

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

Izelmar Todero

**FORMULAÇÃO E APLICAÇÃO DE METABÓLITOS PRODUZIDOS POR
Fusarium fujikuroi COM AÇÃO BIOHERBÍCIDA**

Santa Maria, RS
2021

Izelmar Todero

**FORMULAÇÃO E APLICAÇÃO DE METABÓLITOS PRODUZIDOS POR *Fusarium
fujikuroi* COM AÇÃO BIOHERBICIDA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Agrícola**.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti
Coorientador: Prof. Dr. Giovani Leonel Zobot

Santa Maria, RS
2021

Todero, Izelmar
FORMULAÇÃO E APLICAÇÃO DE METABÓLITOS PRODUZIDOS POR
Fusarium fujikuroi COM AÇÃO BIOHERBICIDA / Izelmar
Todero.- 2021.
98 p.; 30 cm

Orientador: Marcio Antonio Mazutti
Coorientador: Giovani Leonel Zobot
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Engenharia Agrícola, RS, 2021

1. Fusarium fujikuroi 2. . Exopolissacarídeos 3.
Bioherbicida 4. Formulações I. Mazutti, Marcio Antonio
II. Zobot, Giovani Leonel III. Título.

Izelmar Todero

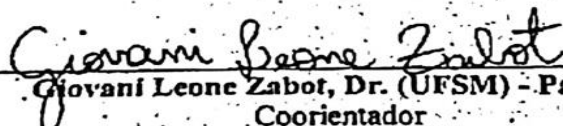
FORMULAÇÃO E APLICAÇÃO DE METABÓLITOS PRODUZIDOS POR *Fusarium fujikuroi* COM AÇÃO BIOHERBICIDA

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia Agrícola.

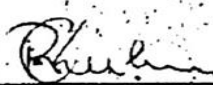
Aprovada em 30 de novembro de 2021:



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



Giovani Leone Zabet, Dr. (UFSM) - Parecer
Coorientador



Raquel Cristine Kuhn, Dra. (UFSM) - Parecer



Marcus Vinicius Tros, Dr. (UFSM) - Parecer



Nicholas Islongo Canabarro, Dr. (USP) - Parecer



Altemir Mossi, Dr. (UFFS) - Parecer

Santa Maria, RS

2021

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me abençoar com saúde e sabedoria para percorrer todo o caminho até aqui.

Ao meu pai, Domingos Todero, e minha família, que me incentivaram e me apoiaram durante toda esta trajetória. A minha mãe Lourena Todero que hoje não está presente em minha vida, agradeço pelo amor incondicional, pelo incentivo e pela dedicação em todos os momentos.

A minha noiva, Tássia C. Confortin, pelo amor, sinceridade, amizade, auxílio, encorajamento e por toda paciência e incentivo durante toda a execução deste trabalho. Obrigado por torcer por mim e pela presença constante durante o projeto.

A minha segunda família, Leonira, Aldecir e Michel, pelo apoio, incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti, pela oportunidade de desenvolver este trabalho em seu laboratório, pela imensa atenção, dedicação e comprometimento na orientação por meio de sugestões e correções essenciais para a conclusão do presente estudo. Verdadeiramente tive um grande mentor que pude contar neste período que contribuiu muito para minha formação.

Aos membros da banca examinadora, que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar desta etapa final deste trabalho. Aos demais professores do programa de mestrado em Engenharia Agrícola, que também contribuíram para a formação profissional.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, por ser um lugar de excelência para estudar, trocar valores e ideias, desenvolver-se profissionalmente e abrir portas para o meu almejado título de Mestre em Engenharia Agrícola.

Aos amigos do Laboratório Biotec factory, pela convivência agradável, amizade, conhecimento e auxílio em diversos momentos.

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

E a todos aqueles que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

FORMULAÇÃO E APLICAÇÃO DE METABÓLITOS PRODUZIDOS POR *Fusarium fujikuroi* COM AÇÃO BIOHERBICIDA

AUTOR: Izelmar Todero

ORIENTADOR: Dr. Marcio Antonio Mazutti

COORIENTADOR: Dr. Giovanni Leone Zobot

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito herbicida dos metabólitos produzidos por *Fusarium fujikuroi* aplicados em pré e pós-emergência em plantas bioindicadoras e plantas daninhas, bem como formular um bioproduto. Os experimentos foram divididos em duas etapas, onde na 1ª etapa foi avaliado o potencial do fungo *Fusarium fujikuroi* para a produção de exopolissacarídeos (EPS), a concentração dos EPS e a relação dos EPS com a atividade bioherbicida. Para isso foi avaliada a produção em caldo fermentado bruto e diferentes métodos de concentração (membranas, liofilização e a evaporação). A quantificação dos exopolissacarídeos foi realizada a partir de precipitação ácida e os testes foram realizados em folhas de *Cucumis sativus*. Na 2ª etapa, primeiramente foram realizados testes de pré-emergência em *Cucumis sativus*, *Bidens pilosa* e *Amaranthus retroflexus*. Juntamente foram avaliados a embebição das sementes e a atividades da α -amilase. Nos experimentos de formulação dois diferentes ensaios foram realizados a fim de investigar a interação do caldo fermentado sem células de *Fusarium fujikuroi* aos adjuvantes. Primeiramente foram realizados testes preliminares avaliando diferentes concentrações de óleo de palma, Span® 80 e Tween® 80, Silweet L-77, Assist, Orgânico, Aureo e Nimbus. A partir dos resultados foram selecionadas as duas melhores formulações com dois melhores adjuvantes comerciais (Silweet L-77 e o Aureo) e realizados os testes em *Bidens pilosa*. Os resultados obtidos na primeira etapa desta Tese demonstraram que o fungo *Fusarium fujikuroi* pode ser considerado um bom produtor de exopolissacarídeos. As tecnologias utilizadas para concentrar os EPS mostraram ser processos eficientes, com destaque para a liofilização, seguido de membranas e evaporação. Os resultados indicam que quando as concentrações de EPS aumentam, ocorre um aumento na atividade bioherbicida e uma diminuição na tensão superficial são obtidos. Ao investigar diferentes concentrações de óleo de palma, Span® 80 e Tween® 80 com diferentes níveis de Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo (EHL), o tratamento que apresentou melhor resultado foi uma mistura de Tween® 80, óleo de palma e o caldo bruto. Testando os diferentes adjuvantes comerciais o Silwet L-77 + Tween® 80 + caldo bruto estes apresentaram maiores danos na planta daninha. Na germinação de *Cucumis sativus* obteve-se resultados promissores. A avaliação em *Bidens pilosa* e *Amaranthus retroflexus* demonstraram que existe um efeito herbicida no caldo bruto, para ambas as espécies de plantas daninhas. Em relação à porcentagem de germinação por embebição das sementes, esta aumentou progressivamente com o tempo de embebição. Todas as concentrações do caldo de *Fusarium fujikuroi* testadas mostraram inibição da embebição das sementes. O efeito da atividade da α -amilase sofreu variação em cada tratamento. Testando os diferentes adjuvantes comerciais o Silwet L-77 apresentou maior compatibilidade com o caldo bruto, levando a lesões irreversíveis.

Palavras chaves: *Fusarium fujikuroi*. Exopolissacarídeos. Bioherbicida. Formulações.

ABSTRACT

FORMULATION AND APPLICATION OF METABOLITES PRODUCED BY *Fusarium fujikuroi* WITH BIOHERBICIDE ACTION

AUTHOR: Izelmar Todero

ADVISOR: Dr. Marcio Antonio Mazutti

CO-ADVISOR: Dr. Giovanni Leone Zabot

The present work aimed to evaluate the herbicide effect of the metabolites produced by *Fusarium fujikuroi* applied in pre and post-emergence in bioindicator plants and weeds, as well as to formulate a bioproduct. The experiments were divided into two stages, where in the 1st stage the potential of the fungus *Fusarium fujikuroi* for the production of exopolysaccharides (EPS), their concentration and the relationship of EPS with the bioherbicidal activity were evaluated. For this purpose, production in crude fermented broth and different methods of concentration (membranes, lyophilization and evaporation) were evaluated. The quantification was carried out using acid precipitation and the tests were carried out on *Cucumis sativus* leaves. In the 2nd stage, firstly, pre-emergence tests were carried out on *Cucumis sativus*, *Bidens pilosa* and *Amaranthus retroflexus*. At this time, seed imbibition and α -amylase activities were evaluated. In the formulation of the experiments, two different tests were carried out in order to investigate the interaction of the fermented broth without *Fusarium fujikuroi* cells with the adjuvants. Firstly, preliminary tests were carried out evaluating different concentrations of palm oil, Span® 80 and Tween® 80, Silwet L-77, Assist, Orgânico, Aureo and Nimbus. From the results, the two best formulations with two best commercial adjuvants (Silwet L-77 and Aureo) were selected and tests carried out on *Bidens pilosa*. The results obtained in the 1st stage of the thesis demonstrate that the fungus *Fusarium fujikuroi* can be considered a good exopolysaccharides producer. The technologies used to concentrate EPS proved to be efficient processes, with emphasis on lyophilization, followed by membranes and evaporation. The results indicate that when EPS concentrations increase, an increase in bioherbicide activity and a decrease in surface tension are obtained. When investigating different concentrations of palm oil, Span® 80 and Tween® 80 with different levels of Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB), the treatment that showed the best result was a mixture of Tween® 80, palm oil and crude broth. Testing the different commercial adjuvants Silwet L-77 + Tween® 80 + crude broth, these showed greater damage to the weed. *In the germination of Cucumis sativus, promising results were obtained.* The evaluation in *Bidens pilosa* and *Amaranthus retroflexus* demonstrated that there is a herbicide effect in the crude broth, for both weed species. In relation to the percentage of germination by imbibition of the seeds, it progressively increased with the imbibition time. All concentrations of *Fusarium fujikuroi* broth tested showed inhibition of seed imbibition. The effect of α -amylase activity varies with each treatment. Testing the different commercial adjuvants, Silwet L-77 showed greater compatibility with the crude broth, leading to irreversible damage.

Keywords: *Fusarium fujikuroi*. Exopolysaccharides. Bioherbicide Formulations.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 - APRESENTAÇÃO

Figura 1.1- Fluxograma das atividades realizadas e etapas futuras da tese de doutorado.....16

CAPÍTULO 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 2.1 - Aumento cronológico em casos únicos* de ervas daninhas resistentes a Herbicidas no mundo.....20

Figura 2.2 - Aumento cronológico de resistência de plantas daninhas em grandes culturas Seleccionadas no mundo.....20

Figura 2.3 - Aumento cronológico das espécies de plantas daninhas que desenvolveram resistência ao glifosato em todo o mundo.....21

Figura 2.4 - Aumento cronológico de espécies resistentes ao glifosato para os cinco países com o maior número de espécies resistentes ao glifosato.....21

Figura 2.5 - Efeito dos bioherbicidas no controle de plantas daninhas.....26

Figura 2.6 - Esquema de um processo de separação com membrana.....35

CAPÍTULO 3- ARTIGO 1

Figura 1 - Aparelho experimental do módulo de ultrafiltração de membrana plana usado para concentração de exopolissacarídeos. A - cilindro de nitrogênio; B - regulador de pressão de duplo estágio acoplado aos dois manômetros (B1 - válvula de abertura do cilindro, B2 - válvula de pressurização de gás); C - módulo de separação com membrana plana (C1 - reservatório de alimentação, C2 - agitador magnético, C3 - anel de vedação, C4 - membrana, C5 - suporte de membrana, C6 - saída de permeado); D - frasco de coleta; E - Banho ultraterostático.....45

Figura 2 - Comparação das lesões observadas em folhas de *Cucumis sativus* pelos métodos de concentração de membranas, liofilização e evaporação.....50

CAPÍTULO 4- FORMULAÇÃO

Figura 1- *Fusarium fujikuroi* (A) - Crescimento micelial em placa de Petri (B) Fermentação submersa.....57

Figura 2- Teste de germinação realizado em caixas gerbox em espécies de *Bidens pilosa* (A) e *Amaranthus retroflexus* (B).....61

Figura 3 - Bandeja com repetições de *Cucumis sativus*.62

Figura 4 - Germinação de semente de *Cucumis sativus* em 12, 24, 36 e 48 horas no tratamento com testemunha (água) e caldo bruto.65

Figura 5 - Efeitos do caldo de *Fusarium fujikuroi* na embebição de sementes de *Cucumis sativus*.....66

Figura 6- Efeito do caldo de *Fusarium fujikuroi* na atividade α -amilase de sementes de *Cucumis sativus*.67

Figura 7- Inibição da germinação de <i>Amaranthus retroflexus</i> 10 dias após a aplicação dos tratamentos.....	68
Figura 8- Inibição da germinação de <i>Bidens pilosa</i> 10 dias após a aplicação dos tratamentos	68
Figura 9- Comparações das formulações.	71
Figura 10 - Maior potencial fitotóxico da planta <i>Bidens pilosa</i> em função da aplicação do formulado 20. Controle (A) e Tratamento (B).	73
Figura 11 - Menor potencial fitotóxico da planta <i>Bidens pilosa</i> em função da aplicação do formulado 15. Controle (A) e Tratamento (B).	74
Figura 12 - Sintomas fitotóxicos da planta <i>Bidens pilosa</i> em função da aplicação dos formulados 15 à 24.	76

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 2.1 - Espécies de plantas daninhas com resistência múltipla a herbicidas detectadas no Brasil até outubro de 2018.....	22
Tabela 2.2 - Espécies de plantas daninhas com resistência cruzada a herbicidas detectadas no Brasil até outubro de 2018.....	23
Tabela 2.3 - Bioherbicidas produzidos a partir de microrganismos e extratos vegetais.....	28
Tabela 2.4 - Efeito de bioherbicidas fungicos na fisiologia das plantas daninhas.....	29
Tabela 2.5 - Produção de EPS por alguns fungos.....	34
Tabela 2.6 - Classificação dos processos clássicos de separação.....	36

CAPÍTULO 3- ARTIGO 1

Tabela 1 - Características das membranas utilizadas neste trabalho	44
Tabela 2 - Comparação dos diferentes métodos de concentração de exopolissacarídeos de <i>Fusarium fujikuroi</i> e avaliação da tensão superficial.....	47
Tabela 3- . Fitotoxicidade de exopolissacarídeos.....	51

CAPÍTULO 4- FORMULAÇÃO

Tabela 1 - Formulações utilizando óleo de palma, Span [®] 80 e Tween [®] 80.....	57
Tabela 2 - Formulações utilizando adjuvantes comerciais.....	58
Tabela 3 - Formulações utilizando Tween [®] 80 + adjuvantes comerciais	58
Tabela 4 - Escala adaptada de Frans & Crowley para a avaliação do percentual de fitotoxicidade.....	63
Tabela 5- Descrição dos conceitos aplicados às avaliações de toxicidade segundo a SBCPD.....	64
Tabela 6- Porcentagem de inibição da germinação em 12, 24, 36 e 48 horas em <i>Cucumis sativus</i> para cada tratamento em câmara de germinação.	65
Tabela 7- Porcentagem de inibição da germinação na primeira e segunda contagem de <i>Bidens pilosa</i> e <i>Amaranthus retroflexus</i> para cada tratamento em câmara de germinação.....	68
Tabela 8- Resultados das avaliações de fitotoxicidade das plantas de <i>Cucumis sativus</i> após a aplicação das formulações.	70
Tabela 9 - Resultados das avaliações das plantas de <i>Bidens pilosa</i> após a aplicação das formulações com adjuvantes.....	73
Tabela 10 – Valores da influência na densidade a 25°C nas diferentes formulações.....	77
Tabela 11 – Valores da influência na tensão superficial para as diferentes formulações.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

WSSA	Weed Science Society of America
ALS	Enzima acetolactato sintase
PPO	Protox
FSII	Herbicidas que bloqueiam o fluxo de elétrons
ACCCase	Enzima acetil coenzima A carboxilase
EPSPs	Enzima 5 - enolpiruvilchiquimato - 3 - fosfato sintase
EPSs	Exopolissacarídeos
ROS	Espécies reativas de oxigênio
BOD	Câmara de Germinação
RAS	Regras para Análise de Sementes
EHL	Equilíbrio hidrófilo lipófilo
MS	Massa de Span [®] 80
MT	Massa de Tween [®] 80
DCCR	Delineamento composto central rotacional
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
SBCPD	Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
MDA	Malondialdeído
TCA	Ácido tricloroacético

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – APRESENTAÇÃO	13
1.1 INTRODUÇÃO.....	13
1.2 OBJETIVOS.....	14
1.2.1 Objetivo geral	14
1.2.2 Objetivos específicos	14
1.3 ESTRUTURA DA TESE DE DOUTORADO.....	15
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 PLANTAS DANINHAS.....	17
2.1.1 Resistência aos herbicidas	19
2.1.2 Controle biológico de plantas daninhas	24
2.2 BIOHERBICIDAS.....	25
2.2.1 Metabólitos secundários produzidos por fungos	31
2.2.1.1 <i>Fusarium fujikuroi</i>	31
2.2.1.2 <i>Exopolissacarídeos</i>	32
2.3 PRODUÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	34
2.3.1 Fermentação Submersa	34
2.3.2 Membranas	35
2.3.3 Liofilização e Evaporação	37
2.4 FORMULAÇÃO.....	38
2.5 CONTRIBUIÇÕES ACERCA DO ESTADO DA ARTE.....	39
CAPÍTULO 3 – ARTIGO 1	41
1 INTRODUÇÃO	42
2 MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1 Microorganismo e produção de exopolissacarídeos	43
2.2 Recuperação e quantificação de exopolissacarídeos por precipitação ácida	43
2.3 Tensão superficial	44
2.4 Concentração de exopolissacarídeos	44
2.4.1 Concentração por membranas.....	44
2.4.2 Concentração por liofilização.....	45
2.4.3 Concentração por evaporação.....	46
2.5 Bioensaios de fitotoxicidade em <i>Cucumis sativus</i>	46
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47

3.1 Concentração de exopolissacarídeos	47
3.2 Atividade herbicida	48
4. CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	52
CAPÍTULO 4 – FORMULAÇÃO	54
1. INTRODUÇÃO	55
2. MATERIAL E MÉTODOS	56
2.1 PRODUÇÃO DO BIOHERBICIDA.....	56
2.2 FORMULAÇÕES.....	57
2.2.1 Densidade	59
2.2.2 Tensão superficial	59
2.3 BIOENSAIOS.....	59
2.3.1 Bioensaio em Pré emergência em <i>Cucumis sativus</i>	59
2.3.2 Bioensaio em Pré emergência em <i>Bidens pilosa</i> e <i>Amaranthus retroflexus</i>	61
2.3.3 Bioensaios em Pós emergência em <i>Cucumis sativus</i>	62
2.3.4 Bioensaios em Pós emergência em <i>Bidens pilosa</i>	63
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	64
3.1 BIOENSAIO EM PRÉ-EMERGÊNCIA EM <i>Cucumis sativus</i>	64
3.1.1 Embebição de sementes e atividade de α-amilase	66
3.2 BIOENSAIO EM PRÉ-EMERGÊNCIA EM <i>Bidens pilosa</i> e <i>Amaranthus retroflexus</i>	67
3.3 BIOENSAIO PÓS-EMERGÊNCIA EM <i>Cucumis sativus</i>	69
3.4 BIOENSAIO PÓS-EMERGÊNCIA EM <i>Bidens pilosa</i>	72
3.4.1 Densidade	77
3.4.2 Tensão Superficial	77
4. CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
5.1 DISCUSSÃO GERAL.....	82
5.2 CONCLUSÕES GERAIS.....	84
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

CAPÍTULO 1 – APRESENTAÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO

As plantas daninhas representam um grande desafio para o sucesso da produção agrícola, pois competem com as culturas por água, luz e nutrientes, causam grandes perdas de rendimento, aumentam os custos de produção e reduzem a qualidade dos produtos. O manejo eficaz de plantas daninhas é elemento chave na produção agrícola, essencial para atingir as metas de aumento de produção necessárias para atender às demandas alimentares da crescente população global (SARDANA et al., 2017).

Nas últimas décadas, o controle de plantas daninhas tem sido realizado principalmente pela aplicação de herbicidas sintéticos. No entanto, o uso destes começou a ser questionado devido à sua toxicidade para animais, plantas, saúde humana e meio ambiente (YANG et al., 2014; MCDUGALL, 2010). Além disso, as plantas daninhas estão se tornando resistentes a esses herbicidas. No Brasil até outubro do ano de 2021 foram relatados 54 casos de resistência de plantas daninhas a herbicidas, com destaque para as espécies *Bidens pilosa*, *Euphorbia heterophylla*, *Conyza* spp., *Amaranthus* spp., *Eleusine indica*, *Lolium multiflorum*, *Echinochloa* spp. e *Digitaria insularis* (WEED SCIENCE, 2021). A resistência de plantas daninhas a herbicidas é um processo que se dá pelo uso repetitivo do mesmo herbicida ou ao mecanismo de ação o qual exerce forte pressão de seleção sobre uma população, onde a sobrevivência majoritária dos indivíduos resistentes dá origem a novas populações com altos níveis de resistência. A capacidade de sobreviver ao herbicida tem origem na variabilidade genética natural das plantas da espécie, sendo assim, o herbicida apenas seleciona os biótipos mais adaptados ao ambiente agrícola (MONQUERO, 2014).

Com o objetivo de minimizar os impactos negativos provocados pela aplicação de herbicidas sintéticos, diversas pesquisas estão sendo desenvolvidas, visando à descoberta de novos herbicidas seletivos, com maior ou igual eficiência de controle e menor risco de danos ao meio ambiente. Neste cenário, está incluída a utilização de produtos naturais obtidos de plantas e microrganismos (OLIVEIRA; BRIGHENTI, 2011; DAYAN; DUKE, 2014).

Os fungos fitopatogênicos são um dos grupos mais estudados em relação ao seu potencial herbicida, pois detêm a habilidade específica de produzir naturalmente substâncias tóxicas às

plantas, com capacidade 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 (CHARUDATTAN, 1991).

O desenvolvimento de uma nova e eficaz formulação microbiana não significa uma simples mistura de inertes a determinado ingrediente ativo. Aspectos como o tipo e a características do ingrediente ativo, características do sistema produtivo, a compatibilidade dos componentes da formulação com o patógeno e a estabilidade deste durante o armazenamento, são imprescindíveis para viabilizar o uso de um bioherbida em campo (MORANDI; BETTIOL, 2009). Neste sentido, o uso de um bioherbicida é uma alternativa promissora, econômica e ambientalmente sustentável e o desenvolvimento de formulações é importante para tornar os bioprodutos disponíveis para uso no manejo integrado de plantas daninhas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito herbicida dos metabólitos produzidos por *Fusarium fujikuroi* aplicados em pré e pós-emergência em plantas bioindicadoras e plantas daninhas, bem como formular um bioproduto.

1.2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a capacidade de produção de exopolissacarídeos por *Fusarium fujikuroi*;
- ✓ Concentrar os exopolissacarídeos do caldo bruto produzido a partir de *Fusarium fujikuroi* utilizando as técnicas de membranas, liofilização e evaporação;
- ✓ Avaliar a relação dos exopolissacarídeos com a atividade herbicida do caldo bruto de *Fusarium fujikuroi*;
- ✓ Estudar a formulação do caldo bruto de *Fusarium fujikuroi* em conjunto de adjuvantes para a aplicação em plantas daninhas *Bidens pilosa* e *Amaranthus retroflexus*;
- ✓ Avaliar a atividade herbicida das formulações no controle de plantas daninhas;
- ✓ Avaliar características físico-químicas das formulações;
- ✓ Otimizar as formulações para o possível poder herbicida.

1.3 ESTRUTURA DA TESE DE DOUTORADO

Nesta Tese de Doutorado as etapas de desenvolvimento estão organizadas em Capítulos da seguinte forma:

Capítulo 1: é apresentada a introdução, os objetivos e a estrutura da Tese.

Capítulo 2: apresenta-se uma breve revisão da literatura, evidenciando sobre os conceitos fundamentais que norteiam este trabalho.

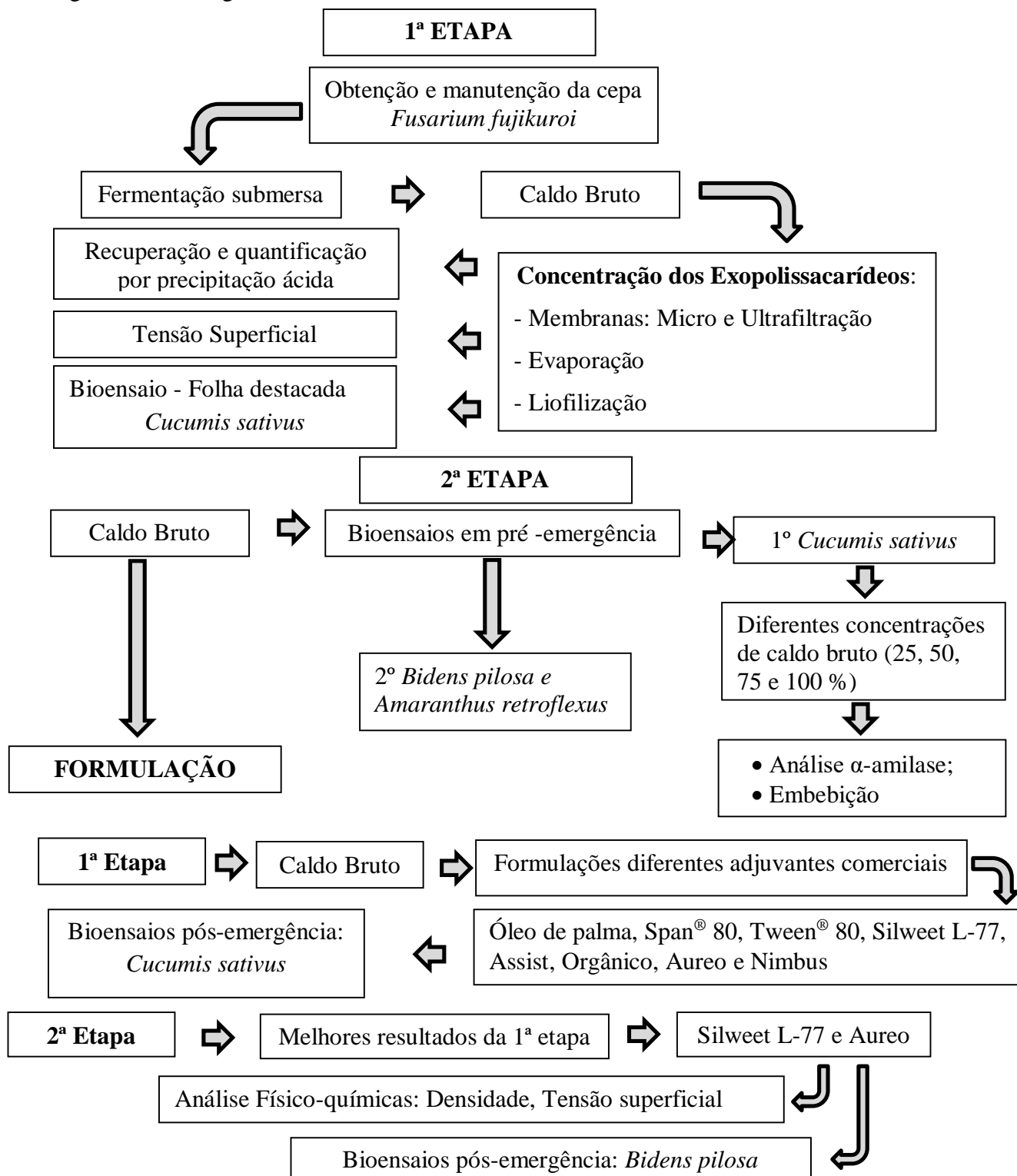
Capítulo 3: é apresentado o primeiro artigo, que teve como foco a “Produção e concentração de exopolissacarídeos produzidos por *Fusarium fujikuroi*, e a sua relação com a atividade herbicida”. Neste Capítulo estão descritos a metodologia e os resultados e discussões.

Capítulo 4: é apresentado o segundo artigo “*Fusarium fujikuroi* como agente potencial no manejo de plantas daninhas”. Neste Capítulo estão descritos os materiais, métodos e resultados e discussões para a avaliação herbicida produzido por metabólitos secundários de *Fusarium fujikuroi*.

Capítulo 5: neste Capítulo apresentam-se as considerações finais: discussão e conclusão geral da Tese.

A Figura 1.1 apresenta um fluxograma organizacional do presente trabalho, com intuito de melhorar o entendimento das etapas realizadas nesta Tese.

Figura 1.1- Fluxograma das atividades realizadas na Tese de Doutorado



CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PLANTAS DANINHAS

As plantas daninhas são conceituadas de diferentes formas ao longo dos anos. Segundo Silva et al. (2007), em um conceito mais amplo, uma planta só pode ser considerada daninha se estiver, direta ou indiretamente, prejudicando determinada atividade humana, porém a maioria dos autores às definem como plantas que crescem onde não são desejadas (RANA, 2016). Portanto pode-se notar que qualquer planta, de qualquer espécie, pode ser considerada planta daninha se estiver ocorrendo em um local indesejado e causando prejuízos (CARVALHO, 2013).

As plantas daninhas apresentam grande importância econômica, pois afetam atividades de produção causando perda econômica substancial (WU et al., 2017). A partir do controle inadequado de plantas daninhas, estima-se que estas podem reduzir em média até 34% a produtividade das culturas. Em relação a algumas culturas de grande interesse agrícola pode-se ter perda de: trigo 23%, soja 37%, arroz 37%, milho 40%, algodão 36% e batata 30% (OERKE, 2006). Sendo que as perdas anuais mundiais são de 10 a 15% aproximadamente da produção atingível entre as principais fontes alimentares (ABOUZIENA et al., 2016).

Charde et al. (2018) relata em seu estudo que as perdas de rendimento real causadas por plantas daninhas foram elevadas, alcançando de 20 a 48% para a soja e 24 a 51% para a cultura do amendoim. Convém ressaltar que na prática, é muito difícil estimar a perda de rendimento para uma única espécie de planta daninha, portanto, estima-se de todas as presentes na área de cultivo. Datta et al. (2017) relataram que a presença de plantas daninhas até a fase crítica da soja pode causar redução de 8 a 55% no rendimento. Fahad et al., (2015) descrevem que as plantas daninhas são responsáveis por mais de 48% de perda de rendimento potencial de trigo.

Na cultura do sorgo sacarino estudo realizado por Silva e colaboradores (2014) verificou redução de 50% da massa de talos de sorgo quando não foi realizado nenhum controle sobre as plantas daninhas. Em trabalho realizado por Forte et al. (2017), a presença de picão na área cultivada de soja na proporção de 75% reduziu a produção de massa seca da parte área da cultura aos 50 dias após a emergência de 47,3 para 25,2g. Tais autores observaram que quanto mais elevada a proporção da competição das infestantes com as cultivares, maiores foram os danos às variáveis da cultura da soja.

Essa perda de rendimento tem uma correlação direta com a competição das plantas daninhas com a cultura de interesse, pois elas competem por espaço, nutrientes, água e luz (WU et al., 2017). Na maioria dos casos, as perdas causadas por esses produtos são maiores e economicamente mais prejudiciais que insetos, fungos ou outras pragas de culturas (ABOUZIENA et al., 2016; GHARDE et al., 2018).

Como a maioria das plantas daninhas são auto-semeadas, ocorre uma taxa rápida de crescimento nos estágios iniciais de crescimento da cultura. Assim o conhecimento sobre as características delas é crucial para ajudar no desenvolvimento de métodos adequados para o seu controle, por estudar a fase mais sensível em seu ciclo de vida (RANA, 2016).

O controle é o manejo propriamente dito que irá reduzir o número de plantas daninhas a fim de impedir que a interferência sobre as plantas cultivadas reduza a produção econômica, além de prevenir o aumento no número de propágulos (POOLE & GILL, 1987). O principal método utilizado atualmente no manejo das plantas daninhas no cenário agrícola mundial é o controle químico (CARVALHO, 2013).

O uso de herbicidas tem aumentado nas últimas décadas e ainda está aumentando (CHOUDHURY et al., 2016). Ao se considerar as vendas de agroquímicos por classe de produto, em 2016, verificou-se que os fungicidas passaram a ser os produtos mais comercializados, respondendo a 33% do total, uma situação vinculada à ferrugem da soja. Na sequência estão os herbicidas com 32%, seguidos dos inseticidas com 29% (SAMPAIO, 2018).

As aplicações de herbicidas sintéticos em larga escala e em longo prazo têm muitos impactos negativos sobre o meio ambiente, a biodiversidade, os ecossistemas agrícolas, a pesca e a saúde humana e animal (BASTIAANS et al., 2008). Consequentemente, há uma necessidade urgente de encontrar soluções ambientalmente amigáveis e economicamente sustentáveis para problemas de plantas daninhas existentes e emergentes (SHEN et al., 2018).

Além das grandes culturas como soja, milho, trigo, as culturas menores que incluem principalmente vegetais, frutas, sementes, ervas e plantas para uso medicinal e especiarias (PANNACCI et al., 2017) também merecem atenção quanto a utilização de métodos biológicos de controle de plantas daninhas. A produção sustentável de culturas menores é vital tanto para a saúde humana quanto para as economias nacionais, uma vez que contribui para a produtividade agrícola, bem como para um suprimento alimentar diversificado e nutricional, e segurança alimentar (LAMICHHANE et al., 2015).

2.1.1 Resistência aos herbicidas

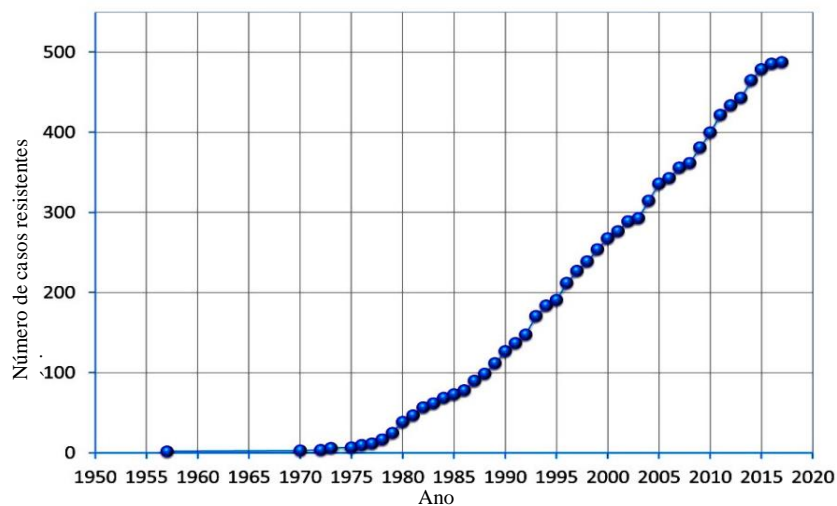
A Sociedade Americana de Ciência das Plantas Daninhas (Weed Science Society of America/WSSA) definiu resistência de plantas daninhas a herbicidas como a habilidade hereditária que uma planta tem de se reproduzir e sobreviver, após ser submetida a doses de herbicidas normalmente letais para seu biótipo (HEAP, 2016). A ocorrência é natural, devido ao fato de as plantas daninhas evoluírem e se adaptarem às mudanças do ambiente e ao uso das tecnologias agrícolas (ADEGAS et al., 2017).

A rápida disseminação de plantas daninhas resistentes a herbicidas (Figura 2.1) é resultado de três práticas: o uso de monoculturas, o excesso de uso de poucos mecanismos de ação herbicida e a negligência de outro método de controle de plantas daninhas (MORTENSEN et al., 2012). Segundo Heap (2018), existem no mundo, 495 casos de plantas daninhas resistentes, com 255 espécies (148 dicotiledôneas e 107 monocotiledôneas), os gêneros com maior número de biótipos resistentes são: *Lolium*, *Echinochloa*, *Poa*, *Avena*, *Alopecurus*, *Amaranthus*, *Eleusine*, *Conyza* e *Kochia*.

Os primeiros casos de resistência a herbicidas no Brasil foram relatados em 1993, relativos às espécies *Bidens pilosa* (picão-preto) e *Euphorbia heterophylla* (leiteiro), resistentes a herbicidas inibidores da enzima acetolactato-sintase – ALS (AGOSTINETTO; VARGAS, 2014; CHRISTOFFOLETI et al., 2016; WEED SCIENCE, 2016). Atualmente no Brasil o número de relatos perfaz 48 casos de plantas daninhas, abrangendo 50 espécies resistentes, sendo que os últimos registros relatados se dá a ocorrência da resistência de forma múltipla ou cruzada em diversas espécies (CHRISTOFFOLETI et al., 2016). Na Figura 2.2 pode-se observar o aumento em casos únicos de plantas daninhas resistentes a herbicidas para culturas selecionadas.

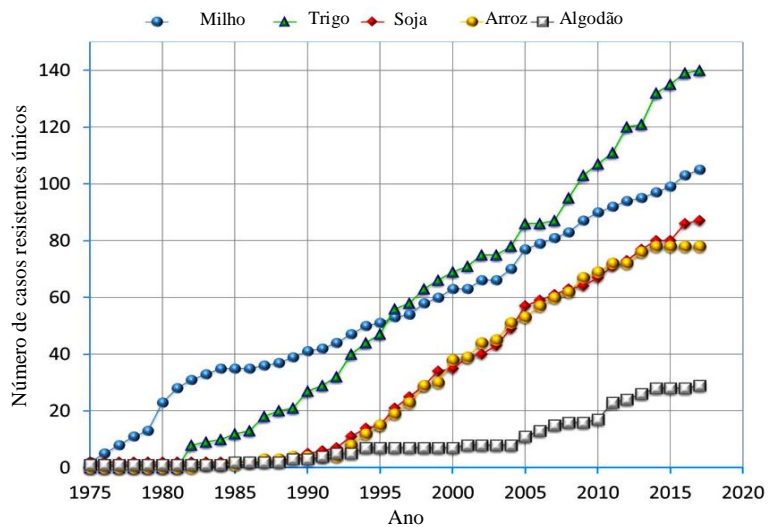
Nos últimos 10 anos, várias espécies de plantas daninhas desenvolveram resistência a múltiplos herbicidas, incluindo o glifosato, o herbicida mais comumente usado em todo o mundo (PANDEY et al., 2018). Em particular, a resistência ao glifosato (o ingrediente ativo do herbicida Roundup®) tornou-se um sério problema global com pelo menos 41 espécies de plantas daninhas que relataram ter desenvolvido resistência a este herbicida até o momento (Figura 2.3) (HEAP, 2018). Os Estados Unidos, Austrália, Brasil e Canadá estão entre os países com maiores quantidades de espécies de plantas daninhas resistentes ao glifosato (Figura 2.4), bem como com maiores áreas infectadas (HEAP, 2017).

Figura 2.1-Aumento cronológico em casos únicos* de plantas daninhas resistentes a herbicidas no mundo.



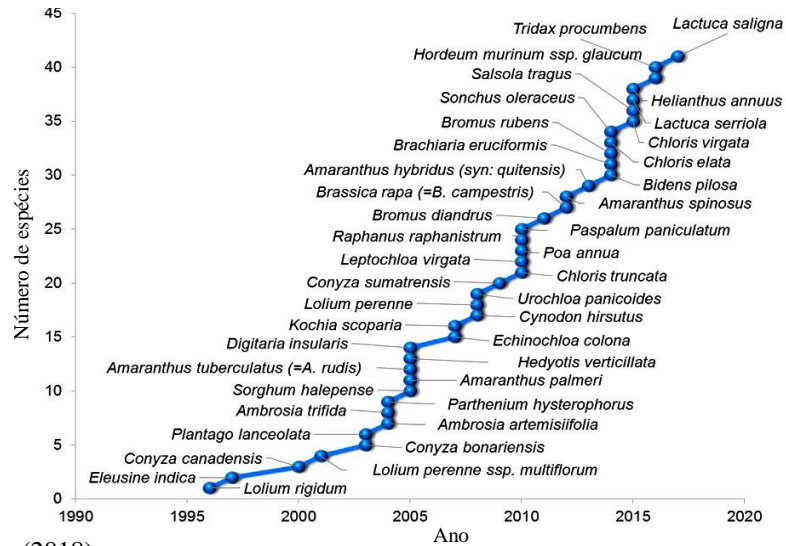
Fonte: Adaptado Heap (2018).

Figura 2.2-Aumento cronológico de resistência de plantas daninhas em grandes culturas selecionadas no mundo.



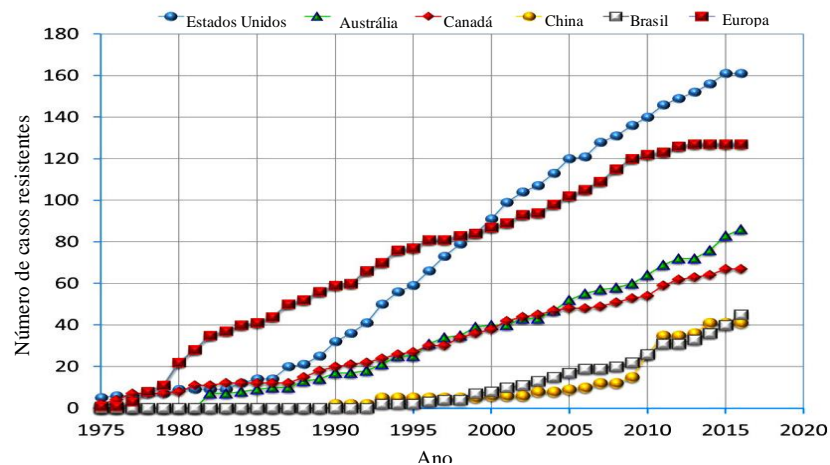
Fonte: Adaptado Heap (2018).

Figura 2.3-Aumento cronológico das espécies de plantas daninhas que desenvolveram resistência ao glifosato em todo o mundo.



Fonte: Adaptado Heap (2018).

Figura 2.4-Aumento cronológico de espécies resistentes ao glifosato para os cinco países com o maior número de espécies resistentes ao glifosato.



Fonte: Adaptado Heap (2018).

Quando um indivíduo possui um ou mais mecanismos que conferem resistência a herbicidas com mecanismo de ação diferente chamamos de resistência múltipla (CHRISTOFFOLETI e LÓPEZ-OVEJERO, 2008). No Brasil, os casos de resistência múltipla cresceram significativamente nos últimos anos como mostrado na Tabela 2.1. Convém ressaltar que os casos

de resistência múltipla documentados não possuem resistência à mais de dois mecanismos de ação herbicida (SANTOS et al., 2014; CARVALHO et al., 2015; GONÇALVES NETTO et al., 2016).

Tabela 2.1 - Espécies de plantas daninhas com resistência múltipla a herbicidas detectadas no Brasil até outubro de 2018.

Espécie	Ano	Resistência Múltipla a 2 Mecanismos de Ação
<i>Euphorbia heterophylla</i>	2004	*Inibidores da ALS (B) e da **Protox (E)
<i>Bidens subalternans</i>	2006	Inibidores da ALS (B) e do FSII (C)
<i>Echinochloa crus-galli</i> <i>var. crus-galli</i>	2009	Inibidores da ALS (B) e dos **Mimetizadores de Auxina (O)
<i>Sagittaria montevidensis</i>	2009	Inibidores da ALS (B) e do FSII (C)
<i>Lolium perenne ssp. Multiflorum</i>	2010	*Inibidores da ACCase (A) e da EPSPs (G)
<i>Conyza sumatrensis</i>	2011	Inibidores da ALS (B) e da EPSPs (G)
<i>Amaranthus retroflexus</i>	2011	Inibidores da ALS (B) e do FSII (C)
<i>Amaranthus viridis</i>	2011	Inibidores da ALS (B), e do FSII (C)
<i>Amaranthus palmeri</i>	2016	Inibidores da EPSPs (G) e da ALS (B)
<i>Bidens pilosa</i>	2016	Inibidores da ALS (B/2) Inibidores do FSII (C)
<i>Lolium perenne ssp. multiflorum</i>	2016	Inibidores da ACCase (A) e Inibidores da ALS (B)
<i>Lolium perenne ssp. multiflorum</i>	2017	Inibidores da ALS (B) e Inibidores da EPSPs
<i>Conyza sumatrensis</i>	2017	Inibidores da ALS e Inibidores da EPSPs (G)

*ALS: Enzima acetolactato sintase; **Protox: Enzima protoporfirinogênio oxidase; FSII: Herbicidas que bloqueiam o fluxo de elétrons; **Mimetizadores de auxina: herbicidas que causam descontrole da divisão e do crescimento das células vegetais, um dos hormônios vegetais reguladores de crescimento; *ACCase: enzima acetil coenzima A carboxilase; EPSPs: Enzima 5-enolpiruvilchiquimato – 3 – fosfato sintase.

Fonte: (HEAP, 2018).

Diferentemente da resistência múltipla, a resistência cruzada ocorre quando biótipos de plantas daninhas são resistentes a dois ou mais herbicidas pertencentes a um mesmo mecanismo de ação, de grupos químicos diferentes. A Tabela 2.2 apresenta exemplos de resistência cruzada relatados no Brasil, com destaque para o *Amaranthus palmeri* resistente ao chlorimuron-ethyl (sulfoniluréia), imazethapyr (imidazolinona) e cloransulan-methyl (triazolopirimidina) (FRANCISCHINI et al., 2014; GONÇALVES NETTO et al., 2016).

Tabela 2.2- Espécies de plantas daninhas com resistência cruzada a herbicidas detectadas no Brasil até outubro de 2018.

Espécie	Ano	Mecanismo de Ação
<i>Bidens pilosa</i>	1993	Inibidores da ALS (B)
<i>Euphorbia heterophylla</i>	1993	Inibidores da ALS (B)
<i>Bidens subalternans</i>	1996	Inibidores da ALS (B)
<i>Urochloa plantaginea</i>	1997	Inibidores da ALS (B)
<i>Sagittaria montevidensis</i>	1999	Inibidores da ALS (B)
<i>Sagittaria montevidensis</i>	1999	Inibidores da ALS (B)
<i>Cyperus difformis</i>	2000	Inibidores da ALS (B)
<i>Raphanus sativus</i>	2001	Inibidores da ALS (B)
<i>Digitaria ciliaris</i>	2002	Inibidores da ACCase (A)
<i>Eleusine indica</i>	2003	Inibidores da ACCase (A)
<i>Parthenium hysterophorus</i>	2004	Inibidores da ALS (B)
<i>Oryza sativa var. sylvatica</i>	2006	Inibidores da ALS (B)
<i>Amaranthus retroflexus</i>	2012	Inibidores da ALS (B)
<i>Raphanus raphanistrum</i>	2013	Inibidores da ALS (B)
<i>Ageratum conyzoides</i>	2013	Inibidores da ALS (B)
<i>Cyperus iria</i>	2014	Inibidores da ALS (B)
<i>Amaranthus palmeri</i>	2016	Inibidores da ALS (B)
<i>Digitaria insularis</i>	2016	Inibidores da ACCase (A)
<i>Conyza sumatrensis</i>	2017	Inibidores da PPO (E / 14)

Fonte: (HEAP, 2018).

A resistência de plantas daninhas aos herbicidas causa preocupação, pois há um aumento acelerado de resistência. Segundo Silva (2012) este fato é ainda mais inquietante quando as alternativas de herbicidas disponíveis para o manejo de biótipos resistentes são limitadas. Assim, há uma necessidade urgente de desenvolver novas ferramentas, que possam ser implantadas para gerenciar as plantas daninhas de maneira efetiva.

À medida que o número de biótipos resistentes a herbicidas aumenta, o desenvolvimento de novos modos de ação diminui (STREK, 2014). A partir disso, aumenta a necessidade de se utilizar todas as opções de manejo de plantas daninhas disponíveis, tais como culturais,

físicas/mecânicas, biológicas e de prevenção em conjunto com produtos herbicidas de origem natural (KORRES, 2018). Assim se os problemas de plantas daninhas resistentes a herbicidas forem abordados apenas com herbicidas, a evolução das resistências a herbicidas provavelmente prevalecerá (MORTENSEN et al., 2012).

2.1.2 Controle biológico de plantas daninhas

O controle biológico como um termo geral refere-se à introdução de organismos num ecossistema, com a intenção de controlar uma ou mais espécies indesejáveis (CHARUDATTAN, 2001; BAILEY et al., 2011). De acordo com a Weed Science Society of America, o controle biológico de plantas daninhas é amplamente definido como “o uso de um agente, um complexo de agentes ou processos biológicos para provocar a supressão de plantas daninhas (BAJWA et al., 2014). Segundo Guetsky et al. (2002) é uma medida não química de contenção de um fitopatógeno, ressaltando que os mecanismos pelos quais o controle biológico atua incluem a indução de resistência da planta, a competição por nutrientes e a produção de metabólitos secundários. Para Araújo et al. (2002) esse tipo de controle utiliza a propriedade dos endófitos em penetrar na planta e se disseminarem, assim como os fitopatógenos.

O controle biológico é tido atualmente como uma das alternativas mais utilizadas pela agricultura moderna, também chamada de agricultura sustentável ou alternativa. Esta opção de controle permite a redução no uso de agroquímicos, de modo a minimizar os danos já causados e evitar futuros danos ao meio ambiente (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000). Segundo Galon et al. (2016) do ponto de vista sustentável e ecológico, o controle biológico é provavelmente o método mais desejável para controle de plantas daninhas.

Os agentes de controle biológico podem ser categorizados em quatro grupos: macrorganismos (predadores, insetos parasitoides, nematoides), microrganismos (bactérias, fungos, vírus), mediadores químicos (feromônios) e substâncias naturais (originado de planta ou animal) (VILLAVERDE et al., 2014). Dentro do contexto de controle das plantas daninhas, este campo de estudo tem sido cada vez mais focado em fungos (DIAZ et al., 2014), pois diversas espécies possuem a capacidade de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários com expressiva atividade biológica (HINZ et al., 2014; VILLAVERDE et al., 2014).

2.2 BIOHERBICIDAS

Nas últimas décadas, as pesquisas para o manejo de plantas daninhas têm-se centrado sobre a forma de reduzir a dependência de herbicidas sintéticos em sistemas de cultivo, combinando várias técnicas de manejo (CHIKOWO et al., 2009). Neste contexto e diante dos problemas causados pelo uso de agrotóxicos se dá a necessidade de buscar a sustentabilidade dos agroecossistemas, assim a descoberta dos bioherbicidas pode ser uma interessante ferramenta (GALON et al., 2016).

Bioherbicidas são produtos que se originam naturalmente de organismos vivos ou de seus metabólitos naturais que são usados para controlar populações de plantas daninhas sem degradar o meio ambiente (HOAGLAND et al., 2007, BAILEY, 2014). Os bioherbicidas são categorizados como específicos para o hospedeiro e não específicos para o controle de plantas daninhas (RADHAKRISHNAN et al., 2018). Ressalva-se que a especificidade do alvo e a rápida degradação ambiental dos produtos do bioherbicida garantem mais atenção ao desenvolvimento de produtos comerciais que são alternativas aos herbicidas químicos (CORDEAU et al., 2016).

As origens biológicas da maioria dos bioherbicidas são microbianas (bactérias, fungos, vírus e nematoides), porém extratos ou compostos isolados de plantas também são utilizados (BAILEY, 2014; RANA, 2016). Os bioherbicidas podem ser usados diretamente e têm sido utilizados como modelo para o desenvolvimento de vários herbicidas bem-sucedidos (glufosinato de amônia e herbicidas de trietona) que introduziram novos mecanismos de ação, que são muito necessários para superar a resistência adquirida aos herbicidas sintéticos na produção agrícola (WU et al., 2017). São considerados um tipo de controle biológico inundativo, significando que os métodos de aplicação e situações de uso são muito semelhantes aos dos herbicidas convencionais (BAILEY, 2014). Uma das grandes vantagens dos bioherbicidas é quanto à questão ambiental, pois o resíduo ambiental dos bioherbicidas registrados é geralmente curto, resultando em menor exposição e redução do risco de poluição ambiental.

Os bioherbicidas inibem a germinação e o crescimento de plantas daninhas, no entanto, poucos estudos são realizados em termos de fisiologia de plantas daninhas. O efeito dos herbicidas está ilustrado na Figura 2.5, onde os metabólitos são absorvidos pelas sementes das plantas

daninhas, o que inicia danos à membrana celular, DNA, mitose, atividade da amilase e outros processos bioquímicos e atrasa ou inibe a germinação das sementes.

Figura 2.5-Efeito dos bioherbicidas no controle de plantas daninhas.



Fonte: Adaptado de Radhakrishnan et al. (2018).

O crescimento de plantas daninhas também é retardado devido às baixas taxas de divisão de células, absorção de nutrientes, síntese de pigmentos fotossintéticos e síntese de hormônio de crescimento vegetal, enquanto a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e hormônios mediados por estresse aumentam. Alguns dos metabólitos causam doenças, necrose e clorose, que inibem a germinação e o crescimento de sementes das plantas daninhas, suprimindo as atividades de fotossíntese e aumentando as EROs, o ácido abscísico e o etileno (RADHAKRISHNAN et al., 2018).

Os bioherbicidas foram introduzidos pela primeira vez nos mercados comerciais em 1980 nos EUA, Canadá, Ucrânia e Europa, sendo estes os únicos usuários que utilizam os bioherbicidas (CHARUDATTAN, 2001; BAILEY 2014; CORDEAU et al., 2016). Embora o número total de biopesticidas registrados em todo o mundo esteja aumentando, os bioherbicidas constituam sendo a menor fração desses produtos utilizados no controle de pragas (ASH, 2010; BAILEY et al., 2010; GLARE et al., 2012). Apesar de vários microrganismos e produtos vegetais terem sido testados em

laboratório e com sucesso à campo, apenas alguns (9 fungos, 3 bactérias e 1 extrato vegetal) estão comercialmente disponíveis nos mercados atuais (CORDEAU et al., 2016) (Tabela 2.3).

Poucos bioherbicidas têm alcançado o sucesso comercial a longo prazo, em parte devido a um desempenho inconsistente em condições de campo. Pesquisa, desenvolvimento e regulação são necessários para melhorar o número de soluções eficazes no mercado mundial. O desenvolvimento e ampliação do uso de bioherbicidas é um passo importante para a sustentabilidade da agricultura (CORDEAU et al., 2016).

Como descrito anteriormente o uso prolongado de herbicidas químicos gera populações de plantas daninhas resistentes a herbicidas, mas a associação microbiana limita a resistência e controla diferentes espécies de plantas daninhas (OMER et al., 2010). Alguns gêneros de fungos como: *Alternaria*, *Chondrostereum*, *Colletorichum*, *Curvularia*, *Diaporthe*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Sclerotinia*, *Trichoderma*, *Verticillium* foram registrados como agentes bioherbicidas que inibem a germinação de sementes e o crescimento de plantas daninhas (Tabela 2.4) (RADHAKRISHNAN et al., 2018).

Inúmeros trabalhos também comprovaram a ação herbicida dos filtrados de cultura de fungos, sem a presença de organismo vivo. Neste sentido, estudos apontam que a produção de herbicidas por rotas biológicas, através de processos fermentativos utilizando fungos é muito promissor para a produção de metabólitos fitotóxicos (KLAIC, 2014; PES et al., 2016; SOUZA et al., 2015; BRUN et al., 2016; SOUZA et al., 2017; BASTOS et al., 2017; TODERO et al., 2018^a; DANEIL Jr. et al., 2018).

Tabela 2.3- Bioherbicidas produzidos a partir de microrganismos e extratos vegetais.

País/Ano	Produto Bioherbicida	Ingrediente Ativo	Erva daninha alvo	Cultura alvo	Comercialização
EUA/1981	Devine	<i>Phytophthora palmivora</i>	<i>Morrenia odorata</i>	Citros	Não está disponível desde 2006
EUA/1982	Collego	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> f. sp. <i>aeschynomene</i>	<i>Aeschynomene virginica</i>	Arroz Soja	Não encontrado
Canadá 1992	BioMal	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Malva pusilla</i>	Trigo, Lentilha Linho	Não encontrado
EUA/2002	Woad Warrior	<i>Puccinia thlaspeos</i> C. Shub	<i>Isatis tinctoria</i>		Não está disponível
Canadá 2004 USA 2004	Myco-tech	<i>Chondrostereum purpureum</i>	<i>Prunus Serotine</i> <i>Populus euramericana</i>	Solos arenoso, florestas de coníferas	Não está disponível
Canadá 2004 EUA 2005	Chontrol	<i>Chondrostereum purpureum</i>	<i>Prunus Serotine</i> <i>Populus euramericana</i>	Solos arenosos, florestas de coníferas	Disponível no EUA e no Canadá
EUA 2005	Smolder	<i>Alternaria destruens</i>	(<i>Cuscuta</i> spp)	Alfafa, cenoura, amora, pimenta doce, tomate, berinjela	Comercializado em forma de grânulos sólidos
Canadá 2009	Sarritor	<i>Sclerotinia minor</i>	(<i>Taraxacum</i> spp.)	Controla as dicotiledôneas	Comercializado
Canadá/ EUA	<i>Phoma</i>	<i>Phoma macrostoma</i>	Não encontrado	Dicotiledônea em campos de golfe, agricultura	Não encontrado
2012	Opportune			Relvado	Vias de registro
Japão	Camperico	<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>Poa annua</i>	Não encontrado	Venda não lançada
Canadá /2010	Organo-Sol Kona (nome comercial)	- <i>Lactobacillus casei</i> , - <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , - <i>Lactobacillus lactis</i> ssp.	- <i>Trifolium repens</i> ; - <i>Lotus corniculatus</i> ; - <i>Medicago lupulina</i>		Comercializado
2015	Beloukha	Derivado do óleo de colza	Não encontrado	Jardinagem	Autorização para 2016/2017 mercado europeu e em seguida Japão
Não encontrado	Katoun	Derivado do óleo de colza – dados Syngenta	Dessecante natural pós-emergência de ervas daninhas	Caminhos de parque, jardins públicos.	Será comercializado pela Syngenta

Fonte: Adaptado CORDEAU et al. (2016).

Tabela 2.4- Efeito de bioherbicidas fúngicos na fisiologia das plantas daninhas

Microrganismos	Estimulante de bioherbicida	Modo de ação em plantas daninhas	Referências
<i>Alternaria alternata</i>	Esporo e cultura	Doença da ferrugem e inibir a germinação de sementes	Masangkay et al. (1999) e Motlagh (2012)
<i>Alternaria cassiae</i>	Esporo	Aumentar a mortalidade do crescimento de plantas daninhas e causar doenças	Pitelli e Amorim (2003)
<i>Alternaria crassa</i>	Esporo	Controlar o crescimento de plantas daninhas	Stewart-Wade et al. (1998)
<i>Alternaria destruens</i>	Esporo	Causar doenças e danificar as plantas daninhas	Cook et al. (2009)
<i>Ascochyta caulina</i> (P. Karst)	Esporo	Inibir o crescimento e induzir a doença	Netland et al. (2001)
<i>Cercospora piaropi</i>	Esporo e cultura (cercosporina e beticolina)	Inibir o crescimento, induzir a doença	Moran (2005) e Tessmann et al. (2008)
<i>Chondrostereum purpureum</i>	Esporo	Reduzir o crescimento de brotos	Bourdot et al. (2006)
<i>Coccodes de Colletorichum</i> (Wallr.)	Esporo	Induzir doença e atividade POD	Ahn et al. (2005)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Esporo	Alta taxa de mortalidade, redução do peso seco e redução do crescimento de plantas, lesões de antracnose no caule, alterações de polissacarídeos na parede celular	Boyette et al. (2010) e Bowling et al. (2010)
<i>Colletotrichum graminicola</i>	Esporo	Reduzir a biomassa de plantas daninhas	Mitchel ¹ continuação
<i>Colletotrichum truncatum</i>	Esporo	Alta taxa de mortalidade e redução do peso seco	Boyette e Hoagland (2010)
<i>Curvularia eragrostidis</i> Isolate QZ-2000	Esporo e cultura	Inibir a germinação de sementes, biomassa, clorofila, fotofosforilação, Mg ²⁺ ATPase, mitose das pontas das raízes, aumento da necrose, mortalidade	Zhu e Qiang (2004) e Jiang et al. (2008)
<i>Diaporthe sp.</i>	Esporo	Indução de doença	Souza et al. (2017)
<i>Drechslera gigantea</i>	Esporo	Aumentar a doença e a mortalidade	Peng e Boyetchko (2006)
<i>Fusarium equiseti</i>	Esporo	Inibir a germinação de sementes e indução de doenças	Motlagh (2011)

Microrganismos	Estimulante de bioherbicida	Modo de ação em plantas daninhas	Referências
<i>Fusarium oxysporum</i>	Esporo	Indução de doenças, necrose, produção de etileno, inibir a germinação de sementes e infectar testículos de sementes e endospermas	Thomas et al. (1999), Jennings et al., 2000 e Ray e Vijayachandran (2013)
<i>Fusarium tumidum</i>	Esporo	Induzir a doença e reduzir o crescimento de brotos	Morin et al. (2000) e Bourdot et al. (2006)
<i>Myrothecium roridum</i>	Esporos e cultura (β – 1,4-exoglucanase, β – 1,4-endoglucanase, glucosidase, xilanase e pectinase)	Inibir a germinação, o crescimento e a doença das sementes	Lee et al. (2008) e Piyaboon et al. (2016)
<i>Myrothecium verrucaria</i>	Esporo	Inibir o crescimento de ervas daninhas, clorofila e induzir a doença	Weaver et al. (2009) e Hoagland et al. (2013)
<i>Phoma commelinicola</i>	Esporo	Mortalidade, indução de doenças e redução do peso seco	Boyette et al. (2015)
<i>Phoma Herbarum</i>	Esporo e cultura	Inibir o crescimento de plantas daninhas	Schnick e Boland (2004) e Vikrant et al. (2006)
<i>Phoma macrostoma</i>	Esporo	Iniba o crescimento de plantas daninhas e perturbe as células da raiz	Bailey et al. (2011)
<i>Phoma macrostoma</i>	Esporo e cultura	Inibir o crescimento, clorose, fotossíntese, biossíntese de carotenóides	Hubbard et al. (2015)
<i>Phomopsis amaranthicola</i>	Esporo	Inibir o crescimento de plantas daninhas, aumentar a taxa de doenças e mortalidade	Ortiz-Ribbing e Williams (2006)
<i>Convolvulus de Phomopsis</i>	Esporo	Inibir o crescimento de plantas daninhas, aumentar a taxa de doenças e mortalidade	Vogelgsang et al. (1998)
<i>Sclerotinia menor</i>	Esporo	Inibir o crescimento de plantas daninhas	Abu-Dieyeh et al. (2010)
<i>Trichoderma virens</i>	Esporo	Inibir o crescimento de plantas daninhas	Heraux et al. (2005)
<i>Verticillium dahliae</i>	Esporo	Indução de doenças e redução do crescimento de plantas daninhas	Skipp et al. (2013)

Fonte: Radhakrishnan et al. (2018).

2.2.1 Metabólitos secundários produzidos por fungos

Os processos biotecnológicos exploram o metabolismo fúngico como potenciais produtores de metabólitos primários e secundários (GENG et al., 2014). Os nutrientes do meio onde os microrganismos se encontram, são assimilados nos processos de biossíntese, gerando os metabólitos primários e secundários (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004).

Os fungos possuem como característica a capacidade de biossintetizar uma diversidade de compostos naturais (SIDDIQUE, 2012; KLAIC, 2014). De acordo com Keller et al., (2005) mais de 30.000 compostos produzidos pelo metabolismo secundário dos fungos são conhecidos, e estes são considerados pelos pesquisadores como fontes de novos fármacos e agroquímicos (VINING, 1990; TREMACOLDI; FILHO, 2006). Ressalva-se que alguns têm importância para os humanos como a penicilina, cefalosporina, alcaloides, griseofulvina, lovastatina, taxol, zeranol, imunossuppressores e micotoxinas, outros já são produtores de biossurfactantes e exopolissacarídeos (WARD, 2012).

Os metabólitos produzidos por fungos que demonstram propriedades tóxicas em animais são denominados de micotoxinas, enquanto aqueles que demonstram propriedades tóxicas em plantas são chamados fitotoxinas. Convém ressaltar que devido a estas fitotoxinas é possível explorar o poder dos bioherbicidas (KLAIC, 2014). Na natureza encontram-se diversos fungos que detêm habilidade de produzir substâncias fitotóxicas como *Alternaria*, *Fusarium*, *Colletotrichum* e *Phoma* com diferentes modos de ação (LI et al., 2003).

2.2.1.1 *Fusarium fujikuroi*

O gênero *Fusarium* (anamorfo) e *Giberella* (telemorfo) pertencente ao filo Ascomycota, família Nectriaceae, e pode ser encontrado no solo, no ar e nos vegetais, incluindo os alimentos “in natura”, com aproximadamente 775 espécies e subespécies descritas (MACIEL, 2012). Com ampla distribuição geográfica, são encontradas espécies cosmopolitas e outras com ocorrência restrita em determinados ambientes. Há predomínio nas regiões tropicais e subtropicais ou em condições de clima frio das regiões temperadas, embora algumas espécies tenham uma íntima associação com os seus hospedeiros, como endofíticos (PRADEEP et al., 2015).

Como mencionado anteriormente os fungos são conhecidos por seu potencial em produzir uma grande variedade de metabólitos bioativos e alguns para aplicações agrícolas (MARINHO et al., 2017). Em relação ao *Fusarium fujikuroi*, trata-se de um fungo que tem a

capacidade de produzir metabólitos com ação fitotóxica (STIPANOVIC et al., 2017; UKALE et al., 2016) como ácido fusárico, ácido indol acético, ácido 2-(4-butilpicolinamida) acético e terpestacina (HILÁRIO et al., 2017), entre outros, como policetídeos e peptídeos não ribossômicos (ARNDT et al., 2017).

O gênero *Fusarium* sp. é o segundo gênero mais citado em estudos relacionados à produção de bioherbicidas (DANIEL Jr. et al., 2018). Pearson et al. (2016) avaliaram a atividade herbicida de diferentes fungos do gênero *Fusarium* (*Fusarium avenaceum*, *Fusarium acuminatum*, *Fusarium redolens*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium cerealis* e *Fusarium solani*) em diferentes espécies de gramíneas. Os autores obtiveram resultados promissores ao usar *Fusarium Avenaceum* e *Fusarium acuminatum*. Da mesma forma Aybeke (2017) relatou efeitos tóxicos do *Fusarium oxysporum* em uma planta daninha parasitária de raiz (*Orobanche* spp.).

Li et al. (2014) relataram que o extrato de acetato de etila do caldo de fermentação de *Fusarium proliferatum* proporcionou atividade fitotóxica seletiva contra o crescimento da radícula de *Amaranthus retroflexus* L.. Mais recentemente, Daniel Jr. et al. (2018) reportaram que os metabólitos de *Fusarium fujikuroi* produzidos a partir da fermentação submersa apresentaram 20% e 25% de fitotoxicidade contra *Cucumis sativus* e *Sorghum bicolor*, respectivamente, sendo que a altura das plantas e o comprimento das raízes foram reduzidos.

2.2.1.2 Exopolissacarídeos

Os exopolissacarídeos (EPSs) são polímeros de carboidratos com alto peso molecular secretados extracelularmente por muitos microrganismos (GÓRSKA et al., 2017). São conhecidos por suas propriedades espessantes, geleificantes e emulsificantes exibindo um amplo espectro de aplicações nas indústrias farmacêutica, biomédica e alimentícia (NICOLAUS et al., 2010; ADEBAYO-TAYO et al., 2018). Os EPSs estão principalmente associados a aplicações de alto valor, e eles receberam considerável atenção de pesquisa nas últimas décadas com sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e compatibilidade ambiental e humana (ATES, 2015), porém devem ter um espectro mais amplo de atividade em vários campos da biotecnologia, medicina, proteção ambiental e principalmente na agricultura.

Eles são derivados de uma ampla variedade de fontes: bacterianas, fúngicas, algas e plantas (LEUNG et al., 2006). Dentre os microrganismos produtores de EPS, as bactérias são aquelas que têm a via biossintética mais bem estabelecida e estudada. Os EPS produzidos pelos

fungos têm sido reconhecidos como biomacromoléculas de alto valor nas últimas duas décadas (MAHAPATRA et al., 2013).

Tanto fungos patogênicos quanto não patogênicos podem ser explorados para a obtenção de metabólitos naturalmente produzidos, como os polissacarídeos, e que possam ser aproveitados para aplicação em diferentes áreas industriais (CHAPLA et al., 2013; SELIM et al., 2012). Os estudos sobre produção de EPS fúngicos têm se diversificado, incluindo os endofíticos, principalmente pela capacidade de síntese e secreção de metabólitos com ações biológicas específicas que estes microrganismos apresentam (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013; SELIM et al., 2012). Esta síntese pode ser explicada devido à intensa atividade metabólica dos endofíticos, causada pela necessidade de adaptação ao hospedeiro, especialmente devido aos mecanismos de defesa que estes últimos apresentam (SURYANARAYANAN et al., 2009).

A produção de EPS é amplamente distribuída entre fungos, incluindo diversos gêneros (Tabela 2.5) (FREITAS et al., 2017). Muitos fungos secretam EPS com propriedades bioativas que incluem antioxidantes, antitumorais, imunoestimulantes e antimicrobianas (OSINSKA-JAROSZUK et al., 2015). De acordo com relatos recentes, fungos endofíticos sintetizam EPS que estão envolvidos em interações planta-endófito e tais biopolímeros são caracterizados por novas estruturas exibindo atividade biológica (LIU et al., 2017). Exemplos incluem o galactomanano produzido por *Aspergillus* sp. Y16, que foi relatado ter atividade antioxidante (CHEN et al., 2011), os β -glucanos produzidos por *Diaporthe* sp. estirpes JF766998 e JF767007 que possuem atividade antitumoral (ORLANDELLI et al., 2017), e o ramnogalactano produzido por *Fusarium solani* SD5 que exibiu atividade anti-inflamatória e anti-alérgica in vitro (MAHAPATRA; BANERJEE, 2012).

Não há condições gerais de cultivo adequadas para todos os microrganismos produtores de EPSs que garantam altas produtividades e rendimentos. Dependendo da espécie e das condições de cultivo, a produção de EPS por bactérias pode variar entre 0,29 e 100 g/L, em processos que levam de 0,5 a 7 dias. Os fungos geralmente têm um tempo de cultivo mais longo do que as bactérias, o que, em alguns casos, se traduz em menores produtividades. Esses bioprocessos estão em grande parte ainda em desenvolvimento e o interesse em sua otimização é suportado pelas valiosas propriedades funcionais dos EPS (FREITAS et al., 2017).

Tabela 2.5- Produção de EPS por fungos.

Microrganismo	EPS (g/L)	Referências
<i>Sclerotium rolfsii</i>	12,80	Taskin et al. (2010)
<i>Fusarium solani</i>	2,27	Mahapatra et al. (2013)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	23,10–31,42	Özcan et al. (2014)
	39,20	Wang et al. (2014)
	39,80	Wang et al. (2015)
	22,20	Wu et al. (2012)
<i>Auricularia auricula</i>	7,50	Osinska-Jaroszuk et al. (2015)
<i>Fusarium oxysporum</i>	0,60	
<i>Ganoderma lucidum</i>	8,10	Mohtar et al. (2016)
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	4,32	Mahapatra et al. (2016)
<i>Antrodia Camphorata</i>	0,47	Mmanywa et al. (2017)

Fonte: O Autor.

2.3 PRODUÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

2.3.1 Fermentação Submersa

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 (SINHA; SINHA, 2009). Nos processos com fungos as condições usadas mais frequentemente são um tempo de fermentação de 5 a 12 dias, com uma temperatura em torno de 24-35 °C e agitação de 50-150 rpm (KLAIC, 2014) e um fator importante na fermentação é o meio de cultura, podendo utilizar-se o meio industrial, bem como um meio sintético (ZHANG et al., 2012; SINGHANIA, 2010).

A fermentação submersa tem sido preferida porque é fácil para aumento de escala e controle, sendo um processo bem estabelecido industrialmente (ASH, 2010; BRUN et al., 2016; SALLET et al., 2017). É um método alternativo viável, rápido e eficiente para produzir micélio e alguns metabólitos valiosos, incluindo os EPS (CHEN et al., 2019) e os bioherbicidas. Porém geralmente as concentrações de fitotoxinas de fungos em meios de cultura são baixas, uma vez que o metabólito produzido se encontra diluído em um grande volume reacional (VAREJÃO, 2013). Neste sentido, a etapa de purificação e concentração das moléculas muitas vezes se torna

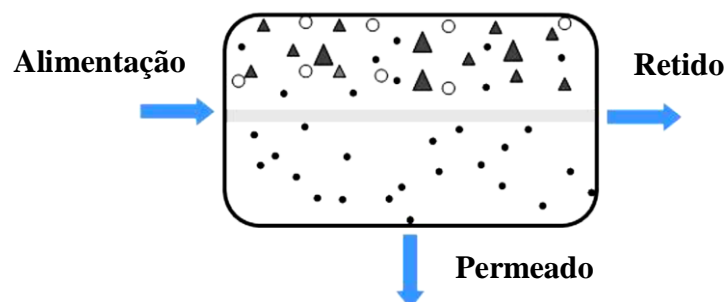
indispensável para garantir a eficácia do produto como bioherbicida (TODERO et al., 2018a) e aumentar a concentração de exopolissacarídeos.

2.3.2 Membranas

Diversas operações unitárias podem ser utilizadas para a separação, purificação e concentração de biomoléculas do caldo de fermentação (BASTRZYK et al., 2015). Dentre elas, a filtração por membranas tem sido amplamente utilizada na separação de vários bioprodutos do caldo bruto (SO'AIB et al., 2013; PACHECO-RUIZ et al., 2017). O processo de separação por membranas é basicamente um processo de transferência de massa, onde a alimentação é constituída por uma mistura de dois ou mais componentes que é parcialmente separada através de uma barreira semipermeável (membrana) em duas frações denominadas permeado e retido (Figura 2.6) (PESSOA JÚNIOR e KILIKIAN, 2005; SEADER et al., 2010).

A separação de biomoléculas por membranas de baixa pressão é um fenômeno complexo governado por três mecanismos principais: exclusão por tamanho, repulsão/atração eletrostática e interações hidrofóbicas/hidrofílicas, onde a exclusão do tamanho dos poros é o mecanismo mais importante. As moléculas menores que o tamanho dos poros passam, enquanto as maiores que o tamanho dos poros são retidas (CARNIEL et al., 2017; ABDELRASOUL et al., 2017; BORTOLUZZI et al., 2017).

Figura 2.6- Esquema de um processo de separação com membrana



Fonte: Adaptado de Harbert; Borges e Nóbrega, 2006

A membrana é caracterizada como uma barreira seletiva, aumentando a concentração de certos componentes da alimentação e diminuindo a de outros (HELDMAN e LUND, 2007; GERKE, 2016). As membranas podem ser classificadas do ponto de vista morfológico como densas ou porosas e quanto a sua estrutura como simétrica ou assimétrica, considerando sua

estrutura interna (CHERYAN, 1998). A membrana é denominada porosa quando o transporte dela ocorre devido à diferença de tamanho entre as partículas e os poros da membrana. Já as membranas densas não possuem poros e, o transporte dos componentes envolve a sorção e a difusão através do material que constitui a membrana (BAKER, 2012).

Nos processos com membranas, duas configurações de escoamento podem ser utilizadas: o escoamento de modo tangencial (*cross flow filtration*) ou o escoamento de modo convencional ou perpendicular (*dead end filtration*), ou seja, sem escoamento da alimentação (MULDER, 1996). No modo tangencial, a solução de alimentação escoar em paralelo à superfície da membrana, enquanto o permeado é transportado transversalmente a membrana. A alimentação escoar ao longo da superfície da membrana, gerando o acúmulo de apenas parte das partículas retidas. A polarização por concentração continua presente, mas é possível minimizar seu efeito, em particular, alternando a velocidade de escoamento da corrente de alimentação (HABER et al., 2006).

Quanto aos diferentes tipos de processos de separação por membrana, pode-se classificá-los como processos de microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração, osmose inversa, pervaporação, permeação de gases e diálise. Um esquema dos processos de separação com suas características de aplicação é descrito na Tabela 2.6 (HABERT et al., 2006; BAKER, 1991; BAKER, 2012).

Tabela 2.6- Classificação dos processos clássicos de separação

Processo	Escala de separação	Aplicações
Microfiltração	0,1 a 10 µm	Esterilização bacteriana; Concentração de células/moléculas
Ultrafiltração	0,01 a 0,1 µm	Concentração de proteínas.
Nanofiltração	1 nm a 0,01 µm	Purificação de enzimas; Biorreatores a membrana
Osmose Inversa	< 5 nm	Concentração de suco de frutas.
Pervaporação	< 1 nm	Desidratação de álcoois.
Permeação de Gases	< 1 nm	Recuperação de hidrogênio.
Diálise	< 5 nm	Hemodiálise; Rim artificial.

Fonte: Adaptado de BAKER (2012) e HABERT et al., (2006).

O processo de microfiltração utiliza membranas porosas com poros na faixa entre 0,1 e 10 µm (100 e 10.000 nm), promovendo a separação de partículas de diferentes tamanhos através da aplicação de um gradiente de pressão relativamente baixo, dificilmente passando de 3 bar, caracterizando-se como o processo de separação por membranas mais parecido com o processo convencional de filtração (BALDASSO, 2008; HABERT et al., 2006; GARCÍA et al., 2013).

A ultrafiltração é um processo geralmente utilizado para retenção de macromoléculas e colóides presentes em solução e pode ser considerado como um processo intermediário entre os processos de microfiltração e nanofiltração (MULDER, 1996). As membranas de ultrafiltração apresentam poros na faixa entre 1 e 100 nm, portanto mais fechadas do que as membranas de Microfiltração. Como os poros das membranas de UF são menores, uma força motriz maior é necessária para obter fluxos permeados elevados o suficiente para que o processo possa ser utilizado industrialmente. Por este motivo as diferenças de pressão através da membrana variam na faixa de 2 a 10 bar (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

Há um grande campo de aplicações envolvendo os processos de utilização e separação por membranas, tanto nas indústrias farmacêuticas, químicas, como nas indústrias agroalimentares: desde a potabilidade da água a partir da água do mar, até o fracionamento, concentração e purificação de soluções moleculares (BRANS et al., 2004). Os resultados alcançados nas pesquisas com o processo de separação por membranas permitem vislumbrar um futuro bastante promissor para essa tecnologia, deixando de serem apenas técnicas laboratoriais para serem utilizadas industrialmente (MOURA, 2002).

2.3.3 Liofilização e Evaporação

A liofilização e evaporação são métodos para reduzir o volume da amostra, no entanto, cada método envolve um processo diferente e afeta as amostras de diferentes maneiras. A força principal que impulsiona a mudança de fase é a energia térmica (WILLIAMS, 2016).

O processo de liofilização consiste em um processo que ocorre por meio da sublimação da parte congelada a temperaturas baixas e sob vácuo (VIEIRA et al., 2012). Essa tecnologia foi desenvolvida para superar as perdas de compostos, os quais são muito suscetíveis às modalidades de processamento que empregam temperaturas elevadas, como a secagem convencional (IBARZ e BARBOSA-CANOVAS, 1999). O material, previamente congelado, é desidratado por sublimação, utilizando-se baixas temperaturas a pressões reduzidas. A liofilização é o método de primeira escolha para produtos termolábeis (CARPENTER et. al., 1999).

A evaporação é baseada na transferência de calor entre o vapor de condensação como meio de aquecimento e o líquido a ser concentrado (TANGUY et al., 2015). Quando a evaporação é usada para concentração, os analitos voláteis também correm o risco de serem perdidos (FORNELLS et al., 2017).

2.4 FORMULAÇÃO

Uma das etapas mais importantes para a produção de um bioherbicida é desenvolver uma tecnologia de formulação e aplicação adequada (RANA, 2016). A busca por uma formulação é fundamental para aumentar a estabilidade e eficiência destes agentes no campo e aumentar o efeito sobre a vida de prateleira do produto, facilitando o desenvolvimento, registro e comercialização futura (GHORBANI et al., 2005). A formulação de um bioherbicida é a chave para o controle biológico bem-sucedido e pode ser definida como a mistura dos patógenos biologicamente ativos e/ou metabólitos secundários com portadores inertes e outro adjuvante para aumentar a eficácia do patógeno na planta daninha alvo (GADDEYYA et al., 2018).

O processo de absorção de um herbicida pela planta, está diretamente relacionado a sua eficiência, onde alguns produtos possuem ação local, conhecidos como herbicidas de contato e os que translocam na planta e agem em sítios específicos, como os herbicidas sistêmicos (DURIGAN; CORREIA, 2008). Visando a melhoria da eficiência e segurança dos herbicidas, alguns componentes podem ser adicionados à sua formulação (TODERO et al., 2018b).

Os adjuvantes são qualquer material adicionado a uma solução de pulverização herbicida com o intuito de modificar ou reforçar as características físico-químicas da referida solução (KISSMANN, 1998; RANA, 2016). Estes podem atuar de diferentes maneiras, afetando o molhamento, aderência, o espalhamento, a formação de espuma e a dispersão da calda de pulverização (MONTÓRIO et al., 2004; CARBONARI et al., 2005; COSTA et al., 2005; MENDONÇA et al., 2007).

Segundo Rana (2016) existem mais de 3.000 adjuvantes disponíveis para uso no mercado, podendo ser agrupados em três tipos gerais:

- Ativadores: aumentam a atividade de herbicidas por modificar certas características, incluindo o tamanho de partícula e a distribuição da pulverização sobre a planta, a viscosidade de pulverização, bem como a velocidade de evaporação.

- Surfactantes: influenciam principalmente a capacidade de herbicidas para penetrar na cutícula cerosa da folha, facilitam ou melhoram a emulsificação, dispersão, molhamento e adesão das moléculas no tanque de mistura, bem como reduzem a tensão superficial da água.

- Agentes molhantes: aumentam a capacidade da água para deslocar o ar ou líquidos a partir da superfície da folha, permitindo que ele seja molhado pelo herbicida, ajudando a espalhar a solução mais uniformemente sobre a folha.

Os surfactantes podem ser divididos em quatro classes: aniônico, catiônico, anfotérico e não iônico, de acordo com seus grupos moleculares e lipofílicos (KIRKWOOD, 1993). Os

aniônicos, são pouco utilizados a nível de campo, pois podem alterar o equilíbrio eletrolítico da calda e pela formação de espuma. Os surfactantes catiônicos raramente são usados em formulações de caldas e produtos fitossanitários, pois podem ser fitotóxicos e incompatíveis com muitos ingredientes ativos. Os anfóteros também são poucos utilizados na agricultura, eles podem atuar como ânions ou cátions dependendo do pH da solução. Já os surfactantes não iônicos são os mais utilizados para herbicidas, eles não se ionizam e por isso não alteram o equilíbrio eletrolítico nas formulações (DURIGAN; CORREIA, 2008).

Na agricultura, são utilizados dois tipos de óleos: o mineral (originados de uma fração da destilação do petróleo) e o vegetal (provenientes do processamento de grãos) (HESS, 1997; MENDONÇA et al., 2007). Eles possuem os efeitos de molhante, espalhante, penetrante, anti-evaporante e adesivante. Os óleos vegetais são menos estáveis que os minerais e para sua formulação, precisam ser adicionados emulsificantes (KISSMANN, 1998). Esses juntamente com a água são adicionados para aumentar o tempo de retenção de uma solução nas folhas, permitindo um aumento na captação do herbicida (MENDONÇA et al., 2007; RANA, 2016).

2. 5 CONTRIBUIÇÕES ACERCA DO ESTADO DA ARTE

Dentre os inúmeros fatores que interferem na redução da produtividade de culturas agrícolas destacam-se as plantas daninhas. Além das elevadas perdas na quantidade colhida, essas espécies também interferem na qualidade do produto. O controle de plantas daninhas tem sido feito quase que exclusivamente pelo uso de herbicidas, gerando alto custo de produção, danos ao meio ambiente e preocupações quanto a saúde dos agricultores.

A utilização de bioherbicidas pode ser uma alternativa a ser adotada no manejo de plantas daninhas. Estes produtos têm especificidade alvo e são produzidos a partir de fontes naturais, ou seja, encontrados a partir de metabólitos secundários extraídos de vegetais, assim como de microrganismos. No entanto, ainda é difícil a determinação da quantidade e qualidade dos aleloquímicos com potencial herbicida (RADHAKRISHNAN, et al., 2018). Algumas das limitações da utilização dos bioherbicidas está associada a dificuldade de extrapolar os resultados obtidos em condições controladas para o campo (SOLTYS et al., 2012). Diante desses desafios é necessário expandir os níveis de conhecimentos, e os estudos conduzidos em laboratório são de suma importância para testes preliminares de compostos com potencial de inibição da germinação e/ou crescimento de plantas daninhas.

Assim, partindo deste pressuposto este trabalho gerou importantes informações sobre a utilização dos metabólitos microbianos de *Fusarium fujikuroi* no meio acadêmico, uma vez que

não havia dados iguais a estes na literatura. E, principalmente, contribuiu para mostrar a eficiência deste fungo uma vez que ele apresentou alta eficiência no controle de plantas daninhas tanto em pré como pós-emergência sendo uma ótima alternativa aos problemas ocasionados pelo controle químico, proporcionando uma agricultura mais sustentável. Assim é de suma importância a continuidade de pesquisas nessa área, principalmente extrapolando esses resultados obtidos a condições a campo.

CAPÍTULO 3 – ARTIGO 1

Neste Capítulo estão descritas as metodologias, resultados e discussões para a concentração de exopolissacarídeos produzidos por *Fusarium fujikuroi*

Concentração de exopolissacarídeos com atividade herbicida produzidos por *Fusarium fujikuroi*

Artigo publicado na revista Environmental Technology

<https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1580775>

Resumo

Os exopolissacarídeos são metabólitos secundários produzidos por microrganismos e são alvo de pesquisas em diversos campos da ciência e da indústria devido a algumas de suas propriedades confirmadas, principalmente nas áreas farmacêutica e agroquímica. Nesse contexto, os objetivos deste trabalho foram avaliar o potencial de *Fusarium fujikuroi* em produzir exopolissacarídeos e concentrar tais compostos para aumentar a atividade herbicida. Os exopolissacarídeos foram produzidos por fermentação submersa e diferentes métodos de concentração (membranas, liofilização e evaporação) foram avaliados. Os efeitos fitotóxicos foram avaliados por meio de ensaios de absorção em folhas destacadas de *Cucumis sativus* e avaliados no sétimo dia após a aplicação. A tensão superficial foi avaliada para cada método de concentração. A produção de exopolissacarídeos no caldo fermentado sem concentração foi de 5,94 g/L. Utilizando o método de liofilização, obteve-se um rendimento máximo de exopolissacarídeos de 10,64 g/L. As membranas também apresentaram resultados satisfatórios de exopolissacarídeos: 9,60 g/L. O aumento da atividade bioherbicida e a diminuição da tensão superficial estão proporcionalmente relacionados ao aumento da concentração de exopolissacarídeos.

Palavras chaves: *Fusarium fujikuroi*; exopolissacarídeos; membranas, fitotoxicidade; fermentação submersa.

1 INTRODUÇÃO

A recente preocupação em tornar o meio ambiente mais sustentável tem instigado mais pesquisas sobre o isolamento, quantificação e caracterização de novos compostos bioativos altamente eficazes e de baixa toxicidade [1]. Nesse contexto, exopolissacarídeos produzidos a partir de fungos emergiram como importantes substâncias bioativas [2], bem como a produção de fitotoxinas por eles produzidas [3].

Exopolissacarídeos são polímeros de carboidratos de alto peso molecular secretados extracelularmente por muitos microrganismos [4]. Eles são derivados de uma ampla variedade de fontes: bactérias, fungos, algas e plantas [5]. Dentre os microrganismos produtores de exopolissacarídeos, as bactérias apresentam a via biossintética mais bem estabelecida e estudada. No entanto, os fungos foram reconhecidos como biomacromoléculas de alto valor nas últimas duas décadas [2]. Nas últimas décadas, o número de exopolissacarídeos produzidos por fermentação microbiana tem aumentado gradualmente [6]. Os exopolissacarídeos estão principalmente associados a aplicações de alto valor e têm recebido considerável atenção em pesquisas nas últimas décadas devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e compatibilidades ambientais e humanas [7].

A produção de exopolissacarídeos a partir de compostos fúngicos deriva basicamente do metabolismo desses microrganismos e é amplamente distribuída entre os fungos, incluindo: *Ganoderma lucidum*, *Agaricus blazei*, *Lentinus edodes* [2], *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum* e *Syncephalastrum* sp. [8]. Osińska-Jaroszuk et al. [9] identificaram alguns fungos, ascomicetes e basidiomicetos, que são secretores de exopolissacarídeos, como: *Trametes versicolor*, *Phellinus* sp., *Aureobasidium pullulans* RYLF-10, *Auricularia auricula*, *Botryosphaeria rhodina* DABACP82, e *Fusarium oxysporum* JN604549, entre outros.

Os exopolissacarídeos microbianos são conhecidos por suas propriedades espessantes, gelificantes e emulsificantes, exibindo um amplo espectro de aplicações nas indústrias farmacêutica, biomédica e alimentícia [10,11]. No entanto, existe um espectro mais amplo de atividades em vários campos da biotecnologia, medicina, proteção ambiental e, principalmente, agricultura. Apesar da alta diversidade química e estrutural encontrada para exopolissacarídeos fúngicos, as atividades biológicas ainda não são suficientemente estudadas [12].

A busca por novas espécies de fungos que possam produzir exopolissacarídeos ainda é necessária, principalmente no que se refere à aplicabilidade agrícola ainda pouco explorada. A

utilização de exopolissacarídeos produzidos por fungos pode resultar em um produto final seguro, natural e mais sustentável e tem impacto significativo no desenvolvimento de novos produtos. Assim, os objetivos deste trabalho foram estudar o potencial de *Fusarium fujikuroi* em produzir exopolissacarídeos e avaliar diferentes métodos de concentração desses compostos, bem como a influência dos exopolissacarídeos no aumento do potencial herbicida deste fungo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microorganismo e produção de exopolissacarídeos

A cepa de *Fusarium fujikuroi* foi previamente isolada do Bioma Pampa Brasileiro como um microrganismo promissor para a produção de bioherbicida [13]. Foi mantido em ágar batata dextrose (BDA) a 4 ° C e subcultivado a cada 15 dias.

A produção dos exopolissacarídeos foi realizada em frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo o fungo e o meio de fermentação composto por sacarose (10,0 g / L), licor de maceração de milho (50,0 g / L), (NH₄)₂SO₄ (0,5 g / L), FeSO₄.7H₂O (1,0 g / L), MnSO₄.H₂O (1,0 g / L) e MgSO₄ (0,5 g / L). O pH inicial foi ajustado para 5,0 de acordo com Souza et al. [14]. Os frascos foram mantidos sob agitação a 220 rpm e 31 ° C por 7 dias em agitador rotativo de incubação (New Brunswick, Innova 44R, EUA).

2.2 Recuperação e quantificação de exopolissacarídeos por precipitação ácida

A quantidade de exopolissacarídeos foi determinada por precipitação ácida. O fungo foi cultivado nas condições descritas na Seção 2.1. As células foram removidas por centrifugação a 4000 rpm durante 4 min e o sobrenadante foi filtrado com uma membrana de 0,22 µm de tamanho de poro. O sobrenadante livre de células foi acidificado a pH 2,0 usando ácido clorídrico (HCl) 6 M e mantido durante a noite para precipitação completa dos exopolissacarídeos [15]. Para a quantificação, as etapas de centrifugação e retirada do sobrenadante foram realizadas novamente. O precipitado foi transferido para um papel de filtro seco a 40 ° C e seco até massa constante.

2.3 Tensão superficial

A tensão superficial foi determinada de acordo com os procedimentos descritos por Todero et al. [16]. As análises foram realizadas em triplicata usando um analisador de forma de gota KRÜSS DSA25 (KRÜSS, Alemanha) a 25 ° C e determinado com o método de gota.

2.4 Concentração de exopolissacarídeos

2.4.1 Concentração por membranas

Dois módulos de membrana diferentes foram usados nos ensaios: fibra oca e folha plana. As principais características dos módulos são apresentadas na Tabela 1. Os ensaios foram conduzidos em sistema controlado à temperatura ambiente (25 ° C) e pressão de 1 bar. A concentração das biomoléculas iniciou-se quando o sistema atingiu o estado estacionário e foi realizada até atingir 50% da concentração. A concentração foi relativa ao volume inicial de caldo cru fermentado. As amostras de retentado e permeado de todas as membranas foram separadas e armazenadas para realizar precipitação ácida, tensão superficial e bioensaios de atividade herbicida.

Tabela 1. Características das membranas utilizadas neste trabalho.

Módulo	Classe	Polímero	Código de Membrana	MWCO*
Plana	UF ^a	PES ^c	UP005	5 kDa
Plana	UF	PES	UP020	20 kDa
Plana	UF	PES	UP050	50 kDa
Plana	UF	PES	UP150	150 kDa
Fibra oca	UF	PS ^d	SLP – 1053	10000 kDa
Fibra oca	MF ^b	PVDF ^e	UMP 1047R	0.2 µm

* MWCO: Limite de peso molecular.

a UF: ultrafiltração.

b MF: microfiltração.

c PES: poli (éter sulfona).

d PS: Polissulfona.

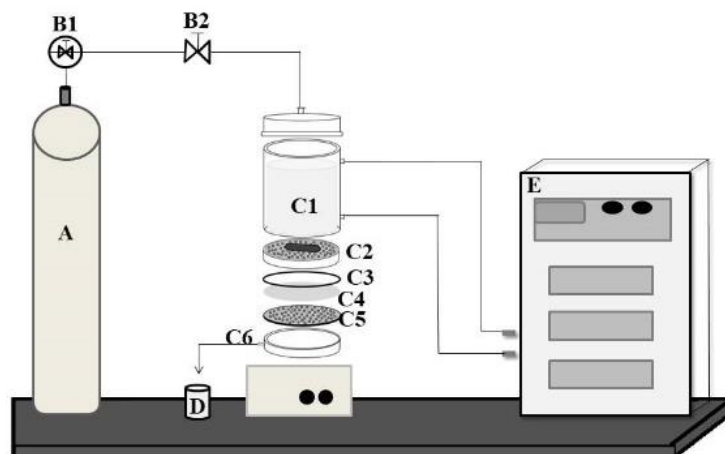
e PVDF: difluoreto de polivinilideno.

Para o módulo de membrana de fibra oca de microfiltração e ultrafiltração, o aparato experimental [17] consistiu de uma bomba peristáltica (Tecnal, TE-198, Brasil), um reservatório de vidro tubular de 1 L, dois manômetros, um módulo tubular contendo uma fibra oca membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (Microza, modelo UMP 1047Re modelo SLP 1053, Japão), válvulas e reservatórios. O módulo tubular de microfiltração é formado por

0,2 μm de tamanho de poro nominal e 0,09 m^2 de área de filtração [16], e o módulo tubular de ultrafiltração é formado por um tamanho de poro nominal de 0,34 nm e 0,12 m^2 de área de filtração. O sobrenadante previamente filtrado e centrifugado foi carregado no reservatório, totalizando 500 mL de caldo fermentado (livre de células). Em seguida, a bomba foi ligada sob pressão de 1 bar à temperatura ambiente (25 ° C).

Para o módulo de membrana plana, o processo de ultrafiltração consistiu em um módulo de filtração convencional (filtração sem saída) de aço inoxidável 304 com capacidade de 500 mL (Figura 1), um cilindro de nitrogênio comprimido com capacidade de 6 m^3 , uma pressão de duplo estágio regulador com dois manômetros acoplados, um banho ultraterostático (Solab, SL 152, Brasil) e um agitador magnético (IKA, C-MAG HS 7, Brasil). Após a montagem do aparelho experimental, a amostra foi adicionada e a barra magnética inserida no módulo de filtração, seguida do anel de vedação. Depois disso, a parte superior do módulo foi fechada.

Figura 1. Aparelho experimental do módulo de ultrafiltração de membrana plana usado para concentração de exopolissacarídeos. A - cilindro de nitrogênio; B - regulador de pressão de duplo estágio acoplado aos dois manômetros (B1 - válvula de abertura do cilindro, B2 - válvula de pressurização de gás); C - módulo de separação com membrana plana (C1 - reservatório de alimentação, C2 - agitador magnético, C3 - anel de vedação, C4 - membrana, C5 - suporte de membrana, C6 - saída de permeado); D - frasco de coleta; E - Banho ultraterostático.



Fonte: autor

2.4.2 Concentração por liofilização

A concentração das amostras ocorreu com redução de 50% do volume inicial em um liofilizador (L 101, Liotop, Brasil) a -55 ° C, acoplado a uma bomba de vácuo (D.V.P Vacuum

Technology, RC.8D). Amostras de 100 mL do caldo bruto foram congeladas em ultracongelador (New Brunswick, U360 Inova, EUA) antes da liofilização. A concentração de 50% ocorreu após 30 h. Em seguida, mediu-se o volume final e determinou-se a precipitação ácida, a tensão superficial e os bioensaios da atividade herbicida.

2.4.3 Concentração por evaporação

A concentração dos exopolissacarídeos por evaporação foram realizada em estufa (Mod. 320-SE, Fanem, Brasil) com circulação de ar para retirada da água do caldo bruto e concentração a 50% (base volume). Quatro diferentes temperaturas foram avaliadas: 40 ° C, 60 ° C, 80 ° C e 100 ° C. Ao final da concentração, foram determinados a tensão superficial, a precipitação ácida e os bioensaios da atividade herbicida.

2.5 Bioensaios de fitotoxicidade em *Cucumis sativus*

Os efeitos fitotóxicos das amostras concentradas foram avaliados por meio de ensaios de absorção em folhas destacadas de *Cucumis sativus* [18]. Para a realização do teste de aplicação em folha, foram coletadas folhas jovens de *C. sativus*, cortadas na base do pecíolo, e dispostas em caixas gerbox previamente desinfetadas com álcool 70% e forradas com duas folhas de filtro umedecido papel. O pecíolo das folhas foi envolto em algodão e embebido em 2 mL de caldo concentrado em diferentes concentrações (usando separadamente as frações retentado e permeado). Após a aplicação, as folhas foram mantidas a 28 ° C em câmara climática (POL-EKO, modelo KK 350, Polônia) com fotoperíodo de 12 h [17].

A fitotoxicidade foi avaliada no sétimo dia após a aplicação com base no software Compu Eye Leaf & Symptom Area [19]. As folhas foram coletadas e escaneadas individualmente, em fundo branco. Os arquivos de imagens foram abertos e analisados pelo software, onde o valor percentual da área do sintoma para cada imagem foliar foi calculado separadamente. Amostras de caldo bruto de fermentação e água foram utilizadas como controle. Foi realizado um delineamento inteiramente casualizado com três repetições de cinco folhas para cada ensaio mais controle negativo (apenas água) e controle positivo (caldo bruto concentrado).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Concentração de exopolissacarídeos

Fusarium fujikuroi é um fungo que produz exopolissacarídeos (Tabela 2). Na avaliação do caldo bruto, foram obtidos 5,94 g/L de exopolissacarídeos. As quantidades de exopolissacarídeos são promissoras quando comparadas aos valores reportados por Mmanywa e Wang [20]. Os autores obtiveram uma produção máxima de exopolissacarídeos de 0,47 g/L de *Antrodia camphorata*. Após estudar a otimização da produção de exopolissacarídeos bioativos de *Fusarium solani*, foi obtido um valor máximo de 2,27 g/L [2], enquanto ao estudar a produção de exopolissacarídeos de *Pestalotiopsis* sp. BC55, um valor máximo de 4,32 g/L foi relatado [21]. Relatos de maiores valores de produção de exopolissacarídeos (7,5 g/L) foram encontrados quando o *Auricularia auricula* foi estudado. *Bacillus velezensis* também apresentou maiores valores de exopolissacarídeos (7,6 g/L) após otimização dos meios de cultura [6]. No entanto, a produção de exopolissacarídeos foi de apenas 0,6 g/L com *Fusarium oxysporum* [9].

Tabela 2. Comparação dos diferentes métodos de concentração de exopolissacarídeos de *Fusarium fujikuroi* e avaliação da tensão superficial.

Ensaio	Tensão superficial (mN.m⁻¹)	Exopolissacarídeos (g/L)
Controle negativo (água)	76,61 ± 0,01	0,00
Controle positivo (caldo fermentativo bruto)	60,76 ± 0,01	5,94 ± 0,01
Membrana Plana		
UP 005		
Permeado	51,72 ± 0,01	8,42 ± <0,01
Retentado	49,69 ± 0,01	9,18 ± <0,01
UP 020		
Permeado	51,71 ± 0,01	8,40 ± <0,01
Retentado	50,38 ± 0,01	8,92 ± <0,01
UP 50		
Permeado	50,37 ± 0,01	8,04 ± <0,01
Retentado	50,39 ± 0,01	8,90 ± <0,01
UP 150		
Permeado	52,20 ± 0,01	8,56 ± <0,01
Retentado	40,20 ± 0,01	9,60 ± <0,01
Membrana de fibra oca		
Ultrafiltração		
Permeado	54,68 ± 0,01	8,24 ± 0,01

Microfiltração	Retentado	50,35 ± 0,01	8,88 ± 0,01
	Permeado	56,65 ± 0,01	8,02 ± 0,01
	Retentado	50,38 ± 0,01	8,78 ± 0,01
Concentração por evaporação			
	40°C	56,67 ± 0,01	7,78 ± 0,01
	60°C	58,48 ± 0,01	7,62 ± 0,01
	80°C	57,79 ± 0,01	7,63 ± 0,01
	100°C	59,95 ± 0,01	6,78 ± 0,01
Concentração por liofilização			
	Liofilizado	40,18 ± 0,01	10,64 ± 0,01

Todos os métodos foram eficientes para a concentração de exopolissacarídeos. As concentrações aumentaram consideravelmente com o uso de membranas, onde foram observadas diferenças estatísticas entre elas (Tabela 2). Porém, a concentração por liofilização foi a melhor, onde se obteve no máximo 10,64 g / L de exopolissacarídeos. A concentração foi aproximadamente 2 vezes maior quando comparada ao caldo cru. A concentração por evaporação foi o método que apresentou resultados inferiores entre os avaliados, mas ainda superiores ao caldo cru. A concentração de exopolissacarídeos foi inversamente proporcional à temperatura. Quando temperaturas mais altas foram usadas, concentrações mais baixas de exopolissacarídeos foram encontradas. Na temperatura mais baixa (40°C), observou-se concentração de 7,78 g/L, enquanto na temperatura de 100°C atingiu-se a concentração de 6,78 g/L.

O uso de membranas aumentou a concentração de exopolissacarídeos. Os retentados da membrana plana UP150 e UP005 apresentaram teores máximos de exopolissacarídeos de 9,6 g/L e 9,18 g/L, respectivamente. De acordo com Balti et al. [22], a filtração por membrana é uma tecnologia notável e útil para a concentração de grandes volumes, que é uma tecnologia madura que encontra aplicações na escala industrial. Balti et al. [22] também relataram que a concentração de exopolissacarídeos mudou de 0,26 g / L no início para 2,26 g / L no final de 25 min do processo de concentração usando membrana de microfiltração para concentrar exopolissacarídeos de *Porphyridium cruentum*.

3.2 Atividade herbicida

Existem muitos relatos na literatura científica sobre as diversas aplicabilidades dos exopolissacarídeos fúngicos, mas sua capacidade de aplicação em áreas agrícolas ainda é pouco

estudada. Tanto quanto é do nosso conhecimento, a capacidade de aumentar os efeitos bioherbicidas dos fungos não foi reportada até agora na principal base de dados científica. A aplicação do caldo fermentativo de *Fusarium fujikuroi* desenvolveu sintomas em *C. sativus* como necrose (5,85%), clorose (16,66%) e leve despigmentação (77,79%) das folhas. Porém, ao avaliar os diferentes métodos de concentração, os melhores resultados foram obtidos com a liofilização. Nesse método, a folha apresentou 100% de despigmentação total (perda total de clorofila), fração retentado UP 150 com sintomas de clorose (51,46%), necrose (21,85%) e despigmentação foliar total (26,69%). Da mesma forma, a fração retentada UP 005 apresentou clorose (67,13%), necrose (17,64%) e despigmentação foliar total (15,23%) (Tabela 3 e Figura 2). Esses resultados levaram à destruição da folha, sem posterior recuperação. As menores concentrações de exopolissacarídeos foram obtidas com o uso do calor, que apresentou baixa fitotoxicidade principalmente em alta temperatura (100 ° C), onde 63,43% da folha estava sã.

Ao comparar o uso de membranas, todas apresentaram fitotoxicidade. De maneira geral, o retentado apresentou maior fitotoxicidade do que o permeado. Todas as frações do permeado apresentaram a porcentagem de área sã na folha. O permeado UP 50 e a microfiltração (permeado) em membrana de fibra oca apresentaram efeitos menores, com áreas saudáveis maiores (Tabela 3 e Figura 2). De acordo com Todero et al. [17], em relação ao retentado, a melhora da atividade bioherbicida pode estar associada à concentração de macromoléculas na membrana como os exopolissacarídeos. Esse comportamento pode ocorrer em decorrência da retenção de biomoléculas de tamanho maior que o tamanho nominal dos poros da membrana. Os resultados de fitotoxicidade confirmam que há um aumento no poder herbicida quando a concentração de exopolissacarídeos é aumentada. Consequentemente, esses métodos são eficientes, permitindo a concentração e possibilitando a maximização do efeito herbicida.

Em relação à análise da tensão superficial, as tensões do caldo e da água foram 60,76 mN.m⁻¹ e 76,61 mN.m⁻¹, respectivamente. Ao comparar os valores de tensão superficial obtidos nos diferentes métodos de concentração (Tabela 2), é possível verificar uma diminuição nos valores devido ao aumento da concentração de exopolissacarídeos. Esses resultados também são corroborados com a atividade herbicida, em que há aumento da fitotoxicidade com diminuição da tensão superficial. Os menores valores de tensão foram obtidos para as amostras liofilizadas (40,18 mN.m⁻¹), fração de retentado UP 150 (40,20 mN.m⁻¹), seguido do retentado UP 005 com 49,69 mN.m⁻¹, indicando uma alta concentração de exopolissacarídeos e alta fitotoxicidade.

Figura 2. Comparação das lesões observadas em folhas de *Cucumis sativus* pelos métodos de concentração de membranas, liofilização e evaporação.

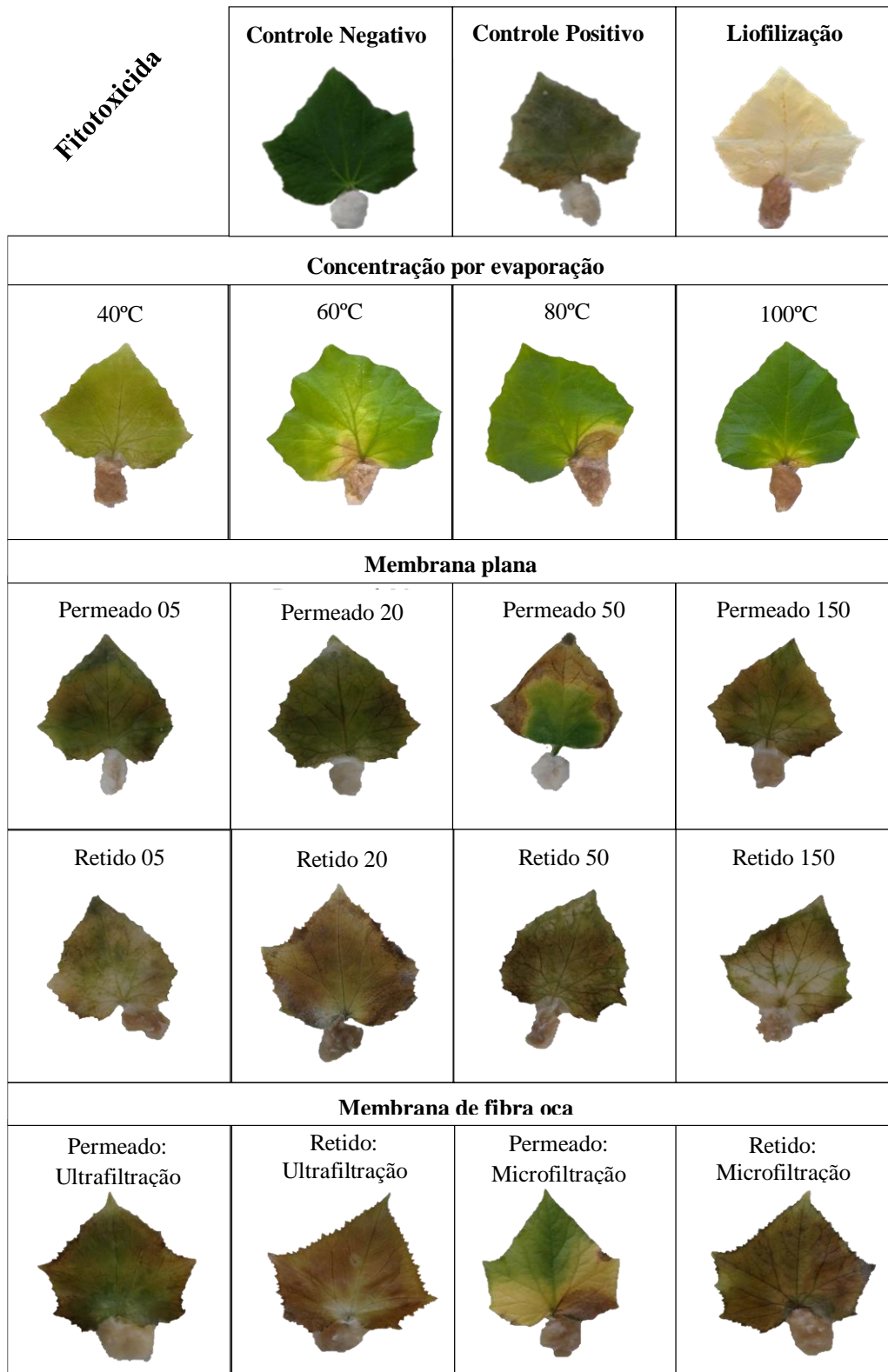


Tabela 3. Fitotoxicidade de exopolissacarídeos.

Ensaio	Sintomas (%)					
	Ligeira despigmentação	Clorose	Necrose	Amarelecimento	Total despigmentação da planta	Saudável
Controle negativo	-	-	-	-	-	100
Controle positivo	77,79	16,66	5,85	-	-	-
Membrana plana						
UP 005						
Permeado	12,18	41,84	41,06	2,94	-	1,98
Retentado	-	67,13	17,64	-	15,23	-
UP 20						
Permeado	7,38	62,75	25,55	1,90	-	2,42
Retentado	-	48,81	43,28	-	7,91	-
UP 50						
Permeado	-	23,50	43,33	7,69	-	25,48
Retentado	-	55,91	33,48	-	10,61	-
UP 150						
Permeado	3,11	75,71	6,03	13,50	-	1,65
Retentado	-	51,46	21,85	-	26,69	-
Membrana de fibra oca						
Ultrafiltração						
Permeado	9,41	50,76	28,30	9,41	-	2,12
Retentado	-	82,14	11,54	-	6,32	-
Microfiltração						
Permeado	-	5,68	5,57	74,60	-	14,15
Retentado	5,97	56,74	37,29	-	-	-
Concentração por evaporação						
40°C	91,26	7,42	1,32	-	-	-
60°C	38,07	4,31	-	11,60	-	46,02
80°C	18,14	4,30	-	28,41	-	49,15
100°C	23,10	1,10	-	12,37	-	63,43
Concentração por Liofilização						
Liofilizado	-	-	-	-	100	-

Esses achados também são corroborados pelos dados apresentados por Banat et al. [23]. Alguns exopolissacarídeos, como os lipopeptídeos, são conhecidos por reduzir a tensão superficial. A baixa tensão superficial leva a uma maior distribuição do produto a ser aplicado na superfície foliar, aumentando sua absorção [24], auxiliando na eficácia biológica, principalmente em superfícies de difícil fixação [25]. A partir dessas características anteriores, a importância da tensão superficial do ponto de vista da tecnologia de aplicação é enfatizada [25].

4. CONCLUSÃO

Considerando os resultados encontrados neste estudo, o fungo *Fusarium fujikuroi* pode ser considerado um bom produtor de exopolissacarídeos, onde o caldo bruto atingiu um rendimento máximo de 5,94 g / L. Os métodos usados para concentrar os exopolissacarídeos foram eficientes, sendo os exopolissacarídeos concentrados até 2 vezes pelo método de concentração por liofilização, chegando a 10,64 g / L. As membranas apresentaram um aumento considerável quando comparadas ao caldo bruto, com concentração máxima de 9,6 g/L com UP 150 e 9,18 g/L com UP005, ambas na fração retentada. Para a evaporação, as concentrações foram inferiores às obtidas pelas outras tecnologias avaliadas (7,78 g/L, 40°C). Quando as concentrações de exopolissacarídeos aumentaram, a atividade bioherbicida aumenta e a tensão superficial diminui. Esses resultados sugerem rotas promissoras para a produção de potenciais bioherbicidas aplicados em escala industrial em um futuro próximo. Consequentemente, o impacto ambiental do uso de herbicidas sintéticos perigosos pode ser reduzido com a aplicação dos bioherbicidas produzidos a partir de fungos.

REFERÊNCIAS

- [1] Gangadevi V, Muthumary J. Isolation of *Colletotrichum gloeosporioides*, a novel endophytic taxol-producing fungus from the leaves of a medicinal plant, *Justicia gendarussa*. *Mycol. Balc.* 2008;5:1–4.
- [2] Mahapatra S, Banerjee D. Optimization of a bioactive exopolysaccharide production from endophytic *Fusarium solani* SD5. *Carbohydr. Polym.* 2013;97:627–634.
- [3] Jabran K, Mahajan G, Sardana V, et al. Allelopathy for weed control in agricultural systems. *Crop Prot.* 2015;72:57–65.
- [4] Górska S, Hermanova P, Ciekot J, et al. Chemical characterization and immunomodulatory properties of polysaccharides isolated from probiotic *Lactobacillus casei* LOCK 0919. *Glycobiology.* 2016;26:1014–1024.
- [5] Leung MYK, Liu C, Koon JCM, et al. Polysaccharide biological response modifiers. *Immunol. Lett.* 2006;105:101–114.
- [6] Moghannem SAM, Farag MMS, Shehab AM, et al. Exopolysaccharide production from *Bacillus*

- velezensis* KY471306 using statistical experimental design. *Brazilian J. Microbiol.* 2018;49:452–462.
- [7] Ates O. Systems Biology of Microbial Exopolysaccharides Production. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2015;3:1–16.
- [8] Kumaran S, Kurungudi AT, Ramaprasanna D, et al. Production and characterization of exopolysaccharides (EPS) from mangrove filamentous fungus, *Syncephalastrum* sp. *African J. Microbiol. Res.* 2014;8:2155–2161.
- [9] Osińska-Jaroszuk M, Jarosz-Wilkolazka A, Jaroszuk-Ścisiel J, et al. Extracellular polysaccharides from Ascomycota and Basidiomycota: production conditions, biochemical characteristics, and biological properties. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2015;31:1823–1844.
- [10] Nicolaus B, Kambourova M, Oner ET. Exopolysaccharides from extremophiles: From fundamentals to biotechnology. *Environ. Technol.* 2010;31:1145–1158.
- [11] Adebayo-Tayo B, Ishola R, Oyewunmi T. Characterization, antioxidant and immunomodulatory potential on exopolysaccharide produced by wild type and mutant *Weissella confusa* strains. *Biotechnol. Reports* 2018;19:e00271.
- [12] Freitas F, Torres CAV, Reis MAM. Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. *Bioresour. Technol.* 2017;245:1674–1683.
- [13] Daniel JJ, Zobot GL, Tres M V., et al. *Fusarium fujikuroi*: A novel source of metabolites with herbicidal activity. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2018;14:314–320.
- [14] Souza ARC de, Baldoni DB, Lima J, et al. Selection, isolation, and identification of fungi for bioherbicide production. *Brazilian J. Microbiol.* 2017;48:101–108.
- [15] Joshi PA, Singh N, Shekhawat DB. Effect of metal ions on growth and biosurfactant production by Halophilic bacteria. *Adv. Appl. Sci. Res.* 2015;6:152–156.
- [16] Todero I, Confortin TC, Luft L, et al. Formulation of a bioherbicide with metabolites from *Phoma* sp. *Sci. Hortic.* 2018;241:285–292.
- [17] Todero I, Confortin TC, Soares JF, et al. Concentration of metabolites from *Phoma* sp. using microfiltration membrane for increasing bioherbicidal activity. *Environ. Technol. (United Kingdom)*. 2018; DOI: 10.1080/09593330.2018.1441330.
- [18] Pedras MSC, Ahiahonu PWK. Phytotoxin production and phytoalexin elicitation by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *J. Chem. Ecol.* 2004;30:2163–2179.
- [19] Bakr E. A new software for measuring leaf area, and area damaged by *Tetranychus urticae* Koch. *J. Appl. Entomol.* 2005;129:173–175.
- [20] Mmanywa MS, Wang G. Production of Exopolysaccharides from Submerged Culture of *Antrodia camphorata* S-29. *J. Nat. Sci. Res.* 2017;7:1–7.
- [21] Mahapatra S, Banerjee D. Production and structural elucidation of exopolysaccharide from endophytic *Pestalotiopsis* sp. BC55. *Int. J. Biol. Macromol.* 2016;82:182–191.
- [22] Balti R, Le Balc'h R, Brodu N, et al. Concentration and purification of *Porphyridium cruentum* exopolysaccharides by membrane filtration at various cross-flow velocities. *Process Biochem.* 2018;
- [23] Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010;87:427–444.
- [24] Vol PP. Investigating the Effect of Vegetable Oils on Stretching, Spreading and Efficiency of Herbic Acid in Ovine Control (*Durieu Avena ludoviciana*). 2017;31:1–12.
- [25] Taylor P. The wetting of leaf surfaces. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2011;16:326–334.

CAPÍTULO 4 – FORMULAÇÃO

Nesta seção estão descritas a metodologia e os resultados e discussões para a formulação do bioherbicida.

Formulação de um bioherbicida com metabolitos de *Fusarium fujikuroi* como agente potencial no manejo de plantas daninhas

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi a formulação de um bioherbicida com metabólitos secundários produzidos por *Fusarium fujikuroi*. Três diferentes bioensaios foram realizados para investigar a atividade herbicida do caldo fermentado sem células: pré-emergência em *Cucumis sativus*, *Bidens pilosa* e *Amaranthus retroflexus* e pós-emergência em *Cucumis sativus* e *Bidens pilosa*. Nos ensaios em pré emergência todos as concentrações de caldo (25%, 50%, 75% e 100%) apresentaram efeito inibitório na germinação de *Cucumis sativus*. Ao testar o caldo bruto em *Bidens pilosa* e *Amaranthus retroflexus* os resultados foram promissores, onde houve efeito inibitório de 100% na germinação na primeira e segunda contagem, diferente da testemunha (água) onde houve germinação. Para os ensaios de formulação primeiramente foram realizados testes preliminares avaliando as melhores formulações utilizando óleo de palma, Span[®] 80 e Tween[®] 80 com diferentes níveis de Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo. A partir dos resultados obtidos neste primeiro teste foi avaliado o melhor resultado utilizando Tween[®] 80 juntamente com adjuvantes comerciais que foram utilizados em uma proporção de 0,1% v/v. Após realizados os 14 testes foram selecionadas as duas melhores formulações com os dois melhores adjuvantes comerciais e realizados testes em plantas daninhas. Nessa segunda testagem de formulações foram utilizados o Silweet L-77 e o Aureo. O uso de adjuvantes aumentou a eficiência do bioherbicida em algumas formulações. Os resultados mostram que a menor concentração de adjuvante e Tween[®] 80 torna a formulação mais eficiente, destaca-se que neste ensaio foi utilizado 0,01 mL Silweet L-77 e 0,1 mL de Tween[®] 80. A formulação que apresentou menor potencial fitotóxico foi utilizando uma menor dose de adjuvante Aureo (0,01 mL) e Tween[®] 80 (0,01 mL). Com isso afirmou-se que o uso de adjuvantes nas formulações potencializou o efeito bioherbicida de *Fusarium fujikuroi*.

1. INTRODUÇÃO

As perdas na agricultura podem chegar a 40% dependendo da cultura com a interferência das plantas daninhas (Ramesh et al., 2017, Xue et al., 2017). Se nenhum método de controle for usado na cultura da soja, as plantas daninhas se constituem um importante estresse biótico e, pode-se à chegar a 90% de perdas no rendimento de grãos (Silva et al., 2009, Gazziero et al., 2019). No entanto, para o controle das plantas daninhas tem sido utilizado principalmente o método químico, pela grande oferta de produtos, economia de mão-de-obra e rapidez na operação (Burnside, 1992; Oliveira Jr et al., 2011). Embora seja eficiente, o controle químico tem algumas implicações em relação aos fatores ambientais, bem como no desenvolvimento de plantas daninhas resistentes a determinados herbicidas químicos (Giacomini et al., 2017, McKeon e Brichta, 2014).

Os fungos são conhecidos por seu potencial metabólico em produzir uma grande variedade de metabólitos para aplicações agrícolas (Marinho et al., 2017). Em relação ao *Fusarium fujikuroi*, é um fungo que produz metabólitos como ácido fusárico, ácido indol acético, ácido 2- (4-butilpicolinamida) acético e o sesterterpeno terpestacina (Hilário et al., 2017), como policetídeos (Arndt et al., 2017), entre outros. O gênero *Fusarium* sp. é o segundo gênero mais citado nos estudos relacionados à produção de bioherbicidas. Pearson et al. (2016) avaliaram a atividade herbicida de diferentes fungos do gênero fusarium (*Fusarium avenaceum*, *Fusarium acuminatum*, *Fusarium redolens*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium cerealis* e *Fusarium solani*) em diferentes espécies de gramíneas. Os autores obtiveram resultados promissores ao usar *Fusarium Avenaceum* e *Fusarium acuminatum*. Da mesma forma, Aybeke (2017) relatou efeitos tóxicos de *Fusarium oxysporum* em uma erva daninha parasita de raiz (*Orobanchespp.*). Li et al. (2014) relataram que o extrato de acetato de etila do caldo de fermentação de *Fusarium proliferatum* proporcionou atividade fitotóxica seletiva contra o crescimento da radícula de *Amaranthus retroflexus* L.

Recentemente, o fungo *Fusarium fujikuroi* obtido no bioma Pampa brasileiro foi identificado com atividade herbicida para plantas-alvo, como *Cucumis sativus* e *Sorghum bicolor* (Daniel et al., 2018). No entanto, um desafio no desenvolvimento de bioherbicidas é sua baixa atividade herbicida. Em geral, o efeito baixo ocorre porque as fitotoxinas fúngicas costumam ser encontradas em concentrações muito baixas nos meios de cultura (Varejão et al., 2013). Alternativas para superar essa dificuldade requerem modificações sintéticas para criar um produto eficaz (Sica et al., 2016) ou o uso de uma combinação adequada de adjuvante em uma formulação para aumentar a atividade herbicida,

visto que se destinam a modificar ou reforçar a características químicas da solução (Rana e Rana, 2016). Alguns estudos na literatura científica demonstraram que a formulação de metabólitos microbianos aumentou a atividade herbicida do produto (Bastos et al., 2017; Piyaboon et al., 2016; Sica et al., 2016; Todero et al 2018; Daniel et al., 2018).

No entanto, há poucos relatos encontrados, até o momento, (Daniel., 2018, Daniel et al., 2020) na literatura que descrevem a atividade herbicida ao *Fusarium fujikuroi*. Diante desse contexto, o objetivo deste trabalho foi a formulação de um bioherbicida com metabólitos secundários produzidos por *Fusarium fujikuroi*. Neste estudo foram realizados testes em pré-emergência em *Cucumis sativus*, *Bidens pilosa* e *Amaranthus retroflexus* e também foram realizadas duas etapas de formulações: (1) avaliação de diferentes formulações contendo filtrado de cultura livre de células ou esporos, óleo de palma, Tween® 80 e Span® 80, adjuvantes comerciais (Silweet L-771, Assist, Orgânico, Aureo, Nimbus) para aumentar a fitotoxicidade contra uma planta bioindicadora (*Cucumis sativus*); (2) foram selecionados as duas melhores formulações com os dois melhores adjuvantes comerciais e realizados testes em plantas daninhas. Nessa segunda testagem de formulações foram utilizados o Silweet L-77 e o Aureo, realizando os ensaios em *Bidens pilosa*. Ressalva-se que também foram realizados testes com o caldo bruto em pré-emergência em *Cucumis sativus*, *Bidens pilosa* e *Amaranthus retroflexus*. Convém ressaltar que em um trabalho recente do grupo de pesquisa o potencial herbicida do filtrado de *Fusarium fujikuroi* já foi testado e apresentou resultados significantes (Daniel Jr. et al., 2018).

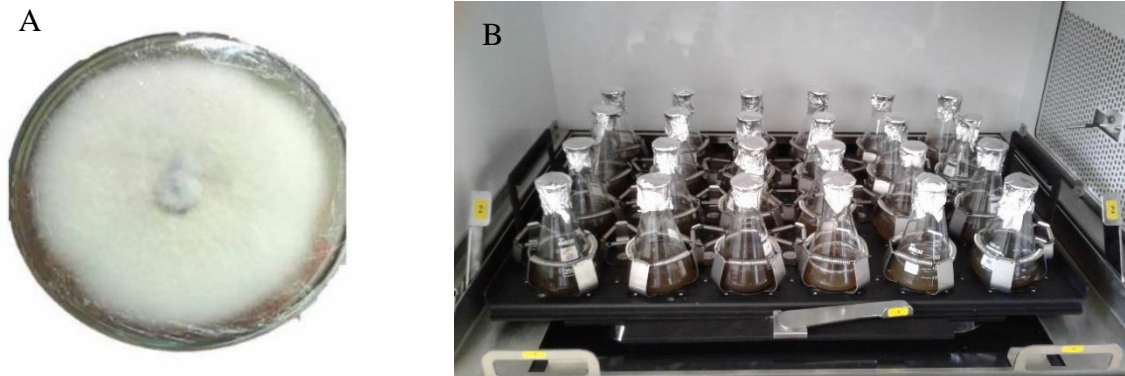
2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PRODUÇÃO DO BIOHERBICIDA

A cepa de *Fusarium fujikuroi* (Figura 1A) foi obtida como descrito por Daniel Jr. (2018) e mantida em ágar batata dextrose (BDA) à 4 °C e repicada a cada 15 dias.

A produção de células para inoculação foi realizada pela incubação da cepa em placa de Petri contendo meio BDA por 8 dias a 28°C. Posteriormente, três discos de 6 mm de micélio fúngico foram transferidos para um frasco erlenmeyer de 250 mL, contendo 125 mL de meio de fermentação e mantido sob agitação a 220 rpm à 31 °C por 7 dias em incubadora rotativa (New Brunswick, Innova 44R, EUA) (Figura 1B). O meio foi composto por (g/L): sacarose (10,0), água de maceração de milho (50,0), (NH₄)₂ SO₄ (0,5), FeSO₄.7H₂O (1,0), MnSO₄.H₂O (1,0) e MgSO₄ (0,5) e o pH inicial foi ajustado para 5,0 (DANIEL Jr., 2017).

Figura 1- *Fusarium fujikuroi* (A) - Crescimento micelial em placa de Petri e (B) Fermentação submersa em agitador orbital



Fonte: O autor.

Após as fermentações, as células foram centrifugadas a 4000 rpm durante 10 min (Eppendorf, 5804 R, Alemanha) e o sobrenadante foi filtrado utilizando uma membrana de difluoreto de polivinilideno de 0,45 μm . As amostras filtradas foram utilizadas nos experimentos.

2.2 FORMULAÇÕES

Dois diferentes ensaios de formulação foram realizados a fim de investigar a interação do caldo fermentado sem células de *Fusarium fujikuroi* aos adjuvantes. Primeiramente foram realizados testes preliminares avaliando as melhores formulações descritas por Todero et al., (2018) e Daniel Jr. (2018), utilizando óleo de palma, Span[®] 80 e Tween[®] 80 com diferentes níveis de Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo (EHL) (Tabela 1). A partir dos resultados obtidos neste primeiro teste foi avaliado o melhor resultado utilizando Tween[®] 80 juntamente com os adjuvantes comerciais (Tabela 2) que foram utilizados em uma proporção de 0,1% v/v.

Para a homogeneização das emulsões utilizou-se o Turrax a 7000 rpm por 1 minuto.

Tabela 1- Formulações utilizando óleo de palma, Span[®] 80 e Tween[®] 80

Formulação	Óleo de Palma (g)	MS (g) ¹	MT (g) ²	Caldo Bruto (g)	EHL ³
01	0,82	0,058	0,222	8,9	0,82
02	0,55	0,55	-	8,9	0,55
03	0,55	-	0,55	8,9	15
04	0,55	0,272	0,277	8,9	0,55

¹ Massa de Span[®] 80 ² Massa de Tween[®] 80 ³ Equilíbrio hidrófilo-lipófilo

Tabela 2- Formulações utilizando adjuvantes comerciais

Formulação	Silweet L-77 (mL)	Assist (mL)	Orgânico (mL)	Aureo (mL)	Nimbus (mL)	MT ¹ (mL)	Caldo (mL)
05	0,01	-	-	-	-	-	10
06	0,01	-	-	-	-	0,5	10
07	-	0,01	-	-	-	-	10
08	-	0,01	-	-	-	0,5	10
09	-	-	0,01	-	-	-	10
10	-	-	0,01	-	-	0,5	10
11	-	-	-	0,01	-	-	10
12	-	-	-	0,01	-	0,5	10
13	-	-	-	-	0,01	-	10
14	-	-	-	-	0,01	0,5	10

¹ Massa de Tween[®] 80

Após realizados os 14 testes foram selecionadas as duas melhores formulações com os dois melhores adjuvantes comerciais e realizados testes em plantas daninhas, ressalva-se que os melhores resultados referesse quanto a fitotoxicidade. Nessa segunda testagem de formulações foram utilizados o Silweet L-77 e o Aureo. A tabela 3 apresenta a descrição das dosagens testadas e, convém ressaltar que elas foram estabelecidas seguindo a recomendação no rótulo do produto. Ressalva-se que para cada formulação utilizou-se um controle substituindo o caldo fermentado por água. Esse controle foi utilizado como forma comparativa da fitotoxicidade. Também para cada formulação foram avaliadas a densidade e a tensão superficial.

Tabela 3- Formulações utilizando Tween[®] 80 e adjuvantes comerciais

Formulação	Silweet L-77 (mL)	Aureo (mL)	Tween[®] 80 (mL)	Caldo (mL)
15	-	0,01	0,1	10
16	-	0,01	0,5	10
17	-	0,05	0,1	10
18	-	0,05	0,5	10
19	-	0,03	0,3	10
20	0,01	-	0,1	10
21	0,01	-	0,5	10
22	0,05	-	0,1	10
23	0,05	-	0,5	10
24	0,03	-	0,3	10

2.2.1 Densidade

As densidades das formulações preparadas foram medidas utilizando o medidor de densidade digital a 20 °C (Rudolph Research Analytical, DDM 2911 Plus EUA). A medição é baseada no princípio comprovado de um tubo em U oscilante assegurando valores de densidade altamente exatos. As amostras foram inseridas no aparelho através de uma seringa, utilizando em torno de 3 ml de cada amostra, sendo realizada uma triplica para cada tratamento.

2.2.2 Tensão superficial

A tensão superficial das formulações preparadas foi medida utilizando um analisador de forma gota KRÜSS DSA25 (KRÜSS, Alemanha) a 25 °C. A tensão superficial foi determinada com o método da gota pendente (10 gotas por solução de tratamento).

2.3 BIOENSAIOS

Quatro diferentes bioensaios foram realizados para investigar a atividade herbicida do caldo fermentado sem células: pré-emergência em *Cucumis sativus* e *Bidens pilosa* e pós-emergência em *Cucumis sativus* e *Bidens pilosa*.

2.3.1 Bioensaio em Pré-emergência em *Cucumis sativus*

Para os testes de germinação foi utilizada a espécie *C. sativus* (pepino). Os ensaios foram realizados em caixas gerbox previamente desinfetadas com álcool 70% e forradas com duas folhas de papel filtro (Germitest®) umedecidas com o respectivo bioherbicida concentrado (retido 30%) correspondendo um volume de 2,5 vezes o peso do papel, de acordo com as Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009).

Após, foram semeadas 4 repetições de 50 sementes com diferentes diluições (25, 50, 75 e 100% de caldo), e acondicionados em estufa BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio), com temperatura constante (28°C) e fotoperíodo de 12/12 horas de luz/escuro. Para a análise do teste de germinação, contabilizou-se o número de sementes germinadas e o número de sementes que germinaram e tornaram-se plantas normais. Posteriormente esses dados foram expressos em percentagem de inibição de germinação ou de plantas anormais (plantas que não tiveram seu crescimento normal). Para ambas as espécies, a primeira avaliação do número de sementes germinadas foi feita aos 4 dias após a instalação do experimento, seguida de outras duas

avaliações aos 7 e 10 dias. Para esse teste, foram contabilizadas como germinadas, as sementes que apresentaram crescimento da radícula superior a 2 mm, segundo descrito na RAS (BRASIL, 2009). A germinação foi calculada por meio da Equação (1):

$$G = \frac{\sum ni}{A} \times 100 \quad (1)$$

onde, ni: é o número de sementes germinadas em cada repetição; A: total de sementes utilizadas.

Juntamente com esses testes foram avaliados a embebição das sementes e a atividade enzimática da α -amilase. A embebição das sementes foi medida 24, 36 e 48 h após a exposição de 50 sementes de *C. sativus* por tratamento de acordo com método previamente descrito de Turk e Tawaha (2003). Resumidamente, a média de quatro repetições foi registrada como o peso original da semente (W_1), e o peso final da semente (W_2) foi determinado de forma semelhante para cada concentração e tempo de exposição. A porcentagem de embebição de sementes foi expressa de acordo com a Equação (2):

$$\text{Embebição de sementes (\%)} = [(W_2 - W_1) / W_1] \times 100 \quad (2)$$

Para a atividade enzimática da α -amilase foram realizados testes em sementes de *Cucumis sativus* utilizando o caldo bruto em diferentes concentrações 25, 50, 75 e 100%. Convém ressaltar que se utilizou um controle com água. A extração e medição da atividade da α -amilase foi realizada seguindo o método de Sadasivam e Manickam (1996). Sementes de *Cucumis sativus* usadas nos testes de germinação (60 sementes para uma determinação) foram moídas até um pó fino. O pó foi então homogeneizado com 4 mL de uma solução de CaCl_2 (cloreto de cálcio) 0,1 M gelado e centrifugadas a 12000 rpm durante 20 min. O sobrenadante foi coletado e usado como o extrato enzimático (fonte de enzima). A atividade da α -amilase foi então avaliada medindo a taxa de geração de açúcares redutores a partir de amido (Poonpaiboonpipat et al., 2013; Laosinwattana et al., 2018).

O meio racional (3 mL) continha 1 mL de amido solúvel a 1% em solução tampão de acetato a pH 5,5 e 1 mL do sobrenadante. Após a mistura foi incubada a 37°C por 15 min. No final da incubação foi adicionado 1 mL de reagente DNS (40 mM 3,5-ácido dinitrosalicílico, 0,4 M NaOH e 1 M K-Na tartarato), e imediatamente foi aquecido em banho-maria fervente por 5 min. Após o aquecimento a mistura foi arrefecida sob água corrente e perfazendo um volume total de 7 ml com água destilada. A intensidade da cor foi medida na absorção a 560 nm em espectrofotômetro. Um branco idêntico ao teste, exceto por não incluir enzima foi usado,

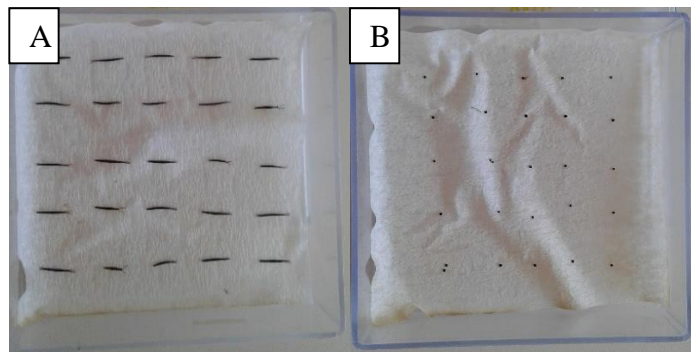
uma curva padrão foi preparada usando maltose, e a quantidade de α -amilase presente na amostra foi calculada a partir da curva padrão e expressa em $\mu\text{mol maltose min}^{-1} \text{g}^{-1(\text{FW})}$ (Poonpaiboonpipat et al., 2013; Laosinwattana et al., 2018).

2.3.2 Bioensaio em Pré emergência em *Bidens pilosa* e *Amaranthus retroflexus*

Também foram realizados testes de germinação nas espécies de *Bidens pilosa* e *Amaranthus retroflexus*. Para isso foi utilizado o caldo bruto e uma testemunha com água. Os ensaios foram realizados em caixas gerbox previamente desinfetadas com álcool 70% e forradas com duas folhas de papel filtro (Germitest[®]) umedecidas com o respectivo tratamento (cultura filtrada) correspondendo a um volume de 2,5 vezes o peso do papel, de acordo com as Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009).

Após, foram semeadas 4 repetições de 25 sementes, totalizando 100 sementes por tratamento e acondicionados em BOD, com temperatura constante (25°C) e fotoperíodo de 12/12 horas de luz/escuro (Figura 2).

Figura 2- Teste de germinação realizado em caixas gerbox em espécies de *Bidens pilosa* (A) e *Amaranthus retroflexus* (B).



Fonte: O autor.

Para a análise do teste de germinação, contabilizou-se o número de sementes germinadas e o número de sementes que germinaram e tornaram-se plantas normais. Posteriormente esses dados foram expressos em percentagem de inibição de germinação ou de plantas anormais (plantas que não tiveram seu crescimento normal). Para ambas as espécies, a primeira avaliação do número de sementes germinadas foi realizada aos 4 dias após a instalação do experimento, seguida de outras duas avaliações aos 7 e 10 dias. Para esse teste, foram contabilizadas como germinadas, as sementes que apresentaram crescimento da radícula superior a 2 mm, segundo descrito na RAS (BRASIL, 2009). A germinação foi calculada de acordo com a Equação (1).

2.3.3 Bioensaios em Pós emergência em *Cucumis sativus*

Para os testes das diferentes formulações (1 a 14) foi utilizado como planta teste uma dicotiledônea, o *Cucumis sativus* (pepino), pois mesmo não sendo planta daninha, é usualmente utilizada em experimentos avaliando seu potencial herbicida. Possuem alta sensibilidade a compostos fitotóxicos e também são plantas de fácil cultivo, demonstrando resposta visual do efeito herbicida ou efeito fitotóxico (Bastos et al., 2017; Klaic et al., 2017).

A semeadura foi realizada em copos plásticos com volume de 180 mL contendo o substrato comercial Mecplant® e posteriormente distribuídos em bandejas de polietileno, sendo utilizado quatro repetições de três plantas para cada tratamento, controle e testemunha (Figura 3). Para cada tratamento foi utilizado um controle, constituído das respectivas formulações e substituído o caldo bruto por água destilada. Para a testemunha foi realizada a aplicação apenas de água destilada. Ainda, utilizou-se mais cinco plantas, onde foi aplicado apenas o caldo bruto.

Figura 3 - Bandeja com repetições de *Cucumis sativus*.



Fonte: autor

As aplicações foram realizadas aos 10 dias após a semeadura, utilizando um borrifador manual. Para cada 12 plantas, foram aplicados 5 ml do formulado e os experimentos foram realizados em casa de vegetação, com ambiente controlado (temperatura e umidade).

O bioensaio visou identificar a capacidade de inibição do desenvolvimento de plântulas diante de uma diversidade de formulados. A avaliação da fitotoxicidade foi realizada visualmente 7 dias após a aplicação dos tratamentos, utilizando-se a escala adaptada de Frans & Crowley (Tabela 4).

Tabela 4- Escala adaptada de Frans & Crowley para a avaliação do percentual de fitotoxicidade.

%	Descrição das categorias principais	Descrição detalhada da fitotoxicidade na cultura
0	Sem efeito	Sem injúria ou efeito
10		Leve descoloração ou atrofia
20	Efeito leve	Alguma descoloração ou atrofia, ou perda por atrofia
30		Injúria mais pronunciada, mas não duradoura
40		Injúria moderada, mas normalmente com recuperação
50	Efeito moderado	Injúria mais duradoura, recuperação duvidosa
60		Injúria duradoura, sem recuperação
70		Injúria pesada, redução de estande
80	Efeito severo	Culturas próximas da destruição – poucas plantas sobreviventes
90		Raramente restam algumas plantas
100	Efeito total	Destruição completa da cultura

Fonte: Adaptado por FRANS & CROWLEY (1986).

2.3.4 Bioensaios em Pós emergência em *Bidens pilosa*

Após realizados os 14 testes foram selecionadas as duas melhores formulações com dois melhores adjuvantes comerciais e realizados testes em plantas daninhas (formulações 15 à 24). Em condições de casa de vegetação foram cultivadas plantas de *Bidens pilosa* (picão-preto). A espécie foi plantada em copos poliméricos com capacidade de 180 ml contendo o substrato comercial Mecplant®, contendo 1 planta por copo. Para cada tratamento foi utilizado um controle, constituído da respectiva formulação substituindo o caldo bruto por água destilada. As espécies de plantas daninhas foram escolhidas por serem plantas daninhas de importância na agricultura brasileira, representando a classe das dicotiledôneas.

As aplicações em pós-emergência foram realizadas em câmara de aplicação modelo Generation III Research Sprayer aos 15 dias após a semeadura. Foram aplicados respectivamente 300 L/ha do formulado, sob pressão constante de 20 PSI, pressurizado por ar comprimido. As plantas foram posicionadas a 0,5 m de altura em relação à barra de aplicação, o bico utilizado foi do tipo jato plano (leque) 8002, que tem como característica uma ponta jato plano (leque) convencional (Toderó et al., 2018). Convém ressaltar que foi realizada a aplicação quando as mudas das plantas daninhas se apresentarem no estágio de 3 a 4 folhas verdadeiras.

Os sintomas da fitotoxicidade foram avaliados visualmente aos 7, 10 e 15 dias após a aplicação dos tratamentos, e a avaliação utilizada para definir a toxicidade dos tratamentos foi

baseada numa escala conceitual alfabética (Tabela 5) da Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas- SBCPD, que varia de “a” até “e”, descrevendo detalhadamente os sintomas apresentados pelas plantas ao final dos tratamentos.

Tabela 5- Descrição dos conceitos aplicados às avaliações de toxicidade segundo a Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas (SBCPD).

Conceito	Descrição
A	Sem injúria ou efeito
B	Injúria leve e/ou redução do crescimento com rápida recuperação
C	Injúria moderada e/ou redução do crescimento com lenta recuperação ou definitiva
D	Injúrias severas e/ou redução do crescimento não recuperáveis e/ou redução do estande
E	Destruição completa da cultura ou somente algumas plantas vivas

Fonte: SBCPD, 1995.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 BIOENSAIO EM PRÉ-EMERGÊNCIA EM *Cucumis sativus*

Na Tabela 6 são apresentados os resultados do teste de germinação em *Cucumis sativus* das diferentes diluições do caldo de *Fusarium fujikuroi*. Todos os ensaios (25%, 50%, 75% e 100%) apresentaram efeito inibitório na germinação. Na Figura 4 pode-se visualizar a evolução da germinação da testemunha (água) quando comparado com o caldo bruto. Esses resultados são promissores uma vez que se observou um efeito bioherbicida significativo com o caldo bruto (100%).

Resultados semelhantes foram encontrados por Almeida (2014) e Brun et al., (2016) que ao utilizarem *Phoma* sp., observaram inibição na germinação de *C. sativus* e *Sorghum bicolor*. Já Bailey et al. (2011) realizaram estudos para produção de um bioherbicida com o fungo *Phoma* sp., evidenciando um efeito maior deste nas sementes de dicotiledôneas do que em monocotiledôneas. Estes resultados demonstraram que a utilização de metabólitos de *Phoma* sp. apresenta um amplo espectro de ação em pré-emergência.

Tabela 6- Porcentagem de germinação em 12, 24, 36 e 48 horas em *Cucumis sativus* para cada tratamento em câmara de germinação.

Tratamentos	Número de sementes germinadas de <i>Cucumis sativus</i>			
	12 horas	24 horas	36 horas	48 horas
Testemunha (água)	0	46	92	100
Caldo Bruto (100%)	0	0	0	0
Caldo 75%	0	0	0	0
Caldo 50%	0	0	0	0
Caldo 25%	0	20	72	92

Figura 4 - Germinação de semente de *Cucumis sativus* em 12, 24, 36 e 48 horas no tratamento com testemunha (água) e caldo bruto.



Fonte: autor

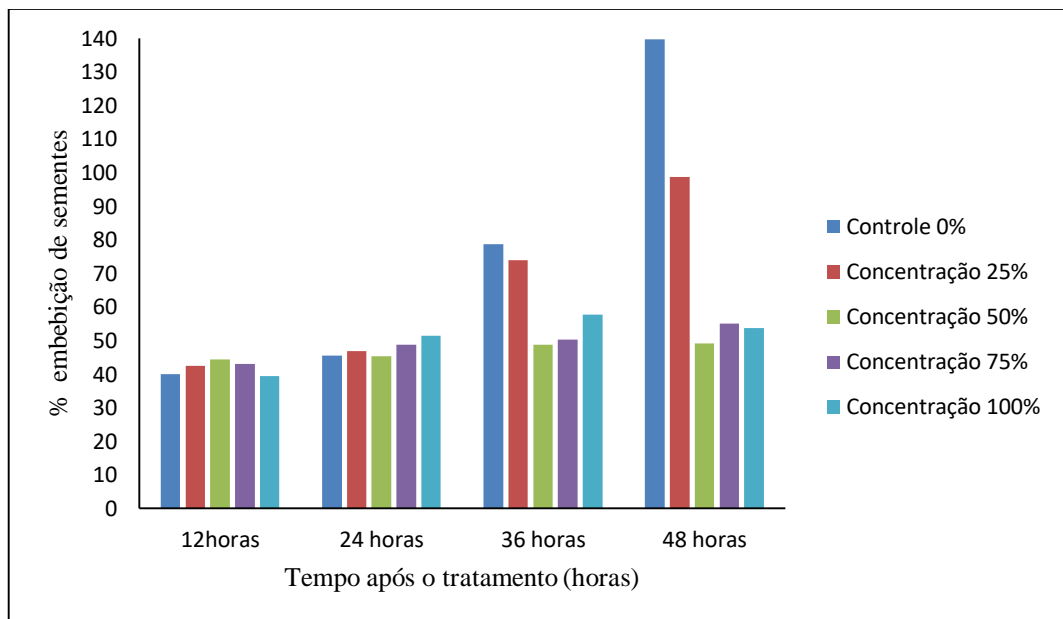
Pes et al., (2016) demonstraram resultados para a produção de bioherbicidas com *Diaporthe* sp., onde foram encontrados resultados de porcentagem de inibição da germinação de 100% nas sementes de *Glycine max*, *C. sativus*, *Triticum aestivum*, *Oryza sativa*, *Lolium multiflorum* e *Sorghum halepense*. Já Phattanawasini et al. (2006) ao testarem metabólitos de *Aspergillus fischeri*, observaram que esse inibiu na ordem de 100% a germinação de *Echinochloa crus-galli* [L.] e *Mimosa pigra* Linn.

O controle por meio de um bioherbicida pré-emergente, possibilitou a redução na emergência e na competição, principalmente na fase inicial do estabelecimento da cultura, propiciando ainda ao longo do tempo a redução no banco de sementes. A característica de controle sobre distintas famílias de plantas, bem como diferentes espécies, é considerada benéfica, do ponto de vista agrônomo, pois a campo aparecem muitas espécies de plantas daninhas e não apenas uma espécie isolada (Pes et al., 2016).

3.1.1 Embebição de sementes e atividade de α -amilase

A embebição das sementes de *C. sativus* foi inibida pela aplicação do caldo de *Fusarium fujikuroi* de maneira dependente da concentração (Figura 5). No controle, a embebição das sementes aumentou progressivamente com o tempo de embebição. Todas as concentrações do caldo de *Fusarium fujikuroi* testadas mostraram inibição da embebição das sementes.

Figura 5 - Efeitos do caldo de *Fusarium fujikuroi* na embebição de sementes de *Cucumis sativus*.



Fonte: autor

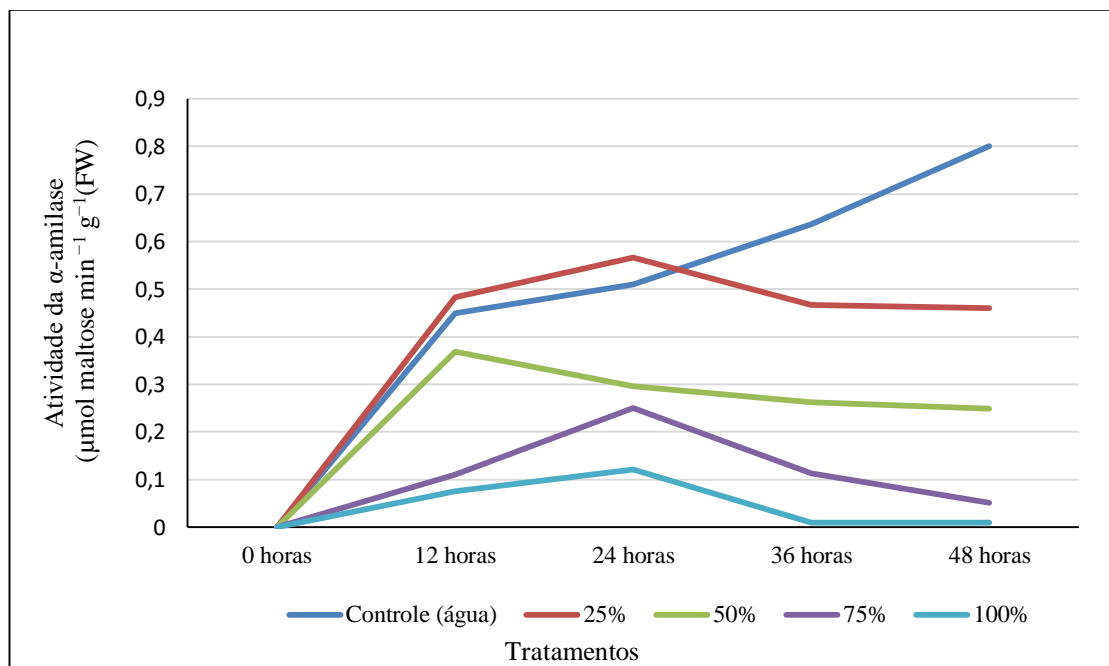
Durante a germinação, a atividade da α -amilase desempenha um papel importante na decomposição de carboidratos armazenados em açúcares solúveis para o crescimento sustentável das plântulas até que esta possa fotossintetizar o suficiente para se autossustentar (Kato-Noguchi et al., 2010). Por essa razão, para entender o efeito do mecanismo na inibição da germinação das sementes, a atividade da α -amilase foi analisada.

Mudanças na atividade da α -amilase em sementes de *Cucumis sativus* após os tratamentos são mostradas na Figura 6. A atividade da α -amilase das sementes aumentou nas concentrações onde houve a germinação. No tratamento controle onde se utilizou água percebeu-se a maior atividade de α -amilase. Isso está correlacionado com a germinação das sementes que foi de 100% após as 48 horas. A aplicação do caldo fermentado em todos os tratamentos aumentou inicialmente a indução da atividade da α -amilase em até 12 horas. A

partir das 24 horas percebe-se uma diminuição da atividade nos tratamentos de 25, 50, 75 e 100% respectivamente.

O efeito da atividade da α -amilase sofreu variação em cada tratamento. Com o aumento da concentração nota-se uma diminuição após as 36 horas. Isso pode ser explicado pelo fato desses tratamentos (75%, 50% e caldo bruto) inibirem 100 % a germinação. Os resultados correlacionam a atividade herbicida do fungo com o efeito inibitório da α -amilase, onde o efeito dos metabólitos de *Fusarium fujikuroi* podem ser atribuídos à diminuição das atividades da α -amilase.

Figura 6- Efeito do caldo de *Fusarium fujikuroi* na atividade α -amilase de sementes de *Cucumis sativus*.



Fonte: autor

3.2 Bioensaio em Pré-emergência em *Bidens pilosa* e *Amaranthus retroflexus*

Nesta etapa foi testado o poder herbicida do caldo bruto de *Fusarium fujikuroi* na germinação de sementes de duas plantas daninhas *Bidens pilosa* e *Amaranthus retroflexus* (Figura 7). A avaliação demonstrou que existe um efeito herbicida no caldo bruto contendo os metabólitos de *Fusarium fujikuroi*, para as espécies de plantas daninhas em relação à porcentagem de germinação (Tabela 7).

Tabela 7- Porcentagem de germinação na primeira e segunda contagem de *Bidens pilosa* e *Amaranthus retroflexus* para cada tratamento em câmara de germinação.

Tratamentos	<i>Bidens pilosa</i>		<i>Amaranthus retroflexus</i>	
	1º contagem	2º contagem	1º contagem	2º contagem
Testemunha (água)	55	75	50	65
Caldo Bruto (100%)	0	0	0	0

O caldo bruto de *Fusarium fujikuroi* apresentou efeito inibitório de 100% na germinação de *Bidens pilosa* e *Amaranthus retroflexus* na primeira e segunda contagem, diferente da testemunha (água) onde houve 25% de inibição da germinação para *Bidens pilosa* e 35% *Amaranthus retroflexus* (Figuras 7 e 8) após a segunda contagem. Assim os resultados apresentados na Tabela 7, mostram que os tratamentos foram eficientes evitando a germinação de ambas plantas daninhas. Esses resultados são corroborados por Daniel Jr. et al. (2018), onde utilizando o mesmo fungo (*Fusarium fujikuroi*) foram obtidos aproximadamente 59% e 52% de inibição da germinação de *Cucumis sativus* e *Sorghum bicolor*, respectivamente.

Figura 7- Inibição da germinação de *Amaranthus retroflexus* 10 dias após a aplicação dos tratamentos.



Fonte: Autor

Figura 8- Inibição da germinação de *Bidens pilosa* 10 dias após a aplicação dos tratamentos.



Fonte: Autor

Resultados semelhantes foram relatados por outros autores com diferentes fungos, Todero et al. (2018a) ao testarem o fungo *Phoma* sp., encontraram 100% de inibição de germinação para *Cucumis sativus*, 100% para *Bidens pilosa* e 100% para *Amaranthus retroflexus*. Brun et al. (2016) utilizando o fungo *Phoma* sp., encontraram inibição na germinação de *Cucumis sativus* e *Sorghum bicolor* de 100%. Estes resultados demonstram que a utilização de metabólitos de *Fusarium fujikuroi* possuem um amplo espectro de ação herbicida em pré-emergência. Pes et al. (2016) demonstraram resultados para a produção de herbicidas com *Diaporthe* sp., onde foram encontrados resultados de porcentagem de inibição da germinação de 100% nas sementes de *G. max*, *C. sativus*, *T. aestivum*, *O. sativa*, *L. multiflorum* e *S. halepense*, sendo que as sementes foram consideradas não germinadas quando não apresentaram a protusão radicular. Já Phattanawasin et al. (2006) utilizando metabólitos de *Aspergillus fischeri*, inibiu na ordem de 100% a germinação de *Echinochloa crus-galli* e *Mimosa pigra* Linn.

O controle por meio de um herbicida pré-emergente, possibilita uma redução na emergência e na competição, principalmente na fase inicial do estabelecimento da cultura, propiciando ainda ao longo do tempo a redução no banco de sementes. A característica de controle sobre distintas famílias de plantas, bem como diferentes espécies, é considerada benéfica, do ponto de vista agrônomo, pois em campo predominantemente ocorre um complexo de plantas daninhas e não apenas uma espécie isolada (Pes et al., 2016).

3.3 BIOENSAIO PÓS-EMERGÊNCIA EM *Cucumis sativus*

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados das avaliações das plantas de *Cucumis sativus* após a aplicação das formulações (1 a 14), com efeitos significativos em alguns tratamentos quanto a fitotoxicidade das plantas. Convém ressaltar que para cada formulação utilizou-se uma testemunha substituído o caldo por água destilada. Quando analisado os primeiros testes de 1 a 4 onde foram testadas diferentes concentrações de óleo de palma, Span[®] 80 e Tween[®] 80 com diferentes níveis de equilíbrio hidrófilo lipófilo (EHL), o tratamento que apresentou melhor resultado foi a formulação 3 (60%) com maior concentração de Tween[®] 80 e maiores equilíbrio hidrófilo lipófilo. Essas plantas apresentaram injúria mais duradoura, sem recuperação, apresentando efeito moderado (Figura 9).

A absorção dos herbicidas aplicados sobre as plantas é principalmente através da cutícula das células da epiderme foliar. A cutícula é composta por três camadas, a mais externa

é composta por ceras epicuticulares, com características lipofílicas, a camada intermediária matriz de cutina, com características hidrofílicas e a camada mais interna formada por ceras imersas na matriz de cutina, de características lipofílicas (Carvalho, 2013). Assim, os herbicidas lipofílicos penetram através da cutícula por difusão molecular simples, através da camada cerosa. Os herbicidas hidrófilos (alto valor de EHL) também são capazes de entrar na planta pela superfície da cutícula por difusão simples, porém essa permeabilidade é reduzida devido ao seu baixo particionamento (Hess; Foy, 2000).

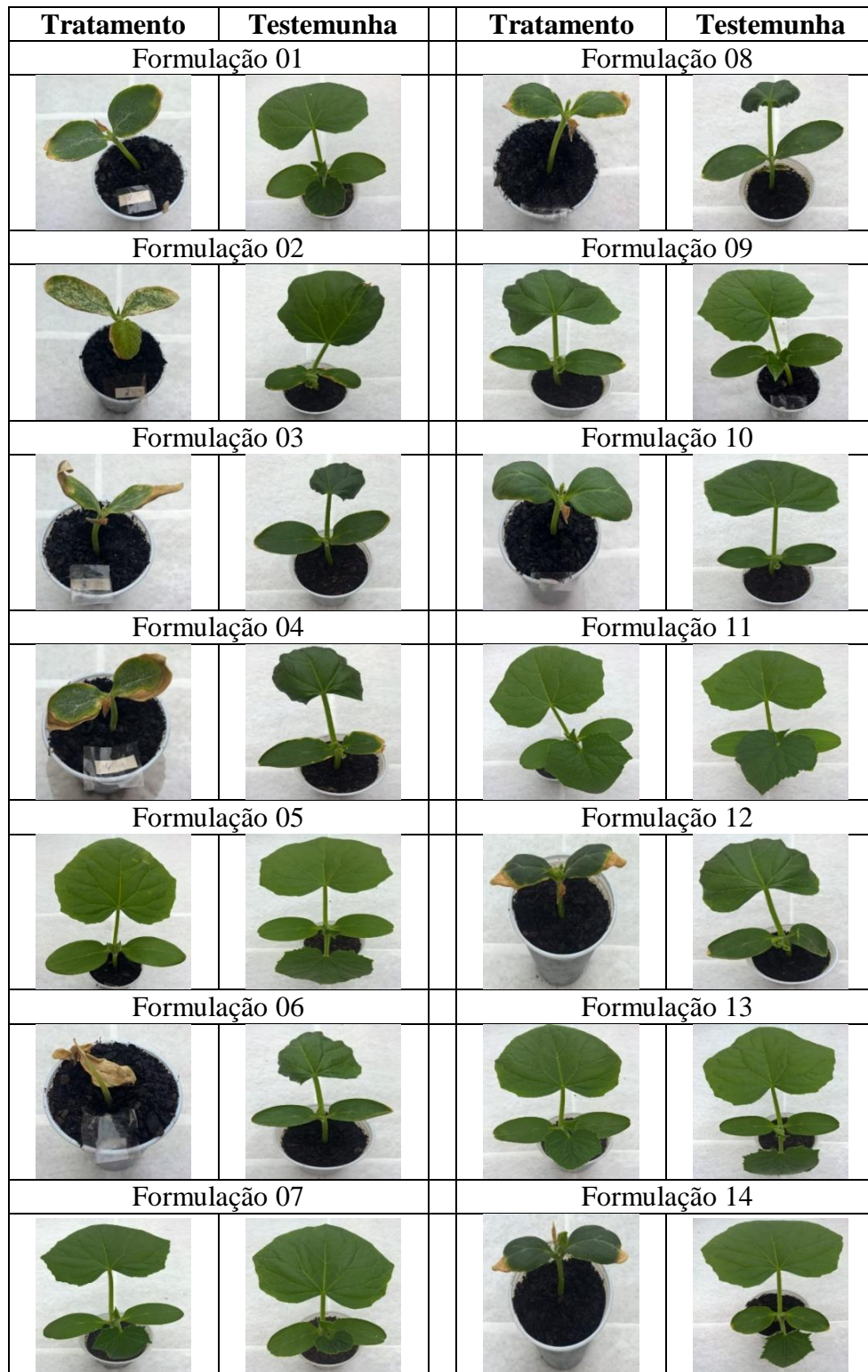
O resultado positivo do tratamento 3, pode estar relacionado com o alto valor de EHL (15). Segundo Weaver et al. (2009) o valor do EHL de um adjuvante pode aumentar a bioatividade de um bioherbicida e melhorar as propriedades químicas de uma formulação. Formulações com valores de EHL de médio a alto podem ser mais eficientes, já que são absorvidas e aumentam a hidratação da cutícula, favorecendo a permanência de herbicidas hidrofílicos sobre as folhas, o que aumenta a velocidade de difusão de herbicidas em um gradiente de concentração constante (Hess; Foy, 2000).

Percebe-se que a formulação apenas com óleo de palma e Span[®] 80, não favoreceram a absorção dos compostos fitotóxicos pela planta de *Cucumis sativus*, como observado no tratamento 2, o qual apresentou menor fitotoxicidade (20%), sendo necessária a presença do Tween[®] 80.

Tabela 8- Resultados das avaliações de fitotoxicidade das plantas de *Cucumis sativus* após a aplicação das formulações.

Formulações	Fitotoxicidade	
	Tratamento %	Controle %
01	20	0
02	20	20
03	60	10
04	50	30
05	0	0
06	100	0
07	0	0
08	30	10
09	0	0
10	10	0
11	0	0
12	40	10
13	0	0
14	40	0

Figura 9- Comparações das formulações.



Fonte: autor

Ao avaliar as formulações de 5 a 14 a utilização dos produtos comerciais juntamente com o caldo bruto observa-se para ambos que o uso de apenas o adjuvante + caldo bruto não

apresenta fitotoxicidade, porém ao utilizar o adjuvante + Tween[®] 80 + caldo bruto todos apresentaram fitotoxicidade. O tratamento que apresentou maior porcentagem de fitotoxicidade em plantas de *Cucumis sativus* foi o tratamento 06 (100%) apresentando efeito total: destruição completa da cultura. Quanto ao menor potencial fitotóxico foi encontrado nos tratamentos 5, 7, 9, 11 e 13 (0%) que se apresentou sem efeito: injúria ou redução (Figura 9).

O Silwet L-77 apresentou maior compatibilidade com o caldo bruto, causando morte total da planta quando usado juntamente com o Tween[®] 80 (tratamento 6) como observado na Figura 9 e Tabela 8 o Silwet L-77 é um surfactante não iônico, organossiliconado, à base de um trisiloxano etoxilado (Ivanova et al., 2017), usado para melhorar a penetração cuticular das superfícies das plantas (Hu et al., 2010). Os surfactantes trisiloxanos são amplamente utilizados em aplicações de pesticidas agrícolas devido às suas características favoráveis de molhabilidade, espalhabilidade, adesividade e penetração (Michel et al., 2016). Os adjuvantes Assist, Aureo e Nimbus pertencentes a classe dos hidrocarbonetos alifáticos apresentaram menor compatibilidade com o caldo bruto, com menores efeitos fitotóxicos.

3.4 BIOENSAIO PÓS-EMERGÊNCIA EM *Bidens pilosa*

Na Tabela 9 estão apresentados os resultados das avaliações das plantas de *Bidens pilosa* após a aplicação das formulações. Ressalva-se que para cada formulação utilizou-se um controle substituindo o caldo fermentado por água. Esse controle foi utilizado como forma comparativa da fitotoxicidade.

O uso de adjuvantes aumentou a eficiência do bioherbicida em algumas formulações específicas. Os resultados mostram que houve efeitos significativos em alguns formulados quanto a fitotoxicidade das plantas (Tabela 9). Dentre os produtos testados, o que apresentou maior fitotoxicidade foi o formulado 20 diferindo dos demais, quando comparado com seu controle (Figura 10), evidenciado que a menor concentração de adjuvante e Tween[®] 80 o que torna a formulação mais eficiente, destaca-se que neste ensaio foi utilizado 0,01 ml Silweet L-77 e 0,1 ml de Tween[®] 80. Os sintomas observados foram pontuações cloróticas nas folhas, amarelamento e alteração no crescimento. A formulação que apresentou menor potencial fitotóxico foi a 15 utilizando uma menor concentração de adjuvante Aureo (0,01 ml) e Tween[®] 80 (0,01 ml) (Figura 11).

Tabela 9 - Resultados das avaliações das plantas de *Bidens pilosa* após a aplicação das formulações com adjuvantes.

Formulações	Fitotoxicidade	
	Tratamento %	Controle %
Água Destilada	0	0
Bioherbicida concentrado	10	10
15	0,00	0,00
16	100	70
17	10	0
18	100	60
19	80	20
20	90	0
21	100	60
22	100	20
23	100	40
24	100	40

Sintomas semelhantes como manchas escuras, necrose, clorose foram observadas por Daniel Jr et al (2018) ao testar caldo sem células de *Fusarium fujikuroi* em folhas destacadas de *Cucumis sativus*. Em trabalho recente foram testados a associação de adjuvantes com filtrado de cultura de *Fusarium fujikuroi* para aumentar o controle de *Conyza* sp., os resultados desmonstraram que a combinação adequada de adjuvantes em associação com filtrado de cultura de *F. fujikuroi* aumentou até 2,5 vezes a eficiência do bioherbicida no controle pós-emergência de *Conyza* sp., e ocasionou danos irreversíveis as plantas testes (Daniel Jr et al., 2020).

Figura 10- Maior potencial fitotóxico da planta *Bidens pilosa* aplicando o formulado 20. Controle (A) e Tratamento (B).



Fonte: autor

Figura 11 - Menor potencial fitotóxico da planta *Bidens pilosa* em função da aplicação do formulado 15. Controle (A) e Tratamento (B).



Fonte: autor

Ao utilizar a pulverização de apenas filtrado de cultura de *Phoma* sp. Todero et al., (2018) relatou sintomas como escores de clorose nas folhas, amarelecimento e crescimento alterado em *C. sativus*. No entanto, os autores descreveram que o uso de adjuvantes foi fundamental para aumentar a eficiência do bioherbicida obtido de *Phoma* sp. nas plantas de *C. Sativus*, apresentando efeitos severos levando a cultura próxima da destruição total.

Lesões como amarelecimento e necrose leves em folhas destacadas de *C. sativus* e *S. bicolor* foram relatadas com o uso de caldo produzido por fermentação submersa com *Phoma* sp. (Brun et al., 2016). Berner et al., (2005) descreveram que um dos sintomas fitotóxicos causados por fungos do gênero *Cercospora* são pequenas manchas marrons nas folhas. Essas manchas muitas vezes se unem resultando em necrose de muitas das folhas e morte da planta hospedeira. Os efeitos de mancha foliar seguido de amarelecimento também foram descritos por Yandoc et al., (2005) ao analisarem o potencial de biocontrole e os efeitos de *Bipolaris sacchari* e *Drechslera gigantea*, fungos patogênicos, em *Imperata cylindrica*.











Na maioria dos formulados foi observado que o uso dos adjuvantes + Tween[®] 80 + caldo causou injúria na gema apical. Esta injúria causa a paralização do crescimento das plantas. Segundo Mello et al. (2003) as toxinas produzidas por fungos podem induzir nas plantas sintomas como clorose, murcha, encharcamento e alteração no crescimento, características essas visualizada nos experimentos. Convém ressaltar que o uso dos adjuvantes foi fundamental para o aumento da eficiência do bioherbicida obtido da fermentação de *Fusarium fujikuroi* sobre as plantas de *Bidens pilosa*.











A paralização do crescimento, também foi observada por Weissmann et al., (2003) ao avaliarem o potencial de controle de isolados bacterianos em plantas daninhas. Para Gronwald et al., (2002) a paralização do crescimento de haste é um fator importante na definição do bioherbicida, sendo que em seus resultados obtiveram redução em 31% na altura das plantas e a redução dos números de plantas vivas ao final do experimento.

Quando comparamos os dois adjuvantes utilizados, o Silwet L-77 + o Tween® 80 apresentaram maior compatibilidade com o caldo bruto causando danos irreversíveis a planta (Figura 12). O Silwet L-77 é um surfactante não iônico, organossiliconado, à base de um trisiloxano etoxilado (Ivanova et al., 2017), usado para melhorar a penetração cuticular das superfícies das plantas (Hu et al., 2010). Os surfactantes trisiloxanos são amplamente utilizados em aplicações de pesticidas agrícola devido às suas características favoráveis de molhabilidade, espalhabilidade, adesividade e penetração (Michel et al., 2016).

Um bioherbicida em muitos casos não irá necessariamente causar o mesmo efeito que um herbicida químico, causando mortalidade nas plantas. No entanto, ele tem o potencial através da infecção e do retardo no crescimento de mudas de plantas daninhas fornecer vantagem competitiva para as culturas (Hetherington et al., 2002).

Figura 12 – Sintomas fitotóxicos da planta *Bidens pilosa* em função da aplicação dos formulados 15 à 24.

		Aureo + Tween® 80				
		Formulação 15	Formulação 16	Formulação 17	Formulação 18	Formulação 19
Controle (Água)						
Caldo (<i>Fusarium fujikuroi</i>)						

		Silwet L-77 + Tween® 80				
		Formulação 20	Formulação 21	Formulação 22	Formulação 23	Formulação 24
Controle (Água)						
Caldo (<i>Fusarium fujikuroi</i>)						

A Tabela 10 apresenta os valores de densidade a 25°C para os formulados de 15 à 24. Para todas as formulações, independente do tratamento e controle, não houve diferença significativa entre os valores de densidade.

Observou-se que os valores encontrados para o controle foram todos próximos à densidade da água (0,9986 g cm⁻³), quanto ao tratamento os valores foram bem próximos ao bioherbicida concentrado. Porém, a magnitude desta alteração foi pequena, em virtude das concentrações empregadas, concordando com os dados apresentados por Matuo et al. (1989), quando estudaram os efeitos de alguns adjuvantes nas propriedades físicas do líquido, onde as alterações na densidade ocorreram nas duas últimas casas decimais. O menor valor de densidade encontrado foi na formulação 17 (1,0077 g cm⁻³) e o maior para a formulação 23 (1,0179 g cm⁻³).

Tabela 10 – Densidade a 25°C nas diferentes formulações

Formulação	Densidade g cm ³	
	Tratamento	Controle
Água Destilada		0,9948
Caldo Bruto		1,0126
15	1,0078	0,9991
16	1,0107	1,0036
17	1,0077	0,9991
18	1,0111	1,0033
19	1,0098	1,0014
20	1,0080	0,9996
21	1,0139	1,0039
22	1,0140	0,9988
23	1,0179	1,0038
24	1,0160	1,0020

3.4.2 Tensão Superficial

Inicialmente foram verificados os valores das tensões superficiais do caldo e da água, apresentando valores de 51,16 mN m⁻¹ e 59,30 mN m⁻¹, respectivamente. Quando comparados os valores de tensão superficial obtidos nas formulações para os tratamentos e controles (Tabela 11), é possível verificar um acentuado decréscimo nos valores em função da adição de surfactantes na calda.

Tabela 11 – Tensão superficial para as diferentes formulações

Formulação	Tensão Superficial mN m ⁻¹	
	Tratamento	Controle
Água Destilada	59,30	
Caldo Bruto	51,16	
15	23,39	39,01
16	24,59	38,30
17	26,36	35,80
18	24,98	38,18
19	27,55	34,91
20	23,27	28,82
21	25,09	31,54
22	22,07	23,32
23	24,80	28,09
24	26,36	28,26

Todas as formulações houve diferença entre as formulações e o tratamento e o controle para a tensão superficial (Tabela 11). Convém ressaltar que todos os formulados apresentaram menores valores para as tensões superficiais, quando comparado caldo bruto e com a água (testemunha), sendo uma característica desejável sob o ponto de vista da tecnologia de aplicação (Antuniassi & Boller, 2011; Caitano et al., 2016).

A redução da tensão superficial favorece a molhabilidade, o espalhamento e absorção dos produtos fitossanitários, além de conferir maior tenacidade às suas moléculas ativas, reduzindo também sua taxa de biodegradação ou fotodegradação (Martins et. al., 2009; Iost & Raetano, 2010).

4. CONCLUSÃO

Os resultados evidenciaram que as formulações são uma etapa importante no desenvolvimento de um bioherbicida com metabólitos de fungos. A partir dos resultados encontrados nesse trabalho concluímos que o caldo de *Fusarium fujikuroi* é uma fonte potencial de herbicida biológico. Apresentando resultados otimistas tanto para pré emergência e pós emergência. O uso de adjuvantes nas formulações potencializou o efeito bioherbicida de *Fusarium*, e a utilização do Tween[®]80 e Silwet L-77 foram fundamentais para a eficácia dos formulados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, T. C. **Formulação de um herbicida biológico produzido através da fermentação submersa em biorreator**. 2014. 91 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.
- ANTUNIASSI, U.R.; BOLLER, W. **Tecnologia de aplicação de fungicidas**. In: ANTUNIASSI, U.R.; BOLLER, W. Tecnologia de aplicação para culturas anuais. Passo Fundo: Aldeia Norte; Botucatu: FEPAF, 2011, p. 221-229.
- ARNDT, B. et al. A Fungal N-Dimethylallyltryptophan metabolite from *Fusarium fujikuroi*. **ChemBioChem**, v. 18, p. 899–904, 2017.
- AYBEKE, M. *Fusarium* infection causes genotoxic disorders and antioxidant-based damages in *Orobanche* spp. **Microbiol. Res**, v. 201, p. 46–51, 2017.
- BASTOS, B.O. et al. Solid-state fermentation for production of a bioherbicide from *Diaporthe* sp. and its formulation to enhance the efficacy. **3Biotech**, v. 7, n. 2, p. 135, 2017.
- BAILEY, K. L. et al. The effects of *Phoma macrostoma* on nontarget plant and target weed species. **Biol. Control**, v. 58, p. 379–386, 2011.
- BERNER, D.K. et al. *Cercospora acroptili* and *Cercospora centaureicola* sp. nov. - Potential biological control agents of Russian knapweed and yellow starthistle, respectively. **Mycologia**, v. 97, n. 5, p. 1122-1128, 2005.
- BURNSIDE, O. C. Rationale for developing herbicide-resistant crops. **Weed Technology**, v. 6, n. 3, p. 621-625, 1992.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Secretaria de Defesa Agropecuária**. – Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.
- BRUN, T. et al. Production of bioherbicide by *Phoma* sp. in a stirred-tank bioreactor. **3Biotech**, v. 6, n. 2, p. 230, 2016.
- CAITANO, C. E. C. et al. **Efeito de adjuvantes na redução da tensão superficial estática da água**. In: 1º Encontro Internacional de Ciências Agrárias e Tecnológicas Crise: tecnologias para a superação de desafios no setor agrário, 2016.
- CARVALHO, L. B. de. **Plantas Daninhas**. Lages, SC, 2013, 82 p.
- DANIEL Jr, J.J. **Seleção de fungos visando a produção de um bioherbicida para o controle de *Conyza* sp.** 2017. 77. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Santa Maria. RS, 2017.
- DANIEL JR. J. J. et al. Association of Adjuvants with Culture Filtrate from *Fusarium fujikuroi* for Increasing the Control of *Conyza* sp. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 10, n 5, p. 6481-6487, 2020.
- FRANS, R.; CROWLEY, H. Experimental design and techniques for measuring and analyzing plant responses to weed control practices. In: **Southern Weed Science Society. Research methods in weed science**, Clemson, 3ª ed., p 29-45, 1986.
- DANIEL Jr., J. J. et al. *Fusarium fujikuroi*: A novel source of metabolites with herbicidal activity. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 314-320, 2018.
- GAZZIERO, D. L. P. et al. Estimating yield losses in soybean due to sourgrass interference. **Planta Daninha**, v. 37, p. 1-10, 2019.

- GIACOMINI, D. A. et al. Duas novas mutações PPX2 associadas à resistência a herbicidas inibidores de PPO em *Amaranthus palmeri*. **Pest Manag. Sci**, v. 73, p. 1559–1563, 2017.
- HESS, F. D.; FOY, C. L. Interaction of surfactants with plant cuticles. **Weed Technology**, v. 14, p. 807-813, 2000.
- HETHERINGTON, S.D. et al. Effects of some environmental conditions on the effectiveness of *Drechslera avenacea* (Curtis ex Cooke) Shoem: a potential bioherbicidal organism for *Avena fatua* L. **Biological Control**, v. 24, p. 103–109, 2002.
- HILÁRIO, F. et al. Antimicrobial screening of endophytic fungi isolated from the aerial parts of *Paepalanthus chiquitensis* (Eriocaulaceae) led to the isolation of secondary metabolites produced by *Fusarium fujikuroi*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 1389–1395, 2017.
- HU, Y. et al. High efficiency transport of quantum dots into plant roots with the aid of silwet L-77. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 703-709, 2010.
- IVANOVA, N. A.; KUBOCHKIN, N. S.; STAROV, V. M. Wetting of hydrophobic substrates by pure surfactants at continuously increasing humidity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 519, p. 71-77, 2017.
- KATO-NOGUCHI, H.; INO, T.; KUJIME, H. The relation between growth inhibition and secretion level of momilactone B from rice root. **Journal of Plant Interactions**, v. 5, p. 87-90, 2010.
- KLAIC, R. et al. A novel combined mechanical-biological approach to improve rock phosphate solubilization. **International Journal of Mineral Processing**, v. 161, p. 50-58, 2017.
- LAOSINWATTANA, C.; WICHITTRAKARN, P.; TEERARAK, M. Chemical composition and herbicidal action of essential oil from *Tagetes erecta* L. leaves. **Industrial Crops & Products**, v. 126, p. 129-134, 2018.
- LI, S. et al. Phytotoxic and Antibacterial Metabolites from *Fusarium proliferatum* ZS07 Isolated from the gut of long-horned grasshoppers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 8997–9001, 2014.
- MARINHO, G. et al. Potential of the filamentous fungus *Aspergillus niger* AN 400 to degrade atrazine in wastewaters. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 162–167, 2017.
- MELLO, S. C. M. de; TEIXEIRA, E. A.; BORGES NETO, C. R. **Fungos e seus metabólitos no controle da tiririca**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. (Documentos, 104). 2003. 55 p.
- MCKEON, T. A.; BRICHTA, J. Efeito do glifosato na mamona *Ricinus communis* L. **Biocatal. Agric. Biotechnol**, v. 3 p. 397 – 399, 2014.
- MICHEL, A. et al. Mobility of a polyether trisiloxane surfactant in soil: soil/water distribution coefficients and leaching in a soil column. **Water, Air, Soil Pollution**, v. 227, p. 1-11, 2016.
- OLIVEIRA JR, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. *Biologia e manejo de plantas daninhas*. **Ominipax**, Curitiba, Brasil, p. 348, 2011.
- PEARSON, K. A. et al. Characterisation and pathogenicity of *Fusarium* taxa isolated from ragwort (*Jacobaea vulgaris*) roots. **Fungal Ecology**, v. 20, p. 186–192, 2016.
- PETTER, A. F. et al. Incompatibilidade física de misturas entre inseticidas e fungicidas. **Comunicata Scientiae**, v. 4, n. 2, p. 129-138, 2013.

- PES, M. P. et al. Bioherbicide based on *Diaporthe* sp. secondary metabolites in the control of three tough weeds. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 42, p. 4242–4249, 2016.
- PIYABOON, O. et al. Pathogenicity, host range and activities of a secondary metabolite and enzyme from *Myrothecium roridum* on water hyacinth from Thailand. **Weed Biology and Management**, v. 16, p.132–144, 2016.
- PHATTANAWASIN, P. et al. Screening of Fungal Extracts for Weed Germination and Growth Inhibitory Activity. **Silpakorn University International Journal**, v. 6, n. 1/2, p. 136-144, 2006.
- RAMESH, K; RAO, A. N.; CHAUHAN, B. S. Papel da competição de safras no manejo de ervas daninhas em arroz, trigo e milho na Índia: uma revisão. **Crop Protection**, v. 95, p. 14 – 21, 2017.
- RANA, S.S.; RANA, M.C. **Principles and Practices of Weed Management**. Department of Agronomy, College of Agriculture, CSK Himachal Pradesh Krishi Vishvavidyalaya, Palampur. 2016. 138 p.
- SADASIVAM, S.; MANICKAM, A. **Biochemical Methods**. New Age International (P) Ltd, Publishers, Tamil Nadu, 1996, 272 p.
- POONPAIBOONPIPAT, T. et al. Phytotoxic effects of essential oil from *Cymbopogon citratus* and its physiological mechanisms on barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 403-407, 2013.
- TODERO, I. et al. Formulation of a bioherbicide with metabolites from *Phoma* sp. **Scientia Horticulturae**, v, 241, p. 285-292, 2018.
- VAREJÃO, E. V. V. et al. The search for new natural herbicides – strategic approaches for discovering fungal phytotoxins. **Crop Protection**, v. 48, p. 41–50, 2013.
- SILVA, A. F. et al. Período anterior à interferência na cultura da soja-RR em condições de baixa, média e alta infestação. **Planta Daninha**, v. 27, n 2, p. 57-66, 2009.
- WEAVER, M. A. et al. Improved bioherbicidal efficacy by *Myrothecium verrucaria* via spray adjuvants or herbicide mixtures. **Biological Control**, v. 50, p. 150-156, 2009.
- WEISSMANN, R., UGGLA, C., GERHARDSON, B. Field performance of a weed-suppressing *Serratia plymuthica* strain applied with conventional spraying equipment. **Biological Control**, v. 48, n. 6, p. 725-742, 2003.
- YANDOC, C. B.; CHARUDATTAN, R.; SHILLING, D. G. Evaluation of Fungal Pathogens as Biological Control Agents for Cogongrass (*Imperata cylindrica*). **Weed Technology**, v. 19, n. 1, p.19-26, 2005.

CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 DISCUSSÃO GERAL

A busca por novas espécies de fungos que possam produzir exopolissacarídeos ainda é necessária, principalmente no que se refere à aplicabilidade agrícola ainda pouco explorada. A utilização de exopolissacarídeos produzidos por fungos pode resultar em um produto seguro, natural e mais sustentável e tem impacto significativo no desenvolvimento de novos produtos. Existem muitos relatos na literatura científica sobre as diversas aplicabilidades dos exopolissacarídeos fúngicos, mas sua capacidade de aplicação em áreas agrícolas ainda é pouco estudada, devido a isso se faz importante o estudo do potencial herbicida e sua relação aos exopolissacarídeos.

Quanto aos principais resultados obtidos neste trabalho ao avaliar os exopolissacarídeos no caldo fermentado com o fungo *Fusarium fujikuroi* este apresentou resultados importantes, onde o caldo bruto alcançou uma produção máxima de exopolissacarídeos de 5,94 g/L de EPS. Outro aspecto importante é quanto as tecnologias utilizadas para concentrar os exopolissacarídeos. Estes foram concentrados até 2 vezes pelo método de concentração por liofilização, chegando a 10,64 g /L. As membranas apresentaram um aumento considerável quando comparadas ao caldo bruto, com concentração máxima de 9,6 g / L com UP 150 e 9,18 g / L com UP005, ambas na fração de retido. Para a evaporação, as concentrações foram inferiores às obtidas por outras tecnologias (7,78 g/L, 40°C). Percebeu-se também que a concentração de exopolissacarídeos altera a tensão superficial e consequentemente a atividade herbicida, uma vez que quando essas concentrações aumentam, a atividade bioherbicida aumenta e a tensão superficial diminui.

Ao realizar os testes em pós emergência para avaliar a eficácia da atividade herbicidas dos exopolissacarídeos do caldo fermentativo de *Fusarium fujikuroi* em *Cucumis sativus* os resultados foram promissores. As plantas *Cucumis sativus* apresentaram sintomas como necrose (5,85%), clorose (16,66%) e leve despigmentação (77,79%) nas folhas. Porém, ao avaliar os diferentes métodos de concentração, os melhores resultados foram obtidos com a liofilização. Os resultados de fitotoxicidade confirmam que há um aumento no poder herbicida quando a concentração de exopolissacarídeos é aumentada. Consequentemente, esses métodos são eficientes, permitindo a concentração e possibilitando a maximização do efeito herbicida.

Também foram avaliados testes em pré emergência. Inicialmente estes testes foram realizados sob a germinação de *Cucumis sativus* onde obteve-se resultados promissores uma

vez que quando testado a eficácia do caldo bruto, caldo em 75% e 50% de *Fusarium fujikuroi* teve-se 100% de inibição da germinação. Posteriormente foram testados o potencial na inibição da germinação em *Bidens pilosa* e *Amaranthus retroflexus*. A avaliação demonstrou que existe um efeito herbicida no caldo bruto contendo metabólitos de *Fusarium fujikuroi*, para as espécies de plantas daninhas em relação à porcentagem de germinação.

Juntamente com os testes em pré emergência foram avaliados a embebição das sementes e a atividade da α -amilase em cada tratamento. No controle, a embebição das sementes aumentou progressivamente com o tempo de embebição. Todas as concentrações do caldo de *Fusarium fujikuroi* testadas mostraram inibição da embebição das sementes. Com o aumento da concentração de caldo houve uma diminuição da atividade da α -amilase após as 36 h. Isso pode ser explicado pelo fato desses tratamentos (75%, 50% e caldo bruto) inibirem 100 % a germinação. Os resultados correlacionam a atividade herbicida do fungo com o efeito inibitório da α -amilase, onde o efeito dos metabólitos de *Fusarium fujikuroi* podem ser atribuídos à diminuição das atividades da α -amilase.

Neste estudo, a necessidade de uma combinação correta de adjuvantes para aumentar a a atividade herbicida do filtrado da cultura foi demonstrada. A fim de avaliar o efeito herbicida do caldo bruto de *Fusarium fujikuroi* em pós emergência inicialmente foram utilizadas plantas de *Cucumis sativus*. Foram realizados testes preliminares avaliando as melhores formulações descritas por Toderó et al., (2018b) e Daniel Jr. (2017), onde utilizaram óleo de palma, Span[®] 80 e Tween[®] 80 com diferentes níveis de Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo. A partir dos resultados obtidos neste primeiro teste foram avaliados os melhores resultados utilizando Tween[®] 80 juntamente com adjuvantes comerciais que foram utilizados em uma proporção de 0,1% V/V.

Ao testar diferentes concentrações de óleo de palma, Span[®] 80 e Tween[®] 80 com diferentes níveis de Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo, o tratamento que apresentou melhor resultado foi a formulação 3 (60%) com maior concentração de Tween[®] 80 e maior equilíbrio hidrófilo lipófilo. Segundo Weaver et al. (2009) o valor do EHL de um adjuvante pode aumentar a bioatividade de um bioherbicida e melhorar as propriedades químicas de uma formulação. Formulações com valores de EHL de médio a alto podem ser mais eficientes, já que são absorvidas e aumentam a hidratação da cutícula, favorecendo a permanência de herbicidas hidrofílicos sobre as folhas, o que aumenta a velocidade de difusão de herbicidas em um gradiente de concentração constante (Hess; Foy, 2000).

Na utilização dos produtos comerciais juntamente com o caldo bruto observa-se para ambos que o uso de apenas o adjuvante + caldo bruto não apresentou fitotoxicidade, porém ao

utilizar o adjuvante + Tween[®] 80 + caldo bruto todos apresentaram porcentagem de fitotoxicidade. Ao testar o potencial herbicida dos metabólitos de *Fusarium fujikuroi* em *Bidens pilosa* os resultados foram promissores. Testando os diferentes adjuvantes comerciais o Silwet L-77 apresentou maior compatibilidade com o caldo bruto, levando a lesões irreversíveis. Um bioherbicida em muitos casos não irá necessariamente causar o mesmo efeito que um herbicida químico, causando mortalidade nas plantas. No entanto, ele tem o potencial através da infecção e do retardo no crescimento de mudas de plantas daninhas para fornecer vantagem competitiva para as culturas (Hetherington et al., 2002).

5.2 CONCLUSÕES GERAIS

Com os resultados obtidos neste trabalho sobre a formulação e aplicação de metabólitos produzidos por *Fusarium fujikuroi* com ação bioherbicida foi possível concluir que:

- O fungo *Fusarium fujikuroi* pode ser considerado um bom produtor de exopolissacarídeos;
- A liofilização, as membranas e evaporação são tecnologias eficientes para concentração dos exopolissacarídeos;
- A concentração de exopolissacarídeos diminui a tensão superficial e conseqüentemente melhora a atividade herbicida;
- Nos testes realizados em pré emergência os resultados foram promissores uma vez que o caldo contendo *Fusarium fujikuroi* apresentou 100% de inibição na germinação em *Cucumis sativus*, *Bidens pilosa* e *Amaranthus retroflexus*;
- Quanto a embebição da semente todas as concentrações do caldo de *Fusarium fujikuroi* testadas mostraram inibição da embebição das sementes;
- Ao relacionar o efeito da atividade da α -amilase com a inibição de germinação concluiu-se que os resultados correlacionam a atividade herbicida do fungo com o efeito inibitório da α -amilase, onde o efeito dos metabólitos de *Fusarium fujikuroi* podem ser atribuídos à diminuição das atividades da α -amilase;
- O caldo bruto contendo metabólitos de *Fusarium fujikuroi* quando formulado utilizando junto com adjuvantes e Tween[®] 80 apresentou maior fitotoxicidade;
- E quando comparamos o Aureo e Silwet L-77 como adjuvante, o Silwet L-77 + o Tween[®] 80 apresentou melhor resultados quando utilizado com o caldo bruto.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Após o desenvolvimento dos experimentos propostos na Tese e das conclusões atingidas, a lista a seguir foi elaborada a fim incentivar novas pesquisas no assunto:

- Bioensaios em outras plantas daninhas;
- Testes como: Integridade da membrana e Peroxidação lipídica;
- Interação do bioherbicida e produto sintético;
- Aplicação em campo com testes nas culturas em soja, milho e trigo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELRASOUL, A. et al. The effect of contaminated particle sphericity and size on membrane fouling in cross flow ultrafiltration. **Environmental Technology**, v. 39, p. 203-220, 2017.
- ABOUZIENA, H. F; HAGGAG, W. M. Weed Control in Clean Agriculture: A Review - **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 34, n. 2, p. 377-392, 2016.
- ABU-DIEYEH, M. H.; SHAHEEN, I.; WATSON, A. K. Effect of plant age and turfgrass competition on the efficacy of the *Sclerotinia minor* granular bioherbicide on broadleaf plantain and prostrate knotweed. **Biocontrol Science Technology**, v. 20, n. 2, p. 213-226, 2010.
- ADEBAYO-TAYO, B.; ISHOLA, R.; OYEWUNMI, T. Characterization, antioxidant and immunomodulatory potential on exopolysaccharide produced by wild type and mutant *Weissella confusa* strains. **Biotechnology Reports**, v.19, e00271, 2018.
- ADEGAS, F. S. et al. Impacto econômico da resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil. **Circular Técnico**, Embrapa Londrina, PR, 2017.
- AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. Resistência de plantas daninhas a herbicidas. In: AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. (Ed.). Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil. Pelotas: Editora UFPel, p. 9-32, 2014.
- AHN, B. et al. Enhancement of *Colletotrichum coccodes* virulence by inhibitors of plant defense mechanisms. **Biocontrol Science Technology**, v. 15, p. 299-308, 2005.
- ARAÚJO, W. L. et al. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, n. 10, p. 4906-4914, 2002.
- ARNDT, B. et al. A Fungal N-Dimethylallyltryptophan metabolite from *Fusarium fujikuroi*. **ChemBioChem**, v. 18, p. 899-904, 2017.
- ASH, G. J. The science art business of successful bioherbicides. **Biological Control**, v. 52, p. 230-40, 2010.
- ATES, O. Systems Biology of Microbial Exopolysaccharides Production. **Front Bioeng Biotechnol**, v. 3, p. 1-16, 2015.
- AYBEKE, M. *Fusarium* infection causes genotoxic disorders and antioxidant-based damages in *Orobancha* spp. **Microbiological Research**, v. 201, p. 46-51, 2017.

- BAILEY K.L. The Bioherbicide Approach to Weed Control Using Plant Pathogens. In: Abrol, D.P., Ed., *Integrated Pest Management: Current Concepts and Ecological Perspectives*, Elsevier, San Diego, p. 245-266, 2014.
- BAILEY, K. L. Canadian innovations in microbial biopesticides. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 32, p. 113-121, 2010.
- BAILEY, K. L. Determining the infection process of *Phoma macrostoma* that leads to bioherbicidal activity on broadleaved weeds. **Biological Control**, v. 59, p. 268-276, 2011.
- BAILEY, K. L. et al. The effects of *Phoma macrostoma* on nontarget plant and target weed species. **Biological Control**, v. 58, 379-386, 2011.
- BAKER, R. W. et al. **Membrane separation systems**, Park Ridge, EUA, Noyes, 1991.
- BAKER, R. W. **Membrane technology and applications**. John Wiley & Sons, Ltd. Third Edition. Menlo Park, California. 2012. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9781118359686>> Acesso em: 17 nov. 2018.
- BAKR E. A new software for measuring leaf area, and area damaged by *Tetranychus urticae* Koch. **Journal of Applied Entomology**, v. 129, p.173-175, 2005.
- BALDASSO, C. **Concentração, purificação e fracionamento das proteínas do soro lácteo através da tecnologia de separação por membranas**. 2008. 179 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2008.
- BASTIAANS, L.; PAOLINI, R.; BAUMANN, D.T. Focus on ecological weed management: what is hindering adoption? **European Weed Research Society**, v. 48, p. 481-491, 2008.
- BASTOS, B.O. et al. Solid-state fermentation for production of a bioherbicide from *Diaporthe* sp. and its formulation to enhance the efficacy. **3Biotech**, v. 7, n. 2, p. 135, 2017.
- BASTRZYK, J.; GRYTA, M. Separation of post-fermentation glycerol solution by nanofiltration membrane distillation system. **Journal Desalination Water Treatment**, v. 53, p. 319-329, 2015.
- BORTOLUZZI, A.C. et al. Dairy wastewater treatment using integrated membrane systems. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, p. 4819-4827, 2017.
- BOURDOT, G. W. et al. *Chondrostereum purpureum* and *Fusarium tumidum* independently reduce regrowth in gorse (*Ulex europaeus*). **Biocontrol Science Technology**, v. 16, p. 307-327, 2006.
- BOWLING, A. J. et al. Immunohistochemical investigation of the necrotrophic phase of the fungus *Colletotrichum gloeosporioides* in the biocontrol of hemp sesbania (*Sesbania exaltata*; papilionaceae). **American Journal of Botany**, v. 97, p. 1915-1925, 2010.
- BOYETTE, C. D., HOAGLAND, R. E. Bioherbicidal potential of *Xanthomonas campestris* for controlling *Conyza canadensis*. **Biocontrol Science Technology**, v. 25, n. 2, p. 229-237, 2015.
- BOYETTE, C. D.; HOAGLAND, R. E. Biological control of hemp sesbania (*Sesbania exaltata*) and sicklepod (*Senna obtusifolia*) in soybean with anthracnose pathogen mixtures. **Weed Technology**, v. 24, p. 551-556, 2010.
- BOYETTE, C.D. et al. Redvine (*Brunnichia ovata*) and trumpetcreeper (*Campsis radicans*) controlled under field conditions by a synergistic interaction of the bioherbicide, *Myrothecium verrucaria*, with glyphosate. **Weed Biology and Management**, v. 8, p. 39-45, 2008.

- BRANS, G. et al. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. **Journal of Membrane Science**, v. 243, n. 2, p. 263-272, 2004.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Secretaria de Defesa Agropecuária**. – Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.
- BRUN, T. et al. Production of bioherbicide by *Phoma* sp. in a stirred-tank bioreactor. **3Biotech**, v. 6, n. 2, p. 230, 2016.
- CARBONARI, C. A. et al. Efeito de surfactantes e pontas de pulverização na deposição de calda de pulverização em plantas de grama-seda. **Planta Daninha**, v. 23, n. 4, p. 725-729, 2005.
- CARNIEL, N. et al. Desolventizing of *Jatropha curcas* oil from azeotropes of solvents using ceramic membranes. **Environmental Technology**, v. 38, p. 2928-2938, 2017.
- CARPENTER, J. F./ IZUTSU, K.; RANDOLPH, T. W. Freezing- and drying-induced perturbations of protein structure and mechanisms of protein protection by stabilizing additives, **Freezing-Drying / Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products**, edited by Louis Rey, 1999.
- CARVALHO, L. B. de. **Plantas Daninhas**. Lages, SC, 2013, 82 p.
- CARVALHO, L. B. **Herbicidas**. 1. ed., Lages, SC, 2013. 62 p.
- 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.
- CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAÚJO, A. R. Fungos endofítios: Uma fonte inexplorável e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, 2013.
- CHARUDATTAN, R. Biological control of weeds by means of plant pathogens: Significance for integrated weed management in modern agro-ecology. **BioControl**, v. 46, p. 229-260, 2001.
- CHARUDATTAN, R. The Mycoherbicide Approach with Plant Pathogens. **Microbial Control of Weeds**, p. 24-57, 1991.
- CHEN, L. et al. Production, structure and morphology of exopolysaccharides yielded by submerged fermentation of *Antrodia cinnamomea*. **Carbohydrate Polymers**, v. 205, p. 271-278, 2019.
- CHEN, Y. et al. Structural characterization and antioxidant properties of an exopolysaccharide produced by the mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. Y16. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8179-8184, 2011.
- CHERYAN, M. **Ultrafiltration and Microfiltration Handbook**. Lancaster: Technomic Publishing Company, Illinois, 1998. 552 p.
- CHIKOWO, R. et al. Integrated Weed Management systems allow reduced reliance on herbicides and long-term weed control. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 132, p. 237-242, 2009.
- CHOUDHURY, P. P. et al. **Herbicide Use in Indian Agriculture**. ICAR-Directorate of Weed Research, Jabalpur, Madhya Pradesh, India, 2016, 110 p.
- CHRISTOFFOLETI, P. J. et al. **Aspectos de Resistência de Plantas Daninhas a Herbicidas**. 4 ed. Piracicaba: Associação Brasileira de Ação a Resistência de Plantas aos Herbicidas-HARAC-BR, 2016, p. 262.

- CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Resistência das plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P. J. (Coord.). **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 3º ed. Piracicaba: HRAC-BR, p. 3-30, 2008.
- COOK, J. C. et al. Effects of *Alternaria destruens*, glyphosate, and ammonium sulfate individually and integrated for control of dodder (*Cuscuta pentagona*). **Weed Technology**, v. 23, p. 550-555, 2009.
- CORDEAU, S. et al. Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. **Crop Protection**, v. 87, p. 44-49, 2016.
- COSTA, N. V. et al. pH foliar e deposição de gotas de pulverização em plantas daninhas aquáticas: *Brachiaria mutica*, *Brachiaria subquadripara* e *Panicum repens*. **Planta Daninha**, v. 23, n. 2, p. 295-304, 2005.
- DANIEL Jr, J.J. **Seleção de fungos visando a produção de um bioherbicida para o controle de *Conyza* sp.** 2017. 77. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Santa Maria. RS, 2017.
- DANIEL Jr., J. J. et al. *Fusarium fujikuroi*: A novel source of metabolites with herbicidal activity. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 314-320, 2018.
- DATTA, A. et al. Managing weeds using crop competition in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Crop Protection**, v. 95, p. 60-68, 2017.
- DAYAN, F. E.; DUKE, S. O. Natural compounds as next-generation herbicides. **Plant Physiology**, v. 166, p. 1090-1105, 2014.
- DIAZ, R. et al. Successful biological control of tropical soda apple (*Solanales: Solanaceae*) in Florida: a review of key program components. **Florida Entomological Society**. v. 97, n. 1, p. 179-190, 2014.
- DURIGAN, J. C.; CORREIA, N. M. **Efeito de adjuvantes na aplicação e eficácia de herbicidas**. In: Leandro Vargas; Erivelton Scherer Roman (in memoriam). (Org.). Manual de manejo e controle de plantas daninhas. 1ed., p. 133-171, 2008.
- ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004, 510 p.
- FAHAD, S. et al. Weed growth and crop yield loss in wheat as influenced by row spacing and weed emergence times. **Crop Protection**, v. 71, p. 101-108, 2015.
- FORNELLS, E. et al. Membrane assisted and temperature controlled on-line evaporative concentration for microfluidics. **Journal of Chromatography A**, v. 1486, p. 110-116, 2017.
- FORTE, C. T. et al. Habilidade competitiva de cultivares de soja transgênica convivendo com plantas daninhas. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. SN (on line) 1981-0997, v.12, n.2, p.185-193. Recife, PE, UFRPE, 2017.
- FRANCISCHINI, A.C. et al. Resistance of *Amaranthus retroflexus* to acetolactate synthase inhibitor herbicides in Brazil. **Planta Daninha**, v. 32, n. 2, p. 437-446, 2014.
- FRANS, R.; CROWLEY, H. Experimental design and techniques for measuring and analyzing plant responses to weed control practices. In: **Southern Weed Science Society. Research methods in weed science**, Clemson, 3ª ed., p 29-45, 1986.
- FREITAS, F. et al. Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1674-1683, 2017.

- GALON, L. et al. Biological weed management – A short review, **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 15, n. 1, p. 116-125, 2016.
- GARCÍA, L. F.; BLANCO, S. Á.; RODRÍGUEZ, F. A R. Microfiltration applied to dairy streams: removal of bacteria. **Journal Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 187-196, 2013.
- GENG, Z. et al. Recent advances in genes involved in secondary metabolite synthesis, hyphal development, energy metabolism and pathogenicity in *Fusarium graminearum* (teleomorph *Gibberella zae*). **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 390-402, 2014.
- GERKE, I. B. B. **Extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) clarificado: extração em batelada e processamento por membranas**. 2016. 85 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.
- GHARDE, Y. et al. Assessment of yield and economic losses in agriculture due to weeds in India. **Crop Protection**, v. 107, p. 12-18, 2018.
- GHORBANI, R.; LEIFERT, C.; SEEL, W. Biological control of weeds with antagonistic plant pathogens. **Advances in Agronomy**, v. 86, p.191-225, 2005.
- GLARE, T. et al. Have biopesticides come of age? **Trends Biotechnology**, v. 30, p. 250-258, 2012.
- GONÇALVES NETTO, A. et al. Multiple resistance of *Amaranthus palmeri* to ALS and EPSPS inhibiting herbicides in the state of Mato Grosso, Brazil. **Planta Daninha**, v.34, n. 3, 2016.
- GÓRSKA S. et al. Chemical characterization and immunomodulatory properties of polysaccharides isolated from probiotic *Lactobacillus casei* LOCK 0919. **Glycobiology**, v. 26, p. 1014-1024, 2016.
- GUETSKY, R. et al. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. **Phytopathology**, v. 92, n. 09, p. 976-985. 2002.
- HABERT, A. C., BORGES, C. P., NOBREGA, R., **Processos de separação com membranas**. Série Escola Piloto de Engenharia Química, Ed. E-papers, UFRJ/COPPE, Rio de Janeiro, 2006. 180 p.
- HEAP, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponível em: <<http://www.weedscience.org>>. Acesso em: 28/10/2018.
- HELDMAN, D. R.; LUND, D. B. **Handbook of Food Engineering**. 2ª edição. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2007. 1040 p.
- HERAUX, F. M. G.; HALLETT, S. G.; WELLER, S. G. Combining *Trichoderma virens*-inoculated compost and a rye covercrop for weed control in transplanted vegetables. **Biological Control**, v. 34, p. 21-26, 2005.
- HESS, F. D.; FOY, C. L. Interaction of surfactants with plant cuticles. **Weed Technology**, v. 14, p. 807-813, 2000.
- HESS, F.D. **Adjuvants**. In: HERBICIDE ACTION COURSE, West Lafayette: Purdue University, p. 38-61, 1997.
- HILÁRIO, F. et al. Antimicrobial screening of endophytic fungi isolated from the aerial parts of *Paepalanthus chiquitensis* (Eriocaulaceae) led to the isolation of secondary metabolites produced by *Fusarium fujikuroi*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 1389-1395, 2017.

- HINZ, H. L. et al. Successes we may not have had: a retrospective analysis of selected weed biological control agents in the United States. **Invasive Plant Science and Management**, v. 7, n. 4, p. 565-579, 2014.
- HOAGLAND R.E.; BOYETTE C.D.; ABBAS H.K. *Myrothecium verrucaria* isolates and formulations as bioherbicide agents for kudzu. **Biocontrol Sci. Technol.** v. 17, n. 7, p. 721-731, 2007.
- HOAGLAND, R. E.; TEASTER, N. D.; BOYETTE, C. D. Bioherbicidal effects of *Myrothecium verrucaria* on glyphosateresistant and-susceptible *Palmer amaranth* biotypes. **Allelopathy Journal**, v. 31, n. 2, p. 367-376, 2013.
- HU, Y. et al. High efficiency transport of quantum dots into plant roots with the aid of silwet L-77. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 703-709, 2010.
- HUBBARD, M.; HYNES, R. K.; BAILEY, K. L. Impact of macrocidins, produced by *Phoma macrostoma*, on carotenoid profiles of plants. **Biological Control**, v. 89, p. 11-22, 2015.
- IBARZ, A.; BARBOSA-CANOVAS, G. V. **Deshidratación y Operaciones Unitarias en la Ingeniería de Alimentos**, Lancaster, Basel, 1999.
- IVANOVA, N. A.; KUBOCHKIN, N. S.; STAROV, V. M. Wetting of hydrophobic substrates by pure surfactants at continuously increasing humidity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 519, p. 71-77, 2017.
- JENNINGS, J. C. et al. Induction of ethylene biosynthesis and necrosis in weed leaves by a *Fusarium oxysporum* protein. **Weed Science**, v. 48, n. 1, p. 7-14, 2000.
- JIANG, S.J. et al. Isolation and phytotoxicity of a metabolite from *Curvularia eragrostidis* and characterisation of its modes of action. **Annals of Applied Biology**, v. 152, p. 103-111, 2008.
- KATO-NOGUCHI, H.; INO, T.; KUJIME, H. The relation between growth inhibition and secretion level of momilactone B from rice root. **Journal of Plant Interactions**, v. 5, p. 87-90, 2010.
- KELLER, N.P.; TURNER, G.; BENNETT, J.W. Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**. p. 937-947, 2005.
- KIRKWOOD, R. C. Use and mode of action of adjuvants for herbicides: a review of some current work. **Pesticide Science**, v. 38, p. 93-102, 1993.
- KISSMANN, K.G. **Adjuvantes para caldas de produtos fitossanitários**. In: GUEDES, J. V. C. & DORNELES, S. B. (Org.). *Tecnologia e segurança na aplicação de agrotóxicos: novas tecnologias*. Santa Maria: Departamento de Defesa Fitossanitária; Sociedade de Agronomia de Santa Maria, p. 39-51, 1998.
- KLAIC, R. et al. A novel combined mechanical-biological approach to improve rock phosphate solubilization. **International Journal of Mineral Processing**, v. 161, p. 50-58, 2017.
- KLAIC, R. **Produção de bioherbicida por processos fermentativos a partir do fungo *Phoma* sp.** 2014. 90 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade Federal de Santa Maria, 2014.
- KORRES, N. E. **Agronomic Weed Control: A Trustworthy Approach for Sustainable Weed Management**. University of Arkansas, Fayetteville, AR, United States. *Non-Chemical Weed Control*, cap 6, p. 97-114, 2018.
- LAMICHHANE, J.R. et al. Challenges and opportunities for integrated pest management in Europe: a telling example of minor uses. **Crop Protection**, v.74, p. 42-47, 2015.

- LAOSINWATTANA, C.; WICHITTRAKARN, P.; TEERARAK, M. Chemical composition and herbicidal action of essential oil from *Tagetes erecta* L. leaves. **Industrial Crops & Products**, v. 126, p. 129-134, 2018.
- LEE, H. B. et al. Evaluation of a fungal strain, *Myrothecium roridum* F0252, as a bioherbicide agent. **The Plant Pathology Journal**, v. 24, n. 4, p. 453-460, 2008.
- LEUNG, M. Y. K. et al. Polysaccharide biological response modifiers. **Immunology Letters**, v. 105, p. 101-114, 2006.
- LI, S. et al. Phytotoxic and Antibacterial Metabolites from *Fusarium proliferatum* ZS07 Isolated from the gut of long-horned grasshoppers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 8997-9001, 2014.
- LI, Y. et al. Research progress on microbial herbicides. **Crop Protection**, v.22, p. 247-252, 2003.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350-382, 1987.
- LIU, J. et al. Recent advances in endophytic exopolysaccharides: production, structural characterization, physiological role and biological activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1113-1124, 2017.
- MACIEL, C. G. ***Fusarium sambucinum* associado a sementes de *Pinus elliottii*: patogenicidade, morfologia, filogenia molecular e controle**. 2012. 93p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Centro de Ciências Rurais. Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2012.
- MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Optimization of a bioactive exopolysaccharide production from endophytic *Fusarium solani* SD5. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, p. 627-634, 2013.
- MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Production and structural elucidation of exopolysaccharide from endophytic *Pestalotiopsis* sp. BC55. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82 p. 182-191, 2016.
- MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Structural elucidation and bioactivity of a novel exopolysaccharide from endophytic *Fusarium solani* SD5. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 683-689, 2012.
- MARINHO, G. et al. Potential of the filamentous fungus *Aspergillus niger* AN 400 to degrade atrazine in wastewaters. **Biocatalysis Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 162-167, 2017.
- MARNETT, L. J. 1999. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. **Mutation Research**, v. 424, p. 83-95, 1999.
- MASANGKAY, R. F. et al. Factors influencing biological control of *Sphenoclea zeylanica* with *Alternaria alternata* f. sp. sphenocleae. **Plant Disease**, v. 83, p. 1019-1024, 1999.
- MCDougALL, P. The global agrochemical market in 2010 – preliminary 275 review. 2014. Disponível em: <<http://www.phillipsmcdougall.com>>. Acesso em: 14 nov. 2018
- MENDONÇA, C. G.; RAETANO, C. G. Tensão superficial estática de soluções aquosas com óleos minerais e vegetais utilizados na agricultura. **Engenharia Agrícola**, v. 27, n. especial, p. 16-23, 2007.
- MICHEL, A. et al. Mobility of a polyether trisiloxane surfactant in soil: soil/water distribution coefficients and leaching in a soil column. **Water, Air, Soil Pollution**, v. 227, p. 1-11, 2016.

- MITCHELL, J. K. et al. The interaction of two potential fungal bioherbicides and a sub-lethal rate of glyphosate for the control of shattercane. **Biological Control**, v. 46, p. 391-399, 2008.
- MMANYWA, M. S. ; WANG, G. Production of Exopolysaccharides from Submerged Culture of *Antrodia Camphorata* S-29. **Journal of Natural Sciences Research**, v. 7, p. 1-7, 2017.
- MONQUERO, P.A. **Aspectos da biologia e manejo das plantas daninhas**. São Carlos: RiMa Editora, 2014. 430 p.
- MONTÓRIO, G.A.; VELINI, E.D. Definição de um coeficiente de eficácia para estudo de tensão superficial com surfactantes siliconados e não siliconados. **Scientia Agrária Paranaensis**, v.3, n.1, p.26-34, 2004.
- MORAN, P.J. Leaf scarring by the weevils *Neochetina eichhorniae* and *N. Bruchi* enhances infection by the fungus *Cercospora piaropi* on water hyacinth, *Eichhornia crassipes*. **Biological Control**, v. 50, p. 511-524, 2005.
- MORANDI, M.A.B; BETIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Orgs). Biocontrole de doenças em plantas: uso e perspectivas. Jaquariúna: EMBRAPA Meio Ambiente. p.7-14, 2009.
- MORIN, L.; GIANOTTI, A. F.; LAUREN, D. R. Trichothecene production and pathogenicity of *Fusarium tumidum*, a candidate bioherbicide for gorse and broom in New Zealand. **Mycological Research**, v. 104, n. 8, p. 993-999, 2000.
- MORTENSEN, D. A. et al. Navigating a critical juncture for sustainable weed management. **Bioscience**, v. 62, p. 75-84, 2012.
- MOTLAGH, M. R. S. Evaluation of *Alternaria alternata* causing leaf spot of barnyardgrass grown in rice fields. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 21, p. 4481-4488, 2012.
- MOTLAGH, M. R. S. Evaluation of *Epicoccum purpurascens* as biological control agente of *Echinochloa* spp. in rice fields. **Journal of Food Agriculture and Environment**, v. 9, n. 1, p. 394-397, 2011.
- MOURA, J.M.L.N. **Degomagem de óleo de soja bruto através de ultrafiltração**. 2002. 88 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- MULDER, M. **Basic Principles of Membrane Technology**. 2 Ed. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 564 p. 1996.
- NETLAND, J. et al. Biological control of *Chenopodium album* L. in Europe. **Biological Control**, v. 46, p. 175-196, 2001.
- NICOLAUS, B.; KAMBOUROVA, M.; ONER, E. T. Exopolysaccharides from extremophiles: From fundamentals to biotechnology. **Environmental Technology**, v. 31, p. 1145-1158, 2010.
- OERKE, E. C. Crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science**, v. 144, n. 1, p. 31-43, 2006.
- OLIVEIRA, M. F. de; BRIGHENTI, A. Comportamento dos Herbicidas no Ambiente. In: Rubem Silvério de Oliveira Júnior, Jamil Constantin, Miriam Hiroko Inoue. (Org.). **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**. 1 ed. Maringá, PR: Omnipax, v. 1, p. 263-304, 2011.
- OMER, Z. S. et al. Bacteria considered as biocontrol agents to control growth of white clover on golf courses. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science**, v. 60, p. 193-198, 2010.

- ORLANDELLI, R. C. et al. β -(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6) -d-glucans produced by *Diaporthe* sp. endophytes: Purification, chemical characterization and antiproliferative activity against MCF-7 and Hep G2-C3A cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 431-437, 2017.
- ORTIZ-RIBBING, L.; WILLIAMS, M. M. Potential of *Phomopsis amaranthicola* and *Microsphaeropsis amaranthi*, as bioherbicides for several weedy *Amaranthus* species. **Crop Protection**, v. 25, p. 39-46, 2006.
- OSIŃSKA-JAROSZUK, M, et al. Extracellular polysaccharides from Ascomycota and Basidiomycota: production conditions, biochemical characteristics, and biological properties. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 1823-1844, 2015.
- ÖZCAN, E.; SARGINA, S.; GÖKSUNGUR, Y. Comparison of pullulan production performances of air-lift and bubble column bioreactors and optimization of process parameters in air-lift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 92, p. 9-15, 2014.
- PACHECO-RUIZ, S.; HEAVEN, S.; BANKS, C. J. Effect of mean cell residence time on transmembrane flux, mixed-liquor characteristics and overall performance of a submerged anaerobic membrane bioreactor. **Environmental Technology**, v. 38, p. 1263-1274, 2017.
- PANNACCI, E.; LATTANZI, B.; TEI, F. Non-chemical weed management strategies in minor crops: A review. **Crop Protection**, v. 96, p. 44-58, 2017.
- PEARSON, K. A. et al. Characterisation and pathogenicity of *Fusarium* taxa isolated from ragwort (*Jacobaea vulgaris*) roots. **Fungal Ecology**, v. 20, p. 186-192, 2016.
- PENG, G.; BOYETCHKO, S. M. Effect of variable dew temperatures on infection of green foxtail by *Pyricularia setariae*, *Drechslera gigantea*, and *Exserohilum rostratum*. **Biological Control**, v. 39, p. 539-546, 2006.
- PES, M. P. et al. Bioherbicide based on *Diaporthe* sp. secondary metabolites in the control of three tough weeds. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 42, p. 4242–4249, 2016.
- PESSOA JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Barueri, SP: Manole, 2005. 444 p.
- PHATTANAWASIN, P. et al. Screening of Fungal Extracts for Weed Germination and Growth Inhibitory Activity. **Silpakorn University International Journal**, v. 6, n. 1/2, p. 136-144, 2006.
- PITELLI, R. L. C. M.; AMORIM, L. Effects of different dew periods and temperatures on infection of *Senna obtusifolia* by a Brazilian isolate of *Alternaria cassiae*. **Biological Control**, v. 28, p. 237-242, 2003.
- PIYABOON, O. et al. Pathogenicity, host range and activities of a secondary metabolite and enzyme from *Myrothecium roridum* on water hyacinth from Thailand. **Weed Biology and Management**, v. 16, p. 132-144, 2016.
- POOLE, M. L.; GILL, G. S. Competition between crops and weeds in southern Australia. **Plant Protection Quarterly**, v. 2, p. 86-96, 1987.
- POONPAIBOONPIPAT, T. et al. Phytotoxic effects of essential oil from *Cymbopogon citratus* and its physiological mechanisms on barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 403-407, 2013.

- PRADEEP, F. S. et al. Larvicidal activity of a novel isoquinoline type pigment from *Fusarium moniliforme* KUMBF1201 against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1479-1486, 2015.
- RADHAKRISHNANA, R.; ALQARAWIB, A. A.; ALLAHB, E. F. A. Bioherbicides: Current knowledge on weed control mechanism - **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 158, p. 131-138, 2018.
- RANA, S. S.; RANA, M.C. **Principles and Practices of Weed Management**. Department of Agronomy, College of Agriculture, CSK Himachal Pradesh Krishi Vishvavidyalaya, Palampur. 2016. 138 p.
- RAY, P.; VIJAYACHANDRAN, L. S. Evaluation of indigenous fungal pathogens from horse purslane (*Trianthema portulacastrum*) for their relative virulence and host range assessments to select a potential mycoherbicidal agent. **Weed Science**, v. 61, p. 580-585, 2013.
- SADASIVAM, S.; MANICKAM, A. **Biochemical Methods**. New Age International (P) Ltd, Publishers, Tamil Nadu, 1996, 272 p.
- SALLET, D. et al. Obtaining fatty acids from *Mortierella isabellina* using supercritical carbon dioxide and compressed liquefied petroleum gas. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 122, p. 79-87, 2017.
- SAMPAIO, R. M. **Controle Biológico: tecnologias na construção de oportunidades no Brasil - Análises e Indicadores do Agronegócio**. ISSN 1980-0711, v. 13, n. 3, 2018.
- SARDANA, V. et al. Role of competition in managing weeds: An introduction to the special issue. **Crop Protection**. v. 95, p. 1-7, 2017.
- SCHNICK, P.; BOLAND, G. J. 2,4-D and *Phoma herbarum* to control dandelion (*Taraxacum officinale*). **Weed Science**, v. 52, p. 808-814, 2004.
- SCOTT, P. **Physiology and Behaviour of Plants**. John Wiley and Sons, Hoboken, USA, 2008, 305p.
- SCRIVANTI, L. R.; ZUNINO, M. P.; ZYGADLO, J. A. *Tagetes minuta* and *Shinus arera* essential oils as allelopathic agents. **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 31, p. 563-572, 2003.
- SEADER, J. D.; HENLEY, E. J.; ROPER, D. K. **Separation Process Principles: Chemical and Biochemical Operations**. 3ª edição. Estados Unidos: John Wiley & Sons, 2010. 848 p.
- SELIM, K. A. et al. Biology of Endophytic Fungi. **Current Research in Environmental and Applied Mycology**, v. 2, n. 1, p. 31-82, 2012.
- SHEN, S. et al. The current status of biological control of weeds in southern China and future options. **Acta Ecologica Sinica**, v. 38, p. 157-164, 2018.
- SIDDIQUE, M. H. Study of the biosynthesis pathway of the geosmin in *Penicillium expansum*. **Institut National Polytechnique de Toulouse**, Laboratoire de Engenharia Química, França. 2012. 129p.
- SILVA, A. A.; SILVA, J. F. **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. UFV: Viçosa, 2007. 367 p.
- SILVA, C. et al. Interferência de plantas daninhas na cultura do sorgo sacarino. **Bragantia**, v. 73, n. 4, p. 438-445, 2014.
- 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.
- SKIPP, R. A. et al. *Verticillium dahliae* and other pathogenic fungi in *Cirsium arvense* from New Zealand pastures: occurrence, pathogenicity and biological control potential. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 56, n. 1, p. 1-21, 2013.
- SMITH, D. A.; HALLETT, S. G. Variable response to glyphosate in common waterhemp from different parts of the midwestern USA. **Weed Technology**, v. 20, p. 18-23, 2006.
- SO'AIB, M.S. et al. Xanthan gum recovery from palm oilbased fermentation broth by hollow fibre microfiltration (MF) membrane with process optimisation using Taguchi method. **Chemical Biochemical Engineering Quarterly**, v. 27, p. 145-56, 2013.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS-SBCPD. **Procedimentos para instalação, avaliação e análise de experimentos com herbicidas**. p. 42, 1995.
- SOUZA, A. R. C. et al. Bioherbicide production by *Diaporthe* sp. isolated from the Brazilian Pampa biome. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 575-578, 2015.
- SOUZA, A. R. C. et al. Selection, isolation, and identification of fungi for bioherbicide production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 101-108, 2017.
- STEWART-WADE, S. M.; LAWRIE, A. C.; BRUZZESE, E. An Australian isolate of *Alternaria crassa* shows potential as amycoherbicide to control the weed *Datura stramonium*. **Australasian Plant Pathology**, v. 27, p. 186-197, 1998.
- STIPANOVIC R. D. et al. Phytotoxicity of fusaric acid and analogs to cotton. **Toxicon**, v. 57, p. 176-178, 2017.
- STREK, H.J. Herbicide resistance. What have we learned from other disciplines? **Journal of Chemical Biology**, v. 7, p. 129-132, 2014.
- SURYANARAYANAN, T. S. et al. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, v. 23, p. 9-19, 2009.
- TANGUY, G. et al. Concentration of dairy products using a thin film spinning cone evaporator. **Journal of Food Engineering**, v.166, p. 356-363, 2015.
- TASKIN, M.; ERDAL, S.; CANLI, O. Utilization of waste loquat (*Eriobotrya Japonica* Lindley) kernels as substrate for scleroglucan production by locally isolated *Sclerotium rolfsii*. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, p. 1069-1075, 2010.
- TESSMANN, D. J.; CHARUDATTAN, R.; PRESTON, J. F. Variability in aggressiveness, cultural characteristics, cercosporin production and fatty acid profile of *Cercospora piaropi*, a biocontrol agent of water hyacinth. **Plant Pathology**, v. 57, p. 957-966, 2008.
- THOMAS, H. *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras*, a potential mycoherbicide, parasitizes seeds of *Orobanche cumana* (sunflower Broomrape): a cytological study. **Annals of Botany**, v. 83, p. 453-458, 1999.
- TODERO, I. et al. Concentration of metabolites from *Phoma* sp. using microfiltration membrane for increasing bioherbicidal activity. **Environmental Technology**, v, 40, p. 2364-2372, 2018.
- TODERO, I. et al. Formulation of a bioherbicide with metabolites from *Phoma* sp. **Scientia Horticulturae**, v, 241, p. 285-292, 2018.

- TREMACOLDI, C. R.; SOUZA FILHO, A. P. S. **Toxinas produzidas por fungos fitopatógenos: possibilidade de uso no controle de plantas daninhas.** Belém PA: Embrapa Amazônia Oriental, (Documentos, 274). 2006. 24 p.
- UKALE, D. U. et al. Metabolic analysis of liquid formulations of organic manures and its influence on growth and yield of *Solanum lycopersicum* L. (tomato) crop in field. **Biocatalysis Agricultural Biotechnology**, v. 8, p. 50-54, 2016.
- VAREJÃO, E. V. V. et al. Phytotoxic Effects Of Metabolites From *Alternaria euphorbiicola* Against Its Host Plant *Euphorbia heterophylla*. **Quimica Nova**, v. 36. n.7, p. 1004-1007, 2013.
- VIEIRA, A. P.; NICOLETI, J. F.; TELIS, V. R. N. Liofilização de fatias de abacaxi: avaliação da cinética de secagem e da qualidade do produto – **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 50-58, 2012.
- VIKRANT, P. et al. Characterization of a phytotoxin from *Phoma herbarum* for management of *Parthenium hysterophorus* L. **Journal Phytopathology**, v. 154, p. 461-468, 2006.
- VILLAVERDE, J. J. et al. Biopesticides in the framework of the European pesticide regulation (EC) No. 1107/2009. **Pest Management Science**, v. 70, n. 1, p. 2-5, 2014.
- VINING, L.C. Functions of secondary metabolites. **Annual Review of Microbiology**, v.44, p. 395-427, 1990.
- VOGELGSANG, S.; WATSON, A. K.; DI-TOMMASO, A. Effect of moisture, inoculum production, and planting substrate on disease reaction of field bindweed (*Convolvulus arvensis* L.) to the fungal pathogen, *Phomopsis convolvulus*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 104, p. 253-262, 1998.
- WANG, D. et al. Efficient production of pullulan using rice hull hydrolysate by adaptive laboratory evolution of *Aureobasidium pullulans*. **Bioresource Technology**, v. 164, p. 12-19, 2014.
- WANG, D. et al. The mechanism of improved pullulan production by nitrogen limitation in batch culture of *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 325-331, 2015.
- WAN-MOHTAR, W. A. A. Q. I. et al. Exopolysaccharide production by *Ganoderma lucidum* immobilised on polyurethane foam in a repeated-batch fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, p. 24-31, 2016.
- WARD, O. P. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1119-1139, 2012.
- WEAVER, M. A. et al. Improved bioherbicidal efficacy by *Myrothecium verrucaria* via spray adjuvants or herbicide mixtures. **Biological Control**, v. 50, p. 150-156, 2009.
- WEED SCIENCE - **International Survey Of Herbicide Resistant Weeds**. Disponível em: <<http://weedscience.org/summary/species.aspx>>. Acesso em: 17 outubro. 2016.
- WILLIAMS, K. **Lyophilization, evaporation or concentration: Which is best for my samples?** 2016. Disponível em <https://www.labconco.com/articles/lyophilization-concentration-or-evaporation-whic>, acessado em 09 de nov. 2018.
- WU, J. et al. Herbicidal Spectrum, Absorption and Transportation, and Physiological Effect on *Bidens pilosa* of the Natural Alkaloid Berberine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 30, p. 6100-6113, 2017.

WU, S.; CHEN, J.; PAN, S. Optimization of fermentation conditions for the production of pullulan by a new strain of *Aureobasidium pullulans* isolated from sea mud and its characterization. *Carbohydrate Polymers*, v. 87, p. 1696-1700, 2012.

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

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

ZHU, Y.; QIANG, S. Isolation, pathogenicity and safety of *Curvularia eragrostidis* isolate QZ-2000 as a bioherbicide agent for large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*). **Biocontrol Science Technology**, v. 14, n. 8, p. 769-782, 2004.