

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

José Roberto Chaves Neto

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES PARA POTENCIALIZAR
A AÇÃO DE METABÓLITOS DE *Phoma dimorpha* NO CONTROLE
BIOLÓGICO DE PLANTAS DANINHAS**

Santa Maria, RS

2019

José Roberto Chaves Neto

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES PARA POTENCIALIZAR A AÇÃO DE
METABÓLITOS DE *Phoma dimorpha* NO CONTROLE BIOLÓGICO DE PLANTAS
DANINHAS**

Tese de Doutorado 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 de grau de **Doutor em Engenharia Agrícola**.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Tres

Co-orientador: Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti

Santa Maria, RS

2019

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

Chaves Neto, José Roberto Chaves Neto
DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES PARA POTENCIALIZAR A
AÇÃO DE METABÓLITOS DE *Phoma dimorpha* NO CONTROLE
BIOLÓGICO DE PLANTAS DANINHAS / José Roberto Chaves Neto
Chaves Neto.- 2019.
190 p.; 30 cm

Orientador: Marcus Vinicius Tres Tres
Coorientador: Marcio Antonio Mazutti Mazutti
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Engenharia Agrícola, RS, 2019

1. Controle Biológico 2. Plantas Daninhas 3. *Phoma*
dimorpha 4. Concentração por membrana 5. Formulação I.
Tres, Marcus Vinicius Tres II. Mazutti, Marcio Antonio
Mazutti III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

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

José Roberto Chaves Neto

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES PARA POTENCIALIZAR A
AÇÃO DE METABÓLITOS DE *Phoma dimorpha* NO CONTROLE BIOLÓGICO
DE PLANTAS DANINHAS**

Tese de Doutorado 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 de grau de **Doutor em Engenharia Agrícola**.

Aprovado em 13 de dezembro de 2019:



Marcus Vinícius Tres, Dr.
(UFSM)
(Presidente/Orientador)



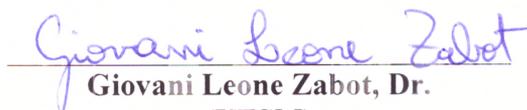
Marcio Antonio Mazutti, Dr.
(UFSM)
(Co-orientador)



Marco Di Luccio, Dr.
(UFSC) - Videoconferência



Rogério Marcos Dallago, Dr.
(URI) - Videoconferência



Giovanni Leone Zabet, Dr.
(UFSM)



Paulo Ademar Avelar Ferreira, Dr.
(UFSM)

Santa Maria, RS

2019

DEDICATÓRIA

A Deus e a Nossa Senhora da Guia, por todas as bênçãos e conquistas realizadas em minha vida.

*Aos meus pais, **Sebastião Chaves Sobrinho e Maria Jacinta Chaves**, pelo apoio incondicional em minhas decisões durante toda minha vida, os quais me ensinaram a buscar a cada dia a sobrevivência e lutar por meus sonhos, se enchendo de alegria sempre a cada conquista minha concretizada. Vocês foram e sempre serão exemplos de honestidade, bondade e compreensão. Vocês são meu orgulho....*

*As minhas irmãs, **Roberta Maria Chaves e Renata Maria Chaves**, pela amizade, ajuda e por sempre acreditarem e me incentivarem na busca desta conquista....*

*As minhas sobrinhas **Maria Clara e Maria Cecilia**, por todo o amor e alegria que trazem para nossa família....*

*“Senhor, tu chegas ao mais profundo
de mim e me conheces por dentro. Sabes
quando não sei o que fazer: Entendes
minhas ilusões e meus desejos como se fossem teus:
Em meu caminho puseste uma trilha,
em meu descanso sentaste a meu lado;
Tocaste todos os meus projetos palmo a palmo.”*

Salmo 139

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, por andar sempre comigo e ajudar-me a superar todas as dificuldades, não me deixando desistir, mesmo nos momentos mais difíceis.

A Nossa Senhora da Guia, por ter me guiado, dado força, ânimo, sabedoria e por permitir mais uma conquista em minha vida.

A minha família “Chaves”, pelo apoio incondicional durante toda esta caminhada. Família está que é e sempre será meu alicerce. Tenho orgulho de ser filho e fazer parte desta família, agradeço a todos vocês grandiosamente.

Ao meu orientador, professor Dr. Marcus Vinícius Tres, pela oportunidade, pelo auxílio e pela imensa presteza na orientação. Grato por tudo.

Ao meu co-orientador, professor Dr. Marcio Antonio Mazutti pelo auxílio na execução do trabalho e pela presteza de suas contribuições.

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho, por meio da bolsa e recursos concedidos.

Aos meus velhos e verdadeiros amigos que sempre torceram por mim, me deram apoio e me depositaram muita confiança sempre, nas pessoas de: Elenir, Hilda, Alécio, Pâmella, Cristiany e Joalisson. De coração, obrigado a todos vocês.

A José Ederli, pelo apoio e companheirismo.

Ao meu amigo de quatro patas Dom, que tanto me escuta, e me dar carinho durante esses últimos anos.

Aos colegas e as amizades construídas no decorrer deste curso, que certamente levarei para a toda a vida: Luana Ferreira, Suany Pinheiro, Max Dantas, Ricardo Boscaini, Luciana Luft, Tassia Confortin e Izelmar Todero.

A todos aqueles que fazem parte do Laboratório Biotec Factory do Departamento de Engenharia Química, pois foram fundamentais para realização deste projeto.

A todos aqueles que fazem parte do Laboratório de Manejo Integrado de Pragas – LabMIP, nas pessoas de: Prof. Dr. Jerson Vanderlei Carús Guedes e Gustavo Ugalde.

A todos aqueles que fazem parte do Laboratório de Engenharia de Processos Agroindustriais - LAPE: Prof. Dr. Giovani Leone Zobot, e todos os demais que contribuíram para realização deste trabalho.

A Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, pelo suporte e pela oportunidade cedida através do Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola, em poder aprimorar ainda mais meus conhecimentos.

A Luciana secretaria do Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola, pela dedicação e auxílio sempre que necessário.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Santa Maria, por todo conhecimento transmitido.

A comissão examinadora pela colaboração e por disponibilizar seu tempo para avaliação deste trabalho: Prof. Dr. Marco Di Luccio (UFSC), Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago (URI - Erechim), Prof. Dr. Giovani Leone Zobot (UFSM - CS) e Prof. Dr. Paulo Ademar Avelar Ferreira (UFSM - CS).

Aos colegas e amigos da empresa Simões Treinamentos: Rosana, Daniela, Eduardo, Sônia, Ricardo, Andriele, Mateus, Alisson, Natalia, e todos os demais.

Enfim a todos que passaram pela minha vida nessa caminhada de formação acadêmica e profissional e me ajudaram no decorrer deste percurso.

Meu muito obrigado!

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES PARA POTENCIALIZAR A AÇÃO DE METABÓLITOS DE *Phoma dimorpha* NO CONTROLE BIOLÓGICO DE PLANTAS DANINHAS

AUTOR: José Roberto Chaves Neto

ORIENTADOR: Dr. Marcus Vinícius Tres

CO-ORIENTADOR: Dr. Marcio Antonio Mazutti

Nas últimas décadas, o setor agrícola enfrenta inúmeras dificuldades devido aos danos causados pela presença de plantas daninhas em diversas culturas, ocasionando perdas expressivas na produção de alimentos. Dentre as alternativas para redução das perdas, destaca-se o controle biológico baseado no uso de metabólitos secundários biosintetizados por microrganismos, sendo o grupo dos fungos endófitos os mais empregados. Além de realizar a concentração destes metabólitos, é necessário determinar os processos de formulação que proporcionem ao produto final, estabilidade, molhabilidade, espalhabilidade e penetração nas plantas. Assim, o objetivo geral deste trabalho foi desenvolver formulações para potencializar a ação do caldo fermentado proveniente do fungo *Phoma dimorpha* concentrado por processos de separação por membranas, no controle biológico de plantas daninhas. Foram avaliadas também a eficácia e viabilidade de três métodos de preservação de isolados deste fungo (repicagens periódicas, Castellani e fragmentos de papel-filtro), em dois períodos de avaliação; eficiência da utilização de diferentes métodos para superação de dormência de sementes das plantas daninhas capim-arroz (*Echinochloa* spp.), caruru-roxo (*Amaranthus cruentus*), picão-preto (*Bidens pilosa*) e mata-pasto (*Senna obtusifolia*). Os compostos bioativos produzidos a partir da fermentação submersa do fungo *P. dimorpha* foram concentrados por ultrafiltração (UP010), microfiltração (MP005) e nanofiltração (NP010) e foi investigado a eficácia do caldo fermentado bruto do fungo *P. dimorpha*, da fração permeada e retida e das formulações no controle biológico de diferentes espécies de plantas: Pepino (*Cucumis sativus*) capim-arroz (*Echinochloa* spp.), caruru-roxo (*Amaranthus cruentus*), picão-preto (*Bidens pilosa*) e mata-pasto (*Senna obtusifolia*). Com base nos resultados observou-se que o fragmento de papel filtro foi o método

mais eficaz na preservação de isolados de *P. dimorpha*. Para a superação de dormência das sementes das plantas daninhas, constatou-se que o método de escarificação mecânica com lixa foi o mais eficiente para a espécie *Senna obtusifolia*; já para as espécies *Bidens pilosa*, *Echinochloa* sp. e *Amaranthus cruentus* o método mais eficiente foi a embebição em água por 48 horas. Independente da membrana utilizada no processo de concentração do caldo fermentado, ocorreu a redução da tensão superficial da fração retida, ficando abaixo dos valores do caldo bruto. Constatou-se também que a concentração intensificou o efeito fitotóxico do caldo sobre folhas destacadas de *C. sativus* independente da membrana utilizada. As formulações do caldo concentrado provenientes de cada membrana, independente do óleo vegetal e da espécie de planta daninha alvo, ocasionaram injúrias, desde pequenas manchas, amarelecimentos e necrose nas folhas, até danos a gema apical, paralisação do crescimento e por fim morte de plantas. As formulações com a fração retida do caldo proveniente da membrana de nanofiltração (NP010) ocasionaram maior controle das plantas daninhas com porcentagens de ação herbicida superiores a 73%.

Palavras chave: Controle Biológico, *Phoma dimorpha*, Preservação de fungo, Superação de dormência, Concentração por membrana, Formulação.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF FORMULATIONS TO POTENTIALIZE THE METABOLITES ACTION OF *Phoma dimorpha* IN BIOLOGICAL CONTROL OF WEED

AUTHOR: José Roberto Chaves Neto

ADVISOR: Dr. Marcus Vinícius Tres

COADVIOSOR: Dr. Marcio Antonio Mazutti

In the last decades, the agricultural sector has faced many difficulties due to damage caused by the presence of weeds in several crops, causing significant losses in food production. Among the alternatives for reducing losses, stands out the biological control based on the use of biosynthesized secondary metabolites by microorganisms, being the group of endophyte fungi the most used. In addition to concentration of these metabolites, it is necessary to determine the formulation processes that provide the final product with stability, wettability, spreadability and plant penetration. Thus, the general objective of this work was to develop formulations to enhance the action of fermented broth from *Phoma dimorpha* concentrate concentrated by membrane separation processes in biological weed control. Evaluating the efficacy and viability of three methods of preserving isolates of this fungus (periodic subcultures, Castellani and filter paper fragments), in two evaluation periods; to evaluate the efficiency of the use of different methods for overcoming seed dormancy of rice grass (*Echinochloa* spp.), purple amaranth (*Amaranthus cruentus*), black-jack (*Bidens pilosa*) and sicklepod (*Senna obtusifolia*) weeds, produce bioactive compounds from submerged fermentation of *P. dimorpha*; concentrate the bioactive compounds present in the crude fermentation broth of *P. dimorpha* by ultrafiltration (UP010), microfiltration (MP005) and nanofiltration (NP010) membranes and investigate the effectiveness of the crude fermentation broth of *P. dimorpha* fungus from permeate and retentate fraction and formulations in the biological control of different plant species: cucumber (*Cucumis sativus*), rice grass (*Echinochloa* spp.), purple amaranth (*Amaranthus cruentus*), black-jack (*Bidens pilosa*) and sicklepod (*Senna obtusifolia*). Based on the results it was observed that the filter paper fragment was the most effective method for preserving *P. dimorpha* isolates. To overcome weed seed dormancy, it was found that the mechanical

scarification method with sandpaper was the most efficient for *Senna obtusifolia*; for *Bidens pilosa*, *Echinochloa* sp. and *Amaranthus cruentus* the most efficient method was soaking in water for 48 hours. Regardless of membrane used in fermentation broth concentration process, the surface tension of retentate fraction was reduced to below the broth values. It was also found that the concentration intensified the phytotoxic effect of concentrated broth (retentate fraction) on detached leaves of *C. sativus* independent of membrane used. The concentrated broth (retentate fraction) formulations from each membrane, regardless of vegetable oil and target weed species, caused injuries, from small spots, yellowing and leaf necrosis, to damage to apical bud, growth paralysis and by end plant death.

Key words: Biological Control, *Phoma dimorpha*, Preservation of fungus, Overcoming dormancy, Membrane concentration, Formulation.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ARTIGO I: RESISTÊNCIA DE PLANTAS DANINHAS A HERBICIDAS E ALTERNATIVAS DE CONTROLE: UMA REVISÃO

Tabela 1 - Principais plantas daninhas de importância global.....35

Tabela 2 - Bioherbicidas produzidos a partir de metabólitos secundários produzidos por microrganismos e plantas medicinais para o controle de plantas daninhas.....39

2.2. ARTIGO II: NOVAS TECNOLOGIAS PARA FORMULAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR *Phoma* sp. PARA O CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS: UMA REVISÃO

Tabela 1 - Identificação de compostos bioativos e atividade biológica de metabólitos produzidos por diferentes espécies de *Phoma*.....55

Tabela 2 - Vantagens e desvantagens da emulsificação da membrana em comparação aos métodos convencionais.....64

Tabela 3 - Bioherbicidas de metabólitos secundários produzidos por fungos.....68

CAPÍTULO 3 - PRESERVAÇÃO DO FUNGO *Phoma dimorpha*

3.1. ARTIGO III: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DO FUNGO *Phoma dimorpha*

Tabela 1 - Resumo da análise de variância e valores médios de crescimento micelial (CM - mm), eficácia do método de preservação (EMP - %) e índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) do fungo *P. dimorpha* em função do método de preservação, em seis (6 MA) e doze meses de armazenamento (12MA)82

CAPÍTULO 4 – QUEBRA DE DORMÊNCIA DE PLANTAS DANINHAS

4.1. ARTIGO IV: SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA DE SEMENTES DE *Senna obtusifolia*

Tabela 1 - Porcentagem média de germinação (PG), eficácia do tratamento (ET), velocidade média de germinação (VG) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *S. obtusifolia* (L.) H. S. Irwin & Barneby após os diferentes métodos de superação de dormência, no final de 8 dias de avaliação.....98

Tabela 2 - Comprimento médio de parte aérea (CPA) e de raiz primária (CRP) de plântulas provenientes do teste de germinação de sementes de *S. obtusifolia* (L.) H. S. Irwin

& Barneby, submetidas a diferentes métodos de superação de dormência, no período de 8 dias de avaliação.....100

Tabela 3 - Valores médios de massa fresca total (MF) e massa seca total (MS) de plântulas provenientes do teste de germinação de sementes de *S. obtusifolia* (L.) H. S. Irwin & Barneby, submetidas a diferentes métodos de superação de dormência.....100

4.2. ARTIGO V: SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA DE SEMENTES DE DIFERENTES PLANTAS DANINHAS

Tabela 1 - Espécies de plantas daninhas submetidas aos tratamentos de superação da dormência.....109

Tabela 2 - Resumo da análise de variância dos atributos avaliados em sementes de *Echinochloa* spp., *Amaranthus cruentus* e *Bidens pilosa*.....111

Tabela 3 - Absorção de água e porcentagem de germinação das sementes de *Echinochloa* spp., *Amaranthus cruentus* e *Bidens pilosa*, após embebição em água por diferentes períodos para a superação de dormência.....112

Tabela 4 - Comprimento médio de parte aérea (CPA) e de raiz primária (CR), massa fresca total (MF) e massa seca total (MS) de plântulas provenientes do teste de germinação de sementes de *Echinochloa* sp., *Amaranthus cruentus* e *Bidens pilosa*, embebição em água por diferentes períodos para a superação de dormência, no período de 8 dias de avaliação.....114

CAPÍTULO 5 – APLICAÇÃO DO CALDO FERMENTADO BRUTO DO FUNGO *Phoma dimorpha* SOBRE PLANTAS DANINHAS

5.1. ARTIGO VI: AÇÃO FITOTÓXICA DO CALDO FERMENTADO DO FUNGO *Phoma dimorpha* SOBRE ATRIBUTOS FISIOLÓGICOS DE SEMENTES E PLANTAS DE *Senna obtusifolia*

Tabela 1 - Descrição da escala para avaliação do percentual de fitotoxicidade em folhas destacadas e plantas, desenvolvida com base nos conceitos aplicados às avaliações de toxicidade de acordo com a SBCPD.....125

Tabela 2 - Porcentagem média de germinação (PG - % de plântulas normais) de sementes de *S. obtusifolia*, submetidas a aplicação de metabólitos secundários de *P. dimorpha*.....126

Tabela 3 - Teste de Fitotoxicidade (%) em folhas destacadas de *S. obtusifolia* aos 3, 6 e 9 dias após a aplicação de metabólitos secundários de *P. dimorpha*.....128

Tabela 4 - Teste de fitotoxicidade (%) em plantas de *S. obtusifolia* aos 15 dias após a aplicação de metabólitos secundários de *P. dimorpha*.....129

Tabela 5 - Altura de planta (AP - cm), redução do percentual de crescimento (RPC - %) e massa fresca de plantas (MFP - g) de plantas de *S. obtusifolia* aos 15 dias após a aplicação de metabólitos secundários de *P. dimorpha*.....130

5.2. ARTIGO VII: EFEITO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS por *Phoma dimorpha* SOBRE A GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DE SEMENTES DE DIFERENTES ESPÉCIES VEGETAIS

Tabela 1 - Espécies de plantas utilizadas no teste de germinação em função da aplicação dos metabólitos secundários provenientes da fermentação submersa do fungo *P. dimorpha*.....137

Tabela 2 - Composição do meio líquido de cultivo para o processo de fermentativo do fungo *P. dimorpha*.....138

Tabela 3 - Porcentagem média de germinação (% de plântulas normais), em função da aplicação dos metabólitos secundários do fungo *P. dimorpha* sobre sementes das diferentes espécies de plantas cultivadas e daninhas.....141

Tabela 4 - Comprimento de parte aérea e de raiz (mm), massa fresca e massa seca (g) de plântulas das diferentes espécies de plantas bioindicadoras e daninhas estudadas, sob efeito da aplicação dos metabólitos secundários do fungo *P. dimorpha*, provenientes do teste de germinação.....143

Tabela 5 - Teste de Fitotoxicidade (%) em folhas destacadas das diferentes espécies de plantas bioindicadoras e daninhas, 9 após a aplicação dos metabólitos secundários do fungo *P. dimorpha*.....145

CAPÍTULO 6 - CONCENTRAÇÃO E FORMULAÇÃO DE BIOHERBICIDA

6.1. ARTIGO VIII: AÇÃO FITOTÓXICA DE METABÓLITOS DE *Phoma dimorpha* NO CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS: CONCENTRAÇÃO POR MEMBRANAS, FORMULAÇÃO E APLICAÇÃO

Tabela 1 - Características das membranas utilizadas neste trabalho.....156

Tabela 2 - Planejamento experimental Composto Central 2² com três repetições no ponto central, para membrana de ultrafiltração (UP010), microfiltração (MP005) e nanofiltração (NP010).....158

Tabela 3 – Escala de fitotoxicidade (% danos) em folhas destacadas e plantas, desenvolvida com base nos conceitos aplicados às avaliações de toxicidade.....160

Tabela 4 - Descrição das formulações, nas diferentes concentrações do caldo fermentado bruto sem células do fungo <i>P. dimorpha</i> em mistura com os adjuvantes e os diferentes óleos vegetais.....	160
Tabela 5 - Tensão superficial (TS - mN m ⁻¹) e pH da água destilada, do caldo fermentado bruto do fungo <i>P. dimorpha</i> e das frações permeadas e retidas provenientes da concentração do caldo por membrana de ultrafiltração (UP010), microfiltração (MP005) e nanofiltração (NP010).....	164
Tabela 6 - Teste de fitotoxicidade (%) em folhas destacadas de <i>C. sativus</i> , 9 dias após a aplicação das frações permeadas e retidas provenientes da concentração do caldo fermentado do fungo <i>P. dimorpha</i> por membrana de ultrafiltração (UP010), microfiltração (MP005) e nanofiltração (NP010).....	166
Tabela 7 - Tensão superficial (TS - mN m ⁻¹) e pH da água destilada, do caldo fermentado bruto do fungo <i>P. dimorpha</i> e das formulações.....	169
Tabela 8 - Fitotoxicidade (%) em plantas de <i>Echinochloa</i> sp., <i>Amaranthus cruentus</i> , <i>Senna obtusifolia</i> e <i>Bidens pilosa</i> , avaliadas quinze dias após a aplicação das formulações.....	171
Tabela 9 - Altura de plantas (cm) de <i>Echinochloa</i> sp., <i>Amaranthus cruentus</i> , <i>Senna obtusifolia</i> e <i>Bidens pilosa</i> , avaliadas quinze dias após a aplicação das formulações.....	174
Tabela 10 – Fitotoxicidade (%) e altura de planta (cm) de <i>Echinochloa</i> sp., <i>Amaranthus cruentus</i> , <i>Senna obtusifolia</i> e <i>Bidens pilosa</i> , avaliadas quinze dias após a aplicação das formulações.....	176

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1- APRESENTAÇÃO

Figura 1 - Fluxograma das atividades realizadas na Tese de Doutorado.....31

CAPÍTULO 2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ARTIGO I: RESISTÊNCIA DE PLANTAS DANINHAS A HERBICIDAS E ALTERNATIVAS DE CONTROLE: UMA REVISÃO

Figura 1 - Fatores componentes da dinâmica de plantas daninhas. Fonte: Gomes e Christoffoleti (2008).....35

2.2. ARTIGO II: NOVAS TECNOLOGIAS PARA FORMULAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR *Phoma* sp. PARA O CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS: UMA REVISÃO

Figura 1 - Etapas e processos utilizados no desenvolvimento de um bioherbicida de *Phoma* sp.....57

Figura 2 - Representação esquemática de emulsões simples e múltiplas. Adaptado de: Bouyer et al. (2012).....60

Figura 3 - Representação esquemática do processo de formação e aparato experimental típico para a produção de emulsões. (A) processo de emulsificação direta e (B) processo de emulsificação de pré-mistura. Adaptado de: Charcosset (2009), Piacentini et al. (2014) e Trentin et al. (2010).....65

Figura 4 - Diagrama esquemático do processo de emulsificação da membrana. Adaptado de: Charcosset (2009).....67

CAPÍTULO 3 - PRESERVAÇÃO DO FUNGO *Phoma dimorpha*

3.1. ARTIGO III: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DO FUNGO *Phoma dimorpha*

Figura 1 - Médias do crescimento micelial e porcentagem de eficácia dos métodos de preservação dos diferentes métodos de preservação do fungo *P. dimorpha*, em dois períodos de avaliação, aos seis e doze meses após o armazenamento. *Médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....83

Figura 2 - Recuperação de isolados de *P. dimorpha* preservados pelos métodos de repicagens periódicas (RP), fragmentos de papel-filtro (PF) e água destilada (AD), em dois

períodos de avaliação, aos seis e doze meses após o armazenamento.....84

Figura 3 - Médias do índice de velocidade de crescimento micelial do fungo *P. dimorpha* nos diferentes métodos de preservação, em seis e doze meses de armazenamento.
*Médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....86

CAPÍTULO 4 – QUEBRA DE DORMÊNCIA DE PLANTAS DANINHAS

4.1. ARTIGO IV: SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA DE SEMENTES DE *Senna obtusifolia*

Figura 1 - Teste de germinação de *S. obtusifolia* (L.) H. S. Irwin & Barneby submetidas a aplicação de diferentes métodos de superação de dormência: T1) Tratamento testemunha; T2) Escarificação mecânica; T3) Embebição em água; T4) Imersão em água quente a 96 °C; A) Teste de germinação; B) Detalhe da parte aérea e radícula.....99

4.2. ARTIGO V: SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA DE SEMENTES DE DIFERENTES PLANTAS DANINHAS

Figura 1 - Efeito de diferentes períodos de embebição na absorção de água e germinação de sementes de *Echinochloa spp.*, *Amaranthus cruentus* e *Bidens pilosa*.....113

CAPÍTULO 5 – APLICAÇÃO DO CALDO FERMENTADO BRUTO DO FUNGO *Phoma dimorpha* SOBRE PLANTAS DANINHAS

5.1. ARTIGO VI: AÇÃO FITOTÓXICA DO CALDO FERMENTADO DO FUNGO *Phoma dimorpha* SOBRE ATRIBUTOS FISIOLÓGICOS DE SEMENTES E PLANTAS DE *Senna obtusifolia*

Figura 1 - Teste fitotóxico em sementes de *S. obtusifolia* (L.) H. S. Irwin & Barneby submetidas a aplicação de metabólitos secundários de *P. dimorpha*.: A) Tratamento testemunha; B) Plântula do tratamento testemunha; C) Tratamento com aplicação de metabólitos secundários de *P. dimropha*. e D) Detalhe da semente quando aplicado metabólitos secundários de *P. dimropha*.....126

Figura 2 - Efeitos fitotóxico em folhas destacadas de *S. obtusifolia* (L.) H. S. Irwin & Barneby após 3, 6 e 9 dias após a aplicação de metabólitos secundários de *P. dimorpha*.
*DAA = Dias após a aplicação, T1 = Testemunha e T2 = Metabólitos secundários.....128

Figura 3 - Efeito fitotóxico em plantas de *S. obtusifolia*, 15 dias após a aplicação de metabólitos secundários de *P. dimorpha*.....129

5.2. ARTIGO VII: EFEITO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS por *Phoma dimorpha* SOBRE A GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DE SEMENTES DE DIFERENTES ESPÉCIES VEGETAIS

Figura 1 - Ação fitotóxica da aplicação dos metabólitos secundários do fungo *P. dimorpha* sobre as espécies de plantas bioindicadoras e daninhas: T1) Tratamento testemunha; T2) Tratamento com aplicação de metabólitos secundários do fungo *P. dimorpha*.....141

Figura 2 - Efeito fitotóxico em folhas destacadas das diferentes espécies de plantas bioindicadoras e daninhas, 9 dias após a aplicação dos metabólitos secundários do fungo *P. dimorpha*: T1) Tratamento testemunha; T2) Tratamento com aplicação de metabólitos secundários do fungo *P. dimorpha*.....146

CAPÍTULO 6 - CONCENTRAÇÃO E FORMULAÇÃO DE BIOHERBICIDA

6.1. ARTIGO VIII: AÇÃO FITOTÓXICA DE METABÓLITOS DE *Phoma dimorpha* NO CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS: CONCENTRAÇÃO POR MEMBRANAS, FORMULAÇÃO E APLICAÇÃO

Figura 1 - (A) Diagrama esquemático do aparato experimental (A - cilindro de Nitrogênio; B - válvula reguladora de pressão de duplo estágio acoplada aos dois manômetros; B1 - válvula de abertura do cilindro; B2 - válvula de pressurização do gás; C - banho ultratermostatizado; D - módulo de separação com membrana tipo plana e E - frasco coletor de permeado. (B) Aspecto visual da unidade experimental utilizada para concentração do caldo fermentado do fungo *P. dimorpha* utilizando membranas planas. Fonte: o autor.....157

Figura 2 - Danos ocasionados em folhas destacadas de *C. sativus*, 9 dias após a aplicação das frações permeadas e retidas provenientes da concentração do caldo fermentado do fungo *P. dimorpha* por membrana de ultrafiltração (UP010), microfiltração (MP005) e nanofiltração (NP010).....167

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AA = Absorção de água
AP = Altura de planta
BDA = Agar batata dextrose
BOD = Biochemical Oxygen Demand
CM = Crescimento micelial
CPA = comprimento de parte aérea
CR = Comprimento de raiz primária
D = Diâmetro médio atual da colônia
Da = Diâmetro médio da colônia do dia anterior
DAP = Dias após a aplicação
EMP = Eficácia do método de preservação
ET = Eficácia do tratamento
FC = Fator de concentração
IVCM = Índice de velocidade do crescimento micelial
IVG = Índice de velocidade de germinação
Jp = Fluxo de permeado
kDa = Quilodalton
MF = Massa fresca
MF = Microfiltração
MS = Massa seca
N = Número de horas ou dias após a inoculação
NF = Nanofiltração
PG = Porcentagem de germinação
pH = Potencial hidrogeniônico
SBCPD = Sociedade Brasileira de Ciência de Ervas Daninhas
SDS = Dodecil Sulfato de Sódio
TGA = Análise Termogravimétrica
TS = Tensão superficial
UF = Ultrafiltração
VG = Velocidade de Germinação

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- APRESENTAÇÃO	27
1.1. INTRODUÇÃO	27
1.2. OBJETIVO	29
1.2.1. Objetivo Geral	29
1.2.3. Objetivos Específicos	29
1.3 ESTRUTURA DA TESE DE DOUTORADO	30
CAPÍTULO 2 - REVISÃO DE LITERATURA	32
2.1. ARTIGO I: RESISTÊNCIA DE PLANTAS DANINHAS A HERBICIDAS E ALTERNATIVAS DE CONTROLE: UMA REVISÃO.....	32
2.1.1. Introdução	33
2.1.2. Plantas daninhas na agricultura	34
2.1.3. Principais métodos de controle de plantas daninhas	36
2.1.4. Resistência de plantas daninhas a herbicidas	37
2.1.5. Medidas alternativas de controle de plantas daninhas	38
2.1.6. Metabólitos secundários provenientes de extratos de plantas no controle de plantas daninhas	40
2.1.7. Metabólitos secundários provenientes de meios fermentados de fungos para o controle de plantas daninhas	42
2.1.8. Conclusões	44
2.1.9. Referências Bibliográficas	44
2.2. ARTIGO II: NOVAS TECNOLOGIAS PARA FORMULAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR <i>Phoma</i> sp. PARA O CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS: UMA REVISÃO.....	51
2.2.1. Introdução	51
2.2.2. Controle biológico de plantas daninhas	53
2.2.3. <i>Phoma</i> sp.: Seu papel no controle biológico	54
2.2.4. Processos de fermentativo	57
2.2.5. Emulsões: Conceitos, Tipos, Aplicações e Formação	59
2.2.6. Emulsificação por membrana	63
2.2.7. Considerações finais e perspectivas futuras	67
2.2.8. Conclusões	69
2.2.9. Referências Bibliográficas	69

CAPÍTULO 3 - PRESERVAÇÃO DO FUNGO <i>Phoma dimorpha</i>	77
3.1. ARTIGO III: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DO FUNGO <i>Phoma dimorpha</i>	77
3.1.1. Introdução	78
3.1.2. Material e Métodos	80
3.1.3. Resultados e Discussão	82
3.1.4. Conclusões	87
3.1.5. Referências	87
CAPÍTULO 4 – QUEBRA DE DORMÊNCIA DE PLANTAS DANINHAS	92
4.1. ARTIGO IV: SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA DE SEMENTES DE <i>Senna obtusifolia</i>	
92	
4.1.1. Introdução	93
4.1.2. Material e Métodos	95
4.1.3. Resultados	97
4.1.4. Discussão	101
4.1.5. Conclusões	103
4.1.6. Referências	103
4.2. ARTIGO V: SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA DE SEMENTES DE DIFERENTES PLANTAS DANINHAS	106
4.2.1. Introdução	107
4.2.2. Material e Métodos	109
4.2.3. Resultados	111
4.2.4. Discussão	114
4.2.5. Conclusões	115
4.1.6. Referências	116
CAPÍTULO 5 – APLICAÇÃO DO CALDO FERMENTADO BRUTO DO FUNGO <i>Phoma dimorpha</i> SOBRE PLANTAS DANINHAS	120
5.1. ARTIGO VI: AÇÃO FITOTÓXICA DO CALDO FERMENTADO DO FUNGO <i>Phoma dimorpha</i> SOBRE ATRIBUTOS FISIOLÓGICOS DE SEMENTES E PLANTAS DE <i>Senna obtusifolia</i>	120
5.1.1. Introdução	121
5.1.2. Material e Métodos	123
5.1.3. Resultados e Discussão	125
5.1.4. Conclusões	131

5.1.5. Referências	131
5.2. ARTIGO VII: EFEITO DO CALDO FERMENTADO PRODUZIDO por <i>Phoma dimorpha</i> SOBRE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE E CRESCIMENTO DIFERENTES ESPÉCIES VEGETAIS	134
5.2.1. Introdução	135
5.2.2. Material e Métodos	137
5.2.3. Resultados e Discussão	140
5.2.4. Conclusões	146
5.2.5. Referências	146
CAPÍTULO 6 - CONCENTRAÇÃO E FORMULAÇÃO DE BIOHERBICIDA	151
6.1. ARTIGO VIII: AÇÃO FITOTÓXICA DE METABÓLITOS DE <i>Phoma dimorpha</i> NO CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS: CONCENTRAÇÃO POR MEMBRANAS, FORMULAÇÃO E APLICAÇÃO	151
6.1.1. Introdução	153
6.1.2. Material e Métodos	155
6.1.3. Resultados e Discussão	162
6.1.4. Conclusões	178
6.1.5. Referências Bibliográficas	178
CAPÍTULO 7 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	184
7.1 DISCUSSÃO GERAL	184
7.2 CONCLUSÕES GERAIS	186
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	188
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	189

CAPÍTULO 1- APRESENTAÇÃO

1.1. INTRODUÇÃO

O modelo atual de produção agrícola busca cada vez mais a obtenção de produtos, e simultaneamente, o desenvolvimento sustentável, que caracteriza a “agricultura alternativa” ou “agricultura sustentável”. Para isso, é fundamental que se adote uma série de precauções e medidas, que visem a redução dos impactos da agricultura convencional sobre o meio ambiente (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000).

Nos últimos anos é notório um aumento no surgimento de doenças, pragas e plantas daninhas nos campos de produção agrícola. Em paralelo, nota-se também uma utilização excessiva de agroquímicos, que associados à falta de assistência técnica, não resolvem o problema e podem acarretar danos à produtividade, como também a contaminação dos alimentos, do solo, da água, dos animais e dos seres humanos. Além de gerar outros problemas como a ocorrência de resistência de patógenos, de pragas e de plantas invasoras a determinadas moléculas químicas, podendo provocar também um desequilíbrio biológico, como a eliminação de organismos benéficos (BRECHELT, 2004; WIT et al., 2009; KORBES et al., 2010).

Dentre as alternativas para redução do uso dos agroquímicos, o controle biológico mostra-se como uma alternativa que permite a substituição, mesmo que gradativa do uso de agroquímicos (CHAGAS et al., 2014). Segundo Venzon et al. (2006), este controle consiste na manipulação do ambiente produtivo para aumentar a sobrevivência e o desempenho dos inimigos naturais, como também com a utilização de compostos presentes em extratos de plantas e em caldos fermentados de microrganismos, que apresentem atividade biológica, que venham a reduzir populações de insetos, patógenos e plantas daninhas.

O uso de compostos secundários é tido como mais uma forma potencial de controle biológico. Atualmente, pouco se conhece sobre a composição química dos caldos fermentados de microrganismos, para que estes venham a ser utilizados no controle biológico. Os metabólitos secundários produzidos pelos fungos e bactérias são as fitotoxinas. Dentre estes microrganismos, os fungos são os mais estudados, pois diversos fungos endofíticos possuem a capacidade de produzirem substâncias tóxicas (BAQUE et al., 2012; GHOSHEH, 2005).

Para a obtenção de metabólitos secundários provenientes de fungos endofíticos vêm sendo utilizados processos fermentativos, agregando ao processo os biorreatores para aumentar a escala de produção, porém, estes processos ainda se encontram em sua maioria em escala laboratorial. Em alguns casos, os metabólitos secundários presentes no caldo fermentado,

possuem moléculas hidrofóbicas, com baixa solubilidade em água e são muito sensíveis à luz, o que inviabiliza sua utilização (ALMEIDA, 2014).

Neste âmbito, para permitir o uso adequado destes metabólitos secundários, além de sua produção, caracterização e concentração, é necessário a utilização de adjuvantes apropriados nas formulações, com o propósito de atenuar os efeitos adversos do ambiente sobre o caldo fermentado. Dentre os adjuvantes que vêm sendo utilizados para formulações de bioprodutos destacam-se os surfactantes, óleos vegetais e sais nitrogenados (ARAÚJO, RAETANO, 2011; BORGES NETO et al., 1998).

Neste contexto são necessários estudos que visem a associação de tecnologias para proporcionar uma formulação adequada de bioprodutos, de modo a permitir a expressão do seu potencial para o controle biológico.

1.2. OBJETIVO

1.2.1. Objetivo Geral

Desenvolver formulações para potencializar a ação do caldo fermentado proveniente do fungo *Phoma dimorpha* concentrado por processos de separação por membranas no controle biológico de plantas daninhas.

1.2.3. Objetivos Específicos

- Avaliar a eficácia e viabilidade de três métodos de preservação de isolados do fungo *Phoma dimorpha* (repicagens periódicas, Castellani e fragmentos de papel-filtro), em dois períodos de avaliação, seis e doze meses após o armazenamento;
- Avaliar a eficiência da utilização de diferentes métodos para superação de dormência de sementes das plantas daninhas capim-arroz (*Echinochloa* spp.), caruru-roxo (*Amaranthus cruentus*), picão-preto (*Bidens pilosa*) e mata-pasto *Senna obtusifolia*;
- Produzir compostos bioativos a partir da fermentação submersa do fungo *P. dimorpha*;
- Concentrar os compostos bioativos presentes no caldo fermentado bruto do fungo *P. dimorpha* por processo de separação por membranas de ultrafiltração (UP010), microfiltração (MP005) e nanofiltração (NP010);
- Investigar a eficácia do caldo fermentado bruto do fungo *P. dimorpha*, da fração permeada e retida sobre folhas destacadas de pepino (*Cucumis sativus*);
- Desenvolver formulações para o controle biológico de diferentes espécies de plantas daninhas: capim-arroz (*Echinochloa* spp.), caruru-roxo (*Amaranthus cruentus*), picão-preto (*Bidens pilosa*) e mata-pasto (*Senna obtusifolia*).

1.3 ESTRUTURA DA TESE DE DOUTORADO

Este trabalho de Tese Doutorado está estruturado em Capítulos da seguinte forma:

Capítulo 1: é apresentada a introdução geral, os objetivos da presente tese de doutorado e a sua estrutura.

Capítulo 2: apresenta-se os artigos I e II duas revisões sobre artigos científicos presentes na literatura, que descrevem a ocorrência de resistência por parte de algumas espécies de plantas daninhas aos herbicidas, novas alternativas para o controle de plantas daninhas, e também achados sobre novas tecnologias para a formulação de bioprodutos que justifiquem o uso de metabólitos produzidos por fungos para diferentes propósitos.

Capítulo 3: é apresentado o artigo III, no qual foi avaliado a eficácia e viabilidade de três métodos de preservação de isolados do fungo *Phoma dimorpha* (repicagens periódicas, Castellani e fragmentos de papel-filtro), em dois períodos de avaliação, seis e doze meses após o armazenamento.

Capítulo 4: são apresentados os artigos IV e V, que tiveram como objetivos avaliar diferentes métodos de superação da dormência de sementes de *Senna obtusifolia* (L.) H. S. Irwin & Barneby, e avaliar a correlação entre diferentes períodos de embebição em água a temperatura ambiente, com níveis de absorção de água e germinação de sementes das plantas daninhas capim-arroz (*Echinochloa* spp.), caruru roxo (*Amaranthus cruentus*) e picão-preto (*Bidens pilosa*), respectivamente.

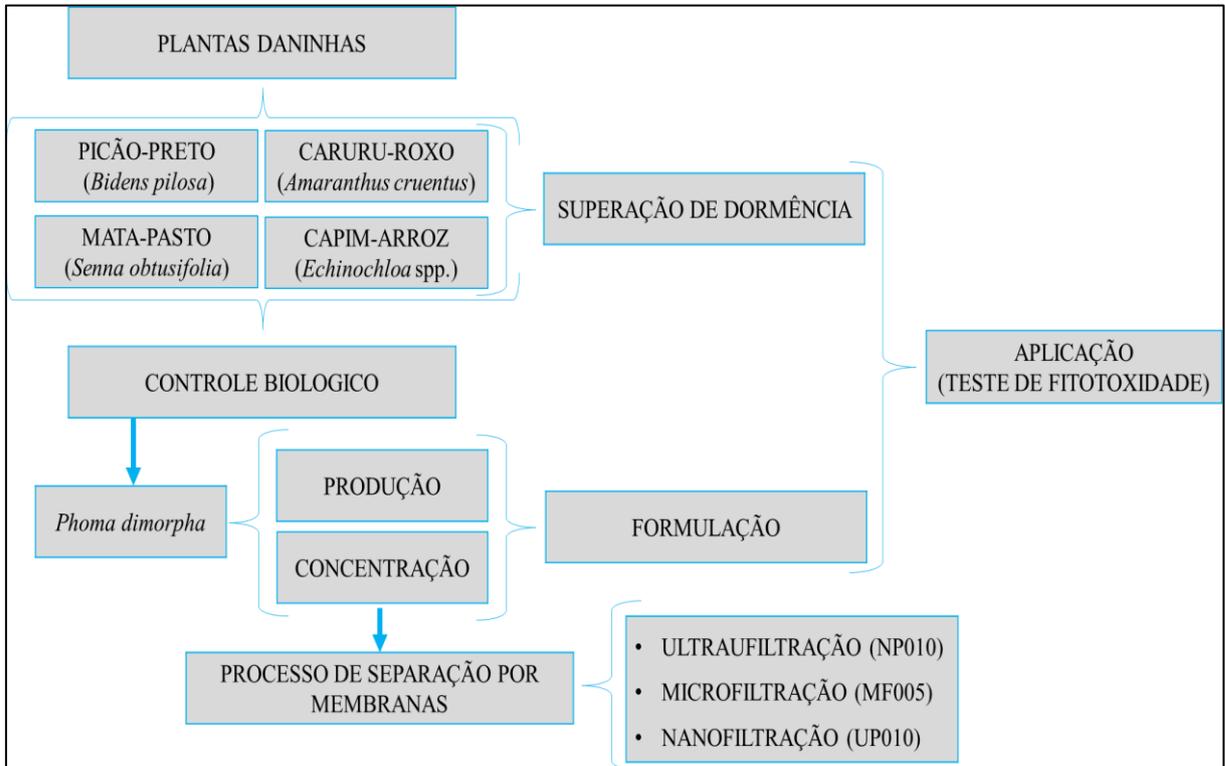
Capítulo 5: são apresentados os artigos VI e VII, que tiveram como objetivos verificar a ação bioherbicida de metabólitos secundários produzidos pelo fungo *Phoma dimorpha* na pré-emergência e pós-emergência da planta daninha de pastagens *Senna obtusifolia* (L.) H. S. Irwin & Barneby, e avaliar o efeito do caldo fermentado sem células do fungo *Phoma dimorpha* sobre a germinação, crescimento, massa fresca e seca de plântulas e em folhas destacadas de espécies de plantas bioindicadoras (*Cucumis sativus*, *Triticum aestivum*) e daninhas (*Amaranthus cruentus*, *Bidens pilosa* e *Echinochloa* spp.), respectivamente.

Capítulo 6: é apresentado o artigo VIII, no qual teve como objetivo concentrar por membranas poliméricas e formular metabólitos secundários provenientes do caldo fermentado do fungo *Phoma dimorpha* para potencializar a ação bioherbicida no controle de plantas daninhas.

Capítulo 7: são apresentadas as discussões e conclusões gerais deste trabalho de Tese Doutorado.

Na Figura 1 está apresentado o fluxograma do presente trabalho, com o objetivo de melhorar o entendimento das etapas.

Figura 1- Fluxograma das atividades realizadas na Tese de Doutorado.



CAPÍTULO 2 - REVISÃO DE LITERATURA

Neste Capítulo estão apresentados dois artigos que trazem uma discussão crítica e construtiva sobre os achados na literatura que norteiam este trabalho.

2.1. ARTIGO I: RESISTÊNCIA DE PLANTAS DANINHAS A HERBICIDAS E ALTERNATIVAS DE CONTROLE: UMA REVISÃO

O presente artigo foi publicado na revista Científica Rural. (v. 21, p. 194-212, 2019). <http://dx.doi.org/10.30945/rcr-v21i3.3126>

Resumo: O manejo de plantas daninhas é um dos grandes desafios da maioria dos campos cultivados, visto que quando presentes em agroecossistemas competem com as culturas agrícolas, reduzindo a produtividade e a qualidade dos produtos colhidos. A presente revisão teve como objetivo apresentar uma discussão crítica e construtiva sobre os achados na literatura que descrevem a ocorrência de resistência por parte de algumas espécies de plantas daninhas aos herbicidas, além de apresentar novas alternativas para o controle de plantas daninhas. Também foram abordadas as principais características do controle biológico com base na utilização de metabólitos secundários provenientes de fungos e a eficácia deste controle alternativo na agricultura. Diversas pesquisas demonstraram a eficácia dos metabólitos secundários provenientes de extratos de plantas e de fungos endofíticos no controle biológico de plantas daninhas. Outros estudos têm avaliado o aumento de escala por fermentação submersa em biorreator para produção de metabólitos secundários por fungos e também a concentração destes por membranas para o aumento da atividade bioherbicida destes metabólitos. Dessa forma, a utilização dos metabólitos secundários presentes em extratos de plantas e em caldo fermentado de fungos é uma alternativa eficaz para o controle de plantas daninhas. No entanto, percebe-se a necessidade de mais estudos relacionados ao desenvolvimento, aplicação e viabilidade dos herbicidas biológicos para o controle de plantas daninhas, visto que a eficácia é o principal fator que limita a aplicação dos bioherbicidas.

Palavras-chave: Plantas daninhas, Controle químico, Resistência, Controle alternativo, Metabólitos secundários.

Abstract: Weed management is one of the challenges for most of cultivated fields, whereas when present in agroecosystems they compete with agricultural crops, reducing the productivity and quality of harvested products. The present review aimed to present information on the main weed species and their interference with agricultural crops, emphasizing the main control measures, resistance to synthetic herbicides and new alternatives for weed control. The main characteristics of biological control based on the use of fungal secondary metabolites and the effectiveness of this alternative control in agriculture were also approached. Several studies have shown the efficacy of secondary metabolites from plant extracts and endophytic fungi in biological weed control. Other studies have evaluated the scaling up by submerged fermentation in bioreactor to produce secondary fungal metabolites and also their membrane concentration to increase the bioherbicidal activity of these metabolites. Thus, the use of secondary metabolites present in plant extracts and fermented broth is an effective alternative for weed control. However, from the literature review, it is possible to observe the need for further studies related to the development, application and viability of biological herbicides for weed control, since efficacy is the main factor limiting the application of bioherbicides.

Key words: Weeds, Chemical control, Resistance, Alternative control, Secondary metabolites.

2.1.1. Introdução

A infestação por plantas daninhas são indiscutivelmente um dos principais e mais difíceis problemas fitossanitários de serem controladas nas áreas agrícolas. Se não controladas, podem gerar diversos impactos negativos sobre as culturas, como redução no rendimento e na qualidade dos produtos colhidos, resultando em prejuízos que podem chegar a altos níveis de perdas da lavoura (PENARIOL et al., 2008).

Dentre as medidas de controle, o químico é amplamente utilizado na agricultura. Um ponto crucial nesta medida de controle é que seu uso indiscriminado e excessivo vem gerando crescente resistência de pragas, microrganismos fitopatogênicos e plantas daninhas aos produtos sintéticos, o que ocasiona maior dependência de insumos químicos por parte de produtores, resultado de uma visão equivocada do processo agrícola (KIM et al., 2003).

Diversas espécies de plantas daninhas apresentam variações de sensibilidade aos herbicidas, fato que independe do histórico de aplicações. Tendo em vista que o limitado número de herbicidas alternativos disponíveis para controle de biótipos resistentes é restrito e o desenvolvimento de novas moléculas está cada vez mais difícil e oneroso, a resistência das

plantas daninhas a herbicidas torna-se um dos grandes desafios para a agricultura mundial (RIAR et al., 2013; MATZRAFI et al., 2015).

A dificuldade de controlar as plantas daninhas pelo método químico e devido ao aparecimento de populações de biótipos resistentes aos herbicidas, assim havendo a necessidade da utilização de um manejo integrado. Este tipo de manejo consiste na combinação de múltiplas práticas de controle associadas, como aumento da intensidade de manejo do solo, uso rotineiro da rotação de culturas, adoção de técnicas culturais apropriadas e também a seleção de novos tipos de agentes de controle mais seletivos e menos agressivos ao homem e ao ambiente (RASSAEIFAR et al., 2013).

A exploração da atividade biológica de compostos presentes em extratos de plantas ou em caldos fermentados de microrganismos vem se tornando uma medida alternativa para o controle de plantas daninhas, caracterizando o chamado controle biológico (HINZ et al., 2014). Esta medida de controle apresenta elevado potencial ecológico para substituir o emprego dos herbicidas sintéticos por meio da utilização de metabólitos secundários de extratos de plantas e de microrganismos (RASSAEIFAR et al., 2013, BRUN et al., 2016; BUNKOED et al., 2017).

Diante disso, esta revisão teve como objetivo apresentar uma discussão crítica sobre os achados na literatura que descrevem a ocorrência de resistência por parte de algumas espécies de plantas daninhas aos herbicidas, além de apresentar novas alternativas para o controle de plantas daninhas.

2.1.2. Plantas daninhas na agricultura

A infestação de plantas daninhas é um dos mais importantes fatores que trazem prejuízo aos campos de cultivo, interferindo na qualidade dos produtos agrícolas e principalmente na produtividade, podendo reduzir a produção por área drasticamente, resultando em danos que podem ocasionar à perda total da lavoura, ocasionando elevados prejuízos econômicos (FONTES et al., 2003).

As plantas daninhas apresentam capacidade de germinar, desenvolver-se e reproduzir-se em condições adversas (déficit hídrico, salinidade, solos ácidos ou alcalinos e temperaturas pouco propícias) (Figura 1), apresentando maior capacidade de competição com as culturas agrícolas (SURIYAGODA et al., 2014). Assim, o uso de herbicidas sintéticos tornou-se uma prática muito comum para o controle de plantas daninhas.

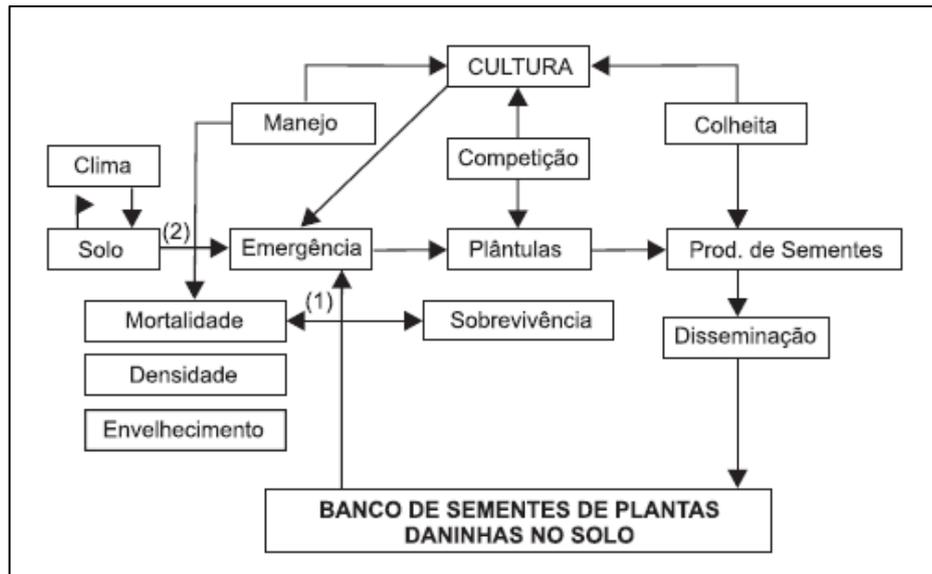


Figura 1 - Fatores componentes da dinâmica de plantas daninhas. Fonte: Gomes e Christoffoleti (2008).

Dentre as plantas daninhas de maior importância agrícola podemos citar: tiririca (*Cyperus rotundus*), buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*), capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*), caruru-rasteiro (*Amaranthus deflexus*), caruru-roxo (*Amaranthus hybridus*), caruru-gigante (*Amaranthus retroflexus*), caruru-de-espinho (*Amaranthus spinosus*) e caruru-demancha (*Amaranthus viridis*) (Tabela 1).

Tabela 1 - Principais plantas daninhas de importância global.

Nome científico	Nome comum	Cultura afetada
<i>Conyza bonariensis</i> <i>Conyza canadensis</i>	Buva ou voadeira	Soja, Algodão e Milho
<i>Amaranthus retroflexus</i>	Caruru	Arroz, Milho e Soja
<i>Echinochloa sp.</i>	Capim-arroz	Arroz
<i>Cyperus rotundus</i>	Tiririca	Arroz e Milho
<i>Ipomoea sp</i>	Corda-de-viola	Arroz
<i>Brachiaria plantaginea</i>	Papuã	Arroz
<i>Euphorbia heterophylla</i>	Leiteira	Arroz
<i>Bidens pilosa</i>	Picão-preto	Arroz, Milho e Soja

Fontes: Sousa et al. (2011), Pannacci et al. (2015) e Giraldele et al. (2018).

A tiririca (*Cyperus rotundus*) é uma planta originária da Índia, encontrada nos solos cultivados da região tropical, infesta cerca de 52 importantes culturas em 92 países (HOLM et al., 1977). A tiririca é considerada uma das mais importantes plantas daninhas no mundo, devido a sua ampla distribuição, capacidade de competição e agressividade, bem como à dificuldade de controle e erradicação (KISSMANN, 1997).

A buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*) é uma espécie nativa das Américas e já é encontrada em vários países da África, Ásia-Pacífico e Europa. Esta espécie é considerada na agricultura moderna como uma das mais problemáticas, nocivas e invasivas plantas daninhas dos sistemas de cultivo. Apresenta características biológicas que lhe permite invadir e se adaptar nas mais variadas condições ambientais, em função de seu eficiente mecanismo de dispersão de sementes, espalhando-se rapidamente nos campos de produção (BAJWA et al., 2016; SANSOM et al., 2013).

Dentre as espécies do gênero *Amaranthus* encontradas com maior frequência infestando as áreas agrícolas, as mais comuns são caruru-rasteiro (*Amaranthus deflexus*), caruru-roxo (*Amaranthus hybridus*), caruru-gigante (*Amaranthus retroflexus*), caruru-de-espinho (*Amaranthus spinosus*) e caruru-demancha (*Amaranthus viridis*). A alta produção e viabilidade de sementes (até 500.000 em plantas de grande porte) destas espécies e a germinação relativamente rápida agrava os danos causados pela competição destas espécies com as culturas agrícolas (RASSAEIFAR et al., 2013).

O capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) é uma planta daninha originária da Europa e da Índia. Esta espécie é amplamente distribuída em todo o mundo e considerada um grave problema em 42 países, sendo que já foi encontrada em pelo menos 27 países (BUNKOED et al., 2017). Esta espécie afeta cerca de 36 culturas agrícolas em todo o mundo. Na região Sul do Brasil é a principal planta daninha da cultura de arroz.

2.1.3. Principais métodos de controle de plantas daninhas

A partir da década de quarenta com a descoberta dos herbicidas sintéticos, o manejo de plantas daninhas teve significativa mudança. No entanto, apesar do amplo uso e eficácia constatada, vem sendo observado nos últimos anos o surgimento de biótipos resistentes ao modo de ação de determinadas moléculas químicas, tornando o controle de plantas daninhas mais complexo (JABRAN et al., 2015; MEULLER-STEOWER et al., 2016).

Em diversos cultivos, a planta daninha corda-de-viola (*Ipomoea* spp.) destaca-se por gerar perdas significativas de produtividade nas culturas agrícolas. Agostineto et al. (2016) avaliaram a eficácia de aplicações isoladas e em mistura de glifosato (Roundup Original®) com

carfentrazone-ethyl (Aurora®) e saflufenacil (Heat®) no controle de *Ipomoea hederifolia*. Estes autores constataram que a mistura dos herbicidas carfentrazone-ethyl e saflufenacil com glifosato proporciona aumento na eficácia de controle em relação à aplicação dos herbicidas isolados. Já a mistura de glifosato+carfentrazoneethyl quando aplicado em plantas no estágio de 6-8 folhas proporcionou controle mais eficaz e mais rápido da planta daninha *I. hederifolia*.

De acordo com Lazaroto et al. (2008), existe grande dificuldade em controlar quimicamente a planta daninha buva (*C. canadenses* e *C. bonariensis*) devido ao aparecimento de populações de biótipos resistentes a diferentes moléculas químicas. Desse modo, faz-se necessário a combinação de diferentes práticas de manejo, como aumento da intensidade de manejo do solo, uso rotineiro da rotação de culturas e adoção de técnicas culturais apropriadas.

2.1.4. Resistência de plantas daninhas a herbicidas

A resistência de plantas daninhas a herbicidas é definida como a capacidade adquirida que alguns biótipos de uma determinada população de plantas em sobreviver à aplicação de uma determinada dose de um herbicida, em condições normais, mesmo sendo letal para os demais biótipos desta mesma população. O fenômeno de resistência pode ocorrer naturalmente (seleção) ou pode ser induzida com o uso repetido de um mesmo princípio ativo presente nos herbicidas mas tendo o mesmo mecanismo de ação. Isto pode ocasionar a seleção de biótipos resistentes de plantas daninhas preexistentes na população, elevando o seu número (OLIVEIRA et al., 2011).

De acordo com Lazaroto et al. (2008), existe grande dificuldade em controlar quimicamente a planta daninha buva (*C. canadenses* e *C. bonariensis*) devido ao aparecimento de populações de biótipos resistentes a diferentes moléculas químicas. Desse modo, faz-se necessário a combinação de diferentes práticas de manejo, como aumento da intensidade de manejo do solo, uso rotineiro da rotação de culturas e adoção de técnicas culturais apropriadas.

A resistência de plantas daninhas a herbicidas é definida como a capacidade adquirida que alguns biótipos de uma determinada população de plantas em sobreviver à aplicação de uma determinada dose de um herbicida, em condições normais, mesmo sendo letal para os demais biótipos desta mesma população. O fenômeno de resistência pode ocorrer naturalmente (seleção) ou pode ser induzida com o uso repetido de uma molécula herbicida. Isto pode ocasionar a seleção de biótipos resistentes de plantas daninhas preexistentes na população, elevando o seu número (OLIVEIRA et al., 2011).

Segundo Giraldeli et al. (2018), até 2018 existiam 48 casos de resistência de plantas daninhas a herbicidas registrados no Brasil. Na grande maioria destes casos de resistência

estavam relacionados a espécies eudicotiledôneas como a buva (*Conyza sumatrensis*, *C. bonariensis*), o picão-preto (*Bidens pilosa*, *B. subalternans*), o caruru-roxo (*Amaranthus palmeri*, *A. retroflexus*) e a leiteira (*Euphorbia heterophylla*) (HEAP, 2018).

Várias espécies de *Echinochloa* têm apresentado resistência a herbicidas químicos de ação local (RIAR et al., 2013), o que tem aumentando ainda mais os danos sobre a cultura do arroz. Para as duas espécies de buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadenses*) também vêm sendo observado resistência múltipla a alguns herbicidas químicos, dentre eles glifosato e paraquat, nos sistemas de cultivo nos EUA, na Europa e em alguns países asiáticos (MATZRAFI et al., 2015).

Além da resistência por parte de algumas espécies de plantas daninhas, os efeitos danosos causados pelo uso indiscriminado dos herbicidas químicos que resulta em múltiplos efeitos tóxicos ao homem, a ecologia e o meio ambiente, vêm gerando extensa discussão (CHOU et al., 2010). Uma alternativa é o desenvolvimento de herbicidas naturais para substituir os herbicidas sintéticos, tornando-se um assunto relevante e de interesse para a agricultura sustentável (RASSAEIFAR et al., 2013, BUNKOED et al., 2017).

2.1.5. Medidas alternativas de controle de plantas daninhas

Há uma necessidade urgente de encontrar métodos alternativos, que sejam ambientalmente seguros e biodegradáveis na natureza. Também, a seleção de agentes de controle específicos quanto ao organismo alvo, com vários sítios de ação de modo a evitar a resistência por parte das plantas daninhas (BAJWA et al., 2016). A utilização de metabólitos secundários provenientes de extratos de plantas ou de caldo fermentado de microrganismos são amplamente utilizados nas indústrias farmacêutica, sanitária, cosmética, agrícola e alimentícia (BAQUE et al., 2012).

De acordo com Singh et al. (2019), muitos grupos de pesquisas têm desenvolvido estudos com o objetivo de estabelecer estratégias alternativas baseadas no uso de metabólitos secundários. Os extratos de plantas, mais especificamente os óleos essenciais, são amplamente utilizados em diversas áreas da indústria. No meio agrícola estes compostos são empregados no controle biológico, por apresentarem elevado potencial para o controle de insetos pragas, plantas daninhas e fungos fitopatogênicos como bactericidas, viricidas, fungicidas e inseticidas (XIAO et al., 2014). Em plantas daninhas estes compostos chegam a inibir até 100% da germinação ou até mesmo ocasionar a necrose e morte de plantas jovens. Estes efeitos variam de acordo com o organismo vivo biosintetizador dos metabólitos secundários e também de

acordo com a espécie da planta daninha (BAILEY et al., 2011a; BAILEY et al., 2011b; BRUN et al., 2016; HUBBARD et al., 2014; PES et al., 2016; TODERO et al., 2018).

Mesmo com os resultados promissores no controle biológico de plantas daninhas com a utilização dos metabólitos secundários produzidos por plantas medicinais e microrganismos, até o ano de 2016, de acordo com Cordeau et al. (2016), existiam disponíveis no mercado apenas treze bioherbicidas (Tabela 2). Destes treze, nove foram desenvolvidos a partir metabólitos produzidos por fungos, três por bactérias e um por extrato de planta.

Tabela 2 - Bioherbicidas produzidos a partir de metabólitos secundários produzidos por microrganismos e plantas medicinais para o controle de plantas daninhas.

Bioherbicida	Ingrediente Ativo	Planta daninha alvo
Devine	<i>Phytophthora palmivora</i>	<i>Morrenia odorata</i>
Collego	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> sp.	<i>Aeschynomene virginica</i>
BioMal	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> f. sp.	<i>Malva pusilla</i>
Woad Warrior	<i>Puccinia thlaspeos</i> C. Shub	<i>Isatis tinctoria</i>
Myco-tech	<i>Chondrostereum pur pureum</i>	<i>Prunus Serotine Populus</i>
Chontrol	<i>Chondrostereum pur pureum</i>	<i>Prunus Serotine Populus</i>
Smolder	<i>Alternaria destruens</i>	Espécies de <i>Cuscuta</i> spp
Sarritor	<i>Sclerotinia minor</i>	Dandelion (<i>Taraxacum</i> spp.)
<i>Phoma</i>	<i>Phoma macrostoma</i>	Espécies de ervas daninhas de folhas largas
Camperico	<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>Poa annua</i>
Organo-Sol Kona	<i>Lactobacillus casei</i> ; <i>Lactobacillus rhamnosus</i> e <i>Lactobacillus lactis</i> ssp.	<i>Trifolium repens</i> ; <i>Lotus corniculatus</i> ; <i>Medicago lupulina</i> e <i>Oxalis</i> <i>acetosella</i> .
Beloukha	Derivado do óleo de canola	Não encontrado
Katoun	Derivado do óleo de canola	Dessecante de plantas daninhas

Fonte: Adaptado de Todero (2017).

2.1.6. Metabólitos secundários provenientes de extratos de plantas no controle de plantas daninhas

A alelopatia é um método alternativo para o controle de plantas daninhas, sendo considerada um processo natural que pode causar efeitos prejudiciais ou benéficos diretos ou indiretos. Diversas substâncias fitotóxicas foram isoladas em todos os tecidos vegetais, incluindo folhas, caules, flores, raízes e sementes. Estas substâncias são conhecidas como aleloquímicos, que são geralmente metabólitos vegetais secundários ou resíduos de compostos das principais vias metabólicas das plantas (MUHAMMAD; MOHSIN et al., 2016).

Diversos estudos demonstraram o efeito fitotóxico de compostos secundários presentes em óleos essenciais extraídos de diferentes espécies de plantas aromáticas e medicinais (*T. articulata*, *S. aromaticum*, *C. plicata* ecótipo, *C. citratus*, *Rosmarinus officinalis* L.) sobre a germinação e crescimento de diferentes plantas daninhas (*Sinapis arvensis* L. e *Phalaris canariensis* L., *E. crusgalli*, *Amaranthus retroflexus*, *Avena fatua*, *Bromus secalinus* e *Centaurea cyanus*, *Lactuca serriola* L. e *Rhaphanus sativus* L.) (OLIVEIRA et al., 2016; MARCZEWSKA-KOLASA et al., 2017; SYNOWIEC et al., 2017).

A planta *Helianthus annuus* L. (girassol) é considerada uma espécie potencialmente alelopática, que possui vários compostos bioativos. Em sua maioria, são os compostos fenólicos, flavonóides e terpenóides, os quais apresentam atividade alelopática contra outras plantas. (MUHAMMAD; MAJEED, 2014). Com o objetivo de avaliar os efeitos dos extratos da raiz e folhas de girassol, foram investigadas a germinação e crescimento de plântulas de trigo (*Triticum aestivum* L.) e milho (*Zea mays* L.) em experimentos de bioensaio de sementes realizados no Departamento de Botânica da Universidade de Peshawar. Os resultados mostraram efeitos inibitórios significativos na germinação de sementes, crescimento e biomassa seca de mudas de trigo e milho (MUHAMMAD; MAJEED, 2014).

Avaliando os efeitos alelopáticos da aplicação de extratos das folhas das espécies vegetais crotalária (*Crotalária juncea*), eucalipto (*Eucaliptus camaldulensis*), nim (*Azadirachta indica*), guaco (*Mikania laevigata*) e mamona (*Ricinus communis*), sobre a germinação das plantas daninhas, capim amargoso (*Digitaria insularis*), capim braquiária (*Brachiaria decumbens*) e tubérculos de tiririca (*Cyperus rotundus*), Sousa et al. (2011), constataram no teste de germinação, que nenhum dos extratos testados mostrou-se eficaz no controle da tiririca.

A aveia (*Avena sativa*) sintetiza diversos compostos secundários, dentre eles os ácidos fenólicos ferúlico. Com base nisso, Hagemann et al. (2010) avaliaram o efeito bioherbicida de extratos aquosos de cinco cultivares de aveia branca (*Avena sativa* L.) e quatro de aveia preta (*Avena strigosa* Schreb), em diferentes concentrações, sobre a germinação e o desenvolvimento

das plântulas das espécies infestantes azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) e amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L.). Os extratos aquosos das cultivares de aveia branca e preta inibiram o potencial alelopático sobre a germinação e o desenvolvimento das plantas daninhas testadas.

Explorando o potencial bioherbicida do óleo essencial de *Eucalyptus tereticornis* contra uma das principais plantas daninhas do arroz (*Oryza sativa* L.), *Echinochloa crus - galli* L., Vishwakarma e Mittal (2014) constataram que o óleo essencial de *E. tereticornis* suprimiu o crescimento e afetou a fisiologia da planta daninha testada, afetam a germinação de sementes e o desenvolvimento de plântulas e diminuiu em 80% o teor de clorofila das plântulas de *E. crus galli*.

Pannacci et al. (2015) mostraram que o extrato de biomassa aérea da *Artemisia vulgaris* L. reduziu a germinação de sementes de *Lolium multiflorum* quando aplicado como bioherbicida em pré-emergência e em pós-emergência tanto em casa de vegetação como em experimentos de campo. Os mesmos autores observaram que este bioherbicida também pode inibir a germinação de sementes de *Amaranthus retroflexus* L., sem inibição na germinação de sementes de culturas de campo (trigo, milho e colza) e culturas hortícolas (tomate, cebola, cenoura e alface).

Ahmed et al. (2016) estudaram a potencialidade alelopática do pó de semente de *Eruca sativa* e *Raphanus* (RSSP) sobre o crescimento das plantas daninhas capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) e malva (*Corchorus olitorius*) associadas a cultura do girassol (*Helianthus annuus*). Os resultados indicam que a utilização da atividade alelopática presente em pó sementes de algumas plantas do gênero *Brassicaceae* (*Eruca sativa*, *Raphanus sativus* e *Brassica rapa*) é um bioherbicida seletivo para controle de plantas daninhas anuais e perenes.

Ahmed et al. (2018), estudando a potencialidade alelopática do pó de semente de rabanete (*Raphanus sativus*) no crescimento de plantas daninhas (*Corchorus olitorius*, *Abelmoschus esculentus* e *Portulaca oleracea*) associadas a cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris*), constataram que houve redução significativa no peso seco das três plantas daninhas quando comparado com o controle não tratado, atingindo efeitos fitotóxicos de 100%. Estes resultados indicam claramente a possibilidade de usar atividade alelopática do pó de sementes *R. sativus* como bioherbicida seletivo para controlar plantas daninhas anuais.

O efeito bioherbicida dos metabólitos secundários presentes nos extratos metanólicos de folhas e cascas de *Ficus bengalensis* sobre a planta daninhas *Ipomoea pentaphylla* foi desenvolvido por Muhammad et al. (2018). Estes autores constataram que os extratos metanólicos das folhas de *F. bengalensis* apresentaram efeito inibitório sobre a germinação de

sementes, no comprimento da parte aérea e da raiz de *I. pentaphylla*, e que este efeito foi diretamente proporcional à concentração aplicada.

Rocha et al. (2018) desenvolveram uma pesquisa com o objetivo de avaliar a atividade alelopática de extratos aquosos de raízes de *Solanum paniculatum* L., popularmente conhecida como jurubeba verdadeira, na germinação e no crescimento inicial de alface (*Lactuca sativa* L.). Constataram que o extrato macerado apresentou atividade alelopática inibitória sobre o processo de germinação e crescimento de alface.

Khare et al. (2019), com objetivo de explorar a atividade bioherbicida de emulsões de óleos essenciais extraídos de folhas de plantas aromáticas e medicinais, avaliaram óleo essencial das espécies de plantas *Eucalyptus citriodora* Hook, *Ocimum basilicum* L. e *Mentha arvensis* L. Foi realizado um experimento em casa de vegetação, onde foram pulverizados os três óleos essenciais em diferentes concentrações (50, 75 e 100 µL/mL) sobre três espécies de plantas daninhas (*A. arvensis*, *C. rotundus* e *C. dactylon*). Os resultados mostraram que a pulverização dos óleos essenciais reduziu o crescimento das plantas daninhas, o comprimento das raízes e da parte aérea, causaram a perturbação na integridade da membrana e geraram estresse oxidativo para a planta daninha. O dano visível foi mais distinto quando se aplicou a emulsão de óleos de *M. arvensis* do que dos demais. A fitotoxicidade foi mais proeminente em *A. arvensis* seguida por *C. dactylon* e *C. rotundus*.

Devido à existência de poucos relatos sobre o potencial fitotóxico de espécies agrofloretais e frutíferas, Perveen et al. (2019) desenvolveram um estudo com o objetivo de avaliar o efeito fitotóxico do extrato de espécies agrofloresta e fruteiras (*Moringa oleifera*, *Morus alba*, *Mangifera indica*, *Albizia lebbek*, *Albizia procera*, *Delonia regia*, *Ziziphus jujube*, *Ziziphus mauritiana*) contra a planta daninha *Lepidium sativum*. A aplicação em pré-emergência dos extratos de todas as espécies de plantas atrasou a germinação e reduziu o crescimento da parte aérea, da radícula e do peso seco de plântulas de *L. sativum*. Estes resultados sugerem que a ação fitotóxica do extrato das folhas destas espécies pode estar relacionada à presença de aleloquímicos fenólicos, que por sua vez podem ser explorados mais diretamente para o desenvolvimento de bioherbicidas.

2.1.7. Metabólitos secundários provenientes de meios fermentados de fungos para o controle de plantas daninhas

O uso de produtos naturais, como metabólitos secundários presentes em extratos e agentes biológicos naturais como fungos e bactérias para o controle de plantas daninhas está se tornando uma medida eficaz. Porém, necessita ser mais investigada para aumentar a eficácia do

controle das plantas daninhas também nas culturas menores e cultivadas em horticultura integrada e orgânica (CAI; GU, 2016).

O grupo dos fungos apresentam uma grande diversidade e capacidade de produzirem substâncias tóxicas, sendo considerado um grupo em potencial para o controle de plantas daninhas. Cerca de 69000 espécies e gêneros já foram descritos, porém um pequeno número de espécies foi avaliado quanto ao seu potencial para produção de metabólitos secundários com atividade bioherbicida (RAI et al., 2009; SINGH; PANDEY, 2019).

A maioria das espécies de fungos já identificadas como potencial bioherbicidas pertence à classe *Deuteromycetes*. Dentre as espécies, os principais gêneros utilizados como bioherbicidas são *Colletotrichum*, *Alternaria*, *Septoria*, *Phomopsis*, *Phoma*, *Phaeoseptoria* e *Ascochyta*. Portanto, o potencial fitotóxico dos metabólitos secundários produzidos por fungos associados ao controle de plantas daninhas tem atraído a atenção de um grande número de pesquisadores em todo o mundo nos últimos anos (BRUN et al., 2016; EVIDENTE et al., 2016; TODERO et al., 2018a,b, 2019).

Pes et al. (2016) avaliando a eficácia da aplicação de um bioherbicida à base de metabólitos secundários provenientes do caldo fermentado do fungo *Diaporthe* sp. no controle de plantas daninhas. Estes autores constataram que as biomoléculas produzidas por este fungo são promissoras para o desenvolvimento de um herbicida natural, visto que a aplicação destes metabólitos secundários contribui para redução no peso da massa seca da parte aérea de plantas das plantas daninhas *Conyza* sp. e *Echinochloa* sp.

Brun et al. (2016) e Klaic et al. (2017), desenvolveram um estudo com objetivo de produzir um bioherbicida com base nos metabólitos secundários provenientes da fermentação submersa em biorreator e fermentação em estado sólido, respectivamente, do fungo *Phoma* sp. e avaliar o potencial herbicida na planta bioindicadora pepino (*C. sativus* L.). Ambos os autores constataram que os metabólitos produzidos pelo fungo *Phoma* sp. apresentaram fitotoxicidade sobre a planta alvo: *C. sativus*. Assim, os metabólitos secundários produzidos pelo fungo *Phoma* sp. podem ser uma alternativa futura para formulação um bioherbicida destinado ao controle de plantas daninhas.

Em estudo posterior também utilizando os metabólitos secundários presentes no caldo fermentado do fungo *Phoma* sp., Todero et al. (2018b) desenvolveram um experimento com o objetivo de aumentar a atividade bioherbicida destes metabólitos por meio da concentração por membranas. Para isso, os metabólitos secundários presentes no caldo fermentado do *Phoma* sp. foram concentrados por membranas de microfiltração de fibra oca. Este estudo mostrou que a fração retida pode inibir a germinação das plantas *Bidens pilosa* e *Amaranthus retroflexus*,

obtendo um controle de 100% de inibição. Para os ensaios em substrato em casa de vegetação, a taxa de controle de *A. retroflexus* foi dependente da concentração de bioherbicida.

Outros estudos estão sendo desenvolvidos para investigar a possibilidade de desenvolver este bioherbicida como uma ferramenta de controle de plantas daninhas em pré e pós-emergência. Todero et al. (2018a) e Todero et al. (2019) evidenciaram que a concentração de metabólitos secundários produzidos por fermentação de fungos propicia aumento da atividade bioherbicida. Isto é uma alternativa para desenvolver novos estudos para avaliar esta tecnologia na concentração de outros metabólitos que também apresentem atividade bioherbicida.

2.1.8. Conclusões

As plantas daninhas representam um dos principais problemas que afetam o rendimento e a produtividade agrícola. Nos últimos anos o manejo destas plantas exige a inserção de novas tecnologias alternativas e eficientes devido aos riscos associados ao controle químico como a poluição ambiental e a resistência desenvolvida por diversas espécies de plantas daninhas às substâncias químicas disponíveis no mercado.

A utilização dos metabólitos secundários presentes em extratos de plantas e em caldo fermentado de fungos é uma alternativa eficaz para o controle de plantas daninhas, pois pode inibir a germinação ou mesmo reduzir o crescimento destas plantas em áreas agrícolas, além disso diminui os impactos ambientais negativos gerados pelo uso dos herbicidas sintéticos.

Em geral, se percebe a necessidade de mais estudos relacionados ao desenvolvimento, aplicabilidade e viabilidade dos herbicidas biológicos para o controle de plantas daninhas. Por fim, torna-se necessário, também, a adequação de novas tecnologias para a formulação, estabilidade e manutenção da ação fitotóxica dos bioherbicidas produzidos, visto que a eficácia, umidade, método de aplicação, e o espectro de ação são os principais fatores que limitam a aplicação dos bioherbicidas.

2.1.9. Referências Bibliográficas

AHMED, S. A. A.; EL-MASRY, R. R.; MESSIHA, N. K.; EL-ROKIEK, K. G. Evaluating the allelopathic efficiency of the seed powder of *Raphanus sativus* L. in controlling some weeds associating *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Environmental Research**, v. 7, n. 3, p. 87-94, 2018.

AHMED, S. A. A.; MESSIHA, N. K.; EL-ROKIEK, K. G.; SANAA, A. Biological and Chemical Sciences The allelopathic efficiency of two Brassicaceae plant seeds in controlling

weeds associating sunflower plants. **Research Journal of Pharmaceutical**, v. 7, n. 5, p. 157-165, 2016.

ASHRAFI, Z. Y.; SADEGHI, S.; MASHHADI H. R.; HASSAN, M. A. Allelopathic effects of sunflower (*Helianthus annuus*) on germination and growth of wild barley (*Hordeum spontaneum*). **Journal of Agricultural Technology**, v. 4, n. 1, p. 219-229, 2008. DOI:

BAILEY, K. L.; PITT, W. M.; FALK, S.; DERBY, J. The effects of *Phoma macrostoma* on nontarget plant and target weed species. **Biological Control**, v. 58, n. 3, p. 379-386, 2011a. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.06.001>

BAILEY, K. L.; PITT, W. M.; LEGGETT, F.; SHEEDY, C.; DERBY, J. Determining the infection process of *Phoma macrostoma* that leads to bioherbicidal activity on broadleaved weeds. **Biological Control**, 59, 2, 268-276, 2011b. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.06.019>

BAJWA, A. A.; SADIA S.; ALI, H. H.; JABRAN, K.; PEERZADA, A. M.; CHAUHAN, B. S. Biology and management of two important *Conyza* weeds: a global review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 24, p. 24694-24710, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7794-7>

BAQUE, M. A.; MHO, S. H.; LEE, E. J.; ZHONG, J. J.; PAEK, K. Y. Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 1, p. 1255-1267, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.004>

BRUN, T.; RABUSKE, J. E.; TODERO, I.; ALMEIDA, T. C.; JUNIOR J. J. D.; ARIOTTI, G.; CONFORTIN, T.; ARNEMANN, J. A.; KUHN, R. C.; GUEDES, J. V. C.; MAZUTTI, M. A. Production of bioherbicide by *Phoma* sp. in a stirred-tank bioreactor. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 230-239, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-016-0557-9>

BUNKOED, W.; WICHITTRAKARN, P.; LAOSINWATTANA C. Allelopathic Potential of Essential Oil from Bottle Brush (*Callistemon lanceolatus* DC.) on The Germination and Growth of *Echinochloa crus-gall* L. **International Journal of Agricultural Technology**, v. 13, n. 7.3, p. 2693-2701, 2017.

CAI, X.; GU, M. Bioherbicides in organic horticulture. **Horticulturae**, v. 2, n. 3, p. 1-10, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/horticulturae2020003>

CHOU, C. H. Role of allelopathy in sustainable agriculture: Use of allelochemicals as naturally occurring bio-agrochemicals. **Allelopathy Journal**, v. 25, n. 1, p. 3-16, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1080/07352689991309414>

- CIMMINO, A.; ANDOLFI, A.; ZONNO, M.; AVOLIO, F.; SANTINI, A.; TUZI, A.; BERESTETSKYI, A.; VURRO, M.; EVIDENTE, A. Chenopodolans A–C: phytotoxic furopyrans produced by *Phoma chenopodiicola*, a fungal pathogen of *Chenopodium album*. **Phytochemistry**, v. 96, n. 1, p. 208-213, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.10.007>
- CORDEAU, S.; TRIOLET, M.; WAYMAN, S.; STEINBERG, C.; GUILLEMIN, J.-P. Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. **Crop Protection**, v. 87, n. 1, p. 44-49, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2016.04.016>
- EVIDENTE, A.; CIMMINO, A.; ZONNO, M. C.; MAIS, M.; BERESTETSKYI, A.; SANTORO, E.; SUPERCHI, S.; VURRO, M.; EVIDENTE, A. Phytotoxins produced by *Phoma chenopodiicola*, a fungal pathogen of *Chenopodium album*. **Phytochemistry**, v. 117, n. 1, p. 482-488, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.07.008>
- FAY, P. K.; DUKE, W. B. An assessment of allelopathic potential in *Avena* germplasm. **Weed Science**, v. 5, n. 3, p. 224-228, 1977. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0043174500033348>
- FONTES, J. R. A. **Manejo Integrado de Plantas Daninhas**. Documentos 113. Planaltina. 2003.
- GIRALDELI, A. L.; SILVA, A. F. M.; BRITO, F. C.; PAGENOTTO, A. C. V.; ARAÚJO, L. S.; VICTORIA FILHO, R. Manejo de plantas daninhas eudicotiledôneas na entressafra. **Journal of Agronomic Sciences**, v. 7, n. 1, p. 205-212, 2018.
- GUENZL, W. D.; MCCALLA, T. M.; NORSTADT, F. A. Presence and persistence of phytotoxic substances in wheat, oat, corn, and sorghum residues. **Agronomy Journal**, v. 59, n. 2, p. 163-165, 1967. DOI: <https://doi.org/10.2134/agronj1967.00021962005900020012x>
- GUSMAN, G. S.; VIEIRA, L. R.; VESTENA, S. Alelopatia de espécies vegetais com importância farmacêutica para espécies cultivadas. **Biotemas**, v. 25, n. 4, p. 37-48, 2012. DOI: <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2012v25n4p37>
- HAGEMANN, T. R.; BENIN, G.; LEMES, C.; MARCHESE, J. A.; MARTIN, T. N.; PAGLIOSA, E. S.; BECHE, E. Potencial alelopático de extratos aquosos foliares de aveia sobre azevém e amendoim-bravo. **Bragantia**, v. 69, n. 3, p. 509-518, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052010000300001>
- HEAP, I. International survey of herbicide resistant weeds. Disponível em: <http://www.weedscience.org>. Acesso em: 21.12.2018.
- HINZ, H. L.; SCHWARZLEANDER, M.; GASSMANN, A.; BOURCHIER, R. S. Successes we may not have had: a retrospective analysis of selected weed biological control agents in the

- United States. **Invasive Plant Science and Management**, v. 7, n. 1, p. 565-579, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1614/IPSM-D-13-00095.1>
- HUBBARD, M.; HYNES, R. K.; ERLANDSON, M.; BAILEY, K. L. The biochemistry behind biopesticide efficacy. **Sustainable Chemical Processes**, v. 2, n. 18, p. 1-8, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40508-014-0018-x>
- KAUL, S.; GUPTA, S.; AHMED, M.; DHAR, M. K. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 4, p. 487-505, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9260-6>
- KHARE, P.; SRIVASTAVA, S.; NIGAM, N.; SINGH, A. K.; SINGH, S. Impact of essential oils of *E. citriodora*, *O. basilicum* and *M. arvensis* on three different weeds and soil microbial activities. **Environmental Technology & Innovation**, v. 14, n. 1, p. 1-27, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100343>
- KIM, E. L.; LI, J. L.; DANG, H. T.; HONG, J.; LEE, C. O.; KIM, D. K.; YOON, W. D.; KIM, E.; LIU, Y. H.; JUNG, J. H. Cytotoxic cytochalasins from the endozoic fungus *Phoma* sp. of the giant jellyfish. **Nemopilema nomurai Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 9, p. 5752-5752, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.03.058>
- KIM, S. I.; ROH, J.-Y.; KIM, D.-H.; LEE, H.-S.; AHN, Y.-J. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. **Journal of Stored Products Research**, v. 39, n. 1, p. 293-303, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(02\)00017-6](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(02)00017-6)
- KLAIC, R.; SALLET, D.; FOLETTI, E. L.; JACQUES, R. J. S.; GUEDES, J. V. C.; KUHN, R. C.; MAZUTTI, M. A. Optimization of solid-state fermentation for bioherbicide production by *Phoma* sp. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 2, p. 377-384, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20170342s20150613>
- LAZAROTO, C. A.; FLECK, N. G.; VIDAI R. A. Biologia e ecofisiologia de buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*). **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 852-860, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000300045>
- MARCZEWSKA-KOLASA, K.; BORTNIAK, M.; SEKUTOWSKI, T. R.; DOMARADZKI, K. Influence of water extracts from cornflower on germination and growth of cereals seedlings. **Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering**, v. 62, n. 3, p. 208-211, 2017.
- MATZRAFI, M.; LAZAR, T. W.; SIBONY, M.; RUBIN, B. *Conyza* species: distribution and evolution of multiple target-site herbicide resistances. **Planta**, v. 242, n. 1, p. 259-267, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-015-2306-4>

MOHSIN, N.; TARIQ, M.; ZAKI, M. J.; ABBASI, M. W.; IMRAN, M. Allelopathic effect of *Ficus benghalensis* L. leaves extract on germination and early seedling growth of maize, mungbean and sunflower. **International Journal of Biological Research**, v. 4, n. 1, p. 34-38, 2016.

MUHAMMAD, Z.; MAJEED, A. Allelopathic effects of aqueous extracts of sunflower on wheat (*Triticum aestivum* L.) and maize (*Zea mays* L.). **Pakistan Journal of Botany**, v. 46, n. 5, p. 1715–1718, 2014.

MUHAMMAD, Z.; ULLAH, S. R.; MAJEED, A. Allelopathic activity of leaf extracts of Benjamin fig on germination and early growth potentials of sunflower. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 7, n. 2, p. 486-493, 2018. DOI: <https://doi.org/10.19045/bspab.70061>

OLIVEIRA, J. R. R. S.; CONSTANTIN, J.; INQUE, M. H. **Resistência de plantas daninhas. In: Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**. Curitiba, Eds. 2011, p. 362.

OLIVEIRA, M. S.; COSTA, W. A.; PEREIRA, D. S.; BOTELHO, J. R. S.; MENEZES, T. O. A.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, S. H. M., SOUSA FILHO, A. P. S.; CARVALHO JUNIOR, R. N. Chemical composition and phytotoxic activity of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil obtained with supercritical CO₂. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 118, n. 1, p. 185-193, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.supflu.2016.08.010>

PANNACCI, E.; PETTOROSSO, D.; REGNI, L.; TEI, F. Allelopathic potential of mugwort (*Artemisia vulgaris* L.) to control the Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) in winter wheat. **Allelopathy Journal**, v. 36, n. 2, p. 257-272, 2015.

PENARIOL, M. C.; MONTEIRO, A. C.; PITELLI, R. A. Growth and sporulation of *bipolaris euphorbiae* cultivated under different nutritional conditions. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 1907-1913, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000700016>

PERVEEN, S.; YOUSAF, M.; MUSHTAQ, M. N.; SARWAR, N.; KHAN, M. Y.; MAHMOOD, S. Bioherbicidal potential of some allelopathic agroforestry and fruit plant species against *Lepidium sativum*. **Soil & Environment**, v. 38, n. 1, p. 11-18, 2019. DOI: <https://doi.org/10.25252/SE/18/71655>

PES, M. P.; MAZUTTI, M. A.; ALMEIDA, T. C.; Curioletti, L. E.; Melo, A. A.; Guedes, J. V. C. Kuhn, R. C. Bioherbicide based on *Diaporthe* sp. secondary metabolites in the control of three tough weeds. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 42, p. 4242-4249, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.5897/AJAR2016.11639>

RASSAEIFAR, M.; HOSSEINI, N.; ASL, N. H. H.; ZANDI, P.; AGHDAM, A. M. Allelopathic effect of eucalyptus globulus' essential oil on seed germination and seedling

- establishment of *Amaranthus blitoides* and *Cyndon dactylon*. **Trakia Journal of Sciences**, v. 11, n. 1, p. 73-81, 2013.
- RIAR, D. S.; NORSWORTHY, J. K.; SRIVASTAVA, V.; NANDULA, V.; BOND, J. A.; SCOTT, R. C. Physiological and Molecular Basis of Acetolactate Synthase-Inhibiting Herbicide Resistance in Barnyardgrass (*Echinochloa crusgalli*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 2, p. 278-289, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf304675j>
- ROCHA, V. D.; SANTOS, T. A.; BISPO, R. B.; ZORTÉA, K. E. M.; ROSSI, A. B. B. Efeito alelopático de extratos aquosos de *Solanum paniculatum* L., na germinação e crescimento inicial de alface. **Revista Ciências Agroambientais**, v. 16, n. 1, p. 72-79, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5327/Z1677-606220181805>
- SANSOM, M.; SABORIDO, A. A.; DUBOIS, M. Control of *Conyza* spp. With glyphosate- a review of the situation in Europe. **Plant Protection Science**, v. 49, n. 1, p. 44-53, 2013. DOI: <https://doi.org/10.4236/as.2015.61003>
- SINGH; A. K.; PANDEY A. K. Fungal metabolites as a natural source of herbicide: a novel approach of weed management. **Journal of Applied and Natural Science**, v. 11, n. 1, p. 158-163, 2019. DOI: <https://doi.org/10.31018/jans.v11i1.1994>
- SOUSA, S. F. G.; OLIVEIRA, R. N. B.; TAVARES, L. A. F.; MARASCA, I.; ANDREANI JUNIOR, R. Efeito da utilização de extratos vegetais sobre a germinação de três espécies de plantas espontâneas. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 18, n. 1, p. 29-33, 2011.
- SURIYAGODA, L.; COSTA W. A. J. M.; LAMBERS, H. Growth and phosphorus nutrition of rice when inorganic fertiliser application is partly replaced by straw under varying moisture availability in sandy and clay soils. **Plant Soil**, v. 384, n. 1-2, p. 53-68, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2049-1>
- SYNOWIEC, A.; HALECKI, W.; WIELGOSZ, K.; BYCZYŃSKA, M.; CZAPLICKI, S. Effect of Fatty Acid Methyl. Esters on the Herbicidal Effect of Essential Oils on Corn and Weeds. **Weed Technology**, v. 31, n. 2, p. 301-309, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1017/wet.2016.17>
- TODERO, I. **Desenvolvimento de um bioherbicida a partir de metabólitos de *Phoma* sp. para o manejo de plantas daninhas**. 2017. 78p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.
- TODERO, I.; CONFORTIN, T. C.; LUFT, L.; BRUN, T.; UGALDE, G. A.; ALMEIDA, T. C.; ARNEMANN, J. A.; ZABOT, G. L.; MAZUTTI, M. A. Formulation of a bioherbicide with metabolites from *Phoma* sp. **Scientia Horticulturae**, v. 241, n. 1, p. 285-292, 2018a. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.07.009>

TODERO, I.; CONFORTIN, T. C.; LUFT, L.; SEIBEL, J.; KUHN, R. C.; TRES, M. V.; MAZUTTI, M. A. Concentration of exopolysaccharides produced by *Fusarium fujikuroi* and application of bioproduct as an effective bioherbicide. **Environmental Technology**, v. 1, n. 1, p. 1-21, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1580775>

TODERO, I.; CONFORTIN, T. C.; SOARES, J. F.; BRUN, T.; LUFT, L.; RABUSKE, J. E.; KUHN, R. C.; TRES, M. V.; ZABOT, G. L.; MAZUTTI, M. A. Concentration of metabolites from *Phoma* sp. using microfiltration membrane for increasing bioherbicidal activity. **Environmental Technology**, 22, 1-9, 2018b. DOI: <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1441330>

VISHWAKARMA, G. S.; MITTALA, S. Bioherbicidal potential of essential oil from leaves of *Eucalyptus tereticornis* against *Echinochloa crus - galli* L. **Journal of Biopesticides**, v. 7, n. 1, p. 47-53, 2014.

XIAO, J.; ZHANG, Q.; GAO, Y. Q.; TANG, J. J.; ZHANG, A. L.; GAO, J. M. Secondary Metabolites from the Endophytic *Botryosphaeria dothidea* of *Melia azedarach* and Their Antifungal, Antibacterial, Antioxidant, and Cytotoxic Activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 16, p. 3584-3590, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf500054f>

2.2. ARTIGO II: NOVAS TECNOLOGIAS PARA FORMULAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR *Phoma* sp. PARA O CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS: UMA REVISÃO

O presente artigo (título original: New technologies for formulation of secondary metabolites produced by *Phoma* sp. for weed control: a review) foi submetido para publicação em periódico científico da área.

Resumo: A sociedade científica em todo o mundo tem procurado ferramentas que minimizem o impacto nocivo das atividades humanas no meio ambiente natural. No campo agrícola, o desenvolvimento de alternativas sustentáveis para o controle de patógenos, pragas e plantas daninhas em diferentes culturas se enquadra nesse escopo. Uma das alternativas é a utilização de caldos fermentados contendo metabólitos produzidos por microrganismos, principalmente pelo grupo de fungos endofíticos. Muitas espécies de fungos do gênero *Phoma* sp. produzem uma grande variedade de metabólitos secundários que, em sua maioria, apresentam ação herbicida. Considerando esse importante assunto na área de controle biológico, esta revisão pretende apresentar uma discussão crítica sobre os achados atuais e perspectivas futuras que justifiquem o uso de metabólitos produzidos por fungos para diferentes finalidades. Comumente, a purificação de caldos fermentados, a caracterização e sua aplicação em espécies de plantas bioindicadoras são algumas tarefas indispensáveis para se ter um forte conhecimento sobre a ação dos metabólitos. Além disso, formulações adequadas podem fornecer ao produto final estabilidade, molhabilidade, capacidade de espalhar e penetração, o que pode melhorar sua ação.

Palavras-chave: controle biológico, fungos endofíticos, compostos bioativos, caracterização, emulsificação por membrana.

2.2.1. Introdução

Recentemente, há um aumento na ocorrência de doenças, pragas e plantas daninhas em campos agrícolas. O uso excessivo de agroquímicos, associado à falta de assistência técnica, não resolve o problema. Caso contrário, pode causar perda de produtividade e contaminação de alimentos, solo, água, animais e seres humanos. O uso excessivo de agroquímicos também pode

causar outros problemas, como o surgimento de patógenos, pragas e espécies invasoras. Os patógenos podem se tornar resistentes a determinadas moléculas químicas, o que pode causar um desequilíbrio biológico como consequência da eliminação de organismos benéficos (Andres et al., 2007; Jabran et al., 2015; Matzrafi et al., 2015; Kleinman et al., 2016; Tahmasebi et al., 2018, Neve et al., 2018).

O controle biológico é um método promissor para reduzir o uso de agroquímicos (Chagas et al., 2014). Tal controle consiste na manipulação do ambiente produtivo para modificar a taxa de sobrevivência de inimigos naturais de pragas. O uso de compostos bioativos produzidos por agentes de controle biológico, que apresentam atividade antifúngica, herbicida e inseticida, com o objetivo de reduzir populações de insetos, patógenos e plantas daninhas (Parsa et al., 2018). Entre os agentes de controle biológico, microrganismos e substâncias naturais são os mais estudados para controle biológico (Villaverde et al., 2014). Em relação aos microrganismos, os fungos são os mais investigados, uma vez que vários fungos endofíticos têm a capacidade de produzir uma grande variedade de substâncias tóxicas (Zhanga et al., 2013; Cordeau et al., 2016).

Os metabólitos secundários presentes no caldo fermentado de fungos são uma forma de controle biológico. Atualmente, a composição química de compostos fermentados de microrganismos para seu uso no controle biológico é raramente conhecida. Para obter metabólitos secundários de fungos endofíticos, processos fermentativos têm sido utilizados. No entanto, esses processos ainda são realizados em escala de laboratório. Em alguns casos, os metabólitos secundários presentes no produto fermentado possuem moléculas hidrofóbicas de baixa solubilidade em água e sensíveis à luz, impossibilitando sua utilização na composição de bioprodutos (Wang et al., 2012; Brun et al., 2016).

Entre os fungos endofíticos com potencial para a produção de metabólitos secundários com atividade herbicida, *Phoma* sp. mostrou resultados promissores (Daia et al., 2010; Bailey et al., 2011a; Cimmino et al., 2013; Brun et al., 2016; Cordeau et al., 2016; Todero et al., 2018a, b). Em todos os estudos acima mencionados, o processo de fermentação submersa foi utilizado para produzir moléculas bioativas, onde o extrato bruto foi aplicado livre de células.

Após a produção, caracterização e concentração de metabólitos, o uso de adjuvantes adequados em combinação com o caldo é necessário para permitir o uso adequado desses metabólitos secundários. A adição destas substâncias destina-se a mitigar os efeitos adversos do ambiente no meio fermentado durante o armazenamento e após a aplicação. Entre os adjuvantes utilizados na composição de bioprodutos, os mais utilizados são os surfactantes, óleos vegetais e nitrogênio (Oliveira et al., 2015).

Nesse contexto, estudos são necessários para associar tecnologias, a fim de fornecer uma formulação adequada de bioprodutos. Pode permitir a máxima expressão do seu potencial no controle biológico. Portanto, esta revisão tem por objetivo apresentar uma discussão crítica e construtiva sobre os achados atuais que descrevem a eficiência do uso de metabólitos secundários a partir de processos fermentativos de *Phoma* sp. Perspectivas futuras para a formulação de bioprodutos utilizando emulsificação de membrana que justifiquem o uso de metabólitos produzidos por fungos para diferentes propósitos também são fornecidas.

2.2.2. Controle biológico de plantas daninhas

O controle biológico é atualmente considerado uma das alternativas utilizadas na agricultura moderna, também chamada de agricultura sustentável ou alternativa. Tal opção de controle possibilita a redução do uso de agroquímicos, a fim de minimizar os danos já causados e evitar danos futuros ao ambiente natural (Schwan-Estrada et al., 2012). O uso do biocontrole em pragas, plantas daninhas e fungos fitopatogênicos consiste na aplicação de interações naturais que levam a relações entre espécies ao controle populacional de determinadas espécies, mas não à sua erradicação (Villaverde et al., 2014).

Os microrganismos endofíticos mais utilizados neste tipo de controle são os fungos, bactérias e actinomicetos que vivem na superfície dos órgãos e tecidos da planta, sem aparentemente causar danos aos seus hospedeiros. Portanto, diferem dos microrganismos fitopatogênicos, uma vez que são prejudiciais às plantas, causando-lhes doenças (Hussain et al., 2014). Estudos mostram que a maioria das plantas vasculares é hospedeira de vários microrganismos, bactérias e fungos endofíticos. Esses microrganismos passaram toda a sua vida útil ou parte dela colonizando os tecidos saudáveis das plantas hospedeiras e na maioria das vezes não apresentam nenhum sintoma aparente (Hussain et al., 2012; Hussain et al., 2014).

Entre esses microrganismos, o grupo de fungos endofíticos é o mais aplicado no controle biológico. Esses microrganismos são considerados uma fonte importante de seleção de agentes de controle biológico para suprimir pragas de plantas (insetos e patógenos) e superar o estresse abiótico (seca, sal e calor). Estudos reafirmam que os fungos endofíticos são uma fonte rica de compostos bioativos com elevado potencial medicinal e agrícola (Hussain et al., 2009; Dai et al., 2010; Saleem et al., 2011; Wijeratne et al., 2013).

Os metabólitos secundários produzidos por fungos, bactérias e actinomicetos são fitotoxinas. Os compostos bioativos produzidos pelos fungos endofíticos apresentam atividade biológica significativa e alto grau de biodiversidade. Portanto, esses compostos poderiam ser

usados no desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos ou na formulação de produtos naturais dentro da esfera agrícola (Hussain et al., 2009; Kaul et al., 2012; Kennedy 2016).

Os bioherbicidas são apresentados como ferramentas integradas para o manejo de plantas daninhas, pois oferecem diversos benefícios, como maior especificidade de alvos e rápida degradação. No entanto, apenas alguns bioherbicidas estão atualmente disponíveis no mercado. Mais estudos são necessários para identificar compostos bioativos e fabricar bioherbicidas eficientes. Além disso, é necessário demonstrar que os organismos aplicados ao controle biológico são suficientemente especificados para as espécies-alvo e que eles não representam um risco para as espécies existentes nos locais onde esse controle é aplicado. Essa avaliação é uma das etapas preliminares para o desenvolvimento e posterior registro de possíveis bioprodutos (Cordeau et al., 2016).

2.2.3. *Phoma* sp.: Seu papel no controle biológico

Entre os fungos endofíticos, *Phoma* sp. são proeminentes. Este gênero é considerado um dos maiores, com aproximadamente 3.000 espécies descritas. Estes fungos são considerados uma fonte promissora de metabólitos secundários biologicamente ativos, que podem ser usados para medicina humana e também na agricultura para controle biológico de ervas daninhas, fungos fitopatogênicos e insetos (Herath et al. 2009; Kaul et al., 2012). Algumas espécies de *Phoma* secretam metabólitos secundários, como pigmentos e antraquinona, que possuem o alto potencial de controle biológico e podem ser explorados na produção de bioprodutos destinados à agricultura (Kim et al., 2012; Rai et al., 2009).

Diversos tipos de pesquisa investigam o potencial biotecnológico de fungos endofíticos de *Phoma* sp. para a produção de metabólitos biologicamente ativos e para a formulação de produtos naturais destinados ao controle biológico de plantas daninhas (Tabela 1). Diferentes toxinas produzidas pelos fungos *Phoma* afetam o crescimento de diferentes espécies de ervas daninhas, uma vez que a germinação de sementes tipicamente tem uma taxa de inibição de aproximadamente 90%. Isso corrobora o potencial bioherbicida desses compostos (Bailey et al., 2011b; Rai et al., 2009; Wang et al., 2012).

Tabela 1 - Identificação de compostos bioativos e atividade biológica de metabólitos produzidos por diferentes espécies de *Phoma*.

Fungo	Compostos bioativos	Atividade biológica	Processo de produção	Referência
<i>P. macrostoma</i>	macrocidins A and B	Herbicida	Fermentação submersa	Graupner et al. (2003)
<i>P. macrostoma</i>	macrocidins A and Z	Herbicida	Fermentação submersa	Zhou et al. (2004)
<i>P. sp.</i> FKI-1840	Spylidone	Antibacteriana	Fermentação submersa	Koyama et al. (2005)
<i>P. herbarum</i>	3-nitro-1,2-benzenedicarboxylic acid (3-nitrophthalic acid)	Herbicida	Fermentação submersa	Vikrant et al. (2006)
<i>P. sp.</i> SANK 13899	Pleofungins A, B, C, and D	Antifúngica	Fermentação submersa	Yano et al. (2007)
<i>Phoma exigua</i>	Oxaphomin	Herbicida		Cimmino et al. (2008)
<i>Phoma macrostoma</i>	macrocidins A and Z	Herbicida	Fermentação submersa	Bailey et al. (2011b)
<i>Phoma sp.</i>	policétido 5-hydroxyramulosin (63)	Antifúngica e Antibacteriana	Potato dextrose agar (PDA)	Santiago et al. (2012)
<i>P. chenopodiicola</i>	chenopodolans A–C	Herbicida	Fermentação submersa	(Cimmino et al., 2013)
<i>Phoma sp.</i>	Phomalacton, (3R)-5-hydroxymellein	Antifúngica e Antibacteriana	Potato dextrose agar (PDA)	Hussain et al. (2014)
<i>P. chenopodiicola</i>	chenopodolan D, cheniscoumarin e chenopodolin B	Herbicida	Fermentação submersa	Arora et al. (2016)
<i>P. cucurbitacearum</i>	thiodiketopiperazine	Antibacteriana	Fermentação submersa	Arora et al. (2016)
<i>Phoma sp.</i>	Pyrrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)	Herbicida	Fermentação submersa	Brun et al. (2016)
<i>P. chenopodiicola</i>	chenopodolans E and F	Herbicida	Fermentação submersa	Evidente et al. (2016)

O potencial para o controle biológico de plantas daninhas também foi examinado por Cimmino et al. (2008). Os autores referenciados avaliaram os efeitos das fitotoxinas produzidas pelas cepas de *Phoma exigua* var. *Exigua* sobre as plantas daninhas *Cirsium arvense* e *Sonchus arvensis*. Foi visto que o composto Oxaphomin apresentou o mais forte efeito tóxico em *S. arvensis*. *Phoma macrostoma* Montagne tem uma ação bioerbicida conhecida e é eficiente no controle biológico de plantas daninhas (Hubbard et al., 2014). Extratos miceliais e extratos de caldo fermentado liofilizado de seis linhagens de *Phoma macrostoma* isoladas no Canadá apresentaram efeitos semelhantes. Quando aplicados em pré-emergência no solo, causaram intensa clorose e branqueamento de folhas emergentes do cardo canadense (*Cirsium arvense* L. (scop)). Quando aplicados em pós-emergência em plantas folhosas, causaram intenso clareamento, que resultou em uma leve inibição do crescimento após 4-6 dias, mas foi letal após 14 dias para plantas de girassol (Graupner et al., 2003).

Eficácias dos metabólitos secundários produzidos por *P. macrostoma* para o controle biológico de outras ervas daninhas são relatadas, tais como cardo canadense (*Cirsium arvense* (L.) Scop.), Dente de leão (*Stellaria media* (Stellaria media) L.) Vill.) e camomila sem perfume (*Matricaria perforata* Merat). Caso contrário, nenhum efeito foi observado em plantas monocotiledôneas, como trigo (*Triticum* spp.), Aveia (*Avena sativa*) e milho (*Pennisetum glaucum*) (Bailey e Derby 2001; Zhou et al., 2004; Hubbard et al., 2014), que é interessante porque essas culturas não devem ser controladas.

Conforme relatado por Bailey e Falk (2011), apenas o fungo *Phoma macrostoma* é registrado como um bioerbicida para seu uso somente em hortas, mas não para a agricultura. *P. macrostoma* gera dois metabólitos secundários que apresentam fitotoxicidade conhecida como macrociclinas A e Z. Esses compostos inibem a biossíntese de carotenóides em plantas suscetíveis, o clareamento severo da clorose e a morte ocasional de plantas daninhas de folhas largas (Graupner et al., 2003; Hubbard et al., 2014). As macrociclinas inibem a biossíntese de carotenóides em plantas sensíveis, induzindo clorose, branqueamento de calça e ocasionais necrose (Bailey et al., 2011b; Hubbard et al., 2014).

Com a caracterização química e avaliação dos potenciais bioerbicidas de metabólitos produzidos na cultura submersa do fungo *Phoma chenopodiicola*, Evidente et al. (2015) identificaram três novos metabólitos, que formam o chenopodolan D, cheniscoumarin e chenopodolin B. Quando aplicado sobre folhas destacadas de plantas daninhas não hospedeiras, foi verificada fitotoxicidade efetiva, causando necrose nos tecidos foliares de *Stellaria media*, *Urtica dioica*, *Sonchus arvensis*, *Parietaria officinalis*, *Lactuca serriola* e *Helianthus annuus*.

Caldo fermentado sem células do fungo *Phoma* sp. foi aplicado em pré-emergência, pós-emergência e em folhas isoladas de *Cucumis sativus* e *Sorghum bicolor* (Brun et al., 2016). Os metabólitos produzidos por este fungo são altamente bioherbicidas, inibindo completamente o crescimento de sementes de plantas de monocotiledôneas (*S. bicolor*) e dicotiledôneas (*C. sativus*).

De fato, mais estudos são necessários na investigação de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos isolados de plantas medicinais, possibilitando encontrar outros compostos bioativos naturais e novos metabólitos secundários. Da mesma forma, é importante pesquisar processos de fermentação para ampliar a produção. Há a necessidade de testes com foco na eficácia da ação microbiana de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos do gênero *Phoma* sp. (Figura 1).

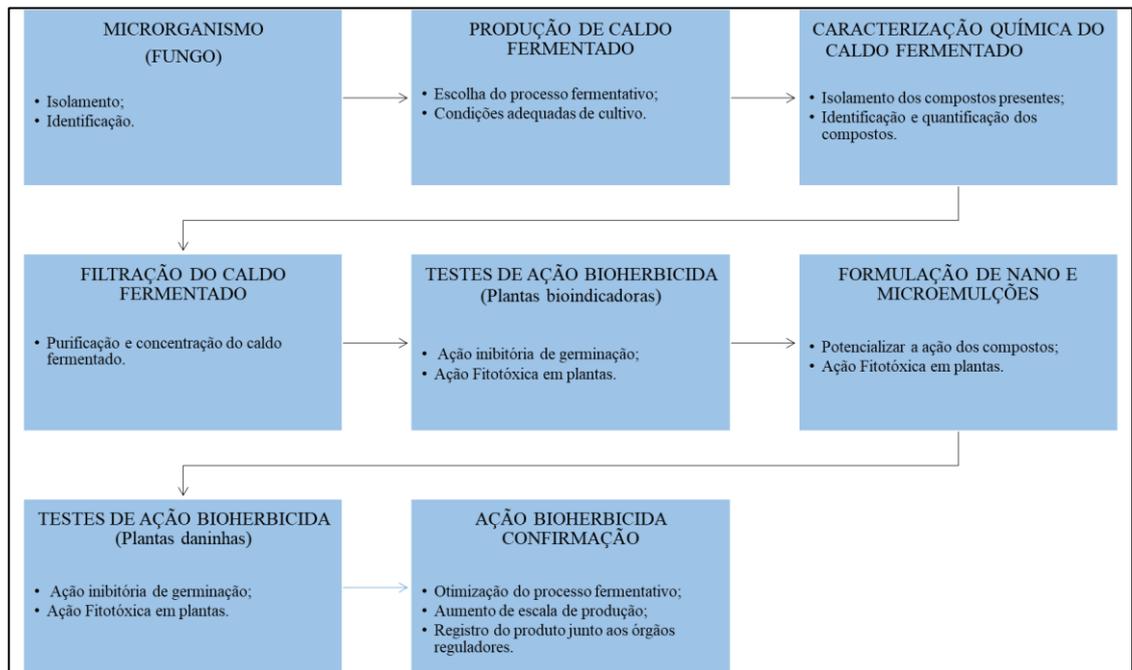


Figura 1 - Etapas e processos utilizados no desenvolvimento de um bioherbicida de *Phoma* sp.

2.2.4. Processos de fermentativo

Além do desenvolvimento de ferramentas para identificar e selecionar microrganismos que produzem metabólitos secundários com potencial para controle biológico, é necessário estabelecer os bioprocessos mais adequados e determinar as melhores condições de crescimento para o aumento da produção desses compostos. Processos fermentativos podem ser uma alternativa para a produção de metabólitos secundários (Ash 2010; Brun et al., 2016). Os processos fermentativos são rotulados como uma soma de etapas ou fases em que os meios de

cultura fornecem todos os nutrientes necessários. Em um processo fermentativo, temperatura, pH, agitação e concentração de nutrientes são controlados para oferecer condições favoráveis ao crescimento de microorganismos. Após o processo, o caldo fermentado é submetido ao tratamento final para separar produtos e subprodutos (Dernain, 2006).

O fermentado pode ser descontínuo, semicontínuo ou continuado, de acordo com o tipo de cultivo (cultivo em estado sólido ou submerso) e de acordo com a oferta de oxigênio (processos aerados e não-aerados). Os processos microbianos são realizados em fermentação submersa ou meio sólido de crescimento, sendo o primeiro o mais utilizado em escala industrial (Castro e Pereira Junior, 2010).

Os processos de fermentação semi-sólida diferem significativamente dos processos de fermentação submersas relativamente à esporulação e produção de enzimas, bem como no que diz respeito às formas de mistura e difusão. O processo submerso de fermentação mostra ser relativamente fácil de cultivar em larga escala, uma vez que assegura a homogeneidade do controle médio e fácil dos parâmetros do processo, especialmente se monitorado por sensores adequados (Couto e Sanromán, 2006; Daryaei et al., 2016b).

A maior produção de biomassa e metabólitos secundários por fungos em processos fermentativos está diretamente relacionada aos fatores de desenvolvimento, que envolvem o meio e as condições de crescimento. Dentre estes, destacam-se o pH, a relação Carbono / Nitrogênio e os suplementos minerais do meio, bem como as propriedades fisiológicas dos microorganismos (como a idade do inóculo). Esses fatores devem ser cuidadosamente selecionados para otimizar o crescimento e o processo de produção dos metabólitos secundários dos fungos endofíticos, mantendo a viabilidade e eficácia (Gunasekaran e Poorniammal, 2008; Daryaei et al., 2016a; Klaic et al., 2017).

Diversos estudos foram realizados nos últimos anos, com o objetivo de determinar o processo de fermentação e as condições de cultivo adequadas para a maior produção de metabólitos por fungos endofíticos. Ao otimizar as condições de cultivo em fermentação submersa para a produção de pigmentos pelo fungo *Phoma herbarum* FGCC # 54, Quereshi et al. (2010) relataram que a maior produção de biomassa e metabólitos foi encontrada no pH ideal do meio de cultura como 4,0. Os autores também destacaram a viabilidade da produção comercial deste pigmento como um potencial bioherbicida. Avaliando a influência da formulação de metabólitos produzidos pelo fungo *Diaporthe* sp. na fermentação em estado sólido com adjuvantes, Bastos et al. (2017) descobriram que a fermentação no estado sólido permitiu a produção de metabólitos pelo fungo *Diaporthe* sp. e também observaram que quando

formulados com adjuvantes, houve um aumento na eficácia do bioherbicida contra plantas de *Cucumis sativus*.

A produção de bioherbicidas da *Phoma* sp. por fermentação em estado sólido foi otimizada por Klaic et al. (2017), utilizando como substrato resíduos agroindustriais (bagaço de cana de açúcar, farelo de soja e água de maceração de milho). Esses autores atestaram alta eficácia no controle da planta alvo *C. sativus* e evidenciaram a obtenção de um nível de fitotoxicidade de 40 lesões. A intensidade do efeito foi influenciada pela formulação do meio de fermentação. Sendo que a melhor condição de otimização para a produção de bioherbicida foi (% em peso): teor de umidade 70,0, teor de farelo de soja 30,0 e água de maceração de milho (CSL) 20,0.

A fermentação submersa do fungo *Phoma* sp. em um biorreator sob condições controladas de agitação e aeração foi eficiente permitindo um aumento na produtividade de biomassa, o que evidencia que métodos de otimização de processos para a produção de metabólitos secundários de fungos com ação bioerpicida são fundamentais para o aumento do teor de compostos (Brun et al., 2016). Ao avaliar a ação bioerpicida do caldo fermentado resultante da fermentação submersa do fungo *Diaporthe* sp. (*Lolium multiflorum*, *Conyza* sp e *Echinochloa* sp.). Em pré-emergência, Pes et al. (2016) verificaram uma eficiência de 100%, inibindo a germinação de todas as espécies estudadas. Na pós-emergência, o crescimento das plantas foi suprimido para as espécies *Conyza* sp. e *Echinochloa* sp.

Um estudo recente foi desenvolvido com base no uso de membrana de fibra oca para concentrar o caldo fermentado de *Phoma* sp. O objetivo foi aumentar a atividade herbicida em pré-emergência e pós-emergência das plantas daninhas *Bidens pilosa* e *Amaranthus retroflexus*. A pré-emergência teve 100% de controle para ambas as espécies. Na pós-emergência, a taxa de controle foi influenciada pela concentração aplicada de bioherbicida (Toderó et al., 2018b).

2.2.5. Emulsões: Conceitos, Tipos, Aplicações e Formação

Emulsões são definidas como sistemas heterogêneos, termodinamicamente instáveis, compostos por dois ou mais líquidos imiscíveis, geralmente óleo e água. As emulsões são compostas por três etapas: etapa oleosa, etapa aquosa e surfactantes. No primeiro passo ou fase (passo disperso), ocorre a formação de gotas pequenas e esféricas. Essas gotas são suspensas em outra etapa (contínua). O tamanho das dimensões depende do processo de emulsificação, que pode variar entre 0,1 µm e 0,1 mm (Graaf et al., 2005; De Luca, 2008; Lam e Nickerson, 2013). Emulsões são classificadas em diferentes tipos, dependendo da definição de qual é a fase contínua e qual é a fase dispersa, e também de acordo com seu tamanho de gota. Quanto às

fases, elas são classificadas em emulsões únicas e emulsões múltiplas, e para tamanho de gotículas em macroemulsões, microemulsões e nanoemulsões (Graaf et al., 2005).

As emulsões simples são divididas em duas classes, de acordo com a distribuição relativa das diferentes fases que compõem o sistema. As emulsões simples óleo-em-água (O/A) são tipicamente sistemas formados por gotículas de óleo dispersas numa fase aquosa. No entanto, as emulsões água-em-óleo (A/O), menos frequentes, são sistemas formados por gotículas de água dispersas em uma fase oleosa, como mostra a Figura 3 (Nazir, 2010; Zanatta et al., 2017; Pereira e Garcia-Rojas, 2015).

As emulsões múltiplas ou duplas apresentam estruturas mais complexas e são definidas como sistemas multicompartimentalizados compostos por três etapas, geralmente com diferentes composições, nas quais coexistem emulsões de óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O). As gotículas aquosas são dispersas no interior de gotas oleosas e estas gotas oleosas são dispersas num passo aquoso externo, o que permite uma distribuição uniforme das moléculas lipídicas. As emulsões múltiplas mais comuns são água/óleo/água (A/O/A) e, dependendo da aplicação, óleo/água/óleo (O/A/O) podem ser preparados (Figura 2) (Grossiord e Sellier, 2001; Bouyer et al., 2012). As emulsões múltiplas têm aplicações promissoras nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. Outros campos da indústria também têm usado emulsões, como para preparação de produtos agrícolas e para a produção de microesferas multicompartimentais (Graaf et al., 2005).

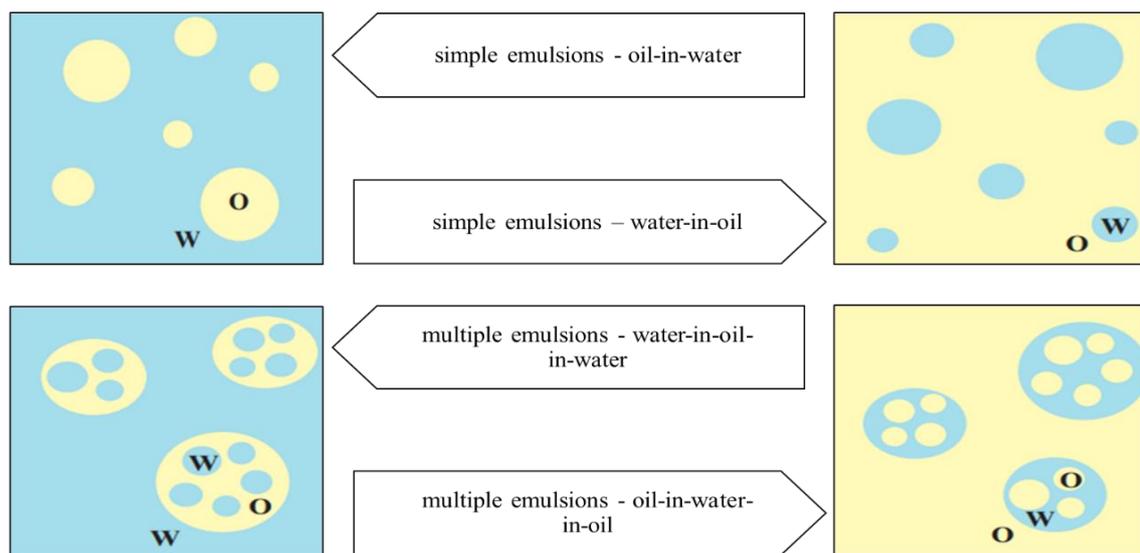


Figura 2 - Representação esquemática de emulsões simples e múltiplas. Adaptado de: Bouyer et al. (2012).

As emulsões O/A simples são as mais utilizadas e de maior interesse para a indústria alimentícia, para a produção de iogurtes, cremes e maioneses. As emulsões A/O simples são usadas na indústria para produção de margarina e alimentos à base de manteiga (Zanatta et al. 2017). Emulsões múltiplas têm alto potencial para aplicação na indústria alimentícia (produtos de baixa caloria, melhores características sensoriais, mascaramento de sabor), indústria cosmética (cremes facilmente difundíveis com ingredientes encapsulados nas fases água e óleo) e na indústria farmacêutica (Graaf et al., 2005; Neethirajan e Jayas, 2011; Bouyer et al., 2012). Estudos recentes mostram que essas emulsões também estão sendo utilizadas na indústria de produtos agrícolas, sendo aplicadas na formulação de produtos pela produção de microesferas multicompartimentais, o que leva à inovação de produtos destinados ao controle de fungos, bactérias e plantas daninhas (Bouyer et al., 2012; Bolzan et al., 2015; Batos et al., 2017; Hazrati et al., 2017).

Entre os métodos de formação de uma emulsão, os mais utilizados são: i) emulsificação física por queda-ruptura, que depende da natureza mecânica do processo e das propriedades reológicas e químicas dos compostos; ii) emulsificação por inversão de fase; iii) emulsificação “espontânea”, que depende principalmente da natureza dos aditivos químicos, a relação entre as duas etapas e a temperatura (Graaf et al., 2005; Schmidts et al., 2010; Anton e Vandamme, 2011).

Alguns aspectos a serem considerados na fabricação de uma emulsão são a seleção das fases contínua e dispersa e o estudo dos fatores que determinam a reologia e estabilidade dos sistemas emulsionados (Graaf et al., 2005; Liu et al., 2011). A emulsificação pode ser produzida por métodos convencionais ou pelo uso da técnica conhecida como emulsificação de membrana. É um processo energeticamente eficiente, pois possui baixa demanda de energia (teor de energia por metro cúbico de emulsão produzida) quando comparado a outras técnicas convencionais de emulsificação (Graaf et al., 2005; Zanatta et al., 2017).

As emulsões também podem ser dimensionadas para tamanho de gotículas formadas na fase dispersa e distribuídas na fase contínua, que podem ser chamadas de micro ou nanoemulsões. As microemulsões são sistemas termodinamicamente estáveis e isotropicamente translúcidos de dois líquidos imiscíveis, geralmente A/O estabilizado por um filme de surfactante interfacial e co-surfactante com gotículas na faixa de 10 μm a 100 nm. Para a formação de microemulsões, é necessário combinar três a cinco componentes: óleo, água, surfactante, co-surfactante e eletrólito (Damasceno et al., 2011). As nanoemulsões são sistemas cineticamente estáveis, transparentes ou translúcidos de dois líquidos imiscíveis estabilizados por um filme de surfactante interfacial com gotículas <100 nm (Tadros et al., 2004; Wang et

al., 2007). Este pequeno tamanho das gotículas é responsável pela estabilidade das nanoemulsões, evitando a sedimentação (Anton e Vandamme, 2011).

Ao contrário das emulsões tradicionais, micro e nanoemulsões, que são sistemas constituídos por uma fase aquosa, uma fase lipofílica e um surfactante, é necessária a adição de um co-surfactante para a preparação de micro e nanoemulsões. A adição deste co-surfactante torna o sistema homogeneamente disperso, o que pode difundir-se facilmente, sendo termodinamicamente estável ao contrário das emulsões (Graaf et al., 2005; Anton e Vandamme, 2011).

A atividade antimicrobiana de nanoemulsões formuladas a partir de óleo de manjeriço com baixo diâmetro de gotícula associado ao surfactante não iônico Tween 80 foi confirmada para preservar alimentos contra a deterioração microbiana (Ghosh et al., 2013). Os resultados destacam o potencial de formulação de nanoemulsões para permitir maior expressão biológica dos compostos metabólitos produzidos pelas plantas ou mesmo por microorganismos. Emulsões foram formuladas para produzir um bioherbicida a partir da mistura de metabólitos secundários da fermentação em estado sólido do fungo *Diaporthe* sp. com adjuvantes para melhorar a atividade herbicida em relação ao organismo alvo (Bastos et al., 2017). Nesse estudo, os autores verificaram que o fungo *Diaporthe* sp. apresentavam potencial para produzir moléculas com atividade herbicida e as emulsões produzidas com a adição de adjuvantes melhoraram três vezes sua eficiência frente às plantas de *Cucumis sativus*.

Além de fornecer ao produto final características como estabilidade, eles também aumentam a molhabilidade, a dispersibilidade e a penetração, aspectos esses que são altamente atraentes para as indústrias de produtos agrícolas (Solans e Solé, 2012). As principais vantagens das nanoemulsões em relação às emulsões convencionais incluem alta estabilidade cinética, melhorando a biodisponibilidade e permitindo o transporte de compostos ativos, alta permeabilidade de substâncias de baixa solubilidade e baixa turbidez. Eles também aumentam a molhabilidade, a dispersibilidade e a penetração, aspectos esses que são altamente atraentes para as indústrias de produtos agrícolas (McClements, 2011; Solans e Solé, 2012; Ghosh et al., 2013). Com a otimização dos parâmetros de processo para a formulação da nanoemulsão do óleo de manjeriço com pequeno diâmetro de gota e alta estabilidade cinética, Ghosh et al. (2013) observaram que a nanoemulsão era estável e possuía diâmetro de 29,6 nm. Além disso, a atividade bactericida também foi demonstrada pelas emulsões formuladas contra *Escherichia coli*.

As propriedades das nanoemulsões, incluindo a atividade antimicrobiana, são altamente dependentes do tipo de óleo essencial utilizado na formulação e do tamanho das gotículas

obtidas no final do processo. Ao avaliar a formulação de nanoemulsões contendo óleos essenciais de diferentes espécies vegetais, Salvia-Trujillo et al. (2015) relataram que as nanoemulsões apresentaram maior ação bactericida in vitro contra *Escherichia coli*, principalmente para o óleo obtido do cravo-da-índia. Em outro trabalho, observou-se atividade antimicrobiana e estabilidade de nanoemulsões de óleo de manjerição livre, principalmente contra *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Streptococcus* sp, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* (Bolzan et al., 2015).

Considerando que o óleo de gerânio apresentou constituintes majoritários, como citronelol e geraniol, Patias et al. (2016) desenvolveram uma nanoemulsão contendo óleo de gerânio para afirmar sua estabilidade acelerada e atividade antifúngica para as espécies *Candida* spp. Eles relataram que as nanoemulsões apresentaram estabilidade por um período de 60 dias, mostrando também atividade antifúngica significativa para as espécies *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. Em um estudo recente, Hazrati et al. (2017) desenvolveram uma nanoemulsão O/A composta por óleo essencial extraído de *Satureja hortensis* L. e avaliaram a atividade bioherbicida em pré e pós emergência de duas plantas de importância global (*Amaranthus retroflexus* L. e *Chenopodium album* L.). Os testes em pré-emergência mostraram que a nanoemulsão reduziu os níveis de germinação e apresentou maior efeito inibitório quando aplicada uma dose de 800 $\mu\text{L.L}^{-1}$.

2.2.6. Emulsificação por membrana

A emulsificação por membranas é uma aplicação recente da tecnologia de membranas, que nos últimos anos tem recebido maior atenção com potenciais aplicações em diversas áreas. A principal vantagem do uso de membranas em comparação com as técnicas convencionais de emulsificação é a formação de micro e nanogotas com pouca dispersão e tamanho uniforme. Além disso, permite controlar o diâmetro médio das gotículas pelo tamanho médio dos poros da membrana (Tabela 2). O tamanho da gota e a distribuição do tamanho estão entre as propriedades mais importantes que devem ser consideradas quando preparar um certo tipo de emulsão. Isso resulta em maior interesse no uso do processo de emulsificação de membrana (Charcosset et al., 2004; Mello et al., 2010).

Tabela 2 - Vantagens e desvantagens da emulsificação da membrana em comparação aos métodos convencionais.

Vantagens	Desvantagens
Membranas em geral	
<p>Elevada e constante área interfacial.</p> <p>Fases fluidas em contato independência.</p> <p>Sem partes móveis, uso de equipamento plástico (ausência de corrosão)</p> <p>Alta modularidade e compatibilidade, expansão direta, controle fácil.</p>	<p>Resistência adicional à transferência de massa criada pela membrana</p> <p>Vida útil da membrana relativamente baixa; altos custos de reposição</p>
Membranas emulsificantes	
<p>Menor consumo de energia em relação aos emulsificantes convencionais.</p> <p>No foaming reduced coalescence phenomena</p> <p>Distribuições de tamanho de gotículas estreitas</p> <p>Várias configurações: pré-mistura de emulsificação, dispositivos rotativos para reduzir incrustações e aumentar a produtividade</p>	<p>Baixas taxas de permeação associadas à distribuição estreita do tamanho das gotículas e produtividade reduzida.</p> <p>Ocorre incrustação na superfície da membrana e/ou nos poros.</p>

Adaptado de: Charcosset (2009)

Além desses fatores, o processo de emulsificação por membranas é uma técnica promissora, especialmente por oferecer suavidade ao processo, facilidade de operação, equipamentos simples e variáveis para produção em larga escala. A emulsificação da membrana é uma técnica amplamente utilizada em diferentes áreas, mas especialmente importante em aplicações finas na indústria farmacêutica, pois permite o controle do tamanho e distribuição das partículas, produzindo múltiplas emulsões de tamanho uniforme, o que agrega mais valor a o medicamento obtido (Liu et al., 2011).

Existem dois métodos distintos para realizar a formação de emulsões pelo processo de emulsificação da membrana. No método de emulsificação direta (Figura 3-A), a fase dispersa permeia através da membrana para a fase contínua em que as gotículas são formadas. O método de emulsificação de pré-mistura (Figura 3-B) é geralmente realizado em ciclos, onde a fase

dispersa passa sucessivamente através da membrana, a fim de reduzir o tamanho das gotículas cada vez mais. Inicialmente, uma emulsão primária é preparada pelo método convencional (agitação mecânica simples), que é então pré-determinada para permear através de uma membrana microporosa, promovendo a redução do tamanho da gota da fase dispersa. Esta técnica é geralmente realizada em ciclos, que são passagens de membrana sucessivas, a fim de reduzir o tamanho das gotículas cada vez mais (Piacentini et al., 2014).

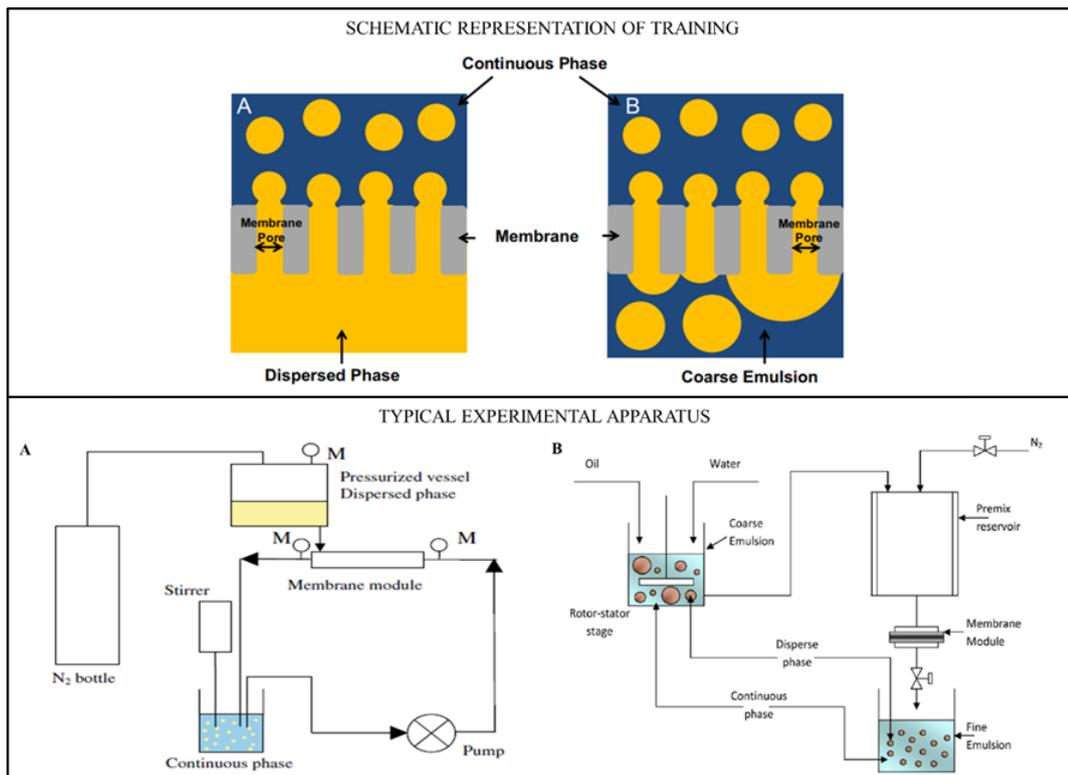


Figura 3 - Representação esquemática do processo de formação e aparato experimental típico para a produção de emulsões. (A) processo de emulsificação direta e (B) processo de emulsificação de pré-mistura. Adaptado de: Charcosset (2009), Piacentini et al. (2014) e Trentin et al. (2010).

O método de emulsificação direta por membrana apresenta as vantagens das baixas taxas de cisalhamento, baixo consumo de energia, tamanho uniforme das gotículas e facilidade de expansão (Van Der Graaf et al., 2005). No entanto, o método de emulsificação de pré-mistura requer menos consumo de energia e permite fluxos de permeado superiores ao outro método. No geral, o aparato experimental é simples e fácil de controlar (Nazir et al., 2010).

Os métodos de emulsificação de membrana têm algumas limitações. A emulsificação direta apresenta baixo fluxo permeado da fase dispersa através da membrana e requer grandes

áreas da membrana (Nazir et al., 2010). No caso da emulsificação de pré-mistura, na maioria dos casos são necessários vários ciclos, porém, a principal desvantagem e incrustação ocorrem na superfície e nos poros da membrana, reduzindo consideravelmente o fluxo de permeado e pode se tornar um problema dependendo da formulação da emulsão (Charcosset et al., 2004; Van der Zwan et al., 2008).

Dois métodos de operação são usados no processo de emulsificação de membrana: emulsificação de membrana de fluxo cruzado e pré-mistura de emulsão de membrana (Quin et al., 2016). Na emulsificação de membrana, o fluxo de velocidade na fase contínua (Figura 4) e a cinética da adsorção ou emulsificante dos surfactantes utilizados têm um efeito significativo na distribuição do tamanho e no tamanho médio das gotas da emulsão. O tamanho da gota é determinado principalmente pelo tipo de membrana, tamanho do poro, fluxo de fase contínua e dispersa, pressão aplicada à membrana, viscosidade relativa das fases, taxa de cisalhamento aplicada, velocidade do fluxo transversal, pressão transmembrana e tensão interfacial (Hancocks et al., 2013). Além disso, o tipo de surfactante e a concentração a ser utilizada são importantes para o processo de emulsificação da membrana. Na maioria das aplicações em diferentes áreas da indústria, os surfactantes misturados são empregados em formulações de emulsão (Fanun, 2010).

Para otimizar o processo de emulsificação da membrana, é necessário utilizar um modelo adequado, que tenha um mínimo de tempo de produção sem prejuízo para a qualidade. Durante o processo de formulação de gotas, as moléculas adsorvem o surfactante na interface óleo/água recém-formada e reduzem a tensão interfacial, facilitando a formação de gotículas e evitando a coalescência imediatamente após a formação (Figura 4) (Schmidts et al., 2010).

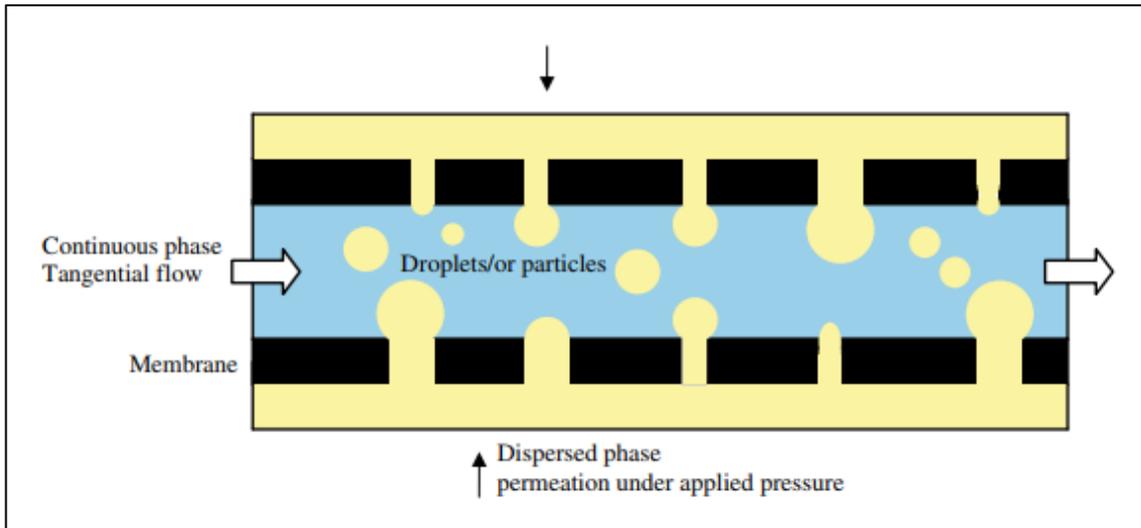


Figura 4 - Diagrama esquemático do processo de emulsificação da membrana. Adaptado de: Charcosset (2009).

2.2.7. Considerações finais e perspectivas futuras

As biomoléculas produzidas por *Phoma* sp. são promissores para o desenvolvimento de produtos naturais (Tabela 3). O controle biológico é uma realidade na área agrícola. Nos últimos anos, pesquisas têm sido realizadas para selecionar agentes biológicos e desenvolver novas tecnologias para a produção de metabólitos biologicamente ativos. Portanto, estes compostos são uma alternativa contra ervas daninhas, mesmo em uma substituição gradual aos herbicidas sintéticos. Eles contribuem para o desenvolvimento de estratégias de controle para a agricultura sustentável. Testes de eficácia em escala laboratorial incluem purificação, concentração e formulação de bioprodutos.

Ainda existem desafios em relação aos metabólitos secundários produzidos por microrganismos, principalmente aqueles produzidos por fungos. Um dos desafios é a baixa produtividade, que é influenciada pelas condições de cultivo, tipo de fermentação e fatores inerentes aos processos (por exemplo, aumentos na temperatura e na aeração). Portanto, é necessário realizar mais pesquisas focando não apenas a ampliação da escala de produção desses compostos, mas também no desenvolvimento de novas tecnologias ou mesmo na adaptação das existentes, que possibilitem demonstrar o alto potencial desses compostos. Um desses casos é a emulsificação por membranas, o que possibilita a produção de emulsões com maior estabilidade cinética, maleabilidade, espalhabilidade, penetração e biodisponibilidade. Associado a isso, a emulsificação da membrana pode prolongar o período de armazenamento dos bioprodutos.

Tabela 3 - Bioherbicidas de metabólitos secundários produzidos por fungos.

Reality			
Produto Comercial	Registro	Fungo	Planta daninha (s) controlada
Devine™	1981	<i>Phytophthora palmivora</i> Butler	<i>Morrenia odorata</i> (Hook. & Arn.) Lindl
Collego™	1982	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , strain 20358	<i>Aeschynomene virginica</i> (L.) B.S.P.
BioMal®	1992	<i>Colletotrichum Gloeosporioides</i> , strain ATCC 20767	<i>Malva pusilla</i> Sm.
LockDown®.	1997	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , strain ATCC 20358	<i>Aeschynomene virginica</i> (L.) B.S.P.
Warrior®	2002	<i>Puccinia thlaspeos</i> C. Shub.	<i>Isatis tinctoria</i> L.
Mycotech™	2002/2005	<i>Chondrostereum purpureum</i> , strain HQ1	<i>Prunus serotina</i> Ehrh; <i>Populus euramericana</i>
Chontrol®	2004/2005	<i>Chondrostereum purpureum</i> , strain PFC 2139	<i>Prunus serotina</i> Ehrh; <i>Populus euramericana</i>
Smoulder®	2005	<i>Alternaria destruens</i> L. Simmons, strain 059	Several weed species
Sarritor®	2007/2010	<i>Sclerotinia minor</i> Jagger, strain IMI 344141	Dicotyledonous weeds
<i>Phoma</i>	2012	<i>Phoma macrostoma</i> , strain 94-44B	Dicotyledonous weeds

Adaptado de: Cordeau et al. (2016).

O controle biológico de ervas daninhas é um dos principais desafios para a agricultura orgânica e convencional. Nesse sentido, os fungos endofíticos de *Phoma* são microrganismos que produzem uma grande variedade de metabólitos secundários, os quais ainda são pouco investigados. A perspectiva para o futuro próximo é que mais produtos de biocontrole com alto potencial possam ser lançados e comercializados em todo o mundo. Com base nisso, as tecnologias podem ser confirmadas para concentrar e formular metabólitos secundários

produzidos por fungos endofíticos e processos podem ser otimizados para o desenvolvimento das produções em maior escala.

2.2.8. Conclusões

Com base no que foi apresentado neste Capítulo, pode-se observar que o controle biológico é uma realidade no meio agrícola. Nos últimos anos vêm sendo desenvolvidas pesquisas relacionadas à seleção de agentes biológicos, desenvolvimento de tecnologia para produção de metabólitos biologicamente ativos, testes de eficácia em escala laboratorial, além de purificação, concentração e formulação de bioprodutos. A utilização de metabólitos secundários provenientes da fermentação de fungos endofíticos é uma aplicação com elevado potencial para o controle biológico de fungos e plantas daninhas. As biomoléculas produzidas pelo fungo *Phoma* sp. são promissoras para o desenvolvimento de produto natural. Porém, ainda existem muitos desafios no que se refere à utilização de metabolitos secundários produzidos por microrganismos, principalmente aqueles produzidos por fungos, devido à baixa produtividade que é influenciada pelas condições do meio de cultivo, tipo de fermentação, assim como fatores inerentes a este, com alterações de temperatura e aeração durante o processo. Devido a isto, é necessário desenvolver mais pesquisas, com foco não só no aumento de escala para produção destes compostos, mas como também para desenvolver ou mesmo adaptar tecnologias já existentes que permitam maior expressão do potencial destes compostos. Destacando-se o processo de emulsificação por membranas, que permite agregar a esta maior estabilidade cinética, molhabilidade, espalhabilidade e penetração, além de melhorar a biodisponibilidade e permitir o carregamento de compostos ativos, associado a isto prolongar o período de armazenamento dos bioprodutos. A obtenção de um bioproduto com eficácia comprovada, permitirá a redução do uso de agroquímicos, dando ênfase ao controle biológico. Aliado a esses benefícios, terá também a redução dos custos de produção e redução do impacto ambiental gerado pelo controle químico.

2.2.9. Referências Bibliográficas

ANTON N, VANDAMME TF. Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. *Pharmaceutical Research* 2011; 28:978-985

Ash GJ (2010) The science, art and business of successful bioherbicides *Biological Control* 52:230-240

- Bailey KL, Derby J (2001) Fungal isolates and biological control compositions for the control of weeds. US Patent Application Serial No. 60/294475. Filed May 20, 2001
- Bailey KL, Falk S (2011) Turning Research on Microbial Bioherbicides into Commercial Products - A *Phoma* Story. *Pest Technology* 5:73-79
- Bailey KL, Pitt WM, Falk S, Derby J (2011a) The effects of *Phoma macrostoma* on nontarget plant and target weed species. *Biological Control* 58:379-386
- Bailey KL, Pitt WM, Leggett F, et al (2011b) Determining the infection process of *Phoma macrostoma* that leads to bioherbicidal activity on broadleaved weeds. *Biological Control* 59:268-276
- Baque MA, Mho SH, Lee EJ et al (2012) Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. *Biotechnology Advances* 30:1255-1267
- Bastos BO, Deobald GA, Brun T et al (2017) Solid-state fermentation for production of a bioherbicide from *Diaporthe* sp. and its formulation to enhance the efficacy. *3 Biotech* 7:135-143
- Bolzan AA, Lopes LQ, Marin, LS et al (2015) Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo de orégano livre e em nanoemulsões. *Disciplinarum Scientia* 16:325-332
- Bouyer E, Mekhloufi G, Rosilio V et al (2012) Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? *International Journal of Pharmaceutics*, 436:359-378
- Brun T, Rabuske JE, Todero I et al (2016) Production of bioherbicide by *Phoma* sp. in a stirred-tank bioreactor. *3 Biotech* 6:230-239
- Castro AM, Ferreira JR (2010) Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova* 33:181-188
- Chagas HA, Basseto MA, Rosa DD et al (2014) Evaluation of fungicides, essential oils and biological agents on *Amphobotrys ricini* control in castor bean (*Ricinus communis* L.). *Summa Phytopathologica* 40:42-48
- Charcosset C (2009) Preparation of emulsions and particles by membrane emulsification for the food processing industry. *Journal of Food Engineering* 92:241-249
- Charcosset C, Limayem I, Fessi H (2004) The membrane emulsification process – a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 79:209-218
- Cheng CJ, Chu LY, Zhang J, Zhou MY (2008) Preparation of monodisperse poly (N-isopropylacrylamide) microspheres and microcapsules via Shirasu-porous-glass membrane emulsification. *Desalination* 234:184-194

- Cimmino A, Andolfi A, Berestetskiy A, Evidente A (2008) Production of phytotoxins by *Phoma exigua* var *exigua*, a potential mycoherbicide against perennial thistles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:630-634
- Cimmino A, Andolfi A, Zonno MC et al (2013) Chenopodolans A–C: phytotoxic furopyrans produced by *Phoma chenopodiicola*, a fungal pathogen of *Chenopodium album*. *Phytochemistry* 96:208-213
- Confortin TC, Todero I, Luft L et al (2018) Importance of *Lupinus albescens* in agricultural and food-related areas: A review. *3 Biotech* 8:448-458
- Cordeau S, Triolet M, Wayman S et al (2016) Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. *Crop Protection* 87:44-49
- Couto SR, Sanromán MA (2006) Application of solid-state fermentation to food industry – a review. *Journal of Food Engineering* 76:91-302
- Daia L, Hussaina H, Drägerb S et al (2010) Metabolites from the Fungus *Phoma* sp. 7210, Associated with *Aizoon canariense*. *Natural Product Communications* 5:1176-1180
- Damasceno BPGL, Silva JA, Oliveira EE et al (2011) Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 32:9-18
- Daryaei A, Jones E, Glare TR, Falloon RE (2016a) Nutrient amendments affect *Trichoderma atroviride* conidium production, germination and bioactivity. *Biological Control* 93:8-14
- Daryaei A, Jones EE, Glare TR, Falloon RE (2016b) pH and water activity in culture media affect biological control activity of *Trichoderma atroviride* against *Rhizoctonia solani*. *Biological Control* 92:24-30
- De Luca G, Di Maio FP, Di Renzo A, Drioli E (2008) Droplet detachment in cross-flow membrane emulsification: Comparison among torque- and force-based models. *Chemical Engineering and Processing* 47:1150-1158
- Dernain AL (2006) *From Natural Products Discovery to Commercialization: A Success Story*. Springer Heidelberg 33:486-495
- Evidente M, Cimmino A, Zonno MC et al (2015) Phytotoxins produced by *Phoma chenopodiicola*, a fungal pathogen of *Chenopodium album*. *Phytochemistry* 117:482-488
- Evidente M, Cimmino A, Zonno MC et al (2016) Chenopodolans E and F, two new furopyrans produced by *Phoma chenopodiicola* and absolute configuration determination of chenopodolan B. *Tetrahedron* 72:8502-8507
- Fanun M (2010) Microemulsions with Mixed Nonionic Surfactants and Flavor Oil. *Journal of Surfactants and Detergents* 13:321-328

Frans R, Talbert R, Marx D, Crowley H (1986) Experimental design and techniques for measuring and analysing plant responses to weed control practices. In: Camper ND (ed) Research Methods in Weed Science, 3rd edn. Southern Weed Science Society, Champaign, pp 29-46

Ghosh V, Mukherjee A, Chandrasekaran N (2013) Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. Ultrasonics Sonochemistry 20:338-344

Graaf SVD, Schroen CGPH, Boom RM (2005) Preparation of double emulsions by membrane emulsification - A review. Journal of Membrane Science 251:7-15

Graupner PR, Carr A, Clancy E et al (2003) The macrocidins: novel cyclic tetramic acids with herbicidal activity produced by *Phoma macrostoma*. Journal of Natural Products 66:1558-1561

Grossiord JL, Sellier M (2001). W/O/W multiple emulsions: a review of the release mechanisms by break-up of the oily membrane. S.T.P. Pharma sciences 11:331-339.

Gunasekaran S, Poorniammal R (2008) Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Penicillium* sp. under submerged cultivation. African Journal of Biotechnology 7:1894-1898

Hancocks RD, Spyropoulos F, Norton IT (2013) Comparisons between membranes for use in cross flow membrane emulsification. Journal of Food Engineering 116:382-389

Hazrati H, Saharkhiz MJ, Niakousari M, Moein M (2017) Natural herbicide activity of *Satureja hortensis* L. essential oil nanoemulsion on the seed germination and morphophysiological features of two important weed species. Ecotoxicology and Environmental Safety 142:423-430

Herath K, Harris G, Jayasuriya H et al (2009) Isolation, structure and biological activity of phomafungin, a cyclic lipodepsipeptide from a widespread tropical *Phoma* sp. Bioorganic & Medicinal Chemistry 17:1361-1369

Hinz HL, Schwarzlander M, Gassmann A, Bouchier RS (2014) Successes we may not have had: a retrospective analysis of selected weed biological control agents in the United States. Invasive Plant Science and Management 7:565-579

Hubbard M, Hynes RK, Erlandson M, Bailey KL (2014) The biochemistry behind biopesticide efficacy. Sustainable Chemical Processes 2:1-8

Hussain H, Akhtar N, Schulz B et al (2009) New bioactive 2,3-epoxycyclohexenes and isocoumarins from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Laurus azorica*. European Journal of Organic Chemistry 5:749-756

- Hussain H, Kock I, Al-Harrasi A et al (2014) Antimicrobial chemical constituents from endophytic fungus *Phoma* sp. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 7:699-702
- Hussain H, Krohn K, Pescitelli G et al (2012) Phomopsinones A–D: Four New Pyrenocines from Endophytic Fungus *Phomopsis* sp. *European Journal of Organic Chemistry* 5:1783-1789
- Jabran K, Mahajan G, Sardana V, Chauhan BS (2015) Allelopathy for weed control in agricultural systems. *Crop Protection* 72:57-65
- Kaul S, Gupta S, Ahmed M, Dhar MK (2012) Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochemistry Reviews* 11:487-505
- Kennedy AC (2016) *Pseudomonas fluorescens* strains selectively suppress annual bluegrass (*Poa annua* L.). *Biological Control* 103:210-217
- Kim EL, Li JL, Dang HT et al (2012) Cytotoxic cytochalasins from the endozoic fungus *Phoma* sp. of the giant jellyfish *Nemopilema nomurai*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22:5752-5752
- Klaic R, Sallet D, Foletto EL et al (2017) Optimization of solid-state fermentation for bioherbicide production by *Phoma* sp. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 34:377-384
- Kleinman Z, Ben-Ami G, Rubin B (2016) From sensitivity to resistance – factors affecting the response of *Conyza* spp. to glyphosate. *Pest Management Science* 72:1681-1688
- Kourniatis LR, Spinelli LS, Mansur CRE (2010) Nanoemulsões óleo de laranja/água preparadas em homogeneizador de alta pressão. *Química Nova* 33:295-300
- Lam RSH, Nickerson MT (2013) Food proteins: a review on their emulsifying properties using a structure-function approach. *Foods Chemistry* 141:975-984
- Lamichhane J R, Devos Y, Beckie HJ et al (2017) Integrated weed management systems with herbicide-tolerant crops in the European Union: lessons learnt from home and abroad. *CRITICAL Reviews in Biotechnology* 37:459-475
- Liu W, Yang XL, Ho WSW (2011) Preparation of uniform-sized multiple emulsions and micro/nano particulates for drug delivery by membrane emulsification. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 100:75-96
- Matzrafi M, Lazar TW, Sibony M, Rubin B (2015) *Conyza* species: distribution and evolution of multiple target-site herbicide resistances. *Planta* 242:259-267
- McClements DJ (2011) Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter* 7:2297-2316
- Mello BCBS, Petrus JCC, Hubinger MD (2010) Desempenho do processo de concentração de extratos de própolis por nanofiltração. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 30:166-172

- Nazir A, Schroën K, Boom R (2010) Premix emulsification: A review. *Journal of Membrane Science* 362:1-11
- Neethirajan S, Jayas DS (2011) Nanotechnology for the Food and Bioprocessing Industries. *Food and Bioprocess Technology* 4:39-47
- Neve P, Barney JN, Y Buckley et al. (2018) Reviewing research priorities in weed ecology, evolution and management: a horizon scan. *Weed Research* 58:250-258
- Oliveira RB, Antuniassi UR, Gandolfo MA (2015) Spray adjuvant characteristics affecting agricultural spraying drift. *Journal of the Brazilian Association of Agricultural Engineering* 35:109-116
- Parsa S, Ortiza, V, Jiménez MIG et al (2018) Root environment is a key determinant of fungal entomopathogen endophytism following seed treatment in the common bean, *Phaseolus vulgaris*. *Biological Control* 116:74-81
- Pereira LJB, Garcia-Rojas EE (2015) Multiple emulsions: formation and application in microencapsulation of bioactive components. *Ciência Rural* 45:155-162
- Pes MP, Mazutti MA, Almeida TC et al (2016) Bioherbicide based on *Diaporthe* sp. secondary metabolites in the control of three tough weeds. *African Journal of Agricultural Research* 11:4242-4249
- Piacentini E, Drioli E, Giorno L (2014) Membrane emulsification technology: Twenty-five years of inventions and research through patent survey. *Journal of Membrane Science* 468:410-422
- Quereshi S, Pandey AK, Singh J (2010) Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Phoma herbarum* (FGCC#54) under submerged cultivation. *Journal of Phytology* 2:01-08
- Rai M, Deshmukh P, Gade A et al (2009) *Phoma Saccardo*: Distribution, secondary metabolite production and biotechnological applications. *Critical Reviews in Microbiology* 35:182-196
- Saleem M, Hussain H, Ahmed I et al (2011) Viburspiran, an Antifungal Member of the Octadride Class of Maleic Anhydride Natural Products. *European Journal of Organic Chemistry* 4:808-812
- Salvia-Trujillo L, Rojas-Graü A, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O (2015) Physicochemical characterization and antimicrobial activity of foodgrade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. *Food Hydrocolloids* 43:547-556
- Schmidts T, Dobler D, Guldan AC, Paulus N, Runkel F (2010) Multiple W/O/W emulsions - using the required HLB for emulsifier evaluation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 372:48-54

- Schwan-Estrada KRF, Stangarlin JR, Cruz MES (2000) Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. *Floresta* 30:129-137
- Silva JDF, Silva YP, Piatnicki CMS et al (2015) Microemulsões: componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações. *Química Nova* 38:1196-1206
- Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK (2017) Microbial metabolites in nutrition, healthcare and agriculture. *3 Biotech* 7:1-14
- Solans C & Solé I (2012) Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 17:246-254
- Tadros T, Izquierdo P, Esquena J, Solans C (2004) Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science* 108:303-318
- Tahmasebi BK, Alebrahim MT, Roldán-Gómez RA et al (2018) Effectiveness of alternative herbicides on three *Conyza* species from Europe with and without glyphosate resistance. *Crop Protection* 112:350-355
- Todero I, Confortin TC, Luft L et al (2018a) Formulation of a bioherbicide with metabolites from *Phoma* sp. *Scientia Horticulturae* 241:285-292
- Todero I, Confortin TC, Soares JF et al (2018b) Concentration of metabolites from *Phoma* sp. using microfiltration membrane for increasing bioherbicidal activity. *Environmental Technology* 22:1-9
- Trentin A, Lamo S, Güell C et al (2010) Microfiltration membranes to produce BSA-stabilized O/W emulsions by premix membrane emulsification. *Journal of Membrane Science* 356:22-32
- Van Der Graaf S, Schroen, CGPH, Boom RM (2005) Preparation of double emulsions by membrane emulsification—a review. *Journal of Membrane Science* 251:7-15
- Van Der Graaf S, Schroen, CGPH, Boom RM (2008) Premix membrane emulsification by using a packed layer of glass beads. *AIChE Journal* 54:2190-2197
- Venzon M, Rosado MC, Euzébio DE et al (2006) Suitability of leguminous cover crop pollens as food source for the green lacewing *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). *Neotropical Entomology* 35:371-376
- Vikrant P, Verma KK, Rajak RC, Pandey AK (2006) Characterization of phytotoxin from *Phoma herbarum* for management of *Parthenium hysterophorus* L. *Journal of Phytopathology* 154:461-468
- Villaverde JJ, Sevilla-Moran B, Sandín-Espana P et al (2014) Biopesticides in the framework of the European pesticide regulation (EC) No. 1107/2009. *Pest Management Science* 70:2-5
- Wang L, Li X, Zhang G, Dong J, Eastoe J (2007) Oil-in water nanoemulsions for pesticide formulations. *Journal of Colloid and Interface Science* 314:230-235

Wang LW, Xu BG, Wang JY et al (2012) Bioactive metabolites from *Phoma* species, an endophytic fungus from the Chinese medicinal plant *Arisaema erubescens*. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:1231-1239

Wijeratne EMK, He H, Franzblau SG, Hoffman AM, Gunatilaka AAL (2013) Phomapyrrolidones A-C, Antitubercular Alkaloids from the Endophytic Fungus *Phoma* sp. NRRL 46751. *Journal of Natural Products* 76:1860-1865

Zanatta V, Rezzadori K, Penha FM et al (2017) Stability of oil-in-water emulsions produced by membrane emulsification with microporous ceramic membranes. *Journal of Food Engineering* 195:73-84

Zhanga H, Xiongb Y, Zhaoa H et al (2013) An antimicrobial compound from the endophytic fungus *Phoma* sp. isolated from the medicinal plant *Taraxacum mongolicum*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 44:177-181

Zhou L, Bailey KL, Derby J (2004) Plant colonization and environmental fate of the biocontrol fungus *Phoma macrostoma*. *Biological Control* 30:634-644

CAPÍTULO 3 - PRESERVAÇÃO DO FUNGO *Phoma dimorpha*

Neste Capítulo é apresentado o artigo sobre a preservação do fungo *Phoma dimorpha*, que teve como objetivo determinar a eficácia e viabilidade de três métodos de preservação de isolados do fungo *Phoma dimorpha* (repicagens periódicas, Castellani e fragmentos de papel-filtro), em dois períodos de avaliação.

3.1. ARTIGO III: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DO FUNGO *Phoma dimorpha*

O presente artigo foi publicado na revista *Colloquium Agrariae* (v. 15, n. 4, p. 1-10, 2019). <https://doi.org/10.5747/ca.2019.v15.n4.a306>

Resumo: Frente a necessidade de preservação e a manutenção de materiais biológicos, dentre eles fungos com potencial para controle biológico, para o desenvolvimento biotecnológico e científico, que vêm ganhando destaque no cenário mundial. Sendo necessário a adequação de métodos de preservação que além de garantia a sobrevivência destes microrganismos permitam a conservação de suas características morfológicas, fisiológicas e genéticas, no entanto, não existe um método ideal ou universal para a conservação de materiais biológicos. Diante desta necessidade o presente trabalho teve como objetivo de avaliar a eficácia e viabilidade de três métodos de preservação de isolados do fungo *Phoma dimorpha* (repicagens periódicas, Castellani e fragmentos de papel-filtro), em dois períodos de avaliação, seis e doze meses após o armazenamento. Estudou-se a eficácia e viabilidade, através do crescimento micelial do fungo em meio de cultivo contendo batata-dextrose-ágar. Houve variabilidade entre os métodos de preservação do isolado do fungo *P. dimorpha* para o crescimento micelial, eficácia do método e índice de velocidade do crescimento micelial, nos dois períodos de avaliação, após seis e doze meses de armazenamento. O método de preservação em fragmento de papel filtro mostrou-se como o mais eficaz na preservação do isolado do fungo *P. dimorpha* nos dois períodos de avaliação, após seis e doze meses de armazenamento, sendo ideal para obter o maior o crescimento micelial, eficácia do método e índice de velocidade do crescimento micelial.

Palavras-chave: crescimento micelial; repicagens periódicas; Castellani; fragmentos de papel-filtro.

Abstract: Facing the need for preservation and maintenance of biological materials, among them fungi with potential for biological control, for biotechnological and scientific development, which are gaining prominence in the world scenario. It is necessary to adapt preservation methods that besides guaranteeing the survival of these microorganisms allow the conservation of their morphological, physiological and genetic characteristics, however, there is no ideal or universal method for the conservation of biological materials. In view of this need, the present work had the objective of evaluating the efficacy and feasibility of three methods for the preservation of *Phoma dimorpha* (periodic transfer, Castellani and filter paper fragments) isolates in two evaluation periods, six and twelve months after the storage. Efficacy and viability were studied by mycelial growth of the fungus in a culture medium containing potato-dextrose-agar. There was variability between the preservation methods of the *P. dimorpha* fungus isolate for mycelial growth, method efficacy and mycelial growth rate index, in the two evaluation periods, after six and twelve months of storage. The filter paper fragment preservation method was the most effective in preserving the *P. dimorpha* fungus isolate in the two evaluation periods, after six and twelve months of storage, being ideal to obtain the highest mycelial growth, efficacy of the method and mycelial growth rate index.

Keywords: mycelial growth; periodic transfer; Castellani method; fragments of qualitative filter paper.

3.1.1. Introdução

Os microrganismos são tidos como uma grande fonte de compostos de alto valor biológico que podem ser utilizados em diversas áreas, porém pouco investigado. Dentre estes compostos produzidos pelos microrganismos, destacam-se vitaminas, antibióticos, álcool, enzimas, biossurfactantes, fitotoxinas, entre outros (CAMEOTRA, 2007). Os fungos são os mais investigados, pois diversas espécies possuem a capacidade de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários quimicamente novos e com expressiva atividade biológica (HINZ *et al.*, 2014; VILLAVERDE *et al.*, 2014; WIJERATNE *et al.*, 2013).

Os fungos do gênero *Phoma* estão entre os mais promissores produtores de metabólitos secundários, possuindo grande potencial para o controle biológico, que podem ser explorados

para a produção de produtos fitossanitários naturais para agricultura sustentável (KIM *et al.*, 2012; RAI *et al.*, 2009). Diversas pesquisas vêm mostrando que algumas espécies deste gênero apresentam elevado potencial para produção de metabólitos secundários com atividade herbicida (CIMMINO *et al.*, 2013; EVIDENTE *et al.*, 2015; ARORA *et al.*, 2016; BRUN *et al.*, 2016; KLAIC *et al.*, 2017; TODERO *et al.*, 2018a,b). Além disso, algumas pesquisas também mostram que as moléculas bioativas produzidas por estes fungos possuem atividade antibacterianas e antifúngicas (KOYAMA *et al.*, 2005; YANO *et al.*, 2007; SANTIAGO *et al.*, 2012, HUSSAIN *et al.*, 2014).

Segundo Guimarães (2011), o isolamento e melhoramento de fungos são processos longos e de elevado custo, sendo necessário a seleção e adequação de técnicas de preservação, visto que esta medida permitirá a realização de pesquisas, tanto básicas como aplicadas, a qualquer tempo. Atualmente no cenário mundial a preservação de materiais biológicos vem ganhando destaque, devido à necessidade destes para o desenvolvimento biotecnológico e científico. A utilização de métodos de preservação tem como propósito permitir a sobrevivência do microrganismo de interesse, garantir a manutenção das características originais da cultura: morfológicas, fisiológicas (esporulação e patogenicidade) e genéticas, excluindo mutações e contaminação indesejável, mesmo após longos períodos (BELOTI *et al.*, 2017).

Para a escolha do método de preservação é necessário levar em consideração alguns fatores, como as características do material biológico em estudo, assim como as vantagens e desvantagens dos métodos disponíveis, dos custos de manutenção, e da disponibilidade de equipamentos para tal procedimento (NAKASONE *et al.*, 2004). Desse modo, a determinação do melhor método de preservar fungos, com a utilização de técnicas simples e eficientes, é de grande interesse para laboratórios de microbiologia. Além de permite o desenvolvimento de estudos capazes de superar barreiras cronológicas e geográficas e, por conseguinte, elucidar as particularidades dos diferentes materiais biológicos (TERAMOTO *et al.*, 2011).

Os métodos de preservação de microrganismos mais utilizados são temperaturas baixas ou congelamento, nitrogênio líquido, repicagens periódicas ou repique contínuo, Castellani ou água destilada, liofilização e óleo mineral, além destes, outros métodos, como o de sílica-gel, fragmento de papel filtro, grãos de cereais esterilizados, solo e turfa esterilizados, também podem ser empregados (BUENO, 2006; APARECIDO *et al.*, 2012). Segundo Finatti e Aparecido (2009), os métodos mais utilizados em institutos de pesquisas, como o Instituto Biológico de Campinas, para preservação de fitopatógenos fúngicos são o método de repicagens periódicas, óleo mineral, Castellani e liofilização. Estes autores relatam que diversas pesquisas vêm mostrando bons resultados, para longos períodos de preservação.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia e viabilidade de três métodos de preservação de isolado do fungo *Phoma dimorpha* (repicagens periódicas, Castellani e fragmentos de papel-filtro), em dois períodos de avaliação, seis e doze meses após o armazenamento.

3.1.2. Material e Métodos

O ensaio foi conduzido no laboratório Biotec Factory do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

O fungo submetido aos diferentes métodos de preservação foi o *Phoma* sp. (NRRL 43879), obtido junto ao National Center for Agricultural Utilization Research – EUA (ARS) e mantido na coleção do Laboratório Biotec Factory do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. Este fungo foi identificado como *Phoma dimorpha* Aveskamp, Gruyter & Verkley, pelo método de sequenciamento da região ITS no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, São Paulo, SP.

Os ensaios foram conduzidos utilizando um delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com três tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos de três métodos de preservação: repique contínuo, fragmentos de papel filtro e água destilada estéril (método de Castellani).

A preservação dos isolados de *P. dimorpha* nos três métodos foi realizada em setembro de 2017 e as avaliações de viabilidade foram realizadas em março e outubro de 2018, aos seis e doze meses após armazenamento, respectivamente, totalizando doze meses de avaliação dos métodos de preservação.

O método de repicagens periódicas ou repique contínuo foi realizado de acordo com metodologia descrita por Dhingra e Sinclair (1995). Um disco de micélio do fungo foi repicado, para placas de Petri (Figura 4) contendo meio BDA, em seguida seladas com parafilme, e incubadas por 10 dias, a 28 °C na ausência de luz. Após o crescimento micelial as placas foram armazenadas em geladeira à temperatura de 4 a 8°C, e a cada dois meses o fungo era repicado para outras placas com meio BDA.

Para a preservação em fragmentos de papel-filtro, utilizou-se a metodologia proposta por Alfenas e Mafía (2007). Tiras de papel filtro esterilizados (2,5 x 0,7 cm), foram depositados sobre meio de cultura BDA em placas de Petri. Posteriormente, discos de micélio do fungo foram repicados para as placas visando proporcionar o crescimento do fungo sobre os fragmentos de papel. As placas foram incubadas por 10 dias, a 28 °C na ausência de luz. Após o crescimento micelial sobre os fragmentos de papel, os mesmos foram transferidos para placas

de Petri estéreis, e permaneceram em incubadora nas mesmas condições pelo período de 10 dias para a secagem das tiras de papel contendo o micélio do fungo. Posteriormente, os fragmentos de papel foram transferidos para microtubos de 2 mL do tipo Eppendorf e armazenados a -15°C. Foram armazenadas quatro tiras de papel com o fungo por frasco.

A preservação em água destilada estéril ou método de Castellani foi realizada de acordo com metodologia descrita por Alfenas e Mafia (2007). Para isso, inicialmente, frascos-ampola de vidro, com capacidade para 10 mL, foram preenchidos com 4 mL de água destilada e vedados com rolhas de borracha, em seguida autoclavados a 121 °C por 30 minutos. Posteriormente, em câmara asséptica, foram transferidos quatro discos de micélio (6 mm de diâmetro) de meio BDA provenientes de colônias em crescimento ativo do fungo *P. dimorpha* em cada frasco.

As avaliações de eficácia e viabilidade dos métodos de preservação para os isolados de *P. dimorpha* foram realizadas, em dois períodos de avaliação, aos seis e doze meses após o armazenamento, onde discos de micélio foram retirados e colocados em meio BDA para teste de eficácia e viabilidade dos métodos de preservação avaliados.

Para ambos os métodos de preservação as avaliações tiveram como base medições diárias do diâmetro das colônias, com auxílio de um paquímetro digital (Within 150 mm), em eixos ortogonais (média das duas medidas diametralmente opostas) para obter-se a média do crescimento miceliano diário, até que o tratamento testemunha atingisse os bordos da placa (MAIA *et al.*, 2011). Com base nestes dados calculou-se:

O índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM – mm dia⁻¹), foi determinado com base na fórmula descrita por Maia *et al.* (2011):

$$(1) \quad IVCM = \sum \frac{(D - D_a)}{N}$$

Onde: D= diâmetro médio atual da colônia (mm); D_a= diâmetro médio da colônia do dia anterior (mm); N= número de horas ou dias após a inoculação.

A eficácia de cada método de preservação (EMP - %), foi calculada a partir da adaptação da equação descrita por Abbott (1925), utilizando-se os dados de crescimento micelial:

$$(2) \quad EMP = (100 \times CM/60)$$

Onde: CM = Crescimento micelial médio do método de preservação; EMP = Eficácia do método de preservação.

Os dados foram submetidos aos testes de normalidade e homogeneidade dos erros, do qual foi constatado o cumprimento dos pressupostos, em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância e na presença de significância, as variáveis qualitativas tiveram suas médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro, com auxílio do programa estatístico Sisvar versão 5.1 (FERREIRA, 2014).

3.1.3. Resultados e Discussão

Os resultados da análise da variância e dos valores médios de crescimento micelial, eficácia do método de preservação (EMP) e índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) do fungo *P. dimorpha* em função dos diferentes métodos de preservação, após seis (6 MA) e doze meses de armazenamento (12MA), indicam que houve diferença significativa entre os métodos de preservação (Tabela 1). Os baixos valores de coeficiente de variação mostram que os dados observados satisfazem a premissa de normalidade.

Tabela 1 - Resumo da análise de variância e valores médios de crescimento micelial (CM - mm), eficácia do método de preservação (EMP - %) e índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) do fungo *P. dimorpha* em função do método de preservação, em seis (6 MA) e doze meses de armazenamento (12MA).

¹ FV	² GL	Quadrados médios					
		CM (mm)		EMP (%)		IVCM (mm/dia ⁻¹)	
		6MA	12MA	6MA	12MA	6MA	12MA
Método de Preservação	2	70,20*	154,93*	42,83*	430,44*	84,83*	43,21*
Erro	9	16,17	18,37	3,80	50,11	0,63	0,89
Desvio Padrão		1,98	6,55	3,30	10,92	3,93	2,93
Coeficiente de variação (%)		12,09	11,99	2,85	11,99	5,02	7,85

⁽¹⁾Fonte de variação, ⁽²⁾Grau de liberdade, *significativo a 5% e ^(NS)não significativo.

Ao analisar os diferentes métodos de preservação do fungo *P. dimorpha*, constatou-se que todos diferem entre si ($p \leq 0,05$), nos dois períodos de avaliação, aos seis e doze meses após o armazenamento. O método de preservação em fragmentos de papel-filtro foi o que proporcionou os maiores diâmetros de crescimento micelial, com valores médios superiores a 43 mm, nos dois períodos de avaliação, aos seis e doze meses após o armazenamento, diferindo estatisticamente dos demais métodos (Figura 1A, 2).

Quanto a porcentagem de eficácia dos métodos de preservação do fungo *P. dimorpha* (Figura 1B), constatou-se diferença significativa entre os métodos de preservação avaliados neste trabalho. Sendo a maior porcentagem de eficácia observada no método de preservação em fragmento de papel-filtro nos dois períodos de avaliação, com porcentagem média superior a 70 e 65, aos seis e doze meses após o armazenamento, respectivamente. Com base neste resultado confirma-se a eficácia do método de preservação em fragmento de papel-filtro para o fungo *P. dimorpha*.

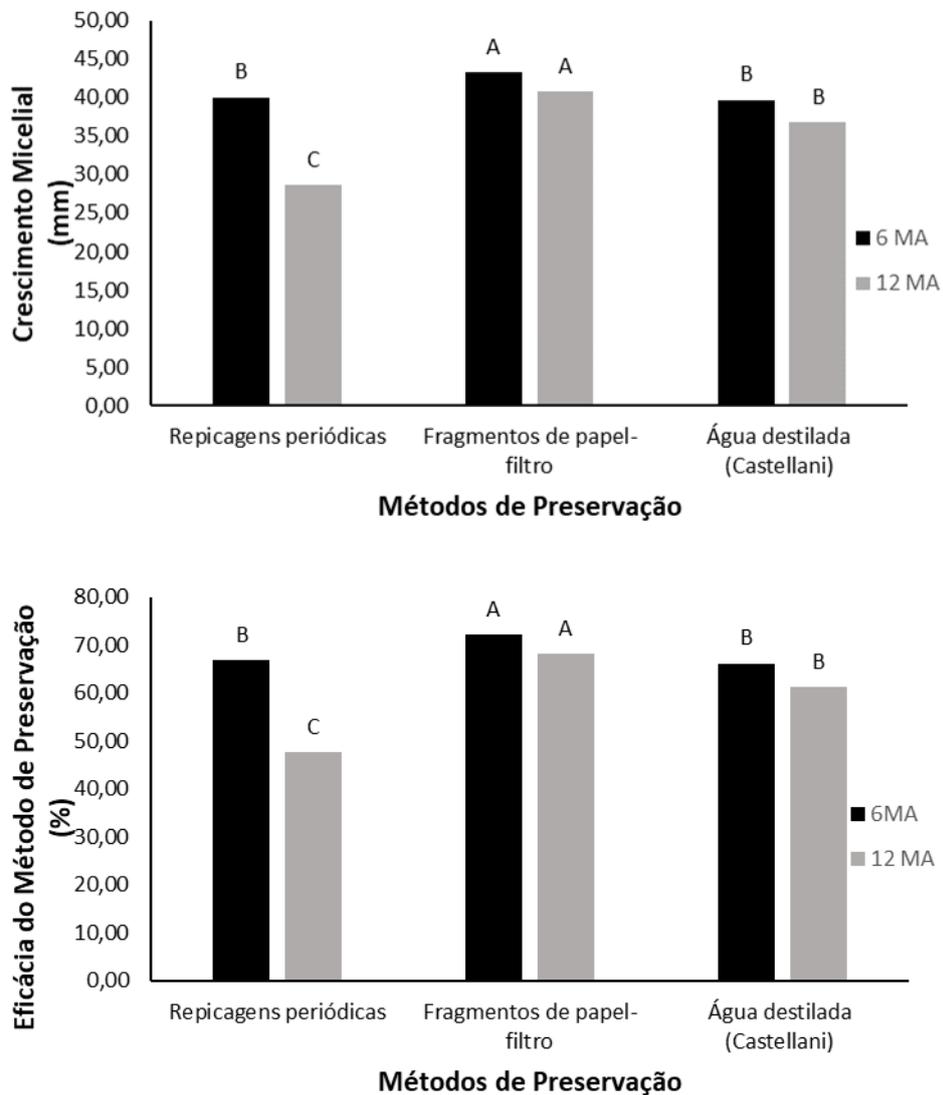


Figura 1 - Médias do crescimento micelial e porcentagem de eficácia dos métodos de preservação dos diferentes métodos de preservação do fungo *P. dimorpha*, em dois períodos de avaliação, aos seis e doze meses após o armazenamento. *Médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos neste estudo destacam que o método de fragmento de papel filtro foi o método de preservação que permitiu maior crescimento micelial, para os isolados do fungo *P. dimorpha*, seguido do repique contínuo e Castellani. No entanto, este resultado não pode ser generalizado para outros fungos, visto que, em virtude da grande biodiversidade destes microrganismos, de acordo Girão *et al.* (2004) não existe uma técnica padrão que seja capaz de preservá-los de forma adequada. Existem diversos métodos para preservação de fungos, porém para a escolha do método de manutenção mais adequado devem-se levar em consideração as vantagens e desvantagens de cada técnica disponível e principalmente as características do agente em estudo (SOLA *et al.*, 2012).

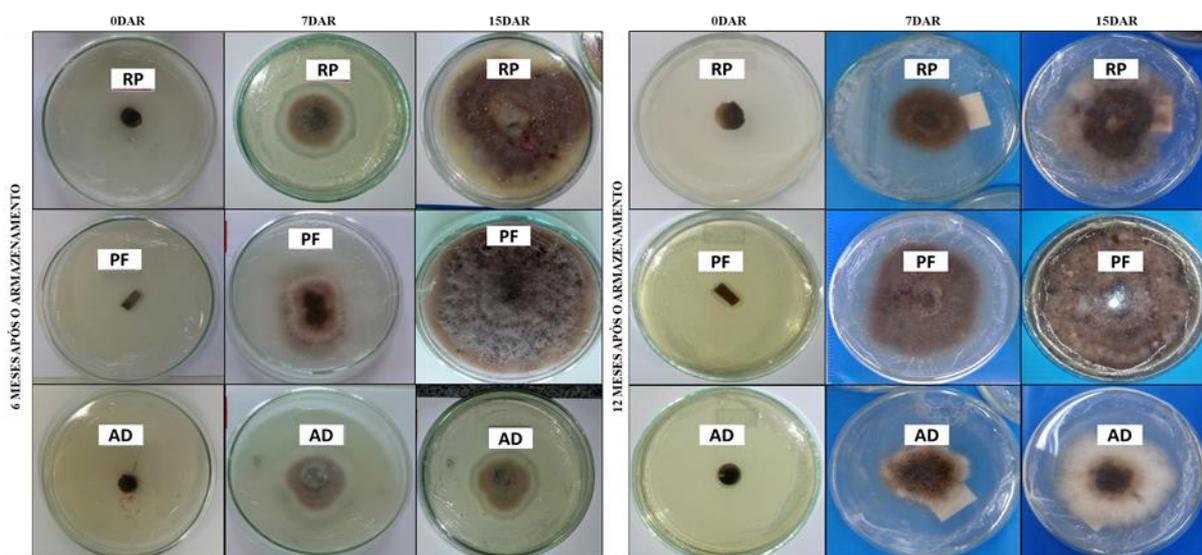


Figura 2 - Recuperação de isolados de *P. dimorpha* preservados pelos métodos de repicagens periódicas (RP), fragmentos de papel-filtro (PF) e água destilada (AD), em dois períodos de avaliação, aos seis e doze meses após o armazenamento.

A eficácia do método de preservação em fragmento de papel-filtro também foi descrita por Fong *et al.* (2000), os quais descrevem que o método de preservação em fragmento de papel-filtro se mostrou muito eficaz para a preservação de *F. oxysporum* a $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$, mantendo-se viáveis após quatro anos de armazenamento, e todas as culturas foram recuperadas sem a presença de ácaros. Neste método de preservação ocorre a remoção de água das células fúngicas, o que diminui ou suspende o metabolismo, aumentando o período de armazenamento na geladeira prolongando a longevidade das culturas (DHINGRA; SINCLAIR, 1995; FONG *et al.*, 2000).

A preservação em fragmento de papel filtro apresenta baixo custo, não necessita de equipamentos sofisticados, além de estabilidade elevada e a não ocorrência de ácaros em função de ser mantido a baixas temperaturas (ANJOS *et al.*, 2012). De acordo com estudo desenvolvido por Aparecido *et al.* (2012), isolados de *Phoma* sp. mostraram-se viáveis após preservação de dois meses, pelo método de congelamento de estruturas a -80 °C.

Com base na figura 1, os métodos de preservação repicagens periódicas e Castellani apresentaram os menores valores crescimento micelial, sendo semelhantes quanto ao crescimento micelial no primeiro período de avaliação (6MA) e diferiram no segundo aos doze meses após o armazenamento, com valores médios de crescimento micelial variando de 28 a 40 mm.

De acordo com Aparecido *et al.* (2007) comparando viabilidade de culturas fúngicas preservadas pelos métodos de Castellani e liofilização com base nos dados de crescimento micelial, constataram que o método de Castellani (água destilada) foi o mais vantajoso para manter, em laboratório, diferentes gêneros e espécies de fungos. Comparando os métodos de repicagens periódicas, método de Castellani ou água destilada e liofilização para manutenção de 35 culturas fúngicas fitopatogênicas foi possível verificar que o método de Castellani ou água destilada foi o mais adequado, por ser o mais eficiente na manutenção da viabilidade e esporulação, apresentou baixa taxa de mutações e de contaminação (PIRES *et al.*, 2012).

Passador *et al.* (2010), avaliando a manutenção da viabilidade dos *Verticillium dahliae* e *Fusarium oxysporum*, pelos métodos de Castellani (água destilada) e repicagens periódicas, constataram que em ambos os métodos o fungo *V. dahliae* permaneceu viável por seis anos. Avaliando a eficiência de três métodos de preservação de isolados, durante seis meses de armazenamento Teramoto *et al.*, (2011), constataram que o método de repicagem periódica foi o método de preservação que permitiu maior crescimento micelial, para todos os isolados, seguido do Castellani e do óleo mineral.

A longo prazo as culturas mantidas por meio de repicagens periódicas podem apresentar contaminação por ácaros ou outros microrganismos, além de ocorrer a secagem do meio. Uma outra desvantagem é que a morfologia e fisiologia de um fungo cultivado podem mudar ao longo do tempo, como a capacidade de esporular ou de infectar um hospedeiro, podem ser perdidas após repiques contínuos por longos períodos (DHINGRA; SINCLAIR, 1995; NAKASONE *et al.*, 2004).

De acordo com Green (2008) e Costa *et al.* (2009), ao longo dos anos vários estudos vêm sendo realizados com o objetivo de desenvolver e aplicar protocolos, no entanto, a grande

maioria dos métodos não se aplica a todos os microrganismos, devido as peculiaridades do microrganismo de interesse e também às características das técnicas (equipamentos e materiais). Estes autores alertam para a necessidade da conjunção de dois ou mais métodos, a fim de se garantir a melhor recuperação dos microrganismos.

O índice de velocidade média de crescimento micelial (IVCM) do fungo *P. dimorpha* sofreu influência dos métodos de preservação, nos dois períodos de avaliação, aos seis e doze meses após o armazenamento (Figura 3). O maior IVCM foi observado no método de preservação em fragmento de papel-filtro, diferindo estatisticamente dos demais métodos, nos dois períodos de avaliação, com médias de 20,39 e 15,23 mm/dia⁻¹, aos seis e doze meses após o armazenamento, respectivamente. O método de preservação em fragmento de papel filtro foi o que obteve o maior índice, 21,92 mm dia⁻¹ (Figura 3).

Qiangqiang *et al.* (1998) compararam a viabilidade de setenta e oito isolados após doze anos, utilizando os métodos de liofilização e Castellani na preservação destes isolados, obtendo como viáveis 89,7% dos isolados preservados pelo método de Castellani e 87,2% dos isolados preservados pelo método de liofilização.

De acordo com Guimarães (2011), o repique contínuo, também chamado de sub-cultura ou repicagem periódica, é uma das técnicas de conservação mais antigas e amplamente utilizada, por ser um método simples e baixo custo, que permite a manutenção da grande maioria das espécies de fúngicas. No entanto, este método é uma boa opção para pequenas coleções de culturas em constante utilização por períodos curtos (menos de 1 ano).

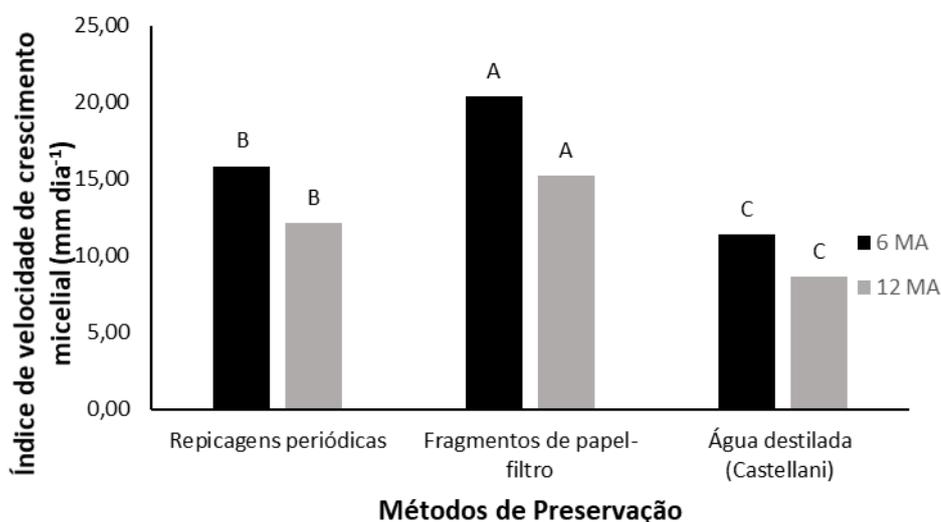


Figura 3 - Médias do índice de velocidade de crescimento micelial do fungo *P. dimorpha* nos diferentes métodos de preservação, em seis e doze meses de armazenamento. *Médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.1.4. Conclusões

Houve variabilidade entre os métodos de preservação do isolado do fungo *P. dimorpha* para o crescimento micelial, eficácia do método e índice de velocidade do crescimento micelial, nos dois períodos de avaliação, após seis e doze meses de armazenamento.

O método de preservação em fragmento de papel filtro mostrou-se como o mais eficaz na preservação do isolado do fungo *P. dimorpha* nos dois períodos de avaliação, após seis e doze meses de armazenamento, sendo ideal para obtenção do maior crescimento micelial, eficácia do método e índice de velocidade do crescimento micelial.

3.1.5. Referências

- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v.18, n.2, p. 265-267, 1925. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2007. 516 p.
- ANJOS, T. V.; TEBALDI, N. D.; FAGIAN, C. C. Coleção preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas. **Horizonte Científico**, v.6, n.1, p. 1-24, 2012.
- APARECIDO, C. C.; HUANG, C. T. M.; PASSADOR, M. M.; FINATTI, D.; FIGUEIREDO, M. B. Divulgação técnica: avaliação da viabilidade de culturas fúngicas preservadas pelos métodos de Castellani (água destilada) e liofilização. **Biológico**, v.69, n.1, p. 5-8, 2007.
- APARECIDO, C. C.; PIRES, G. C. C.; FINATTI, D.; CAMILO, C. M. Preservação de micro-organismos a -80° C. **Biológico**, v.74, n.1, p. 23-29, 2012.
- ARORA, P.; WANI, Z. A.; NALLI, Y.; ALI, A.; RIYAZ-UL-HASSAN, S. Antimicrobial potential of Thiodiketopiperazine derivatives produced by *Phoma* sp., an endophyte of *Glycyrrhiza Glabra Linn*. **Microbial Ecology**, v.72, n.4, p. 802-812, 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-016-0805-x>
- BELOTI, I. F.; JULIATTI, B. C. M.; JULIATTI, F. C. Evaluation of the gelatin technique for the preservation of phytopathogenic fungi. **Bioscience Journal**, v.33, n.4, p. 923-932, 2017. <http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v33n4a2017-37116>
- BRUN, T.; RABUSKE J. E.; TODERO, I.; ALMEIDA, T. C.; JUNIOR J. J. D.; ARIOTTI, G.; CONFORTIN, T.; ARNEMANN, J. A.; KUHN, R. C.; GUEDES, J. V. C.; MAZUTTI, M. A. Production of bioherbicide by *Phoma* sp. in a stirred-tank bioreactor. **3 Biotech**, v.6, n.2, p. 230-239, 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-016-0557-9>

- CAMEOTRA, S. S. Preservation of microorganisms as deposits for patent application. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.353, n.4, p. 849-850, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.069>
- CIMMINO, A.; ANDOLFI, A.; ZONNO, M.; AVOLIO, F.; SANTINI, A.; TUZI, A.; BERESTETSKYI, A.; VURRO M.; EVIDENTE, A. Chenopodolans A–C: phytotoxic furofurans produced by *Phoma Chenopodiicola*, a fungal pathogen of *Chenopodium Album*. **Phytochemistry**, v.96, n.1, p. 208-213, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.10.007>
- COSTA, E. C.; TEIXEIRA, F. F. S.; DANTAS, T. V. M.; MELO, V. S. P.; ARAÚJO, S. A. C.; ROLIM, B. N. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. **Ciência Animal**, v.19, n.2, p. 111-122, 2009.
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. Long-term storage of plant pathogens. In: DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. p. 61-81. <https://doi.org/10.1201/9781315138138-3>
- EVIDENTE, M.; CIMMINO, A.; ZONNO, M. C.; MAIS, M.; BERESTETSKI, A.; SANTORO, E.; SUPERCHI, S.; VURRO, M.; EVIDENTE, A. Phytotoxins produced by *Phoma Chenopodiicola*, a fungal pathogen of *Chenopodium Album*. **Phytochemistry**, v.117, n.1, p. 482-488, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.07.008>
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência & Agrotecnologia**, v.38, n.2, p. 109-112, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>
- FINATTI, D.; APARECIDO, C. C. Caracterização fisiológica e comparação de diferentes métodos na preservação, em laboratório, de isolados do gênero *Verticillium*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, n.4, p. 715-720, 2009.
- FONG, Y. K.; ANUAR, S.; LIM, H. P.; THAM, F. Y.; SANDERSON, F. R. A modified filter paper technique for long-term preservation of some fungal cultures. **Mycologist**, v.4, n.3, p. 127-130, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0269915X\(00\)80090-7](https://doi.org/10.1016/S0269915X(00)80090-7)
- GIRÃO, M. D. PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO R. A.; MONTEIRO A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Viabilidade de cepas de *Malassezia Pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.37, n.3, p. 229-233, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822004000300007>
- GREEN, L. H. **Practical handbook of microbiology**. 2. ed. London: CRC, 2008.

GUIMARÃES, L. C. **Métodos de preservação de fungos potencialmente toxicogênicos**. 2011. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2011.

HINZ, H. L.; SCHWARZLÄNDER, M.; GASSMANN, A.; BOURCHIER, R. S. Successes we may not have had: a retrospective analysis of selected weed biological control agents in the United States. **Invasive Plant Science and Management**, v.7, n.4, p. 565-579, 2014. <https://doi.org/10.1614/IPSM-D-13-00095.1>

HUSSAIN, H.; KOCK, I.; AL-HARRASI, A.; AL-RAWAHI, A.; ABBAS, G.; GREEN, I. R.; SHAH, A.; BADSHAH, A.; SALEEM, M.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; KROHN, K. Antimicrobial chemical constituents from endophytic fungus *Phoma* sp. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.7, n.9, p. 699-702, 2014. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60119-X](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60119-X)

KIM, E. L.; LI, J. L.; DANG, H. T.; HONG, J.; LEE, C. O.; KIM, D. K.; YOON, W. D.; KIM, E.; LIU, Y.; JUNG, J. H. Cytotoxic cytochalasins from the endozoic fungus *Phoma* sp. of the giant jellyfish *Nemopilema Nomurai*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.22, n.9, p. 5752-5752, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.03.058>

KLAIC, R.; SALLET, D.; FOLETO, E. L.; JACQUES, R. J. S.; GUEDES, J. V. C.; KUHN, R. C.; MAZUTTI, M. A. Optimization of solid-state fermentation for bioherbicide production by *Phoma* sp. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.34, n.02, p. 377-384, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20170342s20150613>

KOYAMA, N.; NAGAIRO, T.; YAMAGUCHI, Y.; OHSHIRO, T.; MASUMA, R.; TOMODA, H.; OMURA, S. Spylidone, a novel inhibitor of lipid droplet accumulation in mouse macrophages produced by *Phoma* sp. FKI-1840. **Journal of Antibiotics**, v.58, n.5, p. 338-345, 2005. <http://dx.doi.org/10.1038/ja.2005.42>

MAIA, F. G. M.; ARMESTO, C.; ZANCAN, W. L. A.; MAIA, J. B.; ABREU, M. S. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de mangueira com sintomas de antracnose. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 2, p. 205-210, 2011.

NAKASONE, K. K.; PETERSON, A. W.; JONG, S. Preservation and distribution of fungal cultures. In: MUELLER, G. M.; BILLS, G. F.; FOSTER, M. S. **Biodiversity of fungi, inventory and monitoring methods**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004. p. 37-47. <https://doi.org/10.1016/B978-012509551-8/50006-4>

PASSADOR, M. M.; PIRES, G. C. C.; FINATTI, D.; APARECIDO, C. C.; FIGUEIREDO, M. B. Manutenção da viabilidade e patogenicidade de culturas mantidas na micoteca “Mário Barreto Figueiredo”. **Biológico**, v.72, n.1, p. 51-55, 2010.

PIRES, G. C. C.; APARECIDO, C. C.; FINATTI, D. Preservação em laboratório de fungos filamentosos por longos períodos de tempo. **Biológico**, v.47, n.1, p. 9-16, 2012.

QIANGQIANG, Z.; JIAJUN, W; LI, L. Storage of fungi using sterile distilled water or lyophilization: comparison after 12 years. **Mycoses**, v.41, n.5-6, p. 255-257, 1998.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.1998.tb00334.x>

RAI, M. DESHMUKH, P.; GADE, A.; INGLE, A.; KÖVICS, G. J.; IRINYI, L. *Phoma Saccardo*: distribution, secondary metabolite production and biotechnological applications. **Critical Reviews in Microbiology**, v.35, n.3, p. 182-196, 2009.

<http://dx.doi.org/10.1080/10408410902975992>

SANTIAGO, C.; CHRIS FITCHETT, C.; MUNRO, M. H. G.; JALIL, J.; SANTHANAM, J. Cytotoxic and antifungal activities of 5-Hydroxyramulosin, a compound produced by an endophytic fungus isolated from *Cinnamomum Mollisimum*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.12, n.10, p. 1-6, 2012.

<http://dx.doi.org/10.1155/2012/689310>

SOLA, M. C.; OLIVEIRA, A. P.; FEISTEL, J. C.; REZENDE, C. S. M. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.14, p. 1398-1418, 2012.

TERAMOTO, A.; MARTINS, M. C.; CUNHA, M. G. Avaliação de métodos para preservação de isolados de *Corynespora Cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.41, n.2, p. 296-298, 2011.

<https://doi.org/10.5216/pat.v41i2.12571>

TODERO, I.; CONFORTIN, T. C.; LUFT, L.; BRUN, T.; UGALDE, G. A.; ALMEITA, T. C.; ARNEMANN, J. A.; ZABOT, G. L.; MAZUTTI, M. A. Formulation of a bioherbicide with metabolites from *Phoma* sp. **Scientia Horticulturae**, v.241, n.1, p. 285-292, 2018a.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.07.009>

TODERO, I.; CONFORTIN, T. C.; SOARES, J. F.; BRUN, T.; LUFT, L.; RABUSKE, J. E.; KUHN, R. C.; TRES, M. V.; ZABOT, G. L.; MAZUTTI, M. A. Concentration of metabolites from *Phoma* sp. using microfiltration membrane for increasing bioherbicidal activity. **Environmental Technology**, v.22, n.1, p. 1-9. 2018b.

<https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1441330>

VILLAVERDE, J. J.; MORÁN, B. S.; SANDÍN-ESPAÑA, P.; ALONSO-PRADOS J. L.; LÓPEZ-GOTI, C. Biopesticides in the framework of the european pesticide regulation (EC) No. 1107/2009. **Pest Management Science**, v.70, n.1, p. 2-5, 2014. <https://doi.org/10.1002/ps.3663>

WIJERATNE, E. M. K.; HE, H.; FRANZBLAU, S. G.; HOFFMAN, A. M.; GUNATILAKA, A. A. L. Phomapyrrolidones A-C, Antitubercular Alkaloids from the Endophytic Fungus *Phoma* sp. NRRL 46751. **Journal of Natural Products**, v.76, n.10, p. 1860-1865, 2013. <http://dx.doi.org/10.1021/np400391p>

YANO, T.; AOYAGI, A.; KOZUMA, S.; KAWAMURA, Y.; TANAKA, I.; SUZUKI, Y.; TAKAMATSU, Y.; TAKATSU, T.; INUKAI, M. Pleofungins, novel inositol phosphorylceramide synthase inhibitors from *Phoma* sp. SANK 13899. **Journal of Antibiotics**, v.60, n.2, p. 136-142, 2007. <http://dx.doi.org/10.1038/ja.2007.13>

CAPÍTULO 4 – QUEBRA DE DORMÊNCIA DE PLANTAS DANINHAS

Neste Capítulo estão apresentados dois artigos que tiveram um objetivo comum: determinar o método mais eficiente para superar a dormência das sementes das plantas daninhas capim-arroz (*Echinochloa* spp.), caruru-roxo (*Amaranthus cruentus*), picão-preto (*Bidens pilosa*) e mata-pasto (*Senna obtusifolia*), que posteriormente foram submetidas a aplicação do caldo concentrado e formulado do fungo *Phoma dimorpha*, como uma medida alternativa de controle. Este capítulo foi dividido em dois artigos em função das características biométricas (comprimento, largura e espessura) das sementes das plantas daninhas avaliadas, com o intuito de padronizar os métodos para superação de dormência empregados nestas sementes em cada artigo.

4.1. ARTIGO IV: SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA DE SEMENTES DE *Senna obtusifolia*

O presente artigo foi submetido para publicação em periódico científico da área.

Resumo: Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da utilização de diferentes métodos para superação de dormência em sementes de *Senna obtusifolia* (L.) H. S. Irwin & Barneby. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e oito repetições de 25 sementes. Os tratamentos para superação da dormência foram compostos por: escarificação mecânica, embebição em água e imersão em água quente e testemunha. A avaliação foi realizada por meio da determinação do teor de água, germinação, velocidade de germinação e índice de velocidade de germinação. Observou-se diferença significativa entre os tratamentos para todos os parâmetros avaliados, sendo o tratamento escarificação mecânica o mais eficaz para promoção da germinação. Conclui-se que a escarificação mecânica das sementes com lixa de papel nº 120 favoreceu a germinação e foi o tratamento mais eficiente para superar a dormência da *S. obtusifolia*.

Palavras-chave: Fedegoso, Mata-pasto, Germinação, Escarificação mecânica, Água quente.

Abstract: The objective of this work was to evaluate the efficiency of the use of different methods to overcome dormancy in *Senna obtusifolia* (L.) H. Irwin & Barneby seeds. A completely randomized design with four treatments and eight replications of 25 seeds. The treatments to overcome dormancy were composed of: mechanical scarification, imbibition in water and immersion in hot water and control. There was a significant difference between the treatments for all evaluated parameters, where the mechanical scarification treatment was the most effective for the promotion of germination. It is concluded that the mechanical scarification of the seeds with paper sanding No. 120 favored germination and was the most efficient treatment to overcome the dormancy of *S. obtusifolia*.

Keywords: Fedegoso, Mata-pasto, Germination, Mechanical scarification, Hot water.

4.1.1. Introdução

A espécie *Senna occidentalis* (L.) H. S. Irwin & Barneby é conhecida popularmente como mata-pasto, fedegoso, pau-verde ou mamangá. É uma planta subarborescente anual da família Fabaceae. Esta espécie pode atingir uma altura de 70 cm a 160 cm, apresenta folhas alternas compostas com folíolos de formato oval a lanceolado (afinando da base para a ponta), com uma glândula característica perto da base do pecíolo, suas flores são amarelas e vagens de coloração marrom quando maduras, apresentando cerca de 40 sementes (HENTY; PRITCHARD, 1975; LORENZI, 2000).

Esta espécie desenvolve-se espontaneamente nos biomas brasileiros da Amazônia, Caatinga, Pantanal e Mata Atlântica, incluindo a Floresta Ombrófila do estado do Paraná. Sendo comumente encontrada em áreas com lavouras anuais, perenes e pastagens, ocupadas também áreas com fruticultura, terrenos baldios e bordas de fragmentos florestais (SOUZA; BORTOLUZZI, 2012). Quanto à reprodução e crescimento, o *S. occidentalis* floresce e produz frutos ao longo do ano ou de acordo com as estações, isso dependerá das condições climáticas da região (HENTY; PRITCHARD, 1975).

O mata-pasto (*S. occidentalis*) possui alto potencial produtivo, produzindo elevada quantidade de frutos com sementes de fácil coleta nos diversos ecossistemas de ocorrência. No entanto, ao serem liberadas no solo, parte destas sementes não germinam, embora viáveis e em condições ambientais adequadas, permitindo que estas permaneçam no solo e que sua germinação ocorra ao longo do tempo (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012; TOPANOTTI et al., 2014).

De acordo com Vivian et al. (2008), a alta produção de sementes e elevada taxa de sementes dormentes são os principais fatores de sobrevivência das plantas daninhas em ambientes constantemente perturbados, o que contribui para a perpetuação de espécies interferentes nos cultivos agrícolas. Realizar o controle das plantas daninhas é uma prática extremamente importante no manejo de inúmeras plantas cultivadas. Porém, controlar todas as plantas daninhas presentes em um campo não é suficiente para eliminar por completo estas espécies invasoras, visto que a dormência das sementes é o principal mecanismo de sobrevivência em ambientes constantemente infestados (SOUZA FILHO, et al., 1998; CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

As sementes das espécies pertencentes a família Fabaceae, possuem dormência em função da impermeabilidade do tegumento a água, chamada de dormência tegumentar. Destacando-se dentro do gênero *Senna* algumas espécies que apresentam sementes dormentes, dentre elas, tem-se as espécies *S. siamea* (Lam.), *S. spectabilis* (DC) e *Senna occidentalis* (L.), o que torna temporariamente difícil a germinação, prolongando a viabilidade e germinação ao longo do tempo, ocorrendo apenas em períodos com condições adequadas para a sobrevivência das plântulas (SOUZA et al., 2008; AVELINO et al., 2012).

Silva e colaboradores (2011) destacam que para a ocorrência da germinação de sementes de espécies que apresentam dormência tegumentar é necessário utilizar métodos que promovam o rompimento do tegumento. Dentre os métodos de superação de dormência, os mais utilizados têm sido a escarificação mecânica, que consiste no atrito das sementes contra uma superfície abrasiva, tais como lixas ou a raspagem de uma pequena parte do tegumento, e a escarificação química, na qual se submerge as sementes em soluções como de ácido sulfúrico, por períodos de tempo variados com a espécie (SILVA et al., 2012).

A dormência em sementes de espécies de plantas daninhas dificulta a realização de pesquisas relacionadas a ecofisiologia da germinação e direcionadas ao manejo e ao controle destas espécies em áreas agrícolas. Desse modo, estudos para a adequação e definição de métodos eficazes de superação da dormência vão promover uniformidade e rapidez na germinação, permitindo a obtenção de resultados consistentes (ERASMO et al., 2008).

As informações sobre o manejo e análise de sementes de plantas daninhas ainda são inconsistentes, portanto, o conhecimento do comportamento da germinação destas espécies, são de grande importância para fornecer dados que permitam determinar características físicas e fisiológicas, além de estabelecer técnicas adequadas de manejo e controle (VIVIAN et al., 2008; TOPANOTTI et al., 2014). Desse modo, devido à ausência de informações sobre o manejo e

análise de sementes desta espécie, o objetivo deste estudo foi avaliar diferentes métodos de superação da dormência de sementes de *Senna obtusifolia* (L.) H. S. Irwin & Barneby.

4.1.2. Material e Métodos

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Bioprocessos do Departamento de Engenharia Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS.

As sementes de *Senna obtusifolia* (L.) H. S. Irwin & Barneby foram coletadas em novembro de 2017 em uma área de pastagem localizada no município de Cuité de Mamanguape, mesorregião da mata paraibana do estado da Paraíba, a 75 m de altitude, a latitude 06° 55' 15.4" S e longitude 35° 17' 12.8" W. Após a coleta as sementes foram transportadas até o Laboratório de Bioprocessos da UFSM, onde as sementes foram beneficiadas e selecionadas manualmente, descartando-se as que apresentavam injúrias ou estavam deformadas.

Os ensaios foram conduzidos utilizando um delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com quatro tratamentos e oito repetições com 25 sementes, totalizando 200 sementes por tratamento. Constituído por um tratamento testemunha (sementes não submetidas a nenhum tratamento de superação da dormência) e três tratamentos de superação de dormência, descritos abaixo:

Escarificação mecânica: Para o método de escarificação mecânica, utilizou-se uma lixa de papel nº 120, onde 200 sementes foram escarificadas na região oposta à micrópila até o início da exposição do endosperma, conforme método citado por Bortolini et al. (2011).

Embebição em água: Para o método de embebição em água, 200 sementes foram depositadas em um béquer, ficando imersas em água destilada, mantidas em temperatura ambiente de 25 °C por um período de embebição de 48 horas, seguido método descrito por Adegá et al. (2003). Após o período de embebição, as mesmassementes foram submetidas às avaliações descritas abaixo.

Imersão em água quente (96 °C): O método de imersão em água quente constituiu-se pela deposição de água destilada em um béquer, que foi aquecido até atingir a temperatura de 96 °C. Após atingir a temperatura de trabalho o béquer foi retirado do aquecimento e, então, as sementes foram imersas no recipiente, onde permaneceram embebidas por 18 horas, de acordo com metodologia descrita por Topanotti et al. (2014).

Após a aplicação dos tratamentos de superação da dormência as sementes foram tratadas com solução de hipoclorito de sódio a 2% por 3 minutos e em seguida submetidas ao teste de

germinação, segundo método citado por Bortolini et al. (2011). Os efeitos dos tratamentos para superação de dormência foram estimados mediante as seguintes avaliações:

Porcentagem de germinação: foi realizado o teste de germinação em oito repetições com 25 sementes por repetição (método de superação da dormência), estas foram semeadas em caixas plásticas transparentes, com tampa, tipo gerbox, com dimensões de 11 x 11 x 4 cm, sobre duas folhas de papel filtro (Germitest®) umedecidas na proporção de 2,5 vezes a massa do papel seco, com os diferentes tratamentos. As caixas foram mantidas em câmara de germinação do tipo Biochemical Oxygen Demand (BOD) com fotoperíodo de 12/12 horas de luz/escuro, a uma temperatura de 25 °C, segundo os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

A contagem do número de sementes germinadas foi realizada diariamente até atingir a estabilização, usando como critério a protrusão da radícula mínima de 2 mm de comprimento com características de plantas normais (FERREIRA; AQUILA, 2000), os resultados foram expressos em porcentagem de sementes germinadas (BRASIL, 2009).

Os dados provenientes do teste de germinação além de permitir a estimar a porcentagem de sementes germinadas em cada método de superação de dormência, também foram utilizados para determinar as seguintes variáveis:

Índice de velocidade de germinação (IVG): O IVG foi realizado juntamente com o teste de germinação, mediante a contagem das sementes germinadas foi realizada diariamente após a instalação dos tratamentos, com base na equação desenvolvida por Maguire (1962):

$$(1) \quad IVG = \left(\frac{N_1}{D_1}\right) + \left(\frac{N_2}{D_2}\right) + \dots + \left(\frac{N_n}{D_n}\right)$$

Sendo:

IVG = índice de velocidade de germinação de sementes;

N = número de plântulas computadas no dia da contagem;

D = número de dias após a semeadura em que foi realizada a contagem.

Velocidade de Germinação (VG - dia⁻¹): A determinação do VG foi realizada com base nos dados diários do teste de germinação, com base na equação desenvolvida por Borella et al. (2011):

$$(2) \quad VG = \Sigma \left(\frac{G_t}{D}\right) / \Sigma \left(\frac{G_c}{D}\right) \times 100$$

Sendo:

Gt = número de sementes germinadas diariamente do tratamento;

Gc = número de sementes germinadas diariamente do controle;
D = número de dias correspondente.

Comprimento de parte aérea e de raiz primária de plântulas: A medição do comprimento de parte aérea e de raiz primária das plântulas foi realizada ao final do teste de germinação, com um paquímetro digital (Within 300 mm). Para o comprimento da parte aérea foi considerada a distância entre a inserção da porção basal da raiz primária ao ápice da parte aérea, já para o comprimento da raiz primária considerou-se a distância entre a parte apical e basal. Os resultados foram expressos em milímetros (mm) por plântula (NAKAGAWA, 1999).

Massa fresca total de plântulas: A massa fresca de plântulas foi obtida a partir pesagem de todas as plântulas, obtidas ao final do teste de germinação de todas as repetições de cada tratamento, em balança analítica (A 42207c – Bel Engineering) com precisão de 0,0001 g, os resultados foram expressos em gramas por plântula (SILVA et al., 2016).

Massa seca total de plântulas: A massa seca total de plântulas foi obtida a partir da massa de todas as plântulas, obtidas ao final do teste de germinação de todas as repetições de cada tratamento. As plântulas foram acondicionadas em sacos de papel pardo do tipo Kraft devidamente identificados e submetidas à secagem em estufa de ventilação forçada a temperatura de 70 °C, até massa constante. Os resultados foram expressos em gramas por plântula (SILVA et al., 2016).

Os resultados foram submetidos aos testes de normalidade e homogeneidade dos erros, em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro ($p \leq 0,05$), utilizando o programa estatístico SISVAR versão 5.1 (FERREIRA, 2014).

4.1.3. Resultados

Observou-se que ocorreu germinação em todos os tratamentos de superação de dormência, sendo constatada diferença significativa entre os tratamentos. O melhor resultado de germinação ocorreu para o tratamento em que se empregou o método de superação de dormência de escarificação mecânica, apresentando 99 % de sementes germinadas (Tabela 1), indicando que as sementes de *S. obtusifolia* apresentam dormência tegumentar.

Tabela 1 - Porcentagem média de germinação (PG), eficácia do tratamento (ET), velocidade média de germinação (VG) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *S. obtusifolia* (L.) H. S. Irwin & Barneby após os diferentes métodos de superação de dormência, no final de 8 dias de avaliação.

Tratamentos	PG (%)	ET (%)	VG (sementes.dias ⁻¹)	IVG
Testemunha	4,00 ± 1,85D	0,00	0,06 ± 0,01C	0,81 ± 0,34C
Escarificação mecânica	99,00 ± 1,51A	95,96	1,77 ± 0,78A	21,10 ± 3,80A
Embebição em água	8,88 ± 1,46C	54,93	0,12 ± 0,05B	1,45 ± 0,46C
Imersão em água quente a 96 °C	52,00 ± 4,41B	92,31	1,01 ± 0,44B	18,04 ± 1,72B
DMS	3,57	5,75	9,29	6,59
CV (%)	6,37	7,11	5,17	11,71

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Este resultado também pode ser observado na Figura 1, onde no tratamento com escarificação mecânica (Figura 1 – T2-A), a germinação de *S. obtusifolia* foi visivelmente superior aos demais métodos de superação de dormência. Observou-se também que as plântulas desenvolveram-se saudáveis, sem a presença de necrose, escurecimento, encurvamento ou engrossamento da raiz, e nem anomalias no epicótilo, o que permitiu observar também a zona pilífera e ramificações da raiz (Figura 1 – T2-B).

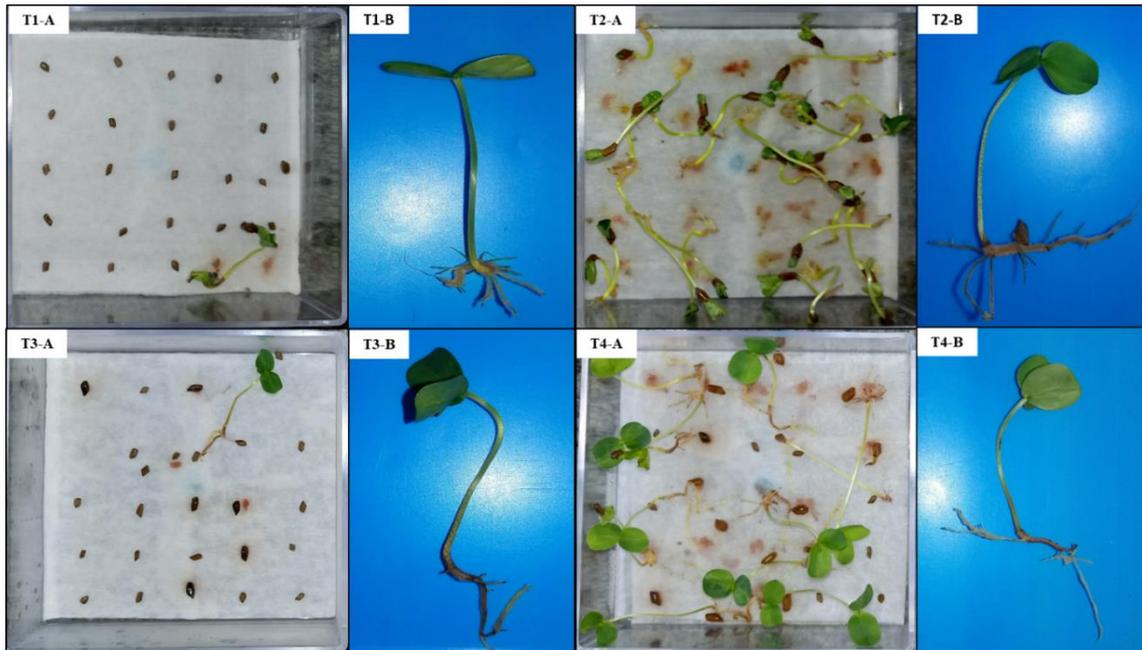


Figura 1 - Teste de germinação de *S. obtusifolia* (L.) H. S. Irwin & Barneby submetidas a aplicação de diferentes métodos de superação de dormência: T1) Tratamento testemunha; T2) Escarificação mecânica; T3) Embebição em água; T4) Imersão em água quente a 96 °C; A) Teste de germinação; B) Detalhe da parte aérea e radícula.

Analisando-se os parâmetros comprimento de parte aérea e comprimento de raiz primária da plântula, constatou-se efeito dos tratamentos sobre estas características (Tabela 2). O tratamento em que se empregou o método de superação de dormência de escarificação mecânica apresentou maior média para o comprimento da parte aérea e da raiz primária, com média de 43,95 e 28,09 mm, respectivamente, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos em ambas as características.

Tabela 2 - Comprimento médio de parte aérea (CPA) e de raiz primária (CRP) de plântulas provenientes do teste de germinação de sementes de *S. obtusifolia* (L.) H. S. Irwin & Barneby, submetidas a diferentes métodos de superação de dormência, no período de 8 dias de avaliação.

Tratamentos	CPA (mm)	CRP (mm)
Testemunha	1,25 ± 8,02C	0,54 ± 5,97C
Escarificação mecânica	43,95 ± 8,66A	28,09 ± 5,27A
Embebição em água	1,80 ± 7,19C	1,32 ± 0,39C
Imersão em água quente a 96 °C	20,03 ± 8,13B	14,64 ± 5,22B
DMS	4,45	3,18
CV (%)	17,75	18,28

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Analisando-se os parâmetros massa fresca total e massa seca total de plântulas (MF e MS), constatou-se efeito dos tratamentos sobre estas características (Tabela 3). O tratamento com escarificação mecânica com lixa de papel nº 120 apresentou maior massa fresca e seca de plântulas, diferindo dos demais tratamentos, com médias de 1,97 e 0,37 g, respectivamente, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos em ambas as características.

Tabela 3 - Valores médios de massa fresca total (MF) e massa seca total (MS) de plântulas provenientes do teste de germinação de sementes de *S. obtusifolia* (L.) H. S. Irwin & Barneby, submetidas a diferentes métodos de superação de dormência.

Tratamentos	MF (g)	MS (g)
Testemunha	0,15 ± 0,04 C	0,03 ± 0,01C
Escarificação mecânica	1,97 ± 0,10A	0,37 ± 0,03A
Embebição em água	0,16 ± 0,01C	0,04 ± 0,01C
Imersão em água quente a 96 °C	0,72 ± 0,05B	0,14 ± 0,02B
DMS	0,08	0,02
CV (%)	8,27	12,93

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.1.4. Discussão

A escarificação mecânica foi a mais eficiente na superação da dormência, apresentando porcentagem de germinação superior a 95 %, indicando que as sementes de *S. obtusifolia* apresentam dormência tegumentar. Segundo Avelino et al. (2012), o tipo de dormência mais comum entre espécies da família Fabaceae é a tegumentar. Estes mesmos autores relatam que este tipo de dormência está relacionado com a impermeabilidade do tegumento à água e ao oxigênio e com a resistência mecânica do tegumento ao crescimento do embrião, inibindo desse modo a germinação das sementes.

De acordo com Vivian et al. (2008) há dormência presente em sementes de diversas espécies de plantas, dentre elas as plantas daninhas. A dormência tegumentar, é um tipo de dormência imposta pelo tegumento, este é o mais comum dos tipos de dormência, em que os tecidos que envolvem as sementes exercem um impedimento que não pode ser superado.

Resultados semelhantes que evidenciam a eficiência do método de escarificação mecânica para superação de dormência também foram descritos por Zucareli et al. (2010), que ao compararem a escarificação mecânica e química com ácido sulfúrico para quebra de dormência de sementes de *Dioclea violacea*, constataram que o método mais eficiente foi o de escarificação mecânica. Porém resultados diferentes foram obtidos por Bandeira et al. (2018), que ao avaliarem o melhor método para superação da dormência, sobre a germinação de *S. obtusifolia*, identificaram que o método de escarificação mecânica com lixa foi um dos menos eficazes na superação de dormência das sementes, com 31 % de germinação.

De acordo com Zucareli et al. (2010) a escarificação mecânica é o método mais seguro e economicamente viável. Um outro fator negativo a ser considerado em relação a escarificação ácida de sementes segundo Rocha et al. (2011), está relacionado a liberação de açúcares resultantes da degradação da celulose, o que ocasiona maior disponibilidade de substrato para o desenvolvimento de fungos. Cangussu et al. (2018) ao avaliarem as características biométricas e a eficiência de tratamentos utilizando escarificação mecânica e imersão em água a diferentes temperaturas para quebrar a dormência de sementes de surucucu (*Piptadenia viridiflora* (Kunth) Benth), constataram que a escarificação mecânica com lixa apresentou maior porcentagem de germinação.

Freire et al. (2016), ao avaliarem a eficiência de diferentes métodos de superação de dormência em sementes de *Albizia pedicellaris*, concluíram que para o método mais eficiente para a quebra de dormência destas sementes foi a escarificação, visto que apresentou 95 % de germinação. No entanto, Pereira et al. (2016) destacaram que pode ser difícil realizar este tratamento de escarificação mecânica para um grande número de sementes. Por outro lado,

estudos desenvolvidos por Leal & Biondi (2007), avaliando a eficiência da água quente na superação da dormência de sementes de diferentes espécies, constataram melhora na germinação.

Os resultados de velocidade de germinação das sementes de *S. obtusifolia* (L.) H. S. Irwin & Barneby encontrados neste trabalho, foram semelhantes aos observados por Bortolini et al. (2011), que ao avaliarem diferentes métodos para a superação da dormência de sementes de *Gleditschia amorphoides* Taub., constataram maior VG para o tratamento com escarificação mecânica, sendo 0,46 e 0,47 sementes/dias⁻¹.

O IVG observado neste estudo mostrou que a escarificação mecânica influencia diretamente neste parâmetro de avaliação de germinação. Resultados semelhantes foram citados por Seleguini et al. (2012), que ao avaliarem a influência da escarificação e embebição de sementes na emergência e desenvolvimento de mudas de buritizeiro (*Mauritia flexuosa* L.f.), observaram que a escarificação das sementes proporcionou um aumento na velocidade de emergência, no entanto, contribuiu para o aumento na taxa de mortalidade das sementes. Por outro lado, Bandeira et al. (2018), ao avaliarem diferentes métodos de superação de dormência, dentre eles a escarificação mecânica, de sementes de *S. obtusifolia* (L.) H.S.Irwin & Barneby., constataram que o IVG foi superior no tratamento com uso de ácido sulfúrico quando comparado aos demais tratamentos.

O comprimento de parte aérea e raiz das plântulas de *Senna obtusifolia* (L.) H. S. Irwin & Barneby foi superior nas sementes submetidas à escarificação mecânica com lixa, visto que estas sementes germinaram mais rapidamente e esses valores concordaram com os valores de VG e IVG. De acordo com Cangussu et al. (2018), este comportamento está relacionado à ineficiência do método de germinação e também pela ausência de processo de quebra de dormência no tratamento controle; portanto, as sementes demoraram mais para germinar, e quando germinam, o crescimento radicular é menor devido ao menor período de crescimento comparado ao das sementes cuja dormência foi superada.

Resultados semelhantes foram observados por Santos et al. (2013). Tais autores relataram que o maior comprimento de parte aérea e raiz de plântulas de *Erythrina velutina* foram nas sementes submetidas à escarificação mecânica, e também destacam que a imersão em água quente não quebrou a dormência. Dentre os tratamentos para quebra de dormência de sementes de *Piptadenia viridiflora* (Kunth) Benth, Cangussu et al. (2018) observaram que os tratamentos com escarificação mecânica e imersão em água quente resultaram em maiores valores de comprimento de parte aérea (4,50 e 4,59 cm, respectivamente), de plântulas de *P. viridiflora* (Kunth) Benth.

Resultados semelhantes foram citados por Cangussu et al. (2018), que avaliando a eficiência dos tratamentos com escarificação mecânica (lixa) e imersão em água sob diferentes temperaturas para superar a dormência de sementes de *Piptadenia viridiflora* (Kunth) Benth, constataram que as maiores massas foram para os tratamentos com escarificação mecânica e imersão em água quente a 60, 70 e 80 °C.

4.1.5. Conclusões

A escarificação mecânica com lixa de papel nº 120 favoreceu a germinação e foi o tratamento mais eficiente para superar a dormência de sementes de *Senna obtusifolia* (L.) H. S. Irwin & Barneby.

4.1.6. Referências

- ADEGAS, F. S.; VOLL, E.; PRETE, C. E. C. Embebição e germinação de sementes de picão-preto (*Bidens pilosa*). Planta Daninha, v.21, n.1, p.21-25, 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582003000100003>
- ARAÚJO NETO, J. C.; CAMARA, C. A.; FERREIRA, V. M.; LESSA, B. F. T.; OLIVEIRA, Y. M. O. Caracterização morfológica, germinação e conservação de sementes de *Caesalpinia pulcherrima* (L.) SW. (Fabaceae: Caesalpinioidea). Semina: Ciências Agrárias, v.35, n.4, p.2287-2300, 2014.
- AVELINO, J. I.; LIMA, J. S. S.; RIBEIRO, M. C.C.; CHAVES, A. P.; RODRIGUES, G. S. O. Métodos de quebra de dormência em sementes de jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*). Revista Verde, v.7, n.1, p.102-106, 2012.
- BANDEIRA, S. B.; MEDEIROS, G. H.; SILVA, A. A.; SARAIVA, I. R.; SOUZA, P. B.; ERASMO, E. A. L. Ecofisiologia da germinação de fedegoso *Senna obtusifolia* (L.) H. S. IRWIN & BARNEBY. Colloquium Agrariae, v.14, n.1, p.16-25, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5747/ca.2018.v14.n1.a186>
- BORTOLINI, M. F.; KOEHLER, H. S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; MALAVASI, M. M.; FORTES, A. M. T. Superação de dormência em sementes de *Gleditschia amorphoides* Taub. Ciência Rural, v.41, n.5, p.823-827, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782011000500014>
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 395 p.
- CANGUSSU, A. C. V.; CAETANO, A. P. O.; SANTOS, J. L.; CASTRO FILHO, M. N.; CARDOSO, A. D. Biometric analysis and breaking of dormancy of seeds of *Piptadenia*

viridiflora (Kunth) Benth. Floresta, v.48, n.3, p.355-362. DOI: <https://doi.org/10.5380/rf.v48i3.55068>

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 5.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590 p.

ERASMO, E. A. L.; TERRA, M. A.; DOMINGOS, V. D.; MARTINS, C. C.; COSTA, N. V. Superação da dormência em sementes de *Murdannia nudiflora* (L.) Brenan. Acta Scientiarum Agronomy, v.30, n.2, p.273-277, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v30i2.1785>

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, v.12, n.1, p.175-204, 2000.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. Ciência & Agrotecnologia, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>

HENTY, E. E.; PRITCHARD, G. H. Weeds of New Guinea and their control. 7. ed. Division of Botany, Department of Forests, Lae, Papua New Guinea, 1975. 180 p.

JUNIOR BORELLA, J.; MARTINAZZO, E. G.; AUMONDE, T. Z. Atividade alelopática de extratos de folhas de *Schinus molle* L. sobre a germinação e o crescimento inicial do rabanete. Brazilian Journal of Biosciences, v.9, n.3, p.398-404, 2011.

KUMARI, A.; KOHLI, R. K. Studies on dormancy and macromolecular drifts during germination in *Cassia occidentalis* L. seeds. Journal of Tree Sciences, v.3, n.1/2, p.111-125, 1984.

LOPES, J. C.; PEREIRA, M. D. Germinação de sementes de cubiu em diferentes substratos e temperaturas. Revista Brasileira de Sementes, v.27, n.2, p.146-150, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222005000200021>

LORENZI, H. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2000. 672 p.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. Crop Science, v.2, n.1, p.176-177, 1962.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA R.D.; FRANÇA NETO JB (Ed.). Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999. p. 2.1-2.24.

ROCHA, R. B.; VIEIRA, A. H.; SPINELLI, V. M.; VIEIRA, J. R. Caracterização de fatores que afetam a germinação de teca (*Tectona grandis*): temperatura e escarificação. Revista Árvore, v.35, n.2, p.205- 212, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622011000200005>

- SANTOS, L. W.; COELHO, M. F. B.; MAIA, S. S. S.; SILVA, R. C. P.; CÂNDIDO, W. S.; SILVA, A. C. Armazenamento e métodos para a superação da dormência de sementes de mulungu. *Semina: Ciências Agrárias*, v.34, n.1, p.171-178, 2013. DOI: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n1p171>
- SILVA, A. C. F.; SILVEIRA, L. P.; NUNES, L. G.; SOUTO, J. S. Superação de dormência de *Enterolobium contortisiliquum* Mor. (Vell.) MORONG. *Scientia Plena*, v.8, n.4, p.1-6, 2012.
- SILVA, P. E. M.; SANTIAGO, E. F.; DALOSO, D. M.; SILVA, E. M.; SILVA, J. O. Quebra de dormência em sementes de *Sesbania virgata* (Car.) Pers. *Idesia*, v.29, n.2, p.39-45, 2011.
- SILVA, T. A.; DELIAS, D.; PEDÓ, T.; ABREU, E. S.; VILLELA, F. A.; AUMONDE, T. Z. Fitotoxicidade do extrato de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist no desempenho fisiológico de sementes e plântulas de alface. *Iheringia*, v.71, n.3, p.213-221, 2016.
- SOUZA FILHO, A. P. S.; DUTRA, S.; SILVA, M. A. M. M. Métodos de superação da dormência de sementes de plantas daninhas de pastagens cultivadas da Amazônia. *Planta daninha*, v.16, n.1, p.3-11, 1998. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83581998000100001>
- SOUZA, V. C.; BORTOLUZZI, R. L. C. 2012. Senna in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB23161>>. Acesso em: 28 maio 2014.
- TOPANOTTI, L. R.; PEREIRA, P. H.; BECHARA, F. C. Germinação de sementes de *Senna obtusifolia* (L.) H. S. Irwin & Barneby (fabaceae) visando a restauração de áreas degradadas. *Ciências Biológicas e da Saúde*, v.20, n.2, p.125-129, 2014. DOI: <https://doi.org/10.5212/Publ.Biologicas.v.20i2.0004>
- VIVIAN, R.; SILVA, A. A.; GIMENES, JR. M.; FAGON, E. B.; RUIZ, S. T.; LABONIA, V. Dormência em sementes de plantas daninhas como mecanismo de sobrevivência – breve revisão. *Planta Daninha*, v.26, n.3, p.695-706, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-83582008000300026>
- ZUCARELI, V.; AMARO, A. C. E.; SILVÉRIO, E. V.; FERREIRA, G. Métodos de superação da dormência e temperatura na germinação de sementes de *Dioclea violácea*. *Semina: Ciências Agrárias*, v.31, n.1, p.1305-1312, 2010.

4.2. ARTIGO V: SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA DE SEMENTES DE DIFERENTES PLANTAS DANINHAS

O presente artigo foi submetido para publicação em periódico científico da área.

Resumo: Determinar o mais adequado método de superação de dormência para cada espécie permite identificar o tipo de dormência, assim como a escolha de estratégias de manejo mais eficazes para no controle das espécies de plantas daninhas. Este trabalho teve como objetivo avaliar a correlação entre diferentes períodos de embebição em água a temperatura ambiente, com níveis de absorção de água e germinação de sementes das plantas daninhas capim-arroz (*Echinochloa* spp.), caruru roxo (*Amaranthus cruentus*) e picão-preto (*Bidens pilosa*). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com cinco tratamentos, e quatro repetições, cada repetição com 50 sementes. Os tratamentos para superação da dormência foram compostos por: embebição em água a temperatura ambiente por 12, 24, 36 e 48 horas. As características determinadas foram: o teor de água, porcentagem de germinação, e avaliações de plântulas (comprimento de radícula e da parte aérea, e massa fresca e seca). As maiores porcentagens de germinação foram obtidas nos maiores períodos de embebição das sementes. Observou-se diferença significativa entre os tratamentos para todas as características estimadas, onde o tratamento T5 (embebição por 48 horas) foi o mais eficaz para promoção da germinação para todas as espécies avaliadas. A absorção de água teve aumento significativo com maiores períodos de embebição. O tratamento com embebição em água a temperatura ambiente por 48 horas foi o mais eficiente para superar a dormência das sementes de *A. cruentus*, *Echinochloa* sp. e *B. pilosa*.

Palavras-chave: *Amaranthus cruentus*, *Echinochloa* sp., *Bidens pilosa*, Germinação, Embebição em água, Imersão em água quente.

Abstract: Determining the most suitable dormancy overcoming method for each species allows identifying the type of dormancy, as well as choosing the most effective management strategies for controlling weed species. The objective of this work was to evaluate the correlation between different periods of soaking in water at room temperature, with water absorption and seed germination levels of rice grass (*Echinochloa* sp.), Purple caruru (*Amaranthus cruentus*) and

pungent weeds. black (*Bidens pilosa*). The experimental design was completely randomized (DIC), with five treatments and four replications of 50 seeds. The treatments for overcoming the dormancy were: soaking in water at room temperature for 12, 24, 36 and 48 hours. The characteristics determined were: water content, germination percentage, and seedling evaluations (root and shoot length, and fresh and dry mass). The highest germination rates were obtained in the longest periods of seed imbibition. Significant differences between treatments were observed for all estimated traits, where T5 treatment (soaking for 48 hours) was the most effective to promote germination for all evaluated species. Water absorption increased significantly with longer soaking periods. The treatment with soaking in water at room temperature for 48 hours was the most efficient to overcome the dormancy of *A. cruentus*, *Echinochloa* sp. and *B. pilosa*.

Keywords: *Amaranthus cruentus*, *Echinochloa* sp., *Bidens pilosa*, Germination, Soaking in water, Immersion in hot water.

4.2.1. Introdução

O controle das plantas daninhas assume um papel extremamente importante no manejo de inúmeras culturas, apresentando reflexos diretos no rendimento e nos custos de produção. A alta produção de sementes e a dormência são os principais mecanismos de sobrevivência das plantas daninhas em ambientes constantemente infestados, como áreas de pastagens e áreas cultivadas com grãos no Brasil (CARMONA, 1995; SOUZA FILHO et al., 1998).

De acordo com Monquero e Christffoleti (2005) várias espécies de plantas daninhas apresentam sementes ortodoxas, que podem ser quiescentes se alguns dos fatores ambientais limitarem a germinação ou mesmo estar em estado de dormência. As sementes das plantas daninhas podem apresentar diferentes mecanismos de dormência e elevada longevidade (SOUZA FILHO et al., 1998).

A dormência é uma “falha” temporária na capacidade das sementes para germinar mesmo dispondo de todas as condições ambientais favoráveis. Caracteriza um mecanismo evolutivo de sobrevivência que amplia a possibilidade de estabelecimento e colonização de algumas espécies vegetais, distribuindo a germinação no espaço e no tempo. Tais características quando relacionadas a espécies de plantas daninhas dificulta o seu controle (PENFIELD, 2017; PORCEDDU et al., 2016).

A dormência é um fenômeno intrínseco das sementes, que funciona como mecanismo natural de resistência a fatores adversos do meio, que é atribuída a diferentes fatores, dentre os quais estão a dormência imposta pelo tegumento, que é o fenômeno de dormência encontrado

com maior frequência. Este tipo de dormência propicia as sementes impermeabilidade à água e a gases, a imaturidade do embrião, o desequilíbrio entre substâncias promotoras e inibidoras da germinação e exigências especiais de luz ou temperatura (ALBUQUERQUE et al., 2007).

A utilização do método de escarificação térmica, por meio de água aquecida, pode influenciar a velocidade de absorção de água e reações bioquímicas, conseqüentemente, interferindo na velocidade e uniformidade da germinação (SOUZA et al., 2007). No entanto, a eficácia desse método depende da intensidade da dormência, que é variável entre espécies e procedências (AZEREDO et al., 2010). A temperatura é um dos principais fatores que afetam a porcentagem final de germinação, reativando reações metabólicas essenciais aos processos de mobilização de reservas e retomada do crescimento radicular (OLIVEIRA et al., 2012).

A água é essencial para a germinação das sementes, pois o processo germinativo se inicia com a hidratação da semente. A porcentagem de germinação das sementes está diretamente relacionada com a tensão de água no solo e com o período de absorção de água, entre outros fatores (THEISEN; VIDA, 1999; ADEGA et al., 2003).

Para cada espécie há um tratamento ideal para superação da dormência, pois o nível de dormência e a eficiência do tratamento para superação empregado, dependem diretamente da espessura da camada impermeável das sementes, dos constituintes desta camada, da presença de substâncias inibidoras, entre outros (PEREIRA et al., 2015; CIPRIANI et al., 2019). Neste sentido, é importante salientar que a eficiência do método de superação de dormência permitirá a máxima expressão da germinação que ocorre dentro de determinados limites de temperatura e umidade. Nos últimos anos a agricultura de precisão é uma realidade, visto que é evidente a busca pela redução dos custos de produção por grande parte dos produtores. Além disso a preocupação com as questões ambientais, vem desencadeando a pesquisa e desenvolvimento de novos métodos de manejo (VOLL et al., 2001).

No Brasil os principais testes que avaliam o vigor das sementes (desempenho das plântulas), e por conseqüência a eficiência de métodos de superação de dormência empregados, são aqueles realizados junto ao teste de germinação, que permite avaliar características da germinação ou das plântulas. Estes testes na maioria das vezes são realizados em laboratório (simulando condições controladas ou de campo), que podem ser a primeira contagem de germinação, o índice de velocidade de germinação, o comprimento da plântula e massa seca de plântulas (VANZOLINI et al., 2007; GUEDES et al., 2015).

Portanto, conhecer o comportamento da germinação de espécies de plantas daninhas é importante para o controle destas, pois permitirá estabelecer controle já antes da germinação, por meios preventivos, mecânicos, químicos ou biológicos (VIVIAN et al., 2008). Neste

contexto, o presente trabalho, objetivou-se avaliar a correlação entre diferentes períodos de embebição em água a temperatura ambiente, com níveis de absorção de água e germinação de sementes das plantas daninhas capim-arroz (*Echinochloa* spp.), caruru roxo (*Amaranthus cruentus*) e picão-preto (*Bidens pilosa*).

4.2.2. Material e Métodos

O experimento foi conduzido no laboratório de Biotec Factory do Departamento de Engenharia Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), no município de Santa Maria, região central, coordenadas geográficas 53°48'3"O de longitude e 29°41'29" de latitude, e altitude de 139 m, Brasil.

As sementes das diferentes espécies de plantas daninhas (Tabela 1) foram adquiridas junto a Empresa Cosmos Agrícola Produção e Serviços Rurais Ltda (AGROCOSMOS). Estas foram mantidas em sacos de papel pardo no Laboratório, onde antes de iniciar os ensaios foram selecionadas manualmente, descartando-se as que apresentavam injúrias ou deformadas.

Tabela 1 - Espécies de plantas daninhas submetidas aos tratamentos de superação da dormência.

Nome comum	Nome científico
Capim-arroz	<i>Echinochloa</i> spp.
Caruru roxo	<i>Amaranthus cruentus</i>
Picão Preto	<i>Bidens pilosa</i>

Inicialmente as sementes das espécies de plantas daninhas avaliadas foram tratadas com solução de hipoclorito de sódio a 2% por 3 minutos e em seguida submetidas ao teste de germinação, segundo metodologia citada por Bortolini et al. (2011). Foi usado o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com 9 tratamentos em quatro repetições, cada uma composta por 50 sementes, totalizando 200 sementes por tratamento para cada espécie de planta daninha avaliada.

Os tratamentos utilizados para superação da dormência das sementes de cada espécie de plantas daninha foram: tratamento 1 (T1) - testemunha (sem embebição); tratamento 2 (T2) - embebição em água a temperatura ambiente por 12 horas; tratamento 3 (T3) - embebição em água a temperatura ambiente por 24 horas; tratamento 4 (T4) - embebição em água a temperatura ambiente por 36 horas e tratamento 5 (T5) - embebição em água a temperatura ambiente por 48 horas, como descritos abaixo:

Foram utilizadas 200 sementes de cada espécie de planta daninha em cada tratamento para superação da dormência. No método de embebição em água, as sementes foram depositadas em béquers, onde permaneceram imersas em água destilada, em temperatura ambiente (25 °C) por um período de embebição de 12, 24, 36 e 48 horas, seguindo método descrito por Adegas et al. (2003).

Após a realização dos tratamentos de superação da dormência, foi determinada a taxa de absorção de água. Esta foi calculada pela relação entre o peso inicial das sementes e a massa das sementes obtido após serem submetidas aos tratamentos de superação da dormência (ADEGAS et al., 2003).

O teste de germinação foi conduzido em caixas plásticas do tipo gerbox (11 x 11 x 4 cm), onde as sementes foram depositadas sobre duas folhas de papel Germitest esterilizadas, umedecidas na proporção de 2,5 vezes a massa do papel seco. Todas as caixas permaneceram em câmara de germinação do tipo Biochemical Oxygen Demand (BOD), com fotoperíodo de 12-12 horas (luz/escuro), sob temperatura de 25 °C, de acordo com a Regra de análise de sementes (BRASIL, 2009).

Para determinar a porcentagem de germinação (PG - %), foram realizadas contagens diariamente, até a estabilização do número de sementes germinadas. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram comprimento de radícula superior a 2 milímetros, com características de plântulas normais (AZANIA et al., 2003).

As plântulas germinadas e consideradas normais em cada tratamento de superação da dormência ao final do teste de germinação, foram avaliadas quanto a massa fresca (g), o comprimento de parte aérea e de raiz primária (mm). O primeiro atributo foi tomado com uma balança analítica (A 42207c – Bel Engineering), os dois últimos, com um paquímetro digital (Within 300 mm). Considerou-se para o comprimento da parte aérea a distância entre o ápice da parte aérea e a inserção da porção basal da raiz primária, para o da raiz primária considerou-se a distância entre a parte apical e basal (NAKAGAWA, 1999; SILVA et al., 2016).

A massa seca de plântulas (g), foi realizada acondicionando todas as plântulas, obtidas ao final do teste de germinação de todas as repetições de cada tratamento, em sacos de papel pardo do tipo Kraft devidamente identificados e submetidas à secagem em estufa com circulação de ar forçada, regulada a 70 ± 3 °C por 24 horas, até massa constante (BRASIL, 2009), resultados expressos em porcentagem.

Os resultados obtidos com os ensaios foram submetidos aos testes de normalidade e homogeneidade dos erros. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro ($p \leq 0,05$).

Quando constatado diferença significativa, os dados foram submetidos à análise de regressão, utilizando o programa estatístico SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2014).

4.2.3. Resultados

Como é apresentado na Tabela 2, os coeficientes de variação foram de 4,32 a 17,13, não ocorrendo nenhuma interferência externa significativa que comprometeu o prosseguimento do experimento. O efeito estatístico significativo pelo teste F ($p \leq 0,05$) em nível de tratamento foi observado para todas as variáveis avaliadas (Tabela 2).

Tabela 2 - Resumo da análise de variância dos atributos avaliados em sementes de *Echinochloa* spp., *Amaranthus cruentus* e *Bidens pilosa*.

¹ FV	² GL	Quadrados médios					
		AA	PG	CPA	CR	MF	MS
<i>Echinochloa</i> spp.							
Tratamentos	4	6235,68*	592,70*	351,11*	15,42*	3,39*	0,83 ND
Erro	15	1711,55	30,80	21,29	7,87	0,25	0,23
DMS		23,33	12,12	5,86	3,57	1,08	1,05
Coeficiente de variação (%)		17,13	16,62	10,38	9,97	12,73	13,86
<i>Amaranthus cruentus</i>							
Tratamentos	4	1199,86*	3371,30*	8,76*	7,48*	3,15*	1,22*
Erro	15	4,31	7,26	0,73	0,53	0,14	0,15
DMS		4,53	5,89	1,08	0,92	0,69	0,85
Coeficiente de variação (%)		7,08	6,69	4,32	5,80	7,57	11,55
<i>Bidens pilosa</i>							
Tratamentos	4	7046,16*	2021,80*	141,86*	297,75*	2,91*	1,61*
Erro	15	8,94	15,73	7,80	12,91	0,02	0,06
DMS		6,53	8,66	3,55	4,57	0,31	0,55
Coeficiente de variação (%)		4,60	7,24	7,25	13,37	6,82	16,53

⁽¹⁾Fonte de variação, ⁽²⁾Grau de liberdade, ^(AA)Absorção de água, ^(PG)Porcentagem de germinação, ^(CPA)comprimento de parte aérea, ^(CR)comprimento de raiz primária de plântulas, ^(MF)massa fresca, ^(MS)massa seca de plântulas, *significativo a 5% e ^(NS)não significativo.

Em quase todas as variáveis estudadas, a absorção de água (AA), porcentagem de germinação (%), comprimento médio de parte aérea e de raiz primária de plântulas (CPA e CR), massa fresca e seca total de plântulas (MF e MS), observaram-se efeito estatístico significativo

pelo teste F ($p \leq 0,05$) entre as sementes submetidas aos diferentes períodos de embebição e a testemunha para todas as espécies avaliadas (Tabela 2).

As plantas daninhas estudadas apresentaram variações no grau de dormência das sementes. Assim, considerando o tratamento testemunha, na qual as sementes das espécies *Bidens pilosa*, *Echinochloa spp.* e *Amaranthus cruentus* chegaram a apresentar 4,0, 14,0 e 34,0% de germinação, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 - Absorção de água e porcentagem de germinação das sementes de *Echinochloa spp.*, *Amaranthus cruentus* e *Bidens pilosa*, após embebição em água por diferentes períodos para a superação de dormência.

Tratamentos	Absorção de água (%)	Porcentagem de germinação (%)
<i>Echinochloa spp.</i>		
T1 (Testemunha)	0,00 ± 0,00c	14,00 ± 1,63d
T2 (Embebição por 12 horas)	60,19 ± 5,10b	30,00 ± 1,63c
T3 (Embebição por 24 horas)	60,72 ± 6,71b	36,50 ± 3,90c
T4 (Embebição por 36 horas)	86,65 ± 5,88a	54,00 ± 3,67bc
T5 (Embebição por 48 horas)	104,19 ± 3,22a	62,50 ± 3,47a
<i>Amaranthus cruentus</i>		
T1 (Testemunha)	0,00 ± 0,00d	4,00 ± 1,63d
T2 (Embebição por 12 horas)	31,88 ± 1,90c	31,00 ± 2,58c
T3 (Embebição por 24 horas)	37,51 ± 3,35c	34,50 ± 2,52c
T4 (Embebição por 36 horas)	31,72 ± 2,56b	48,50 ± 1,91b
T5 (Embebição por 48 horas)	45,47 ± 0,39a	83,50 ± 4,12a
<i>Bidens pilosa</i>		
T1 (Testemunha)	0,00 ± 0,00e	34,00 ± 1,36d
T2 (Embebição por 12 horas)	57,22 ± 6,6d	37,50 ± 3,00d
T3 (Embebição por 24 horas)	68,53 ± 5,10c	46,50 ± 5,51c
T4 (Embebição por 36 horas)	86,50 ± 4,00b	69,50 ± 5,00b
T5 (Embebição por 48 horas)	112,81 ± 2,10a	86,50 ± 3,40a

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Observou-se que ocorreu germinação em todos os tratamentos para superação de dormência, sendo constatada diferença significativa. O melhor resultado de germinação foi para

o tratamento T5 em que se empregou o maior período de embebição (48 horas), apresentando valores superiores a 60% de sementes germinadas para todas as espécies avaliadas (Tabela 3).

A correlação entre a quantidade de água absorvida e a germinação de sementes das espécies estudadas, em função do período de embebição, está apresentada na Figura 1. O teor de água absorvido pelas sementes das espécies estudadas aumentou significativamente com o período de embebição, sendo representado por uma equação de regressão linear, com alto ajuste aos dados. O teor de água das sementes *Echinochloa* sp. *A. cruentus* e *B. pilosa*, após seis horas de embebição foram de 60,19, 31,88 e 57,22%, respectivamente, atingindo teores máximos de 104,19, 45,47 e 112,81%, respectivamente, após 48 horas de embebição (Figura 1).

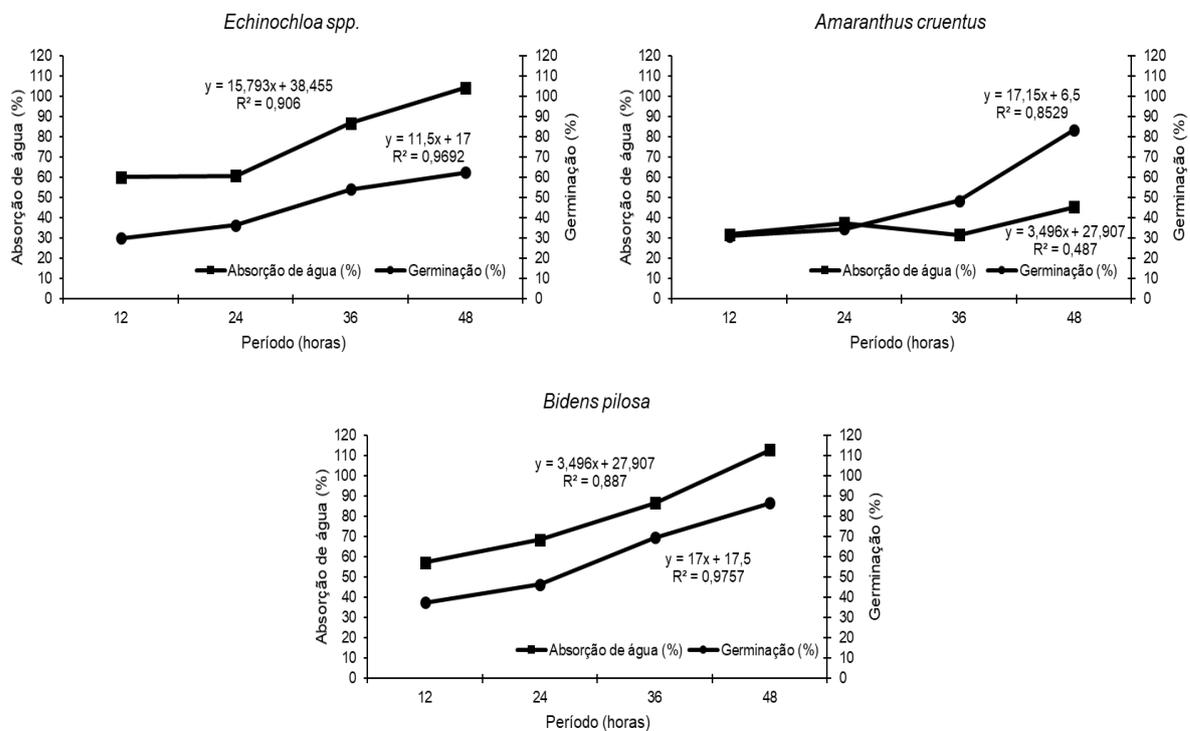


Figura 1 - Efeito de diferentes períodos de embebição na absorção de água e germinação de sementes de *Echinochloa* spp., *Amaranthus cruentus* e *Bidens pilosa*.

Para a espécie *Echinochloa* sp. observaram-se diferenças significativas entre os diferentes períodos de embebição (tratamentos) para as características de comprimento médio de parte aérea (CPA) e massa fresca total (MF), exceção do comprimento de raiz primária (CR) e da massa seca total (MS) de plântulas (Tabela 4). O maior desenvolvimento da parte aérea e maior massa fresca de plântulas (CPA e MF) foi observada nas sementes submetidas à embebição por 48 horas (T5) a temperatura ambiente.

Foram verificadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) para as características comprimento médio de parte aérea e de raiz primária (CPA e CR) e massa fresca e seca total de

plântulas (MF e MS) (Tabela 4), entre os diferentes períodos de embebição (tratamentos) para as sementes de *Amaranthus cruentus* e *Bidens pilosa*. O maior desenvolvimento da parte aérea e das raízes (CPA, CR, MF e MS) foi observado nas sementes submetidas à embebição por 48 horas (T5) a temperatura ambiente.

Tabela 4 - Comprimento médio de parte aérea (CPA) e de raiz primária (CR), massa fresca total (MF) e massa seca total (MS) de plântulas provenientes do teste de germinação de sementes de *Echinochloa* sp., *Amaranthus cruentus* e *Bidens pilosa*, embebição em água por diferentes períodos para a superação de dormência, no período de 8 dias de avaliação.

Tratamentos	CPA (mm)	CR (mm)	MF (g)	MS (g)
<i>Echinochloa</i> sp.				
T1 (0 horas)	35,54 ± 0,62c	27,82 ± 0,53a	0,223 ± 1,11b	0,045 ± 1,07a
T2 (12 horas)	42,70 ± 5,63b	27,27 ± 2,13a	0,239 ± 0,61b	0,053 ± 0,21a
T3 (24 horas)	45,00 ± 2,05b	28,65 ± 3,25a	0,286 ± 0,95b	0,068 ± 0,56a
T4 (36 horas)	47,74 ± 4,41ab	26,93 ± 2,07a	0,816 ± 0,82b	0,578 ± 0,74a
T5 (48 horas)	51,29 ± 7,12a	30,04 ± 4,44a	2,378 ± 0,77a	1,070 ± 0,59a
<i>Amaranthus cruentus</i>				
T1 (0 horas)	18,94 ± 1,49b	11,48 ± 0,18d	0,083 ± 0,09b	0,013 ± 0,12b
T2 (12 horas)	19,09 ± 0,32b	11,88 ± 1,26cd	0,157 ± 0,06ab	0,042 ± 0,32ab
T3 (24 horas)	19,45 ± 0,23b	12,53 ± 0,71bc	0,158 ± 0,04ab	0,046 ± 0,21ab
T4 (36 horas)	19,98 ± 0,83b	13,08 ± 0,24ab	0,180 ± 0,02a	0,048 ± 0,22ab
T5 (48 horas)	21,26 ± 0,73a	13,61 ± 0,67a	0,209 ± 0,05a	0,075 ± 0,33a
<i>Bidens pilosa</i>				
T1 (0 horas)	33,22 ± 0,57c	21,26 ± 2,84b	1,300 ± 0,06d	0,092 ± 0,21b
T2 (12 horas)	36,27 ± 2,38bc	23,49 ± 3,54b	1,434 ± 0,11d	0,101 ± 0,18b
T3 (24 horas)	39,25 ± 3,35ab	24,64 ± 3,77b	1,779 ± 0,21c	0,126 ± 0,20b
T4 (36 horas)	41,72 ± 2,99a	30,47 ± 1,53a	2,658 ± 0,20b	0,188 ± 0,35b
T5 (48 horas)	42,11 ± 3,38a	34,50 ± 2,35a	3,289 ± 0,11a	1,540 ± 0,56a

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.2.4. Discussão

Os coeficientes de variação experimental foram baixos e evidenciaram a precisão do experimento. De acordo com Pimentel (2009), os CV obtidos comumente nos ensaios agrícolas, podem ser considerados baixos quando inferiores a 10%; médios quando de 10 a 20%; altos, quando de 20 a 30%; muito altos, quando superiores a 30%.

O grau de impermeabilidade do tegumento das sementes apresenta variação entre as espécies estudadas devido às características morfoanatômicas do tegumento o que reflete nas diferenças da taxa de germinação em função dos tratamentos de superação de dormência aplicados. De acordo com Ferreira et al. (2006), existe evidências que o tegumento das sementes pode dificultar a embebição de água, restringir a difusão de oxigênio, ou mesmo impor resistência mecânica ao crescimento do embrião e por consequência inibindo a germinação.

De acordo com Silva et al. (2014) o sucesso do tratamento de quebra de dormência depende do grau de dormência, que varia de acordo com cada espécie. Segundo Vieira & Krzyzanowski (1999), no processo de embebição as sementes adquirem a capacidade de regeneração de suas membranas reparando os danos químicos, físicos e biológicos que possam tê-la afetado durante alguma fase da produção, visto que quanto mais rápida e bem sucedida for a regeneração das membranas, menor será a perda de líquidos da semente para o meio externo, mantendo assim um maior vigor.

A embebição das sementes em água proporcionou uma germinação diferenciada para as sementes das espécies avaliadas. Avaliando diferentes métodos para a superação da dormência de sementes de sucará, Bortolini et al. (2011), constataram que a permanência das sementes em embebição por 24h acelerou o início da germinação, visto que a absorção de água é considerada o passo inicial do processo germinativo.

De acordo com Adegas et al. (2003), o teor de água absorvido pelas sementes está diretamente relacionada com o período de embebição. Estes autores avaliando as correlações entre períodos de embebição, níveis de absorção de água e germinação de sementes de *B. pilosa*, constaram que os maiores índices de velocidade de germinação foram obtidos pelos maiores períodos de embebição das sementes, que atingiu o máximo de 105,3% com 48h.

De acordo com Vanzolini et al. (2007) o comprimento e a massa seca são as grandezas físicas que podem ser utilizadas para mensurar o crescimento de plântulas. Guedes et al. (2015), destacam que plântulas normais que expressam os maiores valores de comprimento médio são as mais vigorosas, e segundo Dan et al. (1987), este fato decorre da maior translocação das reservas dos tecidos de armazenamento para o crescimento do eixo embrionário.

4.2.5. Conclusões

A absorção de água teve aumento significativo com maiores períodos de embebição. A embebição das sementes em água a temperatura ambiente por 48 horas favoreceu a germinação,

sendo o tratamento mais eficiente para superar a dormência de sementes de *A. cruentus*, *Echinochloa* spp., *B. pilosa*.

4.1.6. Referências

ADEGAS, F. S.; VOLL, E.; PRETE, C. E. C. Embebição e germinação de sementes de picão-preto (*Bidens pilosa*). Planta Daninha, v.21, n.1, p.21-25, 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582003000100003>

ALBUQUERQUE, K. S.; GUIMARÃES, R. M.; ALMEIDA, Í. F. CLEMENTE, A. C. S. Métodos para a superação da dormência em sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth.). Ciência e Agrotecnologia, v.31, n.6, p.1716-1721, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542007000600017>

AVELINO, J. L.; LIMA, J. S. S.; RIBEIRO, M. C. C.; CHAVES, A. P.; RODRIGUES, G. S. O. Métodos de quebra de dormência em sementes de jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*). Revista Verde, v.7, n.1, p.102-106, 2012.

AZANIA, A. A. P. M.; AZANIA, C. A. M.; PAVANI, M. C. M. D.; CUNHA, M. C. S. Métodos de superação de dormência em sementes de *Ipomoea* e *Merremia*. Planta daninha, v.21, n.2, p.203-209, 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582003000200005>

AZEREDO, G. A.; PAULA, R. C.; VALERI, S. V.; MORO, F. V. Superação de dormência de sementes de *Piptadenia moniliformis* Benth. Revista Brasileira de Sementes, v.32, n.2, p.49-58, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222010000200006>

BORTOLINI, M. F.; KOEHLER, H. S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; MALAVASI, M. M.; FORTES, A. M. T. Superação de dormência em sementes de *Gleditschia amorphoides* Taub. Ciência Rural, v.41, n.5, p.823-827, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782011000500014>

BORTOLINI, M. F.; KOEHLER; H. S.; ZUFFELLATO-RIBAS, C.; MALAVASI, M. M.; FORTES, A. M. T. Superação de dormência em sementes de *Gleditschia amorphoides* Taub. Ciência Rural, v.41, n.5, p.823-827, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782011000500014>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 395 p.

CANGUSSU, A. C. V.; CAETANO, A. P. O.; SANTOS, J. L.; CASTRO FILHO, M. N.; CARDOSO, A. D. Biometric analysis and breaking of dormancy of seeds of *Piptadenia viridiflora* (Kunth) Benth. Floresta, v.48, n.3, p.355-362, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5380/ufv.v48i3.55068>

- CARMONA, R. Banco de sementes e estabelecimento de plantas daninhas em agroecossistemas. *Planta Daninha*, v. 13, n. 1, p. 3-9, 1995. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83581995000100001>
- CIPRIANI, V. B.; GARLET, J.; LIMA, B. M. Quebra de dormência em sementes de *Chloroleucon acacioides* e *Senna macranthera*. *Rev. de Ciências Agrárias* [online]. 2019, vol.42, n.1, pp.51-60. ISSN 0871-018X. <http://dx.doi.org/10.19084/RCA18238>.
- DAN, E. L.; MELLO, V. D. C.; WETZEL, C. T.; POPINIGIS, F.; ZONTA, E. P. Transferência de matéria seca como método de avaliação de vigor de sementes de soja. *Revista Brasileira de Sementes*, v.9, n.2, p.45-55, 1987.
- de comprimento de plântula na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Amburana cearenses* (Allemão) A.C. Smith. *Semina: Ciências Agrárias*, v.36, n.4, p.2373-2382, 2015.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: A Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência & Agrotecnologia*, v.38, n.2, p.109-112, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>
- FERREIRA, S. A. N.; GENTIL, D. F. O. Extração, embebição e germinação de sementes de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*). *Acta Amazonica*, v.36, n.2, p.141-146, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672006000200002>
- GUEDES, R. S.; ALVES, E. U.; SANTOSMOURA, S. DA S.; GALINDO, E. A. Teste de comprimento de plântula na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith. *Semina: Ciências Agrárias*, v.36, n.4, p.2373-2382, 2015. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n4p2373>
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO J. B. (Ed.). *Vigor de sementes: conceitos e testes*. Londrina: ABRATES, 1999. p. 2.1-2.24.
- PENFIELD, S. Seed dormancy and germination. *Current Biology*, v.27, n.17, p.874-878, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.050>
- PEREIRA, F.E.C.B.; GUIMARÃES, I.P.; TORRES, S.B.; BENEDITO, C.P. Superação de dormência em sementes de *Pithecellobium bulce* (Roxb.) Benth. *Semina: Ciências Agrárias*, vol. 36, n. 1, p. 165-170, 2015. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n1p165>
- PIMENTEL, F. G. Curso de estatística experimental. 15. ed. Piracicaba: Fealq, 2009, 451p.
- PORCEDDU, M.; MATTANA, E.; PRITCHARD, H. W.; BACCHETTA, G. Sequential temperature control of multi-phasic dormancy release and germination of *Paeonia corsicaseeds*. *Journal of Plant Ecology*, v.9, n.4, p.1-10, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/jpe/rtv074>

- SILVA, A. C.; SANTOS, J. L.; D'ARÊDE, L. O.; MORAIS, O. M.; COSTA, E. M.; SILVA, E. A. A. Caracterização biométrica e superação de dormência em sementes de *Chloroleucon foliolosum* (Benth.) G. P. Lewis. Revista Brasileira de Ciências Agrárias, v.9, n.4, p.577-582, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.5039/agraria.v9i4a4586>
- SILVA, T. A.; DELIAS, D.; PEDÓ, T.; ABREU, E. S.; VILLELA, F. A.; AUMONDE, T. Z. Fitotoxicidade do extrato de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist no desempenho fisiológico de sementes e plântulas de alface. Iheringia, v.71, n.3, p.213-221, 2016.
- SOUZA FILHO, A. P. S.; DUTRA, S.; SILVA, M. A. M. M. Métodos de superação da dormência de sementes de plantas daninhas de pastagens cultivadas da Amazônia. Planta daninha, v.16, n.1, p.3-11, 1998. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83581998000100001>
- SOUZA, E. B.; PACHECO, M. V.; MATOS, V. P.; FERREIRA, R. L. C. Germinação de sementes de *Adenanthera pavonina* L. em função de diferentes temperaturas e substratos. Revista Árvore, v.31, n.3, p.437-443, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622007000300009>
- THEISEN, G.; VIDAL, R. A. Viabilidade de sementes de papuã (*Brachiaria plantaginea*) e a cobertura do solo com palha. Ciência Rural, v.29, n.3, p.449-452, 1999. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84781999000300011>
- VANZOLINI, S.; ARAKI, C. A. S.; SILVA, A. C. T. M.; NAKAGAWA, J. Teste de comprimento de plântula na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja. Revista Brasileira de Sementes, v.29, n.2, p.90- 96, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222007000200012>
- VIEIRA, R.D.; KRZYZANOWSKI, F.C. Teste de condutividade elétrica. In: VIEIRA, R.D.; KRZYZANOWSKI, F.C.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina, PR: ABRATES, 1999. cap.4, p.1-26.
- VIVIAN, R.; SILVA, A. A.; GIMENES, J. M.; FAGON, E. B.; RUIZ, S. T.; LABONIA, V. Dormência em sementes de plantas daninhas como mecanismo de sobrevivência – breve revisão. Planta Daninha, v.26, n.3, p.695-706, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-83582008000300026>
- VOLL, E.; TORRES, E.; BRICHENTI, A. M.; GAZZIERO, D. L. P. Dinâmica do banco de sementes de plantas daninhas sob diferentes sistemas de manejo de solo. Planta daninha, v.19, n.2, p.171-178, 2001. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582001000200003>
- OLIVEIRA, L. M.; BRUNO, R. L. A.; SILVA, K. R. G.; SILVA, V. D. M.; FERARRI, C. S.; SILVA, G. Z. Germinação e vigor de sementes de *Sapindus saponaria* L. submetidas a

tratamentos pré-germinativos, temperaturas e substratos. *Ciência Rural*, v.42, n.4, p.638-644, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782012000400010>

CAPÍTULO 5 – APLICAÇÃO DO CALDO FERMENTADO BRUTO DO FUNGO *Phoma dimorpha* SOBRE PLANTAS DANINHAS

Neste Capítulo estão apresentados dois artigos relacionados aos bioensaios iniciais com aplicações do caldo bruto (não concentrado) do fungo *Phoma dimorpha*, como testes em pré-emergência, pós-emergência e em folha destacada das espécies pepino (*Cucumis sativus*), trigo (*Triticum aestivum*), capim-arroz (*Echinochloa* spp.), caruru-roxo (*Amaranthus cruentus*), picão-preto (*Bidens pilosa*) e mata-pasto (*Senna obtusifolia*). Este capítulo foi dividido em dois artigos em função das características avaliadas nas sementes e plantas das diferentes espécies estudadas, com o intuito de padronizar os artigos em função das análises e instruções para publicação dos periódicos selecionados.

5.1. ARTIGO VI: AÇÃO FITOTÓXICA DO CALDO FERMENTADO DO FUNGO *Phoma dimorpha* SOBRE ATRIBUTOS FISIOLÓGICOS DE SEMENTES E PLANTAS DE *Senna obtusifolia*

O presente artigo foi publicado na revista Pesquisa Agropecuária Tropical. (v. 50, p. e56894, 2020). <https://doi.org/10.1590/1983-40632019v5056894>

Resumo: A planta daninha *Senna obtusifolia* causa severos danos em áreas de pastagens no Brasil, devido à sua elevada produção e disseminação de sementes. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação bioherbicida do caldo fermentado do fungo *Phoma dimorpha* na pré-emergência e pós-emergência desta planta daninha em pastagens. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com dois tratamentos, um com e outro sem aplicação do caldo fermentado do fungo *P. dimorpha*. Os efeitos bioherbicidas foram mensurados em bioensaios de pré-emergência (porcentagem de germinação), folhas destacadas (fitotoxicidade) e de pós-emergência (fitotoxicidade, altura da planta e massa fresca de planta). A aplicação do caldo fermentado do fungo proporcionou ação bioherbicida em pré-emergência, inibindo em 100% a germinação das sementes. Em folhas destacadas, ocasionou necrose e morte das folhas no nono dia após a aplicação. Na pós-emergência esta aplicação ocasionou sintomas moderados, como manchas nas folhas e redução no tamanho da planta daninha. Conclui-se que o caldo fermentado

de *P. dimorpha* possui ação herbicida potencial e, por isso, representa uma alternativa no desenvolvimento de bioprodutos para controle sustentável de plantas daninhas em pastagens.

Palavras-chave: controle biológico; fitotoxicidade; germinação; folha destacada.

Abstract: The weed plant *Senna obtusifolia* causes severe damage to pasture areas in Brazil due to its high production and seed spread. The objective of this study was to evaluate the bioherbicidal action of *Phoma dimorpha* fungus in the pre-emergence and post-emergence of this pasture weed. The experimental design was completely randomized, with two treatments, one with and other without application of the fermented broth of *P. dimorpha* fungus. The bioherbicidal effects were measured in bioassays of pre-emergence (germination percentage), with detached leaves (phytotoxicity) and post-emergence (phytotoxicity, plant height and fresh plant mass). The application of the fungus fermented broth provided a pre-emergence bioherbicidal action, inhibiting the seed germination in 100%. In detached leaves, it caused leaf necrosis and death on the ninth day after the application. In the post-emergence, this application caused moderate symptoms, such as leaf spots and a reduction in the weed plant size. It was concluded that *P. dimorpha* fermented broth has a potential herbicidal action and, therefore, represents an alternative in the development of bioproducts for a sustainable weed control in pastures.

Keywords: biological control; phytotoxicity; germination; detached leaves.

5.1.1. Introdução

O aumento da infestação de plantas daninhas nas áreas de cultivo pode ser responsável por perdas expressivas na produtividade das culturas agrícolas. Diversos estudos comprovam o potencial tóxico e maior poder competitivo das plantas daninhas sobre as plantas cultivadas, tornando-se mais efetivas nos danos causados, gerando não só perdas de qualidade dos produtos agrícolas, mas também de produtividade, podem reduzir a produtividade das culturas em até 34%, gerando assim elevados prejuízos econômicos (Pisula & Meiners 2010, Suriyagoda et al. 2014).

A espécie de planta daninha mais frequentemente encontrada em pastagens, pomares, culturas anuais e perenes, no Brasil e também em alguns países do mundo é a *Senna obtusifolia*

(L.) H. S. Irwin & Barneby, conhecida popularmente como “fedegoso” devido ao odor fétido característico, também conhecida como “mata-pasto” em função dos danos causados as áreas de pastagens. Nativa do continente americano, é classificada como uma planta subarborescente e lenhosa com cerca de 70-160 cm de altura (Lorenzi 2000).

Seu potencial como planta daninha está associado à sua elevada produção de sementes, cujas vagens ao atingirem a maturidade “estalam”, espalhando as sementes que germinam no início do período chuvoso. Estas podem germinar e florescer em uma ampla faixa de temperatura entre 18 a 36 °C, e assim as sementes são a principal forma de propagação, Além destas características problemáticas, sua habilidade competitiva e a toxicidade para animais domésticos causam grave problemas as áreas agrícolas e de pastagens (Walker & Oliver 2008, Peres et al. 2010).

O controle de plantas daninhas é obtido por meio de atividades culturais, mecânicas, químicas ou biológicas. Nas últimas cinco décadas, o uso de herbicidas químicos é a principal medida dos sistemas de controle de plantas daninhas (Jabran et al. 2015). Apesar do amplo uso e eficácia constatada dos herbicidas no controle de plantas daninhas, se observa nos últimos anos que muitas espécies de plantas daninhas evoluíram, adquirindo resistência múltipla ao modo de ação de determinados moléculas químicas (Jabran et al. 2015, Mueller-Stoeber et al. 2016).

Em função do difícil controle de determinadas espécies de plantas daninhas, e também pelos impactos potenciais dos produtos químicos na saúde humana e ambiente, vem sendo desenvolvido métodos alternativos, que sejam ambientalmente seguros e biodegradáveis na natureza, para reduzir a forte dependência de herbicidas sintéticos. Além disso, específicos quanto ao organismo alvo, com vários sítios de ação de modo a evitar a resistência por parte das plantas daninhas (Bajwa et al. 2016). O controle biológico é uma alternativa para substituição mesmo que gradativa dos agroquímicos, favorecendo a redução no uso destes, minimizando os danos causados ao meio ambiente (Schwan-Estrada et al. 2012).

Metabólitos secundários biologicamente ativos provenientes de meios fermentados de microrganismos são utilizados no meio agrícola para o controle biológico e oferece diversos benefícios, desde maior especificidade a planta alvo, degradação rápida e redução do uso dos herbicidas sintéticos, sendo considerada viável do ponto de vista econômico e ambiental (Baque et al. 2012, Cordeau et al. 2016). Dentre as fontes de metabólitos secundários, os fungos endofíticos são os mais estudados, visto que diversas espécies são consideradas uma fonte potencial de produtos naturais pouco explorada, que permite a seleção de agentes de interesse ao controle biológico (Baque et al. 2012).

Os fungos do gênero *Phoma* constituem uma fonte rica de metabólitos secundários com elevada atividade biológica, estes podem ser utilizados para a obtenção de produtos com atividade bioherbicida, destinados ao controle biológico de fungos fitopatogênicos, insetos e plantas daninhas. Pesquisas recentes reafirmam que os fungos deste gênero produzem uma grande variedade de metabólitos secundários com alto potencial biológico e pouco estudados, que podem ser utilizados para a formulação de bioprodutos destinados ao meio agrícola (Wijeratne et al. 2013, Hubbard et al. 2014, Brun et al. 2016, Todero et al. 2018b).

Assim, o objetivo deste estudo foi verificar a ação bioherbicida de metabólitos secundários produzidos pelo fungo *Phoma dimorpha* na pré-emergência e pós-emergência da planta daninha *Senna obtusifolia* (L.) H. S. Irwin & Barneby.

5.1.2. Material e Métodos

Os bioensaios foram conduzidos de maio a julho de 2018, no Laboratório Biotec Factory do Departamento de Engenharia Química e em casa de vegetação do Departamento de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

O microrganismo empregado para a obtenção do caldo fermentado foi a cepa do fungo *Phoma dimorpha* (NRRL 43879), proveniente da coleção do Laboratório Biotec Factory do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria.

A cepa do fungo foi mantida em placas de Petri contendo meio BDA a 4 °C, e subcultivada a cada 15 dias. Para a realização do processo fermentativo, 2 discos de micélio de 6 mm de micélio de uma placa contendo meio de cultivo BDA, mantidas em estufa bacteriológica por 7 dias a 28 °C, foram transferidos para Erlenmeyers contendo 130 mL de meio líquido de cultivo (extrato de batata 200 g L⁻¹, dextrose 20 g L⁻¹, peptona 10 g L⁻¹, extrato levedura 7,5 g L⁻¹, sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) 2 g L⁻¹, sulfato ferroso (FeSO₄.7H₂O) 1 g L⁻¹, sulfato de magnésio (MgSO₄) 0,5 g L⁻¹, sulfato de manganês (MnSO₄.H₂O) 1 g L⁻¹) (Zhang et al. 2012), previamente esterilizados em autoclave a 121 °C por 30 minutos. Os frascos foram mantidos a 28 °C sob agitação de 120 rpm por 10 dias (Innova 44R, New Brunswick) (Klaic et al. 2017). Com a separação das células do caldo fermentado, obteve-se o caldo fermentado livre de células, que foi armazenado para posteriores avaliações.

Realizou-se três diferentes bioensaios para verificar a ação bioherbicida dos metabólitos secundários de *P. dimorpha* em pré-emergência, folhas destacadas e pós-emergência de *S. obtusifolia*.

Em pré-emergência a ação herbicida do caldo fermentado bruto de *P. dimorpha* foi avaliada por meio do teste de germinação: Antes da montagem do teste, as sementes foram

submetidas ao método de superação de dormência de escarificação mecânica, conforme método citado por Bortolini et al. (2011). Para o teste foram utilizadas oito repetições de 25 sementes de *S. obtusifolia* para cada tratamento, semeadas em caixas tipo gerbox, sobre duas folhas de papel filtro (Germitest®) umedecidas com 4 mL. Em seguida, as caixas foram acondicionadas em câmara de germinação tipo Biochemical Oxygen Demand (BOD) a 25 °C e com fotoperíodo de 12/12 horas de luz/escuro. As avaliações foram efetuadas diariamente até atingir a estabilização, contabilizado o número de sementes que germinaram, tendo como critério a protrusão da radícula mínima de 2 mm de comprimento, seguindo as Regras para Análise de Sementes (Brasil 2009).

Para a ação bioherbicida em folhas destacadas de *S. obtusifolia*, aplicou-se 3 mL do caldo fermentado de *P. dimorpha* com o auxílio de uma pipeta automática sobre algodão envolto ao pecíolo das folhas, estas foram dispostas em caixas gerbox previamente desinfestadas com etanol 70% e forradas com duas folhas de papel filtro. Em seguida as caixas gerbox foram acondicionadas em câmara incubadora tipo BOD com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12/12 horas de luz/escuro, as avaliações foram realizadas no 3º, 6º e 9º dia após a aplicação (Pedras & Ahiahonu 2004, Todero et al. 2018b). Foram observadas a incidência e a intensidade das lesões, de acordo com a escala estabelecida pela Sociedade Brasileira de Ciência de Ervas Daninhas (SBCPD) (Tabela 2).

Em pós-emergência o ensaio para a verificar a ação herbicida dos metabólitos secundários de *P. dimorpha* sobre plantas de *S. obtusifolia* foi realizado em casa de vegetação, com ambiente controlado, localizada no Departamento de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Cada tratamento foi composto por dez plantas, considerando cada planta uma repetição (unidade experimental). Cada unidade experimental foi composta por um vaso de polietileno com volume de 180 mL, preenchido com substrato comercial Macplant®. Inicialmente foram semeadas três sementes em cada vaso, e após a emergência das plântulas, foi realizado o desbaste sendo mantida apenas uma planta por vaso, as quais foram mantidas e cultivadas até o final do ensaio.

A aplicação dos metabólitos secundários foi realizada aproximadamente 15 dias após a emergência das plantas. Para a aplicação foi utilizado um pulverizador manual, com volume de calda de 300 L ha⁻¹ (Brun et al. 2016), as avaliações foram realizadas 15 dias após a aplicação (Todero et al. 2018b), onde os danos foliares às plantas foram estimados visualmente, com base na escala estabelecida pela SBCPD (Tabela 1).

Tabela 1 - Descrição da escala para avaliação do percentual de fitotoxicidade em folhas destacadas e plantas, desenvolvida com base nos conceitos aplicados às avaliações de toxicidade de acordo com a SBCPD.

% de danos	Descrição das principais categorias
0 - 20	Nenhuma lesão ou efeito
20 - 40	Lesão ligeira e/ou redução do crescimento com recuperação rápida
40 - 60	Lesão moderada e/ou redução do crescimento com recuperação lenta ou definitivo
60 - 80	Lesão grave e/ou redução de crescimento não recuperável e / ou redução do stand
80 - 100	Destruição completa da colheita ou apenas algumas plantas vivas

Além desta avaliação também foram estimada: altura de planta (AP - mm) e a massa fresca de planta (MFT - g). Com base nos dados da altura de planta calculou-se a redução percentual do crescimento (RPC - %) do tratamento com aplicação do caldo fermentado bruto do fungo *P. dimorpha* em comparação com o tratamento testemunha sem aplicação do caldo.

Todos os dados coletados foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade dos erros, e posteriormente ao teste F da análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey, adotando-se o nível de 5% de probabilidade de erro ($p \leq 0,05$) (Sisvar, versão 5.6) (Ferreira 2014).

5.1.3. Resultados e Discussão

Observou-se a ação bioherbicida dos metabólitos secundários de *P. dimorpha* sobre a porcentagem de germinação de sementes de *S. obtusifolia* (Tabela 2). A aplicação de metabólitos secundários de *P. dimorpha* inibiu totalmente a germinação, apresentando uma eficácia na ordem de 100%. Quanto ao tratamento testemunha em que se aplicou apenas água destilada, ocorreu 99% de germinação de sementes e as plântulas desenvolveram-se saudáveis (Tabela 2 e Figura 1).

A inibição da germinação das sementes de *S. obtusifolia* (L.) H. S. Irwin & Barneby observada neste trabalho evidencia que os metabólitos secundários produzidos por este fungo apresentam ação bioherbicida considerável e possibilidade para o desenvolvimento de produtos para o meio agrícola. Pesquisas com foco no controle biológico de plantas daninhas por meio da aplicação de metabólitos secundários provenientes de fungos do gênero *Phoma* também foram desenvolvidas por Cimmino et al. (2013), Hubbard et al. (2014), Evidente et al. (2015) e

Todero et al. (2018b). Estes autores observaram efeito fitotóxico em pré-emergência e pós-emergência de diversas espécies de plantas daninhas.

Tabela 2 - Porcentagem média de germinação (PG - % de plântulas normais) de sementes de *S. obtusifolia*, submetidas a aplicação de metabólitos secundários de *P. dimorpha*.

Tratamento	PG (%)
T1 - Testemunha	99,00a
T2 - Metabólitos secundários	0,00b
DMS	1,15
CV (%)	2,16

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, em nível de significância de 5%.

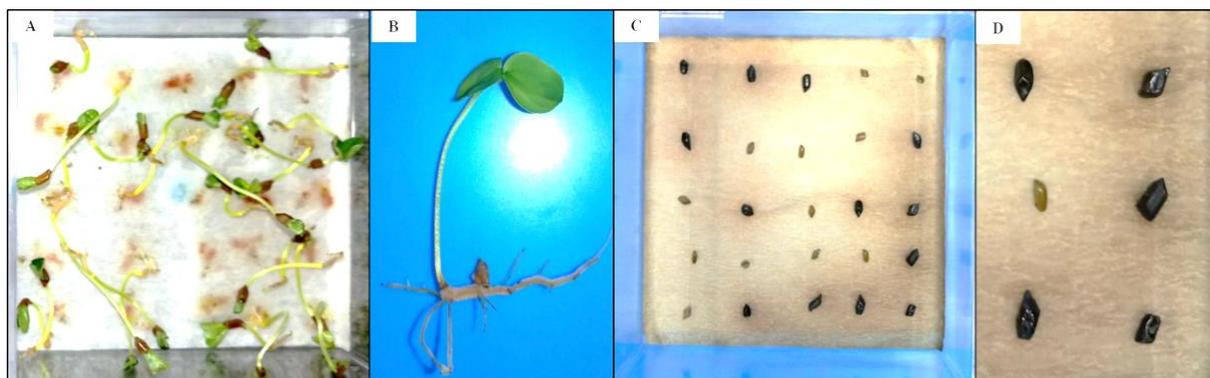


Figura 1 - Teste fitotóxico em sementes de *S. obtusifolia* (L.) H. S. Irwin & Barneby submetidas a aplicação de metabólitos secundários de *P. dimorpha*: A) Tratamento testemunha; B) Plântula do tratamento testemunha; C) Tratamento com aplicação de metabólitos secundários de *P. dimorpha*. e D) Detalhe da semente quando aplicado metabólitos secundários de *P. dimorpha*.

Resultados semelhantes foram reportados por Brun et al. (2016), que ao avaliarem o potencial herbicida do caldo fermentado bruto provenientes da fermentação submersa de *Phoma* sp. em biorreator, na germinação de sementes de *Cucumis sativus* var. wisconsin e *Sorghum bicolor*. Estes autores constataram que a aplicação de metabólitos secundários deste fungo ocasionou redução da germinação, com porcentagens de 100 e 84% de inibição, respectivamente, destacando o potencial das substâncias produzidas por este fungo para o biocontrole de plantas daninhas.

Todero et al. (2018a), avaliando a eficácia da atividade bioherbicida do caldo fermentado do fungo *Phoma* sp. concentrado proveniente de fermentação submersa, constataram em pré-emergência das plantas daninhas *Bidens pilosa* e *Amaranthus retroflexus*, inibição de 100% na germinação de sementes destas espécies.

Na Tabela 3, está apresentada a porcentagem de fitotoxicidade em função da aplicação de metabólitos secundários de *P. dimorpha* em folhas destacadas de *S. obtusifolia*. Observou-se nas folhas destacadas de *S. obtusifolia* um leve amarelecimento, a partir da primeira avaliação realizada 72 horas após a aplicação, intensificando-se até a última avaliação, realizada aos 9 dias após a aplicação do caldo fermentado bruto, quando verificou-se lesões severas, com amarelecimento e necrose acentuada (Tabela 3, Figura 2).

Brun et al. (2016) e Todero et al. (2018a) descreveram resultados semelhantes, ao avaliarem o efeito fitotóxico da aplicação do caldo fermentado bruto de *Phoma* sp. sobre folhas destacadas de *Cucumis sativus*. Eles observaram a ocorrência de leve amarelecimento e necrose nas folhas destacadas de *C. sativus* logo após 72 horas da aplicação, levando à morte total da folha na última avaliação.

Resultados similares foram descritos por Graupner et al. (2003), Vikrant et al. (2006) e Hubbard et al. (2014), que ao avaliarem a eficácia da aplicação do caldo fermentado bruto de diferentes espécies de *Phoma*, obtidos por fermentação submersa sobre folhas destacadas de plantas de *Cirsium arvense* L. e *Parthenium hysterophorus* (losna branca), observaram rápido amarelecimento e clorose, evoluindo para necrose e morte das folhas, como também redução do crescimento.

Bailey et al. (2011) e Hubbard et al. (2014) também encontraram eficácia dos metabólitos secundários produzidos pelo fungo *Phoma macrostoma* no controle biológico de outras espécies de plantas daninhas, como cardo do Canadá (*Cirsium arvense* (L.) Scop.) e camomila sem cheiro (*Matricaria perforata* Merat), respectivamente.

Tabela 3 - Teste de Fitotoxicidade (%) em folhas destacadas de *S. obtusifolia* aos 3, 6 e 9 dias após a aplicação de metabólitos secundários de *P. dimorpha*.

Tratamento	Fitotoxicidade (%)		
	3 DAA	6 DAA	9 DAA
T1 - Testemunha	0 ± 0,00b	0 ± 0,00b	0 ± 0,00b
T2 - Metabólitos secundários	40 ± 8,16a	70 ± 8,16a	90 ± 8,16a
DMS	9,99	9,99	9,99
CV (%)	28,87	16,50	12,83

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, em nível de significância de 5%.

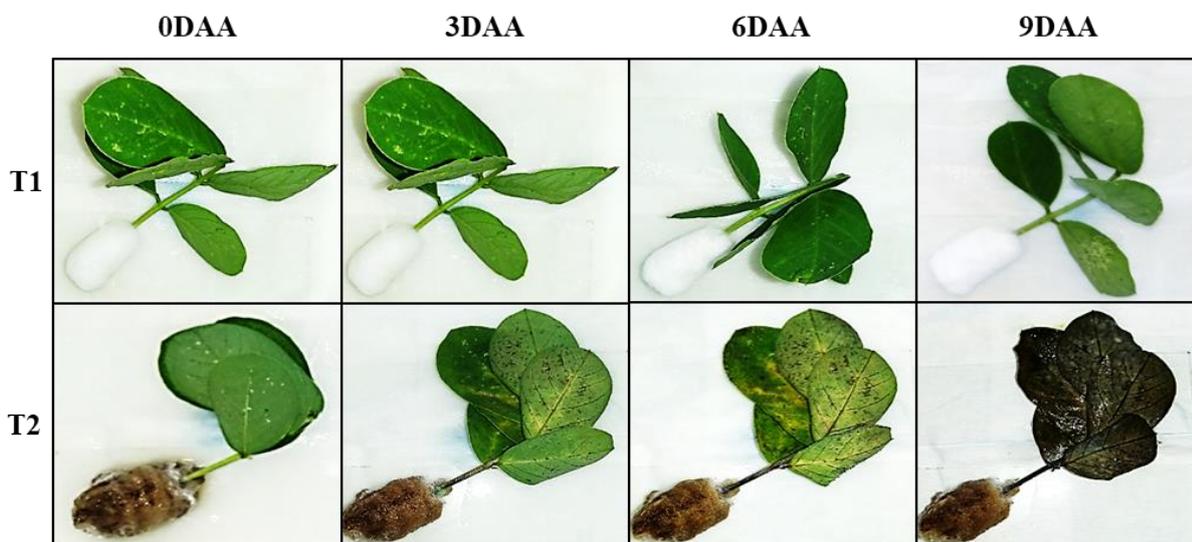


Figura 2 - Efeitos fitotóxico em folhas destacadas de *S. obtusifolia* (L.) H. S. Irwin & Barneby após 3, 6 e 9 dias após a aplicação de metabólitos secundários de *P. dimorpha*. *DAA = Dias após a aplicação, T1 = Testemunha e T2 = Metabólitos secundários.

Os resultados de fitotoxicidade em planta de *S. obtusifolia*, avaliados 15 dias após a aplicação dos tratamentos, estão apresentados na tabela 4. Foi possível observar a necrose das plantas de *S. obtusifolia* ocasionado pela aplicação do caldo fermentado bruto fungo *P. dimorpha* neste trabalho (Tabela 4, Figura 3).

Tabela 4 - Teste de fitotoxidade (%) em plantas de *S. obtusifolia* aos 15 dias após a aplicação de metabólitos secundários de *P. dimorpha*.

Tratamento	Fitotoxidade (%)
T1 - Testemunha	0 ± 0,00 b
T2 - Metabólitos secundários	30 ± 4,08 a
DMS	2,71
CV (%)	19,25

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, em nível de significância de 5%.



Figura 3 - Efeito fitotóxico em plantas de *S. obtusifolia*, 15 dias após a aplicação de metabólitos secundários de *P. dimorpha*.

Resultados semelhantes foram encontrados por Cimmino et al. (2013), que avaliando o potencial do metabólito da chenopodolina produzido pelo fungo *Phoma chenopodicola* em folhas de *Cirsium arvense* e *Setaria viridis*, observaram sintomas como necrose, murcha e degradação de tecidos foliares. Todero et al. (2018a), observaram que a aplicação de fermentados de *Phoma* sp. em pós-emergência de plantas de *Cucumis sativus* ocasionaram leve amarelecimento logo após a aplicação, evoluindo até o aparecimento de murchas e lesões necróticas, além disso, estes autores observaram alteração no crescimento das plantas.

Foi observada diferença significativa para altura de plantas (AP), sendo que a aplicação dos metabólitos secundários de *P. dimorpha* sobre plantas de *S. obtusifolia* resultou em uma menor altura. Resultados semelhantes foram observados por Brun et al. (2016) e Klaic et al. (2017), que constataram diferença na altura da planta bioindicadora *C. sativus* quando submetida à aplicação de metabólitos secundários produzidos pelo fungo *Phoma* sp.

A influência da aplicação de metabólitos secundários de *P. dimorpha* na altura de plantas de *S. obtusifolia* foi confirmada pela redução do percentual de crescimento (RPC). Foi

possível observar que a aplicação dos metabólitos secundários ocasionou redução significativa do crescimento das plantas de *S. obtusifolia*, com média de 20,80 % de redução quando comparado com o tratamento controle (Tabela 5).

Resultados semelhantes foram encontrados por Todero et al. (2018b), ao avaliarem diferentes formulações com metabólitos secundários provenientes da fermentação submersa de *Phoma* sp. com ação herbicida contra espécies de plantas daninhas, constataram uma redução de 31% na altura destas plantas. De acordo com Gronwald et al. (2002), a redução do crescimento de plantas daninhas é um fator importante para determinação de um potencial bioherbicida. Travaini et al. (2016) destacam que bioprodutos provenientes de metabólitos secundários de microbianos apresentam efeitos significativos de infecção, ocasionando redução do crescimento de plantas daninhas.

Os resultados de massa fresca de plantas (MFP) apresentados na Tabela 5 mostram que a aplicação de metabólitos secundários de *P. dimorpha* interferiu diretamente na redução da quantidade de MF de plantas de *S. obtusifolia*. A redução da massa fresca de plantas em função da aplicação de metabólitos secundários também foi constatada por Brun et al. (2016), que relatam redução do massa fresca de plantas de *C. sativus* 7 dias após a aplicação dos metabólitos secundários de *Phoma* sp. Otimizar o processo fermentativo em estado-sólido para produção de bioherbicida por *Phoma* sp., e avaliar a fitotoxicidade do caldo sobre plantas de *C. sativus*, Klaic et al. (2017) constataram que a aplicação deste bioherbicida apresentou redução da massa fresca 20% em comparação com o controle.

Tabela 5 - Altura de planta (AP - cm), redução do percentual de crescimento (RPC - %) e massa fresca de plantas (MFP - g) de plantas de *S. obtusifolia* aos 15 dias após a aplicação de metabólitos secundários de *P. dimorpha*.

Tratamento	AP (cm)	RPC (%)	MFP (g)
T1 - Testemunha	8,43 ± 0,76a	0,00 ± 0,00b	1,97 ± 0,45a
T2 - Metabólitos secundários	6,93 ± 0,70b	20,80 ± 2,07a	1,20 ± 0,14b
DMS	0,69	8,48	0,31
CV (%)	10,06	26,68	21,15

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, em nível de significância de 5%.

5.1.4. Conclusões

A aplicação de metabólitos secundários de *P. dimorpha* apresenta ação herbicida em pré-emergência, inibindo em 100% a germinação das sementes e em folhas destacadas, ocasionando a necrose e morte da folha no nono dia após a aplicação. Em pós-emergência a aplicação ocasionou sintomas moderados, com manchas nas folhas e redução no tamanho das plantas da espécie de planta daninha de pastagem *S. obtusifolia*.

Os metabólitos secundários de *P. dimorpha* possui elevado potencial herbicida, tornando-se uma alternativa para o desenvolvimento de bioprodutos para o manejo de plantas daninhas, ocasionando a redução do uso dos herbicidas sintéticos e a prevenção à poluição dos ecossistemas.

5.1.5. Referências

- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, v. 18, n. 2, p. 265-267, 1925.
- BAILEY, K. L. et al. Determining the infection process of *Phoma macrostoma* that leads to bioherbicidal activity on broadleaved weeds. *Biological Control*, v. 59, n. 2, p. 268-276. 2011.
- BAJWA A. A. et al. Biology and management of two important *Conyza* weeds: a global review. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, n. 24, p. 24694-24710.
- BAQUE, M. A. et al. Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. *Biotechnology Advances*, v. 30, n. 6, p. 1255-1267, 2012.
- BORTOLINI, M. F. et al. Superação de dormência em sementes de *Gleditschia amorphoides* Taub. *Ciência Rural*, v. 41, n. 5, p.823-827, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para análise de sementes*. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009.
- BRUN, T. et al. Production of bioherbicide by *Phoma* sp. in a stirred-tank bioreactor. *3 Biotech*, v. 6, n. 2, p. 230-239, 2016.
- 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.
- CORDEAU, S. et al. Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. *Crop Protection*, v. 87, n. 1, p. 44-49, 2016.

EVIDENTE, A. et al. Stagonolides G–I and Modiolide A, Nonenolides Produced by *Stagonospora cirsii*, a Potential Mycoherbicide for *Cirsium arvense*. *Journal of Natural Products*, v. 71, n. 1, p. 31-34, 2008.

EVIDENTE, M. et al. Phytotoxins produced by *Phoma chenopodiicola*, a fungal pathogen of *Chenopodium album*. *Phytochemistry*, v. 117, n. 1, p. 482-488, 2015.

FERREIRA, D. F. Sisvar: A Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência & Agrotecnologia*, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

FRANS, R. et al. Experimental design and techniques for measuring and analyzing plant responses to weed control practices. In: CAMPER, N. D. *Research methods in weed science*. Champaign: Southern Weed Science Society. 3. ed. 1986. p. 29-46.

GHOSHEH, H. Z. Constraints in implementing biological weed control: A review. *Weed Biology and Management*, v. 5, n. 3, 83-92, 2005.

GRAUPNER, P. R. et al. The macrocidins: novel cyclic tetramic acids with herbicidal activity produced by *Phoma macrostoma*. *Journal of Natural Products*, v. 66, n. 12, p. 1558-1561, 2003.

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.

HERATH, K. et al. Isolation, structure and biological activity of phomafungin, a cyclic lipodepsipeptide from a widespread tropical *Phoma* sp. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 3, p. 1361-1369, 2009.

HUBBARD, M. et al. The biochemistry behind biopesticide efficacy. *Sustainable Chemical Processes*, v. 2, n. 18, p. 1-8, 2014.

HUSSAIN, H. et al. New bioactive 2,3-epoxycyclohexenes and isocoumarins from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Laurus azorica*. *European Journal of Organic Chemistry*, v. 5, n. 8, p. 749-756, 2009.

JABRAN, K. et al. Allelopathy for weed control in agricultural systems. *Crop Protection*, v. 72, n. 1, 57-65, 2015.

KAUL, S. et al. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochemistry Reviews*, v. 11, n. 1, p. 487-505, 2012.

KLAIC, R. et al. Optimization of solid-state fermentation for bioherbicide production by *Phoma* sp. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 34, n. 2, p. 377-384, 2017.

LORENZI, H. *Plantas daninhas do Brasil: terrestres e aquáticas, parasitas e tóxicas*. 4. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008. 640 p.

- MACÍAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. G. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. *Journal Agriculture Food Chemistry*, v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000.
- MEULLER-STEOPER, D. et al. Contribution of the seed microbiome to weed management. *Weed Research*, v. 56, n. 5, p. 335-339, 2016.
- PEDRAS, M. S.; AHIAHONU, P. W. Phytotoxin production and phytoalexin elicitation by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Chemical Ecology*, v. 30, n. 11, p. 2163-2179. 2004.
- PERES, M. T. L. P. et al. Phytotoxic potential of *Senna occidentalis* and *Senna obtusifolia*. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 32, n. 3, p. 305-309, 2010.
- PISULA, N. L.; MEINERS, S. J. Relative allelopathic potential of invasive plant species in a young disturbed woodland. *Journal of the Torrey Botanical Society*, v. 137, n. 1, p. 81-87, 2010.
- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. et al. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. *Floresta*, v. 30, n. 1-2, p. 129-137, 2000.
- SURIYAGODA, L. et al. Growth and phosphorus nutrition of rice when inorganic fertiliser application is partly replaced by straw under varying moisture availability in sandy and clay soils. *Plant Soil*, v. 384, n. 1-2, p. 53-68, 2014.
- TODERO, I. et al. Concentration of metabolites from *Phoma* sp. using microfiltration membrane for increasing bioherbicidal activity. *Environmental Technology*, v. 22, n. 1, p. 1-9. 2018a.
- TODERO, I. et al. Formulation of a bioherbicide with metabolites from *Phoma* sp. *Scientia Horticulturae*, v. 241, n. 1, p. 285-292, 2018b.
- TRAVAINI, M. L. et al. Khellin and Visnagin, Furanochromones from *Ammi visnaga* (L.) Lam., as Potential Bioherbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 64, n. 50, p. 9475-9487, 2016.
- VIKRANT, P. et al. Characterization of a phytotoxin from *Phoma herbarum* for management of *Parthenium hysterophorus* L. J. *Phytopathol*, v. 154, n. 1, p. 461-68, 2006.
- WALKER, E. R.; OLIVER, L. R. Translocation and Absorption of Glyphosate in Flowering Sicklepod (*Senna obtusifolia*). *Weed Science*, v. 56, n. 3, p. 338-343, 2008.
- ZHANG, L. et al. New insight into the stereochemistry of botryosphaeridione from a *Phoma* endophyte. *Journal of Molecular Structure*, v. 1016, n. 1, p. 72-75, 2012.

5.2. ARTIGO VII: EFEITO DO CALDO FERMENTADO PRODUZIDO por *Phoma dimorpha* SOBRE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE E CRESCIMENTO DIFERENTES ESPÉCIES VEGETAIS

O presente artigo foi submetido para publicação em periódico científico da área.

Resumo: Algumas espécies do gênero *Phoma* são consideradas fonte potencial de substâncias biologicamente ativas, as quais podem ser utilizadas no meio agrícola. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do caldo fermentado com células do fungo *Phoma dimorpha* sobre a germinação, crescimento, massa fresca e seca de plântulas e em folhas destacadas de diferentes espécies de plantas bioindicadoras e daninhas encontradas em diferentes regiões do mundo: *Cucumis sativus*, *Triticum aestivum*, *Amaranthus cruentus*, *Bidens pilosa* e *Echinochloa sp.* Observou-se efeito significativo sobre a germinação de todas as espécies avaliadas. As sementes das espécies dicotiledôneas (*Cucumis sativus*, *Amaranthus cruentus* e *Bidens pilosa*) mostraram-se mais sensíveis, inibindo totalmente a germinação. As sementes das espécies monocotiledôneas apresentaram-se resistentes, com maior capacidade de germinação. Em geral, o crescimento das plântulas das espécies estudadas foi inibido pelo caldo fermentado do fungo *P. dimorpha*. No teste em folha destacada lesões foram observadas, com amarelecimento e necrose acentuada nas folhas de todas as espécies estudadas. O caldo fermentado do fungo *P. dimorpha* apresenta compostos biologicamente ativos, com ação bioherbicida com alta atividade fitotóxica.

Palavras-chave: fitotoxicidade, caldo fermentado, capacidade de germinação, plantas agrícolas, plantas daninhas.

Abstract: Some *Phoma* species are considered a potential source of biologically active substances that can be used in the agricultural environment. The aim of this study was to evaluate the effect of secondary metabolites present in the fermented broth of *Phoma dimorpha* fungus on seedling germination, growth, fresh and dry mass and on detached leaves of different species of bioindicators and weeds found in different regions of the world: *Cucumis sativus*, *Triticum aestivum*, *Amaranthus cruentus*, *Bidens pilosa* and *Echinochloa sp.* Significant effect on germination of all evaluated species was observed. The seeds of the dicotyledonous species

(*C. sativus*, *A. cruentus* and *B. pilosa*) were more sensitive, totally inhibiting germination. The seeds of monocotyledonous species were resistant, with greater germination capacity. In general, the seedling growth of the studied species was inhibited by the fermented broth of the fungus *P. dimorpha*. In the detached leaf test, lesions were observed, with yellowing and marked necrosis in the leaves of all studied species. The fermented broth of *P. dimorpha* fungus presents biologically active compounds with bioherbicidal action with high phytotoxic activity.

Keywords: phytotoxicity, fermented broth, germination capacity, agricultural plants, weeds.

5.2.1. Introdução

A interferência das plantas daninhas sobre o desenvolvimento e produtividade das culturas agrícolas vem se agravando, interferindo diretamente no potencial produtivo das culturas, que podem chegar à perda total da lavoura, e por consequência, a grandes perdas econômicas. As plantas daninhas apresentam elevada capacidade em competir com plantas cultivadas por água, luz, nutrientes, energia térmica e dióxido de carbono (PENARIOL et al., 2008; SURIYAGODA et al., 2014). As plantas daninhas apresentam grande agressividade contra as culturas agrícolas, por serem capazes de germinar, de maneira descontínua, através de inúmeros e complexos mecanismos de dormência de suas sementes, podendo até germinar e emergir das camadas mais profundas do solo. As sementes destas plantas possuem grande adaptação a variados ambientes e disseminação a curta e longa distância, com rápido crescimento vegetativo e florescimento (MEROTTO et al., 2002).

Atualmente o principal método de controle das plantas daninhas na agricultura é através da aplicação de herbicidas sintéticos, o qual é considerado muito eficiente (CHOU et al., 2010; BUNKOED et al., 2017). No entanto, quando utilizado de maneira incorreta, com aplicações de doses superiores as recomendadas, acarretam riscos à saúde e ao meio ambiente. Além disso, doses excessivas podem favorecer o desenvolvimento de espécies de plantas daninhas com resistência múltipla ao modo de ação de determinadas moléculas químicas, fato que vem sendo observado nos últimos anos (JABRAN et al., 2015; MEULLER-STEOWER et al., 2016). Desse modo, a busca por métodos de manejo que configura a agricultura sustentável vem tornando-se uma alternativa para o controle de plantas daninhas. Segundo Yang et al. (2014), o desenvolvimento de herbicidas não-poluente, seguros e ambientalmente corretos, tornou-se necessário e indispensável.

O controle biológico é uma alternativa sustentável para o manejo das plantas daninhas nas áreas agrícolas, que permite a substituição gradativa e redução da aplicação de herbicidas

sintéticos (BETTIOL, 2008; CHAGAS et al., 2014). Caracteriza-se como técnica que utiliza organismos vivos para controlar ou reduzir espécies de plantas indesejáveis, por meio da utilização de compostos bioativos produzidas pelo metabolismo secundário de fungos, bactérias e plantas. Essa estratégia de biocontrole denomina-se bioherbicida (VENZON et al., 2006).

Dentre estes microrganismos os fungos são os mais estudados para o controle de plantas daninhas, visto que diversas espécies de fungos fitopatogênicos possuem a capacidade de produzirem substâncias tóxicas às plantas daninhas (VILLAVERDE et al., 2014). Além deste aspecto fundamental, os fungos são encontrados em abundância na natureza, apresentando facilidade de identificação e de fácil cultivo em meios artificiais para produção massal (LI et al., 2003). Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos ao longo dos últimos anos e tem mostrado que fitotoxinas produzidas por fungos fitopatógenos apresentam atividade herbicida comprovada, como é o caso do fungo *Trichoderma* spp. (JAVAID; ALI, 2011), *Diaporthe* sp. (SOUZA et al., 2015; PES et al., 2016), *Phoma* sp. (GRAUPNER et al., 2003; CIMMINO et al., 2008; CIMMINO et al., 2013; EVIDENTE et al., 2016).

Estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de identificar fungos produtores de substâncias bioativas com potencial para serem explorados para a produção de bioprodutos destinados à agricultura (KAUL et al., 2012). Dentre estes, os fungos do gênero *Phoma* são um dos mais estudados, ganhando destaque em todo o mundo, por secretam metabólitos secundários como pigmentos de fitotoxina e antraquinona, os quais possuem grande potencial comprovado para o controle biológico de plantas daninhas (RAI et al., 2009; KIM et al., 2012; HUBBARD et al., 2014; BRUN et al., 2016). EM estudo recente

Pesquisas recentes evidenciam a ação bioherbicida de metabólitos produzidos pelo fungo *Phoma* sp. sobre plantas daninhas. Todero et al. (2018a) avaliaram a adição de adjuvantes aos metabólitos secundários produzidos pelo fungo *Phoma* sp. para potencializa o efeito bioherbicida sobre plantas daninhas. Eles constataram que a aplicação da formulação a base do caldo fermentado filtrado do fungo *Phoma* sp., óleo de palma e Tween®80 potencializou o efeito dos metabólitos produzidos pelo fungo em pré-emergência em três diferentes plantas daninhas *A. retroflexus*, *B. pilosa*, e *C. canadensis*. Luft et al. (2019) avaliaram diferentes métodos de concentração (membranas de fibra oca de ultra e microfiltração) de biopolímeros extracelulares produzidos por *Phoma* sp. por fermentação submersa. Os autores constataram que a absorção dos biopolímeros extracelulares sobre folhas destacadas de *C. sativus*, gerou maiores danos quando concentrados por membrana de fibra oca de microfiltração.

Assim, os estudos de inibição da germinação por parte da aplicação de compostos presentes no caldo fermentado de fungos são de grande importância visto que a interrupção do

processo germinativo de sementes de espécies de plantas daninhas cessa a perpetuação das espécies sendo um ponto crucial para o controle destas que interferem diretamente sobre a produção agrícola. A partir do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do caldo fermentado sem células do fungo *Phoma dimorpha* sobre a germinação, crescimento, massa fresca e seca de plântulas e em folhas destacadas de espécies de plantas bioindicadoras (*Cucumis sativus*, *Triticum aestivum*) e daninhas (*Amaranthus cruentus*, *Bidens pilosa* e *Echinochloa* spp.).

5.2.2. Material e Métodos

Os bioensaios foram realizados no período de maio a setembro de 2018, no Laboratório Biotec Factory do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS.

Para os ensaios de pré-emergência, assim como em folha destacada foram utilizadas sementes e folhas jovens de diferentes espécies de plantas, divididas em dois grupos: bioindicadoras e plantas daninhas (Tabela 1).

A resistência ou tolerância aos compostos presentes no caldo fermentado de fungos é uma característica espécie-específica, existindo aquelas mais sensíveis como *Cucumis sativus* L. (pepino) e *Triticum aestivum* (trigo), consideradas plantas indicadoras de atividade alelopática. Para que seja indicada como planta teste, uma determinada espécie deve apresentar germinação rápida e uniforme, e um grau de sensibilidade que permita expressar os resultados sob baixas concentrações das substâncias alelopáticas (GABOR; VEATCH, 1981; FERREIRA; ÁQUILA, 2000).

Tabela 1 - Espécies de plantas utilizadas no teste de germinação em função da aplicação dos metabólitos secundários provenientes da fermentação submersa do fungo *P. dimorpha*.

Nome científico	Nome comum
Plantas bioindicadoras	
<i>Cucumis sativus</i>	Pepino
<i>Triticum aestivum</i>	Trigo
Plantas daninhas	
<i>Amaranthus cruentus</i>	Caruru roxo
<i>Bidens pilosa</i>	Picão Preto
<i>Echinochloa</i> sp.	Capim-arroz

O microrganismo empregado no processo fermentativo foi o fungo *Phoma dimorpha* proveniente da coleção do Laboratório Biotec Factory do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria, onde são mantidas a 4°C em refrigerador.

Para a fermentação submersa, foram transferidos 2 discos (6 mm) de micélio fúngico, em crescimento ativo cultivado em meio BDA, para frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 130 mL do líquido de cultivo esterilizado a 121 °C em autoclave por 30 minutos. A composição do meio líquido de cultivo seguiu metodologia descrita por Para et al. (2005) e Zhang et al. (2012) (Tabela 2).

Tabela 2 - Composição do meio líquido de cultivo para o processo de fermentativo do fungo *P. dimorpha*.

Componente	Quantidade
Extrato de batata	200 g L ⁻¹
Dextrose	20 g L ⁻¹
Peptona	10 g L ⁻¹
Extrato levedura	7,5 g L ⁻¹
Sulfato de Amônio ((NH ₄) ₂ SO ₄)	2 g L ⁻¹
Sulfato Ferroso (FeSO ₄ .7H ₂ O)	1 g L ⁻¹
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄)	0,5 g L ⁻¹
Sulfato de Manganês (MnSO ₄ .H ₂ O)	1 g L ⁻¹

Fonte: Para et al. (2005) e Zhang et al. (2012).

Em seguida, os frascos foram mantidos a temperatura de 28 °C e agitação de 120 rpm (Innova 44R, New Brunswick) por um período de 10 dias, de acordo com método descrito por Klaic et al. (2017). Após este período, foi realizada a separação da biomassa do caldo fermentado do fungo, de modo a obter um caldo fermentado livre de células, o qual foi armazenado para posteriores avaliações.

Para o teste de germinação das diferentes espécies, foram utilizadas 200 sementes por espécie, as quais foram semeadas em caixas gerbox (11x11x4 cm), contendo duas folhas de papel (Germitest®) previamente umedecidas com o tratamento (Água destilada e Caldo fermentado) na proporção de 2,5 vezes a massa do papel seco, e mantidas em câmara de germinação tipo Biochemical Oxygen Demand (BOD), nas respectivas temperaturas de cada espécie, estabelecidas nas Regras de Análise de sementes (BRASIL, 2009), e fotoperíodo de 12/12 horas de luz/escuro.

A Porcentagem de germinação (PG - %) foi estimada pela contagem diária do número de sementes germinadas, considerando como semente germinada protrusão da radícula com comprimento mínimo de 2 mm (FERREIRA; AQUILA, 2000). O período de avaliação variou para cada espécie, os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009).

Ao final do teste de germinação foram realizadas avaliações de crescimento inicial, com o auxílio de um paquímetro digital (Topex 31C615, Polônia). Foi determinado o comprimento de dez plântulas por repetição, escolhidas ao acaso, e os resultados expressos em milímetros (mm) por plântula. Pesando-se em balança analítica (A42207c – Bel Engineering) todas as plântulas de cada repetição obtidas ao final do teste de germinação, estimou-se a massa fresca total de plântulas de cada espécie, e os resultados expressos em gramas (g) por plântula. Em seguida, para obtenção da massa fresca total, estas plântulas foram acondicionadas em envelopes de papel pardo e submetidas à secagem em estufa de ventilação forçada a temperatura de 70 °C, até massa constante, e os resultados expressos em gramas (g) por plântula.

Para avaliar o efeito fitotóxico da aplicação de metabólitos secundários do fungo *P. dimorpha* sobre folhas destacadas, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos em quatro repetições, sendo cada folha considerada uma repetição. Para isso foram coletadas folhas jovens das diferentes espécies avaliadas. Estas folhas foram dispostas em caixas gerbox previamente desinfetadas com etanol 70% e forradas com duas folhas de papel filtro umedecidas com água destilada, para evitar o ressecamento das folhas (PEDRAS; AHIAHONU, 2004).

A aplicação dos tratamentos foi realizada com uma pipeta automática, adicionando-se 3 mL sobre o algodão envolto ao pecíolo das folhas. Como controle no tratamento T1 aplicou-se apenas água destilada e no T2 aplicou-se o caldo fermentado do fungo *P. dimorpha*. Em seguida as caixas gerbox foram acondicionadas em câmara incubadora tipo BOD (POLEKO, modelo KK 350, Polônia) com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12/12 horas de luz/escuro (TODERO et al., 2018b).

A avaliação foi realizada no 9º dia após a aplicação, quantificando a área foliar com sintomas, com o auxílio do software Compu Eye (BAKR, 2005). Para isso, as folhas foram fotografadas individualmente. Os arquivos de imagem foram anexados e analisados pelo software, tendo como resultado a porcentagem de área afetada (sintomas) para cada folha.

Para a análise estatística dos resultados foi utilizado o programa estatístico SISVAR versão 5.1 (FERREIRA, 2014). Os resultados foram submetidos aos testes de normalidade e

homogeneidade dos erros, em seguida à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro ($p \leq 0,05$).

5.2.3. Resultados e Discussão

Na Tabela 3 são apresentados os resultados do teste de germinação das diferentes espécies avaliadas, após a aplicação do caldo fermentado contendo metabólitos secundários produzidos pelo fungo *P. dimorpha*. Observou-se efeito bioherbicida significativo ($p \leq 0,05$) para o tratamento com aplicação do caldo sobre a germinação de todas as espécies avaliadas (Tabela 3).

Observou-se maior sensibilidade das espécies dicotiledôneas (*Cucumis sativus*, *Amaranthus cruentus* e *Bidens pilosa*) ao tratamento com aplicação do caldo fermentado do fungo *P. dimorpha* que inibiu em 100% a germinação (Tabela 3, Figura 1). Para as espécies monocotiledôneas *Triticum aestivum* e *Echinochloa* spp., observou-se baixas porcentagens de germinação, com médias de 2,0 e 4,12 respectivamente (Tabela 3). Onde não ocorreu o desenvolvimento de parte aérea das plântulas, no entanto, houve uma leve protusão radicular, que no decorrer do teste veio a necrosar (Figura 1). Estes resultados mostram que os metabólitos secundários presentes no caldo fermentado do fungo *P. dimorpha* apresentam efeito inibitório de 100% sobre espécies de plantas bioindicadoras e daninhas de folhas largas, caracterizando-se como uma alternativa para a produção de bioprodutos destinados ao controle de plantas daninhas.

Resultados semelhantes foram observados por Bailey et al. (2011), que ao avaliarem o efeito de um bioherbicida produzido a partir do caldo fermentado livre de células do fungo *Phoma* sp., constataram maior efeito sobre sementes de espécies dicotiledôneas do que em monocotiledôneas. Porém o mesmo não foi observado por Brun et al. (2016), que ao aplicarem o caldo fermentado livre de células do fungo *Phoma* sp., constaram um amplo espectro de ação de herbicida em pré-emergência, onde observou-se inibição da germinação tanto para espécies monocotiledôneas (*Sorghum bicolor*) como de dicotiledôneas (*Cucumis sativus*).

De acordo com Zohaib et al. (2016), a diminuição da germinação e o prolongamento do tempo para atingir 50% de sementes germinadas podem estar relacionados à inibição de enzimas respiratórias e enzimas envolvidas na via das pentoses fosfato na germinação de sementes, em função dos compostos fenólicos presentes em extratos aquosos das plantas daninhas. A utilização de determinado bioherbicida em pré-emergência para o controle de plantas daninhas principalmente na fase inicial do estabelecimento da cultura, permite a redução

na emergência e na competição, favorecendo a diminuição do banco de sementes ao longo do tempo (PES et al., 2016).

Tabela 3 - Porcentagem média de germinação (% de plântulas normais), em função da aplicação dos metabólitos secundários do fungo *P. dimorpha* sobre sementes das diferentes espécies de plantas cultivadas e daninhas.

Espécies	Sementes germinadas (%)	
	Testemunha	Caldo Fermentado
<i>Cucumis sativus</i>	100 ± 0,00A	0 ± 0,00B
<i>Triticum aestivum</i>	100 ± 0,00A	3 ± 2,00B
<i>Amaranthus cruentus</i>	74 ± 2,56A	0 ± 0,00B
<i>Bidens pilosa</i>	79 ± 4,57A	0 ± 0,00B
<i>Echinochloa</i> spp.	71 ± 1,15A	11 ± 4,12B

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

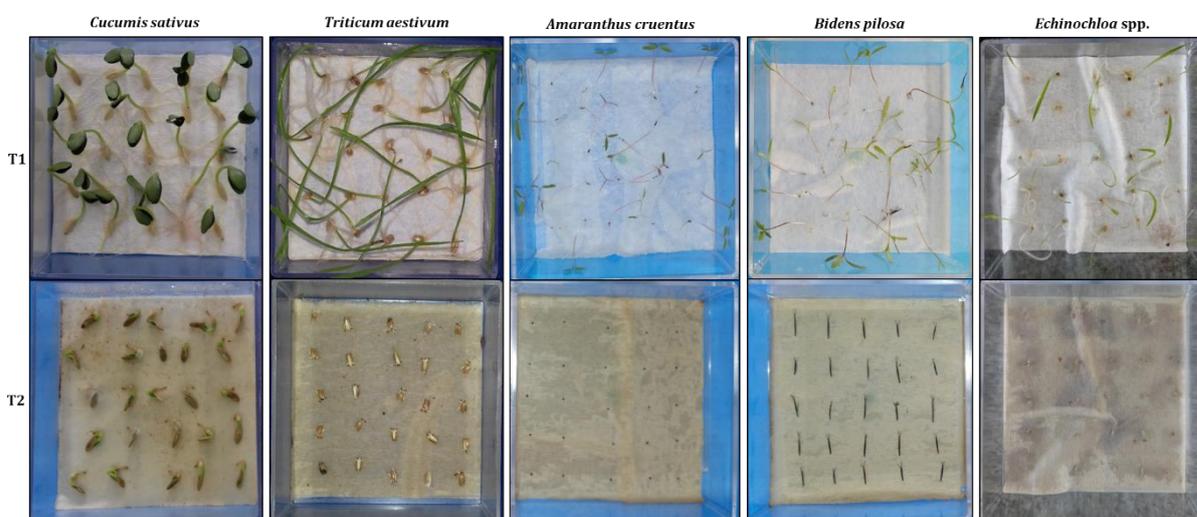


Figura 1 - Ação fitotóxica da aplicação dos metabólitos secundários do fungo *P. dimorpha* sobre as espécies de plantas bioindicadoras e daninhas: T1) Tratamento testemunha; T2) Tratamento com aplicação de metabólitos secundários do fungo *P. dimorpha*.

O comprimento de parte aérea e raiz das plântulas das diferentes espécies estudadas estão apresentadas na Tabela 4. Houve diferença significativa para comprimento da raiz e da parte aérea de plântulas das espécies estudadas em função da aplicação do caldo fermentado do fungo *P. dimorpha*. O comprimento tanto de parte aérea como de raiz foi superior na

testemunha, visto que as sementes germinaram e desenvolveram-se normalmente, o que não foi observado no tratamento com aplicação do caldo fermentado, onde ocorreu inibição total da germinação das sementes das espécies dicotiledôneas. Para as espécies monocotiledôneas a aplicação do caldo do fungo *P. dimorpha* gerou inibição total da emissão de parte aérea das sementes, porém houve um início da protrusão de radícula e posterior necrose (Tabela 2).

Quanto a massa fresca ocorreu diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos aplicados para todas as espécies estudadas (Tabela 4).

Tabela 4 - Comprimento de parte aérea e de raiz (mm), massa fresca e massa seca (g) de plântulas das diferentes espécies de plantas bioindicadoras e daninhas estudadas, sob efeito da aplicação dos metabólitos secundários do fungo *P. dimorpha*, provenientes do teste de germinação.

Espécies	Tratamento	Comp. de parte aérea (mm)	Comp. de raiz (mm)	Massa fresca (g)
<i>Cucumis sativus</i>	Testemunha	21,84 ± 6,70a	81,91 ± 5,69a	4,730 ± 0,28a
	Caldo Fermentado	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00b	0,000 ± 0,00b
<i>Triticum aestivum</i>	Testemunha	89,91 ± 2,28a	140,33 ± 5,09a	4,416 ± 0,32a
	Caldo Fermentado	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00b	2,327 ± 0,00b
<i>Amaranthus cruentus</i>	Testemunha	19,97 ± 0,94a	12,65 ± 0,83a	1,806 ± 0,03a
	Caldo Fermentado	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00b	0,000 ± 0,00b
<i>Bidens pilosa</i>	Testemunha	29,90 ± 3,92a	42,38 ± 8,58a	4,135 ± 0,47a
	Caldo Fermentado	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00b
<i>Echinochloa</i> spp.	Testemunha	41,74 ± 5,82a	26,67 ± 2,23a	0,241 ± 0,03a
	Caldo Fermentado	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00b	0,000 ± 0,00b

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Tabela 5, está apresentada a porcentagem de fitotoxicidade (sintomas) da aplicação do caldo fermentado do fungo *P. dimorpha* sobre folhas destacadas das diferentes espécies avaliadas. Para as folhas destacadas de *C. sativus* observou-se lesões, com amarelecimento e necrose acentuada (Figura 2).

Resultados similares foram descritos por Brun et al. (2016), que ao avaliarem o efeito da aplicação dos metabólitos secundários de *Phoma* sp. sobre folhas destacadas de *C. sativus*. Tais autores observaram a ocorrência de lesões como leve amarelecimento e leve necrose nas folhas destacadas de *C. sativus*.

Graupner et al. (2003) e Vikrant et al. (2006), ao avaliarem a eficácia da aplicação do caldo bruto de diferentes espécies de *Phoma* sp. obtidos por fermentação submersa sobre folhas destacadas de plantas de *Cirsium arvense* L. e *Parthenium hysterophorus* (losna branca), respectivamente, observaram rápido amarelecimento e clorose, seguida por necrose e morte das folhas, como também redução do crescimento.

Zhou et al. (2004) constataram atividade bioherbicida de *Phoma macrostoma* Mont. (Var. *Macrostoma*) contra mudas de dente-de-leão. Bailey e Derby (2001) e Hubbard et al. (2014) também encontraram eficácia dos metabolitos produzidos pelo fungo *Phoma macrostoma* para o controle biológico de outras plantas daninhas, como cardo do Canadá (*Cirsium arvense* (L.) Scop.) e camomila sem cheiro (*Matricaria perforata* Merat), respectivamente.

Resultados semelhantes foram descritos em estudo recente desenvolvido por Toderó et al. (2019). Estes autores avaliaram os efeitos fitotóxicos de exopolissacarídeos produzidos por fermentação submersa de *Fusarium fujikuroi* e submetidos a diferentes métodos de concentração (membranas, liofilização e evaporação), por meio de ensaios de absorção em folhas destacadas de *Cucumis sativus*. Foi constatado que a aplicação dos exopolissacarídeos concentrados produzidos por *F. fujikuroi* induziu sintomas de necrose (5,85%), clorose (16,66%) e ligeira despigmentação (77,79%) sobre folhas de *C. sativus*. Quando é aumentada a concentração de exopolissacarídeos ocorre um aumento no poder herbicida do caldo fermentado do fungo *F. fujikuroi*.

Tabela 5 - Teste de Fitotoxicidade (%) em folhas destacadas das diferentes espécies de plantas biondicadoras e daninhas, 9 após a aplicação dos metabólitos secundários do fungo *P. dimorpha*.

Espécies	Tratamento	Sintomas (%)					Sadia
		Despigmentação Leve	Clorose	Necrose	Amarelecimento	Despigmentação Total	
<i>C. sativus</i>	Testemunha	-	-	-	-	-	100
	Caldo Fermentado	-	82,73	17,27	-	-	-
<i>S. bicolor</i>	Testemunha	-	-	-	-	-	100
	Caldo Fermentado	-	100	-	-	-	-
<i>A. cruentus</i>	Testemunha	-	-	-	-	-	100
	Caldo Fermentado	30,63	10,08	5,41	28,86	25,29	-
<i>Bidens pilosa</i>	Testemunha	-	-	-	-	-	100
	Caldo Fermentado	-	-	100	-	-	-
<i>Echinochloa</i> spp.	Testemunha	-	-	-	-	-	100
	Caldo Fermentado	-	100	-	-	-	-

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

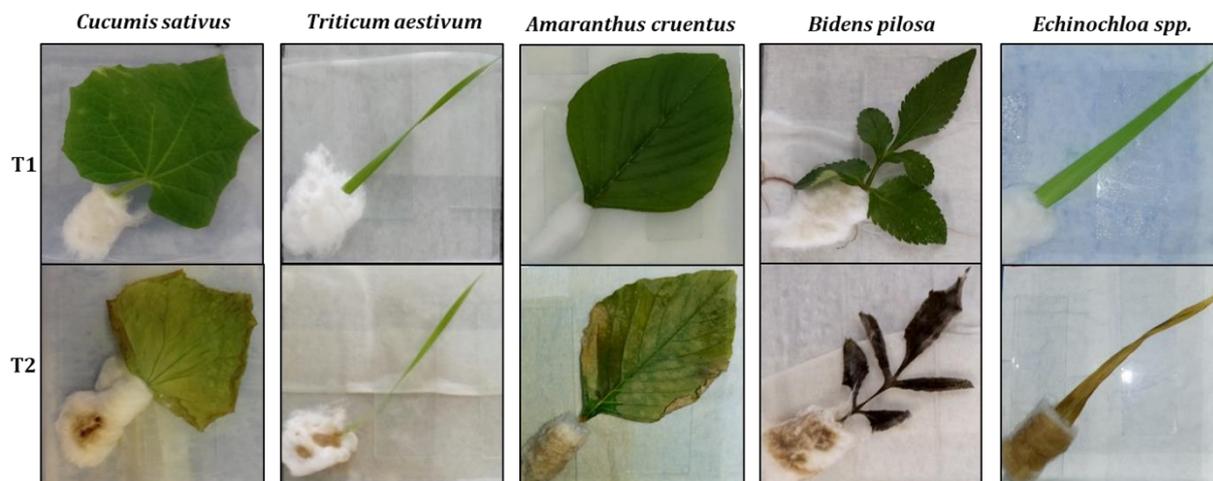


Figura 2 - Efeito fitotóxico em folhas destacadas das diferentes espécies de plantas biondicadoras e daninhas, 9 dias após a aplicação dos metabólitos secundários do fungo *P. dimorpha*: T1) Tratamento testemunha; T2) Tratamento com aplicação de metabólitos secundários do fungo *P. dimorpha*.

5.2.4. Conclusões

A aplicação do caldo fermentado do fungo *P. dimorpha* inibiu totalmente a germinação das sementes das espécies monocotiledôneas e reduziu significativamente a germinação das espécies dicotiledôneas. Em folhas destacadas, o caldo fermentado causou danos severos às folhas das espécies avaliadas.

5.2.5. Referências

- BAILEY, K. L.; PITT, W.M.; FALK, S.; DERBY, J. The effects of *Phoma macrostoma* on nontarget plant and target weed species. *Biological Control*, v. 58, n. 3, p. 379–386, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.06.001>
- BAILEY, K.L.; DERBY, J. Fungal isolates and biological control compositions for the control of weeds. US Patent Application Serial No. 60/294475. Filed May 20, 2001.
- BAKR, E. A new software for measuring leaf area, and area damaged by *Tetranychus urticae* Koch. *Journal of Applied Entomology*, v. 129, p.173-175, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2005.00948.x>
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 395 p.
- BRUN, T. RABUSKE, J.E.; TODERO, I.; ALMEIDA, T.C.; JUNIOR, J.J.D.; ARIOTTI, G.; CONFORTIN, T.C.; ARNEMANN, J.A.; KUHN, R.C.; GUEDES, J.V.C.; MAZUTTI, M.A.

- Production of bioherbicide by *Phoma* sp. in a stirred-tank bioreactor. 3 Biotech, v. 6, n. 2, p. 230-239, 2016. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0557-9>
- BUNKOED, W.; WICHITTRAKARN, P.; LAOSINWATTANA, C. Allelopathic Potential of Essential Oil from Bottle Brush (*Callistemon lanceolatus* DC.) on The Germination and Growth of *Echinochloa crus-galli* L. International Journal of Agricultural Technology, v.13, n.7.3, p.2693-2701, 2017.
- CHOU, C. H. Role of allelopathy in sustainable agriculture: Use of allelochemicals as naturally occurring bio-agrochemicals. Allelopathy Journal, v.25, n.1, p.3-16, 2010. <https://doi.org/10.1080/07352689991309414>
- CIMMINO, A.; ANDOLFI, A.; BERESTETSKIY, A.; EVIDENTE, A. Production of phytotoxins by *Phoma exigua* var *exigua*, a potential mycoherbicide against perennial thistles. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.56, n.15, p.630-634, 2008. <http://dx.doi.org/10.1021/jf8004178>
- CIMMINO, A.; ANDOLFI, A.; ZONNO, M.C.; AVOLIO, F.; BERESTETSKIY, A.; VURRO, M.; EVIDENTE, A. Chenopodolans A–C: phytotoxic furopyrans produced by *Phoma chenopodiicola*, a fungal pathogen of *Chenopodium album*. Phytochemistry, v.96, n.1, p.208-213, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.10.007>
- DAYAN, F.; DUKE, S.O. Natural Compounds as Next-Generation Herbicides. Plant Physiology, v.166, n.1, p.1090-1105, 2014. <https://doi.org/10.1104/pp.114.239061>
- EVIDENTE, M.; CIMMINO, A.; ZONNO, M. C.; MAIS, M.; SANTORO E.; VERGURA, S.; BERESTETSKIY, A.; SUPERCHI, S.; VURRO, M.; EVIDENTE, A. Chenopodolans E and F, two new furopyrans produced by *Phoma chenopodiicola* and absolute configuration determination of chenopodolan B. Tetrahedron, v.72, n.51, p.8502-8507, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2016.11.024>
- FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, v.12, n.esp., p.175-204, 2000.
- FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, v.12, p.175-204, 2000.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: A Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. Ciência & Agrotecnologia, v.38, n.2, p.109-112, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>
- GABOR, W.E.; VEATCH, C. Isolation of phytotoxin from quackgrass (*Agropyron repens*) rhizomes. Weed Science, v.29, n.2, p.155-159, 1981. <https://doi.org/10.1017/S0043174500061713>

- GRAUPNER, P.R.; CARR, A.; CLANCY, E.; GILBERT, J.; BAILEY, K.L.; DERBY, J.A.; GERWICK, B.C. The macrocidins: novel cyclic tetramic acids with herbicidal activity produced by *Phoma macrostoma*. *Journal of Natural Products*, v.66, n.12, p.1558-1561, 2003. <http://dx.doi.org/10.1021/np030193e>
- HUBBARD, M.; HYNES, R.K.; ERLANDSON, M.; BAILEY, K.L. The biochemistry behind biopesticide efficacy. *Sustainable Chemical Processes*, v.2, n.18, p.1-8, 2014. <https://doi.org/10.1186/s40508-014-0018-x>
- JABRAN, K.; MAHAJAN, G.; SARDANA, V.; CHAUHAN, B.S. Allelopathy for weed control in agricultural systems. *Crop Protection*, v.72, p.57-65, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.03.00>
- 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. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392011000200004>
- KAUL, S.; GUPTA, S.; AHMED, M.; DHAR, M.K. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochemistry Reviews*, v.11, n.1, p.487-505, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9260-6>
- KIM, E.L.; LI, J.L.; DANG, H.T.; HONG, J.; LEE, C.O.; KIM, D.K.; YOON, W.D.; KIM, E.; LIU, Y.; JUNG, J.H. Cytotoxic cytochalasins from the endozoic fungus *Phoma* sp. of the giant jellyfish *Nemopilema nomurai*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.22, n.9, p.5752-5752, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.03.058>
- KLAIC, R.; SALLET, D.; FOLETTI, E.L.; JACQUES, R.J.S.; GUEDES, J.V.C.; KUHN, R.C.; MAZUTTI, M.A. Optimization of solid-state fermentation for bioherbicide production by *Phoma* sp. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.34, n.02, p.377-384, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20170342s20150613>
- LUFT, L.; CONFORTIN, T.C.; TODERO, I.; CHAVES NETO J.R.; Tonato, D.; ZABOT, G.L.; MAZUTTI, M.A. Different techniques for concentration of extracellular biopolymers with herbicidal activity produced by *Phoma* sp. *Environmental Technology*, p.1-27. 2019. DOI: 10.1080/09593330.2019.1669720
- MEROTTO, J.A.; VIDAL, R.A.; FLECK, N.G.; ALMEIDA, M.L. Weed Interference in the Initial Development of Soybean and Rice Plants through Light Quality. *Planta Daninha*, v.20, n.1, p.9-16, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582002000100002>
- MEULLER-STEOWER, D.; NYBROE, O.; BARAIBAR, B.; LODDO, D.; EIZENBERG, H.; FRENCH, K.; SØNDERSKOV, M.; NEVE, P.; PELTZER, D.A.; MACZEY, N.;

- CHRISTENSEN, S. Contribution of the seed microbiome to weed management. *Weed Research*, v.56, n.5, p. 335-339, 2016. <https://doi.org/10.1111/wre.12218>
- PARRA, R.; ALDRED, D.; MAGAN, N. Medium optimization for the production of the secondary metabolite squalestatin S1 by a *Phoma* sp. combining orthogonal design and response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, v.37, n.7, p.704-711, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.04.009>
- PEDRAS, M.S.; AHIAHONU, P.W. Phytotoxin production and phytoalexin elicitation by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Chemical Ecology*, v.30, n.11, p.2163-2179, 2004. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000048781.72203.6c>
- PENARIOL, M.C.; MONTEIRO, A.C.; PITELLI, R.A. Growth and sporulation of *bipolaris euphorbiae* cultivated under different nutritional conditions. *Ciência Rural Santa Maria*, v.38, n.7, p.1907-1913, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000700016>
- PES, M.P.; MAZUTTI, M.A.; ALMEIDA, T.C.; Curioletti, L.E.; MELO, A.A.; GUEDES, J.V.C.; KUHN, R.C. Bioherbicide based on *Diaporthe* sp. secondary metabolites in the control of three tough weeds. *African Journal of Agricultural Research*, v.11, n.42, p.4242-4249, 2016. <https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11639>
- RAI, M.; DESHMUKH, P.; GADE, A.; INGLE, A.; KÖVICS, G.J.; IRINYI, L. *Phoma Saccardo*: Distribution, secondary metabolite production and biotechnological applications. *Critical Reviews in Microbiology*, v.35, n.3, p.182-196, 2009. <https://doi.org/10.1080/10408410902975992>
- SOUZA, A.R.C.; BORTOLUZZI, D.; LIMA, J.; PORTO, V.; MARCUZ, C.; FERRAZ, R.C.; KUHN, R.C.; JACQUES, R.J.S.; GUEDES, J.V.C.; MAZUTTI, M.A. Bioherbicide production by *Diaporthe* sp. isolated from the Brazilian Pampa biome. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v.4, n.1, p.575-578, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.09.005>
- SURIYAGODA, L.; COSTA W.A.J.M.; LAMBERS, H. Growth and phosphorus nutrition of rice when inorganic fertiliser application is partly replaced by straw under varying moisture availability in sandy and clay soils. *Plant Soil*, v.384, n.1-2, p.53-68, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2049-1>
- TODERO, I.; CONFORTIN, T. C.; LUFT, L.; SEIBEL, J.; KUHN, R. C.; TRES, M. V.; MAZUTTI, M. A. Concentration of exopolysaccharides produced by *Fusarium fujikuroi* and application of bioproduct as an effective bioherbicide. **Environmental Technology**, v. 1, n. 1, p. 1-21, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1580775>
- TODERO, I.; CONFORTIN, T.C.; LUFT, L.; BRUN, T.; UGALDE, G.A.; ALMEITA, T.C.; ARNEMANN, J.A.; ZABOT, G.L.; MAZUTTI, M.A. Formulation of a bioherbicide with

metabolites from *Phoma* sp. *Scientia Horticulturae*, v.241, n.1, p.285-292, 2018a. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.07.009>

TODERO, I.; CONFORTIN, T.C.; SOARES, J.F.; BRUN, T.; LUFT, L.; RABUSKE, J.E.; KUHN, R.C.; TRES, M.V.; ZABOT, G.L.; MAZUTTI, M.A. Concentration of metabolites from *Phoma* sp. using microfiltration membrane for increasing bioherbicidal activity. *Environmental Technology*, v.22, n.1, p.1-9. 2018b. <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1441330>

VENZON, M. ROSADO, M.C.; EUZÉBIO, D.E.; SOUZA, B.; SCHOEREDER, J.H. Suitability of leguminous cover crop pollens as food source for the green lacewing *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). *Neotropical Entomology*, v.35, n.3, p.371-376, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2006000300012>

VIKRANT, P.; VERMA, K.K.; RAJAK, R.C.; PANDEY, A.K. Characterization of a phytotoxin from *Phoma herbarum* for management of *Parthenium hysterophorus* L. *J. Phytopathol*, v.154, n.1, p.461-68, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2006.01129.x>

ZHANG, L.; WANG, S-Q.; LI, X-J.; ZHANG, A-L.; ZHANG, Q.; GAO, J-M. New insight into the stereochemistry of botryosphaeridione from a *Phoma* endophyte. *Journal of Molecular Structure*, v. 1016, n.1, p. 72-75, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2012.02.041>

ZOHAIB, A.; ABBAS, T.; TABASSUM, T. Weeds cause losses in field crops through allelopathy. *Not Science Biological*, v. 8, p. 47-56, 2016. <https://doi.org/10.15835/nsb.8.1.9752>

CAPÍTULO 6 - CONCENTRAÇÃO E FORMULAÇÃO DE BIOHERBICIDA

Neste Capítulo é apresentado o artigo relacionado ao processo de concentração do caldo fermentado do fungo *Phoma dimorpha* por processo de separação por membranas e também a produção de formulações, geradas pela mistura de diferentes óleos vegetais com os adjuvantes Span®80, Tween®80 e a fração retida proveniente das membranas de ultrafiltração, microfiltração e nanofiltração, com o objetivo de potencializar a ação bioherbicida do caldo concentrado.

6.1. ARTIGO VIII: AÇÃO FITOTÓXICA DE METABÓLITOS DE *Phoma dimorpha* NO CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS: CONCENTRAÇÃO POR MEMBRANAS, FORMULAÇÃO E APLICAÇÃO

O presente artigo foi submetido para publicação em periódico científico da área.

Resumo: Dentre as alternativas de controle de plantas daninhas destaca-se o controle biológico que tem como base o uso de metabólitos secundários provenientes da fermentação de microrganismos, sendo o grupo dos fungos endófitos os mais investigados. Para estabelecer o uso dos metabólitos secundários no controle biológico, além de concentrar e realizar teste de eficácia, é necessário desenvolver formulações que proporcionem ao produto final, estabilidade, molhabilidade, espalhabilidade e penetração. O objetivo deste trabalho foi concentrar por membranas poliméricas e formular o caldo fermentado concentrado do fungo *Phoma dimorpha* para potencializar a ação bioherbicida. O caldo fermentado foi concentrado por membranas de ultrafiltração (UP010), microfiltração (MP005) e nanofiltração (NP010). Em seguida, foi selecionada a fração retida de cada membrana que apresentou maior efeito fitotóxico sobre folhas de *Cucumis sativus*. A partir destas frações, foram produzidas as diferentes formulações, por meio da mistura com diferentes óleos vegetais (óleo de palma, soja e canola) e com os adjuvantes Span®80 e Tween®80. A eficácia destas formulações foi avaliada mediante aplicação sobre as espécies de plantas daninhas: *Amaranthus cruentus*, *Bidens pilosa*, *Echinochloa* sp., *Senna obtusifolia*. A concentração do caldo fermentado do fungo *Phoma dimorpha* por processo de separação por membranas mostrou-se eficiente, visto que reduziu a tensão superficial da fração retida, ficando abaixo dos valores do caldo bruto, e elevou a tensão superficial da fração permeada, ficando acima do caldo bruto e próximo da

tensão da água. O processo de concentração intensificou o efeito fitotóxico do caldo concentrado (fração retida) sobre folhas destacadas de *C. sativus* independentemente do processo utilizado. As frações retidas que ocasionaram maior efeito fitotóxico sobre folhas destacadas de *C. sativus* para o processo de concentração com a membrana UP010 foi o Ensaio 7 (4 bar e 25 °C), com a membrana MP005 foi o Ensaio 2 (3,5 bar e 30 °C) e com a membrana NP010 foi o Ensaio 4 (8,5 bar e 20 °C). As formulações do caldo concentrado provenientes de cada membrana, independente do óleo vegetal e da espécie de planta daninha alvo, ocasionaram injúrias desde pequenas manchas, amarelecimentos e necrose nas folhas, até danos à gema apical, paralização do crescimento e por fim morte de algumas plantas. As formulações com a fração retida do caldo proveniente da membrana de nanofiltração (NP010) ocasionaram maior fitotoxicidade e redução na altura das plantas daninhas.

Palavras chave: Controle Biológico. *Phoma dimorpha*. Membranas poliméricas. *Amaranthus cruentus*. *Bidens pilosa*. *Echinochloa* sp. *Senna obtusifolia*.

Abstract: Among the weed control alternatives, stands out the biological control based on the use of secondary metabolites from the fermentation of microorganisms, being the group of endophyte fungi the most investigated. To establish the use of secondary metabolites in biological control, in addition to concentrating and performing efficacy testing, it is necessary to develop formulations that provide the end product with stability, wettability, spreadability and penetration. The objective of this work was to concentrate by polymeric membranes and formulate the fermented broth of *Phoma dimorpha* fungus to potentiate the bioherbicidal action. Subsequently, the fermented broth was concentrated by ultrafiltration (UP010), microfiltration (MP005) and nanofiltration (NP010) membranes. Then, the retentate fraction with the highest phytotoxic effect on *Cucumis sativus* leaves was selected. From these fractions the different formulations were produced by mixing with different vegetable oils (palm oil, soybean and canola) and with the adjuvants Span®80 and Tween®80. The effectiveness of these formulations was evaluated by applying them to the weed species *Amaranthus cruentus*, *Bidens pilosa*, *Echinochloa* sp., *Senna obtusifolia*. The concentration of fermented broth of *Phoma dimorpha* fungus by membrane separation process was efficient, since it reduced the surface tension of the retentate fraction, being below the values of the raw broth and increased the surface tension of the permeated fraction, being above the broth. rough and close to the water tension. The concentration process intensified the phytotoxic effect of concentrated broth (retentate fraction) on detached leaves of *C. sativus* independent of the membrane used. The

retentate fraction that caused the greatest phytotoxic effect on detached leaves of *C. sativus* for the concentration process with the UP010 membrane were Test 7 (4 bar and 25 °C), with the MP005 membrane was Test 2 (3.5 bar and 30 °C) and with NP010 membrane was Test 4 (8.5 bar and 20 °C). The concentrate broth formulations from each membrane, regardless of the vegetable oil and the target weed species, caused injuries ranging from small spots, yellowing and leaf necrosis, to damage to the apical bud, growth paralysis and eventually death of some plants. The formulations with the concentrated fraction of the broth from the nanofiltration membrane (NP010) caused greater phytotoxicity and reduction in weed height.

Key words: Biological Control. *Phoma dimorpha*. *Amaranthus cruentus*. *Bidens pilosa*. *Echinochloa* sp. *Senna obtusifolia*.

6.1.1. Introdução

Nas últimas décadas, as plantas daninhas vêm causando perdas consideráveis na produção agrícola. A principal forma de manejo destas plantas é o controle químico. Este controle baseia-se na aplicação de herbicidas sintéticos. No entanto, seu uso a longo prazo, pode ocasionar a evolução da resistência a herbicidas em espécies de plantas daninhas (YASUOR et al., 2008). Com base nesta problemática, pesquisas vêm sendo desenvolvidas nos últimos anos com o intuito de produzir bioherbicidas, a fim de reduzir a dependência por produtos químicos e um maior uso de produtos biológicos nos sistemas agrícolas, pelo fato de serem biodegradáveis, seletivos a outros organismos, seguros ao meio ambiente e ao homem (LEE et al., 2013; BO et al., 2019).

O controle biológico mostra-se como uma alternativa que permite a substituição, mesmo que gradativa do uso de agroquímicos. Esta medida de controle consiste na manipulação do ambiente produtivo para aumentar a sobrevivência e o desempenho dos inimigos naturais, bem com na utilização de compostos presentes em extratos de plantas e em caldos fermentados de microrganismos, que apresentem atividade biológica e que venham reduzir populações de insetos, patógenos e plantas daninhas (VENZON et al., 2006; CHAGAS, et al. 2014).

O uso de compostos secundários é tido como mais uma forma potencial de controle biológico. Atualmente pouco se conhece sobre a composição química dos caldos fermentados de microrganismos, para que estes venham a ser utilizados no controle biológico. Os metabólitos secundários produzidos pelos fungos, bactérias e actinomicetos são as fitotoxinas. Dentre estes microrganismos, os fungos são os mais estudados, pois diversos fungos endofíticos

possuem a capacidade de produzirem substâncias tóxicas (BAQUE et al., 2012; GHOSHEH, 2005).

Fungos endofíticos são microrganismos que residem nos tecidos de suas plantas hospedeiras e não causam sintomas aparentes da doença. Verificou-se que os metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos possuem expressiva atividade biológica (GAO et al., 2013). Entre eles, o gênero *Phoma* é um dos contribuintes importantes, que podem produzir diversas substâncias químicas com vários tipos de atividade biológica (CIMMINO et al., 2013; SANG et al., 2017; TAN et al., 2018).

A mistura de produtos fitossanitários com adjuvantes pode ter um efeito aditivo ou sinérgico quando o efeito dos produtos das misturas aumenta a eficiência no controle. Ou ainda, pode ocorrer o efeito antagônico quando o efeito da mistura diminui o efeito do produto fitossanitário (ANTUNIASSI & BOLLER, 2011). Assim, é de fundamental importância obter conhecimento das características físico químicas dos produtos e estudar o comportamento dos produtos em misturas. Os óleos vegetais e minerais quando estão na função de adjuvantes podem favorecer o espalhamento e a absorção por apresentarem uma porcentagem variável de surfactante em sua composição, em média de 5 a 9%, reduzindo a taxa de degradação do ingrediente ativo do produto fitossanitário e a tensão superficial da calda de aplicação. Os óleos vegetais são provenientes do processamento de grãos (MENDONÇA et al., 2007).

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

Green et al. (2007) relataram a utilização de tensoativos e surfactantes nas suspensões líquidas dos bioherbicidas ou dissolvidos em micelas, o que provoca o aparecimento de emulsões para melhorar a eficiência do bioherbicida. Os surfactantes podem ser classificados

em grupos com base em sua ionização em água e isso pode dar alguma pista sobre como um novo surfactante vai se comportar em um ambiente de controle biológico.

Diante do exposto, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de concentrar por membranas planas poliméricas de diferentes tamanhos de poros e formular com diferentes óleos vegetais e adjuvantes o caldo fermentado do fungo *Phoma dimorpha* para potencializar sua ação fitotóxica.

6.1.2. Material e Métodos

6.1.2.1. MICRORGANISMO: MANUTENÇÃO E CONSERVAÇÃO DA CEPA

O microrganismo utilizado nas fermentações foi o fungo *Phoma dimorpha* (NRRL 43879). As cepas deste fungo foram obtidas junto ao National Center for Agricultural Utilization Research – EUA (ARS) e mantidas na coleção do laboratório o Biotec Factory do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

A preservação do fungo *P. dimorpha* foi realizada pelo método de fragmentos de papel-filtro, de acordo com o método Alfenas e Mafia (2007). Inicialmente, fragmentos de papel contendo o micélio do fungo e armazenados em microtubos de 2 mL do tipo Eppendorf a -15 °C, foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura Agar Batata Dextrose (BDA), sendo mantidos em estufa bacteriológica à temperatura de 28 °C na ausência de luz.

6.1.2.2. PROCESSO FERMENTATIVO E CONDIÇÕES DE CULTIVO

O processo fermentativo utilizado foi a fermentação submersa. O meio líquido de cultivo utilizado no processo de fermentação era composto por: extrato de batata 200 g/L, dextrose 20 g/L, peptona 10 g/L, extrato levedura 7,5 g/L, sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) 2 g/L, sulfato ferroso (FeSO₄.7H₂O) 1g/L, sulfato de magnésio (MgSO₄) 0,5 g/L, sulfato de manganês (MnSO₄.H₂O) 1g/L (PARA et al., 2005; ZHANG et al., 2012).

Após o preparo do meio de cultivo, o pH foi corrigido para 6,0. Em seguida 130 ml do meio foram transferidos para frascos Erlenmeyers de 250mL. Estes foram posteriormente esterilizados em autoclave a 121 °C por 30 minutos. Após a redução da temperatura, foram transferidos 2 discos (6 mm) de micélio fúngico, cultivado em meio BDA, para erlenmeyers contendo 130 mL de meio líquido de cultivo esterilizado. Os erlenmeyers foram mantidos a uma temperatura de 28 °C e uma agitação de 120 rpm por um período de 10 dias (New Brunswick, Innova 44R), de acordo com metodologia descrita por Klaic et al. (2017). Após este

período de incubação, foi realizada a separação da biomassa do caldo fermentado do fungo, de modo a obter um caldo fermentado sem células, em seguida armazenado em freezer a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posteriores avaliações.

6.1.2.3. CONCENTRAÇÃO POR MEMBRANAS DO CALDO FERMENTADO

Os ensaios de concentração do caldo fermentado bruto do fungo *P. dimorpha* foram realizados utilizando membranas planas de ultrafiltração (UF), microfiltração (MF) e nanofiltração (NF). O sistema de filtração foi operado em filtração convencional (*dead end filtration*). Foram utilizadas membranas poliméricas planas, adquiridas da NADIR[®] membranes sendo suas especificações apresentadas na Tabela 1. As membranas foram cortadas em discos planos com área de $0,001018\text{ m}^2$. O condicionamento foi feito pela imersão das membranas em água destilada.

Tabela 1 - Características das membranas utilizadas neste trabalho.

Classe ^a	Membrana		MWCO ou Retenção	Fluxo de água (L/m ² h)
	Polímero	Código		
UF	PES ^b	UP010	10 kDa	>150
MF	PES ^b	MP005	0,05 μm	>800
NF	PES ^b	NP010	25 – 55 % Na ₂ SO ₄	>200

^a UF: ultrafiltração, MF: microfiltração e NF: nanofiltração.

^b PES: poli(éter sulfona).

A vista geral da unidade experimental utilizada para os ensaios, está apresenta na Figura 1. O sistema foi operado em modo convencional (*dead end filtration*), sendo que a amostragens foram coletadas em intervalos de 10 minutos durante a execução dos ensaios.

O aparato experimental utilizado para concentrar o caldo fermentado do fungo *P. dimorpha* utilizando membranas planas apresenta os seguintes componentes: a) Cilindro de Nitrogênio comprimido 2.2, capacidade de 6 m^3 (Air Liquide); b) Válvula reguladora de pressão de duplo estágio com dois manômetros acoplados; c) Banho ultratermostático (Solab, SL-152); d) Módulo de filtração convencional (*dead end filtration*) de aço inoxidável 304 com capacidade de 500 mL. O módulo possui duas conexões superiores, sendo uma utilizada para conectar-se a linha de nitrogênio (responsável pela pressurização do sistema) no módulo de membranas, outra para conectar-se o retorno da água do banho ultratermostático. A parte inferior possui duas conexões, sendo uma utilizada para retirada de permeado e a outra para entrada de água do banho ultratermostático. Tanto a parte superior quanto a inferior do módulo possuem um anel de vedação de borracha buna, sendo estes os responsáveis pela vedação do módulo

impedindo vazamentos internos ou externos; e e) Agitador magnético com aquecimento (Solab, SL-91).

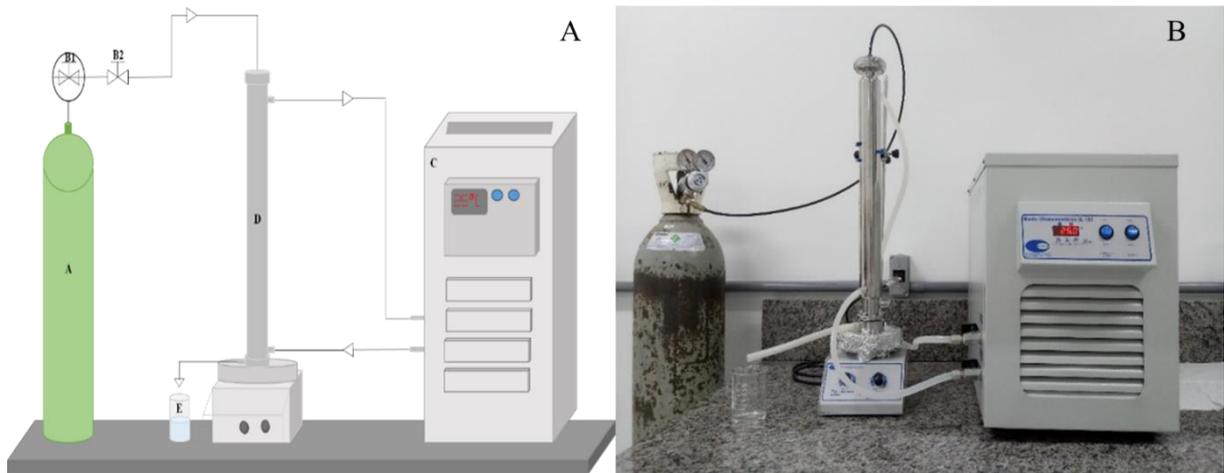


Figura 1 - (A) Diagrama esquemático do aparato experimental (A - cilindro de Nitrogênio; B - válvula reguladora de pressão de duplo estágio acoplada aos dois manômetros; B1 - válvula de abertura do cilindro; B2 - válvula de pressurização do gás; C - banho ultratermostatizado; D - módulo de separação com membrana tipo plana e E - frasco coletor de permeado. (B) Aspecto visual da unidade experimental utilizada para concentração do caldo fermentado do fungo *P. dimorpha* utilizando membranas planas. Fonte: o autor

Inicialmente realizava-se a montagem do módulo de filtração, com o ajuste das membranas em discos planos ($0,001018 \text{ m}^2$) na parte inferior da célula de permeação, seguido do disco suporte de aço perfurado, subsequentemente a colocação do anel de vedação. Após a colocação do anel aparafusava-se os quatro parafusos para garantir a vedação da parte inferior do módulo. Com a montagem da parte inferior finalizada, realizava-se a adição da amostra, mais a barra magnética no módulo de filtração, seguido do anel de vedação da parte superior e rosqueava-se a parte superior do módulo. Posteriormente o módulo era depositado sobre o agitador magnético, e conecta-se as mangueiras de fluxo de água do banho ultratermostático para controle da temperatura dos ensaios.

Os ensaios iniciavam-se com a estabilização da temperatura de trabalho do banho ultratermostático (baseado no planejamento de experimentos), por um período de 30 minutos. Em seguida, realiza-se a abertura da válvula (B1) do cilindro de nitrogênio (A). Após 10 minutos realiza-se o fechamento da segunda válvula (B2), de modo a pressurizar o módulo de membranas, em uma pressão pré-estabelecida para cada ensaio.

Nos ensaios laboratoriais foi utilizado um planejamento experimental composto central 2^2 com três repetições no ponto central, constituído por quatro ensaios lineares nos níveis - 1 e + 1 e três ensaios no ponto central (Tabela 2).

Tabela 2 - Planejamento experimental Composto Central 2^2 com três repetições no ponto central, para membrana de ultrafiltração (UP010), microfiltração (MP005) e nanofiltração (NP010).

Ensaio	Pressão (bar)	Temperatura (°C)
UP010		
1	2 (-1)	20 (-1)
2	2 (-1)	30 (+1)
3	6 (+1)	30 (+1)
4	6 (+1)	20 (-1)
5	4 (0)	25 (0)
6	4 (0)	25 (0)
7	4 (0)	25 (0)
MP005		
1	3,5 (-1)	20 (-1)
2	3,5 (-1)	30 (+1)
3	6,5 (+1)	30 (+1)
4	6,5 (+1)	20 (-1)
5	5 (0)	25 (0)
6	5 (0)	25 (0)
7	5 (0)	25 (0)
NP010		
1	5,5 (-1)	20 (-1)
2	5,5 (-1)	30 (+1)
3	8,5 (+1)	30 (+1)
4	8,5 (+1)	20 (-1)
5	7 (0)	25 (0)
6	7 (0)	25 (0)
7	7 (0)	25 (0)

Após a montagem do aparato experimental, em seguida media-se a permeabilidade hidráulica das membranas com base no fluxo de água destilada. Os dados de permeabilidade hidráulica antes do uso das membranas são considerados como base para avaliar a necessidade de limpeza destas após o uso. Quando constatado redução da permeabilidade hidráulica era superior a 5%, realizava-se a limpeza química das membranas.

Inicialmente as membranas eram lavadas com água destilada, em triplicata (sem pressurização do módulo). Em seguida realiza-se a limpeza química oxidante, com 250 mL de uma solução de hipoclorito de sódio (2000 mg L^{-1}), durante 25 minutos a uma temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$, com agitação magnética. Na sequência, realiza-se o enxágue com água destilada, durante

10 minutos a uma temperatura de 25 °C, com agitação magnética. Todas as etapas foram dos processos foram realizadas em triplicata.

Após o enxágue, realizava-se as medidas de permeabilidade hidráulica (água destilada, nas pressões de 1,5, 3,0, 4,5 e 6,0 bar), para verificar se o fluxo de permeado era semelhante aos dados fornecidos pelo fabricante da membrana, em uso. Após estas etapas as membranas foram mantidas em água destilada até seu uso.

6.1.2.4. Avaliações

Após a obtenção das frações permeadas e retidas do caldo fermentado provenientes do processo de concentração por membranas as frações foram submetidas as seguintes análises:

- **pH:** foi determinado por meio de um medidor de pH (Systronics, 61) à temperatura ambiente;

- **Tensão Superficial:** foi determinada em um tensiômetro da marca Kruss, K6, empregando o método de anel Du Nouy. O tensiômetro era calibrado com água milli-Q;

- **Fitotoxicidade em folha destacada:** nesta análise foram coletadas folhas jovens de *Cucumis sativus*. Estas folhas eram dispostas em caixas gerbox previamente desinfetadas com etanol 70% e forradas com duas folhas de papel filtro umedecidas com água destilada, para evitar o ressecamento das folhas. A aplicação das frações retidas e permeadas provenientes da concentração do caldo fermentado do fungo *Phoma dimorpha* pelas diferentes membranas, foi realizada com o auxílio de uma pipeta automática, adicionando-se 3 mL sobre algodão envolto ao pecíolo das folhas. Em seguida as caixas gerbox eram acondicionadas em câmara incubadora tipo BOD com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12/12 horas de luz/escuro (PEDRAS; AHIAHONU, 2004).

A avaliação da eficácia das frações retidas e permeadas foram estimadas visualmente no 6º dia após a aplicação. Nesta avaliação foi observada a incidência e intensidade de lesões, com base na escala estabelecida pela Sociedade Brasileira de Ciência de Ervas Daninhas (SBCPD, 1995). (Tabela 3).

Tabela 3 – Escala de fitotoxicidade (% danos) em folhas destacadas e plantas, desenvolvida com base nos conceitos aplicados às avaliações de toxicidade.

% de danos	Descrição das principais categorias
0 - 20	Nenhuma lesão ou efeito
20 - 40	Lesão ligeira e/ou redução do crescimento com recuperação rápida
40 - 60	Lesão moderada e/ou redução do crescimento com recuperação lenta ou definitivo
60 - 80	Lesão grave e/ou redução de crescimento não recuperável e / ou redução do stand
80 - 100	Destruição completa da colheita ou apenas algumas plantas vivas

Fonte: SBCPD (1995).

6.1.2.4. FORMULAÇÃO

Com base no teste em folhas destacadas de *C. sativus* foi selecionado a fração de cada membrana que ocasionou maior efeito fitotóxico. As frações selecionadas foram utilizadas para produção das formulações.

➤ Materiais

As formulações foram realizadas por meio do preparo de emulsões utilizando-se como mistura os adjuvantes Span®80 (Equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL= 4,3), Tween®80 (EHL= 15) e diferentes óleos vegetais, conforme a Tabela 4.

Tabela 4 - Descrição das formulações, nas diferentes concentrações do caldo fermentado bruto sem células do fungo *P. dimorpha* em mistura com os adjuvantes e os diferentes óleos vegetais.

Formulações	Óleo (g)		Span®80	Tween®80	EHL
	Tipo	(g)	(g)	(g)	
Água Destilada	-	-	-	-	-
Caldo Bruto	-	-	-	-	-
T1 (UP010)	Palma	0,82	0,0576	0,2224	12,8
T2 (MP005)	Soja	0,82	0,0576	0,2224	12,8
T3 (NP010)	Canola	0,82	0,0576	0,2224	12,8
C1	Palma	0,82	0,0576	0,2224	12,8
C2	Soja	0,82	0,0576	0,2224	12,8
C3	Canola	0,82	0,0576	0,2224	12,8

➤ Procedimento experimental

Inicialmente realizou-se a pesagem, misturou-se o Span®80 ao óleo específico da formulação (mistura A), com o auxílio do homogeneizador Turrax a 7000 rpm por 1 min. Da mesma forma, foi realizada a mistura do caldo fermentado concentrado ao Tween®80 por 1 min (mistura B). Após esse procedimento, a mistura A foi adicionada aos poucos à mistura B e manteve-se em agitação por 5 min (BASTOS et al, 2017; TODERO et al., 2018).

➤ Avaliações

As formulações produzidas foram submetidas as análises de:

- **pH:** determinado verificado por meio de um medidor de pH (Systronics, 61) à temperatura ambiente;

- **Tensão Superficial:** foi determinada em um tensiômetro da marca Kruss, K6, empregando o método de anel Du Nouy, o tensiômetro foi calibrado com água mili-Q;

- **Fitotoxicidade em plantas:** Em pós-emergência foi avaliado a ação fitotóxica das diferentes formulações. Este ensaio foi realizado em casa de vegetação, com ambiente controlado, localizada na Universidade Federal de Santa Maria (Santa Maria, RS, Brasil). Realizou-se o cultivo de diferentes plantas daninhas, caruru roxo (*Amaranthus cruentus*), picão preto (*Bidens pilosa*), capim-arroz (*Echinochloa* sp.) e mata-pasto (*Senna obtusifolia*) para posterior aplicação e avaliação das diferentes formulações.

Cada tratamento foi composto por dez plantas, considerando-se cada planta uma repetição (unidade experimental). Cada unidade experimental foi composta por um vaso de polietileno com volume de 200 mL, preenchido com substrato comercial Macplant®. Inicialmente foram semeadas três sementes em cada vaso, e após a emergência das plântulas, foi realizado o desbaste sendo mantida apenas uma planta por vaso, as quais foram mantidas e cultivadas até o final do ensaio.

A aplicação das diferentes formulações do caldo fermentado concentrado do fungo *P. dimorpha* foi realizada aproximadamente 15 dias após a emergência das plântulas (DAE), momento em que as plantas apresentavam um par de folhas completamente expandidas. A aplicação foi realizada com um pulverizador costal/manual, pressurizado com CO₂, com barra de dois bicos do tipo leque (RX 11002 / TEEJET), espaçados 0,50 m, atingindo faixa de aplicação de 1m, à uma pressão de trabalho de 40 libras.pol⁻² e velocidade de caminhada durante o spray de 1m s⁻¹ e um volume de calda de 300 L ha⁻¹.

A avaliação da eficácia das formulações das frações retidas do caldo fermentado concentrado do fungo *P. dimorpha* foi realizada 15 dias após a aplicação, com base na escala desenvolvida pela Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas (SBCPD, 1995; TODERO et al., 2018a), atribuindo notas de 0 a 100% de fitotoxicidade. Além desta avaliação também foi estimada a altura de planta (AP -cm).

Os dados coletados foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade dos erros, e posteriormente ao teste F da análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste Tukey, adotando-se o nível de 5% de probabilidade de erro ($p \leq 0,05$). Foi utilizado o programa estatístico Sisvar versão 5.6 para as análises (FERREIRA, 2014).

6.1.3. Resultados e Discussão

6.1.3.1. CONCENTRAÇÃO DO CALDO FERMENTADO POR MEMBRANAS

Ao analisar a tensão superficial, observou-se diferença significativa ($p \leq 0,05$), entre a água destilada, o caldo bruto e os ensaios de concentração para todas as membranas avaliadas (Tabela 5).

Constatou-se que as frações permeadas do caldo fermentado provenientes de todas as membranas, apresentaram tensão superficial próxima à da água e superior ao do caldo bruto, o que evidencia a eficiência do processo de separação por membranas em concentrar o caldo fermentado do fungo *P. dimorpha*, visto que as tensões superficiais das frações retidas foram inferiores à do caldo bruto (Tabela 5). Resultados semelhantes foram citados por Todero et al. (2018a), avaliando a concentração de metabólitos secundários produzidos pelo fungo *Phoma* sp. por processo fermentativo submerso, verificaram para o caldo fermentado bruto, valores médios de $49,79 \text{ mN m}^{-1}$.

A concentração do caldo fermentado do fungo *Phoma dimorpha* por processo de separação por membranas mostrou-se eficiente, visto que reduziu a tensão superficial da fração retida, ficando abaixo dos valores do caldo bruto e elevou a tensão superficial da fração permeada, ficando acima do caldo bruto e próximo da tensão da água. O processo de concentração intensificou o efeito fitotóxico do caldo concentrado (fração retida) sobre folhas destacadas de *C. sativus* independente da membrana utilizada.

A tensão superficial de acordo com Silva et al. (2006) é a força que existe na superfície dos líquidos. Essa tensão se deve às fortes ligações intermoleculares, as quais dependem das diferenças elétricas entre as moléculas, e pode ser definida como a força por unidade de comprimento que duas camadas superficiais exercem uma sobre a outra.

A tensão superficial da água utilizada nos ensaios deste experimento foi semelhante aos observados Montório (2004). Tal autor relatou que a água apresenta elevada tensão superficial (em torno de 72 mN m^{-1}), gerando uma baixa capacidade de retenção na cutícula das plantas, quando utilizada no preparo da calda de aplicação de produtos fitossanitários, o que reduz a eficácia de produtos formulados com elevada tensão superficial.

Os resultados encontrados neste trabalho são satisfatórios em relação a utilização do processo de separação por membranas para a concentração de compostos bioativos oriundos de processos fermentativos de microrganismos. Este processo justifica sua utilização, visto que a redução da tensão superficial da fração retida vai influenciar na produção e formulação de um produto fitossanitário biológico.

A tensão superficial é dentre as propriedades físico químicas que podem alterar a eficiência de uma calda de aplicação e até mesmo a formulação de produtos fitossanitários. Além da tensão superficial, a viscosidade e o pH são sensíveis às alterações provocadas pelos adjuvantes, adicionados para a formulação dos produtos, que pode gerar redução da eficácia deste sobre os organismos alvos (plantas daninhas e fungos). Desse modo é essencial conhecer a tensão superficial e o pH do caldo fermentado bruto do fungo *P. dimorpha*, além do caldo permeado e do retido proveniente do processo de concentração por membrana, para posterior formulação de um produto fitossanitário biológico em forma de emulsão (STOCK; BRIGGS, 2000).

Ao compararmos a menor tensão superficial da fração retida ($50,96 \text{ mN m}^{-1}$) do caldo fermentado do fungo *P. dimorpha* encontrada neste trabalho, com produtos fitossanitários químicos, observou-se que a fração retida sem nenhuma formulação apresenta valores de tensão superficial próximos ao de produtos químicos já formulados com adição de adjuvantes. Cunha et al. (2017) avaliaram o comportamento da associação entre produtos fitossanitários e adjuvantes de uso agrícola na tensão superficial, pH e condutividade elétrica da calda. Estes autores obtiveram valores de tensão superficial para o fungicida epoxiconazol + piraclostrobina de $35,35 \text{ mN m}^{-1}$ quando em mistura com o adjuvante éster metílico de óleo de soja e para o herbicida glifosato valores mínimos de $35,35 \text{ mN m}^{-1}$ quando em mistura com o adjuvante óleo mineral.

Tabela 5 - Tensão superficial (TS - mN m^{-1}) e pH da água destilada, do caldo fermentado bruto do fungo *P. dimorpha* e das frações permeadas e retidas provenientes da concentração do caldo por membrana de ultrafiltração (UP010), microfiltração (MP005) e nanofiltração (NP010).

Condição	TS (mN m^{-1})		pH	
	Fração Permeada	Fração Retida	Fração Permeada	Fração Retida
UP010				
Água Destilada	76,93E	76,93A	6,00A	6,00A
Caldo Bruto	62,05A	62,05B	5,61B	5,85B
Ensaio 1 (2 bar/20 °C)	73,00DE	62,91B	5,70B	6,17AB
Ensaio 2 (2 bar/30 °C)	61,41A	62,72B	5,66B	5,66B
Ensaio 3 (6 bar/30 °C)	71,34CD	63,15B	5,30C	6,01AB
Ensaio 4 (6 bar/20 °C)	67,68BC	63,77B	5,37C	6,53A
Ensaio 5 (4 bar/25 °C)	69,51CD	50,96D	5,39C	6,44A
Ensaio 6 (4 bar/25 °C)	72,28DE	50,96D	5,39C	6,17AB
Ensaio 7 (4 bar/25 °C)	63,66AB	51,67D	5,78B	6,59A
MP005				
Água Destilada	76,93A	76,93A	6,00A	6,00A
Caldo Bruto	62,05DE	62,05B	5,66ABC	5,66A
Ensaio 1 (3,5 bar/20 °C)	71,80B	58,71C	5,44BCD	5,75A
Ensaio 2 (3,5 bar/30 °C)	60,21E	56,52C	5,18D	6,03A
Ensaio 3 (6,5 bar/30 °C)	70,14BC	55,95C	5,22CD	6,46A
Ensaio 4 (6,5 bar/20 °C)	66,48CD	57,57C	5,32BCD	6,51A
Ensaio 5 (5 bar/25 °C)	68,31BC	49,76D	5,44BCD	6,03A
Ensaio 6 (5 bar/25 °C)	71,08B	49,76D	5,68ABC	6,44A
Ensaio 7 (5 bar/25 °C)	62,46E	50,47D	5,73AB	6,30A
NP010				
Água Destilada	76,93A	76,93A	6,00A	6,00D
Caldo Bruto	62,05B	62,05B	5,66C	5,66E
Ensaio 1 (5,5 bar/20 °C)	70,32AB	57,23B	5,41E	5,93D
Ensaio 2 (5,5 bar/30 °C)	58,73B	59,04B	5,42E	6,00D
Ensaio 3 (8,5 bar/30 °C)	68,66AB	56,47B	5,51D	6,61B
Ensaio 4 (8,5 bar/20 °C)	65,00AB	56,09B	5,47DE	6,18C
Ensaio 5 (7 bar/25 °C)	66,83AB	46,28C	5,78B	5,66E
Ensaio 6 (7 bar/25 °C)	69,60AB	49,28C	5,87B	6,74A
Ensaio 7 (7 bar/25 °C)	60,98B	45,44C	5,67C	6,03B

*Valores seguidos de mesma letra, maiúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, em nível de significância de 5% (Sisvar).

Na Tabela 6, é apresentada a porcentagem de fitotoxicidade em folhas destacadas de *Cucumis sativus* submetidas à aplicação das frações permeadas e retidas do caldo fermentado do fungo *P. dimorpha* proveniente da concentração pelas diferentes membranas. Observou-se lesões severas nas folhas destacadas de *C. sativus*, com amarelecimento e necrose acentuada (Figura 2), 9 dias após a aplicação das frações retidas provenientes da concentração pelas diferentes membranas. Para a membrana UP010 a fração retida que ocasionou maior efeito

fitotóxico foi a proveniente do Ensaio 6 (4 bar e 25 °C), para a membrana MP005 o Ensaio 7 (5 bar e 25 °C) e para a concentração pela membrana NP010 Ensaio 4 (8,5 bar e 20 °C).

De modo geral, os efeitos fitotóxicos ocasionados pela aplicação das frações retidas provenientes do processo de concentração pelas membranas de ultrafiltração (UF010), microfiltração (MF005) e nanofiltração (NF010) foram superiores aos observados para as frações permeadas e para o controle positivo (caldo fermentado bruto) (Tabela 6). Resultados similares foram descritos por Toderó et al. (2018b), que ao avaliarem a influência da concentração por microfiltração com membrana de fibra oca, no aumento da atividade herbicida caldo fermentado de *Phoma* sp. Para isso o caldo fermentado foi aplicado frações retidas e permeadas sobre folhas destacadas de *Cucumis sativus*, a fração retida (concentrado) 30% foi a que ocasionou os danos mais severos as folhas de *C. sativus* ao ser comparado com o caldo bruto.

Em um ensaio de aplicação em folhas destacadas de *Cucumis sativus*, Luft et al. (2019), para avaliar o aumento da ação de biopolímeros extracelulares produzidos por *Phoma* sp. em diferentes métodos de concentração (membranas de fibra oca de ultra e microfiltração), observaram que a concentração destes compostos por membrana de fibra oca gerou maiores danos nas folhas destacadas de *C. sativus* quando comparado com os outros métodos.

Vikrant et al. (2006) e Cimmino et al. (2013) avaliaram a eficácia da aplicação dos metabólitos produzidos por diferentes espécies de fungos *Phoma* sp., obtidos por fermentação submersa sobre folhas destacadas de plantas de *Parthenium hysterophorus* (Losna branca), *Cirsium arvense* (cardo-rasteiro) e *Setaria viridis* (milhã-de-cabecinha), respectivamente. Eles observaram rápido amarelecimento e clorose, seguida por necrose e morte das folhas. Posteriormente Evidente et al. (2015), ao testarem o efeito da aplicação de metabólitos produzido pelo fungo *Phoma chenopodiicola*, em folhas de *Stellaria media* (Morugem), *Urtica dioica* (Urtiga), *Sonchus arvensis* (Serralha), *Parietaria officinalis* (Fura-paredes), *Lactuca serriola* (alface-brava), *Helianthus annuus* (Girassol), descreveram sintomas como: clorose e necrose nos tecidos foliares.

Tabela 6 - Teste de fitotoxicidade (%) em folhas destacadas de *C. sativus*, 9 dias após a aplicação das frações permeadas e retidas provenientes da concentração do caldo fermentado do fungo *P. dimorpha* por membrana de ultrafiltração (UP010), microfiltração (MP005) e nanofiltração (NP010).

Ensaio	Fitotoxicidade (%)	
	Fração Permeada	Fração Retida
UP010		
Água Destilada	0,00G	0,00E
Caldo Bruto	60,00A	60,00C
Ensaio 1 (2 bar/20 °C)	14,75C	74,75B
Ensaio 2 (2 bar/30 °C)	17,13B	72,50B
Ensaio 3 (6 bar/30 °C)	15,00C	70,00B
Ensaio 4 (6 bar/20 °C)	3,00EF	48,75D
Ensaio 5 (4 bar/25 °C)	14,50C	53,75D
Ensaio 6 (4 bar/25 °C)	10,00CD	89,50A
Ensaio 7 (4 bar/25 °C)	7,50DE	70,00B
MP005		
Água Destilada	0,00E	0,00E
Caldo Bruto	60,00A	60,00C
Ensaio 1 (3,5 bar/20 °C)	0,00E	68,75B
Ensaio 2 (3,5 bar/30 °C)	35,75B	39,25D
Ensaio 3 (6,5 bar/30 °C)	7,50CD	58,25C
Ensaio 4 (6,5 bar/20 °C)	9,75CD	67,75B
Ensaio 5 (5 bar/25 °C)	0,00E	71,38AB
Ensaio 6 (5 bar/25 °C)	11,25C	70,25AB
Ensaio 7 (5 bar/25 °C)	6,65D	73,25A
NP010		
Água Destilada	0,00F	0,00D
Caldo Bruto	60,00A	60,00C
Ensaio 1 (5,5 bar/20 °C)	15,75B	62,75BC
Ensaio 2 (5,5 bar/30 °C)	7,50DE	67,50B
Ensaio 3 (8,5 bar/30 °C)	11,59C	66,75B
Ensaio 4 (8,5 bar/20 °C)	0,00F	90,75A
Ensaio 5 (7 bar/25 °C)	9,75CD	66,75B
Ensaio 6 (7 bar/25 °C)	11,25C	67,25B
Ensaio 7 (7 bar/25 °C)	4,50E	65,00BC

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

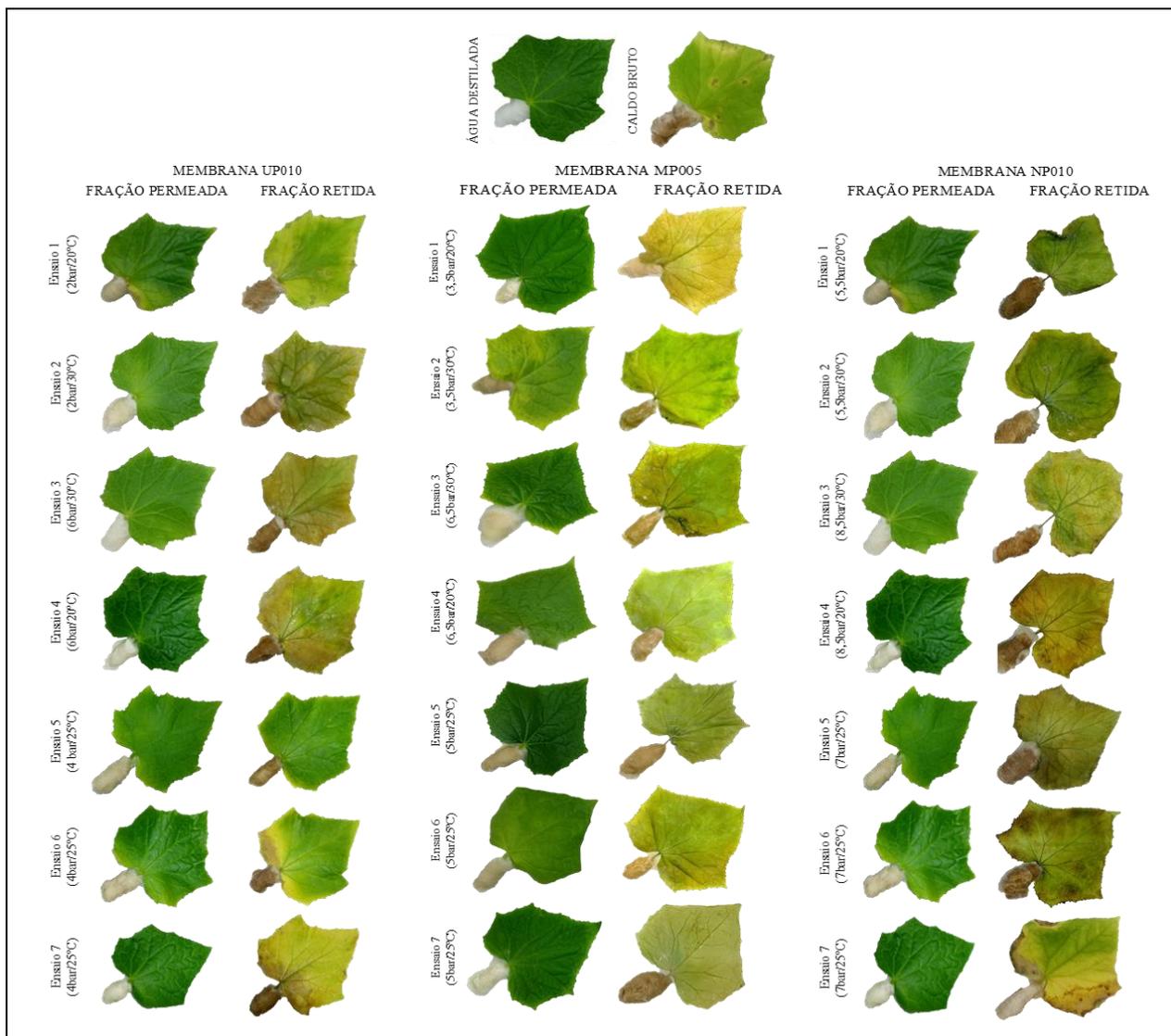


Figura 2 – Danos ocasionados em folhas destacadas de *C. sativus*, 9 dias após a aplicação das frações permeadas e retidas provenientes da concentração do caldo fermentado do fungo *P. dimorpha* por membrana de ultrafiltração (UP010), microfiltração (MP005) e nanofiltração (NP010).

6.1.3.2. FORMULAÇÃO

Para tensão superficial observou-se que em todas as formulações houve diferença entre o tratamento e o controle para a tensão superficial (Tabela 7). Todas as formulações 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. De acordo com Tang et al. (2008), baixos valores de tensão superficial influenciam diretamente na molhabilidade e no processo de absorção do produto na superfície das folhas, elevando assim o efeito fitotóxico da calda.

A redução da tensão superficial pode está relacionada à presença e concentração de macromoléculas como os biosurfactantes, expolipolissacarídeos ou lipopeptídeos. Todero et al. (2019), ao avaliarem a eficiência da concentração por processo de separação por membranas de exopolissacarídeos produzidos pelo fungo *Fusarium fujikuroi*, constataram diminuição da tensão superficial em paralelo ao aumento da concentração de exopolissacarídeos, além disso com a diminuição da tensão superficial constatou-se um aumento na fitotoxicidade sobre folhas de *C. sativus*.

A baixa tensão superficial das gotas durante a pulverização, aumenta a superfície de contato com o alvo biológico e melhora os efeitos molhante, espalhante e penetrante do produto final, além de permitir maior tenacidade às suas moléculas ativas, reduzindo também sua taxa de biodegradação ou fotodegradação (VAN ZYL et al., 2010; HILZ; VERMEER, 2013). A redução da tensão superficial da fração retida do caldo fermentado do fungo *P. dimorpha* com o processo de concentração por membranas pode influenciar na redução do uso de surfactantes, visto que a adição de surfactantes na formulação gera um aumento da molhabilidade após a deposição das gotas no alvo (XU et al., 2010).

Houve diferença significativa entre os tratamentos aplicados (Tabela 7), sendo que todas as formulações apresentaram valores significativamente menores, quando comparado com o caldo fermentado bruto (100% v/v - Controle) e com a água destilada (Testemunha). Porém o pH não foi influenciado pelas formulações, onde verificou-se que o uso de diferentes óleos (Palma, Soja e Canola) não influenciou o pH, tendo em vista que não foram observadas diferenças significativas, apresentando valores médios entre 4,3 e 6,4, descartando-se a possibilidade deste fator ter sido responsável por alterações nos resultados de fototoxicidade (FAVARETTO, 2011).

Resultados semelhantes foram descritos por Cunha et al. (2010), que avaliando o comportamento de formulações geradas pela associação entre produtos fitossanitários e adjuvantes de uso agrícola na tensão superficial, pH e condutividade elétrica, constataram que todos os produtos fitossanitários e adjuvantes, de forma associada ou não, provocaram redução na tensão superficial da calda em relação à água. Green e Beestman (2007) descrevem que dependendo da composição química do formulado, a ação dos adjuvantes podem causar aumento, redução ou alteração do pH.

Todero et al. (2018a), avaliando a influência do pH de diferentes formulações, contendo diferentes concentrações de caldo concentrado do fungo *Phoma* sp., óleo de palma, e os adjuvantes Span®80 e Tween®80, verificaram que não houve diferenças significativas entre

os tratamentos, sendo que o pH variou entre 5,6 e 6,6, demonstrando que os componentes não contribuíram para alterações significativa no pH.

Tabela 7 - Tensão superficial (TS - mN m^{-1}) e pH da água destilada, do caldo fermentado bruto do fungo *P. dimorpha* e das formulações.

	TS (mN m^{-1})		pH	
	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle
UP010				
Água Destilada	70,21A	-	6,00A	-
Caldo Bruto	59,94B	-	5,66B	-
T1 (Óleo de Palma)	26,23C	32,27A	5,31B	6,03A
T2 (Óleo de soja)	26,80C	36,74A	5,55B	6,10A
T3 (Óleo de canola)	28,86C	30,66A	5,51B	6,05A
MP005				
Água Destilada	70,21A	-	6,00A	-
Caldo Bruto	59,94B	-	5,66B	-
T1 (Óleo de Palma)	26,76C	36,39A	5,57C	6,12A
T2 (Óleo de soja)	24,88C	36,10A	5,47D	5,95AB
T3 (Óleo de canola)	27,72C	34,60A	5,35E	6,14A
NP010				
Água Destilada	76,93A	-	6,00A	-
Caldo Bruto	62,05A	-	5,61AB	-
T1 (Óleo de Palma)	23,27B	36,39A	5,22C	6,15A
T2 (Óleo de soja)	19,41B	36,10A	5,47C	6,10A
T3 (Óleo de canola)	26,99B	34,60A	5,51C	6,12A

*Valores seguidos de mesma letra, maiúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, em nível de significância de 5% (Sisvar).

Na Tabela 8 é apresentada a comparação entre as formulações provenientes da fração retida de cada membrana, para a variável fitotoxicidade avaliada nas diferentes plantas daninhas 15 dias após a aplicação. Houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as diferentes formulações (adjuvantes + óleos vegetais + caldo concentrado), e a aplicação destas ocasionaram o desenvolvimento de sintomas nas folhas de todas as espécies de plantas daninhas, como pontuações cloróticas, amarelecimento e necrose, além de causar danos à gema apical paralisando o crescimento.

Resultados semelhantes foram encontrados por Todero et al. (2018a), que ao avaliarem o efeito da formulação de metabólitos de *Phoma* sp. com óleo de palma e diferentes adjuvantes, constataram que as formulações potencializaram o efeito bioherbicida sobre plantas daninhas. A formulação que causou os efeitos mais acentuados foi a composta pelos adjuvantes Span®80 e Tween®80, mais o óleo de palma.

No Brasil, devido à disponibilidade e baixo custo, o óleo de soja é o mais utilizado para formulação de produtos fitossanitários, depois outros, como óleos de girassol, canola e coco. Pois estão atuam eliminando as gorduras que são barreiras presentes na cutícula das folhas, permitindo maior penetração dos produtos hidrófilos pela cutícula (VARGAS; ROMAN, 2006). Porém, por serem pouco estáveis, a utilização de surfactantes na formulação é necessária, o que pode aumentar os custos do produto. A utilização de adjuvante favorece o aumento da bioatividade e melhora as propriedades químicas de uma formulação (WEAVER et al., 2009).

Tabela 8 - Fitotoxicidade (%) em plantas de *Echinochloa* sp., *Amaranthus cruentus*, *Senna obtusifolia* e *Bidens pilosa*, avaliadas quinze dias após a aplicação das formulações.

Fitotoxicidade (%)								
	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle
UP010								
	<i>Echinochloa</i> sp.		<i>Amaranthus cruentus</i>		<i>Senna obtusifolia</i>		<i>Bidens pilosa</i>	
Água Destilada	0,00D	0,00C	0,00D	0,00C	0,00D	0,00C	0,00D	0,00C
Caldo Bruto	21,00C	21,00A	21,00C	21,00A	21,00C	21,00A	21,00C	21,00A
T1 (Óleo de Palma)	76,67B	8,56B	67,11A	9,11B	92,72B	21,67A	30,69B	8,67B
T2 (Óleo de soja)	71,11B	8,78B	61,08B	8,33B	100,00A	16,22B	45,70A	8,56B
T3 (Óleo de canola)	88,44A	9,11B	65,33A	8,78B	100,00A	16,00B	44,76A	9,11B
MP005								
Água Destilada	0,00D	0,00C	0,00D	0,00C	0,00C	0,00C	0,00D	0,00C
Caldo Bruto	21,00C	21,00A	21,00C	21,00A	21,00B	21,00A	21,00C	21,00A
T1 (Óleo de Palma)	75,61B	8,56B	63,61B	9,11B	99,89A	21,67A	58,61B	8,67B
T2 (Óleo de soja)	84,00A	8,78B	74,67AB	8,33B	100,00A	16,22B	59,67B	8,56B
T3 (Óleo de canola)	86,00A	9,11B	80,53A	8,78B	100,00A	16,00B	70,44A	9,11B
NP010								
Água Destilada	0,00D	0,00C	0,00E	0,00C	0,00C	0,00C	0,00E	0,00C
Caldo Bruto	21,00C	21,00A	21,00D	21,00A	21,00B	21,00A	21,00D	21,00A
T1 (Óleo de Palma)	90,00B	8,56B	61,08C	9,11B	100,00A	21,67A	73,50C	8,67B
T2 (Óleo de soja)	98,56A	8,78B	80,67B	8,33B	100,00A	16,22B	77,70B	8,56B
T3 (Óleo de canola)	99,78A	9,11B	92,94A	8,78B	100,00A	16,00B	99,83A	9,11B

*Valores seguidos de mesma letra, maiúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, em nível de significância de 5% (Sisvar).

Na Tabela 9 é apresentada a comparação entre as formulações provenientes da fração retida de cada membrana, para a variável altura de plantas analisada nas diferentes plantas daninhas 15 dias após a aplicação. Houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) para altura de plantas entre a aplicação do caldo bruto e as formulações provenientes da fração retida de cada membrana para todas as plantas daninhas avaliadas.

Para as formulações produzidas a partir da fração concentração proveniente da membrana de ultrafiltração (UP010), para a espécie *Echinochloa* sp. e *Amaranthus cruentus*, o maior efeito bioherbicida foi observado para as formulações T2 (óleo de soja) e T3 (óleo de canola), para a espécie *Senna obtusifolia* e *Bidens pilosa* o maior efeito bioherbicida foi observado para a formulação T3 (óleo de canola), causando redução da altura das plantas (Tabela 9).

Já para as formulações produzidas a partir da fração concentração proveniente da membrana de microfiltração (MP005), não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as formulações para todas as espécies avaliadas, no entanto apresentaram os menores valores de altura de planta, diferindo significativamente dos tratamentos com aplicação do caldo bruto e de água destilada (Tabela 9).

Para as formulações produzidas a partir da fração concentração proveniente da membrana de nanofiltração (NP010), para as espécies *Echinochloa* sp. *Senna obtusifolia* o maior efeito bioherbicida foi observado na formulação T3 (óleo de canola), para as espécies *Amaranthus cruentus* e *Bidens pilosa*, não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as formulações. No entanto apresentaram os menores valores de altura de planta, diferindo significativamente dos tratamentos com aplicação do caldo bruto e de água destilada (Tabela 9).

Além dos danos foliares e à gema apical as plantas das diferentes plantas daninhas observados neste trabalho para as formulações avaliadas, a paralisação do crescimento é um fator importante para a definição de um bioproduto (GRONWALD et al., 2002). Avaliando a aplicação dos metabólitos secundários produzidos pelo fungo *Phoma* sp. sobre plantas de *C. sativus*, Brun et al. (2016) e Klaic et al. (2017), constataram redução na altura quando submetidas à aplicação dos metabólitos.

A paralisação do crescimento também foi observada por Todero et al., (2018a) ao avaliarem o potencial bioherbicida do caldo fermentado do fungo *Phoma* sp. formulado sobre plantas de *Bidens pilosa* e *Amaranthus retroflexus*. Eles constataram que a aplicação dos adjuvantes + caldo causou danos na gema apical, o que resulta na paralisação do crescimento das plantas. Chaves Neto et al (2020) avaliaram o efeito bioherbicida na aplicação do caldo

fermentado bruto do *Phoma dimorpha* em folhas destacadas da planta daninha de pastagens *Senna obtusifolia*, e destacaram que a aplicação do caldo fermentado bruto apenas já ocasionou redução do crescimento quando comparado com o tratamento testemunha.

Tabela 9 - Altura de plantas (cm) de *Echinochloa* sp., *Amaranthus cruentus*, *Senna obtusifolia* e *Bidens pilosa*, avaliadas quinze dias após a aplicação das formulações.

Altura de plantas (cm)								
Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	
UP010								
	<i>Echinochloa</i> sp.		<i>Amaranthus cruentus</i>		<i>Senna obtusifolia</i>		<i>Bidens pilosa</i>	
Água Destilada	20,39A	-	15,97A	-	10,85A	-	15,98A	-
Caldo Bruto	17,95B	-	11,85B	-	9,97B	-	12,92B	-
T1 (Óleo de Palma)	16,13C	19,90A	16,60C	14,29A	6,68B	6,79B	8,29C	12,84A
T2 (Óleo de soja)	15,44C	18,04A	16,87C	13,79A	6,25B	7,58B	7,66C	13,99A
T3 (Óleo de canola)	11,31D	19,06A	13,67D	11,72A	4,22C	9,07A	6,12D	13,50A
MP005								
Água Destilada	20,39A	-	15,97A	-	10,85A	-	15,98A	-
Caldo Bruto	17,95B	-	11,85B	-	9,97A	-	12,92B	-
T1 (Óleo de Palma)	14,93C	19,90A	14,29C	14,29A	5,22B	6,79B	10,19B	12,84A
T2 (Óleo de soja)	12,52C	18,04A	13,79C	13,79A	5,01B	7,58B	12,44B	13,99A
T3 (Óleo de canola)	16,34C	19,06A	11,72C	11,72A	4,39B	9,07A	12,92B	13,50A
NP010								
Água Destilada	20,39A	-	15,97A	-	10,85A	-	15,98A	-
Caldo Bruto	17,95B	-	11,85B	-	9,97A	-	12,92B	-
T1 (Óleo de Palma)	5,43C	19,90A	8,31C	14,29A	6,00A	6,79B	5,11C	12,84A
T2 (Óleo de soja)	4,39D	18,04A	6,58D	13,79A	4,52B	7,58B	4,28C	13,99A
T3 (Óleo de canola)	3,51D	19,06A	6,11D	11,72A	3,44C	9,07A	4,45C	13,50A

*Valores seguidos de mesma letra, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, em nível de significância de 5% (Sisvar).

Na Tabela 10 é apresentada a comparação entre as membranas utilizadas para concentração do caldo em cada formulação e em cada espécie de planta daninha avaliada. Houve diferença significativa entre as membranas em cada formulação para a variável fitotoxicidade e altura de plantas avaliadas nas diferentes espécies de plantas daninhas 15 dias após a aplicação.

Na espécie *Echinochloa* sp. observou-se que em todas as formulações quando utilizou-se a fração retida do caldo proveniente da membrana de nanofiltração (NP010), ocorreu maior fitotoxicidade nas plantas, com porcentagem superior a 98%. Este mesmo comportamento foi observado para variável altura de planta, com a aplicação destas formulações a altura de planta foi inferior a 5,43 cm, mostrando-se eficaz no controle desta espécie (Tabela 10).

Comparando as diferentes formulações sobre as plantas de *Amaranthus cruentus*, observou-se que a maior eficácia com porcentagens de fitotoxicidade superiores a 78% ocorreu quando aplicou-se as formulações do caldo concentrado proveniente da membrana nanofiltração (NP010), resultado expresso também na variável altura de planta, visto que nestas mesmas formulações foram constatadas as menores alturas de plantas (Tabela 10).

Para as plantas da espécie *Senna obtusifolia*, constatou-se que houve diferença significativa entre as membranas utilizadas para obtenção do caldo concentrado apenas na formulação T1 (Óleo de Palma), já nas formulações T2 (Óleo de soja) e T3 (Óleo de canola) observou-se fitotoxicidade de 100% (Tabela 10), independente da membrana utilizada. Este resultado caracteriza a morte total das plantas de acordo com a escala desenvolvida pela Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas (SBCPD, 1995). Para a variável altura de planta não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as membranas utilizadas para concentração do caldo nas diferentes formulações (Tabela 10).

Na espécie *Bidens pilosa* observou-se que em todas as formulações quando utilizou-se a fração retida do caldo proveniente da membrana de nanofiltração (NP010), ocorreu maior fitotoxicidade com porcentagem superior a 73% mostrando-se eficaz no controle desta espécie, o que foi confirmado pela variável altura de planta, visto que com a aplicação destas formulações constatou-se os menores valores para altura de planta, com médias inferiores a 5,11 cm (Tabela 10).

O processo de separação por membranas caracteriza-se com um método eficiente, possibilitando a concentração e potencializando a ação fitotóxicas dos metabólitos secundários produzidos por microrganismos. De modo geral, independente da membrana utilizada para concentrar o caldo do fungo *P. dimorpha*, utilizado na produção das diferentes formulações, a concentração do caldo potencializou a ação fitotóxica sobre folhas de pepino e sobre as plantas

daninhas *Echinochloa* sp., *Amaranthus cruentus*, *Senna obtusifolia* e *Bidens pilosa*. Toderó et al. (2018b) avaliaram a concentração do caldo fermentado de *Phoma* sp. para aumentar sua atividade herbicida utilizando uma membrana de microfiltração de fibra oca. Os autores constataram aumento da atividade herbicida do caldo concentrado em pós-emergência das plantas daninhas *Bidens pilosa* e *Amaranthus retroflexus*. Este fato pode estar atribuído com a concentração de macromoléculas na membrana, como descritos por Toderó et al. (2019), que concentraram exopolissacarídeos, e confirmam um aumento no poder herbicida em paralelo ao aumento da concentração destas moléculas.

Tabela 10 – Fitotoxicidade (%) e altura de planta (cm) de *Echinochloa* sp., *Amaranthus cruentus*, *Senna obtusifolia* e *Bidens pilosa*, avaliadas quinze dias após a aplicação das formulações.

Membrana	Fitotoxicidade (%)			Altura de plantas (cm)		
	T1 (Óleo de Palma)	T2 (Óleo de soja)	T3 (Óleo de canola)	T1 (Óleo de Palma)	T2 (Óleo de soja)	T3 (Óleo de canola)
<i>Echinochloa</i> sp.						
Ultrafiltração (UP010)	76,67B	71,11C	88,44B	14,93B	12,52B	16,34C
Microfiltração (MP005)	75,61B	84,00B	86,00BC	18,13C	17,44C	13,31B
Nanofiltração (NP010)	90,00A	98,56A	99,78A	5,43A	4,39A	3,51A
<i>Amaranthus cruentus</i>						
Ultrafiltração (UP010)	67,11B	61,08C	65,33C	16,60A	16,87A	13,67A
Microfiltração (MP005)	63,61B	74,67A	80,53B	14,29B	13,79B	11,72B
Nanofiltração (NP010)	78,67A	80,67A	92,94A	8,31C	8,58C	6,11C
<i>Senna obtusifolia</i>						
Ultrafiltração (UP010)	92,72B	100,00A	100,00A	6,68A	6,25A	4,22A
Microfiltração (MP005)	99,89A	100,00A	100,00A	5,22A	5,01A	4,39A
Nanofiltração (NP010)	100,00A	100,00A	100,00A	6,00A	4,52A	3,44A
<i>Bidens pilosa</i>						
Ultrafiltração (UP010)	30,69C	45,70C	44,76C	8,29B	7,66B	6,10B
Microfiltração (MP005)	58,61B	59,67B	70,44B	10,19A	12,44A	12,92A
Nanofiltração (NP010)	77,70A	73,50A	99,83A	5,11C	4,28C	4,45C

*Valores seguidos de mesma letra, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, em nível de significância de 5% (Sisvar).

6.1.4. Conclusões

A concentração do caldo fermentado do fungo *Phoma dimorpha* por processo de separação por membranas mostrou-se eficiente, visto que reduziu a tensão superficial da fração retida, ficando abaixo dos valores do caldo bruto e elevou a tensão superficial da fração permeada, ficando acima do caldo bruto e próximo da tensão da água. O processo de concentração intensificou o efeito fitotóxico do caldo concentrado (fração retida) sobre folhas destacadas de *C. sativus* independente da membrana utilizada.

As frações concentradas que ocasionaram maior efeito fitotóxico sobre folhas destacadas de *C. sativus* para o processo de concentração com a membrana UP010 foi o Ensaio 6 (4 bar e 25 °C), com a membrana MP005 foi o Ensaio 7 (5 bar e 25 °C) e com a membrana NP010 foi o Ensaio 4 (8,5 bar e 20 °C).

As formulações do caldo concentrado (fração retida) provenientes de cada membrana, independente do óleo vegetal e da espécie de planta daninha alvo, ocasionaram injúrias desde pequenas manchas, amarelecimentos e necrose nas folhas, até danos a gema apical, paralização do crescimento e por fim morte de algumas plantas.

As formulações com a fração retida do caldo proveniente da membrana de nanofiltração (NP010) ocasionaram maior fitotoxicidade e redução na altura das plantas daninhas.

6.1.5. Referências Bibliográficas

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2007. 516 p.

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.

BO A.B.; KIM, J.D.; KIM Y.S.; SIN, H.T.; KIM, H.J.; KHAITOV B.; KO, Y.K.; PARK K.W.; CHOI J.S. Isolation, identification and characterization of *Streptomyces* metabolites as a potential bioherbicide. **Plos One**, v. 14, n. 9, p. 1-18, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222933>

BORGES NETO, C. R.; MELLO, S. C. M.; RIBEIRO, Z. M. A.; FONTES, E. G. Efeito de adjuvantes no crescimento e infectividade do fungo *Cercospora caricis*, agente de biocontrole da tiririca. **Fitopatologia Brasileira**, 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. 1, p. 77-83, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582004000100010>.

BRUN, T. et al. Production of bioherbicide by *Phoma* sp. in a stirred-tank bioreactor. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 230-239, 2016. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0557-9>.

CHANG, M.; ZHOU, S.; SUN, Q.; LI, T.; NI, J. Recovery of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides from fermented sludge by cross-flow microfiltration. **Journal Desalination and Water Treatment**, v. 43, n. 1-3, p. 17-28, 2012. <https://doi.org/10.1080/19443994.2012.672192>

CHAVES NETO, J.; MAZUTTI, M.; ZABOT, G.; TRES, M. Ação bioherbicida de caldo fermentado de *Phoma dimorpha* em sementes e plantas de *Senna obtusifolia*. **Agricultural Research in the Tropics**, v. 50, p. e56894, 2020. <https://doi.org/10.1590/1983-40632019v5056894>

CIMMINO, A.; ANDOLFI, A.; ZONNO, M.C.; AVOLIO, F.; BERESTETSKIY, A.; VURRO, M.; EVIDENTE, A. Chenopodolans A–C: phytotoxic furopyrans produced by *Phoma chenopodiicola*, a fungal pathogen of *Chenopodium album*. **Phytochemistry**, v.96, n.1, p.208-213, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.10.007>

CUNHA, J. P. A. R.; ALVES, G. S.; MARQUES, R. S. Tensão superficial, potencial hidrogeniônico e condutividade elétrica de caldas de produtos fitossanitários e adjuvantes. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 48, n. 2, p. 261-270, 2017. <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20170030>

CUNHA, J. P. A. R.; ALVES, G. S.; REIS, E. F. Efeito da temperatura nas características físico-químicas de soluções aquosas com adjuvantes de uso agrícola. **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p. 665-672, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582010000300024>

EVIDENTE, M.; CIMMINO, A.; ZONNO, M. C.; MASI, M.; BERESTETSKIY, A.; SANTORO E.; SUPERCHI, S.; VURRO, M.; EVIDENTE, A. Phytotoxins produced by *Phoma chenopodiicola*, a fungal pathogen of *Chenopodium album*. **Phytochemistry**. v. 117, n. 1, p. 482-488, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.07.008>

FAVARETTO, A.; SCHEFFER-BASSO, S. M.; FELINI, V.; CARNEIRO, C. M.; NETO ZOCH, A. Seedling growth of white clover treated with root and leaf aqueous extract of tough lovegrass. **Brazilian Journal of Animal Science**, v. 40, p. 1168-1172, 2011.

FERREIRA, D.F. Sisvar: A Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência & Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>

GOLUNSKI, S., ASTOLFI, V., CARNIEL, N., OLIVEIRA, D., DI LUCCIO, M., MAZUTTI, M. A., TREICHEL, H. Ethanol precipitation and ultrafiltration of inulinases from *Kluyveromyces marxianus*. **Separation and Purification Technology**, v. 78, p. 261–265, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.02.019>

GRAUPNER, P. R. et al. The macrocidins: novel cyclic tetramic acids with herbicidal activity produced by *Phoma macrostoma*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 12, p. 1558-1561, 2003.

GREEN, J. M.; BEESTMAN, G. B. Recently patented and commercialized formulation and adjuvant technology. **Crop Protection**, v. 26, n. 3, p. 320-327, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.04.018>

HERATH, K.; HARRIS, G.; JAYASURIYA, H.; et al (2009) Isolation, structure and biological activity of phomafungin, a cyclic lipodepsipeptide from a widespread tropical *Phoma* sp. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 17:1361-1369

HILZ, E.; VERMEER, A. W. P. Spray drift review: the extent to which a formulation can contribute to spray drift reduction. **Crop Protection**, v. 44, n. 1, p. 75-83, 2013.

KLAIC, R.; SALLET, D.; FOLETTO, E.L.; JACQUES, R.J.S.; GUEDES, J.V.C.; KUHN, R.C.; MAZUTTI, M.A. Optimization of solid-state fermentation for bioherbicide production by *Phoma* sp. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.34, n.02, p.377-384, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20170342s20150613>

LEE B, KIM JD, KIM YS, KO YK, YON GH, KIM CJ. Isolation, identification and characterization of *Streptomyces* metabolites as a potential bioherbicide. **Relva Weed Sci.** 2013; 2: 38-46. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222933>

LIMA, E. R. et al. Recuperação da solução de soda cáustica usada no tratamento do couro bovino na produção de gelatina. **Ciência & Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 98-106, 2008.

LUFT, L.; CONFORTIN, T. C.; TODERO, I.; CHAVES NETO J. R.; Tonato, D.; ZABOT, G. L.; MAZUTTI, M.A. Different techniques for concentration of extracellular biopolymers with herbicidal activity produced by *Phoma* sp. **Environmental Technology**, p.1-27. 2019. <https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1669720>

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. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-69162007000200003>

MONTÓRIO, G. A., VELINI, E. D. Definição de um coeficiente de eficácia para estudo de tensão superficial com surfactantes siliconados e não siliconados. **Sci. Agr. Parana**. 3: 25-34(2004).

PARRA, R.; ALDRED, D.; MAGAN, N. Medium optimization for the production of the secondary metabolite squalenstatin 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.; AHIAHONU, P.W. Phytotoxin production and phytoalexin elicitation by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Chemical Ecology*, v.30, n.11, p.2163-2179, 2004. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000048781.72203.6c>

SILVA, F. M. L.; VELINI, E.D.; CORRÊA, T.M. Influência dos íons Mg, Ca, Fe, Cu e Zn sobre a tensão superficial estática de soluções contendo surfatante. **Planta Daninha**, v. 24, n.1, p. 589-595, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582006000300023>

STOCK, D.; BRIGGS, G. Physicochemical properties of adjuvants: values and applications. **Weed Technology**, v.14, n. 4, p. 798-806, 2000.

TODERO, I.; CONFORTIN, T. C.; LUFT, L.; SEIBEL, J.; KUHN, R. C.; TRES, M. V.; MAZUTTI, M. A. Concentration of exopolysaccharides produced by *Fusarium fujikuroi* and application of bioproduct as an effective bioherbicide. **Environmental Technology**, v. 1, n. 1, p. 1-21, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1580775>

TODERO, I.; CONFORTIN, T.C.; LUFT, L.; BRUN, T.; UGALDE, G.A.; ALMEITA, T.C.; ARNEMANN, J.A.; ZABOT, G.L.; MAZUTTI, M.A. Formulation of a bioherbicide with metabolites from *Phoma* sp. **Scientia Horticulturae**, v.241, n.1, p.285-292, 2018a. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.07.009>

TODERO, I.; CONFORTIN, T.C.; SOARES, J.F.; BRUN, T.; LUFT, L.; RABUSKE, J.E.; KUHN, R.C.; TRES, M.V.; ZABOT, G.L.; MAZUTTI, M.A. Concentration of metabolites from *Phoma* sp. using microfiltration membrane for increasing bioherbicidal activity. **Environmental Technology**, v.22, n.1, p.1-9. 2018b. <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1441330>

VAN ZYL, S. A. et al. The use of adjuvants to improve spray deposition and *Botrytis cinerea* control on Chardonnay grapevine leaves. **Crop Protection**, v.29, n.1, p.58-67, 2010.

VARDANEGA, R. et al. Effect of magnetic field on the ultrafiltration of bovine serum albumin. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.36, n.8, p.1087-1093, 2013.

VIKRANT, P.; VERMA, K. K.; RAJAK, R. C.; PANDEY, A. K. Characterization of a Phytotoxin from *Phoma herbarum* for Management of *Parthenium hysterophorus* L. **Journal of Phytopathology**, v.154, n.1, p.461-468, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2006.01129.x>

VLADISAVLJEVIĆ, G.T.; VUKOSAVLJEVIĆ, P.; BUKVIĆ, B. Permeate flux and fouling resistance in ultrafiltration of depectinized apple juice using ceramic membranes. **Journal of Food Engineering**, v. 60, n. 3, p. 241-247, 2003.

WEAVER, M. A.; JIN, X.; HOAGLAND, R. E.; BOYETTE, C. D. Improved bioherbicidal efficacy by *Myrothecium verrucaria* via spray adjuvants or herbicide mixtures. **Biological Control**, v. 50, n. 2, p. 150-156, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.03.007>

XU, L.; ZHU H.; OZKAN, H. E.; THISTLE, H. W. Evaporation rate and development of wetted area of water droplets with and without surfactant at different locations on 357 waxy leaf surfaces. **Biosystems Engineering**, v. 106, n. 1, p. 58-67, 2010.

YASUOR H, TENBROOK P, TJEERDEMA R. Responses to clomazone and 5-ketoclomazone by *Echinochloa phyllopogon* resistant to multiple herbicides in Californian rice fields. **Pest Management Science**, v. 64, p. 1031-1039, 2008 <https://doi.org/10.1002/ps.1604>

ZHANG, L.; SHI-QIONG WANG; XIAO-JUN LI; AN-LING ZHANG; QIANG ZHANG; JIN-MING GAO. New insight into the stereochemistry of botryosphaeridione from a *Phoma* endophyte. **Journal of Molecular Structure**, v. 1016, n. 1, p.72-75, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2012.02.041>

CAPÍTULO 7 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

7.1 DISCUSSÃO GERAL

Os fungos pertencentes ao gênero *Phoma* destacam-se por serem uma fonte promissora de compostos com potencial para o controle biológico. A preservação e a manutenção de materiais biológicos, dentre eles os fungos, é de fundamental importância pois estes são capazes de produzir uma grande variedade de compostos quimicamente novos e de expressivo valor biológico (HINZ et al., 2014; WIJERATNE et al., 2013).

Os resultados obtidos neste trabalho mostram a comparação entre três métodos de preservação (repicagens periódicas, Castellani e fragmentos de papel-filtro) de isolados do fungo *Phoma dimorpha*, por dois períodos de avaliação, (6 e 12 meses após o armazenamento). Foi evidenciado que o método de fragmentos de papel-filtro foi o mais eficaz na preservação do isolado do fungo *P. dimorpha* nos dois períodos de avaliação, sendo ideal para obter o maior crescimento micelial. A eficácia deste método também foi descrita por Fong et al. (2000), os quais constataram que o método de preservação de fragmento de papel-filtro se mostrou-se muito eficaz para a preservação de *F. oxysporum* a -19 °C, mantendo-se viáveis após quatro anos de armazenamento. De acordo com Anjos et al. (2012), a preservação em fragmento de papel filtro, apresenta baixo custo e não necessita de equipamentos sofisticados.

Controlar todas as plantas daninhas presentes no campo não é suficiente para eliminar por completo estas espécies invasoras, visto que a dormência das sementes é o seu principal mecanismo de sobrevivência em ambientes constantemente infestados (SOUZA FILHO, et al., 1998; VIVIAN et al., 2008; CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). Desse modo, com base nos resultados encontrados nos ensaios para superação de dormência das plantas daninhas (*Bidens pilosa*, *Echinochloa* spp., *Amaranthus cruentus* e *Senna obtusifolia*) avaliadas neste trabalho, o método de escarificação mecânica é o mais indicado para superação da dormência tegumentar das sementes de *S. obtusifolia*, visto que apresentou 99 % de sementes germinadas. Para as espécies *Bidens pilosa*, *Echinochloa* spp. e *Amaranthus cruentus*, o método mais adequado para superação da dormência foi a embebição por 48 horas, apresentando valores superiores a 60% de sementes germinadas para todas as espécies avaliadas.

Resultados semelhantes que evidenciam a eficiência da superação de dormência foram descritos por Zucareli et al. (2010), que evidenciam a escarificação mecânica, já Bortolini et al. (2011) constataram que a permanência de sementes em embebição em água por 24 h acelerou o início da germinação. No entanto, é válido salientar que a eficiência do método de superação

de dormência depende do grau de dormência, que varia de acordo com cada espécie (SILVA et al., 2014).

Dentre os fungos com aplicação agrícola, destaca-se o *Phoma dimorpha*. Apenas a aplicação do caldo fermentado bruto resultou em ação fitotóxica sobre diversas espécies de plantas, sendo observada maior sensibilidade nas espécies dicotiledôneas (*Cucumis sativus*, *Amaranthus cruentus*, *Bidens pilosa* e *Sena obtusifolia*), a aplicação do caldo bruto chegou a inibir totalmente a germinação de sementes destas espécies. Para as espécies monocotiledôneas *T. aestivum* e *Echinochloa* spp. observou-se baixas porcentagens de germinação, com médias de 2,0% e 4,12%, respectivamente. De acordo com Pes et al. (2016), realizar o controle em pré-emergência de plantas daninhas, principalmente na fase inicial do estabelecimento da cultura, favorece a diminuição do banco de sementes ao longo do tempo, reduzindo a emergência e a competição.

Avaliando o efeito da aplicação do caldo bruto aplicação sobre folhas destacadas *Cucumis sativus* *Amaranthus cruentus*, *Bidens pilosa* e *Sena obtusifolia*, observou-se nos primeiros dias leve amarelecimento, intensificando-se ao longo do período de avaliação. Aos 9 dias, após a aplicação do caldo fermentado bruto verificou-se lesões severas, com amarelecimento e necrose acentuada. Resultados semelhantes foram descritos por Brun et al. (2016), Toderó et al. (2018a) que ao avaliarem o efeito fitotóxico da aplicação do caldo fermentado bruto de *Phoma* sp. e sobre folhas destacadas de *Cucumis sativus*, observaram a ocorrência de leve amarelecimento e necrose, logo após 72 horas da aplicação, evoluindo até a morte total da folha na última avaliação.

Ao avaliar a influência da concentração do caldo fermentado do fungo *P. dimorpha* por membranas planas de ultrafiltração (UF), microfiltração (MF) e nanofiltração (NF), com base na aplicação das frações retidas e permeadas resultantes, constatou-se especialmente para as frações retidas maior efeito fitotóxico sobre folhas destacadas de *C. sativus* em relação ao caldo fermentado bruto e também em relação as frações permeadas nos diferentes ensaios para cada membrana.

Quando comparadas, as diferentes formulações (adjuvantes + óleos vegetais + caldo concentrado) da fração retida proveniente de cada membrana utilizada, constatou-se efeitos fitotóxicos sobre as folhas de todas as espécies de plantas daninhas. Tais efeitos apresentam-se como pontuações cloróticas, amarelecimento, necrose e murcha, além de causar danos a gema apical paralisando o crescimento, reduzindo a massa fresca das plantas. Resultados semelhantes foram descritos por autores como Bastos et al., (2017), Toderó et al. (2018), que relatam o

aumento do efeito bioherbicida de metabólitos secundários produzidos por microrganismos quando formulados com adjuvantes e óleos vegetais.

7.2 CONCLUSÕES GERAIS

O método de preservação em fragmento de papel filtro mostrou-se como o mais eficaz na preservação do isolado do fungo *P. dimorpha* nos dois períodos de avaliação, após seis e doze meses de armazenamento, sendo ideal para obtenção do maior crescimento micelial, eficácia do método e índice de velocidade do crescimento micelial.

A escarificação mecânica com lixa de papel nº 120 favoreceu a germinação e foi o tratamento mais eficiente para superar a dormência de sementes de *Senna obtusifolia* (L.) H. S. Irwin & Barneby. A absorção de água apresentou aumento significativo com maiores períodos de embebição. A embebição das sementes em água a temperatura ambiente por 48 horas favoreceu a germinação, sendo o tratamento mais eficiente para superar a dormência de sementes de *A. cruentus*, *Echinochloa* spp. e *B. pilosa*.

Os metabólitos secundários de *P. dimorpha* possuem elevado potencial herbicida. Apresentam-se como uma alternativa para o desenvolvimento de bioprodutos para o manejo de plantas daninhas, ocasionando a redução do uso dos herbicidas sintéticos e a prevenção à poluição dos ecossistemas.

A aplicação de metabólitos secundários de *P. dimorpha* apresenta ação herbicida em pré-emergência para as espécies *Cucumis sativus*, *Amaranthus cruentus*, *Bidens pilosa* e *Senna obtusifolia*, inibindo em 100% a germinação das sementes; e em folhas destacadas ocasionando a necrose e morte da folha no nono dia após a aplicação. Em pós-emergência a aplicação ocasionou sintomas moderados, com manchas nas folhas e redução no tamanho das plantas da espécie de planta daninha de pastagem *S. obtusifolia*.

A concentração do caldo fermentado do fungo *P. dimorpha* por processo de separação por membranas mostrou-se eficiente. Reduziu-se a tensão superficial da fração retida, ficando abaixo dos valores do caldo bruto e elevou a tensão superficial da fração permeada, ficando acima do caldo bruto e próximo da tensão da água.

O processo de concentração intensificou o efeito fitotóxico do caldo concentrado (fração retida) sobre folhas destacadas de *C. sativus* independente da membrana utilizada. As frações retidas que ocasionaram maior efeito fitotóxico sobre folhas destacadas de *C. sativus* para o processo de concentração com a membrana UP010 foi o Ensaio 7 (4 bar e 25°C), com a

membrana MP005 foi o Ensaio 2 (3,5 bar e 30°C) e com a membrana NP010 foi o Ensaio 4 (8,5 bar e 20°C).

As formulações do caldo concentrado (fração retida) provenientes de cada membrana, independente do óleo vegetal utilizado nas formulações (Óleo de Palma, Óleo de soja e Óleo de canola), ocasionaram injúrias desde pequenas manchas, amarelecimentos e necrose nas folhas, até danos à gema apical, paralização do crescimento e por fim morte das plantas. Tais resultados foram observados em todas as espécies de plantas daninhas avaliadas, sendo que os efeitos fitotóxicos foram mais expressivos quando utilizou-se nas formulações a fração retida do caldo proveniente da membrana de nanofiltração (NP010).

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Caracterizar os metabólitos secundários (compostos bioativos) presentes nas frações permeadas e retidas do caldo fermentado do fungo *Phoma dimorpha*;
- ✓ Testar as formulações em outras espécies de plantas daninhas de interesse agrícola.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANJOS, T. V.; TEBALDI, N. D.; FAGIAN, C. C. Coleção preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas. **Horizonte Científico**, v.6, n.1, p. 1-24, 2012.

BASTOS, B. et al. Solid-state fermentation for production of a bioherbicide from *Diaporthe* sp. and its formulation to enhance the efficacy. **3 Biotech**, v. 7, n. 1-9, 2017. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0751-4>

BORTOLINI, M. F. et al. Superação de dormência em sementes de *Gleditschia amorphoides* Taub. **Ciência Rural**, v. 41, n. 5, p. 823-827, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782011000500014>

BRUN, T. RABUSKE, J.E.; TODERO, I.; ALMEIDA, T.C.; JUNIOR, J.J.D.; ARIOTTI, G.; CONFORTIN, T.C.; ARNEMANN, J.A.; KUHN, R.C.; GUEDES, J.V.C.; MAZUTTI, M.A. Production of bioherbicide by *Phoma* sp. in a stirred-tank bioreactor. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 230-239, 2016. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0557-9>

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590 p.

FONG, Y. K. et al. A modified filter paper technique for long-term preservation of some fungal cultures. **Mycologist**, v.4, n.3, p. 127-130, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0269915X\(00\)80090-7](https://doi.org/10.1016/S0269915X(00)80090-7)

HINZ, H. L.; SCHWARZLEANDER, M.; GASSMANN, A.; BOURCHIER, R. S. Successes we may not have had: a retrospective analysis of selected weed biological control agents in the United States. **Invasive Plant Science and Management**, v. 7, n. 1, p. 565-579, 2014.

PES, M. P. et al. Bioherbicide based on *Diaporthe* sp. secondary metabolites in the control of three tough weeds. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 42, p. 4242-4249, 2016. <https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11639>

PIYABOON, O. et al. Pathogenicity, host range and activities of a secondary metabolite and enzyme from *Myrothecium roridum* on water hyacinth from Thailand. **Weed Biol. Manag.** 16, 132–144. 2016. <https://doi.org/10.1111/wbm.12104>

SILVA, A. C. et al. Caracterização biométrica e superação de dormência em sementes de *Chloroleucon foliolosum* (Benth.) G. P. Lewis. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 4, p. 577-582, 2014. <http://dx.doi.org/10.5039/agraria.v9i4a4586>

SOUZA FILHO, A. P. S.; DUTRA, S.; SILVA, M. A. M. M. Métodos de superação da dormência de sementes de plantas daninhas de pastagens cultivadas da Amazônia. **Planta daninha**, v. 16, n. 1, p. 3-11, 1998. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83581998000100001>

TODERO, I. et al. Formulation of a bioherbicide with metabolites from *Phoma* sp. **Scientia Horticulturae**, v. 241, n. 1, p.2 85-292, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.07.009>

VIVIAN, R. et al. Dormência em sementes de plantas daninhas como mecanismo de sobrevivência – breve revisão. **Planta Daninha**, v. 26, n. 3, p. 695-706, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582008000300026>

WIJERATNE, E. M. K.; HE H.; FRANZBLAU, S.G.; HOFFMAN, A.M.; GUNATILAKA, A. A. L. Phomapyrrolidones A-C, Antitubercular Alkaloids from the Endophytic Fungus *Phoma* sp. NRRL 46751. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 2, p. 1860-1865, 2013.

ZUCARELI, V.; AMARO, A. C. E.; SILVÉRIO, E. V.; FERREIRA, G. Métodos de superação da dormência e temperatura na germinação de sementes de *Dioclea violácea*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, p. 1305-1312, 2010.