The increasing importance of herbicides in world wide crop production. **Pest Management Science**, v. 69, p. 1099-1105, 2013.

GOMES, R. R. **Filogenia e taxonomia do gênero *Diaporthe* e a sua aplicação no controle biológico da mancha preta dos citros**. (Doutorado em Genética) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2012.

GOMES, R.R. et al. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia**, v. 31, p. 1–41, 2013.

GRIEPENTROG, H. W.; DEDOUSIS, A. P. Mechanical Weed Control, Soil Engineering. **Springer**, p. 171-179, 2010.

HARGUINDEGUY, M.; FISSORE, D. On the effects of freeze-drying processes on the nutritional properties of foodstuff: A review. **Drying Technology**, p. 1-23, 2019.

HOAGLAND, R. E. Microbes and microbial products as herbicides — an overview. **ACS Symposium**, Series 439, 1990, p. 2–52.

HOAGLAND, R. E. Chemical interactions with bioherbicides to improve efficacy. **Weed Technology**, v. 10, p. 651– 674, 1996.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation – Are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 301–306, 2005.

HOPPIN, J. A. Pesticides and respiratory health: where do we go from here? **Occupational and Environmental Medicine**, v. 71, p. 80, 2014.

HOYOS-LEYVA, J. D. et al. Characterization of Spray Drying Microencapsulation of Almond Oil into Taro Starch Spherical Aggregates. **LWT - Food Science Technology**. v. 101, p. 526–533, 2019.

- JABRAN, K. et al. Allelopathy for weed control in agricultural systems. **Crop Protection**, jun. v. 72, p. 57-65, 2015.
- JAFARI, S.M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y.; BHANDARI, B. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. **Drying Technology**, v. 26, n. 7, p. 816-835, 2008.
- JAVAID, A., ALI, S. Alternative management of a problematic weed of wheat *Avena fatua* L. by metabolites of *Trichoderma*. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v.71, n. 2, p. 205-211, 2011.
- JAVAID, A.; ALI, S.; AKBAR, M. Herbicidal potential of *Drechslera* spp. Culture filtrates against *Parthenium hysterophorus* L. **Chilean journal of agricultural research**, Chillán, Chile, v. 71, n. 4, Nota científica, 2011.
- JESUS, S.S.; MACIEL FILHO, R.. Drying of α -amylase by spray drying and freeze-drying - a comparative study. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 31(3), 625–631, 2013.
- KAMOUN, A.S. et al. Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. **Microbiol. Res**, 163: 299-306, 2008.
- KHALIQ, A.; MATLOOB, A.; KHAN, M.B.; TANVEER, A. Differential suppression of rice weeds by allelopathic plant aqueous extracts. **Planta Daninha**, v. 31, p. 21–28, 2013.
- KLAIC, R. et al. Optimization of solid-state fermentation for bioherbicide production by *Phoma* sp. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, p. 377–384, 2017.
- KRISHNA, C. Solid-State Fermentation Systems - An Overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, p. 1-30, 2005.
- LEI, M. et al. Facile microencapsulation of olive oil in porous starch granules: Fabrication, characterization, and oxidative stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 755-761, 2018.
- MAHADIK, N. D. et al. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 715–721, 2002.
- MASCARIN G.M., ALVES S.B., LOPES R.B. Culture media selection for mass production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*. **Brazilian Archives of Biology Technology**, v. 53, p. 753–761, 2010. doi:10.1590/ S1516-89132010000400002.
- MCFADYEN, R.E.C. Biological control of weeds. **Annu Rev Entomol**, 43:369–393, 1998.
- MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Overview of solid state bioprocessing. **Biotechnology Annual Review**, v. 8, p. 183-225, 2002.
- MIZUMOTO, S.; HIRAI, M.; SHODA, M. Production of lipopeptide antibiotic iturin A using soybean curd residue cultivated with *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 869–875, 2006.

MOHAMMED, N.K. et al. Process conditions of spray drying microencapsulation of *Nigella sativa* oil. **Powder Technology**, v. 315, p. 1-14, 2017.

MOLAVERDI, M. et al. Enhanced sweet sorghum stalk to ethanol by fungus *Mucor indicus* using solid state fermentation followed by simultaneous saccharification and fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 580–585, 2013.

MUNOZ-IBANEZ, M. et al. The microstructure and component distribution in spray-dried emulsion particles. **Food Structure**, v. 8, p. 16-24, 2016.

MURALI, T.S.; SURYANARAYANAN, T.S.; GEETA R. Endophytic *Phomopsis* species: host range and implications for diversity estimates. **Can J Microbiol**, v. 52, p. 673–680, 2006.

NAMALDI, A.; ÇALIK, P.; ULUDAG, Y. Effects of spray drying temperature and additives on the stability of serine protease powders. **Drying Technology**, v. 24, p. 1495 – 1500, 2006.

OERKE, E. C. Crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science**, v. 144, n.01, p. 31-43, 2006.

OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Production of a lipopeptide antibiotic, surfactin, by recombinant *Bacillus subtilis* in solid state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 47, p. 209-214, 1995.

OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Production of the antifungal peptide antibiotic, iturin by *Bacillus subtilis* NB22 in solid state fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, p. 23-27, 1993.

OJEDA, K.; KAFAROV, V. Exergy analysis of enzymatic hidrolysis reactor for tranformation of lignocellulosic biomass to bioethanol. **Chemical Engineering Journal**, v. 154, p. 390-395, 2009.

OOIJKAAS, L. et al. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. **Trends in Biotechnology**, v. 18, p. 356-360, 2000.

O'RIORDAN, K.O.; ANDREWS, D; BUCKLE, K. Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. **Journal of applied microbiology**, v. 91, p. 1059–66, 2002.

PANDEY, A. Recent process developments in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 27, n. 2, p. 109-117, 1992.

PANDEY, A. Solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81–84, 2003.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D.A. New developments in solid-state fermentation. I. Bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153-1169, 2000.

- PAPAGIANNI, M; MOO-YOUNG, M. Protease secretion in glucoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1271–1278, 2002.
- PES, M.P. et al. Bioherbicide based on *Diaporthe* sp. secondary metabolites in the control of three tough weeds. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, p. 4242–4249, 2016.
- 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.
- POPP, J.; PETŐ, K. NAGY, J. Pesticide productivity and food security. A review **Journal of Agronomy for Sustainable Development**, v. 33, p. 243 – 255, 2013.
- POWLES, S. B. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. **Pest Management Science**, v. 64, 360-365, 2008.
- PRADA, H. et al. Caracterización morfológica y molecular del antagonismo entre el endófito *Diaporthe* sp. aislado de frailejón (*Espeletia* sp.) y el fitopatógeno *Phytophthora infestans*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, p. 198-201, 2009.
- QUIROZ, R. D. L. C. et al. Challenges and opportunities of the bio-pesticides production by solid-state fermentation: filamentous fungi as a model. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 35, p. 1-8, 2015.
- RAHARDJO, Y. S. P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 161–179, 2006.
- RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, 1998.
- REZVANKHAH, A.; EMAM-DJOMEH, Z.; ASKARI, A G. Encapsulation and delivery of bioactive compounds using spray and freeze-drying techniques: A review. **Journal Drying Technology**, v. 38, p. 235-238, 2020.
- RUEDA-AYALA, V. et al. The influence of post-emergence weed harrowing on selectivity, crop recovery and crop yield indifferent growth stages of winter wheat. **Weed Research**, v. 51, p. 478-488, 2011.
- SANDHYA, C. et al. Microbial synthesis of chitinase in solid cultures and its potential as a biocontrol agent against phytopathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 127, p. 1-15, 2005.
- SANTOS, J. M. **Resolução do complexo de espécies de *Phomopsis* e dos seus teleomorfos *Diaporthe* no hospedeiro *Foeniculum vulgare***. 2008. 42 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Genética). Universidade de Lisboa, 2008.

- SANTOS, P. J. C. et al. *Diaporthe endophytica* and *D. terebinthifolii* from medicinal plants for biological control of *Phyllosticta citricarpa*. **Microbiological Research**, v. 186–187, p. 153–160, 2016.
- SARABANDI, K. MAHDIJAFARI, S. Effect of chitosan coating on the properties of nanoliposomes loaded with flaxseed-peptide fractions: Stability during spray-drying. **Food Chemistry**, v. 310, 2020.
- SARABANDI, K.; JAFARI, S.M.; MAHOONAK, A.S.; MOHAMMADI A. Application of gum Arabic and maltodextrin for encapsulation of eggplant peel extract as a natural antioxidant and color source. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 140, p. 59-68, 2019.
- SCHMIDELL, W. et al. Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: E. Blücher, v. 2, 254 p. 2001.
- SCHWARZLÄNDER, M.; HINZ, H.L.; WINSTON, R.L, DAY, M.D. Biological control of weeds: an analysis of introductions, rates of establishment and estimates of success, worldwide. **BioControl**. 63:319–331, 2018.
- SHARIF, H.R. et al. Influence of OSA-starch on the physico chemical characteristics of flax seed oil-eugenol nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 66, p. 365-377, 2017.
- SILVA, A. A.; SILVA, J. F. (Eds. 3). **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, p.7, 2007.
- SINGHANIA, R.R. et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme Microbial Technology**, v. 46, p. 541-549, 2010.
- SINHA, S.; SINHA, S. Studies on the production of acid protease by submerged fermentation. **International Journal of Food Engineering**, v. 5, 2009.
- SIROHI, R., SINGH, A., TARAFDAR, A. et al. Produção de celulase a partir de cascos de ervilha pré-tratados com *Trichoderma reesei* sob fermentação submersa. **Biomassa residual**, v. 10, p. 2651–2659, 2019. doi: 10.1007 / s12649-018-0271-4.
- SMITH, A. N. et al. Rolled Rye Mulch for Weed Suppression in Organic No-Tillage Soybeans. **Weed Science**, v.59, 2011.
- SOUZA, A.R.C. de, et al. Selection, isolation, and identification of fungi for bioherbicide production. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 48, p. 101–108, 2017.
- SOUZA, A.R.C. et al. Bioherbicide production by *Diaporthe* sp. isolated from the Brazilian Pampa biome. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 575–578, 2015.
- SPECIAN, V. et al. Chemical characterization of bioactive compounds from the endophytic fungus *Diaporthe helianthi* isolated from *Luehea divaricata*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 1174-1182, 2012.

STARK, B.; PABST, G.; PRASS, R. Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: Effects of cryoprotectants on structure. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, p. 546-555, 2010.

STARLING, A. P. et al. Pesticide use and incident diabetes among wives of farmers in the agricultural health study. **Occupational and Environmental Medicine**. v. 71, p. 629-635 oemed-2013-101659, 2014.

SUN, X.; CAMERON, R.G.; BAI, J. Microencapsulation and antimicrobial activity of carvacrol in a pectin-alginate matrix. **Food Hydrocolloids**, v. 92, p. 69-73, 2019.

TAYLOR, P. The wetting of leaf surfaces. **Current Opinion Colloid & Interface Science**, v. 16, p. 326–334, 2011.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146-161, 2013.

TODERO, I. et al. Formulation of a bioherbicide with metabolites from *Phoma* sp. **Science Horticulturae** (Amsterdam), v. 241, p. 285–292. 2018a.

TODERO, I. et al. Concentration of metabolites from *Phoma* sp. using microfiltration membrane for increasing bioherbicidal activity. **Environmental Technology**, (United Kingdom) v. 40, p. 2364–2372, 2018b.

TODERO, I. et al. Concentration of exopolysaccharides produced by *Fusarium fujikuroi* and application of bioproduct as an effective bioherbicide, **Environmental Technology**. 2019. DOI: 10.1080/09593330.2019.1580775.

TRIOLET, M.; GUILLEMIN, J.-P.; ANDRE, O.; STEINBERG, C. Fungal-based bioherbicides for weed control: a myth or a reality? **Weed Research**, 2019.

VAREJÃO, E.V. V.; DEMUNER, A.J.; BARBOSA, L.C.A.; BARRETO, R.W. The search for new natural herbicides - Strategic approaches for discovering fungal phytotoxins. **Crop Protection**, v. 48, p. 41–50, 2013.

WANG, L. et al. Enhanced stability of liposomes against solidification stress during freeze-drying and spray-drying by coating with calcium alginate. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 30, p. 163-170, 2015.

WINSTON, R.L. et al. Biological control of weeds: a world catalogue of agents and their target weeds, 5th edn. USDA Forest Service, **Forest Health Technology Enterprise Team**, FHTET-2014-04, Morgantown, 2014.

WÜRTH, R.; FOERST, P.; KULOZIK, U. J. Effects of skim milk concentrate dry matter and spray drying air temperature on formation of capsules with varying particle size and the survival microbial cultures in a microcapsule matrix. **Drying Technology**, v. 36, p. 93–99, 2018. DOI:10.1080/07373937.2017.1301952.

YANG, J. et al. Isolation, Identification, and Herbicidal Activity of Metabolites Produced by *Pseudomonas aeruginosa* CB-4. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 13: 1719-1726. 2014.

ZACHARIADES, C.; PATERSON, I.D.; STRATHIE, L.W.; HILL, M.P.; VAN WILGEN, B.W. Assessing the status of biological control as a management tool for suppression of invasive alien plants in South Africa. **Bothalia**, v. 47, p. 21-42, 2017.

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

ZHANG, J.; LIN, ZHANG, L.; LIU, Y.; CHAO, MA, J.; LI, C.; DONG, J.; GAO, WANG, L.; HAN. The Herbicidal Activity of Mutant Isolates from *Botrytis cinerea*. **Agricultural Sciences in China**, v. 5, p. 622–628, 2006.