

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

Izelmar Todero

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOHERBICIDA A PARTIR DE
METABÓLITOS DE *PHOMA* sp. PARA O MANEJO DE PLANTAS
DANINHAS**

Santa Maria, RS
2017

Izelmar Todero

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOHERBICIDA A PARTIR DE
METABÓLITOS DE *PHOMA* sp. PARA O MANEJO DE PLANTAS
DANINHAS**

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

Orientador: Prof. Drº. Marcio Antonio Mazutti

Santa Maria, RS
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Todero, Izelmar
CONCENTRAÇÃO E FORMULAÇÃO DE UM HERBICIDA A PARTIR DE
PHOMA sp. / Izelmar Todero.- 2017.
78 p.; 30 cm

Orientador: Marcio Antonio Mazutti
Coorientadores: Jerson Vanderlei Carús Guedes, Marcus
Vinícius Três

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Agrícola, RS, 2017

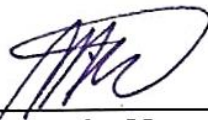
1. Produção de Bioherbicida por rotas biológicas 2.
Purificação e concentração de moléculas 3. Microrganismo
4. Phoma sp. 5. Efeito fitotóxico I. Mazutti, Marcio
Antonio II. Guedes, Jerson Vanderlei Carús III. Três,
Marcus Vinícius IV. Título.

Izelmar Todero

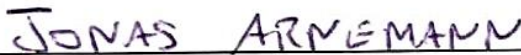
**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOHERBICIDA A PARTIR DE
METABÓLITOS DE *PHOMA* sp. PARA O MANEJO DE PLANTAS
DANINHAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Área de concentração Engenharia Agroambiental da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Agrícola**.

Aprovado em 02 de Março de 2017:



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



Jonas Arnemann, Dr.(UFSM)



Leandro Galon, D. Sc (UFFS)

Santa Maria, RS
2017

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais, Domingos e Lourena, e minha família, que me incentivaram e me apoiaram durante toda esta trajetória.

A minha namorada, 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.

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.

Ao grupo de pesquisa do Professor Marcio Antonio Mazutti e do Professor Jerson Vanderlei Carús Guedes, pela realização dos testes biológicos para avaliação da atividade bioherbicida.

Aos demais professores do programa de mestrado em Engenharia Agrícola, que também contribuíram para a formação profissional.

Aos amigos do Laboratório Biotec Factory e Labmip, 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.

“Que vossos esforços desafiam as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.

Charles Chaplin

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOHERBICIDA A PARTIR DE METABÓLITOS DE PHOMA sp. PARA O MANEJO DE PLANTAS DANINHAS

AUTOR: Izelmar Todero
ORIENTADOR: Marcio Antonio Mazutti

As plantas daninhas são um dos principais problemas enfrentados pelos agricultores, pois estas são responsáveis por grandes perdas agrícolas. O principal método de controle é o químico com uso de herbicidas. Embora eficientes quando usados em doses não recomendadas ou de forma inadequada têm promovido contaminação ambiental, de animais, intoxicação de agricultores, resíduos em alimentos, surgimento de biótipos resistentes, dentre outros. Buscando alternativas de controle menos agressivos a utilização de um produto formulado a partir de microrganismos, principalmente fungos se torna uma ferramenta importante junto à área de proteção de plantas e ao controle biológico. Desta maneira o presente trabalho teve como objetivo concentrar e formular um bioherbicida a base de *Phoma* sp. com efeito sobre planta bioindicadora e plantas daninhas. Os experimentos foram divididos em três etapas. Na 1ª etapa, foi realizada a purificação e concentração do caldo fermentado através de membranas poliméricas, nesta etapa para a análise do potencial fitotóxico foram utilizadas folhas destacadas de *Cucumis sativus*. Na 2ª etapa, utilizou-se a melhor condição da 1ª etapa para avaliar diferentes formulações contendo óleo de palma, Span®80 e Tween®80, com o objetivo de aumentar a fitotoxicidade, aplicando-se os produtos em pós-emergência sobre *C. sativus*. A 3ª etapa avaliou-se a fitotoxicidade em plantas daninhas em pré e pós-emergência. Em pré-emergência os testes foram realizado em câmara de BOD e em substrato na espécie de *Amaranthus retroflexus*. Para isso foi utilizada a melhor condição da 1ª etapa. Em pós-emergência utilizou-se a formulação que apresentou melhor resultado na 2ª etapa e também as condições com diferentes concentrações de óleo, sendo os testes realizados em três espécies: *A. retroflexus*, *Bidens pilosa* e *Conyza canadensis*. Os resultados obtidos para avaliação primária demonstraram que a concentração das moléculas foi eficiente em 30% do caldo retido, apresentando maior efeito nas folhas destacadas de *C. sativus*. Na 2ª etapa, a formulação 6, o qual apresenta para 10g de formulado 0,82g óleo de palma, 0,0576g Span®80, 0,2224g Tween®80 e 8,9g de caldo, apresentou maior fitotoxicidade em *C. sativus*. Na 3ª etapa a aplicação em pré emergência de caldo retido em 30% não deixou ocorrer a germinação de *A. retroflexus* tanto em câmara de BOD quanto em substrato. Em pós-emergência a formulação 6 apresentou diferença da formulação 3 e 15 com maior efeito fitotóxico nas plantas daninhas, destacando-se mais para *A. retroflexus*. *Phoma* sp. apresenta ação bioherbicida em pré-emergência e pós-emergência e a adição de um adjuvante aos metabólitos secundários resultou em melhor ação dos mesmos para as espécies testadas.

Palavras-chave: Microrganismos. Adjuvantes. Plantas Daninhas.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A BIOHERBICIDE FROM *PHOMA* sp. METABOLITES FOR WEED MANAGEMENT

AUTHOR: Izelmar Todero
ADVISOR: Marcio Antonio Mazutti

The weeds are one of the main problems faced by the farmers, because such weeds are responsible for a significant amount of the agricultural losses. The key control method is the chemical with use of herbicides. Although efficient when used in doses not recommended or inadequate form have promoted environmental contamination, of animal, intoxication of farmers, residues in food, appearance of resistant biotopes, among others. Looking for alternatives of control less aggressive, the utilization of a formulated product from microorganisms, mainly fungi, becomes an important tool into the area of plant protection and the biological control. In this way, the present work had as objective to concentrate and formulate a bioherbicide based on *Phoma* sp. with effect on bioindicated plants and weeds. The experiments were divided in 3 stages. In the 1° stage, it was realized the purification and concentration of the fermented broth throughout polymeric membranes, in this stage to analyze the potential phytotoxic was utilized leafs from *Cucumis sativus*. In the 2° stage, was utilized the best condition of the 1° stage to evaluate different formulations containing palm oil, Span®80 and Tween®80, with the objective of increasing the phytotoxicity, applying the products in post-emergence on *C. sativus*. The 3° stage evaluated the phytotoxicity in weeds with pre and post-emergence. In pre-emergence, the tests realized were in BOD chamber and in substrate of an species called *Amaranthus retroflexus*, for this, it was utilized the best condition of the 1° stage. In the post-emergence it was utilized the formulation than presented the best result within the 2° stage and the conditions with different oil concentrations, being the tests performed in three species: *A. retroflexus*, *Bidens pilosa* and *Conyza canadensis*. The results obtained for a primary evaluation demonstrated that the molecules concentration was efficient in 30% of the retained broth, presenting a greater effect in the leaf detected from *C. sativus*. In the 2° stage, the formulation 6, that presents for 10g of formulated 0,82g oil palm, 0,0576g Span 80, 0,2224g Tween 80 and 8,9g of cald, presented a higher phytotoxicity in *C. sativus*. In the 3° stage the application in pre-emergence of broth retained in 30% did not allow to occur the germination of *A. retroflexus* in both BOD and substrate. In the post-emergence, the formulation 6 presented difference of the formulation 3 and 15 with higher phytotoxic effect in weeds, highlighting more for the *A. retroflexus*. *Phoma* sp. presents bioherbicide action in pre-emergence and post-emergence and the addition of an adjuvant for the secondary metabolic resulted in a better action of them on the tested species.

Keywords: Microorganisms. Adjuvants. Weeds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Tipos de membranas de acordo com a morfologia e estrutura interna.	26
Figura 2- Placa de meio BDA com o microrganismo <i>Phoma</i> sp.....	30
Figura 3- Aspecto do pré-inóculo aos 7 dias após a fermentação.....	31
Figura 4- Processo de separação por membranas – Microfiltração.	32
Figura 5- Folha destacada de <i>C. sativus</i> para a realização do teste de aplicação....	33
Figura 6- Casa de vegetação (A), bandejas com repetições (B).....	37
Figura 7- Teste de germinação realizado em caixas gerbox em espécies de <i>B. pilosa</i> e <i>A. retroflexus</i>	39
Figura 8- Vasos com repetição das plantas daninhas <i>B. pilosa</i> , <i>A. retroflexus</i> e <i>C. canadensis</i> e Câmara de aplicação.....	40
Figura 9- Comparação das lesões observadas nos ensaios: testemunha (A), caldo (B) e retido 30% (C).....	43
Figura 10- Fitotoxicidade as plantas de <i>C. Sativus</i> em função da aplicação dos formulados 02, 04, 05, 06, 07, 11 e 13.	48
Figura 11- Fitotoxicidade as plantas de <i>C. Sativus</i> em função da aplicação dos controles 05, 06, e 04.	49
Figura 12- Fitotoxicidade do formulado 06 em folhas de <i>C. sativus</i> : Controle (A) e Tratamento (B).	49
Figura 13- Danos causados em folhas de <i>C. sativus</i> submetidas à aplicação de caldo fermentado de <i>Phoma</i> sp. (A) e caldo fermentado de <i>Phoma</i> sp + adjuvante (B).	50
Figura 14- Eficiência do uso dos adjuvantes sobre as plantas de <i>C. sativus</i>	51
Figura 15- Demonstração das lesões observadas pelos formulados 09 e 10.	51
Figura 16- Demonstração das lesões observadas nos formulados com maior (02, 04, 06) e menor (01, 03, 05 e 07) concentração de óleo.....	52
Figura 17- Inibição da germinação de <i>A. retroflexus</i> 10 dias após a aplicação dos ensaios.	54
Figura 18- Inibição da germinação de <i>B. pilosa</i> 10 dias após a aplicação dos ensaios.	55
Figura 19- Inibição da germinação de <i>A. retroflexus</i> aos 15 dias após a aplicação dos ensaios em casa de vegetação.	56
Figura 20- Efeito do bioherbicida aplicado em diferentes vazões: 100, 200 e 300 L ha ⁻¹ , sobre as plantas daninhas <i>B. pilosa</i> , <i>A. retroflexus</i> e <i>C. canadensis</i> para tratamento e controle na formulação 06.	58
Figura 21- Efeito apresentado por <i>A. retroflexus</i> após o 3º dia da aplicação na vazão de 300 L ha ⁻¹ , comparando-se com a testemunha.	59
Figura 22- Aplicação única em <i>A. retroflexus</i> , <i>B. pilosa</i> e <i>C. canadensis</i> em diferentes vazões 100 L ha ⁻¹ (A), 200 L ha ⁻¹ (B) e 300 L ha ⁻¹ (C), comparando-se com a testemunha (D). Avaliação ao 15º dia.	59
Figura 23- Evolução do controle nas folhas de <i>A. retroflexus</i> usando-se o formulado 06, em aplicação de diferentes vazões: testemunha (A), 100 L ha ⁻¹ (B), 200 L ha ⁻¹ (C) e 300 L ha ⁻¹ (D).	60
Figura 24- Controles observados <i>B. pilosa</i> , <i>C. canadensis</i> , <i>A. retroflexus</i> em diferentes intensidades.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de plantas daninhas com resistência múltipla a herbicidas detectadas no Brasil até julho de 2016.	16
Tabela 2 - Espécies de plantas daninhas com resistência cruzada a herbicidas detectadas no Brasil.....	17
Tabela 3 - <i>Phoma</i> como agente de biocontrole de plantas daninhas.....	22
Tabela 4 - Bioherbicidas produzidos a partir de microrganismos e extratos vegetais para o controle de plantas daninhas.	23/24
Tabela 5 - Classificação dos processos clássicos de separação por membranas. ...	26
Tabela 6 - Concentrações do caldo fermentado nas duas frações da membrana. ...	32
Tabela 7 - Escala adaptada de Frans & Crowley para a avaliação do percentual de fitotoxicidade.....	34
Tabela 8 - Planejamento de experimentos delineamento composto central rotacional (DCCR) para três variáveis independentes.....	35
Tabela 9 - Matriz do desenho DCCR para os formulados, nas diferentes concentrações de bioherbicida concentrado, óleo de palma, Span®80 e Tween®80.....	35/36
Tabela 10 - Descrição dos conceitos aplicados às avaliações de toxicidade segundo a SBCPD.....	41
Tabela 11 - Fitotoxicidade em folhas de <i>C. sativus</i> das diferentes concentrações obtidas na membrana.....	42
Tabela 12 - Matriz do desenho DCCR para avaliar a influência no pH para os formulados de tratamento e controle, nas diferentes concentrações de bioherbicida concentrado, Span®80 e Tween®80.....	43/44
Tabela 13 - Matriz do desenho DCCR para avaliar a influência na densidade a 25°C para o tratamento e controle, nas diferentes concentrações de bioherbicida concentrado, Span®80 e Tween®80.....	45
Tabela 14 - Matriz do desenho DCCR para avaliar a influência na tensão superficial para o tratamento e controle, nas diferentes concentrações de bioherbicida concentrado, Span®80 e Tween®80.....	46
Tabela 15 - Fitotoxicidade a plantas de <i>C. sativus</i> em função da formulação com adjuvantes.....	47
Tabela 16 - Porcentagem de inibição da germinação na primeira e segunda contagem de <i>B. pilosa</i> e <i>A. retroflexus</i> para cada ensaio em câmara de germinação.	54
Tabela 17 - Controle de <i>A. retroflexus</i> em função da aplicação de diferentes vazões e de formulação do fungo <i>Phoma</i> sp.....	57
Tabela 18 - Controle de <i>B. pilosa</i> em função da aplicação de diferentes vazões e de formulação do fungo <i>Phoma</i> sp.	57
Tabela 19 - Controle de <i>C. canadensis</i> em função da aplicação de diferentes vazões e de formulação do fungo <i>Phoma</i> sp.....	58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 PLANTAS DANINHAS	14
3.1.1 Resistência aos herbicidas	15
3.2 CONTROLE BIOLÓGICO	18
3.2.1 Metabólitos Secundários produzidos por fungos	19
3.2.1.1 <i>Microrganismos endofíticos</i>	20
3.2.1.2 <i>Phoma sp.</i>	21
3.2.2 Bioherbicidas	23
3.3 FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	24
3.4 MEMBRANAS	25
3.5 FORMULAÇÃO	27
3.5.1 Adjuvantes	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DA CEPA.....	30
4.2 FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	30
4.3 MEMBRANAS	31
4.3.1 Purificação e concentração	31
4.3.2 Bioensaios	32
4.4 FORMULAÇÃO	34
4.4.1 pH	36
4.4.2 Densidade	36
4.4.3 Tensão superficial	36
4.4.4 Bioensaio em <i>C. sativus</i>	37
4.5 APLICAÇÃO EM PLANTAS DANINHAS.....	38
4.5.1 Bioensaio em pré-emergência	38
4.5.1.1 <i>Câmara de Germinação (BOD)</i>	38
4.5.1.2 <i>Germinação em substrato</i>	39
4.5.2 Bioensaio em pós-emergência	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42

5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO FITOTÓXICO PRODUZIDO POR <i>PHOMA</i> SP. NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES OBTIDAS NA MEMBRANA.....	42
5.2 FORMULAÇÃO	43
5.2.1 pH	43
5.2.2 Densidade	44
5.2.3 Tensão Superficial	45
5.2.4 Aplicação em <i>C. sativus</i>	47
5.3 APLICAÇÃO EM PLANTAS DANINHAS.....	53
5.3.1 Pré-emergência	53
5.3.1.1 Câmara de Germinação (BOD).....	53
5.3.1.2 Casa de Vegetação.....	56
5.3.2 Pós-emergência.....	57
6 CONCLUSÃO	63
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	64
REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

A presença de plantas daninhas em culturas agrícolas reduz significativamente a produtividade e a qualidade dos produtos colhidos, principalmente por competirem com as culturas por água, luz e nutrientes (BARTON, 2004; GARBIN, 2016). Com o intuito de controlar as plantas daninhas e aumentar a produtividade das culturas, o método químico de controle tem sido a principal ferramenta utilizada principalmente pela grande oferta de produtos, economia de mão-de-obra e rapidez da operação (BURNSIDE, 1992; OLIVEIRA JR et al., 2011).

No entanto no uso de herbicidas tem causado problemas de ordem ambiental, relacionados à saúde do agricultor, bem como o surgimento de plantas daninhas resistentes (YANG et al., 2014; MCDUGALL, 2010). A resistência de plantas daninhas a herbicidas é um processo que se dá pelo uso repetitivo do mesmo herbicida ou 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).

Uma alternativa aos problemas acarretados pelo uso intensivo de herbicida químico, segundo Dayan et al. (2009), são as substâncias produzidas pelo metabolismo secundário de fungos, bactérias e plantas, que vêm sendo utilizadas de forma natural ou servindo como modelo para a síntese de novas moléculas. Alguns estudos realizados por Javaid et al. (2011), Pes et al. (2016) e Brun et al. (2016) têm demonstrado que toxinas produzidas por fitopatógenos expressam atividade herbicida.

Os fungos fitopatogênicos são um dos grupos mais estudados em relação ao seu potencial herbicida, pois detêm a habilidade específica de produzirem substâncias tóxicas, sendo capazes 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).

Neste contexto, a utilização de compostos naturais ativos produzidos por *Phoma* sp., também conhecidos como bioherbicidas, pode ser uma alternativa interessante para a proteção da produção agrícola, pois estes podem produzir uma diversidade de metabólitos secundários importantes incluindo fitotoxinas, antimicrobianos e alguns micoherbicidas (RAI et al., 2009; ALMEIDA, 2014). Porém é necessário encontrar alternativas que busquem otimizar o uso dos produtos biológicos, tornando-os mais eficientes, pois apresentam bioatividade em concentrações muito baixas. Com o objetivo de aumentar a eficiência dos herbicidas, alguns produtos, como os adjuvantes, podem ser adicionados à calda para melhorar o efeito dos bioherbicidas. Entre os adjuvantes que vêm sendo pesquisados para formulações de bioherbicidas destacam-se o uso de surfactantes, óleos minerais e vegetais, emulsionantes e sais de fertilizantes. A adição desses podem aumentar a atividade e absorção dos bioherbicidas, além de, em alguns casos permitir a redução da dose (KIRKWOOD, 1993; BORGES NETO et al., 1998). Neste sentido, os estudos para otimizar a produção desses possíveis herbicidas biológicos se tornam indispensáveis.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse trabalho foi concentrar e formular um bioherbicida a base de *Phoma* sp. com efeito sobre plantas bioindicadoras e plantas daninhas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Concentrar e purificar o caldo fermentado produzido a partir de *Phoma* sp., utilizando membranas;
- ✓ Avaliar os efeitos dos metabólitos produzidos por *Phoma* sp. em plantas de *C. sativus*;
- ✓ Testar a adição e a eficiência de adjuvantes ao caldo fermentado em plântulas de *C. sativus*, bem como em plantas daninhas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PLANTAS DANINHAS

As plantas daninhas são definidas de diversas maneiras, porém a maioria dos autores as definem como plantas, que crescem onde não são desejadas (RANA, 2016). As reduções da produtividade, as perdas em áreas cultivadas e até mesmo a inviabilização da colheita causada pela presença das mesmas, têm sido motivo de grande preocupação para os produtores (FONTES et al, 2003; CARVALHO, 2013). Estas causas ocorrem devido à competição e dependem principalmente da espécie de planta daninha, da densidade, bem como das espécies de culturas (RANA, 2016).

As perdas de produção devido às plantas daninhas são mais elevadas do que as causadas por insetos e doenças, variando para cada cultura, pois as mesmas competem diretamente pelos recursos do meio com as culturas, como nutrientes, luz, CO₂ e água, podendo trazer sérios impactos sobre a produção e a qualidade dos produtos agrícola (FONTES et al, 2003).

Entre as características das plantas daninhas que explicam as dificuldades de controle está a grande produção e a facilidade de disseminação de suas sementes, aumentando sua eficiência reprodutiva (ALMEIDA, 2014). Segundo Balbinot Jr. et al. (2002) a maioria das plantas daninhas que infestam áreas agrícolas reproduz-se sexuadamente, ou seja, através da formação de sementes.

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

Os herbicidas se apresentam como principal ferramenta de controle de plantas daninhas em lavouras, superando todos os outros métodos de controle, tais como, mecânico, físico, cultural e o preventivo (VARGAS & ROMAN, 2006).

3.1.1 Resistência aos herbicidas

A partir da década de quarenta com a descoberta dos herbicidas sintéticos, o manejo de plantas daninhas teve significativa mudança. No entanto, após uma década do uso do controle químico houve o surgimento de biótipos resistentes aos herbicidas mais utilizados, tornando o controle de plantas daninhas mais complexo (GREEN, 2014).

O principal método utilizado no manejo das plantas daninhas no cenário agrícola mundial atualmente é o controle químico (CARVALHO, 2013). A utilização desse método e a aplicação consecutiva de herbicidas na mesma área com o mesmo mecanismo de ação, tem propiciado a seleção e o surgimento de biótipos resistentes (SANTOS et al., 2014). Sua utilização tende a aumentar, em decorrência dos agricultores de pequena escala estarem adotando cada vez mais esta tecnologia, fato este que pouco ocorria anteriormente (SILVA & SILVA, 2012).

A resistência de plantas daninhas à herbicidas tornou-se um grande desafio enfrentado pelos técnicos e produtores (CHRISTOFFOLETI et al., 2016). 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).

Segundo Heap (2016), existem no mundo, 471 casos de plantas daninhas resistentes, com 250 espécies (145 dicotiledôneas e 105 monocotiledôneas). Os gêneros com maior número de biótipos resistentes são: *Lolium*, *Echinochloa*, *Poa*, *Avena*, *Alopecurus*, *Amaranthus*, *Eleusine*, *Conyza* e *Kochia*. No Brasil o primeiro registro de planta daninha resistente se deu em 1993 com a resistência de biótipo de *B. pilosa* a herbicidas inibidores da Enzima acetolactato sintase (ALS) (CHRISTOFFOLETI et al., 2016; WEED SCIENCE, 2016).

No Brasil existem 41 casos de espécies de plantas daninhas resistentes a diferentes mecanismos de ação. Os últimos registros relatados se dá a ocorrência da resistência de forma múltipla ou cruzada em diversas espécies (CHRISTOFFOLETI et al., 2016).

Quando um indivíduo apresenta um ou mais mecanismos que conferem resistência a herbicidas com mecanismo de ação diferente, chama-se de resistência múltipla (CHRISTOFFOLETI & LÓPEZ-OVEJERO, 2008). No Brasil, os casos de

resistência múltipla aumentaram significativamente nos últimos anos como mostrado na Tabela 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 1- Espécies de plantas daninhas com resistência múltipla a herbicidas detectadas no Brasil até julho de 2016.

Espécie	Ano	Resistência Múltipla a 2 Mecanismos de Ação
<i>Euphorbia heterophylla</i>	2004	Inibidores da Acetolactato Sintase (B) e Inibidores da Protoporfirinogênio Oxidase (E)
<i>Bidens subalternans</i>	2006	Inibidores da Acetolactato Sintase (B) e Inibidores do Fluxo de Elétrons (C)
<i>Echinochloa crus-galli</i> <i>var. crus-galli</i>	2009	Inibidores da Acetolactato Sintase (B) e Inibidores dos Mimeticos de Auxina (O)
<i>Sagittaria montevidensis</i>	2009	Inibidores da Acetolactato Sintase (B) e Inibidores do Fluxo de Elétrons (C)
<i>Lolium, multiflorum</i>	2010	Inibidores da Acetil-CoA carboxilase (A) e Inibidores da 5-enolpiruvilchiquimato-3-Fosfato Sintase (G)
<i>Conyza sumatrensis</i>	2011	Inibidores da Acetolactato Sintase (B) e Inibidores da 5-enolpiruvilchiquimato-3-Fosfato Sintase (G)
<i>Amaranthus retroflexus</i>	2011	Inibidores da Acetolactato Sintase (B) e Inibidores do Fluxo de Elétrons (C)
<i>Amaranthus viridis</i>	2011	Inibidores da Acetolactato Sintase (B) e Inibidores do Fluxo de Elétrons (C)
<i>Amaranthus palmeri</i>	2016	Inibidores da Acetolactato Sintase (B) e Inibidores da 5-enolpiruvilchiquimato-3-Fosfato Sintase (G)

Fonte: (HEAP, 2016).

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 apresenta exemplo de resistência cruzada relatado no Brasil, com destaque para o recente caso do *Amaranthus palmeri* resistente ao chlorimuron-ethyl (sulfoniluréia), imazethapyr (imidazolinona) e cloransulan-methyl (triazolopirimidina) (FRANCISCHINI et al., 2014; GONÇALVES NETTO et al., 2016).

Tabela 2 - Espécies de plantas daninhas com resistência cruzada a herbicidas detectadas no Brasil.

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)

Fonte: (HEAP, 2016).

Ao se comparar as culturas que mais apresentam biótipos de plantas daninhas resistentes, aparece a soja em primeiro lugar. Isto pode ser explicado porque essa cultura é a principal consumidora de herbicidas, acumulando mais de 50% das vendas destes produtos (HEAP, 2016).

Segundo levantamento realizado pela Conab a estimativa da produção de grãos na safra 2016/2017, deve alcançar a marca de 215,3 milhões de toneladas, superior em 15% quando comparada ao ano anterior, de 2015/2016. Destaca-se a soja uma das mais importantes oleaginosas, com estimativa de 103,78 milhões de toneladas safra 2016/2017. O Brasil com grandes áreas, nível tecnológico avançado e alta produtividade é considerado segundo maior produtor e o primeiro exportador mundial responsável por 42,46% (CONAB, 2017).

No Brasil a estimativa de área plantada de soja é crescente em quase todos os estados produtores, podendo chegar a 33,88 milhões de hectares, o que

representa um crescimento de 1,9% em relação com a safra passada (CONAB, 2017).

A resistência de plantas daninhas aos herbicidas causa preocupação, pois há um aumento acelerado dos casos pelo mundo e no Brasil. Segundo Silva; Silva (2012) este fato é ainda mais inquietante quando as alternativas de herbicidas disponíveis para o manejo das plantas daninhas resistentes são limitadas, exemplo tem-se o azevém (*L. multiflorum*) com biótipos resistentes aos inibidores de ALS, ACCase e EPSPs (AGOSTINETTO & VARGAS, 2014).

3.2 CONTROLE BIOLÓGICO

O controle das pragas na agricultura tem se intensificado, sendo realizado basicamente através do emprego de produtos sintéticos (VENTUROSOS et al., 2010). Estes produtos em curto prazo auxiliam de maneira eficaz o agricultor no alcance de altas produtividades. Porém, em longo prazo, acarreta resultados negativos tanto para a sociedade como para o ambiente: isolados dos fitopatógenos resistentes às substâncias químicas utilizadas, resíduos nos alimentos, desequilíbrio biológico, intoxicação de operadores, são alguns dos problemas existentes (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000).

Nos últimos anos, houve um crescente interesse em métodos agrícolas que sejam ambiental e economicamente viáveis. A busca de métodos alternativos ao controle químico inclui a utilização de produtos naturais que são menos agressivos ao ambiente, destacando-se entre estes as fitotoxinas produzidas pelos fungos (PEREIRA et al., 2008; JABRAN et al., 2015).

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). 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 de plantas daninhas pode ser realizado por vários bioagentes e pode ser categorizado 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 focados em fungos, pois os mesmos provocam doenças nas plantas que paralisam seu crescimento e podem acarretar sua morte (LI et al., 2003; FERRELL et al., 2008; ELLIOTT et al., 2009; DIAZ et al., 2014).

3.2.1 Metabólitos Secundários produzidos por fungos

A evolução dos metabólitos secundários se deu ao longo de milhões de anos, onde os microrganismos utilizavam como sinais químicos para se comunicarem, para defender o habitat ou para inibir o crescimento de concorrentes (BRAKHAGE, 2013). Os microrganismos lideram a produção de compostos naturais úteis (DEMAIN, 2014). Os fungos apresentam como característica a capacidade de biossintetizar uma diversidade de compostos naturais conhecidos como metabólitos secundários. Esses são compostos geralmente por moléculas de tamanho reduzido, de baixa massa molecular estruturalmente heterogêneos (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 excepcionais de novos fármacos e agrotóxicos (VINING, 1990; TREMACOLDI & FILHO, 2006).

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).

A classe dos policetídeos, terpenóides e peptídeo fazem parte da vasta gama de substâncias bioativas oriundas do metabolismo secundário dos fungos (FOX; HOWLETT, 2008). Na natureza encontra-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). Segundo Almeida (2014), devido à diversidade de sítios de ação dos metabólitos, e também à ausência de

protocolos ou métodos padrões, há muita dificuldade em estabelecer corretamente o modo de ação dos compostos naturais fitotóxicos.

Muitos pesquisadores têm desenvolvido seus próprios métodos. Segundo Duke et al. (1997), um método possível consiste em selecionar e testar um composto específico sobre todos os sítios-alvos conhecidos para herbicidas, existindo em torno de 30 sítios-alvos identificados para toxinas. Este método pode, certamente, conduzir à descoberta do modo de ação de uma toxina em particular, mas não assegura que outro modo de ação não possa ser descoberto (ALMEIDA, 2014).

Os danos provocados pelas fitotoxinas podem ocorrer através da penetração na planta, seguido da desestruturação da parede celular e indução da formação de lesões necróticas ou halo clorótico em folhas, talos ou frutos, com a vantagem principal de não serem tóxicas aos seres humanos e animais e degradarem-se facilmente no ambiente. A seletividade da toxina para as plantas daninhas é variável, de uma espécie para outra, sendo que a toxina considerada mais promissora para ser utilizada como herbicida natural é aquela que apresenta a maior especificidade (CHARUDATTAN, 1991).

Quando utilizados em mistura com herbicidas químicos, os metabólitos secundários produzidos por fungos podem exercer um efeito sinérgico no controle de plantas daninhas, além de reduzir a dose do produto sintético (HOAGLAND, 1990), porém, ainda não há estudos utilizando a mistura dos dois tipos de herbicidas. Desta forma, o isolamento de patógenos de plantas, bem como o estudo dos agentes de controle e produção de metabólitos secundários são os principais caminhos para desenvolvimento de herbicidas de origem microbiana (YANG, et al., 2014).

3.2.1.1 Microrganismos endofíticos

Apesar da imensa diversidade biológica que o Brasil detém (20% de toda a biodiversidade mundial) de microrganismos, a biodiversidade destes é ainda considerada desconhecida, sendo evidente a necessidade de estudos sobre a biologia e funcionalidade do todo para manter um ecossistema dinâmico (PYLRO et al., 2013).

Os fungos endofíticos foram descritos inicialmente por Bary em 1866 (CHAPLA, et al., 2013), estes fazem parte de um grupo diversificado de ascomicetos

e são definidos por sua ocorrência assintomática nos tecidos das plantas aparentemente saudáveis (JALGAONWALA, 2011). Estes fungos colonizam tecidos vivos da planta (interior das raízes, folhas e sementes) sem causar quaisquer efeitos negativos imediatos evidentes (STONE, et al., 2000; SOUZA, et al., 2004; CHAPLA, et al., 2013).

Fungos endófitos provaram ser uma fonte rica de novos compostos orgânicos, com atividades biológicas interessantes por seu potencial na produção de metabólitos secundários, além de exercerem funções importantes para a sobrevivência do hospedeiro. Sabe-se que os endófitos podem produzir metabólitos bioativos como toxinas, antibióticos, substâncias antimicrobianas e outros compostos de interesse com potencial biotecnológico (AZEVEDO, 1998; DAI et al., 2005; SCHULZ & BOYLE, 2005; MOUZA & RAIZADA, 2013).

3.2.1.2 *Phoma* sp.

Entre os microrganismos utilizados para o controle biológico de plantas daninhas está o fungo do gênero *Phoma* sp.. Esses fungos são causadores de lesões em folhas, caules, flores e vagens, bem como de descoloração do hipocótilo, cotilédone e raízes (BAILEY et al., 2011; BOEREMA et al., 2004).

Trabalhos mostram bons resultados usando o fungo do gênero *Phoma* sp. como agente herbicida, quando aplicados em algumas plantas daninhas (BAILEY et al., 2011; GRAUPNER et al., 2006). Dentre as espécies do gênero *Phoma* três têm recebido atenção: *P. herbarum*, *P. chenopodicola* e *P. macrostoma* (Tabela 3) (NEUMANN & BOLAND, 1999; STEWART-WADE & BOLAND, 2005; HARDING, 2016).

Bailey e Derby (2010) encontraram dez isolados de *Phoma macrostoma*, com efeito bioherbicida sobre plantas daninhas. A aplicação destes isolados resultou em clorose e morte de várias espécies de plantas daninhas de folha larga, não tendo efeito sobre monocotiledôneas. Porém o mesmo não foi observado por Graupner et al., (2003; 2006), quando houve ação do fungo sobre plantas monocotiledôneas. Bailey et al. (2011) observaram que este fungo foi eficiente para o controle de 38 espécies de 12 famílias, entretanto 57 espécies de 25 famílias foram consideradas resistentes a esse patógeno. Dessa forma, é observado que este bioherbicida pode apresentar um comportamento seletivo entre as diferentes espécies de plantas

daninhas (HALLETT, 2005). Convém ressaltar que outros trabalhos também enfatizam o efeito do *Phoma macrostoma* de inibir especificamente o crescimento de plantas dicotiledôneas (BAILEY et al., 2011; BAILEY et al., 2013; SMITH et al., 2015).

Tabela 3- *Phoma* como agente de biocontrole de plantas daninhas.

Agente bioerbicida Fungo	Planta Daninha	Especificidade do agente de controle	Sistema destinado	A formulação do produto
<i>Phoma chenopodicola</i>	<i>Chenopodium album</i> - <i>Cirsium arvense</i> - <i>Setaria viridis</i> - <i>Mercurialis Annua</i>	Não testado sobre outras espécies	Culturas de campo, tais como beterraba e milho	Ingrediente ativo isolado a partir de cultura viva de <i>P. chenopodicola</i> usando solvente orgânico
<i>Phoma macrostoma</i>	Plantas dicotiledôneas	Afeta a maioria das monocotiledôneas, e não dicotiledôneas (Bailey et al., 2011)	Relvado	Grânulos compostos por fragmentos de micélio e farinha
<i>Phoma herbarum</i>	<i>Taraxacum officinale</i>	Relatado como um agente potencial de controle para a beldroegas <i>Trianthema portulacastrum</i> (Ray e Vijayachandran, 2013)	Relvado	A suspensão de micélio em batata caldo de dextrose (Neumann e Boland, 1999)

Fonte: (HARDING, 2016).

Dois isolados fúngicos do gênero *Phoma* também foram eficientes por causar podridão em *Cirsium arvense*, no entanto, estes isolados não foram identificados ao nível de espécie (SKIPP et al., 2013). Zhang et al. (2012) utilizaram *Phoma* sp. para obter extratos antimicrobianos. Parra et al. (2005) otimizaram a produção de metabólitos secundários de *Phoma* sp. com atividade herbicida. Evidente et al. (2015) utilizaram *P. exigua* como um potencial bioerbicida para o controle de *C. arvense*. Almeida (2014) e Brun et al., (2016) também demonstram que toxinas produzidas por *Phoma* sp. expressam atividade herbicida em plantas bioindicadoras.

Convém ressaltar que para o gênero *Phoma* foi concedido registro provisório como bioherbicidas para uso na gestão de ecossistemas florestais no Canadá e nos Estados Unidos (BOEREMA et al., 2004; BAILEY & FALK, 2011; BAILEY, 2014).

3.2.2 Bioherbicidas

Nas últimas décadas, as pesquisas para o gerenciamento de plantas daninhas têm-se centrado sobre a forma de reduzir a dependência de herbicidas sintéticos em sistemas de cultivo, combinando outras técnicas de manejo (CHIKOWO et al., 2009). Neste contexto os bioherbicidas devem ser considerados parte do manejo integrado de plantas daninhas.

Bioherbicidas são produtos de origem natural para o controle de plantas daninhas, podendo ser originados tanto de organismos vivos, derivados de compostos produzidos pelos fungos, bactérias, vírus ou protozoários, bem como de extratos ou compostos isolados de plantas (BAILEY, 2014; RANA, 2016). Isso justifica o fato da meia vida dos bioherbicidas serem geralmente mais curto do que os herbicidas químicos (DUKE et al., 2000).

Apesar dos esforços para identificar agentes bioherbicida eficazes em laboratório e em campo, apenas treze bioherbicidas (Tabela 4) estão atualmente disponíveis no mercado. Convém ressaltar que destes nove são baseados em microrganismos fúngicos, três bacterianos e um contém uma substância ativa de extrato vegetal. Porém apenas alguns países têm bioherbicidas para comercialização no mercado: Estados Unidos (4), Canadá (3), Ucrânia (1) e França (1) (BAILEY, 2014).

Tabela 4 - Bioherbicidas produzidos a partir de microrganismos e extratos vegetais para o controle de plantas daninhas.

(continua)

País/Ano	Bioherbicida	Ingrediente Ativo	Planta daninha	Cultura alvo
EUA/1981	Devine	<i>Phytophthora palmivora</i>	<i>Morrenia odorata</i>	Citros
EUA/1982	Collego	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> f. sp. <i>aeschynomene</i>	<i>Aeschynomene virginica</i>	Arroz Soja
Canadá 1992	BioMal	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> f.sp. <i>malvae</i>	<i>Malva pusilla</i>	Trigo, Lentilha Linho
EUA/2002	Woad Warrior	<i>Puccinia thlaspeos</i> C. Shub	<i>Isatis tinctoria</i>	
Canadá 2004 USA 2004	Myco-tech	<i>Chondrostereum purpureum</i>	<i>Prunus Serotina</i> <i>Populus euramericana</i>	Solos arenoso, florestas de coníferas
Canadá 2004 EUA 2005	Chontrol	<i>Chondrostereum purpureum</i>	<i>Prunus Serotina</i> <i>Populus euramericana</i>	Solos arenosos, florestas de coníferas

Tabela 4 - Bioherbicidas produzidos a partir de microrganismos e extratos vegetais para o controle de plantas daninhas.

(conclusão)

EUA 2005	Smolder	<i>Alternaria destruens</i>	Controla várias espécies de <i>Cuscuta</i> spp	Alfafa, amora, doce, berinjela, cenoura, pimenta, tomate,
Canadá 2009	Sarritor	<i>Sclerotinia minor</i>	Dandelion (<i>Taraxacum</i> spp.)	Controla as dicotiledônea em relva
Canadá/ EUA	<i>Phoma</i>	<i>Phoma macrostoma</i>	Não encontrado	Dicotiledônea em campos de golfe, agricultura e agro-florestal
2012	Opportune			Relvado
Japão	Camperico	<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>Poa annua</i>	Não encontrado
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> e <i>Oxalis acetosella</i> .	
2015	Beloukha	Derivado do óleo de canola	Não encontrado	Jardinagem
Não encontrado	Katoun	Derivado do óleo de canola – dados Syngenta	Dessecante Natural pós-emergência de plantas daninhas	Caminhos de parque, jardins públicos.

Fonte: Adaptado CORDEAU et al., (2016).

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 necessárias para melhorar o número de soluções eficazes no mercado mundial. O uso de bioherbicidas deve ser um passo importante no sentido da sustentabilidade na agricultura (CORDEAU et al., 2016).

3.3 FERMENTAÇÃO SUBMERSA

A fermentação em estado sólido e a fermentação submersa são os dois principais tipos fermentativos para processos de produção de agrotóxicos com microrganismos microbianos. As condições do meio fermentativo (tempo de fermentação, temperatura e agitação), bem como o tipo de fermentação, influenciam diretamente na produção de metabólitos secundários (CASTRO & FERREIRA, 2010; VAREJÃO et al., 2013).

Um dos métodos ideais para a produção de bioherbicida de origem fúngica é a fermentação submersa (ASH, 2010; CHENG et al., 2003; GIBBS et al., 2000). 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).

Um fator importante na fermentação é o meio de cultura, podendo utilizar-se o meio industrial, bem como um meio sintético (SINGHANIA, 2010; ZHANG et al., 2012), convém ressaltar que este utiliza reagentes biotecnológicos para o desenvolvimento do meio de cultura, por exemplo: extrato de levedura, peptona, glucose e vários micronutrientes (ALMEIDA, 2014).

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 é indispensável para garantir a eficácia e a viabilidade da produção do bioherbicidas.

3.4 MEMBRANAS

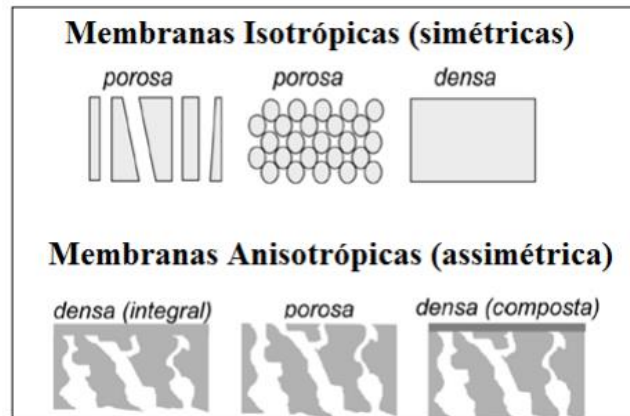
A separação por membranas (PSM) é basicamente um processo de transferência de massa, onde a alimentação é constituída por uma mistura de dois ou mais componentes que é parcialmente separada através de uma barreira semipermeável (membrana) em duas frações denominadas permeado e retido. (PESSOA JÚNIOR & KILIKIAN, 2005; SEADER et al., 2010).

O objetivo principal do PSM é a separação, a concentração e/ou a purificação de qualquer componente/ composto presente em uma solução. Esses processos são baseados na massa e tamanho molecular, na forma dos compostos e nas interações com a superfície das membranas e outros componentes da mistura (STRATHMANN, 1990; BALDASSO, 2008; PINHEIRO, 2015).

A membrana é caracterizada como uma barreira seletiva, aumentando a concentração de certos componentes da alimentação e diminuindo de outros (HELDMAN & 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 (Figura 1) (CHERYAN, 1998).

Figura 1- Tipos de membranas de acordo com a morfologia e estrutura interna.



Fonte: (HABERT, et al., 2006).

Quanto aos diferentes tipos de processos de separação por membrana, os segmentos mais significativos são representados pelos processos de microfiltração (MF), ultrafiltração, nanofiltração, osmose reversa, pervaporação, permeação de gases e diálise. Um esquema dos processos de separação com suas características de aplicação é descrito na Tabela 5 (BAKER, 1991; HABERT et al., 2006; BAKER, 2012).

Tabela 5 - Classificação dos processos clássicos de separação por membranas.

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 Reversa	< 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 HABERT et al., (2006) e BAKER (2012).

O processo de MF 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 semelhante com o processo convencional de filtração (HABERT et al., 2006; BALDASSO, 2008; GARCÍA et al., 2013).

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

3.5 FORMULAÇÃO

Uma das etapas importantes para a produção de um bioherbicida é desenvolver uma tecnologia de formulação e aplicação adequada (RANA, 2016). A busca de 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), podendo para isso utilizar a adição de adjuvantes no caldo a ser aplicado (ALMEIDA, 2014).

3.5.1 Adjuvantes

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).

Os resultados das aplicações dos adjuvantes juntamente com o herbicida podem sofrer interferência de diversos fatores, entre eles: no momento da mistura no tanque (a compatibilidade e estabilidade da mistura, a qualidade da água, o pH, a

formação de espuma, a dispersão e a agitação); na hora da aplicação (forma do jato e a abertura das pontas de pulverização, calibração, pressão, volume perdido por evaporação, vento e velocidade de deslocamento); na deposição do produto sobre o alvo (espalhamento das gotas, chuvas, orvalho, umidade, emissão de raios UV e superfície do alvo); na retenção (velocidade, ângulo e tamanho da gota, superfície das folhas, arquitetura da planta, tensão superficial e viscosidade); na penetração (idade e densidade das folhas, composição e estrutura da planta, propriedades físico-químicas e solubilidade das gotas e condições ambientais); e na translocação (espécie da planta, estágio de crescimento, fisiologia e fitotoxicidade) (GREEN, 2001).

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

- Ativadores: aumentam a atividade de herbicidas por modificar certas características de herbicidas, 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 dos herbicidas a penetrarem 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.

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). Os óleos vegetais e minerais quando estão na função de adjuvantes podem favorecer o espalhamento e a absorção, a concentração comercial em que os óleos são usualmente comercializados se apresentam em cerca de 80% de óleo / 20% de agente tensoativo, esses juntamente com a água são adicionados para aumentar o tempo de retenção de uma solução nas folhas, permitindo um aumento na captação de herbicida (MENDONÇA et al., 2007; RANA, 2016).

Alguns aspectos importantes que levaram ao maior interesse em usar adjuvantes na agricultura através dos sistemas de aplicação por pulverização é a melhora na eficiência e desempenho dos agrotóxicos, melhor cobertura e absorção,

aspectos operacionais ou econômicos, menor prejuízo ao ambiente e saúde humana, eficiência operacional com menor vazão de água e melhor ganho operacional de uso de maquinários (FARM CHEMICALS, 2013; VERONESE, 2015).

Trabalhos demonstraram resultados satisfatórios quando utilizados adjuvantes juntamente com bioherbicidas. Gronwald et al. (2002) estudaram o efeito do possível bioherbicidas *Pseudomonas syringae* pv. *Tagetis* em conjunto com adjuvante para o biocontrole de Canada thistle (*Cirsium arvense*), verificaram a necessidade da adição de Silwet L-77, para melhores resultados. Borges Neto et al. (1998) estudaram o efeito de 10 adjuvantes no desenvolvimento de um bioherbicidas com propágulos de *Cercospora caricis*, visando a melhor distribuição e adesão dos propágulos sobre a superfície das folhas. Neste trabalho, os autores observaram maior porcentagem de folhas mortas causadas pelo bioherbicida com a utilização do adjuvantes.

Borges Neto e Pitelli (2004) relataram os efeitos da adição de adjuvantes e a associação com herbicida na infectividade do fungo *Fusarium graminearum*, para o biocontrole de plantas aquáticas, *Egeria densa* e *E. najas*. Bastos (2016) também relatou em seu trabalho melhores resultados quando adicionado adjuvantes ao fermentado de *Diaporthe* sp.. Piyaboon et al., (2016) relatam que as suspensões de esporos do fungo *Myrothecium roridum* com 10% de óleo de palma ou 1% de Tween 20 causaram nível mais elevado de gravidade da doença, em comparação com os esporos aplicados apenas em água para o controle de Jacinto de água (*Eichhornia crassipes*).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório Biotec Factory, Departamento de Engenharia Química e Laboratório Fitossanitário na Universidade Federal de Santa Maria, RS.

4.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DA CEPA

A cepa de *Phoma* sp. (NRRL 43879) foi obtida no *National Center for Agricultural Utilization Research* – EUA (ARS). A mesma foi mantida em batata dextrose ágar (BDA) a 4 - 6 °C e sub-cultivadas a cada 15 dias.

4.2 FERMENTAÇÃO SUBMERSA

O preparo do pré-inóculo, foi realizado a partir de placas sub-cultivadas durante 7 dias em estufa bacteriológica a 28°C (Figura 2). Para a fermentação utilizou-se oito frascos de Erlenmeyers de 250 mL contendo 125 mL de meio de cultivo cada, conforme a composição definida a seguir: 200 gL⁻¹ de batata, 20 gL⁻¹ de dextrose, 10 gL⁻¹ peptona, 7,5 gL⁻¹ de extrato de levedura, 2,0 gL⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 1,0 gL⁻¹ de FeSO₄.7H₂O, 1,0 gL⁻¹ de MnSO₄.H₂O e 0,5 gL⁻¹ de MgSO₄ (YU et al., 1998; SELBMANN et al., 2002; PARRA et al., 2005; ZHANG et al., 2012).

Figura 2- Placa de meio BDA com o microrganismo *Phoma* sp.



Fonte: Autor

O meio de cultivo foi esterilizado em autoclave a 121°C durante 30 min e após atingirem a temperatura ambiente, com o auxílio de um tubo de ensaio, adicionou-se dois discos de 2 cm de diâmetro em cada frasco. Todo o manuseio, preparo e

inoculação do fungo *Phoma* sp. foi realizado em capela de fluxo laminar com completa assepsia dos materiais utilizados, de modo que a interferência externa ou possível contaminação com organismos indesejáveis fosse eliminada. O fungo foi cultivado durante 7 dias em agitador orbital, com agitação de 120 rpm e 28°C (Figura 3). Ao final da fermentação, o caldo foi filtrado e armazenado em geladeira até a sua utilização.

Figura 3- Aspecto do pré-inóculo aos 7 dias após a fermentação.



Fonte: Autor

4.3 MEMBRANAS

4.3.1 Purificação e concentração

O processo de separação por membranas (Figura 4) foi realizado utilizando uma membrana de microfiltração de fluoreto de polivinilideno - PVDF (Microza – modelo UMP 1047R), módulo tubular com diâmetro de poro de 0,2 μm e com área de filtração de 0,09 m^2 , a pressão de trabalho foi de 1 bar em temperatura ambiente. A alimentação na membrana separa-se em duas correntes: retido e permeado. As moléculas de tamanho inferior ao do poro da membrana passam através dela, enquanto as de tamanho superior ficam retidas pelo efeito peneira ou por forças repulsivas da superfície da membrana (GIRALDO-ZUNIGA et al., 2004; ORDÓNEZ, 2005a, 2005b).

O reservatório da unidade foi alimentado com 500 mL do sobrenadante e após o processo entrar em regime realizou-se a retirada das duas frações (permeado e retido) conforme Tabela 6.

Figura 4- Processo de separação por membranas – Microfiltração.



Fonte: Autor

Tabela 6 - Concentrações do caldo fermentado nas duas frações da membrana.

Permeado (%)	Retido (%)
10	90
30	70
50	50
70	30
90	10

Fonte: Autor

4.3.2 Bioensaios

Para avaliar o melhor desempenho do herbicida de origem biológica produzido por *Phoma* sp. nas diferentes concentrações obtidas nas duas frações (retido e permeado) na membrana, foram realizados testes, em folha destacada em ensaio de absorção de folha (PEDRAS & AHIAHONU, 2004), com a espécie *C. sativus* (pepino). Mesmo não sendo planta daninha, é utilizada em testes com herbicidas químicos, pois é sensível a estes e de uso frequente em bioensaios para detecção de resíduos de herbicidas sintéticos no solo (ALMEIDA, 2014).

Conforme se observa na Figura 5, para a realização do teste de aplicação em folha destacada, foram coletadas folhas jovens de *C. sativus*, seccionando na base de seu pecíolo, e dispostas em caixas gerbox previamente desinfetadas com álcool

70% e forradas com duas folhas de papel filtro (Germitest®) umedecidas. No pecíolo da folha foi colocado um algodão embebido em 2 mL de caldo produzido por *Phoma* sp. na concentração avaliada, e deixou-se absorver um volume da solução teste. Convém ressaltar que para a testemunha o algodão foi embebido com água (PEDRAS & AHIAHONU, 2004).

Figura 5- Folha destacada de *C. sativus* para a realização do teste de aplicação.



Fonte: Autor

Os Gerbox foram acondicionados em BOD com temperatura constante (28°C) e fotoperíodo de 12/12 horas de luz/escuro. Varejão et al., (2013) destacam que alguns metabólitos possuem atividade fitotóxica na presença e outros na ausência de luz, por isso os testes foram realizados sob iluminação alternada, evitando perdas na detecção de atividades fitotóxicas influenciada pela luz.

A avaliação foi realizada em 3^o, 6^o e 9^o dia após a aplicação, para a análise do aparecimento de sintomas. Para a verificação da eficácia do produto, utilizou-se a escala desenvolvida por Frans e Crowley (1986), por meio de notas de 0 a 100% de fitotoxidade, conforme os efeitos causados na parte aérea da planta (Tabela 7).

Tabela 7 - Escala adaptada de Frans & Crowley para a avaliação do percentual de fitotoxicidade.

%	Descrição das categorias	Descrição detalhada da fitotoxicidade
	principais	na cultura
0	Sem efeito	Sem injúria ou redução
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	Cultura próxima da destruição - poucas plantas sobreviventes
90		Raramente restam algumas plantas
100	Efeito total	Destruição completa da cultura

Fonte: Adaptado por FRANS & CROWLEY (1986).

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições de cinco folhas para cada tratamento, mais a testemunha. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, com nível de significância de 5% de probabilidade.

4.4 FORMULAÇÃO

A fim de avaliar a adição de adjuvantes na melhor condição encontrada nos resultados anteriores, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR), conforme Tabela 8.

Para o preparo das emulsões utilizou-se a mistura dos adjuvantes Span[®]80 (Equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL): 4,3), Tween[®]80 (EHL=15) e óleo de palma (Agropalma), conforme a Tabela 8. Após a pesagem, misturou-se o Span[®]80 ao óleo de palma (mistura A), com o auxílio do homogeneizador Turrax a 7000 rpm por 1 min., assim como fez-se a mistura do caldo fermentado ao Tween[®]80 por 1 min. (mistura B). Após esse procedimento, a mistura A foi sendo adicionada aos poucos à mistura B e manteve-se em agitação por 5 min.

Tabela 8 - Planejamento de experimentos delineamento composto central rotacional (DCCR) para três variáveis independentes.

Ensaio	Óleo (% m/m)	Surfactante (% m/m)	EHL* (-)
1	2,8 (-1)	2,8 (-1)	6,5 (-1)
2	8,2 (1)	2,8 (-1)	6,5 (-1)
3	2,8 (-1)	8,2 (1)	6,5 (-1)
4	8,2 (1)	8,2 (1)	6,5 (-1)
5	2,8 (-1)	2,8 (-1)	12,8 (1)
6	8,2 (1)	2,8 (-1)	12,8 (1)
7	2,8 (-1)	8,2 (1)	12,8 (1)
8	8,2 (1)	8,2 (1)	12,8 (1)
9	1 (-1,68)	5,5 (0)	9,7 (0)
10	10 (1,68)	5,5 (0)	9,7 (0)
11	5,5 (0)	1(-1,68)	9,7 (0)
12	5,5 (0)	10 (1,68)	9,7 (0)
13	5,5 (0)	5,5 (0)	4,3 (-1,68)
14	5,5 (0)	5,5 (0)	15 (1,68)
15	5,5 (0)	5,5 (0)	9,7 (0)
16	5,5 (0)	5,5 (0)	9,7 (0)
17	5,5 (0)	5,5 (0)	9,7 (0)

* Equilíbrio hidrófilo-lipófilo.

Na Tabela 9 estão apresentados os dados referentes às doses utilizadas de adjuvantes (óleo de palma, Span[®]80 e Tween[®]80), água destilada e bioherbicida concentrado, de acordo com o DCCR.

Tabela 9 - Matriz do desenho DCCR para os formulados, nas diferentes concentrações de bioherbicida concentrado, óleo de palma, Span[®]80 e Tween[®]80.
(continua)

Formulações	Óleo de Palma (g)	MS (g) ¹	MT (g) ²	EHL	Caldo (g)
Água Destilada	-	-	-	-	-
Bioherbicida concentrado	-	-	-	-	10,0
01	0,28	0,2224	0,0576	6,5	9,4
02	0,82	0,2224	0,0576	6,5	8,9
03	0,28	0,6514	0,1686	6,5	8,9
04	0,82	0,6514	0,1686	6,5	8,4
05	0,28	0,0576	0,2224	12,8	9,4
06	0,82	0,0576	0,2224	12,8	8,9

Tabela 9 - Matriz do desenho DCCR para os formulados, nas diferentes concentrações de bioherbicida concentrado, óleo de palma, Span®80 e Tween®80. (conclusão)

07	0,28	0,1686	0,6514	12,8	8,9
08	0,82	0,1686	0,6514	12,8	8,4
09	0,1	0,2724	0,2775	9,7	9,4
10	1	0,2724	0,2775	9,7	8,5
11	0,55	0,0495	0,0504	9,7	9,4
12	0,55	0,4953	0,5047	9,7	8,5
13	0,55	0,5500	0,0000	4,3	8,9
14	0,55	0,0000	0,5500	15	8,9
15	0,55	0,2724	0,2776	9,7	8,9
16	0,55	0,2724	0,2776	9,7	8,9
17	0,55	0,2724	0,2776	9,7	8,9

¹ Massa de Span®80

² Massa de Tween®80

4.4.1 pH

O pH foi mensurado com uso de um pHmetro de bancada, temperatura de 25°C, foram realizadas aferições de todas as caldas de pulverização, bem como da água isoladamente. Foram feitas três aferições de cada solução, entretanto, não houve diferença nas repetições, portanto os valores apresentados não foram submetidos à análise estatística.

4.4.2 Densidade

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

4.4.3 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 dos formulados).

4.4.4 Bioensaio em *C. sativus*

O possível poder bioherbicida da fitotoxina do fungo *Phoma* sp. foi determinado através da aplicação das diferentes fórmulas do DCCR, foi conduzido em casa de vegetação, onde se utilizou como planta teste a espécie *C. sativus*.

A semeadura de *C. sativus* foi feita em copos plásticos com volume de 180 mL contendo o substrato comercial Mecplant® e posteriormente distribuídos em bandejas de polietileno, sendo 17 bandejas para os tratamentos e uma bandeja para a testemunha, contendo doze plantas, divididas em quatro repetições contendo três plantas. Para cada tratamento foi utilizado um controle, constituído das respectivas formulações de Span®80 e Tween®80 e substituído o caldo fermentado por água destilada. Para a testemunha utilizou-se uma bandeja com doze plantas onde foi realizada a aplicação apenas de água destilada. Ainda, utilizou-se uma bandeja com doze plantas onde foi aplicado apenas o caldo fermentado (Figura 6).

Figura 6- Casa de vegetação (A), bandejas com repetições (B).



Fonte: Autor

As aplicações foram realizadas em duas etapas, a primeira aos 7 dias e a segunda aos 10 dias após a semeadura, utilizando um borrifador manual. Para cada repetição, foram aplicados 3 mL do formulado.

O bioensaio visou identificar a capacidade de inibição do desenvolvimento de plântulas diante de uma grande diversidade de formulados. A avaliação da

fitotoxicidade foi realizada visualmente aos 7 dias após a aplicação dos formulados, utilizando-se a escala adaptada de Frans & Crowley (Tabela 7).

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições de três plantas para cada formulado, mais a testemunha. Os dados foram submetidos à análise de variância, em havendo significância as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, com nível de significância de 5% de probabilidade.

4.5 APLICAÇÃO EM PLANTAS DANINHAS

4.5.1 Bioensaio em pré-emergência

4.5.1.1 Câmara de Germinação (BOD)

Para os testes de germinação foi utilizada a espécie *B. pilosa* (picão-preto) e *A. retroflexus* (caruru gigante). Os mesmos 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).

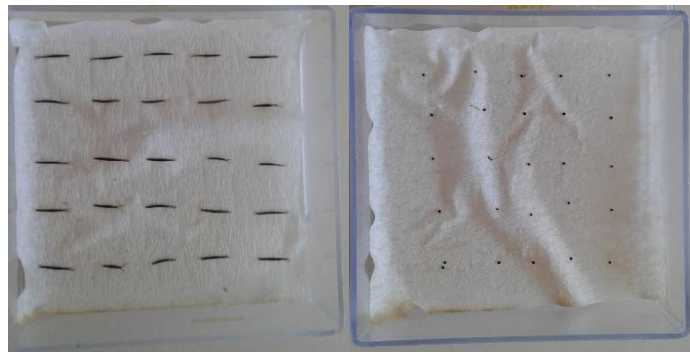
Após, foram semeadas 4 repetições de 25 sementes com diferentes diluições (10, 20, 40, 60, 80 e 100%), totalizando 100 sementes por tratamento e acondicionados em BOD, com temperatura constante (28°C) e fotoperíodo de 12/12 horas de luz/escuro (Figura 7).

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 porcentagem 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:

$$\text{Germinação: } G = \frac{\sum ni}{A} \times 100$$

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

Figura 7- Teste de germinação realizado em caixas gerbox em espécies de *B. pilosa* e *A. retroflexus*.



Fonte: Autor

4.5.1.2 Germinação em substrato

O bioensaio visou identificar a capacidade de inibição da germinação da planta daninha diante do bioherbicida concentrado – retido 30% formulado com *Phoma* sp., aplicado diretamente ao substrato.

Para os testes foi utilizada a espécie *A. retroflexus*, por ser uma planta daninha de fácil germinação e não necessitar de quebra de dormência. Os experimentos foram realizados em bandejas previamente desinfetadas com álcool 70% e preenchidas com 2 kg de substrato comercial Mecplant®. Em cada bandeja foram semeadas aleatoriamente as sementes e aplicado 100 mL do caldo retido 30%, convém ressaltar que foram realizadas diferentes diluições: 100, 50 e 25 %. O teste de germinação foi instalado no delineamento inteiramente casualizado, contendo 3 repetições.

Os bioensaios foram realizados em casa de vegetação com condições de temperatura e umidade controladas. A avaliação da germinação de *A. retroflexus* foi realizada visualmente aos 10 e 15 dias após a aplicação.

4.5.2 Bioensaio em pós-emergência

A partir da melhor condição encontrada nos resultados anteriores, quanto ao desempenho das diferentes formulações utilizando adjuvantes em *C. sativus*, foram realizados testes em plantas daninhas.

Em condições de casa de vegetação foram cultivadas plantas de *B. pilosa* (picão-preto) e *A. retroflexus* (caruru gigante) e *C. canadensis* (buva). As espécies de *B. pilosa* e *A. retroflexus* em copos com capacidade 100 mL contendo o substrato comercial Mecplant[®], contendo 1 plantas por copo, em dez repetições. Já a *C. canadensis* foi cultivada em copos de 180 mL contendo o substrato comercial Mecplant[®], contendo 1 planta por copo, em cinco repetições. Para cada bioensaio foi utilizado um controle, constituído da respectiva formulação substituindo o caldo fermentado por água destilada. As espécies foram escolhidas por serem plantas daninhas de importância na agricultura brasileira, representando a classe das dicotiledôneas e que tem ocasionando elevadas perdas se não controladas.

As aplicações em pós-emergência foram realizadas em câmara de aplicação modelo Generation III Research Sprayer em duas etapas, a primeira aos 15 dias e a segunda aos 18 dias após a sementeira. Para cada repetição, foram aplicados respectivamente 100, 200 e 300 L ha⁻¹ do formulado, sob pressão constante de 20 Psi, pressurizado por CO₂. A ponta utilizada foi do tipo jato plano (leque) 8002. (Figura 8).

Figura 8- Vasos com repetição das plantas daninhas *B. pilosa*, *A. retroflexus* e *C. canadensis* e Câmara de aplicação.



Fonte: Autor

Convém ressaltar que as mudas das plantas daninhas *B. pilosa* e *A. retroflexus* estavam no estágio de 3 à 4 folhas verdadeiras, enquanto *C. canadenses* se encontrava em estágio mais avançado de crescimento.

A casa de vegetação, onde foram conduzidos os testes, apresenta um sistema automático de controle de temperatura e umidade relativa, através de ventiladores. O bioensaio visou identificar a capacidade de inibição do desenvolvimento das plantas daninhas diante do formulado. Os sintomas da fitotoxicidade foram realizados visualmente aos 7, 10 e 15 dias após a aplicação dos formulados, e a avaliação utilizada para definir a toxicidade foi baseada segundo conceitos aplicados, (Tabela 10) da Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas- SBCPD, descrevendo detalhadamente os sintomas apresentados pelas plantas.

Tabela 10 - Descrição dos conceitos aplicados às avaliações de toxicidade segundo a SBCPD.

%	Descrição
0 – 20	Sem injúria ou efeito
20 – 40	Injúria leve e/ou redução do crescimento com rápida recuperação
40 – 60	Injúria moderada e/ou redução do crescimento com lenta recuperação ou definitiva
60 – 80	Injúrias severas e/ou redução do crescimento não recuperáveis e/ou redução do estande
80 – 100	Destruição completa da cultura ou somente algumas plantas vivas

Fonte: (SBCPD,1995).

O delineamento utilizado para os bioensaios foi inteiramente casualizado com três repetições de doze plantas para cada formulação, mais a testemunha. Os dados foram submetidos à análise de variância em havendo significância as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, com nível de significância de 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO FITOTÓXICO PRODUZIDO POR *PHOMA* sp. NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES OBTIDAS NA MEMBRANA

Na Tabela 11, observou-se que o ensaio utilizando caldo bruto apresentou valor que diferiu significativamente do valor do processo de utilização de membrana, assim confirmando a necessidade de um tratamento a fim de concentrar os compostos bioativos no caldo antes de sua aplicação na planta.

Tabela 11 - Fitotoxidade em folhas de *C. sativus* das diferentes concentrações obtidas na membrana.

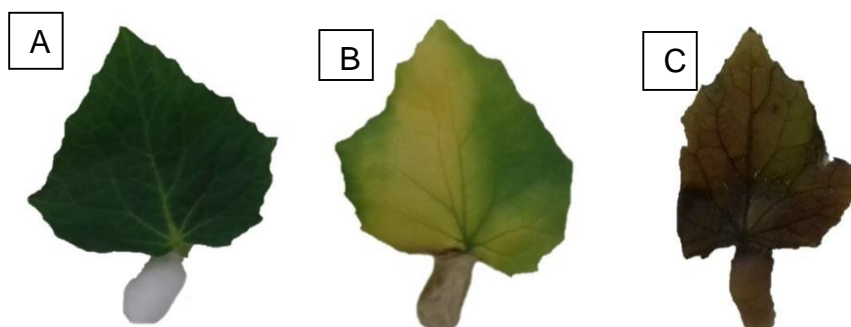
Ensaio	Permeado	Retido
Testemunha	0,00 a	0,00 a
Caldo	36,00 b	36,00 b
10%	30,00 b	60,67 c
30%	32,00 b	80,67 c
50%	44,88 b	47,33 b
70%	39,33 b	29,33 b
90%	30,00 b	33,33 b
CV (%)		26,93

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a nível de 5% de probabilidade de erro.

Conforme os resultados expressos na Tabela 11 as concentrações que apresentaram os melhores resultados foram 10% e 30% no retido. Escolheu-se o ensaio com a fração retido 30%, pois apresentou maior efeito nas plantas teste. Entre os sintomas destacam-se o amarelamento, murchamento e necrose em plantas de *C. sativus* (Figura 9).

A tecnologia que utiliza membranas mostrou-se um processo eficiente, permitindo a concentração e o fracionamento dos compostos com base no peso e tamanho molecular, possibilitando a maximização do efeito bioherbicida.

Figura 9- Comparação das lesões observadas nos ensaios: testemunha (A), caldo (B) e retido 30% (C).



Fonte: Autor

5.2 FORMULAÇÃO

5.2.1 pH

Na Tabela 12 está representado o pH das diferentes formulações, onde verificou-se que os valores dos tratamentos e dos controles sofreram variações, porém não significativas, permanecendo entre 5,6 e 6,6 demonstrando que estes produtos não alteram o pH, segundo Favaretto (2011) descarta que este fator tenha sido responsável por alterações no comportamento nos testes realizados.

Tabela 12 - Matriz do desenho DCCR para avaliar a influência no pH para os formulados de tratamento e controle, nas diferentes concentrações de bioherbicida concentrado, Span[®]80 e Tween[®]80.

(continua)

Formulação	pH	
	Tratamento %	Controle %
Água Destilada	6,0	6,0
Bioherbicida concentrado	5,4	5,4
01	5,7	6,6
02	5,7	6,4
03	5,7	5,7
04	5,6	5,4
05	5,6	5,4
06	5,6	5,7
07	5,7	5,7
08	5,6	5,9

Tabela 12 - Matriz do desenho DCCR para avaliar a influência no pH para os formulados de tratamento e controle, nas diferentes concentrações de bioherbicida concentrado, Span[®]80 e Tween[®]80.

		(conclusão)
09	5,7	5,9
10	5,7	5,9
11	5,7	5,9
12	5,6	5,9
13	5,6	5,8
14	5,7	6,0
15	5,7	6,2
16	5,7	6,2
17	5,7	6,1

Em termos de características para a aplicação dos produtos sobre possíveis plantas daninhas, o pH das 17 formulações permaneceram próximo do valor de pH entre (4,0 a 7,0) que auxilia no aumento da eficiência do produto (ALMEIDA, 2014). Segundo Cunha et al (2009) em pH mais baixo, a taxa de hidrólise é retardada, mantendo a folha úmida por maior tempo, pois a superfície das folhas tem pH neutro, havendo uma interação com o pH da calda.

5.2.2 Densidade

A Tabela 13 apresenta os valores de densidade a 25°C para os 17 formulados do DCCR, com as diferentes concentrações do caldo, Span[®]80 e Tween[®]80. 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 04 (1,0046 g cm⁻³) e o maior para a formulação 14 (1,0134 g cm⁻³). Diferenças não significativa em valores de densidade para as diferentes formulações, adjuvantes e concentrações também foram relatadas por Cunha e Alves (2009).

Tabela 13 - Matriz do desenho DCCR para avaliar a influência na densidade a 25°C para o tratamento e controle, nas diferentes concentrações de bioherbicida concentrado, Span®80 e Tween®80.

Formulação	Densidade	
	Tratamento %	Controle %
Água Destilada	0,9986	0,9986
Bioherbicida concentrado	1,0078c	1,0078j
01	1,0081c	0,9970e
02	1,0065b	0,9945c
03	1,0078c	0,9974e
04	1,0046a	0,9921a
05	1,0094c	0,9980f
06	1,0092c	0,9977f
07	1,0133d	1,0027i
08	1,0133d	1,0004h
09	1,0084c	1,0002h
10	1,0083c	0,9928b
11	1,0083c	0,9971e
12	1,0060b	0,9990g
13	1,0087c	0,9980f
14	1,0134d	1,0026i
15	1,0082c	0,9966d
16	1,0082c	0,9966d
17	1,0082c	0,9966d
CV	0,08	0,04

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a nível de 5% de probabilidade de erro.

5.2.3 Tensão Superficial

Inicialmente foram verificados os valores das tensões superficiais do caldo contendo o bioherbicida concentrado por membrana (100%v/v) e da água, apresentando valores 49,72 mN m⁻¹ e 69,00 mN m⁻¹ respectivamente. Quando comparados os valores de tensão superficial obtidos nas 17 formulações para os tratamentos e controles (Tabela 14), é possível verificar um acentuado decréscimo nos valores em função da adição de surfactantes na calda.

Tabela 14 - Matriz do desenho DCCR para avaliar a influência na tensão superficial para o tratamento e controle, nas diferentes concentrações de bioherbicida concentrado, Span®80 e Tween®80.

Formulação	Tensão Superficial	
	Tratamento %	Controle %
Água Destilada	69,00	69,00
Bioherbicida concentrado	49,72	49,72
01	29,08	31,71
02	28,65	28,85
03	28,12	28,59
04	27,58	30,45
05	29,03	32,57
06	27,00	34,61
07	27,31	29,11
08	30,57	30,43
09	29,69	29,77
10	29,36	31,14
11	31,74	30,55
12	27,05	29,76
13	29,04	29,10
14	34,40	38,19
15	31,16	31,91
16	31,14	31,89
17	31,15	31,90

Observou-se na (Tabela 14) que em todas as formulações houve diferença entre o tratamento e o controle para a tensão superficial. Convém ressaltar que todos os 17 formulados apresentaram menores valores para as tensões superficiais, quando comparado com bioherbicida concentrado (100%v/v - controle) 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).

5.2.4 Aplicação em *C. sativus*

Na Tabela 15 estão apresentados os resultados das avaliações das plantas de *C. sativus* após a aplicação das formulações, bem como os dados referentes às doses utilizadas de adjuvantes (óleo de palma, Span[®]80 e Tween[®]80) e caldo fermentado, de acordo com o planejamento de experimentos.

Tabela 15 - Fitotoxidade a plantas de *C. sativus* em função da formulação com adjuvantes.

Formulações	Fitotoxidade	
	Tratamento %	Controle %
Água Destilada	0,00a	0,00a
Bioherbicida concentrado	22,50b	22,50b
01	50,00c	17,50b
02	90,00f	17,50b
03	78,33e	20,00b
04	89,17f	57,50d
05	35,00b	4,16a
06	82,50f	4,16a
07	38,33b	20,00b
08	50,00c	24,17b
09	48,33c	20,00b
10	67,50e	31,66c
11	37,50b	20,00b
12	77,50e	20,00b
13	40,83b	36,67c
14	70,83e	20,83b
15	60,00d	21,66b
16	60,83d	20,00b
17	61,67d	20,83b
CV	7,66	9,69

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a nível de 5% de probabilidade.

Os resultados mostram que houve efeitos significativos em alguns formulados quanto a fitotoxidade das plantas (Tabela 15). Os tratamentos que apresentaram a maior porcentagem de fitotoxidade em plantas de *C. sativus* foram as formulações 02, 04, e 06, diferindo estatisticamente dos demais (Figura 10). As formulações que

apresentaram menor potencial fitotóxico foram os 05, 07, 11 e 13, não havendo diferença significativa entre os mesmos.

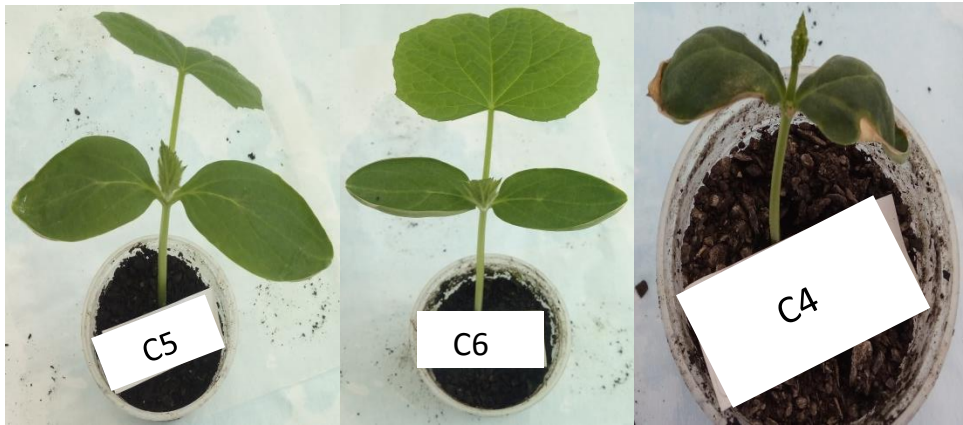
Figura 10- Fitotoxidade as plantas de *C. Sativus* em função da aplicação dos formulados 02, 04, 05, 06, 07, 11 e 13.



Fonte: Autor

Quando se compara as fitotoxidades dos controles com os tratamentos, observou-se que mesmo a aplicação isolada de adjuvantes provocou efeito fitotóxico nas plantas de *C. sativus*. Os controles com a ausência da fitotoxina que apresentaram os melhores resultados, com menor efeito foram as formulações 06 e 05. O maior efeito foi encontrado na formulação 04, ambos diferindo estatisticamente dos demais (Tabela 14 e Figura 11).

Figura 11- Fitotoxidade as plantas de *C. Sativus* em função da aplicação dos controles 05, 06, e 04.

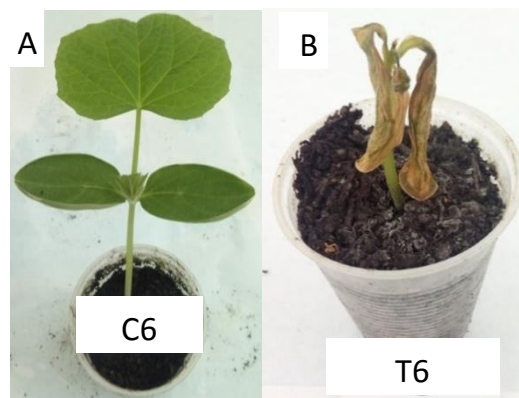


Fonte: Autor

A Figura 12 mostra a comparação entre as lesões ocorridas nas folhas do único formulado que diferiu na escala de fitotoxidade (06). O formulado 06 apresentou severas lesões ao *C. sativus*, diferentemente do seu controle observando-se algumas lesões com baixa severidade, principalmente na borda das folhas.

Na maioria dos formulados foi observado que o uso dos adjuvantes + 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.

Figura 12- Fitotoxidade do formulado 06 em folhas de *C. sativus*: Controle (A) e Tratamento (B).



Fonte: Autor

A aplicação apenas do caldo produzido a partir do *Phoma* sp. desenvolveu sintomas em *C. sativus* como pontuações cloróticas nas folhas, amarelamento e alteração no crescimento (Figura 13). Resultados semelhantes foram encontrados por Vikrant et al. (2006), que ao aplicar os filtrados de cultura de *Phoma herbarum* obtidos por fermentação submersa, observaram danos como: amarelecimento, seguido de murcha acentuada e colapso completo de mudas de *Parthenium hysterophorus* (losna branca). Posteriormente Cimmino et al. (2013), ao testarem o potencial do metabólito *chenopodolin*, produzido pelo fungo *Phoma chenopodicola*, em folhas de *Cirsium arvense* (cardo-rasteiro) e *Setaria viridis* (milhã-de-cabecinha), descreveram sintomas como: lesões por necrose, murchamento e degradação dos tecidos foliares de um modo geral.

O uso dos adjuvantes foi fundamental para o aumento da eficiência do bioherbicida obtido da fermentação de *Phoma* sp. sobre as plantas de *C. sativus*. O uso apenas do Span[®]80 e o óleo de palma (formulado 13) apresentou uma menor eficiência do bioherbicida, quando comparado com a utilização apenas do Tween[®]80 e do óleo de palma (formulado14). Porém a interação dos três componentes causou efeitos mais acentuados como observado no melhor resultado encontrado no formulado 06, (Figura 14).

Figura 13- Danos causados em folhas de *C. sativus* submetidas à aplicação de caldo fermentado de *Phoma* sp. (A) e caldo fermentado de *Phoma* sp + adjuvante (B).



Fonte: Autor

Figura 14- Eficiência do uso dos adjuvantes sobre as plantas de *C. sativus*.



Fonte: Autor

Os adjuvantes classificados como óleos (mineral e vegetal), aumentam a penetração dos herbicidas em contato com a superfície foliar e são comumente utilizados quando as condições climáticas são inapropriadas para aplicação como altas temperaturas, baixa umidade relativa do ar e ventos fortes e/ou quando as cutículas foliares são espessas (TU; RANDALL, 2003; AZEVEDO et al., 2016). O efeito positivo do uso do óleo de palma pode ser observado quando comparados os formulados 09 e 10, com as mesmas doses de Tween[®]80 e Span[®]80 porém variando a dose de óleo (Figura 15). Assim como os formulados 02, 04 e 06 com maior concentração de óleo de palma obteve-se melhores resultados na fitotoxicidade. No entanto, este comportamento não foi observado entre as formulações 01, 03, 05 e 07 que apresentam doses menores de óleo de palma e restante da formulação semelhantes (Figura 16).

Figura 15- Demonstração das lesões observadas pelos formulados 09 e 10.



Fonte: Autor

Figura 16- Demonstração das lesões observadas nos formulados com maior (02, 04, 06) e menor (01, 03, 05 e 07) concentração de óleo.



Fonte: Autor

A utilização dos surfactantes proporciona uma melhor distribuição do inóculo nas superfícies das plantas e aumentam a infecção das plantas por agentes patogênicos através da penetração direta das células microbianas através dos estômatos (HOAGLAND et al., 2007; PIYABOON et al., 2016). Dagno et al. (2011) relataram que *C. malorum* + óleo de palma e *Alternaria jacinthicola* + óleo de palma produziram maior grau de severidade da doença do que os fungos sem o surfactante em Jacinto de água em estufa e condições de campo.

Para melhores resultados na aderência na cutícula da folha e para aumentar as propriedades de dispersão dos ingredientes ativos são adicionados em produtos fitossanitários os surfactantes (HAZEN, 2000; AZEVEDO et al., 2016) por serem constituídos por uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica que permitem a formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, para romper a tensão superficial e interfacial da água (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Os bioherbicidas lipofílicos penetram através da cutícula da planta 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).

Weaver et al. (2009) relatam que o valor do EHL de um adjuvante pode aumentar a bioatividade de um bioherbicida e melhorar as propriedades químicas de uma formulação. O resultado positivo do formulado 06, com alto valor de EHL, pode ter ocorrido pela maior concentração de óleo de palma. Os óleos vegetais agem dissolvendo as gorduras componentes da cutícula, com a eliminação destas barreiras há maior penetração dos herbicidas hidrófilos pela cutícula (DURIGAN, 1992; VARGAS; ROMAN, 2006).

5.3 APLICAÇÃO EM PLANTAS DANINHAS

Os resultados obtidos nesta seção do trabalho têm o objetivo de mostrar o potencial de *Phoma* sp. para ser aplicado como um bioherbicida no controle de plantas daninhas em pré e pós-emergência. Convém ressaltar que para os testes em pré-emergência foi utilizado o bioherbicida concentrado – retido 30% e para os testes de pós-emergência foi utilizado a formulação 06 com maior eficiência, bem como as condições que apresentaram diferentes concentrações de óleo em suas formulações (03 e 15).

5.3.1 Pré-emergência

5.3.1.1 Câmara de Germinação (BOD)

A avaliação demonstrou que existe um efeito bioherbicida no caldo contendo metabólitos de *Phoma* sp., para as espécies de plantas daninhas em relação à porcentagem de germinação (Tabela 16).

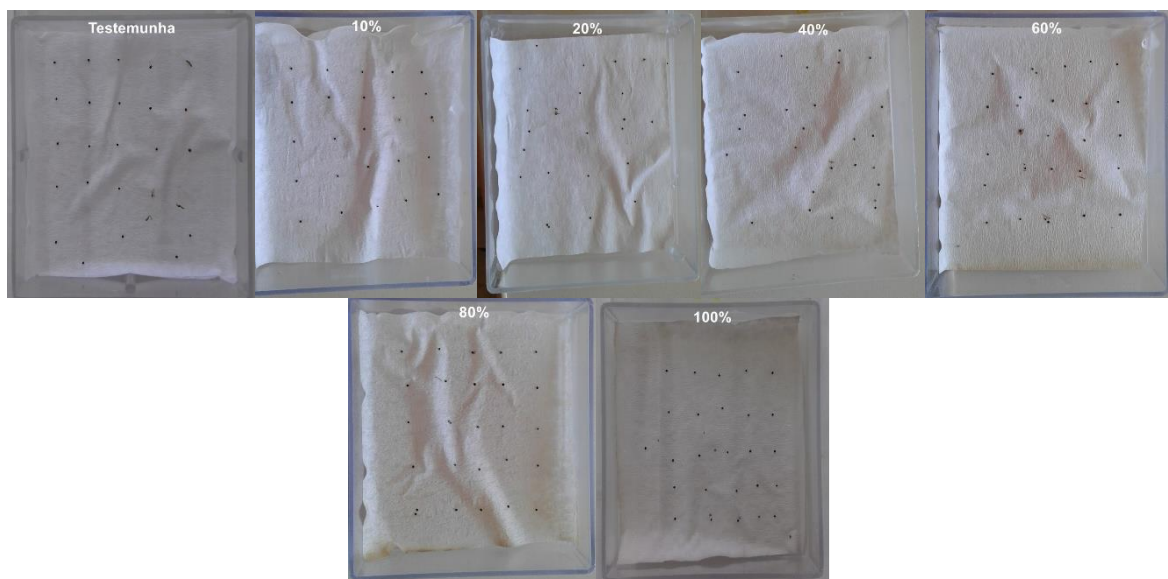
Todos os ensaios (10, 20, 40, 60, 80 e 100%) apresentaram efeito inibitório na germinação de *B. pilosa* e *A. retroflexus* na primeira e segunda contagem, sendo que na segunda contagem a inibição foi de 100% na germinação em todos os ensaios, diferente da testemunha onde houve 30% de inibição da germinação para *A. retroflexus* e 20% para *B. pilosa* (Figuras 17 e 18). Assim os resultados apresentados na Tabela 15, mostram que os ensaios foram eficientes, pois não houve diferença significativa, exceto para o T 10% para primeira contagem de *A. retroflexus*.

Tabela 16 - Porcentagem de inibição da germinação na primeira e segunda contagem de *B. pilosa* e *A. retroflexus* para cada ensaio em câmara de germinação.

Ensaio	<i>B. pilosa</i>		<i>A. retroflexus</i>	
	1ª contagem	2ª contagem	1ª contagem	2ª contagem
Testemunha (Água Destilada)	50 b*	20 b	60 b	30 b
T10%	100 a	100 a	90 b	100 a
T20%	100 a	100 a	100 a	100 a
T40%	100 a	100 a	100 a	100 a
T60%	100 a	100 a	100 a	100 a
T80%	100 a	100 a	100 a	100 a
T100%	100 a	100 a	100 a	100 a
CV %	8	4	10	7

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a nível de 5% de probabilidade.

Figura 17- Inibição da germinação de *A. retroflexus* 10 dias após a aplicação dos ensaios.



Fonte: Autor

Figura 18- Inibição da germinação de *B. pilosa* 10 dias após a aplicação dos ensaios.



Fonte: Autor

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 demonstram que a utilização de metabólitos de *Phoma* sp. apresentam um amplo espectro de ação em pré-emergência.

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*, sendo que as sementes foram consideradas não germinadas quando não apresentaram a protusão radicular. Já Phattanawasin 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.

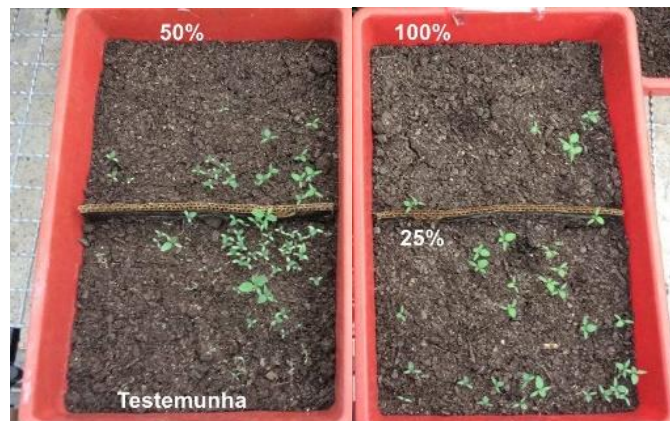
O controle por meio de um bioherbicida pré-emergente, possibilita redução na emergência e na competição, principalmente na fase inicial do estabelecimento da cultura, propiciando ainda ao longo do tempo a redução no banco de sementes. A

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).

5.3.1.2 Casa de Vegetação

Na Figura 19 estão apresentados os resultados da inibição de germinação de *A. retroflexus* após 15 dias da aplicação nas diferentes concentrações (100, 50 e 25 %). As figuras apresentadas mostram que todos os ensaios apresentaram efeito inibitório, porém não apresentando inibição total. Destaca-se o ensaio 100%, o qual apresentou a menor taxa de germinação quando comparado com a testemunha. Convém ressaltar que com o aumento da concentração obteve-se melhores resultados.

Figura 19- Inibição da germinação de *A. retroflexus* aos 15 dias após a aplicação dos ensaios em casa de vegetação.



Fonte: Autor

Na fase de germinação as sementes absorvem maiores quantidades de água, por consequência seus tecidos ficam mais tenros. Nesta circunstância há uma maior probabilidade de penetração da fitotoxina ocasionando a podridão de pré-emergência, ocasionando a não germinação das sementes (VALE et al., 2001).

Quando aplica-se um herbicida em pré-emergência (ao solo) sua atividade ocorre por diferentes processos e com velocidades distintas, influenciadas pelas propriedades físico-químicas da molécula, pelos atributos do solo, pelas condições

ambientais ou pela interação desses fatores (VIVIAN et al., 2006). Portanto, a atividade das fitotoxinas destes bioensaios podem ter sofrido a influência desses processos em maior ou menor grau, dependendo da natureza química da fitotoxina, a qual é desconhecida ainda.

5.3.2 Pós-emergência

A partir da melhor condição encontrada nos resultados anteriores (formulado 06), quanto ao desempenho das diferentes formulações utilizando adjuvantes em *C. sativus*, foram realizados testes sobre as plantas daninhas (*A. retroflexus*, *B. pilosa* e *C. canadensis*). Vale ressaltar que também foram testadas as formulações 03 e 15 por apresentarem diferentes concentrações de óleo em suas formulações. Para cada formulado foram testadas diferentes vazões (100, 200 e 300 L ha⁻¹) e avaliados após uma e duas aplicações.

A Tabela 17, 18 e 19 apresenta os resultados dos três formulados (03, 06 e 15) e controles, aplicados em diferentes vazão em *A. retroflexus*, *B. pilosa* e *C. canadensis*, mostrando o desenvolvimento das plantas daninhas durante as etapas de aplicação do bioherbicida.

Tabela 17 - Controle de *A. retroflexus* em função da aplicação de diferentes vazões e de formulação do fungo *Phoma* sp.

Formulação	Vazão de aplicação (L ha ⁻¹)		
	100	200	300
03	20 – 40%	40 – 60%	40 – 60%
06	20 – 40%	40 – 60%	60 – 80%
15	20 – 40%	20 – 40%	40 – 60%

Tabela 18 - Controle de *B. pilosa* em função da aplicação de diferentes vazões e de formulação do fungo *Phoma* sp.

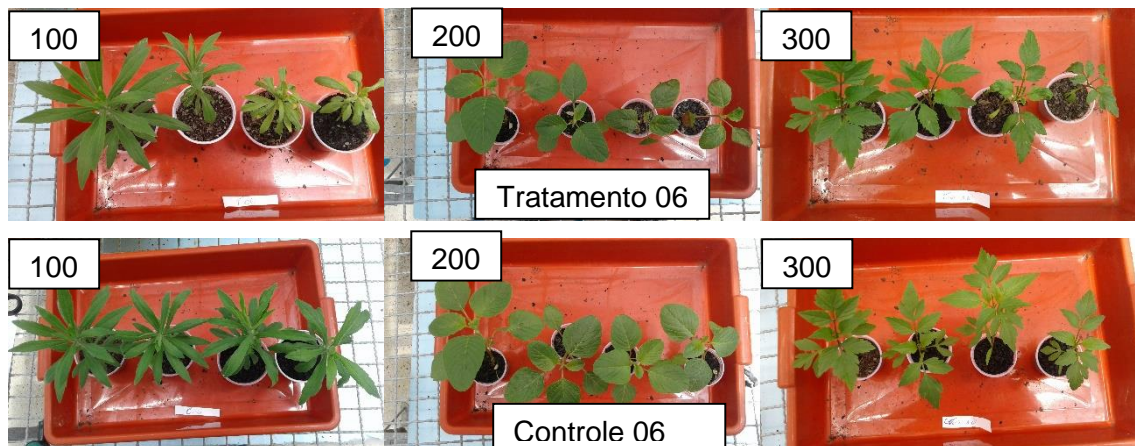
Formulação	Vazão de aplicação (L ha ⁻¹)		
	100	200	300
03	20 – 40%	20 – 40%	20 – 40%
06	0 – 20%	20 – 40%	20 – 40%
15	0 – 20%	20 – 40%	20 – 40%

Tabela 19 - Controle de *C. canadensis* em função da aplicação de diferentes vazões e de formulação do fungo *Phoma* sp.

Formulação	Vazão de aplicação (L ha ⁻¹)		
	100	200	300
03	20 – 40%	40 – 60%	40 – 60%
06	0 – 20%	40 – 60%	40 – 60%
15	0 – 20%	40 – 60%	20 – 40%

Dentre os produtos testados, o que apresentou maior controle foi o formulado 06 diferindo dos demais, quando comparado com seu controle (Figura 20), evidenciado que a maior concentração de óleo torna a formulação mais eficiente.

Figura 20- Efeito do bioherbicida aplicado em diferentes vazões: 100, 200 e 300 L ha⁻¹, sobre as plantas daninhas *B. pilosa*, *A. retroflexus* e *C. canadensis* para tratamento e controle na formulação 06.



Fonte: Autor

Com as vazões 100, 200 e 300 L ha⁻¹, aplicando-se uma única vez foram observadas no 3º dia apenas um pequeno murchamento, destacando-se que para o *A. retroflexus*, não foram visualizados quaisquer sintomas (Figura 21).

As plantas daninhas também foram avaliados no 7º e 15º dia após a aplicação dos formulados, porém no 15º dia demonstraram capacidade da recuperação da injúria, havendo redução de controle (Figura 22).

Figura 21- Efeito apresentado por *A. retroflexus* após o 3º dia da aplicação na vazão de 300 L ha⁻¹, comparando-se com a testemunha.



Fonte: Autor

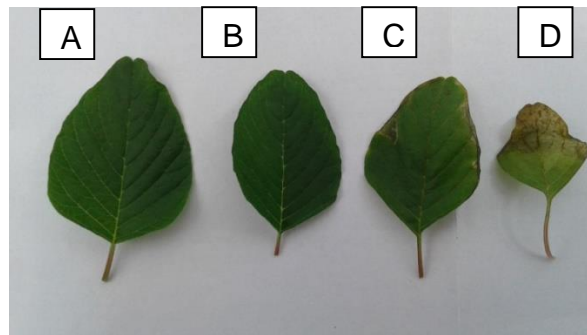
Figura 22- Aplicação única em *A. retroflexus*, *B. pilosa* e *C. canadensis* em diferentes vazões 100 L ha⁻¹ (A), 200 L ha⁻¹ (B) e 300 L ha⁻¹ (C), comparando-se com a testemunha (D). Avaliação ao 15º dia.



Fonte: Autor

Observou-se efeito positivo nas plantas daninhas, nos formulados que foram realizadas duas aplicações. Os sintomas de controle foram evoluindo proporcionalmente com as diferentes vazões aplicadas como pode-se observar na Figura 23 nas folhas de *A. retroflexus*. É importante salientar que as plantas apresentaram efeito fitotóxico significativo ao 7º dia aumentado no 15º dia de avaliação.

Figura 23- Evolução do controle nas folhas de *A. retroflexus* usando-se o formulado 06, em aplicação de diferentes vazões: testemunha (A), 100 L ha⁻¹ (B), 200 L ha⁻¹ (C) e 300 L ha⁻¹ (D).



Fonte: Autor

Das características observadas, tem-se a mudança na coloração das folhas que ganham um tom amarelado, o aparecimento de manchas na cor marrom (correspondentes à área atingida pela pulverização) e a apoptose de algumas folhas.

Com o formulado 06 na vazão 300 L ha⁻¹, os sintomas de controle tiveram início 48 h após a aplicação, diferenciando-se de intensidade para cada planta daninhas testada. Dos efeitos observados em *C. canadensis* destaca-se a mudança na coloração das folhas que ganham um tom amarelado iniciando nas extremidades, bem como inibição do crescimento, para *B. pilosa* os efeitos foram os mesmos apresentado em *C. canadensis*, porém menos evidentes. Destaca-se entre as plantas daninhas *A. retroflexus*, onde se observou os mesmos sintomas, porém em intensidade maior, também apresentou manchas na cor marrom bem acentuada, seguidas de necrose, provocando queda das mesmas (Figura 24).

Figura 24- Controles observados *B. pilosa*, *C. canadensis*, *A. retroflexus* em diferentes intensidades.



Fonte: Autor

Sintomas semelhantes também foram observados por Chung et al., (1998) ao avaliarem o potencial bioherbicida de *Plectosporium tabacinum* em *Sagittaria trifolia*. 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*.

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 obteve

redução em 31% na altura das plantas e a redução dos números de plantas vivas ao final do experimento.

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).

6 CONCLUSÃO

- A utilização da membrana para concentrar os metabólitos secundários de *Phoma* sp., mostrou-se eficiente. O melhor resultado foi encontrado na fração retido 30%.
- O uso de adjuvantes nas formulações potencializa o efeito bioherbicida de *Phoma* sp. A melhor condição na formulação foi para 06, com 8,2 % de óleo de palma, 2,8 % de adjuvantes e EHL de 12,8.
- A utilização do óleo de palma com o Span[®]80 apresenta menor eficiência, quando comparado ao óleo de palma e Tween[®]80.
- Em pré-emergência o bioherbicida teve melhor efeito do que em pós-emergência.
- O microrganismo *Phoma* sp. tem potencial de uso como bioherbicida, tanto para pré-emergência como pós-emergência, de *B. pilosa*, *C. canadensis*, especialmente para o *A. retroflexus*;
- Em pós-emergência os melhores resultados foram obtidos com duas aplicações de 300 L ha⁻¹.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Embora o processo desenvolvido neste trabalho tenha apresentado possível potencial de aplicação, alguns aspectos precisam ser investigados e aprimorados. Desta forma, algumas sugestões para trabalhos futuros são elencadas a seguir:

- Utilização de diferentes tipos de membranas, para a purificação e concentração dos fermentados produzidos;
- Avaliações mais precisas na pré-emergência em casa de vegetação, utilizando outras plantas daninhas;
- Realização de bioensaios em condições de campo, com aplicações em pré e pós-emergência das plantas;
- Realização da análise de clorofila antes e após a aplicação da fitotoxina + adjuvante.
- Realização de análises cromatográficas para caracterização química.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINETTO, D.; VARGAS L. **Resistência de Plantas Daninhas a Herbicidas no Brasil**. 2ª Ed. Editora: UFPel, 2014, p. 398.
- 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. Conceitos básicos da tecnologia de aplicação de defensivos para a cultura da soja. **Boletim de Pesquisa de Soja 2009**. Rondonópolis: Fundação Mato Grosso, v. 13, 2009. p. 299-317.
- 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.
- 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.
- ASH, G. J. The science art business of successful bioherbicides. **Biological Control**, v. 52, 230–240, 2010.
- AZEVEDO, J.L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L. (coords) Ecologia microbiana, **Editora Embrapa/CNPMA**, Jaguariuna, p.445-461, 1998.
- AZEVEDO, L.A.S. **Proteção integrada de plantas com fungicidas**. Emopi. Campinas, Brasil, 2007, 284 p.
- AZEVEDO, M. G. et al. **Determinação da Tensão Superficial de Soluções com Adjuvantes**. In: 1º Encontro Internacional de Ciências Agrárias e Tecnológicas Crise: tecnologias para a superação de desafios no setor agrário. 2016.
- 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, p. 245-266, 2014.
- BAILEY, K. L. et al. The effects of *Phoma macrostoma* on nontarget plant and target weed species. **Biological Control**, v. 58, 379–386, 2011.
- BAILEY, K.L. et al. The effect of fertilizers on the efficacy of the bioherbicide, *Phoma macrostoma*, to control dandelions in turfgrass. **Biological Control**, v. 65, p.147–151, 2013.
- BAILEY, K.L.; DERBY, J. Fungal isolates and biological control compositions for the control of weeds. **US Patent Application** Serial No. 60/294475. Filed aug. 10, 2010.

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 jan. 2017.

BALBINOT JR., A. A. et al. Predação de sementes de plantas daninhas em áreas cultivadas. **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p. 707-714, 2002.

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.

BARTON, J. How good are we at predicting the Field host-range of fungal pathogens used for classical biological control of weeds? **Biological Control**. v. 31, p. 99–112, 2004.

BASTOS, B. O. **Produção de herbicida por fermentação em estado sólido utilizando o fungo *diaporthe* sp.** 2016. 52p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

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.

BOEREMA, G. et al. **Phoma identification manual: differentiation of specific and infraspecific Taxa in culture**; CABI publishing: Wallingford,UK, 2004, 479 p.

BORGES NETO, C. R. et al. Efeito de adjuvantes no crescimento e infectividade do fungo *Cercospora caricis*, agente de biocontrole da tiririca. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília - DF, v. 23, n.4, p. 502-502, 1998.

BORGES NETO, C. R.; PITELLI, R. A. Adjuvantes e herbicidas e a infectividade de *Fusarium graminearum*, agente potencial de biocontrole de *EGERIA DENSA* E *EGERIA NAJAS*. **Planta Daninha**, v. 22, n.01, p. 77-83, 2004.

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

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. **3 Biotech**, 6:230, 2016. DOI 10.1007/s13205-016-0557-9

BURNSIDE, O. C. Rationale for developing herbicide-resistant crops. **Weed Technology**, v. 6, n. 3, p. 621-625, 1992.

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

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.

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.

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.; BIASSETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos. Produtos Naturais. **Revista Virtual Química**, v. 5, n. 3, p. 421-437, 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, In: **Microbial Control of Weeds**, D. O. Tebeest, ed., New York, Chapman and Hall, p.24-57, 1991.

CHENG, J. D. et al. Production, survival and *Coniothyrium minitans* conidia produced in shaken liquid culture. **FEMS Microbiology Letters**. v. 227, p. 127-131, 2003.

CHERYAN, M. Ultrafiltration and Microfiltration Handbook. Lancaster: **Technomic Publishing Company**, p. 552, 1998.

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.

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**. 3^o ed. Piracicaba: HRAC-BR, 2008. p. 3-30.

CHUNG, Y.R. et al. Potential of an indigenous fungus, *Plectosporium tabacinum*, as a mycoherbicide for control of arrowhead (*Sagittaria trifolia*). **Plant Disease**, v. 82, n. 6, p. 657-660. 1998.

CIMMINO, A et al. *Chenopodolin*: A Phytotoxic Unrearranged ent -Pimaradiene Diterpene Produced by *Phoma chenopodicola*, a Fungal Pathogen for *Chenopodium album* Biocontrol. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 7, p. 1291–1297, 2013.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos: Safra 2016/17**, v. 4, n. 4, p. 1-176, 2017.

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 subquadripata* e *Panicum repens*. *Planta Daninha*, v. 23, n. 2, p. 295-304, 2005.

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

DAGNO K. et al. Production and oil-emulsion formulation of *Cadophora malorum* and *Alternaria jacinthicola*, two biocontrol agents against water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). **African Journal of Microbiology Research**, v.5, 924–929, 2011.

DAI, J. et al. Novel Highly Substituted Biraryl Ethers, Phomosines D–G, Isolated from the Endophytic Fungus *Phomopsis* sp. from *Adenocarpus foliolosus*. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 23, p. 5100–5105, 2005.

DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. Natural products in crop protection. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, p. 4022 – 4034, 2009.

DEMAIN, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, p. 185–201, 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.

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

DUKE, S. O. et al. Natural products as sources of herbicides: Current status and future trends. **Weed Research**, v. 40, n. 1, p. 99–111, 2000.

DURIGAN, J. C. Efeito de adjuvantes na calda e do estágio de desenvolvimento das plantas, no controle do capim-colonião (*Panicum maximum*) com glyphosate. **Planta Daninha**, v. 10, p. 39-44, 1992.

ELLIOTT, M.S. et al. Supplemental host range of *Araujia mosaic virus*, a potential biological control agent of moth plant in New Zealand. **Australasian Plant Pathology**, v. 38, p. 603-607, 2009.

EVIDENTE, M. et al. Phytotoxins produced by *Phoma chenopodiicola*, a fungal pathogen of *Chenopodium album*. **Phytochemistry**. v. 117, p. 482–488, 2015.

FARM CHEMICALS. Farmchemicals international. 2013. Disponível em: <<http://www.farmchemicalsinternational.com/article/print/34161/> 6/11/2013>. Acesso em: 01 fev. 2017.

FAVARETTO, A. et al. Seedling growth of white clover treated with root and leaf aqueous extract of tough lovegrass. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 40, n. 6, p. 1168-1172, 2011.

FERRELL, J. et al. Effects of selected herbicides on the efficacy of tobacco mild green mosaic virus to control tropical soda apple (*Solanum viarum*). **Weed Science** v. 56, n.1, p. 128-132, 2008.

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

FOX, E. M.; HOWLETT, B. J. Secondary metabolism: Regulation and role in fungal biology. **Current Opinion Microbiology**, v. 11, p. 481–487, 2008.

FRANCISCHINI, A.C. et al. Resistance of *Amaranthus retroflexus* to Aceto lactatesyn thase 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, 3^a ed., p 29-45, 1986.

GARBIN, S. et al. **Seleção de fungos patogênicos com potencial fitotóxico para Controle de plantas daninhas**. In: VI Jornada de Iniciação Científica e Tecnológica UFFS – Campus Chapecó. 2016.

GARCÍA, L. F.; BLANCO, S. Á.; RODRÍGUEZ, F. A R. Microfiltration applied to dairy streams: removal of bactéria. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 187–196, 2013.

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.

GHORBANI, R.; LEIFERT, C.; SEEL, W. Biological control of weeds with antagonistic plant pathogens. **Advances in Agronomy**. v. 86, p.191-225, 2005.

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 17-48, 2000.

GIRALDO-ZUNIGA, A. D. et al. Tecnologias aplicadas ao processamento do soro de queijo. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 59, n. 340-341, p. 53-66, 2004.

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.

GRAUPNER, P. R. et al. The macrocidins: novel cyclic tetramic acids with herbicidal activity produced by *Phoma macrostoma*. **Natural Products**. v. 66, 1558-1561, 2003.

GRAUPNER, P.R. et al. Chlorosis inducing phytotoxic metabolites: new herbicides from *Phoma macrostoma*. In: Rimando, A.M., Duke, S.O. (Eds.), **Natural Products for Pest Management**. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 37– 47, 2006.

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

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

GRONWALD, J. W. et al. Assessment of *Pseudomonas syringae* pv. tagetis as a biocontrol agent for Canada thistle. **Weed Science**, v. 50, n. 3, p. 397-404. 2002.

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.

HALLETT, S.G. Where are all the bioherbicides? **Weed Science Society of America**. v. 53, n. 3, p. 404-415, 2005.

HARDING, D. P. **Effects of Bacterial Endophytes from the Genus Zea on Non-Native Host Species in the Context of Application to Biological Weed Control**.

2016. 192 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura de Plantas) - Universidade de Guelph, Ontário, Canadá, 2016.

HAZEN, J. L. Adjuvants-terminology, classification, and chemistry. **Weed Technology**, v. 14, n. 4, p. 773-784, 2000.

HEAP, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponível em: <<http://www.weedscience.org>>. Acesso em: 08/10/2016.

HELDMAN, D. R.; LUND, D. B. **Handbook of Food Engineering**. 2ª edição. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2007. 1040 p.

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, 1997. p. 38-61.

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.

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

IOST, C. A. R.; RAETANO, C. G. Tensão superficial dinâmica e ângulo de contato de soluções aquosas com surfactantes em superfícies artificiais e naturais. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 30, n.4, p.670-680, 2010.

JABRAN, K. et al. Allelopathy for weed control in agricultural systems. **Crop Protection**. v. 72, p. 57-65, 2015.

JALGAONWALA, R. E.; MOHITE, B. V.; MAHAJAN, R.T. A review: Natural products from plant associated endophytic fungi. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 21-32, 2011.

JAVAID, A., ALI, S. Alternative management of a problematic weed of wheat *Avena fatua* L. by metabolites of *Trichoderma*. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v.71, n. 2, p. 205-211, 2011.

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. **An overview regarding bioherbicide and their production methods by fermentation**. In: GUPTA, V. K.; MACH, R. L.; SREENIVASAPRASAD, S. (Org.). Fungal Bio-Molecules: Sources, Applications and Recent Developments. 1ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2015, v. 1, p. 183-200.

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, Santa Maria, 2014.

LI, Y. et al. Research progress on microbial herbicides. **Crop Protection**, v.22, p. 247–252, 2003.

MARTINS, D. et al. Ação de adjuvantes na absorção e translocação de glyphosate em plantas de aguapé (*Eichhornia crassipes*). **Planta Daninha**, v.27, n.1, p.155-163, 2009.

MATTA, V.M.; CABRAL, L.M.C.; SILVA, L.M.M. Suco de acerola microfiltrado: avaliação da vida-de-prateleira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 293- 297, 2004.

MATUO, T.; NAKAMURA, S. H.; ALMEIDA, A. Efeito de alguns adjuvantes da pulverização nas propriedades físicas do líquido. **Summa Phytopathologica, Jaguariuna**, v. 15, n. 2, p. 163-173, 1989.

MCDougall, P. The global agrochemical market in 2010 – **preliminary 275 review**. 2014. Disponível em: <<http://www.phillipsmcdougall.com>>. Acesso em: 14 dez. 2016.

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.

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.

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.

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.

MOUZA, W. K.; RAIZADA, M. N. The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: an interdisciplinary perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, 2013.

NEUMANN, S.; BOLAND, G.J. Influence of selected adjuvants on disease severity by *Phoma herbarum* on dandelion (*Taraxacum officinale*). **Weed Technology**, v. 13, n. 4, p. 675-679, 1999.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

OLIVEIRA JR, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Ominipax, Curitiba, Brasil, 2011. 348 p.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de alimentos**: componentes dos alimentos e processos. Porto Alegre: Artmed, v. 1, 2005a. 294 p.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de alimentos**: alimentos de origem animal. Porto Alegre: Artmed, v. 2. 2005b. 280 p.

PARRA, R.; ALDRED, D.; MAGAN, N. Medium optimization for the production of the secondary metabolite squalenolone S1 by a *Phoma* sp. combining orthogonal design and response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 704-711, 2005.

PEDRAS, M. S. C.; AHIAHONU, P. W. K. Phytotoxin production and phytoalexin elicitation by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Chemical Ecology** v. 30, p. 2163-2179, 2004.

PEREIRA, R. B. et al. Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil no manejo da cercosporiose-do-cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 10, p. 1287-1296, 2008.

PES, M. P. et al. Bioherbicide based on *Diaporthe* sp. secondary metabolites in the control of three tough weeds. **African Journal of Agricultural Research**. v. 11, p. 4242-4249, 2016.

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.

PINHEIRO, N. C. **Aproveitamento energético de gás de aterro para produção de energia utilizando membranas para purificação do biogás**. 2015. 93p. Projeto

Final (Curso de Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2015.

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

PYLRO, V.S. et al. Brazilian Microbiome project: Revealing the Unexplored microbial diversity – Challenges and Prospects. **Microbial Ecology**, v. 67, p. 237–241, 2013.

RAI, M. et al. *Phoma saccardo*: Distribution, secondary metabolite production and biotechnological applications. **Critical Reviews in Microbiology**. v. 35, n. 3, p. 182–196, 2009.

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 Society of America**. v. 61, n. 4, p. 580-585, 2013.

SANTOS, F. M. et al. Differential susceptibility of biotypes of *Conyza sumatrensis* to Chlorimuron-ethyl herbicide. **Planta Daninha**, v. 32, n. 2, p. 427-435, 2014.

SASAKI, R. S. et al. Adjuvantes nas propriedades físicas da calda, espectro e eficiência de eletrificação das gotas utilizando a pulverização eletrostática. **Ciência Rural**, v.45, n.2, p.274-279, 2015.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. Review: The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, p. 661-686, 2005.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Revista Floresta**, v.30, p.129-37, 2000.

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.

SELBMANN, L. et al. Production and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE 5080. **Res. Microbiol.**, v. 153, p. 585–592, 2002.

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. (Eds. 3). **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2012. p. 7.

SINGHANIA, R. R. et al. 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.

SINHA, S.; SINHA, S. Studies on the production of acid protease by submerged fermentation. **International Journal of Food Engineering**, v. 5, 2009.

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, p. 1–21, 2013.

SMITH, J. et al. Weed control spectrum and turfgrass tolerance to bioherbicide *Phoma macrostoma*. **International Journal of Pest Management**. v. 61, n. 2, p. 91-98, 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS - SBCPD. **Procedimentos para instalação, avaliação e análise de experimentos com herbicidas**. p. 42, 1995.

SOUZA, A. Q. L. et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazonica**, v.34, n.2, 2004.

STEWART-WADE, S.M.; BOLAND, G.J. Oil emulsions increase efficacy of *Phoma herbarum* to control dandelion but are phytotoxic. **Biocontrol Science and Technology**. v. 15, n. 7, p. 671-681, 2005.

STONE J. K.; BACON, C. W.; WHITE, J. F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined, in: BACON, C. W.; WHITE, J. F. (Eds.), **Microbial Endophytes**, Marcel Dekker Inc., New York, p. 3-29, 2000.

STRATHMANN, H. Synthetic membranes and their preparation. In: Porter, M.C. (Ed.) **Handbook of industrial membrane technology**. New Jersey: Noyes Publications, 1990.

TANG, X.; DONG, J.; LI, X. A comparison of spreading behaviors of Silwet I-77 on dry and wet lotus leaves. **Journal of Colloid Interface Science**, v. 325, p. 223-227, 2008.

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.

TU, M.; RANDALL, J. M. Adjuvants. In: TU, M.; HURD, C.; RANDALL, J. M. **Weed control methods handbook the nature conservancy**. Davis: TNC, 2003. p. 1-24.

- VALE, F. X. R. do et al. **Importância do manejo integrado de doenças**. In: SILVA, L. H. C. da; CAMPOS, J. R.; NOJOSA, G. B. de A. (Eds.). Manejo integrado de doenças e pragas em hortaliças. Lavras: UFLA, p. 39-90, 2001.
- VAN REIS, R.; ZYDNEY, A. Membrane separation in biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, p. 208-211, 2001.
- 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.
- VARGAS, L.; ROMAN, E. S. **Conceitos e aplicações dos adjuvantes**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, (Documentos, 56). 2006. 10 p.
- VENTUROSOSO, L. R. et al. Influência de diferentes metodologias de esterilização sobre a atividade antifúngica de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.4, p.499-505, 2010.
- VERONESE, R. - **Oportunidades, demanda regulatória e de pesquisa e uso de adjuvantes siliconados na agricultura**. 2015. 125 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba, 2015.
- VIKRANT, P. et al. Characterization of a phytotoxin from *Phoma herbarum* for management of *Parthenium hysterophorus* L. **Journal of Phytopathology**, v. 154, n. 7-8, 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.
- VIVIAN R. et al. Persistência de sulfentrazone em Argissolo Vermelho-Amarelo cultivado com cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 24, p. 741-750, 2006.
- WEAVER, M. A. 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.
- WEISSMANN, R., UGGLA, C., GERHARDSON, B. Field performance of a weed-suppressing *Serratia plymuthica* strain applied with conventional spraying equipment. **BioControl**, 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.

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.

YU, X. et al. Effects of carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio on growth, conidiation, spore germination and efficacy of the potential bioherbicide *Colletotrichum coccodes*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 20, p. 333–338, 1998.

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.