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

Bruna de Oliveira Bastos

PRODUÇÃO E FORMULAÇÃO DE HERBICIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO O FUNGO *Diaporthe* sp.

Santa Maria, RS.
2016

Bruna de Oliveira Bastos

PRODUÇÃO E FORMULAÇÃO DE HERBICIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO O FUNGO *Diaporthe* sp.

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

Orientador: Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti
Co-orientadora: Prof. Dra. Aniela Pinto Kempka

Santa Maria, RS
2016

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

de Oliveira Bastos, Bruna
Produção e formulação de herbicida por fermentação em estado sólido utilizando o fungo *Diaporthe* sp. / Bruna de Oliveira Bastos.- 2016.
55 p.; 30 cm

Orientador: Marcio Antonio Mazutti
Coorientadora: Aniela Pinto Kempka
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, RS, 2016

1. Adjuvantes 2. Herbicida 3. Formulação 4. Plantas daninhas 5. *Cucumis sativus* I. Antonio Mazutti, Marcio II. Pinto Kempka, Aniela III. Título.

Bruna de Oliveira Bastos

PRODUÇÃO E FORMULAÇÃO DE HERBICIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO O FUNGO *Diaporthe* sp.

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

Aprovado em 24 de agosto de 2016:

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

Aniela Pinto Kempka, Dra. (UDESC)
(Co-orientadora)

Emanuele Junges, Dra. (IFFarroupilha)

Valéria Dal Prá, Dra.

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

Aos meus pais, Jorge e Regina, pelo incentivo que me deram em dar continuidade a este trabalho e pela confiança que depositaram em mim. E a minha irmã Juliana, pela troca de ideias e apoio em todas etapas.

Ao meu noivo Gabriel Deobald, pelo amor e apoio em todos momentos, ajudando nos trabalhos e sendo fundamental para a sua conclusão, me fez acreditar que seria capaz, tendo paciência e compreensão com as dificuldades encontradas, não há palavras que possam agradecer.

Aos colegas do Laboratório de Bioprocessos, que de alguma forma me auxiliaram nas atividades no laboratório.

Ao professor Marcio Antonio Mazutti, pela orientação e confiança que depositou em mim e em meu trabalho, que desde o início me incentivou e acreditou que conseguiria.

A professora Aniela Pinto Kempka, pela co-orientação e pela disponibilidade em ajudar em todos os momentos.

A Emanuele Junges, sempre auxiliando nos momentos em que precisei, com conselhos e soluções para todos os problemas.

A Valéria Dal Prá, por compor a banca examinadora deste trabalho e pela ajuda prestada.

Aos colegas da Epagri, Mircon Frühauf, Celso Bach, Adriane Menin e Terezinha Franzon, que sempre me incentivaram a dar continuidade e concluir este trabalho.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola pela oportunidade oferecida.

A Universidade do Estado de Santa Catarina e aos seus alunos e funcionários que de alguma forma ajudaram a conduzir os trabalhos no laboratório.

Muito obrigada!

RESUMO

PRODUÇÃO E FORMULAÇÃO DE HERBICIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO O FUNGO *Diaporthe* sp.

AUTORA: Bruna de Oliveira Bastos
ORIENTADOR: Marcio Antonio Mazutti
CO-ORIENTADORA: Aniela Pinto Kempka

O controle de plantas daninhas é realizado principalmente através de herbicidas químicos. Atualmente, tem-se buscado métodos mais sustentáveis no manejo destas plantas e as fitotoxinas produzidas por micro-organismos apresentam-se como alternativas. O objetivo deste trabalho foi a produção de herbicida por fermentação em estado sólido (FES) a partir do fungo *Diaporthe* sp. O potencial fitotóxico do caldo fermentado foi avaliado no controle da planta teste *Cucumis sativus* - pepino. Os experimentos foram divididos em duas etapas. Na etapa 1, foi realizada FES utilizando 10 gramas de bagaço de cana de açúcar, suplementados com água de maceração de milho e farelo de soja e inoculados com a biomassa fúngica macerada, de acordo com o planejamento de experimentos, e mantidos em câmara de acondicionamento por 7 dias. Após, foi realizada a extração dos compostos e bioensaios em casa de vegetação para a seleção da condição com maior porcentagem de dano causado em folhas. Na segunda etapa, utilizou-se a melhor condição da primeira etapa para obter moléculas e avaliado diferentes formulações contendo óleo de palma, Span® 80 e Tween® 80, com o objetivo de aumentar a fitotoxicidade. Na etapa 1, a condição de FES que produziu maior dano às folhas de *Cucumis sativus* foi 25°C de temperatura, 50% de teor de umidade do substrato, suplementação com água de maceração de milho e farelo de soja de 10% da massa do substrato e 15% de densidade de inóculo. Neste tratamento 1,23% das folhas apresentaram lesões. Na etapa 2, os tratamentos 8 (8,2% m/m de óleo de palma, 8,2% m/m de Span® 80 e Tween® 80 e EHL 12,8) e 14 (5,5% m/m de óleo de palma, 5,5% m/m de Span® 80 e Tween® 80 e EHL 15) apresentaram maior efeito na supressão de crescimento, em torno de 36% e maior fitotoxicidade nas folhas. O tratamento 14 teve uma redução de 36,8% na massa seca em comparação com a testemunha. *Diaporthe* sp. apresenta potencial para a produção de moléculas com atividade herbicida e o uso de adjuvantes aumenta sua eficiência no controle de plantas daninhas.

Palavras-chave: Plantas daninhas. *Cucumis sativus*. Adjuvantes. Herbicida. Formulação.

ABSTRACT

PRODUCTION AND FORMULATION OF HERBICIDE BY SOLID STATE FERMENTATION USING THE FUNGUS *Diaporthe* sp.

AUTHOR: BRUNA DE OLIVEIRA BASTOS
ADVISOR: MARCIO ANTONIO MAZUTTI
CO-ADVISOR: ANIELA PINTO KEMPKA

The weed control is accomplished primarily through chemical herbicides. Currently, the use phytotoxins produced by microorganisms are presented as sustainable alternatives. The objective of this study was to produce a herbicide by solid state fermentation (SSF) using the fungus *Diaporthe* sp. The phytotoxic potential of the fermentation broth was assessed in control of target (*Cucumis sativus*). The experiments were divided into two steps: i) the fermentation condition for bioherbicide production was assessed. In this step the response was the percentage of damage in leaves of target; ii) evaluation of different formulations containing palm oil, Tween® 80 and Span® 80, in order to increase phytotoxicity. In step 1, the maximum herbicidal activity (1.23% of the leaves had lesions) was obtained at 25°C, moisture content of 50 wt%, supplemented with 10 wt% of corn steep liquor and soybean bran and inoculum density of 15 wt%. In step 2, the formulation containing 8.2 wt% of palm oil, 8.2 wt% of Tween® 80 and Span® 80, resulting in an HLB of 12.8 showed the highest phytotoxicity on the leaves. At this condition, dry weight of target was reduced about 36% in comparison with control. *Diaporthe* sp. has the potential to produce molecules with herbicidal activity and the use of adjuvants enhances its efficiency in weed control.

Keywords: Weeds. *Cucumis sativus*. Adjuvants. Herbicide. Formulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Placa de meio BDA com o micro-organismo *Diaporthe* sp.....23
Figura 2 – Aspecto do pré-inóculo aos 7 dias após o início da fermentação. 24
Figura 3 – Fluxograma com as etapas do preparo do inóculo. 26
Figura 4 – Crescimento de *Diaporthe* sp. após 7 dias de fermentação (A), extração em shaker (B), filtração do caldo fermentado (C). 26
Figura 5 – Casa de vegetação utilizada para os bioensaios. 27
Figura 6 – Efeito das variáveis temperatura, umidade, água de maceração de milho (AMM), farelo de soja (FS) e densidade de inóculo sobre a porcentagem de dano causado nas folhas de *Cucumis sativus*.....33
Figura 7 – Folhas destacadas de Cucumis sativus. Testemunha – T0 (A); Tratamento 8 (B).....33
Figura 8 – Imagens dos tratamentos 8 (A e C) e 14 (B e D) em comparação com seus respectivos controles e testemunha. Destaque do efeito na planta do tratamento 8 (E) e 14 (F). 36
Figura 9 – Danos causados em folhas de *Cucumis sativus* submetidas a aplicação de caldo fermentado de *Diaporthe* sp. sem adição de adjuvantes. 37
Figura 10 – Comparação das lesões observados nos tratamentos 9 (A e C) e 10 (B e D). 38
Figura 11 – Comparação das lesões observados nos tratamentos 7 (A e C) e 8 (B e D). 39
Figura 12 – Característica de plantas de *Cucumis sativus* após aplicação do tratamento 13. 39
Figura 13 – Altura de plantas (cm) de *Cucumis sativus* submetidas a aplicação de diferentes formulados. 41
Figura 14 – Massa seca (g) de *Cucumis sativus* submetidas a aplicação de diferentes formulados. 43
Figura 15 – Fitotoxicidade em folhas de *Cucumis sativu*s. (A) Controle 13; (B) Tratamento 13. 45
Figura 16 – Fitotoxicidade causada pelo tratamento 5 (A, B e C) e tratamento 10 (D, E e F) em plantas de *Cucumis sativus*, comparadas com seus respectivos controles. 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Planejamento de experimentos Plackett & Burman de 12 ensaios. 25
Tabela 2 – Planejamento de experimentos Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para três variáveis independentes. 29
Tabela 3 – Índice de avaliação e descrição da fitointoxicação das plantas (EWRC, 1964). 30
Tabela 4 – Porcentagem de danos nas folhas de *Cucumis sativus* em relação às variáveis temperatura (°C), umidade (%), água de maceração de milho (AMM), farelo de soja (FS) e densidade de inóculo (%). 31
Tabela 5 – Altura de planta (cm), fitotoxicidade e massa seca de parte aérea (g) em função da formulação com adjuvantes. 35
Tabela 6 – Avaliação da fitotoxicidade de plantas de *Cucumis sativus* submetidas aos diferentes formulados e seus respectivos controles (EWRC, 1964). 44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A. fumigatus	*Aspergillus fumigatus*
AMM	Água de maceração de milho
BDA	Batata-dextrose-ágar
DCCR	Delineamento composto central rotacionado
D. endophytica	*Diaporthe endophytica*
D. terebinthifolii	*Diaporthe terebinthifolii*
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
FES	Fermentação em estado sólido
FS	Farelo de soja
FSub	Fermentação submersa
MS	Massa de Span® 80
MT	Massa de Tween® 80
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....11
2 OBJETIVOS 12
2.1 OBJETIVO GERAL 12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 14
3.1 CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS.....14
3.2 BIOTECNOLOGIA.....15
3.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO 17
3.4 *Diaporthe* sp. 19
3.5 FORMULAÇÃO 20
4 MATERIAL E MÉTODOS.....23
4.1 MICRO-ORGANISMO.....23
4.2 PRÉ-INÓCULO 24
4.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO 24
4.4 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS.....26
4.5 BIOENSAIOS 27
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA 28
4.7 FORMULAÇÃO 28
4.7.1 Bioensaios 29
4.7.2 Análise estatística 30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....31
5.1 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO 31
5.2 FORMULAÇÃO 34
6 CONCLUSÕES.....46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....47

1 INTRODUÇÃO

As plantas daninhas são responsáveis, entre outros fatores, por causarem prejuízos à agricultura, reduzindo o rendimento e a qualidade dos cultivos, competindo por água, nutrientes e luz solar (TEE BEST et al., 1992). A crescente ênfase dada a agricultura sustentável e a preocupação com os efeitos adversos do uso extensivo de produtos químicos, tem levado à busca por alternativas ao manejo de plantas daninhas, buscando a redução do uso de herbicidas sintéticos (KHALIQ et al., 2013).

Nesse sentido, pesquisas com novas estratégias de produção de herbicidas tem buscado o desenvolvimento de produtos seletivos que possuam maior eficiência e menor risco de danos ao ambiente. Estas, incluem a utilização de produtos naturais obtidos de plantas e micro-organismos (OLIVEIRA; BRIGHENTI, 2011). O controle de plantas daninhas através de métodos biológicos é realizado a mais de 200 anos, principalmente com o uso de inimigos naturais como animais herbívoros e micro-organismos patogênicos (TREMACOLDI; SOUZA FILHO, 2006).

Embora os fungos fitopatogênicos representem uma restrição na produção agrícola, eles também podem apresentar uma alternativa no controle de plantas daninhas. As fitotoxinas produzidas pelos fungos podem ser uma alternativa para a produção de novos herbicidas, evitando a ocorrência de plantas resistentes, reduzindo o impacto no ambiente e o risco para a saúde humana e animal (CIMMINO et al., 2015).

Atualmente, a maior parte dos produtos biológicos obtidos a partir de fungos são comercializados com o ingrediente ativo na fase conidial e o inerte da formulação é o próprio substrato de cultivo. Porém, o produto final possui menor estabilidade no armazenamento, reduzindo, portanto, a sua vida de prateleira (LOPES, 2009). Para aumentar a durabilidade, o armazenamento desses produtos deve ser em local refrigerado ou com temperaturas menores que 28°C. Nesse sentido, é necessário encontrar alternativas que busquem otimizar o uso dos produtos biológicos, tornando-os mais eficientes e com maior vida de prateleira.

O uso da fermentação em estado sólido (FES) apresenta algumas vantagens em relação a fermentação submersa (FSub), principalmente quando o micro-organismo utilizado é um fungo. Pandey (2003) descreve que, com a fermentação em estado sólido, pode-se obter maiores rendimentos de produtos, isto porque o crescimento dos fungos se encontra em condições semelhantes ao seu habitat

natural, o que proporcionaria maior atividade do micro-organismo. Além disso, vários metabólitos secundários de fungos são produzidos exclusivamente durante o crescimento em meio sólido, sendo, portanto, a FES uma alternativa viável na descoberta e produção de novos metabólitos produzidos por fungos (HÖLKER; LENZ, 2005).

Apesar da grande importância econômica e ambiental do controle microbiano de pragas, a produção deste tipo de fungo por fermentação em estado sólido é ainda artesanal. No entanto, ela pode ser empregada para produzir biomoléculas complexas, as quais dificilmente poderiam ser obtidas por síntese química (AGUDELO, 2010).

A fim de aumentar a eficiência dos herbicidas, alguns produtos podem ser adicionados à calda para atingir esse propósito, como os adjuvantes. O uso de surfactantes, óleos minerais e vegetais, emulsionantes e sais de fertilizantes, podem aumentar a atividade e absorção dos herbicidas, aumentar a atividade biológica do ingrediente ativo, diminuir a exposição do trabalhador durante a aplicação, melhorar a eficiência de aplicação nos tratamentos iniciais, reduzindo os tratamentos sequenciais, além de, em alguns casos permitir a redução da dose (KIRKWOOD, 1993; UNDERWOOD, 2000).

Pesquisas envolvendo a seleção de micro-organismos com potencial de produção de fitotoxinas vêm sendo desenvolvidas no Laboratório de Bioprocessos da Universidade Federal de Santa Maria. Em trabalho desenvolvido por Souza (2015) foram avaliados 45 fungos fitopatogênicos, isolados de folhas plantas daninhas, dentre estes, destacou-se o potencial herbicida do fungo *Diaporthe* sp., devido aos efeitos em plantas teste que seus metabólitos secundários causaram.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi a produção de herbicida por fermentação em estado sólido a partir de micro-organismo isolado do bioma Pampa (*Diaporthe* sp.) e avaliação do seu potencial fitotóxico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir a melhor composição do meio para a produção do herbicida por fermentação em estado sólido em escala de bancada.
- Avaliar a eficiência do fermentado como herbicida em planta teste (*Cucumis sativus*), em casa de vegetação.
- Avaliar a adição e eficiência de adjuvantes adicionados ao caldo fermentado em planta teste (*Cucumis sativus*), em casa de vegetação.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS

As plantas daninhas podem ser definidas como qualquer vegetal que cresce em local que não é desejado. Estas plantas podem ser hospedeiras de pragas e doenças e podem interferir no desenvolvimento de culturas agrícolas, competindo por água, luz, CO_2 e nutrientes, podendo reduzir a produção (CARVALHO, 2013; LORENZI, 2014). Nesse sentido, o controle destas plantas invasoras é fundamental no manejo de diversas culturas agrícolas, apresentando reflexos diretos no rendimento das lavouras e nos custos de produção (BRACCINI, 2011).

Atualmente, a principal forma de controle das plantas daninhas é através do controle químico, pelo uso de herbicidas. O início do desenvolvimento de produtos químicos para o controle de plantas daninhas começou a partir da década de 1940 e são, hoje, os principais defensivos agrícolas comercializados no mundo, os herbicidas sintéticos (CARVALHO, 2013). Os herbicidas são substâncias químicas capazes de selecionar populações de plantas, ou seja, provocam a morte de certas plantas e de outras não (OLIVEIRA, 2011).

Existem cerca de 20 mecanismos de ação de herbicidas comerciais, e quase 30 anos se passaram desde que o último novo modo de ação foi introduzido. Anteriormente a esse período, um novo modo de ação era introduzido aproximadamente a cada três anos (DUKE, 2012; DUKE; DAYAN, 2015).

A agricultura moderna passa constantemente por mudanças, porém, uma série de fatores vem interferindo nas práticas de manejo de plantas daninhas, tais como a eliminação progressiva de alguns herbicidas mais antigos, o alto custo de desenvolvimento e registro de novos herbicidas químicos, a falta de herbicidas registrados para pequenos mercados, os crescentes problemas com plantas daninhas resistentes a herbicidas, entre outros (CHARUDATTAN, 2001). Estes fatos levam a uma crescente busca por novos herbicidas com perfis toxicológicos e ambientais mais seguros e novos modos de ação (DAYAN; DUKE, 2014).

Os micro-organismos produzem uma grande variedade de compostos fitotóxicos com potencial para serem utilizados como herbicidas (BARBOSA et al., 2003). Porém, poucos destes compostos têm sido avaliados quanto a sua

fitotoxicidade, e os modos de ação destas fitotoxinas ainda não são conhecidos (DAYAN; DUKE, 2014).

Como exemplo de fungo utilizado com sucesso no controle de plantas daninhas nos Estados Unidos tem-se o fungo *Phytophthora palmivora* sob o nome comercial de DeVine, utilizado para controlar *Morrenia odorata* em pomares de citrus; *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. aeschynomene, com o nome comercial de Collego para o controle de *Aeschynomene virginica* em lavouras de arroz e soja (TE BEEST et al., 1992); *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *malvae*, sob o nome de Biomal, utilizado para o controle de *Malva pusilla* e CASST, um produto de *Alternaria cassiae* para o controle de *Cassia obtusifolia* (SHARMA, 2014) e Dr. BioSedge, um bioerbicida baseado no fungo *Puccinia canaliculata*, foi registrado para uso contra *Cyperus esculentus* (RUBERSON, 1999).

No entanto, esses produtos são comercializados na forma de esporos. Segundo Duke et al. (2015), em culturas anuais seria necessário a introdução destes organismos a cada ano, já que há grande mudança no ambiente e na vegetação durante o período de crescimento. Além dos riscos na introdução de micro-organismos em novas áreas, sem que este seja específico para uma cultura.

Apesar de quase 70% de todos os ingredientes ativos recentemente registrados terem as suas origens na pesquisa de produtos naturais, apenas 8% dos herbicidas convencionais são derivados de compostos naturais, de acordo com os registros da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, no período de 1997 a 2010 (CANTRELL et al., 2012). Os herbicidas produzidos à base de produtos naturais são, geralmente, considerados mais seguros do que os herbicidas sintéticos. Porém, são necessárias mais pesquisas para validar essa hipótese (DAYAN; DUKE, 2014).

3.2 BIOTECNOLOGIA

Biotecnologia é definida como um conjunto de tecnologias que utilizam sistemas biológicos, organismos vivos ou seus derivados para a produção ou modificação de produtos e processos, assim como pode ser utilizada para gerar produtos para a indústria e para a sociedade (MAPA, 2010).

A diversidade genética e metabólica dos micro-organismos vem sendo explorada há muitos anos visando a obtenção de produtos biotecnológicos, como a produção de antibióticos, processamento de alimentos, bebidas alcoólicas, ácidos

orgânicos, álcoois, alimentos fermentados, tratamento e/ou remediação de resíduos e também na agricultura, na fertilização de solos e controle biológico de pragas e doenças (CANHOS; MANFIO, 2004). Segundo Valois (2001), o Brasil é um dos países com o maior potencial para a geração de biotecnologias, por ser detentor de grande biodiversidade de plantas, animais e micro-organismos, possuindo cerca de 20% do total existente no planeta.

Os processos biotecnológicos vêm sendo utilizados desde a antiguidade, principalmente na produção de alimentos, tais como o preparo de bebidas fermentadas a partir de cereais na Babilônia e no Egito (8.000 a 6.000 anos a.C.), a produção de pão, utilizando fermentos, no Egito (4.000 anos a.C.) e a produção de vinhos na Grécia (2.000 a.C.) (BORZANI et al., 2001). Somente em 1862, Louis Pasteur descobriu a associação de micro-organismos com o processo de fermentação (FALEIRO; ANDRADE, 2011).

A partir do século XIX, com a evolução do conhecimento científico sobre os micro-organismos, a sua utilização foi ampliada para o desenvolvimento de vacinas, antibióticos, hormônios, além de diversos insumos para a indústria (MAPA, 2010). Os fungos também têm sido muito utilizados como produtores de diversas substâncias de interesse econômico, tais como enzimas, vitaminas, aminoácidos e esteroides (BRAGA et al., 1999).

A biotecnologia moderna surgiu com a descoberta da estrutura do DNA por James Watson e Francis Crick em 1953, começando assim os estudos em engenharia genética (FALEIRO; ANDRADE, 2011), e oferece três estratégias para a produção de compostos bioativos: os processos fermentativos, no qual o crescimento da biomassa e a biossíntese do produto ocorrem em biorreatores; a micropropagação e a engenharia genética (PLETSCH, 1998).

A biotecnologia pode ser utilizada como ferramenta para obtenção de novos herbicidas. Estudos em biologia molecular e pesquisas com produtos naturais sugerem que ainda existem muitos sítios alvo ainda não explorados (DUKE; DAYAN, 2015) e as fitotoxinas naturais, produzidas através de processos fermentativos podem ser a fonte para a descoberta de novos herbicidas (DAYAN; DUKE, 2014).

Saxena e Pandey (2001) relatam que a pesquisa envolvendo micro-organismos e seus metabólitos vem sendo cada vez mais estudada entre cientistas envolvidos no manejo de plantas daninhas. Ainda, segundo esses autores, a maioria das fitotoxinas microbianas são compostos não halogenados e solúveis em água, sendo menos

tóxicas ao ambiente, quando comparadas com os herbicidas sintéticos. Devido a sua diversidade estrutural e atividade biológica, as fitotoxinas oferecem oportunidades para o desenvolvimento de compostos naturais utilizados diretamente e também na produção de herbicidas sintéticos com novos sítios alvo (DAYAN; DUKE, 2014).

3.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Os processos fermentativos são divididos em fermentações submersas (FSub) e fermentações em estado sólido (FES). A principal diferença entre estes dois bioprocessos é a quantidade de água livre no substrato (MITCHELL et al., 2002).

A FES pode ser definida como o crescimento de micro-organismos sobre materiais sólidos, ocorrendo na ausência ou em pequena quantidade de água livre (PANDEY, 1992). Porém, o material deve possuir umidade suficiente para permitir o crescimento e a atividade metabólica do micro-organismo (THOMAS et al., 2013). Segundo RAHARDJO et al. (2006), os micro-organismos podem crescer entre os fragmentos do substrato ou sobre a sua superfície, consumindo o substrato e secretando metabólitos e enzimas.

Algumas vantagens da FES em relação à FSub são as maiores concentrações do produto depois da extração, a menor quantidade de resíduos líquidos gerado após a fermentação e as condições de cultivo mais semelhantes ao habitat natural dos fungos, assim, são capazes de crescer e excretar maiores quantidades de enzimas (CASTILHO et al., 2000). Outra vantagem da FES é a utilização de resíduos agroindustriais, o que leva a uma redução de custos e consumo de energia, baixa produção de água residual, além da alta estabilidade dos produtos gerados (QUIROZ et al., 2015).

A FES possui um potencial econômico na produção de produtos para a alimentação humana, animal, indústria farmacêutica e agrícola (OOIJKAAS et al., 2000). Bianchi et al. (2001) relatam que o controle do processo fermentativo pode ser uma ferramenta para obtenção de diversos produtos, tais como enzimas, biomassa microbiana, inóculos, além de alimentos, medicamentos, pigmentos, etc.

Os substratos utilizados em FES podem estar tanto na forma natural como na forma sintética, dependendo do processo que se deseja realizar, da facilidade de se obter determinada matéria-prima ou do resultado que se deseja conseguir. Devido ao baixo valor comercial, geralmente, são utilizados produtos e/ou resíduos da agricultura

e agroindústrias (BIANCHI et al., 2001). Exemplos destes substratos incluem a mandioca, a soja, batata doce, batata, resíduos de culturas como o farelo e palha de trigo e de arroz, casca de soja, milho e arroz, bagaço de cana e mandioca, resíduos do processamento de frutas, espigas de milho, entre outros (PANDEY, 2000).

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

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

Alguns trabalhos relatam a maior produção de compostos pela FES em comparação com a FSub. Um exemplo, é a produção de iturina, um lipopeptídio surfactante produzido pela bactéria *Bacillus subtilis*, com atividade antibiótica e antifúngica (MIZUMOTO et al., 2006; OHNO, et al., 1995; OHNO, et al., 1993). Mizumoto et al. (2006) relataram que a produção de iturina em FES foi aproximadamente dez vezes maior do que quando *B. subtilis* foi cultivado em meio líquido, e quando o meio sólido contendo o micro-organismo foi adicionado em solo infectado por *Rhizoctonia solani*, um agente causador de tombamento de plantas de tomateiro, a ocorrência do fitopatógeno foi significativamente suprimida. Ohno et al. em 1993 e 1995, obtiveram uma produção de iturina cerca 8 e 5 vezes maior em FES do que em FSub, respectivamente, em avaliações de diferentes controles do

ambiente. Nestes estudos, foi utilizado como substrato sólido um resíduo da produção de leite de soja.

Segundo Krishna (2005), a FES apresenta vantagens em relação a FSub na produção de biopesticidas, já que os esporos produzidos em FES tendem a ser mais estáveis e tolerantes do que os produzidos em FS. Desgranges et al. (1993) encontraram uma eficiência de campo de 80% no bioinseticida contra broca do milho produzido a partir do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*, cultivado por FES, sendo esta eficiência semelhante aos inseticidas químicos. A FES também foi utilizada na produção de quitinase por *Trichoderma harzianum*. Sandhya et al. (2005) utilizando como substrato o farelo de trigo contendo 1% de quitina coloidal, observou que a quitina produzida alterou a morfologia das hifas do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, causando inchaço e a lise da parede de hifas.

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

3.4 *Diaporthe* sp.

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

Diaporthe tem sido relatado como um gênero com potencial para o uso na biotecnologia com várias descobertas importantes, incluindo novos metabólitos fúngicos estruturalmente significativos e fisiologicamente ativos, tais como phomopxanthone, phomopsin, phomopsichalasin, entre outros (GOMES, 2012).

Specian et al. (2012), observaram atividade antibacteriana no extrato bruto e frações do metabólito secundário tirosol de *Diaporthe helianthi*. Prada et al. (2009), encontraram efeito antagonista de *Diaporthe* sp. sobre *Phytophthora insfestans*. Além do efeito antibacteriano, Santos et al. (2016) também encontraram efeito antifúngico de *D. endophytica* e *D. terebinthifolii* isolados de plantas medicinais para o controle de *Phyllosticta citricarpa* em citrus.

Com relação ao controle de plantas daninhas, Ash et al. (2010) relatam o potencial herbicida encontrado nesse gênero, controlando plantas daninhas da família Asteraceae. Briscoe (2014) avaliou o fungo *Diaporthe eres* isolado de folhas de *Hedera helix* e encontrou dois compostos fitotóxicos, com controle sobre sementes de *Agrostis stolonifera*, 8-hydroxy- 3.7-dimethylisochroman-1-one e 2-(4-hydroxyphenyl)-ethanol.

O gênero *Diaporthe* sp. também tem sido fonte de estudo para a busca pelo controle de doenças em humanos, tais como tubercolose, pelo diterpeno diaportheins (DETTRAKUL et al., 2003), câncer, pelo composto diaporthelactone e phomoxanthone, que possuem atividade citotóxica e antimicrobiana (DING et al., 2013; LIN et al., 2005; SHIONO et al., 2013). Outros estudos encontraram efeitos antibacteriano e antifúngico de metabólitos secundários extraídos de *Phomopsis*, isolado de diferentes plantas (DAI et al., 2005; KROHN et al., 2011; HUSSAIN et al., 2011).

3.5 FORMULAÇÃO

Os produtos fitossanitários são aplicados, geralmente, sobre a superfície de partes vegetais, como ramos, folhas e frutos. Alguns devem permanecer sobre essas superfícies enquanto outros devem ser absorvidos, para atuar no interior dos tecidos (KISSMANN, 1998).

A eficiência de um herbicida está relacionada com o processo de absorção, tanto para aqueles que possuem ação local, os herbicidas de contato, quanto para os que se translocam na planta e sua ação fitotóxica age em sítios específicos, como os herbicidas sistêmicos (DURIGAN; CORREIA, 2008). Com o objetivo de melhorar a eficiência e segurança dos herbicidas, alguns outros componentes podem ser adicionados à sua formulação.

Os adjuvantes são substâncias adicionadas à formulação de um herbicida com o objetivo de aumentar a sua eficiência ou modificar determinadas propriedades da solução. Podem ser divididos em dois grupos: os modificadores das propriedades de superfície dos líquidos, como os surfactantes (espalhante, umectante, detergentes, dispersantes e aderentes) e os aditivos, que afetam a absorção devido à sua ação direta sobre a cutícula (óleo mineral ou vegetal, sulfato de amônio e ureia) (VARGAS; ROMAN, 2006).

Os surfactantes desempenham um papel importante na formulação de herbicidas, tais como: emulsionantes para concentrados emulsionáveis e microemulsões ou como agentes molhantes e dispersantes para os pós molháveis, grânulos dispersíveis em água e os concentrados em suspensão (KIRKWOOD, 1993).

Os adjuvantes possuem como principal propriedade a redução de superfície e tensões interfaciais, o que pode aumentar a cobertura e a manutenção dos herbicidas sobre as plantas (SHERRICK et al., 1986). A formulação do produto a ser aplicado e as características das folhas irão influenciar no grau de angulação formado pela gota (MADUREIRA et al., 2013). Se a folha possuir uma superfície hidro-repelente, como uma folha cerosa, a gota será mais esférica e o contato será menor. Já se a folha for mais hidrófila, a gota se espalhará, ficando mais em contato com a folha (KISSMANN, 1998).

Os surfactantes podem ser divididos em quatro classes: aniônico, catiônico, anfotérico e não iônico, de acordo com seus grupos moleculares e lipofílicos (KIRKWOOD, 1993). Os aniônicos, são pouco utilizados a nível de campo, pois podem alterar o equilíbrio eletrolítico da calda e pela formação de espuma. Os surfactantes catiônicos raramente são usados em formulações de caldas e produtos fitossanitários, pois podem ser fitotóxicos e incompatíveis com muitos ingredientes ativos. Os anfóteros também são poucos utilizados na agricultura, eles podem atuar como ânions ou cátions dependendo do pH da solução. Já os surfactantes não iônicos são os mais utilizados para herbicidas, eles não se ionizam e por isso não alteram o equilíbrio eletrolítico nas formulações (DURIGAN; CORREIA, 2008).

Os óleos minerais e vegetais também são utilizados como adjuvantes aditivos. Eles possuem os efeitos de molhante, espalhante, penetrante, anti-evaporante e adesivante. Os óleos vegetais são menos estáveis que os minerais e para sua formulação precisa ser adicionado mais emulsificantes (KISSMANN, 1998). As principais vantagens da adição de óleos nas caldas herbicidas são a diminuição da

evaporação das gotas e a facilidade de penetração do herbicida através da cutícula (DURIGAN; CORREIA, 2008).

Produtos com características diferentes, como a água e o óleo, possuem uma incompatibilidade física, o que dificulta a mistura, sendo que cada componente representa uma fase da mistura. Para compatibilizar essas fases, algumas moléculas, chamadas produtos de interface são utilizadas, como os surfactantes. Estes, apresentam um segmento de sua molécula com propriedades hidrofílicas e outro segmento lipofílico, formando emulsões e compatibilizando a mistura de água com o óleo (KISSMANN, 1998). O balanço e a força destes dois segmentos é chamado de equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL). A classificação dos surfactantes pelo EHL permite a previsão do comportamento e reduz o trabalho envolvido na seleção de um agente emulsionante, agente molhante, ou outro tipo de agente (GRIFFIN, 1949).

Os surfactantes podem ser classificados pelo EHL em valores de 1 a 20. Os surfactantes lipofílicos possuem EHL inferior a 8, os surfactantes com EHL entre 9 e 11 são intermediários, e os que possuem valores de EHL superior a 11 são classificados como hidrofílicos (HESS; FOY, 2000). Nesse sentido, pode-se selecionar um tensoativo para cada situação baseado no seu valor de EHL (KIRKWOOD, 1993). Segundo Hess e Foy (2000), os surfactantes com baixo EHL, permitem uma melhor penetração dos herbicidas com baixa solubilidade em água e os surfactantes com elevado EHL melhoram a penetração dos herbicidas com maior solubilidade em água.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bioprocessos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e nos Laboratórios de Bioprocessos e Microbiologia da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), campus de Pinhalzinho.

O trabalho foi desenvolvido em duas etapas. A etapa 1 foi realizada para definir as melhores condições de cultivo do fungo *Diaporthe* sp. através do seu efeito nas plantas. Com esses resultados, realizou-se a etapa 2 com o objetivo de melhorar a eficiência do herbicida, utilizando diferentes formulações.

4.1 MICRO-ORGANISMO

Foi utilizado o fungo *Diaporthe* sp., isolado a partir de amostras infectadas da planta *Solanum americanum* Mill. coletadas no bioma Pampa em trabalho de Souza (2015a). Para a propagação do micro-organismo foi utilizado o meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), previamente autoclavado a 121±1ºC durante 30 minutos e vertido em placas de Petri. Após a repicagem, as placas já inoculadas foram transferidas para estufa microbiológica e mantidas a uma temperatura de 28°C por 7 dias (Figura 1).

Figura 1 – Placa de meio BDA com o micro-organismo *Diaporthe* sp.

Fonte: A autora

4.2 PRÉ-INÓCULO

A produção do pré-inóculo foi realizada utilizado dois discos de 15 mm de *Diaporthe* sp. Estes discos foram adicionados a erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de fermentação previamente autoclavado a 121±1ºC durante 30 minutos. O meio de fermentação foi constituído: 10 $g.L^{-1}$ de glicose, 10 $g.L^{-1}$ de peptona, 7,5 $g.L^{-1}$ de extrato de levedura, 2,0 $g.L^{-1}$ de sulfato de amônio ($(NH_4)\ 2SO_4$), 1,0 $g.L^{-1}$ de sulfato ferroso ($FeSO_4.7H_2O$), 1,0 $g.L^{-1}$ de sulfato de manganês ($MnSO_4.H_2O$) e 0,5 $g.L^{-1}$ de sulfato de magnésio ($MgSO_4$) (SOUZA, 2015a). Os erlenmeyers foram mantidos em agitador orbital a 120 rpm por 7 dias, a uma temperatura de 28°C (Figura 2).

Figura 2 – Aspecto do pré-inóculo aos 7 dias após o início da fermentação.

Fonte: A autora

4.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Foram utilizados béqueres contendo 10 gramas de bagaço de cana de açúcar, suplementados com água de maceração de milho e farelo de soja e inoculados com a biomassa fúngica macerada. A composição do meio de cultura, bem como as condições de operação (temperatura, umidade inicial dos substratos, densidade de inóculo), foram definidas através do emprego da metodologia de planejamento de experimentos Plackett & Burman (Tabela 1).

Tabela 1 – Planejamento de experimentos Plackett & Burman de 12 ensaios.

Ensaios	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Água de maceração de milho (% m/m)	Farelo de soja (% m/m)	Densidade de inoculo (% m/m)
1	35 (1)	50 (-1)	10 (1)	0 (-1)	5 (-1)
2	35 (1)	75 (1)	0 (-1)	10 (1)	5 (-1)
3	25 (-1)	75 (1)	10 (1)	0 (-1)	15 (1)
4	35 (1)	50 (-1)	10 (1)	10 (1)	5 (-1)
5	35 (1)	75 (1)	0 (-1)	10 (1)	15 (1)
6	35 (1)	75 (1)	10 (1)	0 (-1)	15 (1)
7	25 (-1)	75 (1)	10 (1)	10 (1)	5 (-1)
8	25 (-1)	50 (-1)	10 (1)	10 (1)	15 (1)
9	25 (-1)	50 (-1)	0 (-1)	10 (1)	15 (1)
10	35 (1)	50 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	15 (1)
11	25 (-1)	75 (1)	0 (-1)	0 (-1)	5 (-1)
12	25 (-1)	50 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	5 (-1)
13	30 (0)	62,5 (0)	5 (0)	5 (0)	10 (0)
14	30 (0)	62,5 (0)	5 (0)	5 (0)	10 (0)
15	30 (0)	62,5 (0)	5 (0)	5 (0)	10 (0)

A proporção de água de maceração de milho, farelo de soja e densidade de inóculo foram calculadas sobre a massa do substrato utilizado. O ajuste da umidade foi determinado através da formula:

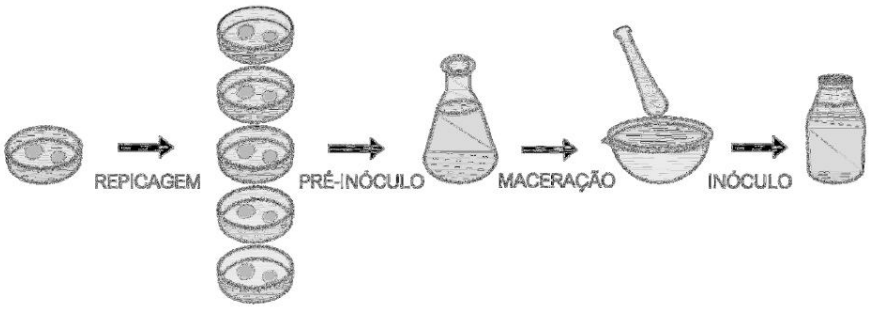
Massa H_2O = % umidade (massa H_2O + massa do substrato), onde:

Massa H_2O = massa de água requerida para correção da umidade do substrato.
%Umidade = porcentagem pré-definida no planejamento de experimentos.
Massa do substrato = massa de bagaço de cana de açúcar.

Realizou-se a esterilização do substrato e suplementos em autoclave com temperatura de 121±1ºC durante 30 minutos. Após o arrefecimento, foi realizada a inoculação do meio e a adição de água previamente esterilizada até a umidade desejada em cada tratamento.

A biomassa fúngica obtida no pré-inóculo foi macerada com o auxílio de almofariz e pistilo, conforme esquema apresentado na Figura 3. Após a maceração, utilizou-se a quantidade de inóculo para obter a densidade determinada em cada tratamento.

Figura 3 – Fluxograma com as etapas do preparo do inóculo.



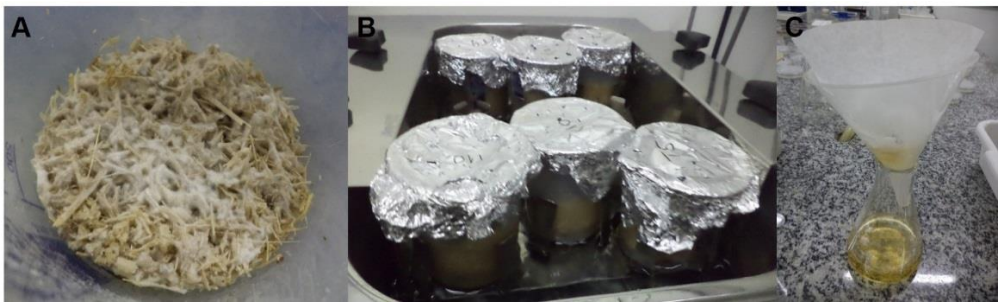
Fonte: ALMEIDA, 2014.

Os béqueres contendo os tratamentos foram mantidos em câmara com temperatura e umidade controladas durante 7 dias.

4.4 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS

Após o final da fermentação (7 dias), foi realizada a extração dos compostos, através da adição de 200 mL de água destilada em cada tratamento e agitação orbital a 120 rpm e 28°C durante 1 hora. O caldo obtido a partir da extração foi filtrado com papel filtro e armazenado em geladeira até a utilização nos bioensaios (Figura 4).

Figura 4 – Crescimento de *Diaporthe* sp. após 7 dias de fermentação (A), extração em shaker (B), filtração do caldo fermentado (C).



Fonte: A autora

4.5 BIOENSAIOS

Os bioensaios foram conduzidos em casa de vegetação (Figura 5), utilizando como planta teste o pepino (*Cucumis sativus*). Esta espécie foi utilizada nos bioensaios por ser uma espécie cultivada, com germinação uniforme e não apresentar dormência (FERREIRA; ÁQUILA, 2000).

As sementes foram semeadas em copos plásticos de 180 mL contendo o substrato comercial Mec Plant®. Para cada tratamento foram utilizadas seis plantas, que foram mantidas em bandejas, sendo 15 bandejas para os tratamentos e uma bandeja para a testemunha, onde aplicou-se somente água.

As aplicações dos caldos fermentados foram realizadas 7 dias após a semeadura, utilizando um borrifador manual. Para cada tratamento foram aplicados 10 mL de caldo fermentado.

Figura 5 – Casa de vegetação utilizada para os bioensaios.

Fonte: A autora

A avaliação foi realizada nas folhas cotiledonares, 7 dias após a aplicação dos tratamentos. Foi avaliada a porcentagem de área foliar afetada utilizando o software ImageJ®.

Após a definição do tratamento com maior dano causado nas folhas de *Cucumis sativus*, foi realizada uma nova fermentação com as melhores condições de cultivo, com o objetivo de uma maior produção de caldo fermentado. Da mesma forma que o item 4.3, os recipientes foram mantidos em câmara de acondicionamento por 7 dias.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com seis repetições e 15 tratamentos, mais a testemunha. A análise estatística do planejamento Plackett & Burman foi realizada utilizando o software Statistica 10.0 ®, com nível de significância de 10% 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 de erro, utilizando o software SASM-Agri (CANTERI et al., 2001).

4.7 FORMULAÇÃO

A fim de avaliar a adição de adjuvantes ao caldo fermentado foi realizado um novo planejamento de experimentos (Tabela 2). Foram utilizados os adjuvantes Span® 80 (EHL=4,3), Tween® 80 (EHL=15), obtidos de Sigma-Aldrich (EUA) e óleo de palma, obtido de Distriol comércio de insumos.

As formulações foram preparadas conforme o planejamento de experimentos DCCR (Tabela 2). Para os formulados, foram preparadas emulsões, onde primeiramente foi realizada a pesagem dos adjuvantes. Após a pesagem, adicionou-se o Span® 80 ao óleo de palma em um béquer (mistura A) e realizou-se a mistura com o auxílio do homogeneizador Turrax a 7000 rpm por 1 minuto. Posteriormente, em um segundo béquer realizou-se a mistura do caldo fermentado ao Tween® com o auxílio do homogeneizador Turrax a 7000 rpm por 1 minuto (mistura B). Após esses procedimentos, a mistura A foi adicionada aos poucos à mistura B e manteve-se em agitação no Turrax por 5 minutos a 7000 rpm.

Tabela 2 – Planejamento de experimentos Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para três variáveis independentes.

Ensaio	Óleo de palma (% m/m)	Span® 80 + Tween® 80 (% 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

4.7.1 Bioensaios

O preparo das plantas para a realização do bioensaio foi o mesmo descrito no item 4.5. Foram utilizadas doze plantas por tratamento, divididas em três repetições. 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 com água destilada. Ainda, utilizou-se uma bandeja com doze plantas onde foi aplicado apenas o caldo fermentado.

As aplicações foram realizadas 14 dias após a semeadura, utilizando um borrifador manual. Para cada repetição, foram aplicados o volume de 3 mL do

formulado, o qual apresentou, em testes preliminares, boa distribuição de gotas sobre as folhas, sem ocorrer escorrimento.

A avaliação foi realizada 7 dias após a aplicação dos tratamentos. Foram avaliadas a altura e massa seca de plantas e fitotoxicidade do produto. A avaliação da fitotoxicidade foi realizada visualmente, utilizando-se a escala desenvolvida por EWRC (1964) (Tabela 3).

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

Tabela 3 – Índice de avaliação e descrição da fitointoxicação das plantas (EWRC, 1964).

Índice de avaliação	Descrição da fitointoxicação
1	Sem dano
2	Pequenas alterações (descoloração, deformação) visíveis em algumas plantas
3	Pequenas alterações visíveis em muitas plantas (clorose e encarquilhamento)
4	Forte descoloração ou razoável deformação, sem ocorrer necrose
5	Necrose de algumas folhas, acompanhada de deformação em folhas e brotos
6	Redução no porte das plantas, encarquilhamento e necrose das folhas
7	Mais de 80% das folhas destruídas
8	Danos extremamente graves, sobrando pequenas áreas verdes nas plantas
9	Morte da planta

4.7.2 Análise estatística

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições e 18 tratamentos. A análise estatística foi realizada através do software SASM-Agri (CANTERI et al., 2001). Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Skott-Knott, com nível de significância de 5% de probabilidade de erro.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Os resultados obtidos na primeira etapa demonstraram que há um efeito herbicida nos extratos obtidos a partir da fermentação em estado sólido utilizando o fungo *Diaporthe* sp. A Tabela 4 apresenta os dados referentes à porcentagem de dano causado nas folhas de *Cucumis sativus*.

Tabela 4 – Porcentagem de danos nas folhas de *Cucumis sativus* em relação às variáveis temperatura (°C), umidade (%), água de maceração de milho (AMM), farelo de soja (FS) e densidade de inóculo (%).

Tratamentos	Temperatura (°C)	Umidade (%)	AMM (% m/m)	FS (% m/m)	Densidade de inóculo (% m/m)	% Dano nas folhas
Testemunha	-	-	-	-	0	0,0 g*
T1	35	50	10	0	5	0,36 d
T2	35	75	0	10	5	0,28 d
T3	25	75	10	0	15	0,14 e
T4	35	50	10	10	5	0,89 b
T5	35	75	0	10	15	0,62 c
T6	35	75	10	0	15	1,01 b
T7	25	75	10	10	5	0,04 f
T8	25	50	10	10	15	1,23 a
T9	25	50	0	10	15	0,94 b
T10	35	50	0	0	15	0,52 c
T11	25	75	0	0	5	0,24 d
T12	25	50	0	0	5	0,25 d
T13	30	62,5	5	5	10	0,02 g
T14	30	62,5	5	5	10	0,01 g
T15	30	62,5	5	5	10	0,01 g

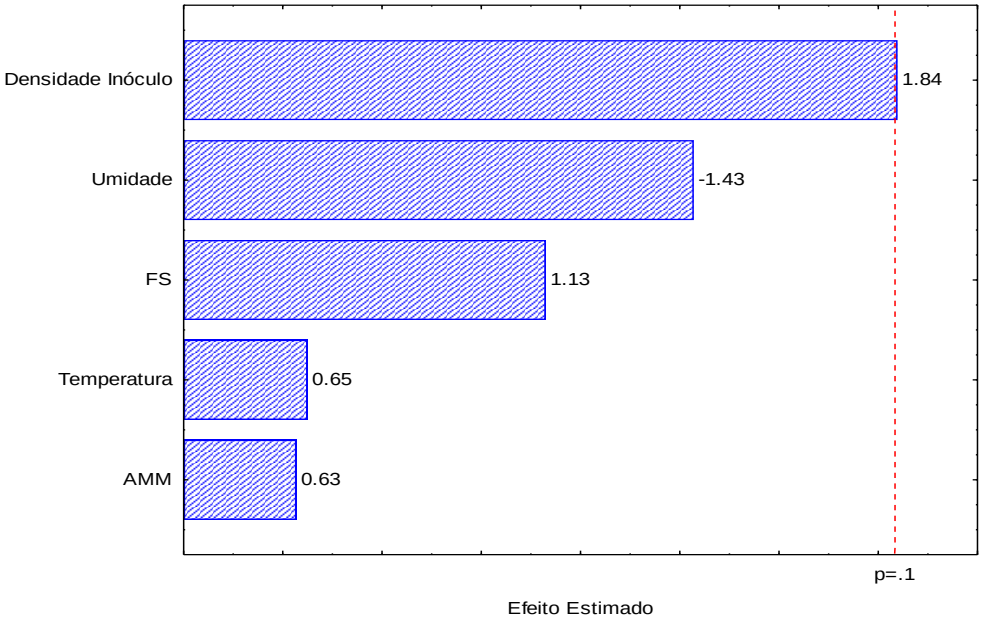
Coeficiente de variação (CV): 37,66 %
* Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a nível de 5% de probabilidade de erro.

Observa-se na Tabela 4 que a maior porcentagem de dano nas folhas de *Cucumis sativus* ocorreu nas condições do tratamento 8, com 1,23% da folha com lesões, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Neste tratamento, as condições de cultivo foram: 25°C de temperatura, 50% de teor de umidade do substrato, suplementação com água de maceração de milho e farelo de soja de 10% e 15% de densidade de inóculo. Com este conjunto de fatores, pode-se inferir que houve uma maior produção de metabólitos quando a temperatura de cultivo foi mais amena aliada a um menor teor de umidade e com maior suplementação de fontes de carbono e nitrogênio e maior densidade de inóculo.

Delabona et al. (2013) avaliando a produção de endonuclease por *Aspergillus niger* e *A. fumigatus*, observaram uma maior produção quando o teor de umidade no substrato passou de 70 para 50%, sob FES utilizando farelo de trigo. Estes autores associaram a redução na produção da enzima em teores de umidade mais elevados com uma redução da porosidade do substrato e limitação na transferência de oxigênio. Vu et al. (2011) também encontraram maior produção de celulase por *Aspergillus* sp. em FES com teor de umidade do substrato de 50%.

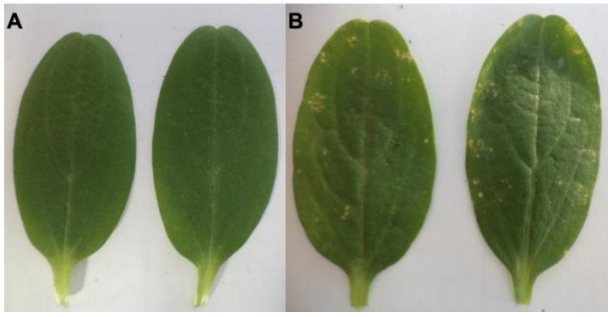
O efeito de cada variável na porcentagem de dano causado nas folhas pode ser observado na Figura 6. Observa-se que apenas a variável densidade de inóculo apresentou diferença estatística ($p<0,1$) (foi significativa). Adinarayana et al. (2003) avaliaram densidades que variaram de 5 a 50% e encontraram uma menor produção de antibióticos em FES com 5% de densidade de inóculo. Avaliando a produção de xilanase por *Bacillus subtillis*, Sanghi et al. (2008) observaram maior produção com 15% de inóculo em farelo de trigo, também relatam que 5% de massa de inóculo não é adequado para o bom crescimento do micro-organismo e para produção de enzima. Segundo Selvakumar e Pandey (1999), uma densidade de inóculo mais baixa pode não produzir biomassa suficiente e permitir o crescimento de micro-organismos indesejáveis.

Figura 6 – Efeito das variáveis temperatura, umidade, água de maceração de milho (AMM), farelo de soja (FS) e densidade de inóculo sobre a porcentagem de dano causado nas folhas de *Cucumis sativus*.



As lesões causadas pelos metabólitos do fungo *Diaporthe* sp., caracterizadas por clorose normalmente no local de contato dos tratamentos com a folha, podem ser observadas na Figura 7. A clorose é a denominação do sintoma de esmaecimento do verde em órgãos clorofilados (SALGADO; AMORIM, 1995). Lesões semelhantes foram encontradas por Varejão et al. (2013), halos de clorose e necrose com 1,4 mm de diâmetro em folhas de *Euphorbia heterophylla* submetidas a punctura e aplicação de extrato orgânico bruto obtido de filtrados de *Alternaria euphorbiicola.*

Figura 7 – Folhas destacadas de Cucumis sativus. Testemunha – T0 (A)*; Tratamento 8 (B)**.



Fonte: A autora
* T0: testemunha com aplicação apenas de água.
** T8: temperatura 25°C, umidade 50%, AMM 10%, FS 10%, 15% densidade de inóculo.

Em trabalho desenvolvido por Souza (2015a) utilizando o fungo *Diaporthe* sp. em fermentação submersa foi relatado efeito herbicida em pós-emergência sobre *Cucumis sativus*, causando manchas, amarelecimento e crestamento nas folhas. Em pré-emergência, Souza (2015b) observou 100% de inibição de germinação de sementes de *Cucumis sativus*. Avaliando o efeito Pes (2015) avaliando o efeito herbicida do produto obtido por fermentação submersa de *Diaporthe* sp. sobre sementes de soja, pepino, trigo, arroz e azevém em pré-emergência encontrou inibição de 100% na germinação destas sementes, demostrando assim, o potencial de uso como herbicida dos metabólitos produzidos por este micro-organismo, quando obtido por fermentação submersa.

5.2 FORMULAÇÃO

Para que um bioherbicida seja bem-sucedido no controle de plantas daninhas, é necessário um entendimento sobre a formulação e métodos que garantam um controle eficiente (KLAIC et al., 2015). Sendo assim, com base nos resultados obtidos na etapa anterior, foram selecionadas as condições do tratamento 8 para produzir caldo fermentado para ser usado nas formulações contendo adjuvantes.

Na Tabela 5 estão apresentados 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, assim como os resultados das avaliações das plantas de *Cucumis sativus* após a aplicação de cada uma das formulações.

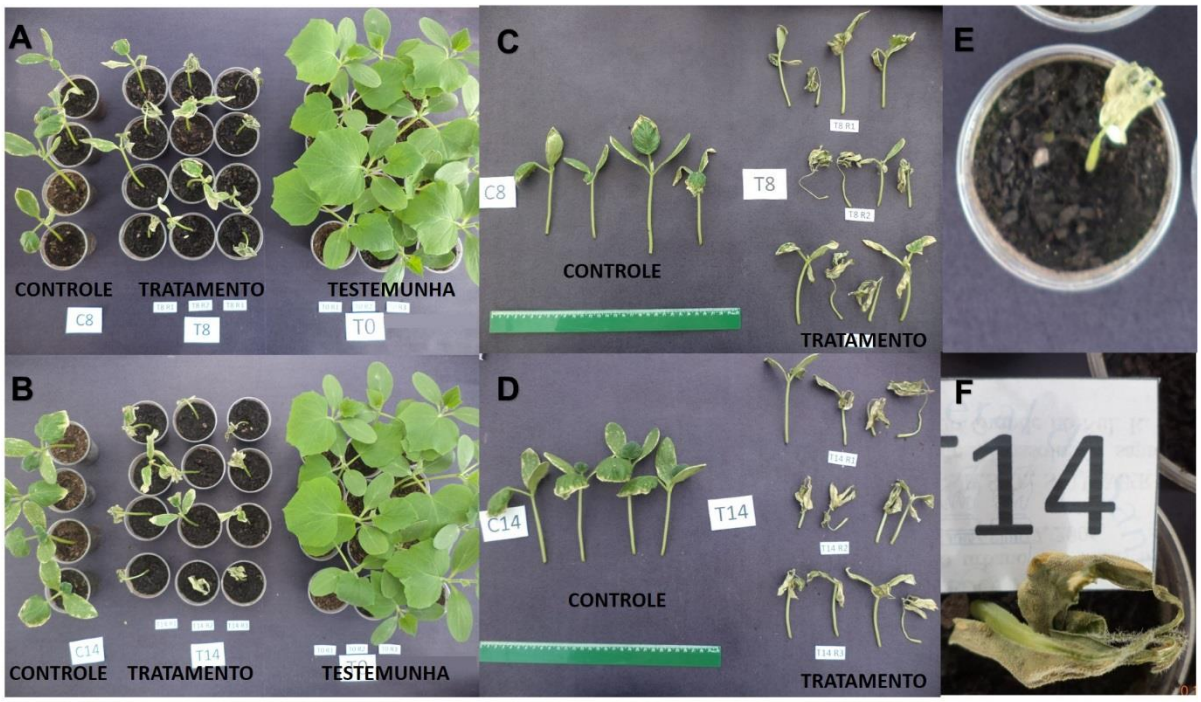
Tabela 5 – Altura de planta (cm), fitotoxicidade e massa seca de parte aérea (g) em função da formulação com adjuvantes.

Tratamento	Óleo de palma (g)	Massa Span® 80 (g)	Massa Tween® 80 (g)	EHL	Caldo fermentado (g)	Altura de planta (cm)	Fitotoxicidade	Massa seca (g)
Testemunha	-	-	-		-	9,1 a*	1 a	0,81 a
Caldo	-	-	-		25,0	6,9 c	3 c	0,56 b
T1	0,7	0,556	0,144	6,5	23,6	7,6 b	3 c	0,77 a
T2	2,05	0,556	0,144	6,5	22,25	8,2 a	3 c	0,82 a
T3	0,7	1,629	0,421	6,5	22,25	8,0 b	4 d	0,72 a
T4	2,05	1,629	0,421	6,5	20,9	7,5 b	5 e	0,73 a
T5	0,7	0,144	0,556	12,8	23,6	7,1 c	5 e	0,59 b
T6	2,05	0,144	0,556	12,8	22,25	7,6 b	4 d	0,71 a
T7	0,7	0,421	1,629	12,8	22,25	7,2 c	5 e	0,64 b
T8	2,05	0,421	1,629	12,8	20,9	5,9 d	7 f	0,57 b
T9	0,25	0,681	0,694	9,7	23,375	8,7 a	3 c	0,76 a
T10	2,5	0,681	0,694	9,7	21,125	7,1 c	5 e	0,61 b
T11	1,375	0,124	0,126	9,7	23,375	7,3 c	3 c	0,72 a
T12	1,375	1,238	1,262	9,7	21,125	7,8 b	5 e	0,81 a
T13	1,375	1,375	0	4,3	22,25	7,6 b	2 b	0,89 a
T14	1,375	0	1,375	15	22,25	5,8 d	8 g	0,51 b
T15	1,375	0,681	0,694	9,7	22,25	7,7 b	5 e	0,59 b
T16	1,375	0,681	0,694	9,7	22,25	7,7 b	5 e	0,65 b
T17	1,375	0,681	0,694	9,7	22,25	8,4 a	5 e	0,69 a
Coeficiente de variação (CV):						8,55%	0	12,86%

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

A avaliação de altura de plantas mostra que houve um efeito de supressão de crescimento em alguns tratamentos. Os tratamentos 14 e 8, respectivamente, foram os que apresentaram maior efeito de supressão, em torno de 36%, diferindo estatisticamente dos demais. Estes dois tratamentos foram também os que apresentaram maior fitotoxicidade nas folhas de *Cucumis sativus* (Figura 8).

Figura 8 – Imagens dos tratamentos 8 (A e C) e 14 (B e D) em comparação com seus respectivos controles e testemunha. Destaque do efeito na planta do tratamento 8 (E) e 14 (F).



Fonte: A autora

Alguns tratamentos apresentaram efeito significativo dos formulados sobre a massa seca das plantas de pepino. O tratamento 14 teve uma redução de 36,8% na massa seca em comparação com a testemunha. A aplicação de apenas o caldo provocou redução próxima a 31% de massa seca, porém, quando avaliada a fitotoxicidade, apenas pequenas pontuações cloróticas nas folhas foram observadas (Figura 9). Mello et al. (2003) relatam que as toxinas produzidas por fungos podem induzir nas plantas sintomas como clorose, murcha, encharcamento e alteração no crescimento.

Figura 9 – Danos causados em folhas de *Cucumis sativus* submetidas a aplicação de caldo fermentado de *Diaporthe* sp. sem adição de adjuvantes.

Fonte: A autora

Nesse sentido, o uso dos adjuvantes foi fundamental para o aumento da eficiência do herbicida obtido da fermentação de *Diaporthe* sp. sobre as plantas de *Cucumis sativus*. De acordo com Tremacoldi e Souza Filho (2006) as toxinas produzidas por micro-organismos podem desintegrar a estrutura celular das folhas e causar halos cloróticos ou lesões necróticas, com a vantagem de não serem tóxicas e se degradarem rapidamente no ambiente.

Em todas as avaliações os tratamentos 8 e 14 obtiveram os melhores resultados, o efeito mais acentuado dos danos pode ter sido causado pelo uso do Tween® 80 aliado ao óleo de palma. O uso do Span® 80 não influenciou na eficiência do herbicida, como observado no tratamento 14, que não utilizou Span® 80 na formulação.

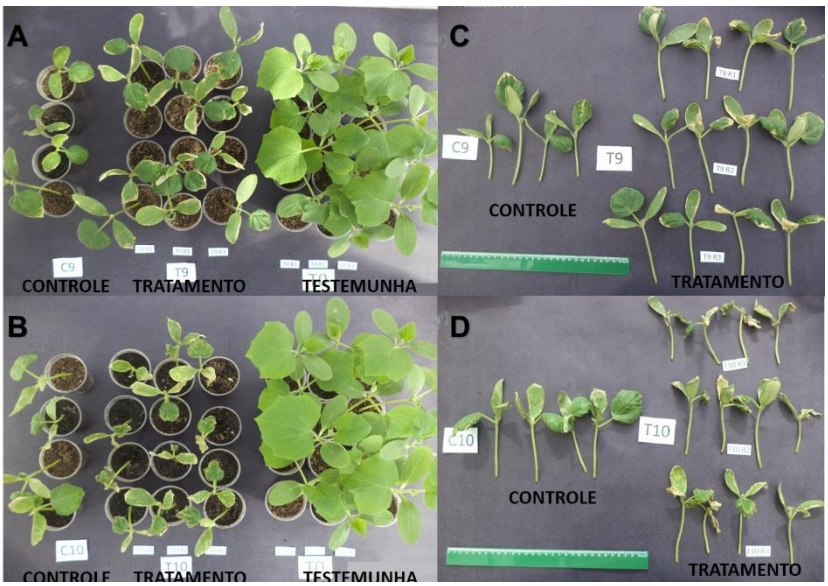
A absorção dos herbicidas aplicados sobre as plantas é principalmente através da cutícula das células da epiderme foliar. A cutícula é composta por três camadas, a mais externa é composta por ceras epicuticulares, com características lipofílicas, a camada intermediária matriz de cutina, com características hidrofílicas e a camada mais interna formada por ceras imersas na matriz de cutina, de características lipofílicas (CARVALHO, 2013).

Os herbicidas lipofílicos penetram através da cutícula por difusão molecular simples, através da camada cerosa. Os herbicidas hidrófilos (alto valor de EHL) também são capazes de entrar na planta pela superfície da cutícula por difusão simples, porém essa permeabilidade é reduzida devido ao seu baixo particionamento (HESS; FOY, 2000).

O resultado positivo do tratamento 14, 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).

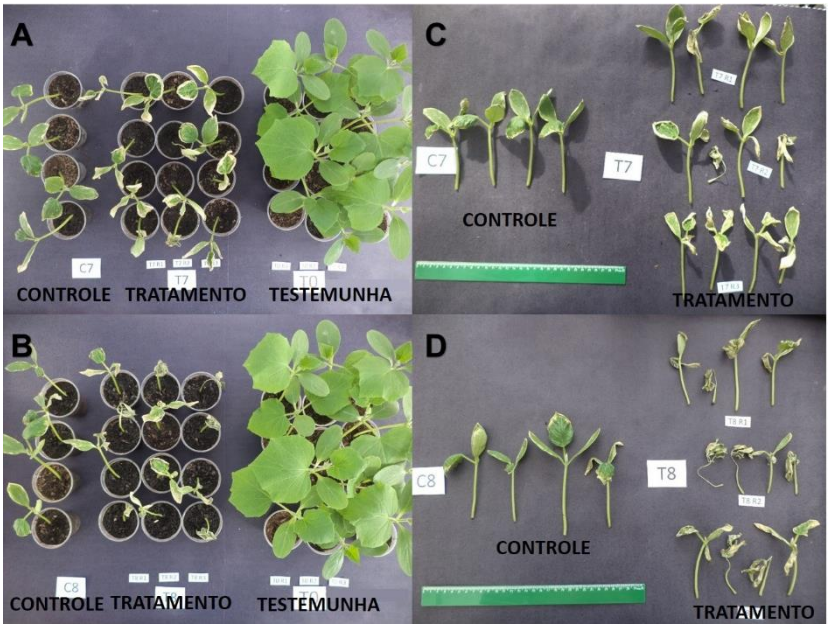
O efeito positivo do uso do óleo de palma também pode ser observado quando comparados os tratamentos 9 e 10, com as mesmas doses de Tween® 80 e Span® 80 porém variando a dose de óleo (Figura 10). O tratamento 9 com 0,25 gramas de óleo de palma, mesmo possuindo mais caldo em sua formulação, teve os resultados de altura de plantas e massa seca estatisticamente iguais à testemunha. Assim como os tratamentos 7 e 8, onde o T8 com maior concentração de óleo de palma obteve melhores resultados nos testes de altura de planta e fitotoxicidade (Figura 11). No entanto, este comportamento não foi observado entre os tratamentos 1 e 2, 5 e 6 que apresentam diferentes doses de óleo de palma e restante da formulação semelhantes.

Figura 10 – Comparação das lesões observados nos tratamentos 9 (A e C) e 10 (B e D).



Fonte: A autora

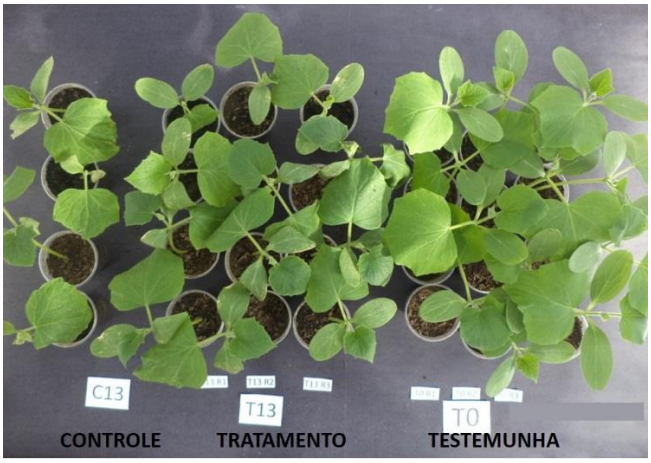
Figura 11 – Comparação das lesões observados nos tratamentos 7 (A e C) e 8 (B e D).



Fonte: A autora

Analisando o tratamento 13 (EHL 4,3), percebe-se que a formulação apenas com óleo de palma e Span® 80, não favoreceu a absorção dos compostos fitotóxicos pela planta de *Cucumis sativus*, já que os sintomas observados nas folhas foram inferiores aos observados na aplicação apenas do caldo. Além disso, não foi observado sintomas significativos nas folhas representativas do controle (Figura 12).

Figura 12 – Característica de plantas de *Cucumis sativus* após aplicação do tratamento 13.



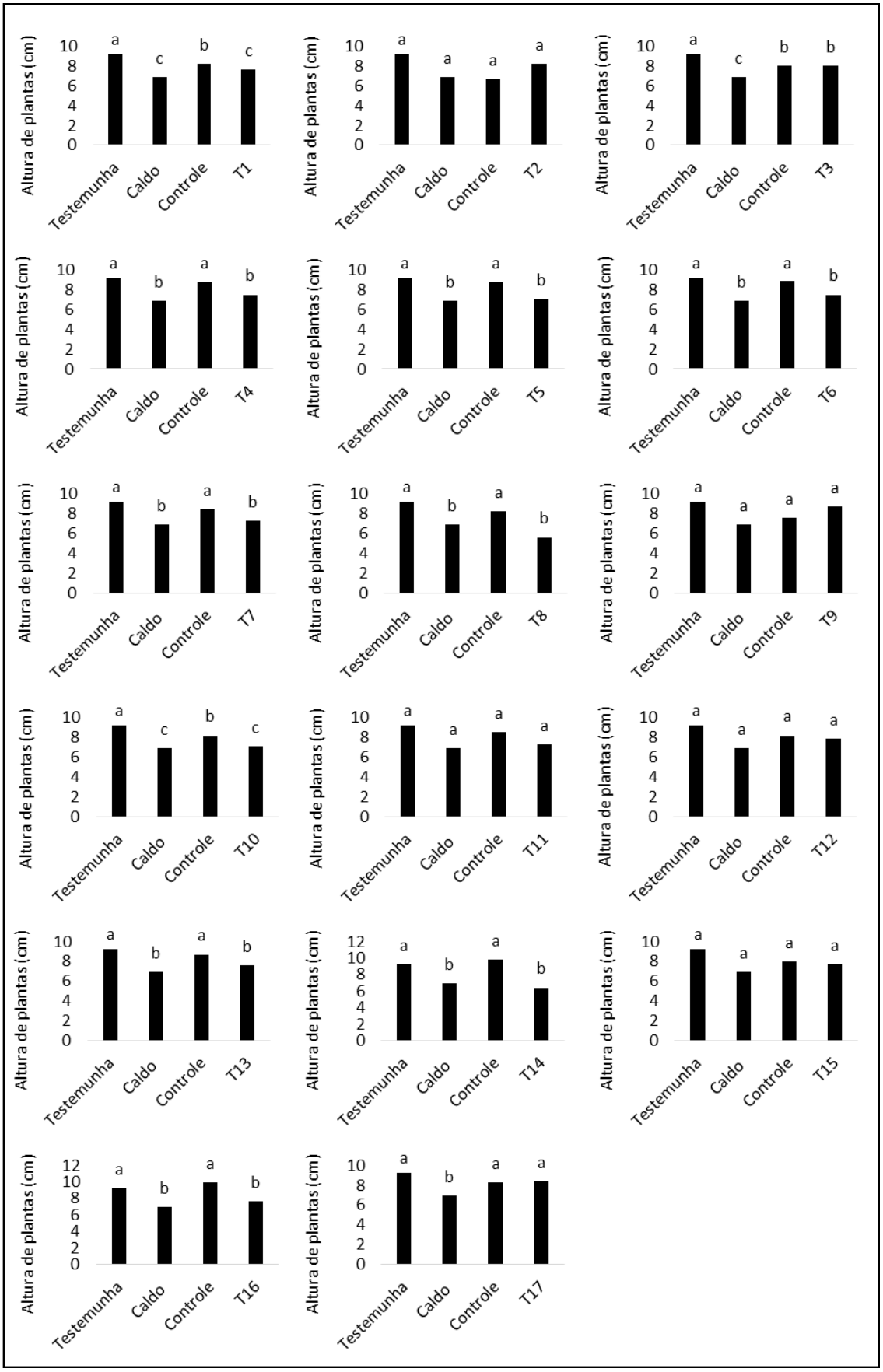
Fonte: A autora

A Figura 13 apresenta os gráficos referentes à altura de planta em cada tratamento, em comparação ao controle.

Quando se compara os tratamentos com o controle, observa-se que a aplicação de apenas os adjuvantes não têm efeito supressivo sobre o crescimento das plantas de *Cucumis sativus*, não diferindo estatisticamente da testemunha. Resultado semelhante foi encontrado por Gronwald et al. (2002), em que avaliando o uso isolado do adjuvante Silwet L-77 em plantas de *Cirsium arvense* não observaram redução da altura destas plantas, já quando utilizado na formulação com *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* obteve redução de 31% na altura de plantas.

O efeito supressivo do crescimento das plantas pelas fitotoxinas produzidas pelo fungo *Diaporthe* sp. pode ser observado nos tratamentos 1, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14 e 16, onde a aplicação apenas do caldo fermentado não diferiu estatisticamente da aplicação de caldo com adjuvantes. Estudando o uso de *Drechslera avenacea* como potencial herbicida, Hetherington et al. (2002) afirmam que isoladamente este micro-organismo não terá a mesma eficiência que um produto químico em termos de mortalidade de plantas, porém tem a capacidade de retardar o crescimento de plantas daninhas, evitando a competição com as plantas de interesse.

Figura 13 – Altura de plantas (cm) de *Cucumis sativus* submetidas a aplicação de diferentes formulações.

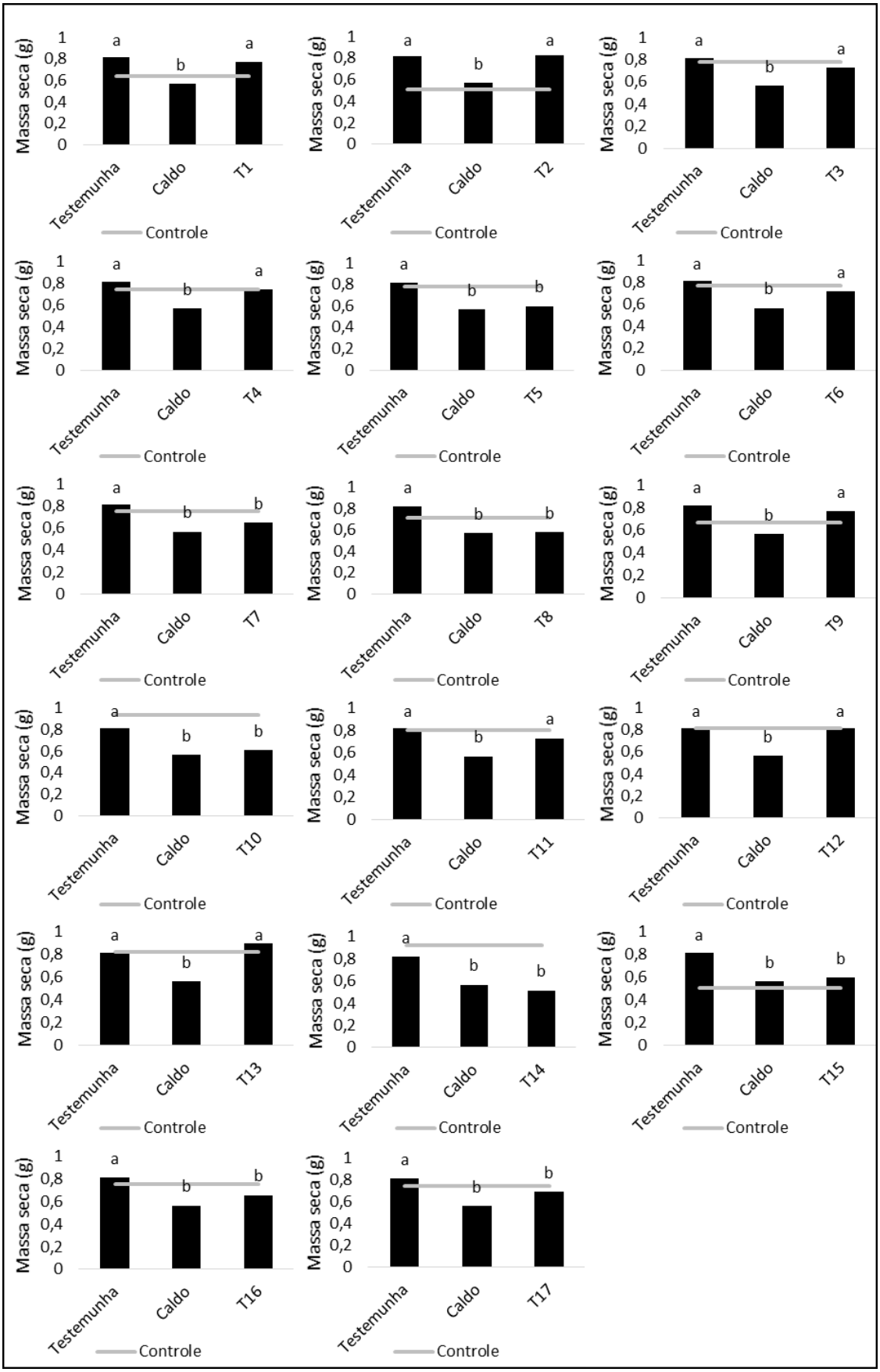


A avaliação da massa seca de plantas, comparando as testemunhas, tratamentos e controle estão apresentadas na Figura 14. Nos tratamentos 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 13, 16 e 17 a massa seca do controle foi próxima a média obtida na testemunha, sugerindo que o efeito de redução de massa seca é causado principalmente pela fitotoxina de *Diaporthe* sp.

Apenas nos tratamentos 5, 7, 8, 10, 14, 16 e 17 a aplicação de caldo com adição de adjuvantes teve médias menores do que os seus respectivos controles e estatisticamente diferentes à testemunha. Observa-se que na composição destes tratamentos (EHL entre 9,7 e 15) a relação entre dose de Tween® 80 e Span® 80 foi semelhante ou maior dose de Tween® 80 do que Span® 80. Formulações com valores de EHL de médio a alto podem ser mais eficientes, já que são absorvidas pela cutícula e aumentam a sua hidratação, favorecendo a permeabilidade de herbicidas hidrofílicos sobre as folhas, o que aumenta a velocidade de difusão de herbicidas em um gradiente de concentração constante (BEHRENS, 1964; 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. Em trabalho desenvolvido por Pes (2015), metabólitos do fungo *Diaporthe* sp. formulados com adjuvante causaram redução de 30 a 40% na massa seca de parte aérea de *Echinochloa* sp. e *Conyza* sp.

Figura 14 – Massa seca (g) de *Cucumis sativus* submetidas a aplicação de diferentes formulações.



As fitotoxicidades dos controles (adjuvantes) e dos tratamentos (caldo + adjuvantes) através da escala de EWRC (1964) são apresentados na Tabela 6.

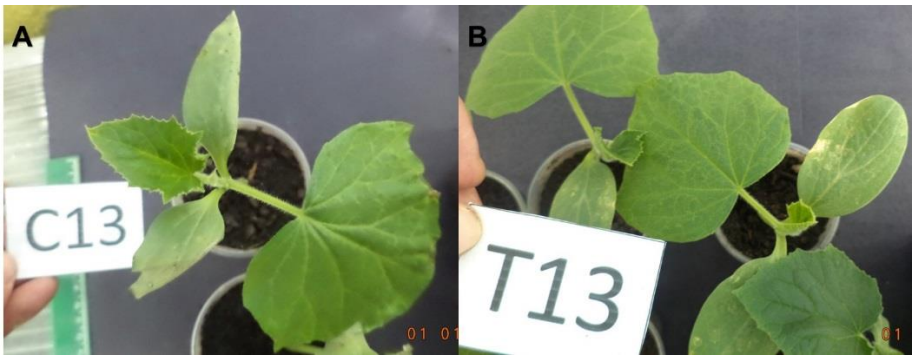
Tabela 6 – Avaliação da fitotoxicidade de plantas de *Cucumis sativus* submetidas aos diferentes formulados e seus respectivos controles (EWRC, 1964).

Tratamentos	Fitotoxicidade controle	Fitotoxicidade tratamento
Testemunha	1	1
Caldo	2	3
1	2	3
2	2	3
3	2	4
4	2	4
5	2	4
6	2	3
7	2	4
8	2	7
9	2	3
10	2	5
11	2	3
12	2	4
13	2	2
14	2	8
15	2	5
16	2	5
17	2	5

Quando comparamos as fitotoxicidades dos controles com os tratamentos, observamos que mesmo a aplicação isolada de adjuvantes provocou efeito fitotóxico nas plantas de *Cucumis sativus*. Porém, observa-se que as lesões causadas foram mais acentuadas quando adicionadas ao caldo fermentado. Apenas na formulação do tratamento 13 o dano causado pelas fitotoxinas do fungo *Diaporthe* sp. não foi potencializado com o uso dos adjuvantes.

A Figura 15 mostra a comparação entre as lesões ocorridas nas folhas do único tratamento que não diferiu na escala de fitotoxicidade (tratamento 13). O tratamento 13 apresentou pequenas e suaves lesões, assim como no seu controle pode-se observar algumas lesões com pouca severidade, principalmente na borda das folhas.

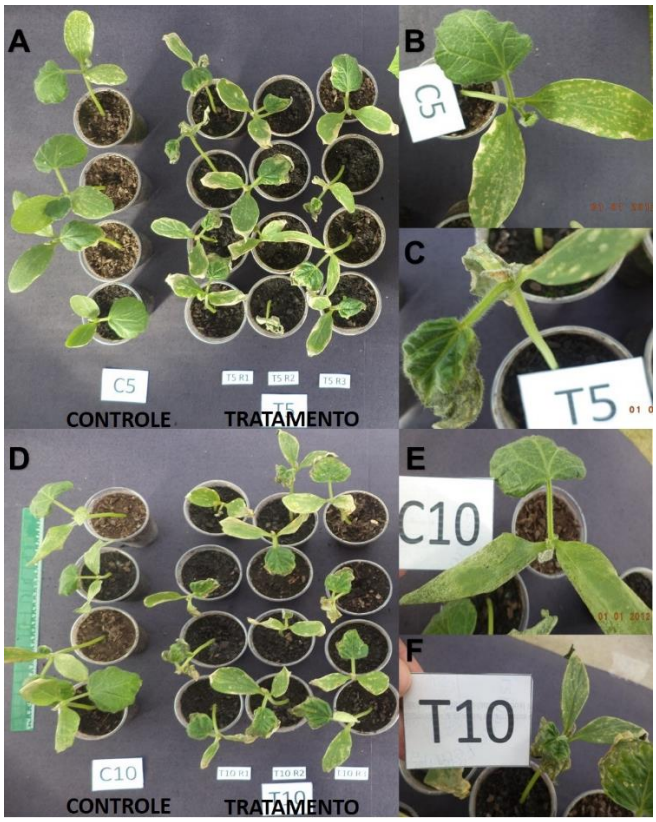
Figura 15 – Fitotoxicidade em folhas de *Cucumis sativus*. (A) Controle 13; (B) Tratamento 13



Fonte: A autora

Na maioria dos tratamentos foi observado que o uso dos adjuvantes + caldo causou uma queima na gema apical. Esta queima causa a paralização do crescimento das plantas, como exemplificado pelos tratamentos 5 e 10 (Figura 16).

Figura 16 – Fitotoxicidade causada pelo tratamento 5 (A, B e C) e tratamento 10 (D, E e F) em plantas de *Cucumis sativus*, comparadas com seus respectivos controles.



Fonte: A autora

6 CONCLUSÕES

- O micro-organismo *Diaporthe* sp. tem potencial de uso como herbicida em pós-emergência, causando lesões cloróticas nas folhas de *Cucumis sativus*.
- As melhores condições para que *Diaporthe* sp. expresse seu potencial fitotóxico foi com 25°C de temperatura, 50% de teor de umidade do substrato, suplementação com água de maceração de milho e farelo de soja de 10% e 15% de densidade de inóculo.
- O uso de adjuvantes nas formulações potencializa o efeito herbicida de *Diaporthe* sp.
- A formulação com 5,5 % em massa de óleo de palma, 5,5 % em massa de adjuvantes e EHL de 15 proporciona maior dano em plantas de *Cucumis sativus*.
- O adjuvante Span® 80 não aumenta a eficiência do herbicida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADINARAYANA, K. et al. Optimization of process parameters for cephalosporin C production under solid state fermentation from *Acremonium chrysogenum*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 171-177, 2003.

AGUDELO, L. M. G. **Avaliação de um biorreator rotativo para fermentação em estado sólido.** 2010. 98 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista, 2010.

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, 2014.

ASH, G. J. et al. Genetic characterization of a novel *Phomopsis* sp., a putative biocontrol agent for *Carthamus lanatus*. **Mycologia**, v. 102, p. 54–61, 2010.

BARBOSA, L. C. A. et al. Síntese e avaliação da atividade fitotóxica de novos análogos oxigenados do ácido helmintospórico. **Química Nova**, v. 26, p. 655-660, 2003.

BEHRENS, R. W. The Physical and Chemical Properties of Surfactants and Their Effects on Formulated Herbicides. **Weeds**, v. 12, p. 255-258, 1964.

BIANCHI, V. L. D.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em estado sólido. In: SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: E. Blücher, 2001. v. 2, 254 p.

BORZANI, W. et al. **Biotecnologia Industrial:** Fundamentos. São Paulo: E. Blücher, 2001. v. 1, 254 p.

BRACCINI, A. L. Banco de sementes e mecanismos de dormência em sementes de plantas daninhas. In: OLIVIERA JR, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. (Org.). **Biologia e manejo de plantas daninhas.** 2ed.CURITIBA: OmniPax Editora, 2011, v. 1, p. 37-66.

BRAGA, G. U. L.; DESTÉFANO, R. H. R.; MESSIAS, C. L. Protease production during growth and autolysis of submerged *Metarhizium anisopliae* cultures. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, p. 107-113, 1999.

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

CANHOS, V. P.; MANFIO, G. P. Recursos Microbiológicos para Biotecnologia. In: SILVEIRA, J. F. J.; POZ, M. E. D.; ASSAD. A. L. **Biotecnologia e Recursos Genéticos** - Desafios e Oportunidades para o Brasil. 252 ed. Campinas, 2004, 412 p.

CANTERI, M. G. et al. SASM - Agri : Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, p.18-24, 2001.

CANTRELL, C. L.; DAYAN, F. E.; DUKE, S. O. Natural products as sources for new pesticides. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 1231-1242, 2012.

CARVALHO, L. B. **Herbicidas**. 1. ed., 2013. 62 p.

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

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.

CIMMINO, A. et al. Fungal phytotoxins with potential herbicidal activity: chemical and biological characterization. **Natural Product Reports**, v. 32, p. 1629-1653, 2015.

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.; DUKE, S. O. Natural compounds as next-generation herbicides. **Plant Physiology**, v. 166, p. 1090–1105, 2014.

DELABONA, P. S. et al. Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading enzymes production and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 236-242, 2013.

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

DETTRAKUL, S. et al. Antimycobacterial pimarane diterpenes from the Fungus *Diaporthe* sp. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 1253–1255, 2003.

DING, B. et al. Novos membros da família diméricas phomoxanthone phomolactonexanthones: A, B e C deacetylphomoxanthone isolado a partir do fungo *Phomopsis* sp. **Mar Drugs**, v. 11, p. 4961-4972, 2013.

DUKE, S. O. Why have no new herbicide modes of action appeared in recent years? **Pest Management Science**, v. 68, p. 502-512, 2012.

DUKE, S. O.; DAYAN, F. E. Discovery of new herbicide modes of action with natural phytotoxins. **Discovery and Synthesis of Crop Protection Products**, v. 1204, p. 79-92, 2015.

DUKE, S. O. et al. **Biotechnology in Weed Control**. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, p. 1–25, 2015.

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

DURIGAN, J. C.; CORREIA, N. M. Efeito de adjuvantes na aplicação e eficácia de herbicidas. In: Leandro Vargas; Erivelton Scherer Roman (in memorian). (Org.). **Manual de manejo e controle de plantas daninhas**. 1ed.:, 2008, p. 133-171.

EUROPEAN WEED RESEARCH COUNCIL. Report of the 3rd and 4rd meetings of EWRC. Comittes of Methods in Weed Research. **Weedsearch**, v. 4, p. 88, 1964.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. Biotecnologia: uma visão geral. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M; JÚNIOR, F. B. R. (Org.). **Biotecnologia**: estado da arte e aplicações na agropecuária. 1ed.Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011, 730 p.

FERREIRA, A. G.; ÁQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, n. 12, p. 175-204, 2000.

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

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

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

GRIFFIN, W. C. “Classification of Surface – Active Agents by HLB”. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 1, p. 311-326, 1949.

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

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

HETHERINGTON, S. D. et al. Effects of some environmental conditions on the effectiveness of *Drechslera avenacea* (Curtis ex Cooke) Shoem.: a potential bioherbicidal organism for *Avena fatua* L. **Biological Control**, v. 24, p. 103–109, 2002.

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

HUSSAIN, H. et al. Antimicrobial chemical constituents from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Notobasis syriaca*. **Natural Product Communications**, v. 6, p. 1905 – 1906, 2011.

KHALIQ, A. et al. Differential suppression of rice weeds by allelopathic plant aqueous extracts. **Planta Daninha**, v. 31, p. 21-28, 2013.

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.; DORNELLES, S. B. (Org.) **Tecnologia e segurança na aplicação de agrotóxicos:** novas tecnologias. Santa Maria: Departamento de Defesa Fitossanitária; Sociedade de Agronomia de Santa Maria, 1998. p. 39-51.

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.

KRISHNA, C. Solid-State Fermentation Systems - An Overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, p. 1-30, 2005.

KROHN, K. et al. Phomosines H–J, Novel Highly Substituted Biaryl Ethers, Isolated from the Endophytic Fungus *Phomopsis* sp. from *Ligustrum vulgare*. **Natural Product Communications**, v. 6, p. 1907 – 1912, 2011.

LIN, X. et al. Cytotoxic and antimicrobial metabolites from marine lignicolous fungi, *Diaporthe* sp. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, p. 53–58, 2005.

LOPES, R. B. A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microrganismos no Brasil. In: BETTIOL, W., MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas**: uso e perspectivas. Embrapa, 2009.

LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas:** plantio direto e convencional. 7. Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2014.

MADUREIRA, R. P. et al. Tensão superficial e ângulo de contato de gotas provenientes de diferentes soluções com adjuvantes em superfície foliar do algodoeiro. In: Simpósio Internacional de Tecnologia de Aplicação, 2013, Londrina. **Tecnologia de Aplicação:** da teoria ao campo, 2013.

MAHADIK, N. D. et al. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 715–721, 2002.

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, 2003. 55 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 104).

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. **Biotecnologia Agropecuária**. Boletim Técnico. 2010. 73 p.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Overview of solid state bioprocessing. **Biotechnology Annual Review**, v. 8, p. 183-225, 2002.

MIZUMOTO, S.; HIRAI, M.; SHODA, M. Production of lipopeptide antibiotic iturin A using soybean curd residue cultivated with *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 869–875, 2006.

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

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

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

OLIVEIRA JR, R. S. Introdução ao controle químico. In: Rubem Silvério de Oliveira Jr.; Jamil Constantin; Miriam Hiroko Inoue. (Org.). **Biologia e manejo de plantas daninhas**. 1ed.Curitiba, PR: Omnipax Editora Ltda, 2011, v. 1, p. 125-140.

OLIVEIRA, M. F. de; BRIGHENTI, A. Comportamento dos Herbicidas no Ambiente. In: Rubem Silvério de Oliveira Júnior, Jamil Constantin, Miriam Hiroko Inoue. (Org.). **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**. 1ed.Maringá, PR: Omnipax, 2011, v. 1, p. 263-304.

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

PANDEY, A. Recent Process Developments in Solid-State Fermentation. **Process Biochemistry**, v. 27, 109-117, 1992.

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

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

PAPAGIANNI, M; MOO-YOUNG, M. Protease secretion in glucoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1271–1278, 2002.

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

PLETSCH, M. A aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 4, p. 12-15, 1998.

PRADA, H. et al. Caracterización morfológica y molecular del antagonismo entre el endófito *Diaporthe* sp. aislado de frailejón (*Espeletia* sp.) y el fitopatógeno *Phytophthora infestans*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, p. 198-201, 2009.

QUIROZ, R. D. L. C. et al. Challenges and opportunities of the bio-pesticides production by solid-state fermentation: filamentous fungi as a model. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 35, p. 1-8, 2015.

RAHARDJO, Y. S. P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 161–179, 2006.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, 1998.

RUBERSON, J. R. **Handbook of pest management**. CRC Press, 1999.

SALGADO, C. L.; AMORIM, L. Sintomatologia. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1, p. 212-223.

SANDHYA, C. et al. Microbial synthesis of chitinase in solid cultures and its potential as a biocontrol agent against phytopathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 127, p. 1-15, 2005.

SANGHI, A. et al. Optimization of xylanase production using inexpensive agro-residues by alkalophilic *Bacillus subtilis* ASH in solid-state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 633-640, 2008.

SANTOS, J. M. **Resolução do complexo de espécies de *Phomopsis* e dos seus teleomorfos *Diaporthe* no hospedeiro *Foeniculum vulgare*.** (Mestrado em Biologia Molecular e Genética). Universidade de Lisboa, 2008.

SANTOS, P. J. C. et al. *Diaporthe endophytica* and *D. terebinthifolii* from medicinal plants for biological control of *Phyllosticta citricarpa.* **Microbiological Research**, v. 186–187, p. 153–160, 2016.

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

SCHMIDELL, W. Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial. In: SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: E. Blücher, 2001. v. 2, 254 p.

SELVAKUMAR, P.; PANDEY, A. Solid state fermentation for the synthesis of inulinase from *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 851–855, 1999.

SHARMA, P. D. **Plant Pathology**. Editora Rastogi Publications, 468 p., 2014.

SHERRICK, S. T.; HOLT, H. A.; HESS, F. D. Effects of adjuvants and environment during plant development on glyphosate absorption and translocation in field bindweed (*Convulvus arvensis*). **Weed Science**, v. 34, p. 811-816, 1986.

SHIONO, Y. et al. Isolation of a phomoxanthone A derivative, a new metabolite of tetrahydroxanthone, from a *Phomopsis* sp. isolated from the mangrove, *Rhizhopora mucronata*. **Natural Product Communications**, v. 8, p. 1735-1737, 2013.

SOUZA, A. R. C. **Obtenção de isolados a partir de recursos biológicos do bioma Pampa com potencial no controle de plantas.** 2015, p. 75. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015a.

SOUZA, A. R. C. et al. Bioherbicide production by *Diaporthe* sp. isolated from the Brazilian Pampa biome. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 575–578, 2015b.

SPECIAN, V. et al. Chemical characterization of bioactive compounds from the endophytic fungus *Diaporthe helianthi* isolated from *Luehea divaricata*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 1174-1182, 2012.

TE BEEST, D. O., YANG, X. B., CISAR, C. R. The status of biological control of weeds with fungal pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, p. 637-657, 1992.

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

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, 2006 (Série Embrapa - Documentos).

UNDERWOOD, A. K. Adjuvant trends for the new Millennium. **Weed Technology**, Champaign, v. 14, n. 4, p. 765-772, 2000.

VALOIS, A. C. C. **Importância dos transgênicos para a agricultura**. Cadernos de Ciência e Tecnologia, Brasília, v. 18, p. 27-53, 2001.

VAREJÃO, E. V. V. et al. Toxicidade de filtrados de cultura de *Alternaria euphorbiicola* em folhas de *Euphorbia heterophylla*. **Planta daninha**, v. 31, p. 1-9, 2013.

VARGAS, L.; ROMAN, E. S. **Conceitos e aplicações dos adjuvantes**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006. 10 p. (Embrapa Trigo. Documentos, 56).

VU, V. H.; PHAM, T. A.; KIM, K. Improvement of Fungal Cellulase Production by Mutation and Optimization of Solid State Fermentation. **Mycobiology**, v. 39, p. 20-25, 2011.

WEAVER, M. A. Improved bioherbicidal efficacy by *Myrothecium verrucaria* via spray adjuvants or herbicide mixtures. **Biological Control**, v. 50, p. 150–156, 2009.