

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUÇÃO EM ENGENHARIA DE
PROCESSOS**

**FORMULAÇÃO DE UM HERBICIDA BIOLÓGICO
PRODUZIDO ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO
SUBMERSA EM BIORREATOR.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Thiago Castro De Almeida

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

FORMULAÇÃO DE UM HERBICIDA BIOLÓGICO PRODUZIDO ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM BIORREATOR.

Thiago Castro De Almeida

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia de Processos**

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Hoffmann
Coorientador: Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti

Santa Maria, RS, Brasil
2014

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

**FORMULAÇÃO DE UM HERBICIDA BIOLÓGICO PRODUZIDO
ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM BIORREATOR.**

elaborada por
Thiago Castro De Almeida

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia de Processos

COMISSÃO EXAMINADORA:

Ronaldo Hoffmann, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Marcio Antônio Mazutti, Dr. (UFSM)
(Coorientador)

João Paulo Bender, Dr. (UFFS)

Marcos Antônio Villetti, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 12 de dezembro de 2014

Agradecimentos

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

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

Agradeço em especial aos professores Ronaldo Hoffmann e Marcio Antônio Mazutti pela orientação, conselhos ao longo do mestrado e amizade.

Agradeço a todos os colegas e amigos pelo apoio e incentivo ao longo desses últimos dois anos. Aos grandes amigos do LABCEN, em especial ao “mestre” Stefen Barbosa Pujol, por todo ensinamento.

Agradeço a todos os colegas e amigos do PPGepro Flavio Mayer, Rodrigo Klaic, Nicolas, Paulo, Michel, Daniel, André, Jair, Juliana Ferreira, Juliana, Camila, Chayene, entre outros. Aos meus bolsistas e amigos Gustavo e Gabriel pela grande ajuda.

Agradeço a todos os amigos da Biomonte.

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

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

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Ministério da Educação) pela bolsa de incentivo à pesquisa disponibilizada e, a SCIT- RS (Secretaria de Ciência e Inovação Tecnológica - Rio Grande do Sul) e Fapergs (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) pelo apoio financeiro deste trabalho.

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

*"Na vida, não vale tanto o
que temos, nem tanto importa o que somos.
Vale o que realizamos com aquilo que
possuímos e, acima de tudo,
importa o que fazemos de nós!"*

Chico Xavier

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos
Universidade Federal de Santa Maria

FORMULAÇÃO DE UM HERBICIDA BIOLÓGICO PRODUZIDO ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM BIORREATOR.

AUTOR: THIAGO CASTRO DE ALMEIDA

ORIENTADOR: RONALDO HOFFMANN

COORIENTADOR: MARCIO ANTONIO MAZUTTI

Data e Local de Defesa: Santa Maria, 12 de dezembro de 2014.

As plantas daninhas podem acarretar grandes prejuízos na produção agrícola e o principal método de controle é o uso de herbicidas químicos. Os herbicidas químicos são eficientes e de grande praticidade, porém trazem consequências diretas e indiretas que causam diversos impactos sobre o meio ambiente. Uma alternativa importante para diminuir o uso abusivo de herbicidas químicos seria a utilização do controle biológico, entre eles, o uso das fitotoxinas como herbicidas biológicos. Uma barreira significativa na produção dos produtos biológicos, como as fitotoxinas, é o desenvolvimento de um processo economicamente viável, logo, os objetivos deste trabalho foram produzir um herbicida biológico da fitotoxina do fungo *Phoma* sp. por fermentação submersa através de um biorreator, otimizar as formulações da fitotoxina em conjunto de adjuvantes com ajuda de diferentes misturadores e avaliar a atividade herbicida das formulações de fitotoxina no controle de plantas bioindicadoras. Na fermentação submersa foi utilizado um biorreator, com um tempo de fermentação de 5 dias, rotação de 50 rpm, 15% de oxigênio dissolvido, pH de 6,0 e malha de aeração variando de 1,0 até 7,0 L/min. O ultrassom apresentou os melhores resultados, num geral, para as propriedades físico químicas estudadas, onde por exemplo manteve a estabilidade das formulações com as diferentes concentrações de fitotoxina em conjunto do Silwet L-77 e Aporte Plus. A avaliação de o possível poder herbicida foi dividida em *Screening* primário e *Screening* secundário, com as 17 formulações do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) formuladas por ultrassom e agitador turrax. O *Screening* primário foi realizado através de testes de germinações com sementes de pepino (*Cucumis sativus*) e sorgo (*Sorghum bicolor*). Os resultados obtidos para o controle de germinação nas sementes de pepino variaram de 57,0% até 100%, já no sorgo de 45,1% até 100%. Os ensaios que apresentaram controle de germinação de 100% para pepino e sorgo, foram os ensaios 10, 12, 14 e os pontos centrais. O *Screening* secundário foi com a aplicação das formulações sobre quatro espécies bioindicadoras já emergidas a mais de 15 dias, onde as dicotiledôneas foram à alface (*Lactuca sativa* L) e pepino (*Cucumis sativus*), e as monocotiledôneas a cebola (*Allium cepa* L. - Alliaceae) e sorgo (*Sorghum bicolor*), determinaram o possível poder herbicida em pós emergência. Os resultados dos 17 ensaios DCCR foram semelhantes ao experimento em pré-emergência, apresentando os ensaios 10, 12, 14 e os pontos centrais os melhores efeitos herbicidas, controle de 100%.

Palavras-chaves: Herbicidas biológicos, fitotoxina, biorreator, adjuvantes.

ABSTRACT

Thesis for the degree of Master of Science
Graduate Program in Process Engineering
Federal University of Santa Maria

AUTHOR: THIAGO CASTRO DE ALMEIDA

ADVISOR: RONALDO HOFFMANN

COADVIOSOR: MARCIO ANTONIO MAZUTTI

Date and Local of defense: Santa Maria, December, 12, of 2014.

The weeds can result in large losses in agricultural production and the main method of control is the use of chemical herbicides. Chemical herbicides are effective and great practicality, however bring direct and indirect consequences that cause different impacts on the environment. An important alternative to reduce the excessive use of chemical herbicides would be the use of biological control, including the use of phytotoxins as organic herbicides. A significant barrier in the production of organic products is the development of an economically viable process. The objectives of this study were to have a biological herbicide from the fungus *Phoma sp.* phytotoxin through a submerged fermentation, to optimize the formulations of the phytotoxin adjuvants together with the aid of various mixers and evaluate the herbicidal activity of the phytotoxin formulations on the control bioindicators. In submerged fermentation was used a bioreactor. The fermentation time was 5 days, other parameters used were rotation of 50 rpm, 15% dissolved oxygen, of 6.0 pH and aeration ranging from 1.0 to 7.0 L / min. Ultrasound showed the best results, in general, for the physicochemical properties studied, for example the formulations has remained stable with different concentrations together phytotoxin of Silwet L-77 and Aporte Plus. The evaluation of the possible action herbicide was divided in primary *screening* and secondary *screening*, with 17 formulations of the Central Composed Delineation Rotacional (CCRD) made by ultrasound and turrax stirrer. At primary *screening* was performed by germination tests on seeds of cucumber (*Cucumis sativus*) and sorghum (*Sorghum bicolor*). The germination results obtained for control on cucumber seeds ranged from 57.0% to 100%, as in the 45.1% to 100% sorghum. Tests showed that 100% germination control for cucumber and sorghum, were the tests 10, 12, 14 and the central points. Secondary *Screening* was with the application of the formulations on four bio-indicator species have emerged more than 15 days, where dicotyledon were the lettuce (*Lactuca sativa* L) and cucumber (*Cucumis sativus*.), And Monocotyledon (*Allium cepa* L. - Alliaceae) and sorghum (*Sorghum bicolor*), determined the possible action herbicide in post-emergence. The results of 17 tests CCRD were similar to the experiment in pre-emergence tests having 10, 12, 14 and the midpoints of the top herbicidal effects, control of 100%.

Keywords: Biological herbicides, Phytotoxin, bioreactor, adjuvants.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Delineamento composto central rotacional (DCCR) para três variáveis independentes.

Tabela 2: Matriz do desenho DCCR para avaliar a influência no pH para os misturadores mecânico e ultrassom, nas diferentes concentrações de Fitotoxina, Aporte Plus e Silwet L-77.

Tabela 3: Matriz do desenho DCCR para avaliar a influência na estabilidade aos 30 minutos, 1 hora e 6 horas para os misturadores mecânico e ultrassom, nas diferentes concentrações de Fitotoxina, Aporte Plus e Silwet L-77.

Tabela 4: Matriz do desenho DCCR para avaliar a influência na estabilidade as 12 horas e 24 horas para os misturadores mecânico e ultrassom, nas diferentes concentrações de Fitotoxina, Aporte Plus e Silwet L-77.

Tabela 5: Matriz do desenho DCCR para avaliar a influência na formação de espuma para os misturadores mecânico e ultrassom, nas diferentes concentrações de Fitotoxina, Aporte Plus e Silwet L-77.

Tabela 6: Matriz do desenho DCCR para avaliar a influência na viscosidade para os misturadores mecânico e ultrassom, nas diferentes concentrações de Fitotoxina, Aporte Plus e Silwet L-77.

Tabela 7: Matriz do desenho DCCR para avaliar a influência na densidade a 25°C para os misturadores mecânico e ultrassom, nas diferentes concentrações de Fitotoxina, Aporte Plus e Silwet L-77.

Tabela 8: Matriz do desenho DCCR para avaliar a influência na tensão superficial para os misturadores mecânico e ultrassom, nas diferentes concentrações de Fitotoxina, Aporte Plus e Silwet L-77.

Tabela 9: Matriz do desenho DCCR para avaliar a influência no controle de germinação nas sementes de pepino e sorgo para os misturadores mecânico e ultrassom, nas diferentes concentrações de Fitotoxina, Aporte Plus e Silwet L-77.

Tabela 10: Matriz do DCCR com os resultados em termos de controle percentual obtidos nos ensaios de aplicação pós-emergência aos 5 DAA para cada planta bioindicadora.

LISTA DE FIGURAS

- Fig (1). Fluxograma para o preparo do inóculo.
- Fig (2). Biorreator Tecnal.
- Fig.(3). Visão geral do biorreator e outros equipamentos.
- Fig.(4). Agitador mecânico Turrax e agitador ultrassom, respectivamente.
- Fig.(5). No lado esquerdo temos um exemplo de (-) estabilidade e do lado direito (+) estabilidade, respectivamente.
- Fig.(6). Densímetro DMA 4500 M.
- Fig.(7). Banho termostático e viscosímetro Brookfield.
- Fig.(8). Tensiômetro de bancada com anel de platina (Kruss, K6).
- Fig.(9). Gráfico de Pareto mostrando os efeitos de termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes sobre a DCCR para o pH nas formulações.
- Fig.(10). Gráfico de Pareto mostrando os efeitos de termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes sobre a DCCR para a formação de espuma nas formulações utilizando misturador mecânico.
- Fig.(11). Gráfico de Pareto mostrando os efeitos de termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes sobre a DCCR para a viscosidade nas formulações.
- Fig.(12). Gráfico de Pareto mostrando os efeitos de termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes sobre a DCCR para o controle de germinação nas sementes de pepino.
- Fig.(13). Gráfico de Pareto mostrando os efeitos de termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes sobre a DCCR para o controle de germinação nas sementes de sorgo.
- Fig.(14). Gráficos de contorno que expressam o efeito inibitório na germinação das sementes de pepinos nas 17 diferentes formulações do DCCR.
- Fig.(15). Gráficos de contorno que expressam o efeito inibitório na germinação nas sementes de pepino das 17 diferentes formulações do DCCR.
- Fig.(16). Gráficos de contorno que expressam o efeito inibitório na germinação nas sementes de pepino das 17 diferentes formulações do DCCR.
- Fig.(17). Gráficos de contorno que expressam o efeito inibitório na germinação nas sementes de sorgo das 17 diferentes formulações do DCCR.

Fig.(18). Gráficos de contorno que expressam o efeito inibitório na germinação nas sementes de sorgo das 17 diferentes formulações do DCCR.

Fig.(19). Gráficos de contorno que expressam o efeito inibitório na germinação nas sementes de sorgo das 17 diferentes formulações do DCCR.

Fig.(20). Gráfico de Pareto mostrando os efeitos de termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes sobre a DCCR para o controle da alface.

Fig.(21). Gráfico de Pareto mostrando os efeitos de termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes sobre a DCCR para o controle de germinação nas sementes de cebola.

Fig.(22). Exemplares das quatro espécies (Alface, Pepino, Sorgo e cebolinha; respectivamente), onde na direita estão as notas de 0% de controle e da esquerda 100% de controle.

Fig.(23). Ensaio 14 comparado com a testemunha, ensaio Silwet L-77 2%v/v + Aporte Plus 2% v/v comparado com a testemunha e visão geral das bandejas com os 17 ensaios; respectivamente.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Objetivo	17
1.1.1. Objetivo geral	17
1.1.2. Objetivos específicos.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS	18
2.2. CONTROLE BIOLÓGICO DE PLANTAS DANINHAS	20
2.2.1. Controle biológico fitopatogênico	21
2.2.2. Metabolitos secundários (Fitotoxinas):	25
2.2.3. Extração vegetal (aleloquímicos)	29
2.3. FERMENTAÇÃO SUBMERSA	32
2.4. BIORREATORES	34
2.4.1. Biorreatores de reações submersa	35
2.4.2. Biorreatores de tanque agitado	36
2.4.3. Biorreatores pneumáticos.....	37
2.5. PROPRIEDADES FÍSICO QUÍMICAS	39
2.6. ADJUVANTES	43
3. MATERIAL E MÉTODO	49
3.1. Manutenção e conservação da cepa:	49
3.2. Fermentação Submersa:	49
3.2.1. Pré-inoculo	49
3.2.2. Preparo do Inóculo.....	49
3.2.3. Substrato:.....	50
3.2.4. Biorreator:	50
3.2.5. Condições de cultivo:	51
3.3. Misturadores/Agitadores	52
3.4. pH	53
3.5. Estabilidade e Volume de espuma	53
3.6. Densidade	53
3.7. Viscosidade	54
3.8. Tensão Superficial	55
3.9. Bioensaio	55
3.9.1. <i>Screening</i> Primário - Atividade herbicida em pré-emergência.....	55

3.9.2.	<i>Screening</i> secundário – Atividade herbicida em pós-emergência	56
3.10.	Análise estatística	57
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	58
4.1.	pH	58
4.2.	Estabilidade e volume de espuma	59
4.3.	Viscosidade.....	63
4.4.	Densidade.....	65
4.5.	Tensão superficial.....	66
4.6.	<i>Screening</i> Primário - Atividade herbicida em pré-emergência.....	68
4.7.	<i>Screening</i> secundário – Atividade herbicida em pós-emergência	76
5.	CONCLUSÃO	81
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

1. INTRODUÇÃO

As plantas daninhas são definidas por Ashton & Mônaco (1991) como plantas que nascem onde não são desejadas. Neste sentido, as plantas daninhas competem por água, luz e nutrientes nas áreas agrícolas, determinando perdas severas de produtividade, e por consequência, grandes perdas econômicas. A principal estratégia de manejo das plantas daninhas na agricultura moderna é através da aplicação de herbicidas orgânicos sintéticos, que constituem uma ferramenta valiosa para o controle de plantas daninhas, porém a utilização intensiva e/ou incorreta de herbicidas pode representar implicações negativas ao ambiente, à saúde humana e animal.

Dentre as alternativas para a redução do uso de herbicidas está o controle biológico de ervas daninhas (Bettioli, 2008). O controle biológico de plantas daninhas é uma técnica que utiliza organismos vivos para controlar ou reduzir populações de espécies de plantas indesejáveis (Van Den Bosh et al., 1987). A estratégia do biocontrole de plantas daninhas denominada bioherbicida, envolve o aumento da efetividade do organismo candidato, por meio de aplicações inundativas de esporos ou outros propágulos com a finalidade de gerar um alto nível de doença, com consequente morte ou supressão de populações da planta daninha em questão (Charudattan, 1991). O interesse na utilização do biocontrole teve seu início na década de 60, com aumentando significativo nos últimos anos, decorrente principalmente do apelo mundial por alimentos mais saudáveis. (Nachtigal, 2000).

A maioria dos projetos de pesquisas para o controle biológico de plantas daninhas é desenvolvido com fungos, por apresentarem certas características que favorecem sua utilização, dentre elas: serem mais efetivos no controle de infestações de plantas daninhas em vários agrossistemas terrestres, maior abundância na natureza e facilidade na identificação, e pela facilidade no cultivo em meios artificiais para produção massal (Li et al., 2003).

Outro modo de controle biológico é a utilização dos metabólitos secundários dos fungos, bactérias e actinomicetos, chamado de fitotoxinas. Porém, os fungos são mais estudados, pois diversos fungos fitopatogênicos detêm a habilidade específica de produzirem substâncias tóxicas. Diversas fitotoxinas podem apresentar um potencial

herbicida, sendo capaz de penetrar nas folhas de plantas, desintegrar sua estrutura celular e induzir a produção de lesões necróticas ou halo clorótico, com a vantagem de não serem tóxicas aos mamíferos e serem facilmente degradadas no ambiente. A especificidade da toxina para a planta daninha hospedeira é variável, indo de uma única espécie a um conjunto de espécies, sendo que quanto menor a especificidade pela planta hospedeira mais promissora é a toxina para uso como herbicida natural (Charudattan, 1991).

Os bioherbicidas ou as fitotoxinas dos fungos seguem em estudo para alcançar um desempenho satisfatório não apenas em escala laboratorial, mas a campo também, pois muitos estudos apresentam excelentes resultados quando testados em pequena escala, e ao serem testados em grande escala não consegue um desempenho satisfatório. Dentre as razões estão o efeito negativo do micro ambiente a que o organismo passa a ser exposto e a dificuldade de otimizar a produção em grande escala em biorreatores (Ghosheh, 2005; Baque et al., 2012).

O uso de biorreatores para fermentações de fungos para a utilização das fitotoxinas, ainda está em sua maioria em escala de bancada. Buscando a otimização de parâmetros importantes como a temperatura, o pH, a mistura, as concentrações de biomassa e os nutrientes em bancada, a partir da agitação da cultura em frascos. Após esta etapa é importante o estudo em biorreatores para o aumento da escala de produção. Os biorreatores de tanque agitado, colunas de bolhas e biorreatores air-lift (tipo de biorreatores pneumáticos) são comumente aplicados para a fermentação microbiana e culturas de células de mamíferos (Warnock & Al-Rubeai, 2006).

A utilização de adjuvantes apropriados em conjunto da calda de aplicação ou nas formulações é um meio para atenuar os efeitos adversos do ambiente sobre o fungo (Te best, 1992). Na agricultura o uso de adjuvantes teve início no século 19, quando alguns materiais, tais como, breu, resinas, farinha, melão, açúcar e leite em pó, eram adicionados com o objetivo de prolongar a proteção oferecida, principalmente por inseticidas e fungicidas (Azevedo, 2011). A formulação de herbicidas contém o ingrediente ativo e outros componentes químicos, incluindo os adjuvantes que são adicionados para aumentar a eficiência e ação na aplicação de fertilizantes e agrotóxicos para o controle de pragas, doenças e plantas daninhas (Butler et al., 1997).

Dentre os adjuvantes que vêm sendo pesquisados para formulações de bioherbicidas destacam-se os surfactantes; os óleos vegetais e os sais nitrogenados (Womak & Burge, 1993; Borges Neto et al., 1998). A adição de adjuvantes às caldas de pulverização desperta interesse e também gera dúvidas e controvérsias, pela falta de conhecimento de sua interação com alguns ingredientes ativos. Sendo importante a pesquisa das diferentes interações. (Araújo; Raetano, 2011).

Segundo Stock e Briggs (2000), as propriedades físicas e químicas das formulações determinam suas funções, impactos sobre as atividades biológicas e, são dependentes da proporção relativa de cada componente na mistura, incluindo a água. Dentre as principais propriedades físicas e químicas que podem alterar a eficiência de uma calda de aplicação estão a viscosidade, o pH e a tensão superficial. As propriedades físico-químicas e a atividade dos herbicidas podem ser alteradas com a redução do pH da calda, onde maior parte das caldas são estáveis em pH 5,5 a 7,0 (levemente ácido para neutro) (McCormick, 1990). Principais propriedades físico químicas relacionadas aos produtos fitossanitários que são sensíveis as alterações provocadas pelos adjuvantes, estão a tensão superficial, a viscosidade, a densidade, a condutividade elétrica e o pH.

Existem diversos trabalhos sobre controle biológico de plantas daninhas que apresentam grande eficiência quando produzidos e otimizados em escala laboratorial, porém a utilização desses produtos no campo ainda são desafios importantes a serem enfrentados por pesquisadores e empresas. Neste sentido, os estudos para otimizar a produção desses possíveis herbicidas biológicos através de biorreatores, se torna indispensável. As formulações devem ser melhoradas para aumentar a estabilidade e eficiência destes produtos, podendo ser usado a adição de adjuvantes.

1.1. Objetivo

1.1.1. Objetivo geral

Estudar a produção de uma fitotoxina do fungo *Phoma* sp por processo fermentativo a partir de um biorreator.

1.1.2. Objetivos específicos

- i) Estudar a produção da fitotoxina por fermentação submersa;
- ii) Estudar a formulação da fitotoxina em conjunto de adjuvantes;
- iii) Estudar características físico químicas das formulações;
- iv) Otimizar as formulações para o possível poder herbicida;
- v) Avaliar a atividade herbicida das formulações no controle de plantas bioindicadoras.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS

Com o crescimento da população mundial, o aumento na produção agrícola tornou-se de suma importância. Para alcançarmos este propósito, torna-se cada vez mais buscar técnicas e manejos adequados que ajudem no aumento da produtividade agrícola. Entre estes manejos adequados temos o controle de pragas e doenças, a fertilidade, as novas tecnologias, o controle das plantas daninhas e outros. As plantas daninhas apresentam como um de seus conceitos, o de ser *“toda e qualquer planta que ocorre onde não é desejada, acarretando muitas vezes em prejuízo econômico”* (Shaw, 1956; Klingman, 1961; Salisbury, 1961; Buchholtz, 1967). Blanco (1972) descreveu como sendo qualquer planta que germine espontaneamente e que interfira negativamente nas atividades dos agricultores. Todos os conceitos baseiam-se na indesejabilidade em relação ao interesse humano.

Desta forma, algumas plantas cultivadas podem ser consideradas plantas daninhas se estiverem crescendo, espontaneamente, em meio à outra cultura de interesse, sendo denominada de planta daninha comum, ou ainda planta voluntária ou planta guaxa. 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.

De maneira geral, plantas daninhas causam impacto negativo em algumas atividades humanas, seja ela agrícola, florestal, pecuária, ornamental, náutica, produção de energia etc. A presença de plantas daninhas em áreas cultivadas resulta em redução da produtividade devido à interferência causada pelas plantas daninhas. As perdas variam conforme a espécie e podem, inclusive, inviabilizar a colheita (Fontes et al., 2003). O grau de interferência das plantas daninhas nas culturas depende da comunidade vegetal infestante (espécie, densidade e distribuição), da cultura (cultivar, espaçamento e densidade), do ambiente (solo, clima e manejo) e do período de convivência (Pitelli, 1985a apud Duarte, Silva E Sousa, 2002).

As plantas daninhas competem diretamente por recursos básicos ao desenvolvimento das culturas, como por água, luz, nutrientes e espaços para o crescimento, reduzindo o rendimento de grãos, aumentando os custos de produção, e por consequência, diminuindo a renda do agricultor. Indiretamente os prejuízos sobre as plantas cultivadas podem ser pela liberação de substâncias alelopáticas ou por serem hospedeiros de pragas e doenças (Fontes et al, 2003). Por exemplo, as plantas daninhas apresentam grande influência no crescimento e na produtividade de grãos da soja (Rizzardì et al., 2004). Diversos estudos realizados demonstraram que a interferência de plantas daninhas causaram impactos negativos na produção de soja, variando de 20 à 80%, dependendo dos fatores já citados (Chemale & Fleck, 1982; Durigan, 1983; Melhorança, 1994; Fleck, 1996).

Entre as características das plantas daninhas que explicam as dificuldades no seu controle esta a grande disseminação de suas sementes, aumentando sua eficiência reprodutiva. Balbinot Jr. et al. (2002) afirmam que a maioria das plantas daninhas que infestam áreas agrícolas reproduz-se sexuadamente, ou seja, através da formação de sementes. Essa capacidade das plantas daninhas de produzir sementes, em quantidade e formas diferentes, é variável e está diretamente relacionada à família, ao gênero e até mesmo à espécie. Essa capacidade produtiva também sofre ação do ambiente no qual essa planta está inserida. Quando as condições ambientais são favoráveis, as plantas daninhas produzem grande número de sementes, sendo essa quantidade definida pelas suas características genéticas (Fontes, 2005).

Algumas plantas daninhas pertencem às mesmas classes, ordens, famílias, gênero e, em certos casos, até a mesma espécie que algumas plantas cultivadas (ex: arroz vermelho e arroz cultivado, ambos *Oryza sativa*). A classificação das plantas daninhas pode ser quanto ao ciclo, habitat de crescimento, ou mesmo quanto ao habitat. Quanto ao ciclo são classificadas como: anuais, perenes ou bianuais. As *plantas daninhas anuais* brotam, florescem e geram sementes em uma única estação, enquanto as *perenes* possuem órgãos de armazenamento em baixo da terra, normalmente rizomas, que permitem que a planta cresça por longos anos. A reprodução das *plantas daninhas perenes* pode ocorrer tanto por meio de sementes lançadas ao solo como através de uma extensão do rizoma, do qual surgem plantas filhas. Há um terceiro tipo de *plantas daninhas* que germina em uma estação e floresce em outra. São as chamadas *plantas*

bianuais. Durante o inverno estas plantas ‘soltam’ uma espécie de ramo alto e florescente (Gazziero et al., 2001).

Outra classificação que surgiu com o aparecimento dos primeiros herbicidas orgânicos, derivados dos ácidos alifáticos e fenociacéticos, separaram as plantas daninhas, quanto suas características botânicas, em dois grupos “folhas largas” e “folhas estreitas, devido ao fato destes produtos possuírem ação eficiente sobre gramíneas e dicotiledôneas. A folha estreita (monocotiledôneas), pertence à subclasse de plantas angiospermas, cujo embrião tem um cotilédone (Ex.: *Digitaria horizontalis* (capimcolchão)). Já a folha larga, também conhecida como dicotiledôneas, por pertencer à subclasse de plantas angiospermas, cujo embrião tem dois cotilédones (Ex.: *Amaranthus* spp (caruru) e *Bidens* spp (picão-preto).

O manejo de plantas daninhas é bastante oneroso, porém com resultados em sua maioria positivos. Por isso, é necessário que haja um balanceamento entre o custo da operação e o possível ganho na produção. Os principais métodos utilizados são o mecânico, o químico e o cultural, havendo, ainda, o controle biológico. Sendo importante a utilização de dois ou mais métodos de controle, conforme as necessidades e as condições existentes. O controle cultural consiste na utilização de práticas que propiciem à cultura maior capacidade de competição com as plantas daninhas. O controle mecânico consiste na utilização de instrumentos ou implementos tracionados por máquinas, animal ou mesmo pelo homem, com o objetivo de reduzir a população de invasoras em lavoura já instalada. A capina manual é o método mais simples e eficaz, porém demanda grande quantidade de mão-de-obra; pode ser utilizada como complemento a outros métodos. O método químico mais utilizado e com resultados mais eficientes é o controle das plantas daninhas com a utilização de produtos químicos (herbicidas), que se apresentam no mercado sob vários tipos. A grande vantagem atribuída ao sistema é a economia de mão-de-obra e a rapidez na aplicação.

2.2.CONTROLE BIOLÓGICO DE PLANTAS DANINHAS

O método de controle de plantas daninhas mais utilizado no mundo é o controle químico, um manejo necessário, porém de grandes gastos e conseqüências negativas ao ambiente. De acordo com o SINDAG (2012), as vendas totais de defensivos agrícolas

no Brasil, em 2012, totalizaram US\$ 9,710 bilhões, novo recorde histórico, com crescimento de 14,4% em relação a 2011, quando atingiram US\$ 8.488 bilhões. Outra constatação refere-se à existência de uma concentração do mercado de agrotóxicos em determinadas categorias de produtos. Os herbicidas, por exemplo, representaram 45% do total de agrotóxicos comercializados, os fungicidas responderam por 14% do mercado nacional, os inseticidas 12% e as demais categorias de agrotóxicos por 29% (ANVISA; UFPR, 2012). Segundo Queiroz et al. (2011), o grupo dos herbicidas é o mais comercializado no mundo. No Brasil 127.000 toneladas desse grupo foram comercializadas em 2009, sendo os ingredientes ativos Glifosato e 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) os mais comercializados oficialmente no Brasil, com 90.591 toneladas e 9.472 toneladas, respectivamente, vendidas naquele ano (IBAMA, 2010).

No entanto, os herbicidas químicos por mais que apresentem grande eficiência no controle de plantas daninhas, podem causar graves efeitos secundários, tais como populações de plantas daninhas resistentes à herbicidas, a redução da qualidade do solo e da água e efeitos prejudiciais sobre organismos não-alvo (TeBeest & Templeton, 1985; Beckie and Morrison, 1993). Atualmente, existem mais de 300 biótipos resistentes aos herbicidas no mundo, envolvendo 181 espécies daninhas, no Brasil já foram descobertas 33 espécies resistentes a diferentes mecanismos de ação (Heap, 2014).

Assim deve se buscar novas alternativas para o controle de plantas daninhas, entre elas está o controle biológico, com algumas variações que será descrita abaixo.

2.2.1. Controle biológico fitopatogênico

Os herbicidas químicos pela sua eficácia tornam se uma solução imediata para a maioria dos problemas com plantas daninhas, porém, devido a diversos entraves e problemas, como os altos custos para o desenvolvimento e registro dos herbicidas químicos, e a conscientização ambiental sobre pesticidas numa forma geral, levaram alguns pesquisadores a buscarem ferramentas alternativas de controle de plantas daninhas, tais como controle biológico de plantas daninhas (Zhou *et al.*, 2004). O interesse pela utilização de fitopatógenos como agente de biocontrole começou a partir da década de 60, e vem aumentando significativamente nas últimas décadas (Mello e

Ribeiro, 1998), onde diversas revisões sobre o tema foram publicadas (Adams, 1998; Charudattan, 1991; Evans et al., 2001; Figueiredo, 1995; Te Beest, 1991; Te Beest et al., 1992; Tessmann, 2011; Yandoc Ables et al., 2006).

Além da utilização de fungos patogênicos no controle biológico de plantas daninhas, outros grupos de organismos podem ser utilizados, como: insetos, peixes, bactérias, vírus e nematóides. Há registros de que em 1836 foi levado por pesquisadores indianos do norte para o sul da Índia, um inseto chamado *Dactylopius ceylonicus* para controlar a infestação de cactácea *Opuntia vulgaris* (Julien, 1989). Seixas et al. (2007) relatou o uso de algumas espécies de nematóides no controle biológico clássico de plantas daninhas. Jacson (1998) reportou o cultivo da bactéria *Xanthomonas campestris* em fermentação líquida, a qual é o ingrediente ativo de um bioherbicida para *Poa annua*. Um produto com a mesma bactéria citada anteriormente, conhecido por Camperico®, foi comercializado e demonstrou grande viabilidade (Imaizumi et al., 1997).

O marco histórico para o controle biológico de plantas daninhas é considerado como sendo o ano de 1902, pois foi a partir desse ano, nos Estados Unidos, que o Hawaii Department of Agriculture introduziu várias espécies de insetos originários do México, visando ao controle da planta herbácea *Lantana camara*. Também pode se citar como marco do controle biológico de plantas a utilização, na Austrália, da mariposa *Cactoblastis cactorum*, para controlar a cactácea *Opuntia stricta*, sendo que a introdução da mariposa deu-se no ano de 1925 e no ano de 1933 já havia ocorrido o controle completo da cactácea (Barreto, 2009).

Existem duas abordagens para controle de plantas daninhas biológica usando patógenos; clássica (inoculativa) e inundativa ou aumentativa. O método clássico ou inoculativo envolve a busca de um patógeno inimigo natural da planta-alvo em questão, pois nesta área a mesma se encontra livre de seus inimigos naturais tornando-se agressiva, assim, o patógeno é buscado no centro de origem da planta e introduzido na nova área de distribuição da planta-alvo, para que ocorra um equilíbrio natural. Quando o agente patogênico é bem sucedido, vai se multiplicando e se distribuindo na área de ocorrência da planta em questão, e usualmente não há a necessidade de intervenção do homem. Já o método de bioherbicida ou inundativo envolve o uso de fitopatógenos endêmicos, predominando a utilização de fungos (denominados de

micoherbicidas) associados a plantas alvo. Neste método os patógenos são reproduzidos em massa, formulados e aplicados de modo semelhante a um herbicida químico onde a população da invasora está estabelecida (Barreto, 2009; Berner e Bruckart, 2005).

Mesmo sendo atraente a utilização de bioherbicidas no controle de ervas daninhas, a comercialização destes produtos é baixa. Desde os primeiros relatos do uso de bioherbicidas com *Phytophthora palmivora* e *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *Aeschynomene* (TEBEEST *et al.*, 1992), pelo menos 15 produtos foram comercializados (ASH, 2010; BAILEY *et al.*, 2011). Um dos primeiros bioherbicidas foi estudado na China, a partir de uma suspensão de cultura de *C. gloeosporioides* f. sp. *Cuscutae* com o nome Lubao No. 1, para controlar cuscuta (dodder) (*australis Cuscutae*) na década de 1960 (Zhaoyuan Gao, 1992). No entanto, o seu desenvolvimento comercial não foi bem sucedido. Um exemplo bem sucedido de controle biológico clássico ocorreu na Austrália em 1971, com a introdução de *Puccinia chondrillina* para controlar *Chondrilla juncea* (Barton, 2004). Nos EUA, um produto chamado DeVine®, foi registrado o primeiro bioherbicida como produto comercial, em 1981, sua formulação líquida era composta de clamidósporos do fungo *Phytophthora palmivora*, habitantes do solo, para o controle *Morrenia odorata* em citros (Boyetchko *et al.*, 2002; TESSMANN, 2011). Este produto ofereceu mais de 90% de controle de plantas daninhas, sendo recomendado para uso em pomares e jardins (Li *et al.*, 2003). O primeiro bioherbicida registrado no Canadá foi o BioMal®, um produto contendo esporos de *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* para controle de malva rodada de folhas (*Malva pusill*) (Boyetchko *et al.*, 2002). No entanto, a pequena dimensão do mercado e as dificuldades técnicas associadas à produção em massa foram duas grandes considerações que dificultaram à comercialização do produto (Li *et al.*, 2003;.. Boyetchko *et al.*, 2002;.. Ash *et al.*, 2010).

Colletotrichum coccodes foi um dos primeiros fungos estudados e caracterizados como agente de controle de ervas daninhas, por exemplo, Meir *et al.* (2009) utilizaram *Colletotrichum coccodes* para o controle biológico de *Abutilon theophrasti*. Outro fungo patogênico que apresentou características e potencial como bioherbicida, foi *Microsphaeropsis amaranthi* para o controle de *Amaranthus SP.*, com sua eficiência comprovada em alguns trabalhos (Doll *et al.* 2005, Shabana *et al.*, 2010).

No Brasil temos alguns exemplos de controle biológico de plantas daninhas, Borges Neto et al. (1998) por exemplo, testaram o controle biológico com o fungo *Cercospora caricis*, como agente de biocontrole da tiririca (*Cyperus rotundus L.*). Neste trabalho, os autores utilizaram alguns adjuvantes em conjunto, obtendo resultados satisfatórios de controle. Outro trabalho é de Borges Neto e Pitelli (2004), que relataram os efeitos da adição de adjuvantes e a associação com herbicida na infectividade do fungo *Fusarium graminearum* para o biocontrole de plantas aquáticas, *Egeria densa* e *Egeria najas*. O efeito de 14 adjuvantes e 6 herbicidas, adicionados à suspensão de inóculo, sobre a ação de *F. graminearum* em *E. densa* e *E. najas* foi avaliado. De modo geral, os adjuvantes melhoraram a eficiência do bioherbicida e a associação herbicida + fungo proporcionou maior severidade de doença e controle do crescimento das plantas.

Atualmente, no Brasil, alguns pesquisadores vêm buscando encontrar fungos fitopatogênicos que estejam associados a plantas daninhas relevantes no cenário do agronegócio do país, por exemplo, *Conyza Spp.*, *Euphorbia heterophylla*, entre outras. Assim, Fernandes et al.(2014) isolou diversos fungos da *Conyza canadensis* (buva), e um isolado de organismo fitopatogênico (168-B) foi encontrado durante levantamentos no Brasil e selecionado para o desenvolvimento de um novo bioherbicida. Concentrações diferentes de propágulos do isolado 168-B e o efeito de aplicação do bioherbicida em estágios fenológicos distintos da planta resultaram em controle completo com aplicações nas concentrações de 10^6 e 10^7 propágulos/mL, e plantas de buva em todos os estágios fenológicos foram altamente suscetíveis ao patógeno. Os resultados demonstram o potencial do isolado fitopatogênico 168-B para o desenvolvimento de um bioherbicida para controle da buva.

O gênero *Phoma Sp.*, inclui diversos fungos patogênicos de plantas, sendo responsáveis por doenças graves em muitas espécies de plantas, estes fungos são causadores de lesões em folhas, caules, flores e vagens, e descoloração dos hipocótilo, cotilédones, raízes e alguns desses patógenos são transmitidas por solo e muitas vezes persistem em ou em solo e restos vegetais (Boerema et al.,2004). Diversos trabalhos demonstraram a eficiência do *Phoma Sp.* como agente herbicida em alguns plantas daninhas (Bailey et al., 2011; Graupner). Na maioria destes trabalhos os autores utilizaram o micélio do *Phoma macrostoma* em grânulos, para posterior aplicação do inóculo em gramados, obtendo resultados de grande significância no controle de plantas daninhas. Por exemplo, Bailey et al. (2011) encontraram no seu trabalho um total de 57

espécies de plantas resistentes a *P. macrostoma*, enquanto 38 espécies de 12 famílias foram sensíveis. Esta situação determina um possível modo de utilizar este bioerbicida como seletivo, pois no geral, os bioherbicidas que foram estudados não apresentaram comportamento seletivo no controle de plantas daninhas (Hallett, 2005).

A utilização a campo e a formulação dos bioherbicidas ainda são desafios importantes a serem enfrentados por pesquisadores, buscando novas tecnologias para que no futuro possa chegar ao mercado produtos menos nocivos e também eficientes no controle de plantas daninhas.

2.2.2. Metabolitos secundários (Fitotoxinas):

O biocontrole de plantas daninhas, utilizando principalmente animais herbívoros e microrganismos patogênicos, é realizado há mais de 200 anos. Porém apenas nos últimos 10 anos com avanço da ciência na área de toxinas microbianas aumentaram os estudos. Nesta área, estudos com a utilização de metabólitos secundários de fungos, ou seja, as toxinas (Fitotoxinas) isoladas de microrganismos patogênicos a plantas daninhas mostraram atividade herbicida potencial. Muitos especialistas sugerem que essas toxinas sejam desenvolvidas como um novo tipo de bioherbicidas ou herbicida biológico, sendo uma alternativa para à utilização aos herbicidas sintéticos.

Os metabolitos são biossintetizados e excretado através de um conjunto de vias metabólicas, estes compostos estão presentes no meio de cultura ou do substrato onde os microrganismos crescem, mas não são essenciais para o crescimento e sobrevivência dos fungos e bactérias (Betina, 1989).

Metabólitos primários são pequenas moléculas encontradas em todas as células vivas. Eles são produtos intermediários ou finais do metabolismo intermediário, blocos de construção para macromoléculas essenciais, ou coenzimas. Os metabólitos primários de maior importância industrialmente são os ácidos, nucleotídeos, vitaminas, solventes e ácidos orgânicos aminoácidos (Demain, 2000). O grupo de metabolitos secundários inclui antibióticos, toxinas e pesticidas (Li et al, 2003; Betina, 1989; Demain, 2000). Os metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos que demonstram propriedades tóxicas em animais são genericamente chamadas micotoxinas, quando aqueles que demonstram propriedades tóxicas em plantas são chamadas de fitotoxina.

Observou-se que alguns fungos e bactérias podem produzir fitotoxinas, portanto, pode ser utilizado para o controle de ervas daninhas.

Tanto fungos, bactérias e actinomicetos podem produzir toxinas, porém, os fungos são mais estudados. Diversos fungos fitopatogênicos detêm a habilidade específica de produzir substâncias tóxicas, as toxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos, geralmente de baixa massa molecular (< 1000 Da), móveis, ativas em concentrações fisiológicas ($< 10^{-6} - 10^{-8}$ M), não apresentam características enzimáticas, hormonais ou de ácidos nucléicos (GOODMAN et al., 1986) e são capazes de causar doenças e até a morte de plantas (SCHMELZ et al., 2003; TRUCKSESS, 2004).

Devido aos diversos sítios de ação dos metabólitos, e também como não há protocolos ou métodos padrões, há muita dificuldade em estabelecer corretamente o modo de ação dos compostos naturais fitotóxicos. Os pesquisadores têm desenvolvido seus próprios métodos, de acordo com o tipo de toxina a ser testada e com suas necessidades (MORI et al., 1995). Um método utilizado consiste em selecionar um composto específico e testar o mesmo sobre todos os sítios-alvos conhecidos para herbicidas, existindo ao redor de trinta sítios-alvos claramente identificados para toxinas (DUKE et al., 1997). Este método pode, certamente, conduzir à descoberta do modo de ação de uma toxina em particular, mas não assegura que outro modo de ação não possa ser descoberto.

As toxinas que apresentam potencial herbicida são capazes de penetrar a planta hospedeira, desintegrar sua estrutura celular e induzir a produção de lesões necróticas ou halo clorótico, com a vantagem de não serem tóxicas aos mamíferos e serem facilmente degradadas no ambiente. A especificidade da toxina para a planta daninha hospedeira é variável, indo de uma única espécie a um conjunto de espécies, sendo que quanto menor a especificidade pela planta hospedeira mais promissora é a toxina para uso como herbicida natural (Charudattan, 1991).

Fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Alternaria*, *Strachybotrys*, *Myrothecium*, *Phoma* e *Diplodia* são alguns exemplos de espécies patogênicas produtoras de toxinas estudadas. (Bélangier et al., 2002; Spencer-Phillips et al., 2002). Graupner et al. (2003) estudaram os metabólitos de vários fungos, incluindo

espécies do gênero *Phoma*. O gênero *Phoma* apresenta mais de 2000 espécies distribuídos pelo mundo, algumas espécies são conhecidas como patógenos de plantas, enquanto outros são saprófitas que colonizam tecidos vegetais em decomposição e vivem no solo. Várias espécies produzem metabólitos fitotóxicos, como phoma lairdenone por *P. lingam*, nonenolides de *P. herbarum*, epoxydonesters a partir de uma *Phoma sp* não identificada., e putaminoxin a partir de *P. putaminum*. *Phoma macrostoma* Montagne é um patógeno que provoca clorose, manchas foliares e necrose em plantas lenhosas e herbáceas, e podridão negra das folhas de alcachofra. Os fungos *Phoma macrostoma* produzem fitotoxinas conhecidas como macrociclinas (macrocíclicos ácidos 3-acyltetramic), que são moléculas dignas de síntese, dado o seu potencial como um modelo para o projeto de herbicida (Schobert & Barnickel, 2010).

Graupner et al. (2003) estudaram o efeito de macrociclinas produzidas pelo *Phoma macrostoma* e descobriram que, quando aplicado sobre plantas de folhas larga, induziu o branqueamento das folhas e a inibição do crescimento da raiz seguido de morte da planta. Estudos realizados por Bailey et al. (2011) com *Phoma macrostoma* mostraram que a mortalidade chega a 95% em testes de campo.

Em 2001, Bailey & Derby (2001) relataram o efeito das fitotoxinas do fungo *Phoma macrostoma* Mont., que ocorre naturalmente sobre o crescimento de dente de leão, sobre diversas plantas onde demonstraram a sua patogenicidade e causando supressão de um número de outras ervas daninhas de folhas largas, incluindo Canadá cardo (*Cirsium arvense* (L.) Scop.), chickweed (*Stellaria media* (L.) Vill.) e camomila scentless (*Matricaria perforata* Merat). Quando utilizados como bioherbicidas, obtiveram fraco desempenho, ocorrendo principalmente patógeno em hospedeiros lenhosos, especialmente membros da família Rosaceae (Farr et al., 1989), mas quando cultivadas em grãos e formuladas para a dispersão sobre o solo, provocou um retardo no crescimento dos brotos e raízes, acompanhados por graves foto-branqueamento das folhagens. Alguns estudos não mostraram eficiência do *Phoma macrostoma* sobre plantas monocotiledôneas (Graupner et al., 2003, 2006).

As espécies de *Fusarium* são frequentemente estudadas em relação ao seu potencial herbicida, a partir da produção de substâncias fitotóxicas, como por exemplo, os tricotecenos, cuja biossíntese procede do farnesil pirofosfato, que é convertido a tricodieno. O possível papel dos tricotecenos na patogênese de plantas foi inicialmente

observado em estirpes mutantes UV-bloqueadas de *Fusarium sporotrichoides*, permitindo entender os mecanismos de produção dessa toxina, a organização e função dos genes tricotecenos e o papel destes nas doenças de plantas (Desjardins, 2003).

Ohra et al. (1995) relatou a partir do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* a presença da toxina ferricina, que causou danos extremos às plantas daninhas *Aeschynomene*, *Amaranthus retroflexus* e *Desmodium tortuosum*. A produção da toxina AAL-toxina pelo fungo *Alternaria alternata* pode suprimir a sintetase cearmide e resulta em acúmulo esfingol que induz a ruptura da membrana (Li et al., 2003). A cornexistina é um inibidor de metabolismo e sua ação é semelhante à do sal aminoacético, ou seja, ela inibe uma isoenzima de asparaginas aminotransferases, mas quando um ácido do ciclo do ácido tricarbóxico, como ácido aspártico e ácido glutâmico é adicionado, a atividade da toxina desaparece, ativa contra monocotiledôneas e dicotiledôneas. Outra toxina presente em alguns metabólitos de fungos é a tentoxina, que apresenta certa eficiência contra monocotiledôneas e dicotiledôneas, tem dois diferentes mecanismos de ação sob condições diferentes. Um é a interrupção da formação de cloroplastos pelo bloqueio da síntese de proteína nucleocitoplásmica e o outro é o inibidor de energitransferase de ATPases para controlar fotofosforilação (Duke et al., 1996).

Algumas bactérias também apresentam atividade herbicida através de seus metabólitos, por exemplo, *Pseudomonas seringa* pv. *phaseolicola* é um patógeno de plantas bacteriana que causa a doença de halo praga e morte localizada em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) e kudzu (*Pueraria lobata*), cuja toxina é chamado phaseolotoxin. Uma vez que infecta as raízes da planta, ele vai se espalhar para parte terminal, em seguida, promovendo nanismo de plantas, clorose e/ou lesões necróticas (Li et al., 2003). O *Xanthomonas campestris* é um bioherbicida ou herbicida natural bacteriano que foi registrado para controlar gramíneas anuais em gramados (Hoagland et al., 2007). O isolamento e caracterização de uma fitotoxina de *Xanthomonas campestris* pv. *retroflexus* foi estudada por Mingzhi et al. (2007). Eles identificaram compostos moleculares, incluindo ácidos orgânicos e ciclo- (prolina-fenilalanina).

Varejão et al.(2013), durante trabalhos de levantamento de fungos fitopatogênicos, encontrou na espécie *Alternaria euphorbiicola* um potencial agente de biocontrole para *Euphorbia heterophylla*. Os resultados mostraram que a composição

do meio de cultura e as condições de cultivo influenciaram a fitotoxicidade de filtrados de cultura, tendo o cultivo sob agitação e na ausência de luz favorecido a produção de metabólitos fitotóxicos pelo fungo.

Os diversos estudos mostram um potencial e eficiente poder herbicida dos metabólitos secundários dos fungos e algumas bactérias, tornando assim as fitotoxinas uma excelente alternativa para o controle de plantas daninhas. Porém, a produção massal destes produtos e a melhora nas formulações são alguns dos principais temas a serem investigados para que estes produtos tornem-se produtos fitossanitários registrados e utilizados pelos agricultores.

2.2.3. Extração vegetal (aleloquímicos)

A utilização de herbicidas químicos, mesmo sendo considerado um método de controle de plantas daninhas eficiente e prático, vem recebendo diversos questionamentos quanto ao seu impacto ambiental e por selecionar indivíduos cada vez mais resistentes a esses produtos (Gelmini et al., 2001). Assim, a busca por alternativas para o controle de plantas daninhas menos nocivas ao meio ambiente vem sendo investigadas por pesquisadores do mundo todo, entre estas encontra-se a utilização de espécies que liberam substâncias prejudiciais a outras, fenômeno conhecido como alelopatia, reduzindo ou até mesmo inibindo totalmente o desenvolvimento de plantas daninhas (Silveira et al., 2010).

Alelopatia é um fenômeno no qual os metabólitos secundários sintetizados por plantas influenciam nos sistemas biológicos e agrícolas, de forma estimulatória ou inibitória. Envolve a síntese de compostos bioativos conhecidos como aleloquímicos, capazes de atuar como herbicidas naturais. Tais substâncias podem eventualmente servir para atuar contra a resistência desenvolvida por plantas daninhas, e em problemas de saúde e contaminação de solos, causados pelo uso intensivo de agroquímicos sintéticos (WHITTAKER & FEENY, 1971; IAS, 1996; Farroq et al., 2011).

A atividade dos aleloquímicos tem sido usada como alternativa ao uso de herbicidas, inseticidas e nematicidas (defensivos agrícolas), podendo ser utilizado com a resteva permanecendo no solo ou a extração dos vegetais para aplicação como herbicida

natural (Waller, 1999). Há inúmeros registros da influência alelopática na rotação de culturas; por exemplo, a resteva (restos da cultura anterior) de trigo retardou o crescimento de plantas de algodão (Hicks *et al.*, 1989) ou de arroz na rotação, embora não tenha reduzido a germinação (Alsaadawi, 1999). Os extratos das folhas do trigo inibiram a germinação de suas próprias cariopses, além do desenvolvimento de suas plântulas (Kalburtji, 1999). No Brasil, foi encontrado que resteva de trigo (*Triticum aestivum*), aveia preta (*Avena strigosa*) ou centeio (*Secale cereale*) não influenciou sobre a germinação de culturas de verão como milho, feijão e soja, mas afetou o crescimento destas plantas (Rodrigues *et al.*, 1999). Igualmente, restos de plantas de soja ou azevém inibiram o desenvolvimento das raízes de milho em até 34% (Martin *et al.*, 1990). Restos de palhada de arroz podem inibir o crescimento de aveia, trigo e lentilha (Narwal, 1999). O sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) apresenta potente aleloquímico, a quinona sorgoleone (Einhellig & Souza, 1992). Este inibe a germinação e crescimento de várias plantas, agindo como inibidor do sistema PSI da fotossíntese. É bastante persistente no solo com a resteva desta cultura (Weston & Duke, 2003). Com o trigo, cultura de inverno, o efeito da resteva não foi tão dramático.

Os metabólitos secundários que causam efeitos alelopáticos são chamados de aleloquímicos e são produzidos em diferentes órgãos da planta, incluindo folhas, caules, raízes e sementes, com quantidades variáveis de um órgão para outro (Hong *et al.*, 2004). As folhas parecem ser as mais consistentes fontes de químicos envolvidos na alelopatia, enquanto poucas e menos potentes toxinas ocorrem nas raízes (Reinhardt & Bezuidenhout, 2001). Os aleloquímicos são liberados por volatilização, lixiviação, exsudação radicial e decomposição de tecidos. No ambiente, a toxicidade destes compostos varia em função da concentração, idade e estágio fenológico da planta, clima, estação do ano e componentes químicos, físicos e microbiológicos do solo (Inderjit & Weiner, 2001; Gniazdowska & Bogatek, 2005).

As quantidades de substâncias potencialmente alelopáticas produzidas variam de um local de ocorrência ou estágio de desenvolvimento para outro, pois sua síntese sofre a influência de fatores genéticos e de ambiente, bióticos e abióticos (Ferreira & Aquila, 2000).

Compostos fenólicos são a classe de maior importância e os aleloquímicos mais comuns nas plantas (LI *et al.*, 2010). Esses compostos podem ser encontrados em grãos,

pólen, exudatos de raiz, resíduos, matéria em decomposição e no solo (Sánchez-Moreiras et al., 2004). A melhor maneira de se descrever a natureza química das substâncias alelopáticas é a sua diversidade, pois variam desde simples hidrocarbonetos, como etileno, até compostos complexos, como os policíclicos, com peso molecular bastante elevado (Putnam, 1987). Pela semelhança na composição química e vias de síntese, Rice (1984) designou 14 categorias de compostos alelopáticos: taninos hidrolisáveis, ácidos gálico, digálico e protocatecuico; aminoácidos e polipeptídios; alcaloides e cianohidrininas; óleos glicosídeos de mostarda; purinas e nucleotídeos; fenóis simples, ácido benzóico e derivados; cumarinas; flavonóides; taninos condensados; ácidos orgânicos solúveis em água, aldeídos alifáticos e cetonas; lactonas simples insaturadas; ácidos graxos de cadeia longa; naftoquinonas, antraquinonas e quinonas complexas; terpenóides e esteroides. Os terpenóides e ácidos fenólicos são categorias de compostos alelopáticos mais comumente associadas à alelopatia. Fatores apontados para isto são a habilidade dos investigadores e as facilidades analíticas em laboratórios para isolar e identificar determinados compostos, o menosprezo a compostos que se encontram em menores concentrações (Dalton, 1999).

No Brasil temos alguns estudos relacionados ao poder inibitório na germinação de plantas daninhas com extratos vegetais. Favaretto et al. (2011) investigaram o efeito do extrato de folhas e raízes de capim-annoni-2 (*Eragrostis plana*) no crescimento de plântulas de trevo-branco (*Trifolium repens*), e os resultados mostraram que os compostos alelopáticos de folhas e raízes do capim-annoni-2 diferem quanto à natureza química e/ou concentração. Magalhães et al. (2012) verificou o potencial alelopático de folhas secas de *Cymbopogon citratus* (capim-santo) e *Cyperus rotundus* L. (tiririca) sobre a germinação de sementes e o desenvolvimento inicial de plântulas de freijó (*Cordia Goeldiana*), onde prepararam soluções com álcool etílico, nas concentrações de (p/v) 0 a 5%. Os extratos obtidos foram impregnados em folhas germitest e secos à temperatura ambiente, observando efeito alelopático de capim-santo positivo sobre o freijó, evidenciando um estímulo no crescimento de radícula e hipocótilo até a concentração 3%, não observando em concentrações maiores. O efeito do extrato aquoso de três plantas daninhas, *Cynodon dactylon* (L.) Pers., *Cyperus rotundus* L. e *Sorghum halepense* (L.) Pers. sobre a germinação e o crescimento de plântulas de arroz (*Oryza sativa* L. cv. IAC-165) foi estudado por Castro et al. (1984), utilizando na preparação dos extratos raízes de *Cynodon dactylon*, tubérculos de *Cyperus rotundus*: e

riomas de *Sorghum halepense*, os quais foram homogeneizados em solução aquosa, submetidos a filtração e centrifugação. O melhor efeito alelopático foi causado pelo extrato de *Cyperus, retundus*.

2.3. FERMENTAÇÃO SUBMERSA

A busca para tornar viável a produção e comercialização dos produtos biológicos, passa pela otimização de sua produção massal. Assim, os processos de produção a partir das fermentações são de grande importância, utilizando resíduos da agroindústria e materiais que consigam tornar a produção eficiente e de baixo custo.

A humanidade convive com processos fermentativos desde 5000 a.c na sua utilização para a obtenção de vinho, queijos e outros derivados do leite. Os egípcios, por exemplo, utilizavam a fermentação da cevada para a obtenção de uma bebida alcoólica parecida com a cerveja espécie e, a levedura da cerveja era utilizada para a panificação. Hoje em dia diversos produtos são utilizados por processos fermentativos. Estes produtos podem ser gerados pelo metabolismo primário (ex: Etanol) ou secundário (Ex: Antibiótico) do microrganismo cultivado e ao lado da produção de biomassa, enzimas e proteínas em geral (Ward, 1911).

Os processos microbianos ocorrem sob fermentação submersa ou então com meio de cultura no estado semi-sólido ou sólido, sendo o primeiro o mais utilizado em escala industrial (Castro; Pereira Jr., 2010).

Os processos submersos são aqueles em que o microrganismo, ou mesmo outras células, desenvolvem se em meio de cultura com excesso de água sob agitação. As fermentações são conduzidas em biorreatores agitados e aerados mecanicamente. A fermentação submersa é o processo mais utilizado na produção comercial/escala industrial de bioprodutos com microrganismos (Gibbs et al., 2000), pois apresenta o maior número de pesquisas e instrumentações para o controle do processo, tornando-o mais acessível que a fermentação semi sólida, assim como melhor facilidade de monitoramento (Fuglsang, 2002). Dentre outras vantagens estão à facilidade de controle dos parâmetros físico-químicos, como controle de temperatura devido ao alto teor de água, a melhor absorção de nutrientes e recuperação de metabólitos e ainda redução da possibilidade de degradação do produto (Castro, 2010).

Este processo é bastante utilizado e adequado para as bactérias, uma vez que no caso de fungos filamentosos, a produção de esporos neste tipo de fermentação pode ser uma desvantagem (Gibbs et al, 2000;.. Cheng et al 2003). No entanto, como alguns fungos considerados candidatos a bioherbicida iram produzir conídios ou outras formas de propágulos em cultura líquida, a fermentação submersa torna se um método ideal para a produção, também conhecido por produzir propágulos secundários em cultura líquida, tais como micro escleródios ou clamidósporos de hifas ou conídios de que pode ser variadamente formulados e aplicados como uma bioherbicida (Ash, 2010; Cheng et al, 2003;.. Gibbs et al, 2000). Assim fermentação submersa é uma excelente opção para produção de bioherbicida e seus metabólitos.

Os processos de fermentação submersa com fungos variam o tempo de fermentação de 5 a 12 dias, com uma temperatura em torno de 24-35 °C e agitação de 50-150 rpm foram mais freqüentes. Para fermentação utilizando bactérias, o tempo médio variou de 1 a 3 dias com a temperatura do sistema em torno de 26-30 °C e agitação de 100 rpm. A agitação para os fungos devem ser mais branda em comparação com células de bactérias, uma vez que altas taxas de agitação aumentam as tensões de cisalhamento no biorreator prejudicando o crescimento do micélio e, assim, reduzindo a biomassa fúngica (Klaic, 2014).

O cultivo submerso de fungos é considerado um processo multicomponente onde o crescimento celular e a formação de produtos são influenciados pelos parâmetros operacionais que envolvem a fermentação, como: composição do meio de cultura, temperatura, pH do meio, forças de cisalhamento, reologia e morfologia do fungo, natureza e concentração do substrato celulósico, disponibilidade de nutrientes, presença de indutores e, outros parâmetros como agitação do meio reacional, configuração dos impelidores, quantidade de oxigênio dissolvido, etc. Todos esses parâmetros podem variar durante o processo fermentativo e a relação desses parâmetros com complexo formado deve ser analisado durante a fermentação (Singhania et al., 2010). O meio de cultura na fermentação é um fator importante, onde há estudos que utilizam o meio de cultura sintético (Zhang et al, 2012;.. Fenici et al, 2010;..) e outros estudos utilizam o meio industrial (Singhania, 2010).

Meio sintético utiliza reagentes biotecnológicos para o desenvolvimento do meio de cultura, por exemplo: extrato de levedura, peptona, glucose e vários micronutrientes, mas a utilização destes compostos aumenta o custo de produção.

Meio industrial utilizando resíduos ou subprodutos agroindustriais como substratos na fermentação e alguns dos resíduos mais utilizados em fermentação submersa são: água de maceração de milho, óleo de soja, óleo de algodão, melão de cana de açúcar, leite de soja e sorgo. Os meios naturais são altamente desejados por permitirem o cultivo dos microrganismos em meios obtidos a partir de fontes naturais de qualquer parte do mundo. Tem se, também, pelo fato do meio ser, basicamente composto de extratos naturais, o custo bem inferior ao custo do meio sintético. Para aumentar a produtividade, os meios podem ser concentrados, porém, isto pode acarretar um aumento da pressão osmótica e dificuldades de aeração. As matérias primas perfazem 60 a 80% do preço de custo em uma produção de enzimas por fermentação e, portanto, a composição do meio deve ser definida com cuidado e trabalhos de pesquisas são necessários para que se viabilize a substituição de compostos caros por outros disponíveis em maior quantidade e de preço mais baixo (Godfrey & West, 1996).

O uso do meio industrial representa uma boa alternativa para melhorar a produzir bioherbicida ou/e seus metabólitos a baixo custo ou, pelo menos, permanecem os mesmos, como o obtido utilizando um meio sintético. Além disso, a pesquisa para o substrato mais adequado não é apenas ditada pelos custos e disponibilidade de substrato, mas por outros fatores, como a complexidade de reações indesejadas que não afetam apenas o processo em si. Por outro lado, os resíduos industriais podem conter substâncias insolúveis e outros componentes que podem afetar o crescimento do microrganismo (Singhania et al., 2010).

2.4. BIORREATORES

Os estudos de produção em escala dos processos de fermentações microbianas para biocontrole ou para metabólicos (fitotoxinas) dos fungos, em geral, são realizados com reatores experimentais de laboratório. Normalmente o desenvolvimento de uma fermentação microbiana começa com sua otimização (temperatura, pH, pressão, mistura, as concentrações de biomassa e nutrientes) em bancada, a partir da agitação da

cultura em frascos, para depois a utilização de fermentadores de bancada, assim, com as variáveis bem estudadas ir para a escala industrial (Hosobuch & Yoshikawa, 1999).

Os biorreatores de tanque agitado, colunas de bolhas e biorreatores air-lift (tipo de biorreatores pneumáticos) são comumente aplicados para a fermentação microbiana e culturas de células de mamíferos (Warnock & Al-Rubeai, 2006). Na seleção do biorreator é importante conhecer as variáveis necessárias para o crescimento da cultura utilizada e as vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de reatores. Os critérios gerais para a escolha de um biorreator adequado deve considerar a transferência de massa de oxigênio suficiente para as células, baixa tensão de cisalhamento para as células e transferência de massa adequada (fornecimento de nutrientes para as células e remoção do produto e subproduto a partir de células).

A maioria dos processos microbianos industriais é aeróbicos, realizados principalmente em meios contendo substâncias aquosas e orgânicas; geralmente viscosos, mostrando um comportamento não-newtoniano. Nestes processos, o oxigênio é extremamente importante para o crescimento dos microrganismos, manutenção e produção de seus metabólitos. Portanto, para microrganismos aeróbicos é importante assegurar um fornecimento adequado de oxigênio geralmente por uma corrente de gás. Assim, deve se conhecer a taxa de transferência de oxigênio (OTR) em diferentes escalas e em diferentes condições operacionais, pois tem um papel relevante para a predição da via metabólica para o crescimento e produção de qualquer metabólito no processo aeróbico. (Ochoa et al., 2000.).

O aumento da produção da cultura microbiana em um biorreator em larga escala é o principal desafio para exploração comercial (Banque et al., 2012). A melhoria dos potenciais agentes de controle, muitas vezes depende de um método de produção em massa adequado para produzir os propágulos numa escala suficientemente grande (Issaly et al., 2005). Fatores físicos e químicos dos processos de fermentação modificam em alguns pontos com o aumento da escala, onde geralmente é mais prático nas fermentações submersas do que em sólidas (Cheng et al., 2003).

2.4.1. Biorreatores de reações submersa

Processos de fermentação submersa são industrialmente mais difundidos, devido a facilidade do aumento de escala em biorreatores e facilidade de operação deste tipo de

reatores. Huang & McDonald (2009) listaram alguns dos principais tipos de biorreatores utilizados para processos de fermentação microbiana em escala, os biorreatores de tanque agitado e pneumáticos.

2.4.2. Biorreatores de tanque agitado

As principais vantagens de biorreatores de tanque agitado (STR) são sua flexibilidade e capacidade de fornecer altos coeficientes de transferência de massa (Doran, 1999). Em biorreatores agitados mecanicamente, o agitador é o principal instrumento de dispersão de gás e um agitador de velocidade e de criação têm ambos um efeito pronunciado sobre a transferência de massa (Ochoa & Gomez, 2009). É importante a escolha dos impelidores adequados para proporcionarem elevados coeficientes de transferência de massa e um ambiente homogêneo permitindo o crescimento microbiano controlado de forma consistente, porém, alguns impelidores podem resultar em danos ao crescimento microbiano, devido ao cisalhamento, mesmo a uma velocidade de agitação mínima (Kieran, 2001).

Ainda existem poucos estudos relacionados à produção de bioherbicidas ou seus metabolitos utilizando biorreatores, como os biorreatores STR, os poucos estudos tiveram o objetivo de otimizar as condições do processo, tais como agitação, aeração, temperatura, pH e tempo de fermentação (Vurro et al, 2012; Boyette et al, 2008, Mendizábal et al, 2012), além de utilizar resíduos da agro-industrial para reduzir os custos operacionais (Boyette et al., 2008) ou otimizar o meio sintético (Vurro et al., 2012). A quantidade de inóculo também é importante e deve ser otimizada, mas depende das características de cada um dos microrganismos (Vurro et al., 2012; Mendizábal et al., 2012). Estas variáveis são de grande importância para maximizar a produção e reduzir os custos e obter um processo viável.

Um estudo realizado por Vurro et al. (2012), otimizou a produção de metabolitos do fungo *Ascochyta* como possível herbicida natural. Houve o maior crescimento do fungo e conseguiu se produzir até 230 mg de L-toxinas quando cultivadas durante 5-10 dias em condições de agitação, desde que o inóculo inicial de pelo menos 10^5 - 10^6 conídios mL⁻¹. A adição de extrato de levedura melhorou a produção dos metabolitos. Neste trabalho foi utilizado um fermentador de 30 L (BIOSTAT- Sartorius Stedim

Biotech), os parâmetros utilizado foram uma agitação com 40 rpm, temperatura de 26 ° C e 15 dias de fermentação. A cada 2 ou 3 dias a velocidade de rotação foi aumentada para cerca de 200 rpm, durante dois ou três minutos, e depois restaurado para 40 rpm, para reduzir a adesão dos pedaços de micélio para as paredes do fermentador e lâminas.

A produção de um bioherbicida em fermentação submersa, a partir do fungo *Myrothecium verrucaria*, contendo os micélios em conjunto de 0,20% de Silwet L-77 como surfactante obteve sucesso no controle da planta daninha exótica Kudzu. Este bioherbicidas causou mortalidade de 90% de ocorrência natural kudzu maduro dentro de 48 h após a aplicação em experimentos de campo. O tempo de cultura foi de 7 dias a 28 ° C e agitação de 200 rpm (Boyette et al., 2008). Dokken (2007) estudou a fermentação submersa de *Colletotrichum truncatum*, como um potencial bioerbicida para controle biológico de *camomila Scentless* usando reator STR de 20L. O meio de produção foi otimizado com uma relação C / N de cerca de 20: 1, a temperatura de 20 ° C, pH de 7,5 e agitação de 200 rpm. Os resultados preliminares foram satisfatórios, evidenciando que o crescimento e a esporulação são possíveis em escala de produção.

2.4.3. Biorreatores pneumáticos

Um biorreator pneumático (coluna de bolhas, de ar comprimido e de fluxo de ar modificado) é um biorreator de dispersão tipo de gás-líquido que consiste de um vaso cilíndrico, onde o ar comprimido ou uma mistura de gás é introduzido na parte inferior do vaso, através de bicos ou placas perfuradas, um pulverizador anel para aeração, mistura e circulação de fluidos, sem peças mecânicas em movimento. (Hung & McDonald, 2009). Colunas de bolhas e biorreatores de transporte aéreo são os dois principais tipos de reatores pneumaticamente agitados (Hung & McDonald, 2009, 2009; Ochoa & Gomez, 2009).

Reatores do tipo *airlift* são reatores pneumáticos, diferentes do reator de coluna de bolhas, dividindo se em duas regiões de escoamento, sendo uma direcionada para cima e outra para baixo. Os canais possibilitam a circulação de liquido em grande escala ao redor do corpo do reator (Siegel & Robinson, 1992).

Biorreatores *airlift* são considerados um dos projetos mais promissores no sentido de aumento das taxas de transferência de oxigênio e, ao mesmo tempo minimizando o consumo de energia. Neste tipo de dispositivo, toda a energia necessária é investida na injeção de ar a uma pressão conveniente (Hung & McDonald, 2009). A circulação de ar em que o dispositivo tem a função dupla de distribuir o oxigênio necessário para o metabolismo dos microrganismos e de criar turbulência suficiente na fase líquida para obter uma taxa aceitável de transferência de oxigênio. Em comparação com tanques agitados, bioreatores *airlift* são considerados sistemas de baixo cisalhamento com dissipação de energia mais uniformemente distribuída e tensão de cisalhamento ao longo do reator (Znad et al, 2006).

Air-lift ou biorreatores *air-lift* modificados contêm um projeto de tubo (circular interna) ou loop externo, que tem as seguintes vantagens: prevenção da bolha de coalescência, direcionando-os em uma direção; aumento na transferência de massa de oxigênio através do aumento do número de bolhas; a distribuição de tensão de cisalhamento de forma mais uniforme; e promover o movimento cíclico do fluido, resultando em tempos de mistura mais curtos. Alguns fatores tornam limitantes estes biorreatores, como problemas de transferência de massa de oxigênio podem ocorrer em culturas com elevada densidade celular, assim, acaba diminuindo a homogeneidade da biomassa, dos nutrientes, do oxigênio e do pH, além da extensa formação de espuma (resultante de polissacarídeos extracelulares, proteínas, ácidos graxos e da alta velocidade superficial do gás) (Huang & Wang, 2001; Tanaka, 2000).

Por outro lado, as características de baixo capital e custos operacionais (sem peças mecânicas em movimento e elementos de vedação), facilidade de operação asséptica durante longos períodos de tempo, a circulação do fluido eficiente com o uso de loops de recirculação interna ou externa e de transferência de massa de oxigênio adequada. (Hsiao, 1999). O ambiente de tensão de cisalhamento relativamente baixo em biorreatores pneumáticos é particularmente desejável para células de plantas sensíveis ao cisalhamento.

A utilização dos biorreatores do tipo *airlift* em escala industrial é limitada, devido às questões relacionadas ao *scale-up* desses reatores. Estes são menos flexíveis às mudanças de processo do que os STR. Uma vez que os parâmetros geométricos foram selecionados para um determinado processo durante o projeto, a velocidade de

fluxo de gás é, em princípio, o único parâmetro de ajuste durante a operação. Portanto, o *airlift* é menos adaptável a outros processos com muitas necessidades diferentes de velocidade do líquido, onde a aeração e agitação podem ser independentemente controladas (Chisti, 1989).

Estudos relacionados à produção de bioherbicidas em biorreatores *airlift* não foram encontrados na literatura, porém havia alguns artigos sobre a produção de bioinseticida. Por exemplo, Micheloud et al. (2011) estudaram a produção de bioinseticida com a formulação baseada no fungo *Anticarsia gemmatalis* múltiplos *nucleopolyhedrovirus* e a otimização da produção em biorreator STR. Já Visnovski et al. (2011) estudou o mesmo fungo para o mesmo biocontrole, comparando shaker, STR e reatores air-lif para o crescimento celular, conseguindo maior produção com o biorreatores STR.

2.5. PROPRIEDADES FÍSICO QUÍMICAS

A eficiência na aplicação de produtos fitossanitários está ligada diretamente entre o potencial de deriva, a perda por escorrimento e a cobertura do alvo. Trata-se de um processo complexo, influenciado por diversos fatores, como o tipo de equipamento de pulverização empregado e as propriedades físico-químicas da calda (Cunha et al., 2003; Broniarz-Press et al., 2009; Schampheleire et al., 2008). Devido à complexidade do processo, as informações sobre a influência das propriedades físico químicas são escassas, pois estes fatores dificultam o estabelecimento de relações.

A ação dos produtos fitossanitários é dependente dos constituintes da calda de pulverização, onde geralmente, é composta pelo produto, água e adjuvantes. Alguns produtos fitossanitários já apresentam na sua composição surfactantes, espalhantes, umectantes, etc; porém, quando não presente no produto, o adjuvante vai em conjunto à calda de pulverização. Ramsdale & Messersmith (2001) afirmam que os adjuvantes melhoram, em muitos casos, a eficácia das aplicações, no entanto, a interação adjuvante e produto fitossanitario é um processo complexo, que envolve muitos aspectos físicos, químicos e fisiológicos, e varia para cada condição testada. Os adjuvantes atuam de maneira diferente entre si, afetando o molhamento, a aderência, o espalhamento, a

formação de espuma e a dispersão da calda de pulverização (Montório *et al.*, 2004; Mendonça *et al.*, 2007).

Algumas das propriedades físicas e químicas das caldas de pulverização são sensíveis as alterações provocadas pelos adjuvantes, como a tensão superficial, a viscosidade, a densidade, a condutividade elétrica e o pH. Por exemplo, Christofolletti (1999) descreve que alguns fluidos ao aumentarem a viscosidade e tensão superficial requerem maior quantidade de energia para a pulverização. Portanto, a pulverização de líquidos que tenham maior viscosidade e maior tensão superficial produzem gotas maiores.

Silva *et al.* (2006) relataram que a tensão superficial é a força que existe na superfície dos líquidos. Essa tensão se deve às fortes ligações intermoleculares, as quais dependem das diferenças elétricas entre as moléculas, e pode ser definida como a força por unidade de comprimento que duas camadas superficiais exercem uma sobre a outra. O efeito da tensão superficial está presente em diversos segmentos industriais, como os de cosméticos, de materiais de limpeza, de tintas e de produtos fitossanitários. A água, por exemplo, apresenta elevada tensão superficial (em torno de 70 mN/m) e assim tem uma baixa capacidade de retenção quando aplicada á cutícula das plantas (Montorio, 2001). Na área dos produtos fitossanitários, o seu efeito é fundamental para o desenvolvimento de formulações e para a eficácia nas aplicações em campo. Nas formulações, é importante a presença de compostos que reduzem a tensão superficial, facilitando o contato entre os diversos componentes de um produto formulado, promovendo a diluição do produto em água e aumentando a estabilidade da solução obtida (Bianco,1985). Segundo Green e Hazen (1998), a tensão superficial está relacionada às propriedades dos adjuvantes que influenciam na atividade biológica dos produtos fitossanitários. Com a redução da tensão superficial melhoram os efeitos molhante, espalhante e penetrante. Os adjuvantes que possuem a característica de modificar a tensão superficial são denominados surfactantes (DURIGAN, 1993; KISSMANN, 1997). Atualmente, são comercializados diversos tipos de herbicidas, diferenciando se pela concentração do ingrediente ativo e pela presença ou ausência de surfactantes em sua composição. Para Schönherr *et al.* (1991), os surfactantes, como agentes modificadores das características físico-químicas de soluções causam alterações na adesão, velocidade de espalhamento, área de molhamento e retenção das gotas pulverizadas sobre as superfícies foliares.

Existem estudos antigos de que alguns surfactantes aumentam a permeabilidade da cutícula foliar e membrana plasmática (Haapala, 1970; Parr et al., 1965). A melhoria da atividade dos herbicidas é, entretanto, acreditada por ser resultado do surfactante que induz um desarranjo normal das células reguladoras da permeabilidade. Eles têm a capacidade de reduzir a tensão superficial da gota, o que diminui o ângulo de contato entre as gotas e a cera cuticular da folha, proporcionando maior molhamento e espalhamento sobre a superfície alvo (Hess; Foy, 2000; Wagner et al., 2003).

Mendonça et al. (2007) avaliaram a tensão superficial estática de alguns óleos minerais (Assist, Attach, Dytrol, Iharol, Mineral Oil, Spinner, Sunspray-E, Triona) e outros óleos vegetais (Agrex`oil vegetal, Crop Oil, Natur`l Oil, óleo Vegetal Nortox e Veget Oil) utilizados na agricultura, em concentrações que variaram de 0,025% a 3% v/v. Dos óleos minerais avaliados, em concentrações acima de 1% v/v, os valores de tensão superficial foram semelhantes, com exceção do Sunspray-E que apresentou valores entre 69,70 mN.m⁻¹ (1% v/v) a 70,52 mN.m⁻¹ (2,5% v/v). Entre os óleos vegetais, em concentrações acima de 1% v/v, os valores de tensão superficial também foram semelhantes entre eles, tendo como exceção o óleo Vegetal Nortox que apresentou os mais altos valores variando entre 51,89 mN.m⁻¹ (1% v/v) e 34,58 mN.m⁻¹ (3% v/v). Estudo realizado por Montório (2001) mostrou que os adjuvantes organossiliconados Silwet L-77 e Break Thru foram os que atingiram os menores valores de tensão superficial, chegando a 20 mN.m⁻¹ em soluções aquosas. Neste estudo foram avaliados 15 adjuvantes presentes no mercado e todos atingiram tensão superficial iguais ou inferiores a 35 mN.m⁻¹.

O processo de pulverização para converter um líquido em gotas e depois as mesmas irem ao destino final, dependem das propriedades físico-químicas das soluções empregadas (Prokop e Kejklícek, 2002). O termo reologia, do grego Rheo (fluxo) e logos (ciência), foi sugerido por Bingham e Crawford, apud MARTIN (1993), para descrever as deformações de sólidos e a fluidez de líquidos. Seu estudo abrange a viscosidade, tipo de fluxo, valor de rendimento e tixotropia do produto. Viscosidade é uma expressão de resistência do fluido ao fluxo: quanto maior a viscosidade, maior a resistência (MARTIN, 1993). A reologia é um parâmetro importante para avaliação do comportamento de fluxo do material, determinando como este flui sobre influências externas (Chorilli et al., 2007). O grau de pulverização está diretamente ligado à viscosidade e escoamento da solução (Schampheleire et al., 2008). Dessa forma, o

produtos fitossanitários a base de água apresentam baixíssima viscosidade e com isso as gotas ficam muito finas, aumentando facilmente a deriva. Uma opção economicamente viável encontrada para aumentar a viscosidade do líquido, bem como a eficiência das pulverizações, tem sido a adição de óleo vegetal às caldas de pulverização de herbicidas, fungicidas e inseticidas. A utilização de óleo vegetal como adjuvante tem indicação principal de espalhante adesivo, mas sua característica de viscosidade pode alterar também o espectro de gotas pulverizadas. Os óleos triglicéridos são essencialmente uma mistura de óleo e surfactante e geralmente são chamados de óleos de sementes por serem extraídos das plantas por pressão ou solventes e tem uma tendência de alta viscosidade em comparação aos óleos metilados. Os óleos triglicéridos usualmente contêm somente de 5 a 7% de surfactante emulsificante enquanto o óleo metilado contém 10 a 20% de surfactante. No entanto, não há definida a magnitude dessa elevação necessária para o aumento do diâmetro das gotas. Bouse et al. (1988) mostram que os componentes das formulações são importantes na determinação das características da pulverização, como o tamanho de gota. Entretanto, a variação da viscosidade proporcionada pela adição de adjuvantes não é muito significativa.

Características como estabilidade e densidade também influenciam no processo de formação da gota, cujo conhecimento é fundamental para o sucesso de uma aplicação de agrotóxico. A maioria dos compostos orgânicos, incluindo todos os hidrocarbonetos alifáticos, tem densidades menores que da água, enquanto os compostos orgânicos halogenados têm densidades maiores. Esta propriedade influencia o risco de deriva e o potencial de lixiviação em uma dada situação (Azevedo, 2007).

Trabalhos recentes mostram que alguns produtos fitossanitários, em especial herbicidas, têm sua eficiência elevada na planta com a redução do pH da água a valores próximos a 4,0. A máxima absorção e eficiência de herbicidas com caráter de ácido fraco ocorre em pH em que 50% das moléculas encontram-se dissociadas (pKa) (McCORMICK, 1990). Além disso, em pH mais baixo, a taxa de hidrólise é retardada, mantendo a folha úmida por um maior tempo, pois a superfície das folhas tem um pH neutro, havendo uma interação com o pH da calda. Stahlman e Philips (1979) também verificaram que ao tornar-se uma calda de pulverização mais alcalina, a atividade do glyphosato diminui, resultados encontrados igualmente por Dan et al. (2009). Ao reduzir o pH da solução, há o predomínio da forma não iônica das moléculas desse

herbicida, que possui características apolares, assim, passando através da membrana plasmática das células.

2.6. ADJUVANTES

As formulações de bioherbicidas ou dos seus metabolitos (fitotoxinas) contém o ingrediente ativo (esporos ou metabólitos secundários), o material inerte e os adjuvantes. Estes podem auxiliar na sobrevivência do agente patogênico ou ajudar na proteção do ingrediente ativo de condições ambientais adversas. A busca de uma formulação para o bioherbicida ou seus metabólitos (fitotoxinas) é para aumentar o sucesso destes agentes no campo (Brar et al., 2006) e aumentar o efeito sobre a vida de prateleira do produto, assim, facilitando o desenvolvimento, registro e comercialização do produto futuramente (Ghobani et al., 2005).

No mercado de produtos fitossanitários existem diversos produtos para serem utilizados em conjunto á calda de pulverização, com o intuito de modificar as características físico-químicas. Estes produtos são denominados adjuvantes e podem ser classificados, de acordo com sua atuação, como: quelatizantes e acidificantes, redutores de pH, surfactantes, ativadores nitrogenados, espalhantes adesivo, anti-espumantes, rebaixadores de fitotoxicidade, anti-evaporantes, espessantes, redutores de deriva e filtros solar, além dos adjuvantes complexos que possuem múltiplas funções (KISSMAN, 1997). O mesmo autor definiu de maneira mais complexa os adjuvantes, como sendo qualquer substância ou composto sem propriedade fitossanitária, exceto a água, que é acrescido em conjunto á calda com produto fitossanitário para facilitar a aplicação, aumentar a eficiência ou diminuir os riscos. Outra definição importante citado por diversos autores seria a importância desta classe em melhorar a performance dos produtos devido à alteração das propriedades físico química.

A capacidade de molhamento, a tensão superficial, o balanço hidrofílico-lipofílico (BHL), a concentração micelar critica, o pH, a estrutura química, a solubilização, o depósito, a foto-proteção, os íons trocáveis, entre outros são algumas propriedades de atuação dos adjuvantes, relacionados por Green & Hazen (1998), que influenciam na atividade biológica dos produtos fitossanitários. A melhoria na cobertura vegetal, bem como na penetração e absorção dos produtos fitossanitários nas plantas

decorrente da adição dos adjuvantes, serão obtidas quanto mais semelhantes forem as características físico-químicas da superfície vegetal e dos adjuvantes (Stickler, 1992)

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

Quanto aos grupos de adjuvantes presentes no mercado, existe uma grande variedade, onde estão divididos em surfactantes, óleos (minerais e vegetais), adesivantes, antiespumantes, antievaporantes, antideriva, acidificantes, tamponantes, protetores solares, espessantes, quelatizantes e fertilizantes nitrogenados. Cada grupo possui suas diferentes ações e benefícios, podendo alguns possuir dois ou mais efeitos e/ou propriedades, sendo assim necessários diversos estudos da relação do produto fitossanitário em questão com algum adjuvante (ANTUNIASSI & BOLLER, 2011).

Os surfactantes representam o grupo de adjuvantes com maior número de produtos comerciais, utilizações, pesquisas, mas também dúvidas e controvérsias (MILLER & WESTRA, 1998). A começar pelo uso e definição do termo. Muitas vezes a palavra surfactante tem sido utilizada como sinônimo de adjuvantes, ou vice-versa, para se referir a determinados grupos de substâncias a exemplo de óleos minerais ou vegetais, entre outros. Assim, é importante saber que todo surfactante é um adjuvante, mas nem todo adjuvante é um surfactante. O nome é derivado de agentes ativadores de superfície porque estes componentes facilitam ou melhoram a emulsificação, dispersão, molhamento e adesão das moléculas do agrotóxico no tanque de mistura, bem como reduzem a tensão superficial da água (KIRKWOOD et al., 1999). Os surfactantes têm a capacidade de reduzir a tensão superficial da gota, o que diminui o ângulo de contato

entre as gotas e a cera cuticular da folha, proporcionando maior molhamento e espalhamento sobre a superfície alvo (HESS & FOY, 2000; WAGNER et al., 2003). A propriedade dos surfactantes de reduzir a tensão superficial de líquidos promove o efeito espalhante, molhante ou umectante, espalhante-adesivo, penetrante e dispersante, onde, no geral são as nomenclaturas distintas encontradas nos rótulos dos produtos.

Os surfactantes podem ser divididos em três grupos: os iônicos, os não iônicos e os anfotéricos, sendo os dois primeiros mais comuns (Alister & Kogan, 2003). Os anfotéricos são produtos que, segundo o pH da solução, podem apresentar tanto cargas positivas como negativas ao mesmo tempo (Alterman & Jones, 2003). Os iônicos podem ser divididos em aniônicos ou catiônicos. Aniônicos são polieletrólitos que, quando dissolvidos, liberam íons carregados positivamente, sendo negativamente reativos. Alguns aniônicos são bastante utilizados em formulações de produtos fitossanitários, a nível de campo, o seu uso como adjuvante é pouco comum pois pode alterar o equilíbrio eletrolítico da calda e formar espuma (Durigan & Correia, 2008). Os surfactantes aniônicos são mais eficientes quando utilizados com agrotóxicos de contato. É um agente de superfície ativa na qual a porção ativa da molécula contém um segmento lipofílico formando exclusivamente um íon negativo (ânion) quando colocado em solução aquosa (Hazen, 2000).

Os catiônicos são polieletrólitos que quando dissolvidos liberam íons carregados negativamente, sendo positivamente reativos. Estes são dificilmente utilizados nas formulações de produtos fitossanitários, pois sua reatividade é incompatível com muitos ingredientes ativos e, nas plantas segundo Hazen (2000), os surfactantes catiônicos não podem ser utilizados sozinhos por que usualmente causam fitotoxidez às plantas, possuem fraco poder detergente e precipitam na presença de sais.

Os surfactantes não iônicos tendem a não alterar o equilíbrio de cargas elétricas de caldas e formulações, os mesmos são os mais utilizados e podem ser classificados em etoxilados, propoxilados, polímeros de bloco e organosiliconados. Pelo fato de não interagirem com outros compostos químicos e elementos em suspensão, apresentam baixa toxicidade e fitotoxicidade (Alister & Kogan, 2003). Os organosilicones utilizados como surfatantes organosiliconados com herbicidas foi relatado em 1973 por Jansen, que estudou o potencial dos adjuvantes organosilicone no aumento da atividade dos herbicidas (STEVENS et al.,1992). Outro ponto positivo neste tipo de adjuvantes é sua

contribuição para reduzir o efeito da chuva após aplicação (rainfastness), ou seja, reduz o período mínimo necessário sem chuva para que o herbicida não tenha sua ação comprometida. Também os organossilicones têm demonstrado características superiores para o molhamento e penetração nas folhas via estômatos, eles têm sido amplamente utilizados com os herbicidas e com menos frequência com reguladores de crescimento, nutrientes foliares e inseticidas (NEUMANN & PRINZ, 1974; STEVENS, 1994).

Os óleos vegetais e minerais quando estão na função de adjuvantes podem favorecer o espalhamento e a absorção por apresentarem uma porcentagem variável de surfactante em sua composição, em média de 5 a 9%, reduzindo a taxa de degradação do ingrediente ativo do produto fitossanitário e a tensão superficial da calda. Os óleos vegetais são provenientes do processamento de grãos. Os óleos minerais são originados de uma fração da destilação do petróleo (Mendonça et al., 2007).

Os óleos minerais são constituídos por hidrocarbonetos cuja as moléculas se apresentam nas seguintes formas básicas: parafínica, naftênica, olenífica e aromática. Os aromáticos são os mais fitotóxicos, seguidos de olenífica e naftênica, já os parafínicos são melhor tolerados pelas plantas.

Os óleos vegetais apresentam proporções variadas de ácidos graxos, como o oleico e o linoleico. No Brasil devido a disponibilidade e baixo custo, o óleo de soja é o mais utilizado, depois outros, como óleos de girassol, canola e coco. Porém como estes óleos são pouco estáveis, a utilização de surfactantes na formulação é necessária, aumentando os custos do produto (Kissmans, 1996).

Os fertilizantes a base de amônio ou nitrogênio têm sido adicionados aos herbicidas e apresentam a função de adjuvantes porque ajudam na prevenção de formação de precipitados no tanque de mistura ou sobre a superfície das folhas. Algumas vantagens como a redução da tensão superficial, aumento do espalhamento do produto sobre as folhas, neutralização das cargas iônicas e aumento a penetração do herbicida dentro das folhas, são importantes para a aplicação de produtos fitossanitários. Os fertilizantes amônios usados como adjuvantes incluem a uréia, sulfato de amônio, nitrato de amônio e polifosfato de amônio. A atividade de fertilizantes amônios é função da interação herbicida e espécies específicas e, provavelmente, dependem de vários mecanismos. Os sulfatos de amônio são também usados para reduzir o antagonismo de metais pesados na água da solução pulverizada. Alguns íons, ferro, zinco, magnésio,

sódio, potássio e cálcio podem reagir com certos herbicidas formando precipitados e reduzindo a eficiência do herbicida (NALEWAJA, 1994).

Os adjuvantes podem ser utilizados em conjuntos dos produtos fitossanitários, como herbicidas, inseticidas, fungicidas e outros, como os bioherbicidas ou seus metabólitos. Diversos autores que trabalham com o controle biológico das daninhas testaram a melhora da eficiência dos bioherbicidas com o uso de adjuvantes. A interação de produtos visando elevar a efetividade no controle de plantas daninhas, por exemplo, pode ocorrer a melhora esperada ou piorar o controle. Neste ponto, a mistura de produtos fitossanitários com adjuvantes pode ter um efeito aditivo ou sinérgico quando o efeito dos produtos das misturas aumentam a eficiência no controle. Ou ainda, pode ocorrer o efeito antagônico quando o efeito da mistura diminui o efeito do produto fitossanitário (ANTUNIASSI & BOLLER, 2011). Assim é importante o conhecimento das características físico químicas dos produtos, e estudar o comportamento dos produtos em misturas.

Green et al. (2007) relatou a utilização de tensoativos e surfactantes nas suspensões líquidas dos bioherbicidas ou dissolvidos em micelas, o que provoca o aparecimento de microemulsões para melhorar a eficiência do bioherbicida. Os surfactantes podem ser classificados em grupos com base em sua ionização em água e isso pode dar alguma pista sobre como um surfactante novo ou inexperiente vai se comportar em um ambiente de controle biológico. Os surfactantes habitualmente utilizados, Tween 20, Tween 80 de Triton X-100 e o Tergitol são surfactantes não iônicos. Estes compostos têm sido os mais utilizados para a experimentação inicial. Uma desvantagem deste tipo de surfactante não iônico é de que ajudam a quebrar a cutícula, podendo estimular na planta a produção de compostos e induzindo a resistência ou mesmo promovendo a entrada de microrganismos capazes de induzir a proteção cruzada, ambos os quais podem retardar o crescimento do patógeno. Outros agentes tensoativos que atuam como agentes emulsionantes são utilizados com formulações mais complexas, tais como aquelas que envolvem suspensões de esporos à base de óleo (Roskopf et al., 1999).

Gronwald et al. (2002) estudou o efeito do possível bioherbicida *Pseudomonas syringae* pv. *Tagetis* em conjunto com o adjuvante Silwet L-77 para o biocontrole de Canada thistle (*Cirsium arvense*), pouco encontrada no Brasil. O efeito do Silwet L-77

foi estudado previamente por estes autores, verificando à necessidade da adição de Silwet L-77, um surfactante de organo-silicone, à suspensão de aplicação para facilitar a entrada de bactérias em folhas. Silwet L-77 facilita o movimento das bactérias nos estômatos e hidatódios baixar a tensão superficial. Os resultados foram consistentes com o relatório anterior que uma concentração de 0,2% (v / v) ou superior de Silwet L-77 foi necessária para a penetração máxima de *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola* nas folhas.

Borges et al.(1998) estudaram o efeito de 10 adjuvantes no desenvolvimento de um bioherbicidas com propágulos de *Cercospora caricis*, visando a melhor distribuição e adesão dos propágulos sobre a superfície das folhas. Neste trabalho, os autores observaram maior porcentagem de folhas mortas causadas pelo bioherbicida com a utilização do adjuvante metamucil, e maior porcentagem de folhas com sintomas de fitotoxicidade com a utilização dos adjuvantes Tween 20, AgBem e Haiten. Borges Neto e Pitelli (2004) relataram os efeitos da adição de adjuvantes e a associação com herbicida na infectividade do fungo *Fusarium graminearum*, para o biocontrole de plantas aquáticas, *Egeria densa* e *Egeria najas*.

Um estudo foi realizado por Zhang et al. (2003), onde tentou determinar se certos surfactantes (Tween: 20, 40, 80 e Tergitol NP série: 9, 10) e adjuvantes (sorbitol e gelatina) seriam componentes úteis em formulações bioherbicida de *Colletotrichum sp.* (10 isolados) e *Phoma sp.* (5 isolados). O efeito dos adjuvantes sobre a germinação de esporos e crescimento micelial variou com os adjuvantes. Tween 20 reduziu a germinação e crescimento micelial em alguns isolados de *Phom sp.a* e *Colletotrichum sp.*, enquanto que Tween 40 e Tween 80 estimulou a germinação sem efeitos negativos sobre o crescimento micelial de todos os isolados. Tergitol NP muitas vezes reduziu a germinação e crescimento micelial, e não houve tendências nas respostas fúngicas para sorbitol. As respostas de *Colletotrichum sp.* foram altamente variável para gelatina, mas para o *Phoma sp.*, gelatina aumentou a germinação e crescimento micelial. Em resumo, a gelatina, o Tween 40, e Tween 80 eram componentes úteis para formulações bioherbicida para aumentar a germinação de esporos e crescimento micelial de *Phoma sp.*, enquanto que Tween 40 e Tween 80 foram úteis para *Colletotrichum sp.*.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Manutenção e conservação da cepa:

A cepa de *Phoma sp.* (NRRL Y-7571) foi obtida no *National Center for Agricultural Utilization Research* – EUA (ARS) e ativada em meio líquido de cultivo (meio contendo Glicose 10g/l, Peptona 10g/l, Extrato levedura 7,5g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7,5g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g/l, MgSO_4 0,5g/l, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1g/l), em frascos Erlenmeyer de 250mL, contendo 50mL de meio. Os frascos foram incubados em estufa bacteriológica na temperatura de 28°C durante 5 dias. Após este período, a suspensão bacteriana foi empregada para inocular novos tubos de ensaio contendo meio BDA inclinado (cultivo de superfície, 28°C por 5 dias). Periodicamente, novos procedimentos de ativação e cultivo foram realizados para a manutenção do microrganismo, ocorrendo a repicagem do fungo em placas em meio BDA.

3.2. Fermentação Submersa:

3.2.1. Pré-inóculo

O preparo do pré-inóculo foi feito a partir da cepa conservada á 4°C em refrigerador em placas, onde as mesmas permaneciam 2 dias em estufa bacteriológica para ativação, e depois serem repicadas em outras placas. As placas repicadas permaneciam 5 dias na estufa. O pré-inóculo foi através da transferência direta de discos (2 cm de diâmetro) retirados das placas repicadas utilizando tubos de ensaio para dar uniformidade, sendo colocados em frascos de Erlenmeyer de 125mL contendo 50mL de meio Batata e dextrose (BD). Os frascos foram vedados e incubados em estufa bacteriológica à temperatura de 28°C, durante 5 dias sem agitação.

3.2.2. Preparo do Inóculo

Frascos Erlenmeyer de 125mL, contendo 50mL de meio de cultivo, descrito anteriormente, foram inoculados com 7g suspensão microbiana obtida na etapa anterior (pré-inóculo). A massa microbiana era macerada em cadinho.

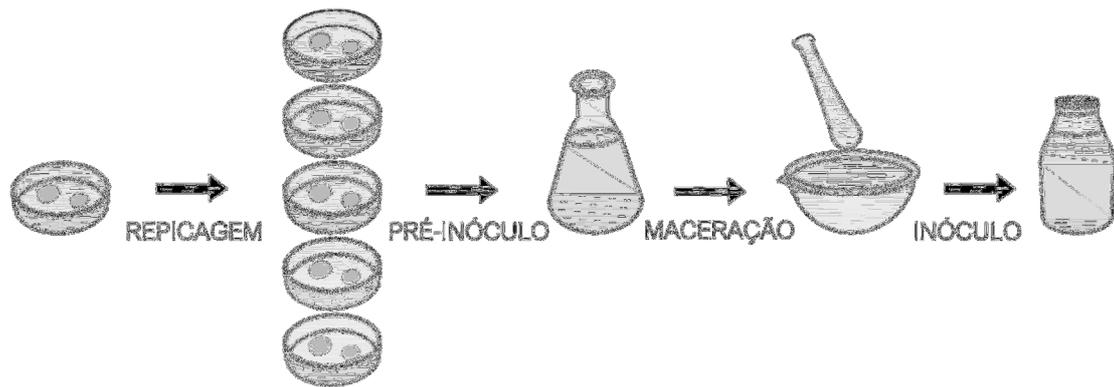


Fig 1: Fluxograma para o preparo do inóculo.

3.2.3. Substrato:

Água de maceração de milho (A.M.M), obtido junto a Empresa Corn Products Brasil (Mogi Guaçu, SP, Brasil) e sacarose de qualidade alimentar (Açúcar Cristal), comprado em um mercado local, foram utilizados neste experimento como meio líquido.

3.2.4. Biorreator:

Foi utilizado um biorreator STR de tanque agitado encamisado da marca Tecnal, com volume de 4,5 litros, altura de 43 cm e largura de 32 cm, conectado a um banho termostático TE-2005, com refrigeração e controlador independente, e conectado também a um compressor.



Fig 2: Biorreator Tecnal

3.2.5. Condições de cultivo:

Para a esterilização do biorreator, o mesmo foi acondicionado em autoclave a 110°C por 45 min. A utilização do meio de cultura foi com 10% de AMM e 20g/L de açúcar, sendo neste trabalho utilizados 300ml de AMM e 60 g de açúcar. Estas proporções foram descritas por Klaic (2014), assim como o cultivo do fungo em pH 6,0. Os parâmetros utilizados no processo foram pH 6,0, 15% de oxigenação dissolvido, agitação de 50 rpm, temperatura de 28°C e a malha de aeração variando de 1,0 ate 7,0 L/min, conforme a porcentagem de oxigênio dissolvido durante o processo.

Após a esterilização, o biorreator permanecia 6 horas polarizando seus sensores de pH (calibrados previamente antes da esterilização) e oxigênio dissolvido. Depois deste período, os acessórios eram conectados ao biorreator, realizada a calibração do oxigênio e da espuma. O sistema apresenta quatro bombas peristálticas, onde na segunda foi adicionado um anti -espumante siliconado, na terceira uma solução NaOH 2M e na quarta uma solução ácido acético 2M. Pela primeira bomba peristáltica foi adicionado o inoculo.

Passados cinco dias de fermentação submersa (conforme Klaic (2014)), ocorreu à separação da biomassa do caldo fermentado (fitotoxina do fungo). A fitotoxina era armazenada para posteriores formulações.

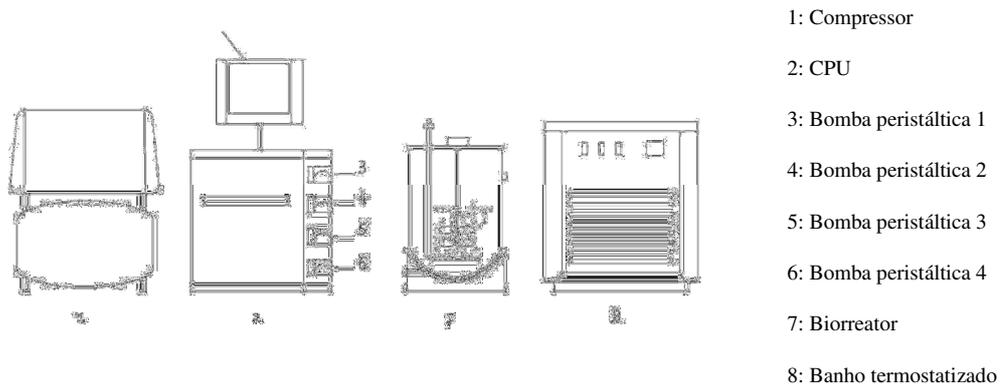


Fig. 3: Visão geral do biorreator e outros equipamentos.

3.3. Misturadores/Agitadores

As formulações foram preparadas através de misturadores mecânico Turrax e por Ultrassom, conforme as figuras abaixo.



Fig 4: Agitador mecânico Turrax e agitador ultrassom, respectivamente.

3.4. pH

O pH foi medido através de um pHmetro de bancada, temperatura de 25°C, para as 17 formulações do DCCR em cada tipo de misturador.

3.5. Estabilidade e Volume de espuma

A estabilidade da calda foi avaliada de forma visual. Após o preparo das formulações, as mesmas foram mantidas em repouso por 30, 60, 360, 60, 720 e 1440 min, verificando a formação de fases na solução: estável (monofásica) e instável (bifásica). Os sinais positivos (+) indicam estabilidade da calda no referido tempo, e os sinais negativos (-) representam instabilidade da calda.

Depois de realizada cada formulação com Agitador mecânico Turrax e por Ultrassom eram medidas a altura da espuma, quando formada, para posteriormente transformar em porcentagem de volume.



Fig 5: No lado esquerdo temos um exemplo de (-) estabilidade e do lado direito (+) estabilidade, respectivamente.

3.6. Densidade

O equipamento utilizado para a determinação da densidade a 20°C foi um densímetro DMA 4500 M que determina a densidade ou a concentração de um líquido. A medição é baseada no princípio comprovado de tudo em U oscilante assegurando valores de densidade altamente exatos. As amostras eram inseridas no aparelho através

de uma seringa, utilizando em torno de 3 ml de cada amostra, sendo realizada uma triplica para cada ensaio.



Fig 6: Densímetro DMA 4500 M.

3.7. Viscosidade

Para a determinação da viscosidade das diferentes formulações, foi utilizado um viscosímetro da marca Brookfield. O instrumento é equipado com rotores/cilindros de diâmetros diferentes (spindles), onde é utilizado o cilindro adequado conforme a viscosidade do fluido. O viscosímetro foi acoplado a um banho termostático, permitindo assim mensurar a viscosidade a uma temperatura de 25°C.

Para a medição dos tratamentos do planejamento DCCR foram utilizados o rotor 1 e rotação de 60 rpm, sendo realizada triplicatas para cada tratamento.

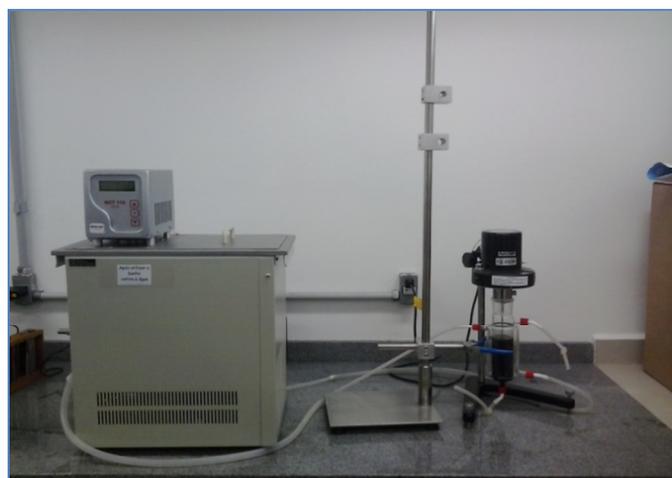


Fig 7: Banho termostático e viscosímetro Brookfield.

3.8. Tensão Superficial

A tensão superficial foi determinada em um tensiômetro da marca Kruss, K6, empregando o método de anel Du Nouy (Dopierala & Prochaska, 2008). O teste consiste em medir a tensão sofrida pelo anel que fica na extremidade de uma haste flexível, colocada sobre a superfície da amostra e pressionada contra esta até que sofra repulsão. O tensiômetro foi calibrado com água mili-Q.



Fig 8: Tensiômetro de bancada com anel de platina (Kruss, K6).

3.9. Bioensaio

3.9.1. *Screening* Primário - Atividade herbicida em pré-emergência

Os testes de seleção primária do possível poder herbicida da Fitotoxina do fungo *Phoma Sp.*, visam a identificação da capacidade para inibir a germinação de sementes e/ou o desenvolvimento de plântulas. Como plantas testes nos bioensaios de laboratório foram utilizadas pepino (*Cucumis sativus*) e sorgo (*Sorghum bicolor*). Muito embora não sejam plantas daninhas, essas espécies são utilizadas em testes com herbicidas químicos, pois são sensíveis a estes herbicidas e são de uso frequente em bioensaios para detecção de resíduos de herbicidas sintéticos no solo. Além disso, as sementes dessas espécies possuem germinação rápida, uniforme e não apresentam dormência. O pepino e o sorgo representam as classes das dicotiledôneas e monocotiledôneas respectivamente, as quais apresentam comportamento diferenciado em resposta à aplicação de herbicidas sintéticos.

Para o bioensaio foram realizados testes de germinação para os 17 ensaios do DCCR, em cada tipo de misturador. Anterior aos ensaios do DCCR, foram realizados

testes de germinação para 100% (v/v) da Fitotoxina, água destilada e com silwet 2%(v/v) em conjunto do Aporte Plus 2%(v/v). Para cada tratamento foram dispostas 50 sementes de Pepino e sorgo entre duas folhas de papel Germitest esterilizadas, com quatro repetições, num total de 200 sementes de pepino e sorgo. Foi utilizado um total de 35 ml de solução para cada tratamento. Os tratamentos foram realizados durante 7 dias em BOD á 28°C, para depois ser realizada a contagem das sementes. Buscando não superestimar os ensaios do DCCR, a porcentagem de germinação tanto para o pepino como para o sorgo em água destilada foi descrita como sendo 0% de controle. A média das 4 repetições (cada uma com 50 sementes) foi de 48,25 sementes germinadas do pepino, enquanto o sorgo obteve media de 48,50 sementes germinadas.

3.9.2. Screening secundário – Atividade herbicida em pós-emergência

O possível poder herbicida da fitotoxina do fungo *Phoma Sp.* foi determinado através da aplicação das diferentes fórmulas do DCCR em quatro espécies bioindicadoras, sendo as dicotiledôneas alface (*Lactuca sativa* L. – Asteraceae) e pepino (*Cucumis sativus*), incluindo as monocotiledôneas cebola (*Allium cepa* L. - Alliaceae) e sorgo (*Sorghum bicolor*), a qual são representantes de famílias de plantas invasoras de culturas de interesse agrícola. Para os 17 ensaios do DCCR aplicados neste experimento foram utilizado para a formulação o agitador ultrassom, devido a resultados de testes que serão exemplificados posteriormente.

Foram colocadas sementes das quatro espécies para germinar em bandejas de isopor, e após 15 dias da emergência as mesmas foram transplantadas para copos plásticos com substrato, sendo cada copo com três mudas. As mudas nos copos foram deixadas em bandejas com água, para ocorrer à aclimação das espécies. Passados dois dias do transplante das mudas nos copos, ocorreu a aplicação do herbicida. Os ensaios foram aplicados utilizando pulverizador costal de CO₂.

Para cada ensaio haviam três copos de pepino, alface, sorgo e cebola. Adicionalmente aos 17 ensaios do DCCR foram aplicados três ensaios, sendo: silwet 2% v/v + Aporte 2% v/v, fitotoxina 50% v/v e uma testemunha sem aplicação. Após ocorrer cada aplicação, os ensaios foram colocados em bandejas, com um total de doze copos com quatro espécies dispostas aleatoriamente. Todas as bandejas permaneceram com

lâminas d'água e colocadas em casa de vegetação. As avaliações foram aos 5 dias após aplicação (DAA), comparando a testemunha como 0% de controle e 100% para plantas totalmente mortas.

3.10. Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica® 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA), considerando-se um nível de significância de 90%. A otimização do poder herbicida da fitotoxina foi testado a utilização de utilização de dois tipos de adjuvantes, onde, um o surfactante e outro uma fonte de nitrogênio. Para o primeiro foi utilizado um surfactante organossiliconado chamado Silwet L-77, e para o segundo um adjuvante chamado Aporte Plus que apresenta na sua formulação alguns nutrientes, em especial nitrogênio.

Para este propósito, um delineamento composto central rotacional para três variáveis independentes foi proposto, 2^3 com pontos centrais e axiais. A gama de variáveis investigada foi as concentrações da fitotoxina do fungo *Phoma sp* 15 a 55% v/v, Silwet L-77 0 a 2% v/v e Aporte Plus 0 a 2% v/v, conforme a Tabela 1 abaixo.

Tabela 1: Delineamento composto central rotacional (DCCR) para três variáveis independentes.

		-1,68	-1	0	1	1,68
Fitotoxina (%v/v)	X1	4,8	15	30	45	55,2
Aporte Plus (%v/v)	X2	0	0,4	1,0	1,6	2,0
Silwet L-77(%v/v)	X3	0	0,4	1	1,6	2,0

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1.pH

A influência da composição da formulação é apresentada na Tabela 2, onde verifica-se que o uso de diferentes agitadores (US e mecânico) não influenciou o pH das diferentes formulações, tendo em vista que os valores entre os agitadores foram similares. No entanto, houve variações de pH entre as formulações. Os valores de pH permaneceram entre 4,3 e 6,4, descartando-se a possibilidade deste fator ter sido responsável por alterações no comportamento germinativo das espécies nos testes de germinações (Favaretto, 2011).

Tabela 2: Matriz do desenho DCCR para avaliar a influência no pH para os misturadores mecânico e ultrassom, nas diferentes concentrações de Fitotoxina, Aporte Plus e Silwet L-77.

	Fitotoxina (%v/v)	Aporte Plus (%v/v)	Silwet (%v/v)	US pH	Mec pH
Fitotoxina	55	--	--	6,4	6,4
1	15 (-1)	0,4 (-1)	0,4 (-1)	5,3	5,3
2	45 (1)	0,4 (-1)	0,4 (-1)	5,5	5,7
3	15 (-1)	1,6 (1)	0,4 (-1)	5,1	4,9
4	45 (1)	1,6 (1)	0,4 (-1)	5,4	5,3
5	15 (-1)	0,4 (-1)	1,6 (1)	5,4	5,4
6	45 (1)	0,4 (-1)	1,6 (1)	5,8	5,8
7	15 (-1)	1,6 (1)	1,6 (1)	4,7	4,7
8	45 (1)	1,6 (1)	1,6 (1)	5,4	5,4
9	4,8 (-1,68)	1,0 (0)	1,0 (0)	4,7	4,3
10	55,2 (1,68)	30 (0)	1,0 (0)	5,3	5,0
11	30 (0)	0 (-1,68)	1,0 (0)	5,2	5,3
12	30 (0)	2,0 (1,68)	1,0 (0)	5,3	5,1
13	30 (0)	1,0 (0)	0 (-1,68)	5,8	5,8
14	30 (0)	1,0 (0)	2,0 (1,68)	5,1	5,1
15	30 (0)	1,0 (0)	1,0 (0)	5,3	5,3
16	30 (0)	1,0 (0)	1,0 (0)	5,0	5,3
17	30 (0)	1,0 (0)	1,0 (0)	5,4	5,5

Os dados da Tabela 2 foram usados para calcular os efeitos das variáveis no valor final do pH e os dados estão apresentados na Figura 9 sob a forma de gráfico de Pareto. Pode-se observar que o adjuvante aporte Plus e a concentração da Fitotoxina influenciaram significativamente os valores de pH. Porém, o efeito da concentração do

Aporte Plus foi negativo, significa que o aumento do valor do mesmo conduziu em uma diminuição na concentração do pH. A concentração da fitotoxina, significativa também nas formulações, mostrou se que ao aumentar sua concentração maior será o pH (mais básico).

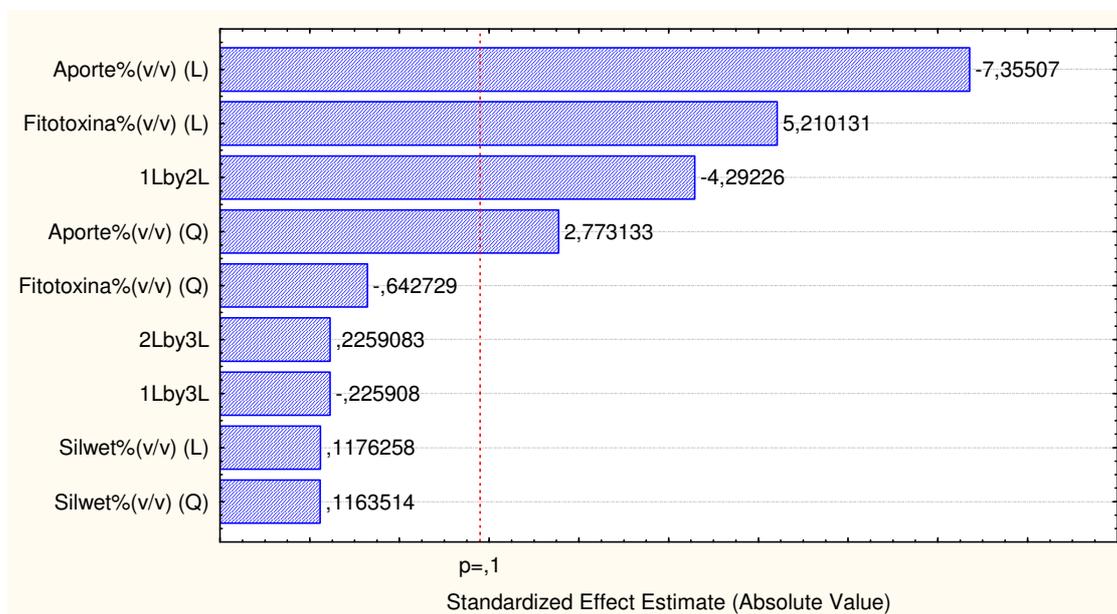


Fig. 9. Gráfico de Pareto mostrando os efeitos de termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes sobre a DCCR para o pH nas formulações.

Em termos de características para a aplicação dos produtos sobre possíveis plantas daninhas, o pH dos 17 ensaios das formulações permaneceram próximo do valor de pH entre 4,0 a 7,0) que auxilia no aumento da eficiência do produto. Nesta faixa, o pH retarda a taxa de hidrólise, mantendo a folha úmida por um maior tempo (Dan et al., 2009).

4.2. Estabilidade e volume de espuma

Através das tabelas 3 e 4, observa se os dados de estabilidade das formulações, onde, os sinais positivos (+) indicam estabilidade da calda no referido tempo e os sinais negativos (-) representam instabilidade. A estabilidade da formulação para os produtos fitossanitários detêm importância no momento da aplicação destes produtos, pois influenciam no processo de formação das gotas. O conhecimento desta característica é importante para o processo de aplicação dos produtos fitossanitários.

Tabela 3: Matriz do desenho DCCR para avaliar a influência na estabilidade aos 30 minutos, 1 hora e 6 horas para os misturadores mecânico e ultrassom, nas diferentes concentrações de Fitotoxina, Aporte Plus e Silwet L-77.

	Fitotoxina (%v/v)	Aporte Plus (%v/v)	Silwet (%v/v)	30	30	1h	1h	6h	6h
				min	min	US	Mec	US	Mec
1	15 (-1)	0,4 (-1)	0,4 (-1)	+	+	+	+	+	+
2	45 (1)	0,4 (-1)	0,4 (-1)	+	+	+	+	+	+
3	15 (-1)	1,6 (1)	0,4 (-1)	+	+	+	+	+	+
4	45 (1)	1,6 (1)	0,4 (-1)	+	+	+	+	+	+
5	15 (-1)	0,4 (-1)	1,6 (1)	+	+	+	+	+	+
6	45 (1)	0,4 (-1)	1,6 (1)	+	+	+	+	+	+
7	15 (-1)	1,6 (1)	1,6 (1)	+	+	+	+	+	+
8	45 (1)	1,6 (1)	1,6 (1)	+	+	+	+	+	+
9	4,8 (-1,68)	1,0 (0)	1,0 (0)	+	+	+	+	+	+
10	55,2 (1,68)	30 (0)	1,0 (0)	+	+	+	+	+	+
11	30 (0)	0 (-1,68)	1,0 (0)	+	+	+	+	+	+
12	30 (0)	2,0 (1,68)	1,0 (0)	+	+	+	+	+	+
13	30 (0)	1,0 (0)	0 (-1,68)	+	+	+	+	+	+
14	30 (0)	1,0 (0)	2,0 (1,68)	+	+	+	+	+	+
15	30 (0)	1,0 (0)	1,0 (0)	+	+	+	+	+	+
16	30 (0)	1,0 (0)	1,0 (0)	+	+	+	+	+	+
17	30 (0)	1,0 (0)	1,0 (0)	+	+	+	+	+	+

Tabela 4: Matriz do desenho DCCR para avaliar a influência na estabilidade as 12 horas e 24 horas para os misturadores mecânico e ultrassom, nas diferentes concentrações de Fitotoxina, Aporte Plus e Silwet L-77.

	Fitotoxina (%v/v)	Aporte Plus (%v/v)	Silwet (%v/v)	12h	12h	24h	24h
				US	Mec	US	Mec
1	15 (-1)	0,4 (-1)	0,4 (-1)	+	-	+	-
2	45 (1)	0,4 (-1)	0,4 (-1)	+	-	+	-
3	15 (-1)	1,6 (1)	0,4 (-1)	+	-	+	-
4	45 (1)	1,6 (1)	0,4 (-1)	+	-	+	-
5	15 (-1)	0,4 (-1)	1,6 (1)	+	-	+	-
6	45 (1)	0,4 (-1)	1,6 (1)	+	-	+	-
7	15 (-1)	1,6 (1)	1,6 (1)	+	-	+	-
8	45 (1)	1,6 (1)	1,6 (1)	+	-	+	-
9	4,8 (-1,68)	1,0 (0)	1,0 (0)	+	-	+	-

10	55,2 (1,68)	30 (0)	1,0 (0)	+	-	+	-
11	30 (0)	0 (-1,68)	1,0 (0)	+	-	+	-
12	30 (0)	2,0 (1,68)	1,0 (0)	+	-	+	-
13	30 (0)	1,0 (0)	0 (-1,68)	+	-	+	-
14	30 (0)	1,0 (0)	2,0 (1,68)	+	-	+	-
15	30 (0)	1,0 (0)	1,0 (0)	+	-	+	-
16	30 (0)	1,0 (0)	1,0 (0)	+	-	+	-
17	30 (0)	1,0 (0)	1,0 (0)	+	-	+	-

Nota-se que as formulações obtidas com o uso do Ultrassom mantiveram-se estáveis por 24 horas, diferente do misturador mecânico que conseguiu manter a estabilidade apenas por 6 horas. Como pré-tratamento, o ultrassom normalmente é usado na indústria para limpeza de materiais, solda de plásticos, processos químicos, preparação de emulsão e suspensão, de gaseificação de solventes, entre outros. O ultrassom é um método físico que reduz o grau de cristalinidade, diminui o grau de polimerização e também ajuda a reduzir o tamanho das partículas, podendo ser usado diferentes potências (MIGUEL, 2009). Então, para o preparo das formulações de emulsões deste trabalho, o ultrassom apresentou importante característica de estabilidade e de volume de espuma, como pode ser visualizado na tabela 5.

Observando a tabela 5, nota se que o ultrassom misturou as formulações sem a formação de espuma, característica importante para a aplicação de produtos fitossanitários.

Tabela 5: Matriz do desenho DCCR para avaliar a influência na formação de espuma para os misturadores mecânico e ultrassom, nas diferentes concentrações de Fitotoxina, Aporte Plus e Silwet L-77.

	Fitotoxina (%v/v)	Aporte Plus (%v/v)	Silwet L-77 (%v/v)	US	Mec
				Espuma (%V/V)	Espuma (%V/V)
1	15 (-1)	0,4 (-1)	0,4 (-1)	0,0	5,9
2	45 (1)	0,4 (-1)	0,4 (-1)	0,0	9,5
3	15 (-1)	1,6 (1)	0,4 (-1)	0,0	7,2
4	45 (1)	1,6 (1)	0,4 (-1)	0,0	11,5
5	15 (-1)	0,4 (-1)	1,6 (1)	0,0	4,3
6	45 (1)	0,4 (-1)	1,6 (1)	0,0	5,9

7	15 (-1)	1,6 (1)	1,6 (1)	0,0	4,5
8	45 (1)	1,6 (1)	1,6 (1)	0,0	6,5
9	4,8 (-1,68)	1,0 (0)	1,0 (0)	0,0	3,6
10	55,2 (1,68)	30 (0)	1,0 (0)	0,0	8,7
11	30 (0)	0 (-1,68)	1,0 (0)	0,0	7,0
12	30 (0)	2,0 (1,68)	1,0 (0)	0,0	7,8
13	30 (0)	1,0 (0)	0 (-1,68)	0,0	11,1
14	30 (0)	1,0 (0)	2,0 (1,68)	0,0	4,3
15	30 (0)	1,0 (0)	1,0 (0)	0,0	7,4
16	30 (0)	1,0 (0)	1,0 (0)	0,0	7,0
17	30 (0)	1,0 (0)	1,0 (0)	0,0	7,0

Segundo Mendonça et al.(2004), a espuma formada durante o preparo da calda no tanque de pulverização não é uma característica desejável, uma vez que geralmente faz-se necessário interromper a adição de água quando a espuma começa a transbordar do tanque. Assim, a espuma ocupa um volume que deveria estar preenchido pela água, tornando a calda mais concentrada do que o programado, e/ou mesmo pode prolongar o tempo de preparo da calda de pulverização, ao aguardar a sua dissipação.

As formulações quando misturadas por misturador mecânico, apresentaram formação de espuma para os 17 ensaios. Pela Figura 10 podemos visualizar que num intervalo de confiança de 90%, a produção de espuma está ligada diretamente ao aumento da concentração da fitotoxina. Já o aumento do Silwet L-77 diminui a formação de espuma.

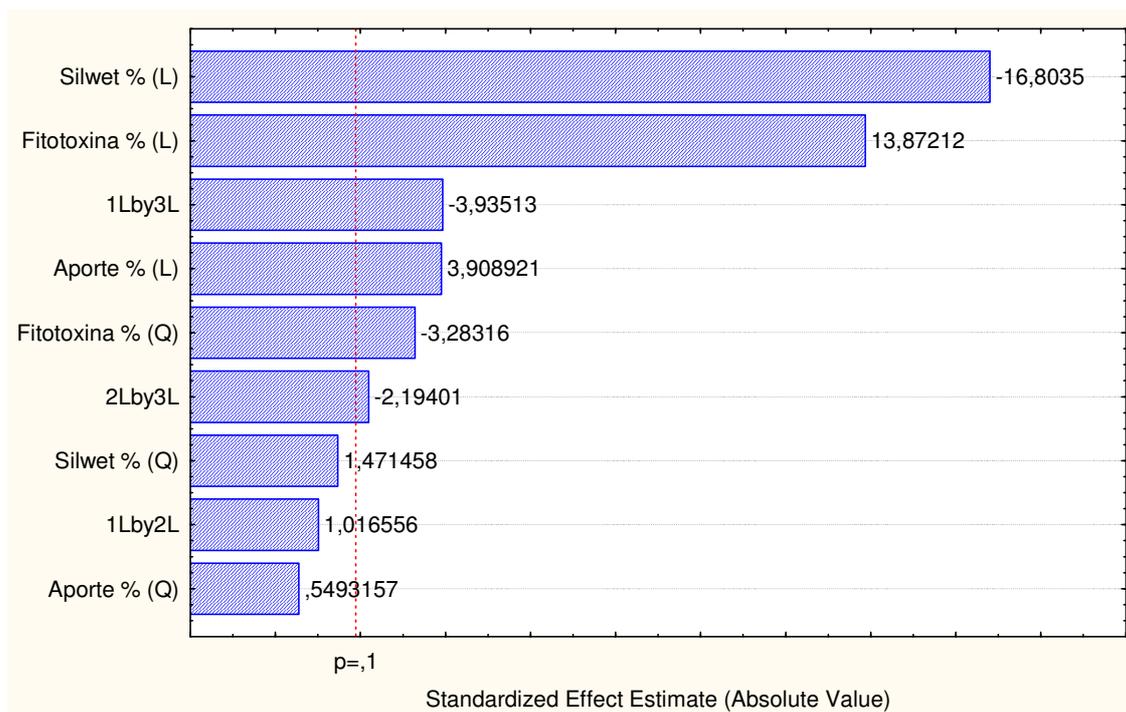


Fig. 10. Gráfico de Pareto mostrando os efeitos de termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes sobre a DCCR para a formação de espuma nas formulações utilizando misturador mecânico.

4.3. Viscosidade

Na Tabela 6 estão os resultados encontrados para a viscosidade nos 17 ensaios. Além destes, foram realizadas a determinação da viscosidade da água e da fitotoxina (100%v/v) a 25°C, com ambas apresentando valores próximos a 0,9 mPa.s. A análise estatística foi através do software Statistica® 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA), considerando o nível de confiança de 90%. Todos os ensaios mostraram um acréscimo na viscosidade com a adição dos adjuvantes.

Tabela 6: Matriz do desenho DCCR para avaliar a influência na viscosidade para os misturadores mecânico e ultrassom, nas diferentes concentrações de Fitotoxina, Aporte Plus e Silwet L-77.

	Fitotoxina (%v/v)	Aporte Plus (%v/v)	Silwet (%v/v)	Viscosidade (mPa.S) 25°C	
				US	Mec
1	15 (-1)	0,4 (-1)	0,4 (-1)	1,4	1,4
2	45 (1)	0,4 (-1)	0,4 (-1)	1,2	1,2

3	15 (-1)	1,6 (1)	0,4 (-1)	1,4	1,4
4	45 (1)	1,6 (1)	0,4 (-1)	1,2	1,2
5	15 (-1)	0,4 (-1)	1,6 (1)	1,6	1,6
6	45 (1)	0,4 (-1)	1,6 (1)	1,4	1,4
7	15 (-1)	1,6 (1)	1,6 (1)	1,6	1,6
8	45 (1)	1,6 (1)	1,6 (1)	1,4	1,4
9	4,8 (-1,68)	1,0 (0)	1,0 (0)	1,8	1,8
10	55,2 (1,68)	30 (0)	1,0 (0)	1,4	1,4
11	30 (0)	0 (-1,68)	1,0 (0)	1,4	1,4
12	30 (0)	2,0 (1,68)	1,0 (0)	1,5	1,5
13	30 (0)	1,0 (0)	0 (-1,68)	1,0	1,0
14	30 (0)	1,0 (0)	2,0 (1,68)	1,5	1,5
15	30 (0)	1,0 (0)	1,0 (0)	1,4	1,4
16	30 (0)	1,0 (0)	1,0 (0)	1,4	1,4
17	30 (0)	1,0 (0)	1,0 (0)	1,5	1,5

A partir da tabela 6, podemos observar que entre os misturadores não houve diferença para a viscosidade das 17 formulações. Observando a Figura 11, nota-se que as concentrações de fitotoxina e do Silwet L-77 influenciaram estatisticamente na viscosidade, onde a concentração do Silwet L-77 aumentou a viscosidade com aumento de sua concentração. Por outro lado, o aumento da concentração da fitotoxina levou a diminuição da viscosidade, causado maior número de gotas finas e assim facilmente perdidas por deriva. Os resultados encontrados para viscosidade apresentaram valores condizentes a outros autores que estudaram o comportamento. Conforme McMullan (2000), os adjuvantes a base de polímeros tendem a alterar as propriedades viscoelásticas da pulverização onde o líquido tende a resistir ao alongamento e ao aumento da taxa de cisalhamento. Com a alteração desses dois fatores o líquido formado pelas pontas será mais grosso, gerando um espectro de gotas com maior diâmetro mediano volumétrico (DMV) e menor fração de gotas finas. Segundo Reichard e Zhu (1996), os adjuvantes que aumentam a viscosidade são adicionados às caldas para aumentar o DMV e, conseqüentemente, reduzir a deriva e muitos pesquisadores têm investigado os efeitos de sua adição. Oliveira (2011) caracterizou diversos adjuvantes quanto às suas propriedades físico-químicas, entre elas a viscosidade. O Silwet L-77 foi um dos adjuvantes que manteve a viscosidade próxima a 1,1 mPa.s, resultado semelhante ao encontrado neste trabalho.

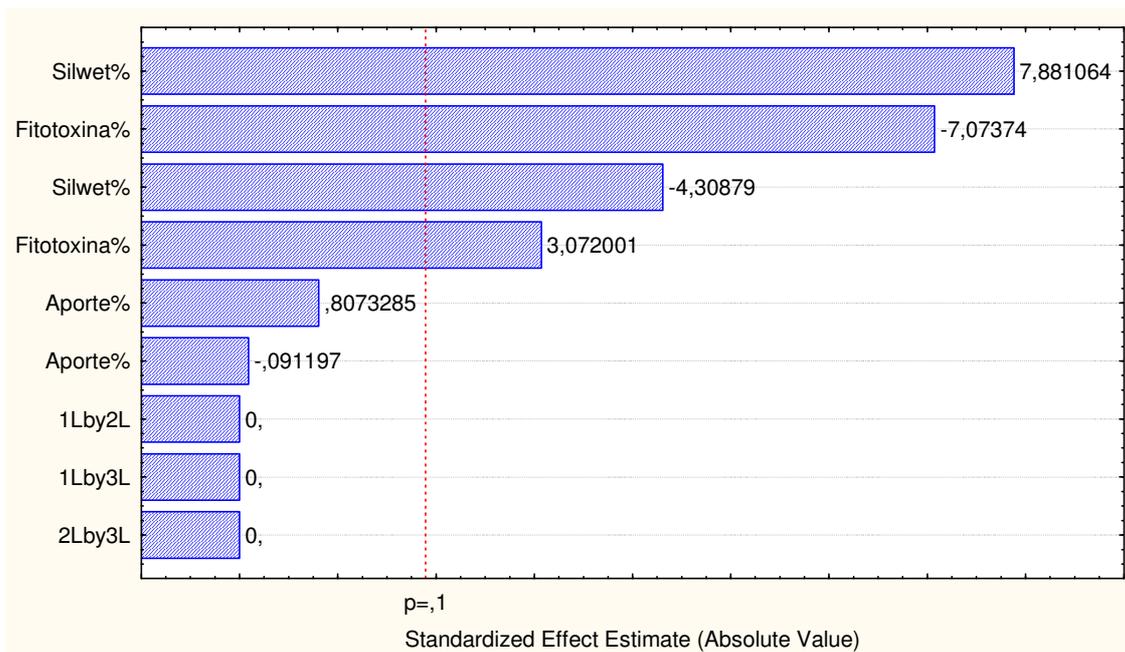


Fig. 11. Gráfico de Pareto mostrando os efeitos de termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes sobre a DCCR para a viscosidade nas formulações.

4.4. Densidade

A Tabela 7 apresenta os valores de densidade a 25°C para os 17 ensaios do DCCR, com as diferentes concentrações de fitotoxina, Silwet L-77 e Aporte Plus. Para todas as formulações, independente do tipo de agitador, não houve diferença estatística entre os valores de densidade.

Tabela 7: Matriz do desenho DCCR para avaliar a influência na densidade a 25°C para os misturadores mecânico e ultrassom, nas diferentes concentrações de Fitotoxina, Aporte Plus e Silwet L-77.

	Fitotoxina (%v/v)	Aporte Plus (%v/v)	Silwet (%v/v)	US	Mec
				Densidade (g cm ⁻³) 25°C	Densidade (g cm ⁻³) 25°C
Água destilada	--	--	--	0,9986	0,9986
Fitotoxina	100	--	--	1,0022	1,0022

1	15 (-1)	0,4 (-1)	0,4 (-1)	1,0052	1,0044
2	45 (1)	0,4 (-1)	0,4 (-1)	1,0160	1,0159
3	15 (-1)	1,6 (1)	0,4 (-1)	1,0107	1,0107
4	45 (1)	1,6 (1)	0,4 (-1)	1,0194	1,0189
5	15 (-1)	0,4 (-1)	1,6 (1)	1,0052	1,0053
6	45 (1)	0,4 (-1)	1,6 (1)	1,0174	1,0161
7	15 (-1)	1,6 (1)	1,6 (1)	1,0067	1,0083
8	45 (1)	1,6 (1)	1,6 (1)	1,0188	1,0189
9	4,8 (-1,68)	1,0 (0)	1,0 (0)	1,0029	1,0033
10	55,2 (1,68)	30 (0)	1,0 (0)	1,0217	1,0218
11	30 (0)	0 (-1,68)	1,0 (0)	1,0042	1,0040
12	30 (0)	2,0 (1,68)	1,0 (0)	1,0105	1,0100
13	30 (0)	1,0 (0)	0 (-1,68)	1,0710	1,0690
14	30 (0)	1,0 (0)	2,0 (1,68)	1,0170	1,0162
15	30 (0)	1,0 (0)	1,0 (0)	1,0770	1,0790
16	30 (0)	1,0 (0)	1,0 (0)	1,0790	1,0750
17	30 (0)	1,0 (0)	1,0 (0)	1,0760	1,0790

Diferenças não significativas nos valores de densidade para as diferentes formulações adjuvantes e concentrações foram encontradas por Cunha e Alves (2009). Assim como neste trabalho, as alterações de valores de densidade ocorreram nas duas últimas casas decimais, concordando com Matuo et al. (1989), os quais descrevem que as concentrações empregadas nos adjuvantes são pequenas, onde a dose não influencia a densidade das soluções.

4.5. Tensão superficial

Na Tabela 8 são apresentados os dados de tensão superficial obtidos nas 17 formulações do DCCR. Inicialmente foi verificado os valores das tensões superficiais da fitotoxina (100%v/v) e da água, apresentando valores 45 mN m⁻¹ e 69 mN m⁻¹, respectivamente. Valores estes que para aplicação de produtos fitossanitários apresentam baixa capacidade de retenção quando aplicados à cutícula das plantas (Montorio, 2001).

Tabela 8: Matriz do desenho DCCR para avaliar a influência na tensão superficial para os misturadores mecânico e ultrassom, nas diferentes concentrações de Fitotoxina, Aporte Plus e Silwet L-77.

	Fitotoxina (%v/v)	Aporte Plus (%v/v)	Silwet (%v/v)	US	Mec
				Tensão superficial	Tensão superficial
Água	--	--	--	69,0a ¹	69,2a
Fitotoxina	100	--	--	45,5b	45,2b
1	15 (-1)	0,4 (-1)	0,4 (-1)	20,4d	20,4d
2	45 (1)	0,4 (-1)	0,4 (-1)	20,5d	20,3d
3	15 (-1)	1,6 (1)	0,4 (-1)	20,6d	20,5d
4	45 (1)	1,6 (1)	0,4 (-1)	20,5d	20,6d
5	15 (-1)	0,4 (-1)	1,6 (1)	20,3d	20,1d
6	45 (1)	0,4 (-1)	1,6 (1)	20,4d	20,3d
7	15 (-1)	1,6 (1)	1,6 (1)	20,4d	20,4d
8	45 (1)	1,6 (1)	1,6 (1)	20,5d	20,4d
9	4,8 (-1,68)	1,0 (0)	1,0 (0)	20,3d	20,3d
10	55,2 (1,68)	30 (0)	1,0 (0)	20,5d	20,3d
11	30 (0)	0 (-1,68)	1,0 (0)	20,4d	20,3d
12	30 (0)	2,0 (1,68)	1,0 (0)	20,3d	20,5d
13	30 (0)	1,0 (0)	0 (-1,68)	25,1c	25,5c
14	30 (0)	1,0 (0)	2,0 (1,68)	20,2d	20,5d
15	30 (0)	1,0 (0)	1,0 (0)	20,1d	20,4d
16	30 (0)	1,0 (0)	1,0 (0)	20,3d	20,4d
17	30 (0)	1,0 (0)	1,0 (0)	20,1d	20,1d

¹ 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 de resultados entre os misturadores para a tensão superficial. Todos os ensaios apresentaram menores valores para as tensões superficiais, quando comparado com a fitotoxina 100%v/v. Entre as 17 formulações do DCCR, apenas o ensaio 13 apresentou diferença estatística significativa, evidenciando que a presença de Silwet L-77 é eficiente para a redução da tensão superficial, cujo resultado é similar aos encontrados por Sun & Foy (1998) e Montorio (2001). Em trabalho realizado com o Silwet L-77, BreakThru e o Haiten, Montório (2001) obteve resultados que confirmam a mesma tendência encontrada, ou seja, maior capacidade de redução de tensão para os organossiliconados e menores para outros, como o Haiten (32,04 mN.m⁻¹).

O Aporte Plus também apresentou grande eficiência na redução da tensão superficial, pois reduziu o valor para 25 mN m⁻¹. Iost et al. (2010) testou seis surfactantes comerciais em soluções aquosas, verificando a tendência do Silwet L-77 de reduzir a tensão superficial próximo a 20 mN m⁻¹, por outro lado, três outros

surfactantes apresentaram resultados acima de 40 mN m⁻¹. Estes resultados evidenciaram um excelente poder de redução da tensão superficial do adjuvante Aporte Plus.

4.6. Screening Primário - Atividade herbicida em pré-emergência.

A atividade herbicida da fitotoxina do fungo *Phoma sp.* em conjunto dos adjuvantes silwett ® L-77 e Aporte plus, foi testada através de testes de germinação em BOD, utilizando sementes bioindicadoras, sendo o pepino (*Cucumis sativus*) para dicotiledôneas (folhas largas) e o sorgo (*Sorghum bicolor*) para monocotiledôneas (gramíneas). Testes iniciais foram realizados para representar melhor o potencial de controle, para isso, testou-se a germinação do sorgo e do pepino com água destilada, fitotoxina (100%v/v), Silwet L-77 (2%v/v) e Aporte plus (2%v/v), conforme descrito anteriormente. Os resultados para o controle de germinação para as sementes de pepino foram 0%, 58,60%, 2% e 0%, respectivamente. Os resultados para sorgo foram semelhantes, modificando apenas o controle de germinação para a fitotoxina, que obteve controle 43,41%. Assim, ambos os adjuvantes não apresentaram influência nas germinações.

A Tabela 9 apresenta os resultados do planejamento DCCR para controle de germinação do pepino e sorgo, sendo formulados a partir da agitação mecânica e ultrassom. Não houve diferença estatística (p<0.1) nos resultados de germinação entre os agitadores. Tendo em vista que os resultados para volume de espuma e estabilidade foram melhores usando o ultrassom, assim, somente serão analisados os dados obtidos com ultrassom, pois o resultado será similar ao obtido com agitador mecânico.

Tabela 9: Matriz do desenho DCCR para avaliar a influência no controle de germinação nas sementes de pepino e sorgo para os misturadores mecânico e ultrassom, nas diferentes concentrações de Fitotoxina, Aporte Plus e Silwet L-77.

	Fitotoxina (%v/v)	Aporte Plus (%v/v)	Silwet (%v/v)	Pepino		Sorgo	
				US %	MEC %	US %	MEC %
Água destilada	--	--	--	0,0	0,0	0,0	0,0
1	15 (-1)	0,4 (-1)	0,4 (-1)	57,0	56,0	45,1	39,4
2	45 (1)	0,4 (-1)	0,4 (-1)	95,3	100,0	87,0	84,2

3	15 (-1)	1,6 (1)	0,4 (-1)	79,8	78,0	74,6	70,5
4	45 (1)	1,6 (1)	0,4 (-1)	97,9	97,0	95,3	94,7
5	15 (-1)	0,4 (-1)	1,6 (1)	81,9	80,3	77,7	100,0
6	45 (1)	0,4 (-1)	1,6 (1)	100,0	100,0	98,4	100,0
7	15 (-1)	1,6 (1)	1,6 (1)	89,6	88,9	85,0	86,5
8	45 (1)	1,6 (1)	1,6 (1)	100,0	100,0	99,0	100,0
9	4,8 (-1,68)	1,0 (0)	1,0 (0)	67,9	65,3	45,1	42,0
10	55,2 (1,68)	30 (0)	1,0 (0)	100,0	100,0	100,0	100,0
11	30 (0)	0 (-1,68)	1,0 (0)	95,3	93,0	95,0	94,5
12	30 (0)	2,0 (1,68)	1,0 (0)	100,0	100,0	100,0	100,0
13	30 (0)	1,0 (0)	0 (-1,68)	97,4	96,4	93,8	91,2
14	30 (0)	1,0 (0)	2,0 (1,68)	100,0	100,0	100,0	100,0
15	30 (0)	1,0 (0)	1,0 (0)	100,0	100,0	100,0	100,0
16	30 (0)	1,0 (0)	1,0 (0)	100,0	100,0	100,0	100,0
17	30 (0)	1,0 (0)	1,0 (0)	100,0	100,0	100,0	100,0

Os resultados apresentados na Tabela 9 para o ultrassom demonstram o efeito inibitório na germinação para as sementes de pepino e sorgo. Para as 17 ensaios do DCCR o efeito inibitório ou efeito herbicida da fitotoxina demonstrou uma semelhança no comportamento entre as monocotiledôneas e dicotiledôneas no decorrer dos ensaios. Porém, em alguns ensaios foram obtidos 100% de controle de germinação das sementes em ambas as classes. Bailey et al. (2011) realizou estudo para produção de um bioherbicida granulado com o fungo *Phoma Sp.*, evidenciando um efeito maior deste nas sementes dicotiledôneas do que nas monocotiledôneas.

O controle de germinação nas sementes de pepino variou de 57,0% até 100%, já no sorgo variou de 45,1% até 100%. O ensaio 1 apresentou a menor resposta quanto ao controle de germinação, tanto para as sementes de pepino e quanto nas de sorgo, respectivamente, 57,0% e 45,1%. Os ensaios que apresentaram controle de germinação de 100% para pepino e sorgo, foram os ensaios 10, 12, 14 e os pontos centrais.

Os resultados apresentados na Tabela 9, para o agitador Ultrassom, foram utilizados para construir um modelo quadrático expressando o potencial de controle de germinação em função das três variáveis independentes. Eq. 1 e Eq. 2 apresentam os termos significativos do modelo ($p < 0,1$) e nível de confiança de 90%, respectivamente, para pepino e para o sorgo.

$$CGp = 100,35 + 10,17 * Fit - 6,87Fit^2 + 3,0*Ap + 3,36*sil \quad (1)$$

$$CGs = 100,36 + 13,89 * Fit - 10,95Fit^2 + 3,96 * Ap + 5,02 * sil \quad (2)$$

Onde:

Fit: concentração da fitotoxina do fungo Phoma Sp

Ap: Concentração do adjuvante Aporte Plus.

Sil: Concentração do adjuvante Silwet L-77.

Os termos significativos dos modelos podem ser usados para discutir a influência da formulação no efeito inibitório da germinação. Para o pepino, ambos os termos lineares das concentrações da fitotoxina, Aport Plus e Silwet L-77 foram estatisticamente significativos, onde as concentrações de fitotoxina apresentaram efeito mais acentuado sobre as outras duas variáveis. As interações das concentrações de fitotoxina com Silwet L-77 e fitotoxina com o Aport Plus não foram estatisticamente significativas, mesmo assim, nota se que o efeito dessas interações são importantes no controle de germinação das sementes de pepino, conforme a Figura 12, por encontrarem-se muito próximo do nível de significância. Já para o sorgo, apenas as concentrações da fitotoxina (temo linear e quadrático), Aport Plus e Silwet L-77 apresentaram resultados significativos estatisticamente, conforme a Figura 13.

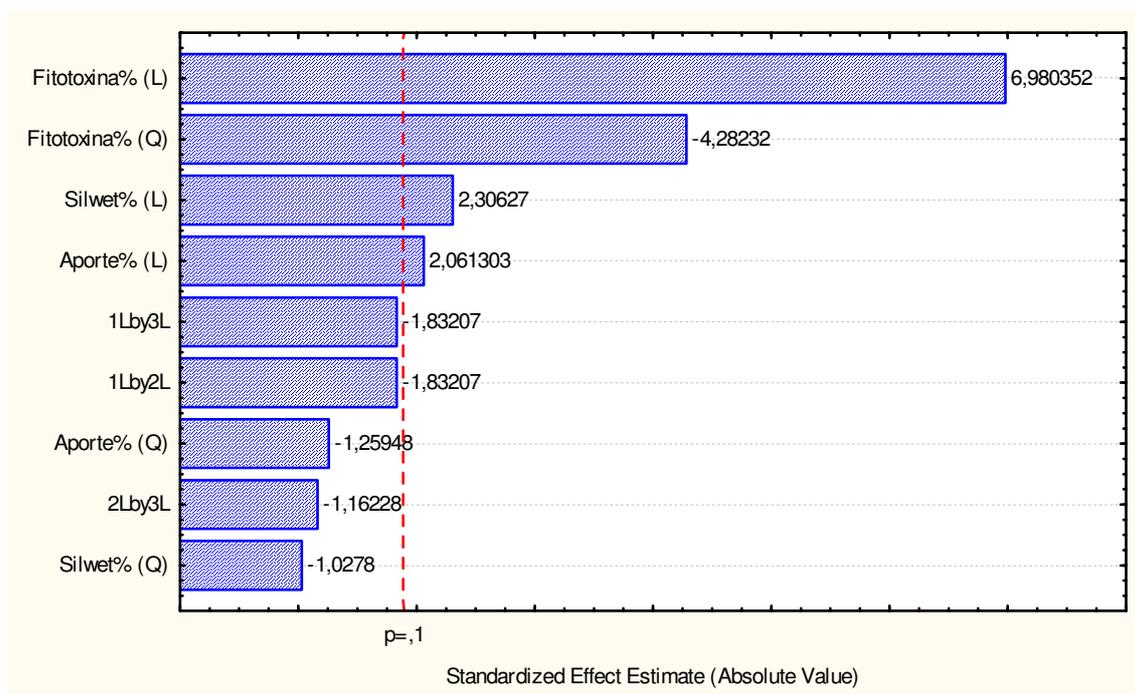


Fig. 12. Gráfico de Pareto mostrando os efeitos de termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes sobre a DCCR para o controle de germinação nas sementes de pepino.

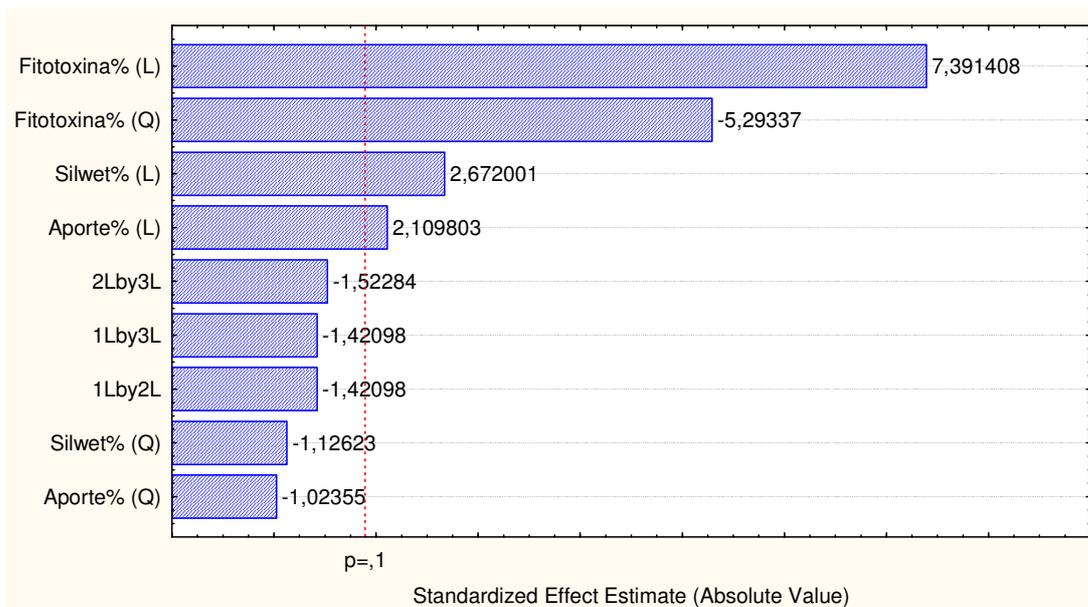


Fig. 13. Gráfico de Pareto mostrando os efeitos de termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes sobre a DCCR para o controle de germinação nas sementes de sorgo.

Ambos os modelos foram validados pela análise de variância (ANOVA). O F-teste calculado para Eq. 1 e Eq. 2 foram cerca de 32 e 37 vezes maiores do que o valor tabelado e o coeficiente de determinação (R^2) foi 0,9237 e 0,9207, respectivamente. Os valores elevados para o coeficiente de determinação indicam bom ajuste dos dados experimentais, permitindo a utilização de tal modelo para prever o efeito inibitório de germinação para pepino e sorgo. Os modelos validados foram utilizados para otimizar as formulações perante ao efeito inibitório de germinação, e os resultados obtidos são apresentados na Fig. 14, Fig. 15, Fig. 16, Fig. 17, Fig. 18 e Fig. 19 na forma de gráficos de contorno.

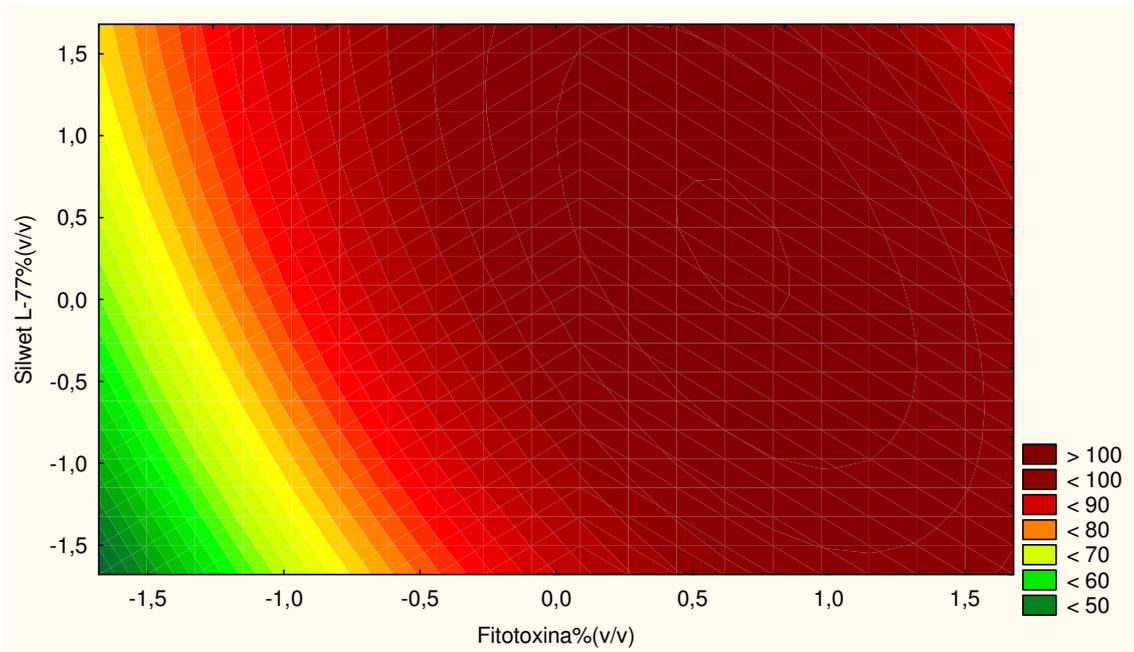


Fig. 14. Gráficos de contorno que expressam o efeito inibitório na germinação das sementes de pepinos nas 17 diferentes formulações do DCCR.

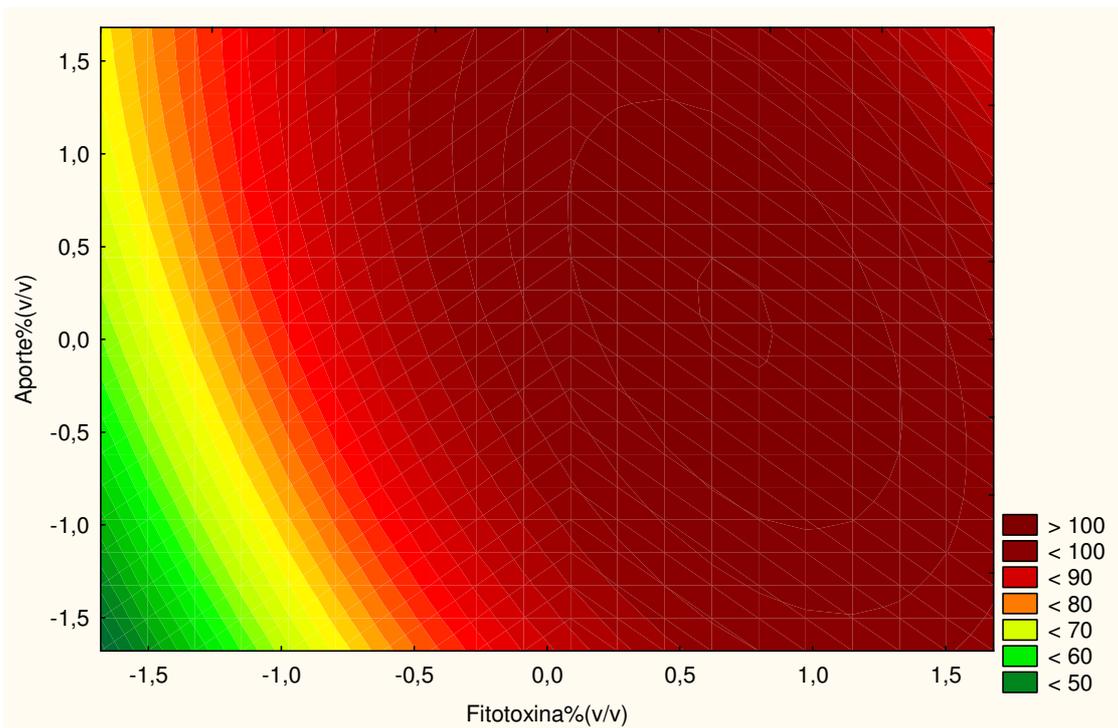


Fig. 15. Gráficos de contorno que expressam o efeito inibitório na germinação nas sementes de pepino das 17 diferentes formulações do DCCR.

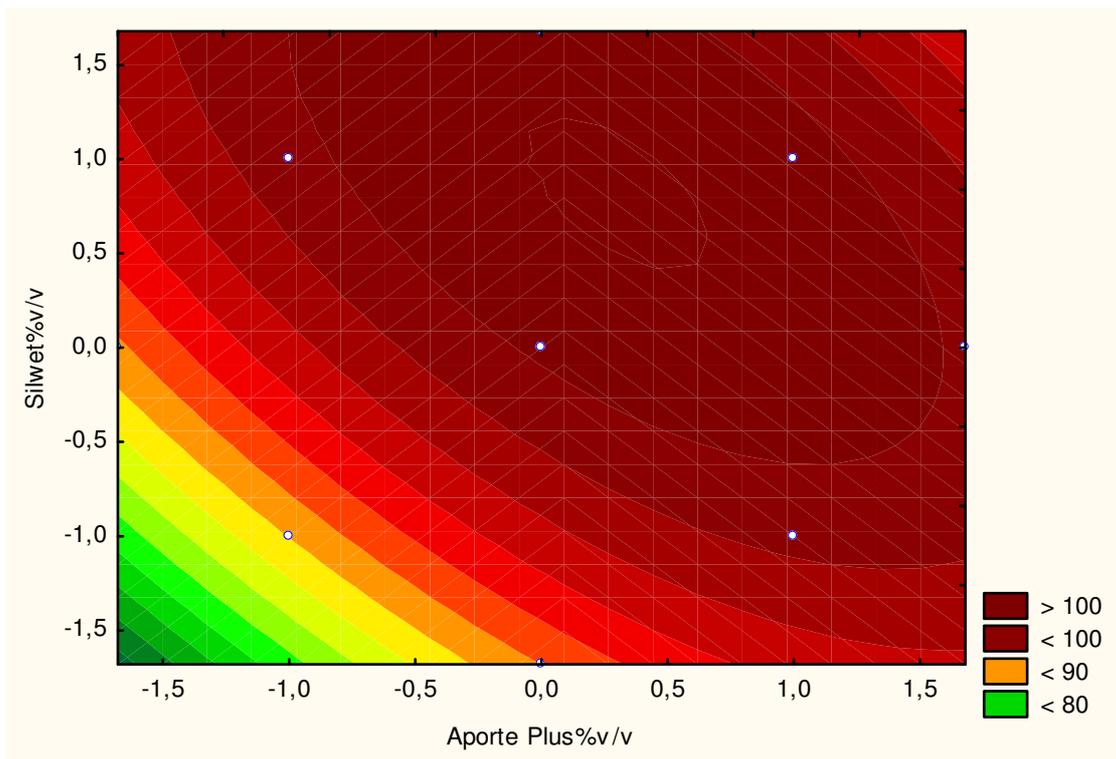


Fig. 16. Gráficos de contorno que expressam o efeito inibitório na germinação nas sementes de pepino das 17 diferentes formulações do DCCR.

A Figura 14 apresenta a influência da concentração da fitotoxina e concentração do Silwet L-77 no controle da germinação nas sementes de pepino, enquanto a Figura 15 apresenta a influência da concentração da fitotoxina e concentração do adjuvante Aporte Plus. Pela superfície de contorno da Figura 14 pode se observar que os maiores controles ficam na faixa da concentração da fitotoxina variando 30 a 55(%V/V), e para a concentração do Silwet L-77 de 0,4 a 2,0 (%V/V). O modelo permite afirmar que existe uma região ótima na superfície de contorno, além disso, é possível afirmar que a condição otimizada foi encontrada para concentração de 30%V/V de fitotoxina e concentração de 1%V/V para o Silwet L-77. Observando a Figura 15, nota se que o comportamento da superfície de controle do adjuvante Aporte Plus com a concentração da fitotoxina variou de 30 a 45(%V/V), e para a concentração do Aporte Plus de 0,4 a 1,6 (%V/V). Pela Figura 16 podemos observar uma região ótima na superfície de controle entre os adjuvantes, com a concentração do Silwet L-77 variando de 0,5 a 2,0 (%V/V), e para a concentração do Aporte Plus de 0,2 a 2,0 (%V/V).

A Figura 17 apresenta a influência da concentração da fitotoxina e concentração do Silwet L-77 no controle da germinação nas sementes de sorgo, enquanto a Figura 18

apresenta a influência da concentração da fitotoxina e concentração do adjuvante Aporte Plus. Na figura 17, os melhores resultados em termos de inibição da germinação foram obtidos na faixa de concentração da Fitotoxina entre 30 a 45(%V/V), e para a concentração do Silwet L-77 de 0,4 a 2,0 (%V/V). Resultados similares foram obtidos na Figura 18. A Figura 19 mostrou que o modelo permite afirmar a existência de uma região ótima na superfície de contorno, podendo assim, prever a concentração dos adjuvantes na busca do controle eficiente desta classe de plantas.

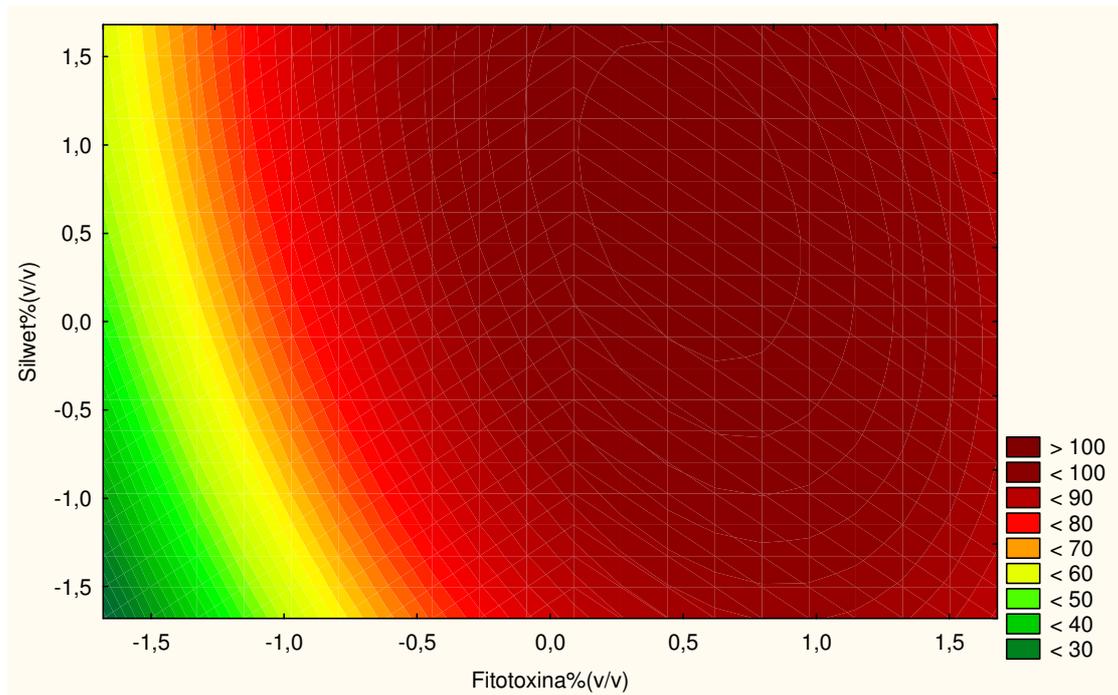


Fig. 17. Gráficos de contorno que expressam o efeito inibitório na germinação nas sementes de sorgo das 17 diferentes formulações do DCCR.

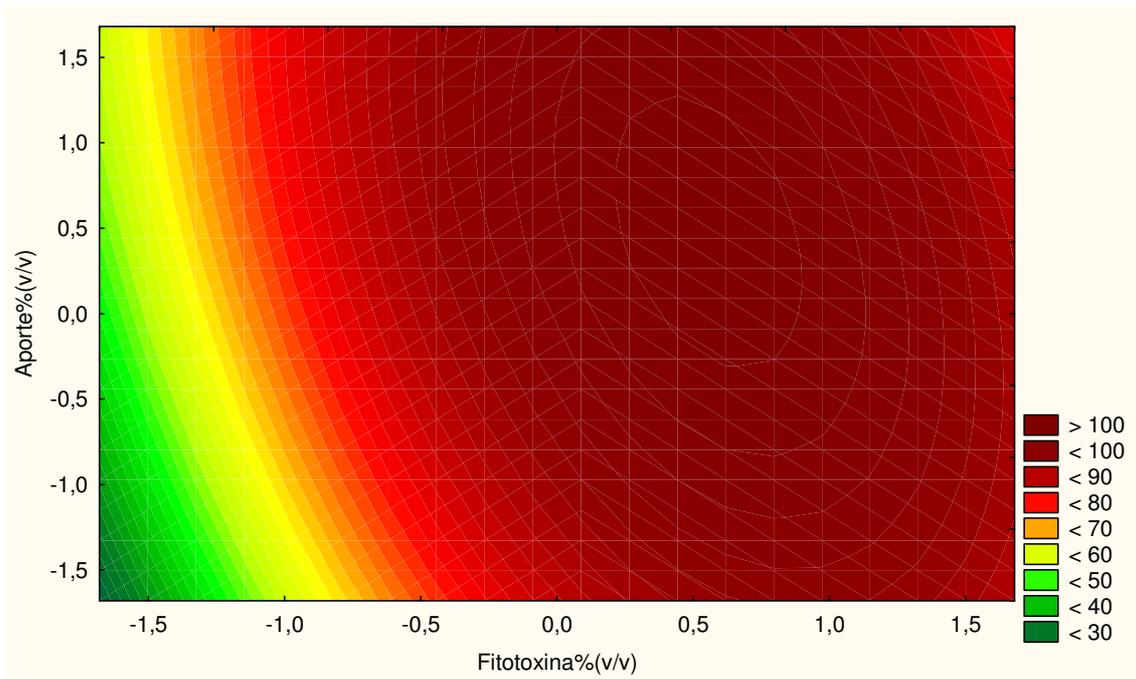


Fig. 18. Gráficos de contorno que expressam o efeito inibitório na germinação nas sementes de sorgo das 17 diferentes formulações do DCCR.

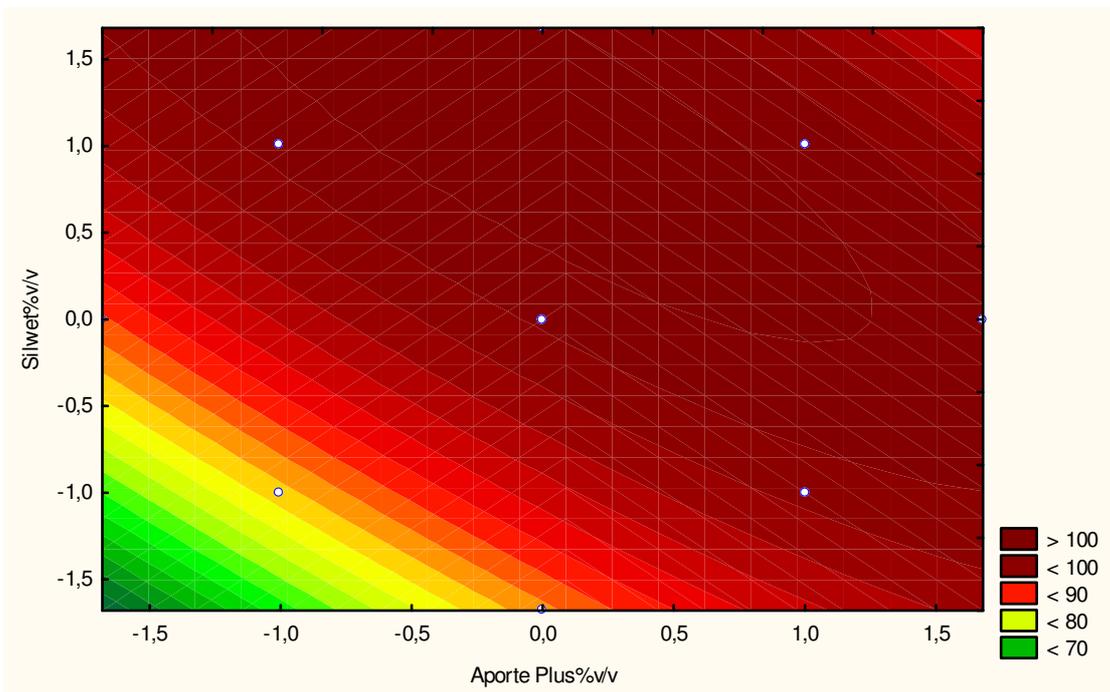


Fig. 19. Gráficos de contorno que expressam o efeito inibitório na germinação nas sementes de sorgo das 17 diferentes formulações do DCCR.

Diversos trabalhos na literatura, tanto para herbicidas químicos como herbicidas biológicos (incluindo bioherbicidas, fitotoxinas, etc), já comprovaram os efeitos positivos da utilização de adjuvantes nas formulações ou mesmo nos tanques de aplicação (Brar et al, 2006; Gronwald et al., 2002; . Borges Neto & Pitelli, 2004). Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com a literatura, pois o herbicida biológico testado (fitotoxina do fungo *Phoma Sp.*) e formulado em conjunto de adjuvantes, melhorou significativamente a sua eficiência no controle de germinação das semente dicotiledôneas e monocotiledôneas.

4.7. *Screening* secundário – Atividade herbicida em pós-emergência

Para avaliar o possível poder herbicida da fitotoxina em conjunto dos adjuvantes, foi realizado a aplicação dos 17 ensaios do DCCR em plantas daninhas bioindicadoras. Os resultados do percentual de controle dos ensaios sobre alface (*Lactuca sativa* L. – Asteraceae), pepino (*Cucumis sativus*. – Cucurbitaceae), cebola (*Allium cepa* L. - Alliaceae) e sorgo (*Sorghum bicolor* - Poaceae) podem ser visualizados na tabela 10. Vale ressaltar que além dos 17 ensaios do DCCR, foram aplicados outros dois, sendo a testemunha (sem aplicação nenhuma) e Silwet L-77 2%v/v + Aporte Plus 2%v/v, podendo ser visualizado na figura 23.

Tabela 10: Matriz do DCCR com os resultados em termos de controle percentual obtidos nos ensaios de aplicação pós-emergência aos 5 DAA para cada planta bioindicadora.

	Fitotoxina (%v/v)	Aporte Plus (%v/v)	Silwet (%v/v)	Pepino	Sorgo	Alface	Cebola
1	15 (-1)	0,4 (-1)	0,4 (-1)	100,0a ¹	95,0b	40,0h	40,0h
2	45 (1)	0,4 (-1)	0,4 (-1)	100,0a	85,0c	60,0e	50,0f
3	15 (-1)	1,6 (1)	0,4 (-1)	100,0a	85,0c	50,0g	60,0e
4	45 (1)	1,6 (1)	0,4 (-1)	100,0a	95,0b	60,0e	70,0d
5	15 (-1)	0,4 (-1)	1,6 (1)	100,0a	80,0d	55,0f	45,0g
6	45 (1)	0,4 (-1)	1,6 (1)	100,0a	85,0c	65,0d	50,0f
7	15 (-1)	1,6 (1)	1,6 (1)	100,0a	100,0a	60,0e	60,0e
8	45 (1)	1,6 (1)	1,6 (1)	100,0a	100,0a	75,0c	85,0b
9	4,8 (-1,68)	1,0 (0)	1,0 (0)	100,0a	95,0b	55,0f	45,0g
10	55,2 (1,68)	1,0 (0)	1,0 (0)	100,0a	100,0a	100,0a	100,0a
11	30 (0)	0 (-1,68)	1,0 (0)	100,0a	100,0a	80,0b	70,0d
12	30 (0)	2,0 (1,68)	1,0 (0)	100,0a	100,0a	100,0a	100,0a
13	30 (0)	1,0 (0)	0 (-1,68)	100,0a	100,0a	55,0f	80,0c
14	30 (0)	1,0 (0)	2,0 (1,68)	100,0a	100,0a	100,0a	100,0a
15	30 (0)	1,0 (0)	1,0 (0)	100,0a	100,0a	100,0a	100,0a

16	30 (0)	1,0 (0)	1,0 (0)	100,0a	100,0a	100,0a	100,0a
17	30 (0)	1,0 (0)	1,0 (0)	100,0a	100,0a	100,0a	100,0a

¹ Médias não seguidas pelas mesmas letras nas colunas diferem entre si pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

O pepino mostrou ser a espécie mais sensível, pois em todos os ensaios obteve-se 100% de controle após 5 DAA. O sorgo foi à segunda espécie mais sensível as formulações, onde obteve-se controle sobre o mesmo maior de 85%. Conforme Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a média de controle que um herbicida deve promover para ser considerado viável e pleitear um registro junto ao órgão citado são de 80% (MAPA, 2011).

Os resultados para alface e cebolinha foram os que apresentaram as maiores variações entre os experimentos, indicando que dependendo da formulação diferentes níveis de ação podem ser obtidos. Por esta razão, os dados da Tabela 10 referentes ao controle de alface e cebolinha foram usados para o cálculo dos efeitos de cada variável independente na resposta de cada uma das plantas bioindicadoras, os quais estão apresentados a seguir sob a forma do gráfico de pareto, considerando um nível de confiança de 90%.

A Figura 20 mostra os efeitos das variáveis independentes no controle de alface. Os termos lineares das concentrações da fitotoxina e do Silwet I-77 foram significativos e apresentaram valores positivos, indicando que o aumento dos seus valores pode levar a maior eficiência no controle. Os termos quadráticos negativos para as concentrações da fitotoxina e do Silwet I-77 indicam que há um ponto de máximo na faixa estudada. Os ensaios 10, 12, 14 e pontos centrais foram as melhores formulações para o controle de 100% da alface.

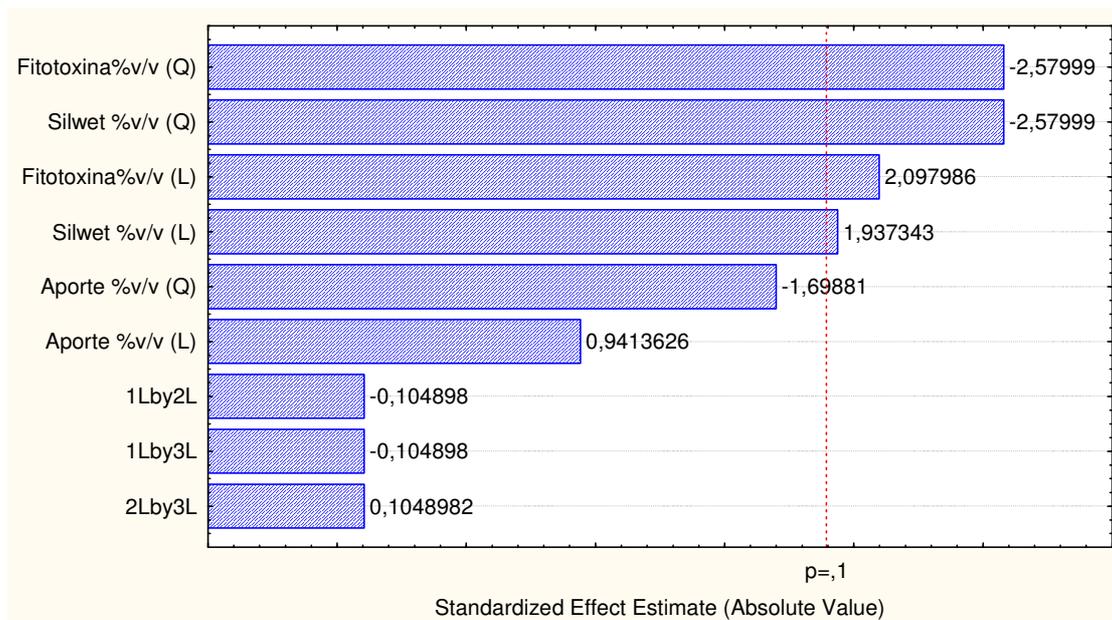


Fig. 20. Gráfico de Pareto mostrando os efeitos de termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes sobre a DCCR para o controle da alface.

Os efeitos das variáveis independentes no controle da Cebola são mostrados na Figura 21. Os termos lineares das concentrações da fitotoxina e do Aporte Plus foram significativos e apresentaram valores positivos, indicando que o aumento dos seus valores pode levar a maior eficiência no controle. O termo quadrático negativo para a concentração da fitotoxina indica que há um ponto de máximo na faixa estudada. Os ensaios 10,12,14 e pontos centrais apresentaram controle de 100% sobre a Cebola, porem, o ensaio 13 também obteve controle satisfatório, controle de 85%.

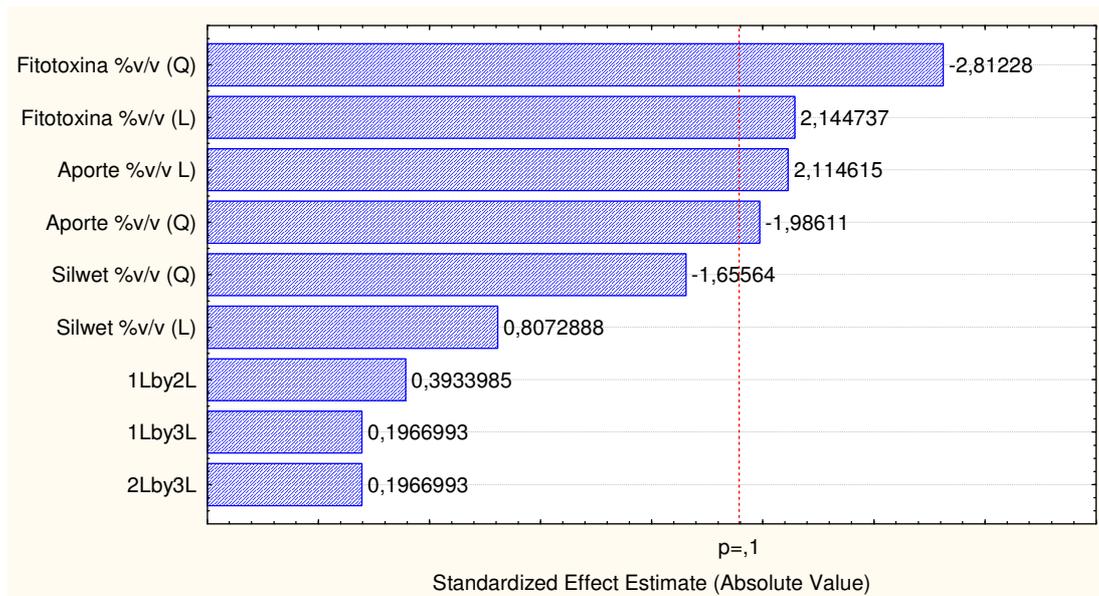


Fig. 21. Gráfico de Pareto mostrando os efeitos de termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes sobre a DCCR para o controle de germinação nas sementes de cebola.

As melhores eficiências no controle para as duas espécies monocotiledôneas e as duas espécies dicotiledôneas foram constatadas nos ensaios 10, 12, 14 e pontos centrais, onde foi alcançado controle de 100% para todas as espécies. Assim, é possível inferir que concentrações de fitotoxina a partir de 30% v/v e as concentrações do Silwet %v/v e Aporte Plus %v/v acima de 1% v/v, tornam uma ótima alternativa futura para o controle de plantas daninhas.

Pela Figura 22, mostrou se o modo de como foi dado os valores de controle de 0% e 100%. Nesta figura comparamos uma amostra de cada espécie da testemunha com amostras do ensaio 14. Através da figura 23, podemos visualizar na primeira foto a comparação do ensaio 14 (que obteve controle de 100% para as quatro espécies bioindicadoras igualmente aos ensaios 10,12 e ponto central) com a testemunha. Já na segunda figura é comparada a testemunha com o ensaio Silwet L-77 2%v/v + Aporte Plus 2%v/v, demonstrando que os adjuvantes potencializam o efeito herbicida da fitotoxina, e que não são os mesmos que apresentam o poder de controle das espécies bioindicadoras.

De modo geral, mostrou-se eficiente à utilização de surfactantes organossiliconados e fontes nitrogenadas para potencializar o efeito herbicida da

fitotoxina estudada. O controle evidenciado tanto nas monocotiledôneas como nas dicotiledôneas, demonstraram uma possível utilização deste herbicida biológico como dessecante em pós emergência de plantas daninhas.



Fig 22: Exemplos das quatro espécies (Alface, Pepino, Sorgo e cebolinha; respectivamente), onde na direita estão as notas de 0% de controle e da esquerda 100% de controle.



Fig. 23: Ensaio 14 comparado com a testemunha, ensaio Silwet L-77 2%v/v + Aporte Plus 2% v/v comparado com a testemunha e visão geral das bandejas com os 17 ensaios; respectivamente.

5. CONCLUSÃO

A adição dos adjuvantes Silwet L-77 e Aporte Plus nas formulações do herbicida biológico surtiram grande efeito, influenciando positivamente em algumas propriedades das formulações como pH, viscosidade, tensão superficial e volume de espuma, melhorando a eficiência para posterior aplicação. Entre os misturadores mecânico Turrax e Ultrassom, pode se inferir que o misturador ultrassom apresentou grande eficiência em relação à estabilidade das formulações.

A fitotoxina do *Phoma sp* estudada apresentou poder herbicida, tanto para monocotiledônea como para dicotiledônea. Através dos bioensaios concluiu-se que as concentrações de fitotoxina a partir de 30% v/v e as concentrações do Silwet %v/v e Aporte Plus %v/v acima de 1% v/v, podem tornar a ser uma ótima alternativa no futuro para o controle de plantas daninhas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ash, G.J. The science art business of succesful bioherbicides. *Biological Control*. 2010, 52:230–240.

ANVISA; UFPR. Seminário de mercado de agrotóxico e regulação. Brasília: ANVISA. Acesso em: 20 de outubro de 2014. <<http://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/capadr/audiencias-publicas/audiencias-2012/rap-09-de-maio-de-2012-anvisa-agenor>>.

ARAÚJO, D.; RAETANO, C. G. Adjuvantes de produtos fitossanitários. In: Tecnologia de aplicação para grandes culturas, Passo fundo: Aldeia Norte, 2011. p. 27-49.

Azevedo, L.A.S. (2007) Proteção integrada de plantas com fungicidas. Emopi. Campinas, Brasil. 284 pp.

Azevedo, L. A. S. Adjuvantes agrícolas para a proteção de plantas. IMOS Gráfica e Editora, 2011. 264p.

Bailey, K.L., Derby, J., 2001. Fungal isolates and biological control compositions for the control of weeds. US Patent Application Serial No. 60/294475. Filed May 20, 2001.

Bailey, K.L., W.M. Pitt, S. Falk, and J. Derby. 2011. The effects of *Phoma macrostoma* on nontarget plant and target weed species. *Biological Control*. 58:379–386.

- Balbinot JR., A. A. et al. Predação de sementes de plantas daninhas em áreas cultivadas. *Ci. Rural*, v. 32, n. 4, p. 707-714, 2002.
- Baque, M.A., S.H. Mho, E.J. Lee, J.J. Zhong and K.Y. Paek. 2012. Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. *Biotechnology Advances*. 30:1255–1267.
- Blanco, H. G. A importância dos estudos ecológicos nos programas de controle de plantas daninhas. *O Biológico*, São Paulo, v.38, p.343-350, 1972.
- Bailey, K.L., W.M. Pitt, F.L. Leggett, C. Sheedy and J. Derby. 2011. Determining the infection process of *Phoma macrostoma* that leads to bioherbicidal activity on broadleaved weeds. *Biological Control*. 59:268-276.
- Barton, J. 2004. How good are we at predicting the Field host-range of fungal pathogens used for classical biological control of weeds? *Biological Control*. 31:99–112.
- Barreto, R. W. . Controle Biológico de Plantas Daninhas com Fitopatógenos. In: Wagner Bettiol; Marcelo Augusto Boechat Morandi. (Org.). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. ., 2009, v. , p. 101-128.
- Beckie, H.J., Morrison, I.N., 1993. Effect of ethalfluralin and other herbicides on trifluralin-resistant green foxtail (*setaria viridis*). *Weed Technol*. 7, 6–14.
- Berner, D.K. and Bruckart, W.L. (2005) A decision tree for evaluation of exotic plant pathogens for biological control of introduced invasive weeds. *Biological Control* 34, 222–232.
- Bélanger, R. R.; Bushnell, W. R.; Dik, A. J.; Carver, T. L. W. (Ed.) *The powdery mildews: a comprehensive treatise*. St. Paul, USA: APS Press, 2002.
- Betina, V. 1989. Chromatographic methods as tools in the field of mycotoxins. *Journal of Chromatography*. 477:187-233.
- Boerema, G. H.; de Gruyter, J.; Noordeloos, M. E.; Hamers, M. E. C. *Phoma identification manual: differentiation of specific and infraspecific Taxa in culture*; CABI publishing: Wallingford,UK, 2004.
- Boyetchko, S.M., E.N. Roskopf, A.J. Caesar and R. Charudattan. 2002. Biological weed control with pathogens: search for candidates to applications. *Agriculture and Food Production*. 2:239-266.
- Bouse, L. F; Carlton, J. B.; Jank, P. C. Effect of water soluble polymers on spray droplet size. *Transactions of the ASABE*, St. Joseph, v. 31, p. 1633-1641, 1988.
- Boyette, C.D., M.A. Weaver, R.E. Hoagland and K.C. Stetina. 2008. Submerged culture of a mycelial formulation of a bioherbicidal strain of *Myrothecium verrucaria* with mitigated mycotoxin production. *World J. Microbiol Biotechnol*. 24:2721–2726.
- Borges neto, C. R. ; Pitelli, R. A. . Adjuvantes e herbicidas e a infectividade de *Fusarium graminearum*, agente potencial de biocontrole de *Egeria densa* e *Egeria najas*. *Planta Daninha*, Viçosa - MG, v. 22, n.01, p. 77-83, 2004.

Borges neto, C. R. ; Mello,S.C.M. ; Ribeiro, Z. M. A. ; Fontes, E. G. Efeito de adjuvantes no crescimento e infectividade do fungo *Cercospora caricis*, agente de biocontrole da tiririca. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília - DF, v. 23, n.04, p. 502-502, 1998.

Bianco, C. A. Tensão superficial e estado físico. In: ENCONTRO NACIONAL DE FORMULAÇÕES DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS, 1., 1985, São Paulo. Anais...São Paulo: Instituto Biológico de São Paulo, 1985. p. 161-172.

Broniarz-Press, L. et al. The atomization of water–oil emulsions. *Exper. Thermal Fluid Sci.*, v. 33, n. 6, p. 955-962, 2009.

BUTLER ELLIS, M. C.; TUCK, C. R.; MILLER, P. C. H. The effect of some adjuvants on sprays produced by agricultural flat fan nozzles. *Crop Protection*, Guildford, v. 16, n. 1, 1997.

Castro, A. M.; Ferreira, J.R. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*. 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.

Chemale, V. M.; Fleck, N. G. Avaliação de cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) em competição com *Euphorbia heterophylla* L. sob três densidades e dois períodos de ocorrência. *Planta Daninha*, Campinas, n. 5, p. 36-45, 1982.

Cheng, J., D. Jiang, X. Yi, Y. Fu, G. Li and J.M. Whipps. 2003. Production, survival and *Coniothyrium minitans* conidia produced in shaken liquid culture. *FEMS Microbiology Letters*. 227:127-131.

Chisti, M. Y. *Airlift Bioreactors*. Elsevier Applied Sciences. London, 1989. 345p.

ChristofolletI, J. C. Considerações sobre a deriva nas pulverizações agrícolas e seu controle. São Paulo: Teejet South América, 1999. 15 p. (Boletim técnico 5).

Chorilli M. et al. Influência da viscosidade do veículo na liberação in vitro da cafeína. *Revista Farmácia*, Anápolis, n. 4, p. 52-60, 2007.

Cunha, J. P. A. R. et al. Avaliação de estratégias para redução da deriva de agrotóxicos em pulverizações hidráulicas. *Planta Daninha*, Rio de Janeiro, v. 21, n. 2, p. 325-332, 2003.

Cunha, J. P. A. R.; Alves, G. S. Características físico-químicas de soluções aquosas com adjuvantes de uso agrícola. *Interciencia*, Caracas, v. 34, n. 9, p. 655-659, 2009.

Dan, H. A. et al. Efeito do pH da calda de pulverização na dessecação de *Brachiaria brizantha* com o herbicida glyphosate. *Sci. Technol.*, v. 2, n. 1, p. 1-6, 2009.

Demain, A.L. 2000. Small bugs big business: The economic power of the microbe. *Biotechnology Advances*. 18:499–514.

- Desjardins, A. E. Trichothecenes: from yellow rain to green wheat. *ASM News*, v. 69, p. 182-185, 2003.
- Doran, P.M. Design of mixing systems for plant cell suspensions in stirred reactors, *Biotechnology Progress* (1999) 319–335.
- Dokken, F. 2007. Submerged Fermentation of *Colletotrichum truncatum* for Biological Control of Scentless Chamomile. Head of the Department of Applied Microbiology and Food Science, University of Saskatchewan.
- Duke, S. O.; Abbas, H. K.; Duke M. V.; Lee, H. J. ; Vaughn, K. C.; Amagasa, T.; TANAKA, T. Microbial phytotoxins as potential herbicides. *Journal of Environmental Science and Health*, v. 31, n. 3, p. 427-434, 1996.
- Duke, S. O.; Dayan, F. E.; Hernández, A.; Duke, M. V.; ABBAS, H. K. Natural products as leads for new herbicide modes of action. *Proceedings, Brighton Crop Protection Conference Weeds*, v. 2, p. 579-586, 1997.
- Duarte, N. F.; Silva, J. B.; Souza, I. F. Competição de plantas daninhas com a cultura do milho no município de Ijaci, MG. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, n.5, p. 983-992, 2002.
- Durigan, J. C. Matocompetição e comportamento de baixas doses de herbicidas, na cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill). 1983. 163 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - ESALQ/Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Durigan, J.C. Efeito de adjuvantes na aplicação e eficácia dos herbicidas. Jaboticabal: FUNEP, 1993. 42p.
- Farr, D.F., Bills, G.F., Chamuris, G.P., Rossman, A.Y., 1989. *Fungi on Plants and Plant Products in the United States*. APS Press, St. Paul, Minneapolis.
- Favaretto, A. ; Scheffer-Basso, S. M. ; Felini, V. ; Carneiro, C. M. ; Neto Zoch, A. . Seedling growth of white clover treated with root and leaf aqueous extract of tough lovegrass. *Revista Brasileira de Zootecnia / Brazilian Journal of Animal Science*, v. 40, p. 1168-1172, 2011.
- Fenice, M.; Federici, F.; Selbmann, L.; Petruccioli, M. Repeated-batch production of pigments by immobilized *Monascus purpureus*. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 80, n. 3, p. 271-276, 2000.
- Fontes, J. R. A. ; Shiratsuchi, L. S. ; Neves, J. L. ; Julio, L. ; Sodre filho, J. . Manejo Integrado de Plantas Daninhas. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003 (Documentos - Embrapa).
- Fleck, N. G. Interferência de papuã (*Brachiaria plantaginea*) com a soja e ganho de produtividade obtido através de seu controle. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, Porto Alegre, n. 2, p. 63-68, 1996.
- Garcia-Ochoa, F. Gomez, E. Santos, VE. Oxygen transfer and uptake rates during xanthangum production. *Enzyme Microb Technol* 2000a;27:680–90.

Gazziero, D.L.P. et. al. As plantas daninhas e a semeadura direta. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 59 p. (Circular Técnica 33).

Gibbs, P. A., Seviour, R. J., Schmid, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. *Crit. Rev. Biotechnol.*, v. 20, n. 1, p. 17-48, 2000.

Graupner, P.R., A. Carr, E. Clancy, J. Gilbert, K.L. Bailey, J.A. Derby and B.C. Gerwick. 2003. The macrocidins: novel cyclic tetramic acids with herbicidal activity produced by *Phoma macrostoma*. *Natural Products*. 66:1558-1561.

Graupner, P.R., Gerwick, B.C., Siddall, T.L., Carr, A.W., Clancy, E., Gilbert, J.R., Bailey, K.L., Derby, J.-A., 2006. Chlorosis inducing phytotoxic metabolites: new herbicides from *Phoma macrostoma*. In: Rimando, A.M., Duke, S.O. (Eds.), *Natural Products for Pest Management*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 37–47.

Green, J.M. Factors that influence adjuvant performance. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ADJUVANTS FOR AGROCHEMICALS, 60., 2001, Amsterdam. Proceedings... Amsterdam: ISAA, 2001. p.179-90.

Green, J.M.; Hazen, J.L. Understanding and using adjuvants properties to enhance pesticide activity. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ADJUVANTS FOR AGROCHEMISTS, 5., 1998, Tennessee. Proceedings. Memphis: ISAA, 1998. p.25-36.

Ghorbani, R., C. Leifert and W. Seel. 2005. Biological control of weeds with antagonistic plant pathogens. *Advances in Agronomy*. 86:191-225.

Goodman, R. N.; Király, A.; Wood, K. R. The Biochemistry and physiology of plant disease. Columbia: University of Missouri Press, 1986. 433 p.

Godfrey, T.; West, S. (1996). *Industrial Enzymology*. 2d. Ed. Stockton Press Ed. US e Canadá, 609p.

Hallett, S.G. Where are the bioherbicides? *Weed Science*, 53 (2005), pp. 404–415.

Heap, I. International survey of herbicide resistant weeds. Disponível em: <<http://www.weedscience.com>>. Acesso em: 30 set. 2014.

HESS, F.D.; FOY, C. L. Interaction of surfactants with plant cuticles. *Weed Technology*, Champaign, v. 14, p. 807-813, 2000.

Hsiao, T.Y., Bacani, F.T., Carvalho, E.B., Curtis, W.R.. Development of a low capital investment reactor system: application for plant cell suspension culture, *Biotechnology Progress* 15 (1999) 114–122.

Hoagland, R.E., C.D. Boyette and M.A. Weaver. 2007. Bioherbicides: Research and risks. *Toxin Reviews*. 26:313–342.

Hosobuch, M. and H. Yoshikawa. 1999. Scale-up of microbial processes. In manual of

industrial microbiology and biotechnology. ASM Press. 236-239.45:168–184.

Huang, T.K. & K.A. McDonald. 2009. Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures. *Biochemical Engineering Journal*.

Huang, T.K., Wang, P.M, Wu, W.T.. Cultivation of *Bacillus thuringiensis* in an airlift reactor with wiremesh draft tubes, *Biochemical Engineering Journal* 7 (2001) 35–39.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil – uma abordagem ambiental. Brasília. 2010.

Imaizumi, S., Tateno, A., Fujimori, T., 1998. Effect of bacterial concentration of *Xanthomonas campestris* pv. *poae* (JT-P482) on the control of annual bluegrass. *J. Pesticide Sci.* 23 (2), 141–144.

IOST, C. A. R. ; RAETANO, C.G. . Tensão superficial dinâmica e ângulo de contato de soluções aquosas com surfatantes em superfícies artificiais e naturais. *Engenharia Agrícola (Impresso)*, v. 30, p. 670-680, 2010.

Issaly, N., H. Chauveaux, F. Aglevor, J. Fargues and A. Durandd. 2005. Influence of nutrient pH and dissolved oxygen on the production of *Metarhizium flavoviride* Mf189 blastospores in submerged batch culture. *Process Biochemistry*. 40:1425–1431.

Klingman, G.C. *Weed control: as a science*. New York: John Wiley & Sons, 1961. 421p.

KIRKWOOD, R. C. Recent developments in our understanding of the plant cuticle as a barrier to the foliar uptake of pesticides. *Pesticide Science*, Oxford, v. 55, p. 69-77, 1999.

KISSMANN, K. G. *Adjuvantes para caldas de defensivos agrícolas*. BASF: São Paulo, 1996. 45 p.

KISSMANN, K.G. *Adjuvantes para caldas de produtos fitossanit-rio*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CI NCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 21., 1997, Caxambu, MG. Palestras... Caxambu, MG: Sociedade Brasileira da CiÍncia das Plantas Daninhas, 1997.p. 61-77.

Li, Y., Sun, Z., Zhuang, X., Xu, L., Chen, S., Mingzhi, L. (2003). Research progress on microbial herbicides. *Crop Prot.*, 22, 247-252.

McCORMICK, R. W. Effects of CO₂, N₂, air and nitrogen salts on spray solution pH. *Weed Technology*, Champaign, v. 4, n. 4, p. 910-912, 1990.

McMullan, P. M. Utility adjuvants. **Weed Technology**, Champaign, v. 14, p. 792-797, 2000.

MAPA - Ministério da agricultura Pecuária e Abastecimento - **AGROFIT Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/servicos-e-sistemas/sistemas/agrofit>. Acesso em: 25 out.2014.

- Martin, A. Physical pharmacy. 4^a.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.
- MATUO, T.; NAKAMURA, S. H.; ALMEIDA, A. Efeito de alguns adjuvantes da pulverização nas propriedades físicas do líquido. Summa Phytopathologica, Jaguariuna, v. 15, n. 2, p. 163-173, 1989.
- Melhorança, A. L. Interferência entre plantas de *Desmodium tortuosum* (Sw) DC. e de *Glycine max* (L.) Merrill. 1994. 94 p. Tese (Doutorado em Agricultura) - FCA/Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Mendizábal, V.Y., I. Viñas, J. Usall, R. Torres, C. Solsona and N. Teixidó. 2012. Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. Biological Control. 60:280–289.
- Mendonça, C. G.; Raetano, C. G.; Tensão superficial estática de soluções aquosas com óleos minerais e vegetais utilizados na agricultura. Engenharia Agrícola, Jaboticabal, v. 27, n. especial, p. 16-23, 2007.
- Miguel, A. A. Avaliação do uso de radiação micro-ondas e ultrassom combinados com agentes químicos como pré-tratamentos de bagaço de cana-de-açúcar para posterior sacarificação enzimática. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José dos Campos, 2009.
- Micheloud, G.A., V.V. Gioria, I. Eberhardt, G. Vinovsky and J.D. Clau. 2011. Production of the *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus in serum-free suspension cultures of the saUFL-AG-286 cell line in stirred reactor and airlift reactor. Journal of Virological Methods. 178:106-116.
- Miller, P.; Westra, P. How surfactants work. Bulletin 0.564, Crop Series Colorado State University Cooperative Extension, Crop Fact. 1998.
- Mingzhi, L., X. Ling and S. Ziling. 2007. Isolation and Characterization of a phytotoxin from *Xanthomonas campestris* pv. *Retroflexus*. Chin. J. Chem. Eng. 15(5):639-642.
- MORI, I. R.; FONNE-PFISTER, R.; MATSUNAGA, S. A novel class of herbicide: specific inhibitors of imidazoleglycerol phosphate dehydratase. Plant Physiology, v. 107, p. 719- 723, 1995.
- Montório, G. A. Eficiência dos surfatantes agrícolas na redução da tensão superficial. 2001. 70 f. Tese (Doutorado em Agronomia)-Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.
- Montório, G.A., Velini, E.D. Definição de um coeficiente de eficácia para estudo de tensão superficial com surfactantes siliconados e não siliconados. Sci. Agr. Parana. 3: 25-34(2004).
- McCORMICK, R. W. Effects of CO₂, N₂, air and nitrogen salts on spray solution pH. Weed Technology, Champaign, v. 4, n. 4, p. 910-912, 1990.

NACHTIGAL, G. F. Desenvolvimento de agente de controle biológico microbiano de *Egeria densa* e *Egeria najas*. 2000. 160 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

Nalewaja, J. D. Esterified seed oil adjuvants. Proceedings North Central Weed Science Society, Champaign, v. 49, p. 149-156, 1994.

Neumann, P. M.; Prinz, R. The effect of organosilicone surfactants on foliar nutrient sprays on increased adsorption of phosphate and iron salts through stomatal infiltration. Israel Journal of Agricultural Research, Rehovot, v. 23, p. 123-128, 1974.

OLIVEIRA, R. B. Caracterização funcional de adjuvantes em soluções aquosas. 2011.122f. Tese (Doutorado em Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

Ochoa, F.G. & E. Gomez, E. 2009. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. Biotechnology Advances. 27:153–176.

OHRA, J; MORITA, K; OHRA, J; MORITA, K.; TSUJINO, Y.; FUJIMORI, T.; GOERING, M.; EVANS, S.; ZORNER, P. Production of two phytotoxic metabolites by the fungus *Alternaria- cassiae*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, v. 59, n. 9, p.1782-1783, 1995.

Prokop, M.; Kejklíček, R. (2002) Effect of adjuvants on spray droplet size of water. Res. Agric. Eng. 48: 144-148.

Queiroz, G. M. P.; Silva, M. R.; Bianco, R. J. F. Transporte de Glifosato pelo escoamento superficial e por lixiviação em um solo agrícola. Química Nova. 34, 2, 190-195, 2011.

Ramsdale, B.K.; Messersmith, C.G. (2001) Nozzle, spray volume, and adjuvant effects on carfentrazone and imazamox efficacy. Weed Technol. 15: 485-491.

Reichard, D. L.; Zhu, H. A system to measure viscosities of spray mixtures at high shear rates. Pesticide Science, Oxford, v. 47, n. 2, p. 137-143, 1996.

Rizzardi, M. A.; Fleck, N. G. Métodos de qualificação da cobertura foliar da infestação de plantas daninhas e da cultura da soja. Ci. Rural, v. 34, p. 13-18, 2004.

Schamphelire, M. et al. Effects on pesticide spray drift of the physicochemical properties of the spray liquid. Precision Agriculture, Bedford, v. 9, p. 1-12, 2008.

Schmelz, E. A.; Engelberth, J.; Alborn, H. T. O'Donnell, P.; Sammons, M.; TOSHIMA, H.; Tumlinson, J. H. Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins and volatile organic compounds in plants. PNAS, v. 100, n. 18, p. 10551-10557, Sep. 2003.

Silva, F. M. L. ; Velini, E.D. ; Corrêa, T.M. . Influência dos íons mg, ca, fe, cu e zn sobre a tensão superficial estática de soluções contendo surfatante. Planta Daninha (Impresso), v. 24, p. 589-595, 2006.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA – SINDAG. Vendas de defensivos agrícolas por culturas de destinação e classes, 2010 e 2011. (Dados não publicados). São Paulo. 2012.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production Technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, p. 541-549, 2010.

Stahlman, P. W.; Phillips, W. M. Inhibition of glyphosate phytotoxicity. *Weed Science*, Champaign, v. 27, n. 5, p. 575-577, 1979

Stevens, P. J. G. et al. Spray formulation with Silwet® organosilicone surfactants. In: FOY, C. L. Adjuvants for agrichemicals. Boca Raton: Library of Congress, 1992. chap. 37, p. 399-403.

Stevens, P. J. G. et al. Organosilicone surfactants: tools for horticultural crop protection. *Proceedings of Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases*, Thornton Heath, p. 755-760. 1994.

Stickler, W.E. The importance of adjuvants to the agricultural chemical industry. In: FOY, C.L. (Ed.). *Adjuvants for Agrochemicals*. New York: Marcell Dekker, 1992. cap.22, p.247-9.

STOCK, D.; BRIGGS, G. Physiochemical properties of adjuvants: values and applications. *Weed Technology*. Champaign, v.14, p. 798-806, 2000.

Schönherr, J. et al. Foliar uptake of pesticides and its activation by adjuvantes: Theories and methods for optimization. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PESTICIDE CHEMISTRY: ADVANCES IN INTERNATIONAL RESEARCH, DEVELOPMENT, AND LEGISLATION, 7., 1990, Hamburgo. *Proceedings...* Weinheim: VCH, 1991. p. 237-253.

Schobert, R. and B. Barnickel. 2010. Toward the macrocidins: Macrocyclization via williamson etherification of a phenolate. *JOCnote*. 75:6716–6719.

Spencer-phillips, P. T. N.; GISI, U.; LEBEDA, A. (Ed.). *Advances in downy mildew research*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2002.

Shabana, Y.M., D. Singh, L.M.O. Ribbing and S.G. Hallett. 2010. Production and formulation of high quality conidia of *Microsphaeropsis amaranthi* for the biological control of weedy *Amaranthus* species. *Biological Control*. 55:49–57.

Siegel, M. H.; Robinson, C. W. Application of airlift gas-liquid-solid reactors in Biotechnology. *Chemical Engineering Science*. V.47, p.3387-3394. 1992.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA – SINDAG. Vendas de defensivos agrícolas por culturas de destinação e classes, 2010 e 2011. (Dados não publicados). São Paulo. 2012.

SILVA, A. A.; SILVA, J. F. Tópicos em manejo de plantas daninhas. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 367 p.

SHAW, W.C.; Integrated weed management systems technology for pest management. Weed science, 30(supl. 1): 2-12, 1982.

SUN, J.; FOY, C.L. Physico-chemical properties of several commercial organosilicones their blends, and selected other adjuvants. In: NALEWAJA, J.D.; GROSS, G.R.; TANN, R.S. (Eds.) Pesticide formulations and application systems. West Conshohocken: American Society for Testing and Materials, 1998, v.18, p.281-93.

Tanaka, H. Technological problems in cultivation of plant cells at high density Biotechnology and Bioengineering 67 (2000) 775–790.

TEBEEEST, D.O., Yang, X.B., Cisar, C.R. (1992). The status of biological-control of weeds with fungal pathogens. Annu. Rev. Phytopathol., 30, 637-657.

TEMPLETON, G.E., Tebeest, D.O., Smith, R.J. (1984). Biological weed control in rice with a strain of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) sacc. used as a mycoherbicide. Crop Prot., 3, 409-422.

TESSMANN, D.J. Controle biológico: aplicações na área de ciência das plantas daninhas. In: Biologia e Manejo de Plantas Daninhas. Oliveira et al (ed). Cap. 4 , p.79-94, 2011.

TRUCKSESS, M. W. Mycotoxins. JAOAC International, v. 87, p. 275-284, 2004.

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

Van Den BOSH, R.; MESSENGER, P. S.; GUTIERREZ, A. An introduction to biological control. New York: Plenum Press, 1987. 247 p.

Visnovsky, G., G.A. Micheloud, V.V. Gioria, I. Eberhardt and J.D. Claus. 2011. Production of the *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus in serum-free suspension cultures of the saUFL-AG-286 cell line in stirred reactor and airlift reactor. Journal of Virological Methods. 178:106–116.

Vurro, M., A. Andolfi, A. Boari, M.C. Zonno, S. Caretto, F. Avolio and A. Evidente. 2012. Optimization of the production of herbicidal toxins by the fungus *Ascochyta caulina*. Biological Control. 60:192-198.

Wagner, P. et al. Quantitative assessment to the structural basis of water repellency in natural and technical surfaces. Journal of Experimental Botany, Oxford, v. 54. n. 385, p. 1295-1303, 2003.

Warnock J.N., Al-Rubeai M., Bioreactor systems for the production of biopharmaceuticals from animal cells, Biotechnology and Applied Biochemistry 45 (2006) 1–12.

Ward, O. P. Proteinases. In: FOGARITY, W. M. (Ed). Microbial enzymes and biotechnology. Applied Science Publishers, London, p.251-305, 1983.

Zhang, W.M., Wolf, T.M., Bailey, K.L., Mortensen, K., Boyetchko, S.M. Screening of adjuvants for bioherbicide formulations with *Colletotrichum* spp. and *Phoma* spp.. *Biological Control* 26, 95–108, 2003.

Zhang, J. M.; Geng, A. L.; Yao, C. Y.; Lu, Y. H.; Li, Q. B. 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, Oct 2012.

ZHAOYUAN, Gao, 1992. Biological control of dodder-a review research progress of the bioherbicide Lubao no. 1. *Chinese J. Biol. Control* 8 (4), 173–175.

Znad, H., M. Tokumura and Y. Kawase. 2006. Axial distribution of oxygen concentration in different airlift bioreactor scales: Mathematical modeling and simulation. *Chem. Eng. Technol.* 29(9):1042–1047.