

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Dinalva Schein

**PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS E AVALIAÇÃO DE
METODOLOGIAS PARA A MAXIMIZAÇÃO DA ATIVIDADE
FITOTÓXICA VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE
BIOHERBICIDAS**

Santa Maria, RS
2022

Dinalva Schein

**PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS E AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS
PARA A MAXIMIZAÇÃO DA ATIVIDADE FITOTÓXICA VISANDO O
DESENVOLVIMENTO DE BIOHERBICIDAS**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti

Santa Maria, RS
2022

Schein, Dinalva
PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS E AVALIAÇÃO DE
METODOLOGIAS PARA A MAXIMIZAÇÃO DA ATIVIDADE FITOTÓXICA
VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE BIOHERBICIDAS / Dinalva
Schein.- 2022.
74 p.; 30 cm

Orientador: Marcio Antonio Mazutti
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química, RS, 2022

1. Prospecção microbiológica 2. Bioherbicida 3.
Fitotoxicidade 4. Amaranthus hybridus 5. Echinochloa
crusgalli I. Mazutti, Marcio Antonio II. 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, DINALVA SCHEIN, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) 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.

Dinalva Schein

**PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS E AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS
PARA A MAXIMIZAÇÃO DA ATIVIDADE FITOTÓXICA VISANDO O
DESENVOLVIMENTO DE BIOHERBICIDAS**

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

Aprovada em 18 de novembro de 2022:

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

Giovani Zobot, Dr. (UFSM)

Thiarles Brun, Dr. (URI)

Santa Maria, RS
2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por todo o incentivo e apoio durante toda esta trajetória.

Agradeço ao meu orientador, professor Marcio Antonio Mazutti, pela oportunidade e a confiança depositada em mim, pela orientação, pela paciência e conselhos ao longo do mestrado.

Agradeço a todos os colegas de laboratório e do PPGEQ pela companhia e apoio durante esses anos.

Agradeço aos amigos que se fizeram presentes, pelas ajudas, conselhos, incentivo e apoio nos momentos difíceis.

Agradeço a UFSM e ao PPGEQ pela estrutura física disponibilizada.

Agradeço ao CNPq pela bolsa de incentivo à pesquisa, e à Solubio Tecnologias Agrícolas Ltda pelo suporte financeiro ao projeto.

Agradeço a todos que de alguma forma ajudaram e se fizeram presentes durante essa caminhada.

RESUMO

PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS E AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA A MAXIMIZAÇÃO DA ATIVIDADE FITOTÓXICA VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE BIOHERBICIDAS

AUTORA: Dinalva Schein

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti

Plantas daninhas são um dos principais problemas na agricultura. Elas competem com a cultura de interesse por recursos como água, luz e nutrientes. Na agricultura moderna, o método mais utilizado para o controle de plantas daninhas são os herbicidas químicos. A demasiada utilização destes herbicidas vem gerando grandes preocupações com o meio ambiente, devido à contaminação de alimentos, poluição ambiental, resistência de plantas daninhas, entre outros. Neste contexto, o presente trabalho propôs realizar uma prospecção de microrganismos capazes de produzir metabólitos secundários com atividade herbicida em plantas daninhas. Para isso, foi realizada uma busca de campo por plantas daninhas com sintomas de enfermidades, resultando no isolamento de sessenta e três microrganismos. A atividade bioherbicida foi primeiramente avaliada em sementes e plantas de *Cucumis sativus* e em sementes de *Avena strigosa*. Os caldos brutos dos microrganismos com os melhores resultados foram testados em plantas daninhas: *Amaranthus hybridus*, *Echinochloa crusgalli*, *Conyza* sp. e *Bidens pilosa*. Na sequência, as plantas daninhas com maior sensibilidade aos tratamentos (*A. hybridus*, *E. crusgalli*) foram selecionadas para a sequência dos experimentos, onde foram empregados diferentes métodos para a extração e potencialização do efeito herbicida dos metabólitos secundários (ultrassom, co-cultivo e aumento de dose aplicada). Foi realizado um estudo preliminar para o desenvolvimento de formulações com os caldos mais promissores, empregando diferentes óleos (soja, girassol e mineral) e os tensoativos Break-Thru[®] e Tween[®]80 como adjuvantes. As formulações empregando óleo de soja apresentaram os melhores resultados em testes com folha destacada, e foram empregadas nos testes *in vivo* contra *A. hybridus* e *E. crusgalli*. A fitotoxicidade nos testes com formulações chegou a 70% em *E. crusgalli* e 30% em *A. hybridus*, com uma dose equivalente a 600 L ha⁻¹. Os microrganismos identificados por análise molecular foram: *Nigrospora sphaerica*, *Bacillus velezensis* e *Aspergillus flavus*.

Palavras-chave: Prospecção microbiológica. Bioherbicida. Fitotoxicidade. *Amaranthus hybridus*. *Echinochloa crusgalli*.

ABSTRACT

PROSPECTION OF MICROORGANISMS AND EVALUATION OF METHODOLOGIES FOR MAXIMIZING PHYTOTOXIC ACTIVITY FOR THE DEVELOPMENT OF BIOHERBICIDES

Author: Dinalva Schein

Academic Advisor: Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti

Weeds are one of the main problems in agriculture. They compete with the culture of interest for resources such as water, light, and nutrients. In modern agriculture, chemical herbicides are the most widely used method for weed control. The too much use of these herbicides has generated great concerns about the environment, due to food contamination, environmental pollution, weed resistance, among others. In this context, the present work proposed to prospect microorganisms capable of producing secondary metabolites with herbicide activity in weeds. For this, a field search was performed for weeds with symptoms of diseases, resulting in the isolation of sixty-three microorganisms. The bioherbicide activity was first evaluated in seeds and plants of *Cucumis sativus* and seeds of *Avena strigosa*. The crude broths of microorganisms with the best results were tested in weeds: *Amaranthus hybridus*, *Echinochloa crusgalli*, *Conyza* sp., and *Bidens pilosa*. After that, weeds with greater sensitivity to treatments (*A. hybridus*, *E. crusgalli*) were selected for the sequence of experiments, where different methods were used to extract and potentiate secondary metabolites (ultrasound, co-cultivation and increased dose applied). A preliminary study was carried out for the development of formulations with the most promising broths, using different oils (soybean, sunflower, and mineral) and the surfactant Break-Thru® and Tween®80 as adjuvants. The formulations using soybean oil presented the best results in tests with detached leaf and were used in the *in vivo* tests against *A. hybridus* and *E. crusgalli*. Phytotoxicity in tests with formulations reached 70% for *E. crusgalli* and 30% for *A. hybridus*, with a dose equivalent to 600 L ha⁻¹. The microorganisms identified by the molecular analysis were: *Nigrospora sphaerica*, *Bacillus velezensis*, and *Aspergillus flavus*.

Keywords: Microbiological Prospection. Bioherbicide. Phytotoxicity. *Amaranthus hybridus*. *Echinochloa crusgalli*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Aumento cronológico de plantas daninhas resistentes no mundo.....	18
Figura 2 –	Números de espécies de acordo com a família de plantas daninhas.	19
Figura 3 –	Publicações com as palavras-chave “ <i>bioherbicide</i> ” e “ <i>weed control</i> ” de 1987 até 2021 (n = 443). Pesquisa realizada em Abril/2022.	20
Figura 4 –	Países que mais produzem publicações quando combinado as palavras-chaves “ <i>bioherbicide</i> ” e “ <i>weed control</i> ”.	21
Figura 5 –	Fluxograma das atividades realizadas no decorrer do trabalho.....	28
Figura 6 –	a) Planta lesionada; b) Isolamento da área lesionada; c) Crescimento dos microrganismos; d) Cultura pura obtida por meio de repicagens sucessivas.....	30
Figura 7 –	Equipamento de ultrassom utilizado para a extração dos produtos pós fermentação.	32
Figura 8 –	Aparato experimental para filtração.	34
Figura 9 –	Teste de germinação em caixa gerbox, (a) e (b) duplicata de <i>C. sativus</i> L. var wisconsin; (c) e (d) duplicata de <i>A. strigosa</i>	36
Figura 10 –	Melhores resultados de fitotoxicidade obtidos com a aplicação do caldo fermentado em plantas de <i>C. sativus</i>	43
Figura 11 –	Fitotoxicidade (%) ocasionada em plantas de <i>C. sativus</i> com a aplicação do caldo fermentado dos diferentes tratamentos.....	43
Figura 12 –	Árvores filogenéticas dos microrganismos que apresentaram atividade bioherbicida selecionados para identificação, sendo a) cepa γ , b) cepa A14.2 e cepa B22.2, c) cepa B14.....	56
Figura 13 –	Fitotoxicidade acentuada em folhas destacadas de a) <i>E. crusgalli</i> e b) <i>A. hybridus</i>	59
Figura 14 –	Comparativo do crescimento de plantas de <i>E. crusgalli</i> com diferentes tratamentos e aplicação de 600 L ha ⁻¹	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Os 10 ingredientes ativos mais comercializados no Brasil no ano de 2020.....	17
Tabela 2 – Microrganismos que apresentam efeitos fitotóxicos em plantas por meio de metabólitos ou células.	23
Tabela 3 – Área coletada, plantas coletadas e número de microrganismos isolados.	29
Tabela 4 – Descrição das formulações com os caldos já preparados e concentrados em combinação com adjuvantes e diferentes óleos.....	34
Tabela 5 – Descrição dos conceitos aplicados para a avaliação fitotóxica.	37
Tabela 6 – Porcentagem de inibição de germinação em sementes <i>A. strigosa</i>	40
Tabela 7 – Porcentagem de inibição de germinação em sementes <i>C. sativus</i>	41
Tabela 8 – Efeito inibitório em folhas destacadas <i>Conyza</i> sp., <i>B. pilosa</i> , <i>A. hybridus</i> e <i>E. crusgalli</i>	44
Tabela 9 – Efeitos fitotóxicos dos metabólitos dos microrganismos em plantas de <i>Conyza</i> sp., <i>B. pilosa</i> , <i>A. hybridus</i> e <i>E. crusgalli</i> após 21DAA.	46
Tabela 10 – Efeitos dos metabólitos originados a partir da aplicação do caldo bruto, dose tripla e das metodologias EAU, co-cultivo e co-cultivo + EAU sobre parâmetros de desenvolvimento de <i>E. crusgalli</i> avaliados em 14DAA.	49
Tabela 11 – Efeitos dos metabólitos originados a partir da aplicação do caldo bruto, dose tripla e das metodologias EAU, co-cultivo e co-cultivo + EAU sobre parâmetros de desenvolvimento de <i>A. hybridus</i> avaliados em 14DAA.	50
Tabela 12 – Matriz dos resultados de inibições e crescimento das 10 combinações dos microrganismos em placa de petri.	54
Tabela 13 – Resultados físico-químicos obtidos com a formulação dos caldos.	57
Tabela 14 – Resultados das formulações com aplicação de 300 L ha ⁻¹ e 600 L ha ⁻¹ em plantas de <i>E. crusgalli</i>	59
Tabela 15 – Resultados das formulações com aplicação de 300 L ha ⁻¹ e 600 L ha ⁻¹ em plantas de <i>A. hybridus</i>	60

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido-2,4-diclorofenoxiacético
BDA	Batata Dextrose Ágar
FSm-F	Fermentação Submersa com microrganismos com morfologia fúngica
FSm-B	Fermentação Submersa com microrganismos com morfologia bacteriana
(NH ₄)SO ₄	Sulfato de amônio
FeSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato de ferro heptahidratado
MnSO ₄ ·H ₂ O	Sulfato de manganês monohidratado
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
EAU	Extração Assistida por Ultrassom
US	Ultrassom
EHL	Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo
DAA	Dias Após Aplicação
AP	Altura da planta
CR	Comprimento de raiz
MVPA	Massa fresca da parte área
MVR	Massa fresca da raiz
MSPA	Massa seca da parte aérea
MSR	Massa seca da raiz
B22.2	Código da cepa identificada como <i>Nigrospora sphaerica</i>
A14.2	Código da cepa identificada como <i>Nigrospora sphaerica</i>
B14	Código da cepa identificada como <i>Bacillus velezensis</i>
γ	Código da cepa identificada como <i>Aspergillus flavus</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. Objetivo geral	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1. PLANTAS DANINHAS	15
3.2. CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS	15
3.3. HERBICIDAS QUÍMICOS.....	16
3.4. RESISTÊNCIA DE PLANTAS DANINHAS.....	17
3.5. BIOHERBICIDAS PARA CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS	19
3.6. MICRORGANISMOS PARA A PRODUÇÃO DE BIOHERBICIDAS	21
3.7. PROCESSOS PARA A PRODUÇÃO DE BIOHERBICIDA	24
3.7.1. Fermentação submersa	24
3.7.2. Extração Assistida por Ultrassom (EAU).....	24
3.7.3. Co-cultivo.....	26
3.8. FORMULAÇÃO DE BIOHERBICIDAS	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. COLETA DE PLANTAS LESIONADAS	29
4.2. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS FITOPATOGÊNICOS.....	29
4.3. PROCESSO FERMENTATIVO	30
4.4. ESTRATÉGIAS DE MELHORAMENTO DA ATIVIDADE HERBICIDA DO CALDO FERMENTADO	31
4.4.1. Co-cultivo.....	31
4.4.2. Extração assistida por ultrassom (EAU) pós fermentação	32
4.4.3. Estratégias de co-cultivo associada a EAU pós-fermentação	33
4.4.4. Formulação.....	33
4.5. <i>SCREENING</i> PRIMÁRIO	35
4.5.1. Germinação de <i>Cucumis sativus</i> L. var wisconsin e <i>Avena strigosa</i>	35
4.5.2. Aplicação do caldo fermentado <i>in vivo</i> em plantas de <i>C. sativus</i> L. var wisconsin.....	36
4.5.3. Aplicação do caldo de fermentação em folha destacada de plantas daninhas	37
4.6. <i>SCREENING</i> SECUNDÁRIO	38
4.6.1. Aplicação em cultivo plantas daninhas.....	38
4.7. IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	38
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40

5.1.	<i>SCREENING</i> PRIMÁRIO	40
5.1.1.	Germinação de <i>C. sativus</i> e <i>A. strigosa</i>	40
5.1.2.	Aplicação do caldo fermentado em <i>C. Sativus</i>	42
5.1.3.	Folha destacada.....	44
5.2.	<i>SCREENING</i> SECUNDÁRIO: APLICAÇÃO <i>IN VIVO</i> DE PLANTAS DANINHAS.....	46
5.2.1.	Caldo fermentado bruto.....	46
5.3.	ESTRATÉGIAS PARA AUMENTO DA ATIVIDADE HERBICIDA DO CALDO DE FERMENTADO	48
5.3.1.	Aplicação de dose tripla	51
5.3.2.	Caldo bruto submetido a EAU	52
5.3.3.	Co-cultivo.....	53
5.3.4.	Co-cultivo com EAU	55
5.4.	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	55
5.5.	FORMULAÇÃO	57
6.	CONCLUSÃO.....	62
	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	63
7.	REFERÊNCIAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

Plantas daninhas são um dos principais problemas na agricultura (KLAIC et al., 2017; VASILAKOGLU; ELEFTHROHORINOS; DHIMA, 2000). Estas espécies apresentam alta capacidade de capturar recursos como micronutrientes e luz (MATHUR; GEHLOT, 2018). A agricultura moderna tem dependido quase que exclusivamente de herbicidas químicos, devido à alta eficiência em curto prazo e custo relativamente baixo em comparação a outras tecnologias de manejo de controle de plantas daninhas (ZHU et al., 2020).

Entretanto, herbicidas químicos apresentam algum grau de toxicidade, tanto para os seres humanos como em animais e o meio ambiente. Além disso, podem ser facilmente lixiviados até as águas subterrâneas ou entrar na cadeia alimentar. A persistência no solo facilita o desenvolvimento de resistência de algumas espécies prevalentes de plantas daninhas aumentando continuamente a demanda pela aplicação desses herbicidas (BO et al., 2019; HASAN et al., 2021; TRIOLET et al., 2020). A necessidade de formas de manejo mais sustentáveis, juntamente com a crescente resistência das plantas daninhas, impulsiona a busca por outros métodos para regular a infestação de plantas daninhas (ABBAS et al., 2018; KOŁODZIEJCZYK, 2015).

Uma alternativa ao uso intensivo de herbicidas químicos são os bioherbicidas, que se baseiam em agentes vivos naturais como bactérias, fungos, plantas e os metabólitos produzidos durante seu crescimento (ANEJA et al., 2013; HARDING; RAIZADA, 2015; RADHAKRISHNAN; ALQARAWI; ABD ALLAH, 2018; STEFANSKI et al., 2020; STENBERG et al., 2021). Fitopatógenos, em especial os fungos, estão entre os mais estudados, pois possuem a capacidade específica de produzir substâncias tóxicas (CHAVES NETO et al., 2021; DANIEL et al., 2020; TODERO et al., 2020). Os metabólitos produzidos por estes microrganismos são capazes de penetrar nas folhas das plantas, desintegrar sua estrutura celular e induzir a produção de lesões necróticas ou halo clorótico (HASAN et al., 2021; LI et al., 2003).

Ao mesmo tempo que a especificidade dos bioherbicidas é uma característica vantajosa, faz-se necessário o desenvolvimento de diferentes bioherbicidas para cada planta daninha de interesse (KLAIC et al., 2017; REICHERT JÚNIOR et al., 2019). Somado ao fato de ser uma área de pesquisa ainda recente e com poucos produtos comerciais registrados mundialmente, emerge a necessidade de prospecção de novos bioherbicidas a fim de contemplar o maior número possível de plantas daninhas que afetam as produções agrícolas atualmente (RADHAKRISHNAN; ALQARAWI; ABD ALLAH, 2018).

Existem treze bioherbicidas registrados no mundo, sendo nove baseados em fungos, três em bactérias e um proveniente de extrato de planta (CORDEAU et al., 2016; RADHAKRISHNAN; ALQARAWI; ABD ALLAH, 2018). Algumas plantas daninhas conhecidas por afetar culturas produzidas mundialmente em larga escala ainda não possuem bioherbicida dedicado ao seu controle. Por exemplo, *Bidens pilosa* e *Amaranthus* sp. afetam culturas de arroz, milho e soja. Já *Conyza* sp. afeta plantações principalmente de soja, algodão e milho (HEAP, 2022). *Echinochloa* sp. são comumente encontrados em plantações de arroz (CORDEAU et al., 2016).

Nesse contexto, esse trabalho buscou encontrar bioherbicidas viáveis para o controle de *Amaranthus* sp., *B. pilosa*, *Conyza* sp. e *Echinochloa* sp., a partir da prospecção de microrganismos encontrados acometendo indivíduos de plantas daninhas. Ainda, uma série criteriosa de etapas para a otimização do potencial fitotóxico dos microrganismos com atividade inibitória nessas plantas daninhas foi realizada, incluindo o uso de ultrassom para a extração de metabólitos, co-cultivo e o emprego de adjuvantes para maximizar a interação dos metabólitos com os tecidos das plantas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Realizar a prospecção de microrganismos com potencial de aplicação para o controle de plantas daninhas.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar o isolamento de microrganismos a partir de plantas daninhas com sintomas de doenças prospectadas no campo;
- Realizar o *screening* primário (*in vitro*) e secundário (*in vivo*) dos microrganismos em plantas-teste;
- Realizar a intensificação da atividade bioherbicida através de estratégias de melhoramento do caldo fermentado, como co-cultivo, utilização de ultrassom e aumento de volume aplicado;
- Desenvolver formulações para potencialização da atividade bioherbicida.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. PLANTAS DANINHAS

Plantas daninhas, também conhecidas como ervas daninhas, são consideradas plantas indesejadas e um dos principais problemas na agricultura (KLAIC et al., 2017; VASILAKOGLU; ELEFTHROHORINOS; DHIMA, 2000). As plantas daninhas desempenham papéis duplos, como fornecer habitat a diversos insetos, restaurar a biodiversidade, mas ao mesmo tempo são problemáticas por apresentarem alta capacidade de capturar recursos como dióxido de carbono, calor, nutrientes, luz, água e espaço, além de servirem como hospedeiro para patógenos de plantas, ocasionando perdas na produtividade (BO et al., 2019; GEORGIEVA et al., 2015; MATHUR; GEHLOT, 2018; TRIOLET et al., 2020). Além disso, apresentam elevada produção de sementes as quais se dispersam facilmente e tem elevada capacidade de regeneração, podendo permanecer no solo até que as condições sejam propícias à germinação (TROGNITZ et al., 2016). Assim, as plantas daninhas são importante fator de prejuízos à agricultura, interferindo diretamente na produção, reduzindo-a drasticamente por área, resultando em prejuízos econômicos (TROGNITZ et al., 2016).

Algumas plantas daninhas já são conhecidas pela cultura que afetam. *B. pilosa* e *Amaranthus sp.*, conhecidos respectivamente como picão-preto e caruru, afetam culturas de arroz, milho e soja. Já *Conyza sp.*, também conhecida como buva, afeta principalmente plantações de soja, algodão e milho. Enquanto *Echinochloa sp.*, *Ipomoea sp.*, e *Euphorbia heterophylla*, conhecidos como capim-arroz, corda de viola e leiteira, respectivamente, são comumente encontradas em plantações de arroz (HEAP, 2022).

3.2. CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS

Entre os antigos métodos de controle de plantas daninhas, destacava-se a prática de puxar e cortar à mão as plantas. No entanto, com o passar dos anos, ferramentas manuais foram desenvolvidas para lavrar o solo e com o desenvolvimento de tecnologia, metodologias mais modernas foram implementadas para o controle de plantas daninhas (JABRAN et al., 2015; YOUNG; PIERCE; NOWAK, 2014), facilitando assim o trabalho da agricultura (TRIOLET et al., 2020). Dentre os métodos utilizados para o controle de plantas daninhas, destaca-se o controle cultural, mecânico, biológico e químico, que podem ser usados de maneira isolada ou em conjunto (SILVA; BRAUN; COELHO, 2011; SOUZA BARROS et al., 2021).

O método de controle cultural é baseado na rotação de cultura, manejo de solo, água e fertilidade, atuando como um método preventivo de patógenos de solos e pragas agrícolas (SILVA; BRAUN; COELHO, 2011). O método mecânico inclui a roçada e outros meios utilizando implementos de tração manual ou mecânico (JABRAN et al., 2015; SILVA; BRAUN; COELHO, 2011).

O controle químico é amplamente utilizado no mundo e consiste no uso de produtos químicos conhecidos como herbicidas, que possuem diferentes mecanismos de ação e seu uso em excesso vem ocasionando resistência de plantas e poluição do meio ambiente (ÖZKARA; AKYIL; KONUK, 2016). Já o controle biológico surge como uma alternativa sustentável com a utilização de organismos vivos para o controle de plantas daninhas. Esse método de controle consiste na aplicação de células microbiológicas para o combate de pragas (SOUZA BARROS et al., 2021; STENBERG et al., 2021). Juntamente com o controle biológico, há o controle bioquímico que consiste na utilização de metabólitos secundários oriundos desses microrganismos (BRUN et al., 2022; DANIEL et al., 2018; PAPAGIANNI, 2004; TODERO et al., 2019).

3.3. HERBICIDAS QUÍMICOS

A agricultura moderna depende quase que exclusivamente dos agentes químicos, devido à alta produtividade em curto prazo e o custo relativamente baixo em comparação às outras tecnologias de manejo de controle de plantas daninhas. Além disso, podem ser utilizados nas etapas de pré- ou pós-emergência (DAYAN et al., 2019; SILVA; BRAUN; COELHO, 2011).

Apesar de existirem centenas de herbicidas diferentes em diversos produtos comercializados mundialmente, os ingredientes ativos de herbicidas disponíveis nos países variam de acordo com as restrições regulatórias, econômicas e agrícolas (DAYAN et al., 2019). O boletim anual de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil, registrado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) em 2020 totalizou aproximadamente 685.745,68 toneladas de ingredientes ativos vendidos como produtos formulados e registrados como químicos e bioquímicos. Esse número representa um aumento de 10,51% nas vendas em relação a 2019. Com base nos dados de 2020, o agrotóxico mais comercializado no Brasil é o com base no ingrediente ativo glifosato (Tabela 1) (IBAMA, 2021).

Tabela 1 – Os 10 ingredientes ativos mais comercializados no Brasil no ano de 2020.

Ingrediente Ativo	Vendas (ton.IA*)	Ranking
Glifosato e seus sais	246.017,51	1°
Ácido-2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)	57.597,57	2°
Mancozebe	50.526,87	3°
Atrazina	33.321,11	4°
Acefato	29.982,50	5°
Clorotalonil	24.191,03	6°
Malationa	15.702,11	7°
Enxofre	11.390,90	8°
Imidacloprido	9.401,65	9°
Clorpirifós	8.864,88	10°

*Unidade de medida: tonelada de Ingrediente ativo (ton.IA)

Fonte: IBAMA, 2021.

A despeito da alta eficiência observada primariamente com o uso de agentes químicos no manejo de plantas daninhas, a sociedade e o meio ambiente vêm sofrendo com os efeitos negativos que eles trazem a longo prazo (SOUZA BARROS et al., 2021). Muitos herbicidas não são biodegradáveis, apresentam toxicidade leve a moderada, com a irrigação ou chuva os herbicidas são lixiviados para as águas subterrâneas causando danos à fauna e à flora, além de facilitar a transmissão da substância tóxica para a cadeia alimentar (JURADO et al., 2011). Assim, o uso elevado de herbicidas químicos gera desafios como desequilíbrio biológico, acúmulo de resíduos nocivos no solo e nos recursos hídricos, poluição ambiental, bem como, alimentos contaminados, intoxicação de operadores e resistência de algumas espécies prevalentes de plantas daninhas (BO et al., 2019; BONNY, 2016; DE OLIVEIRA et al., 2019).

3.4. RESISTÊNCIA DE PLANTAS DANINHAS

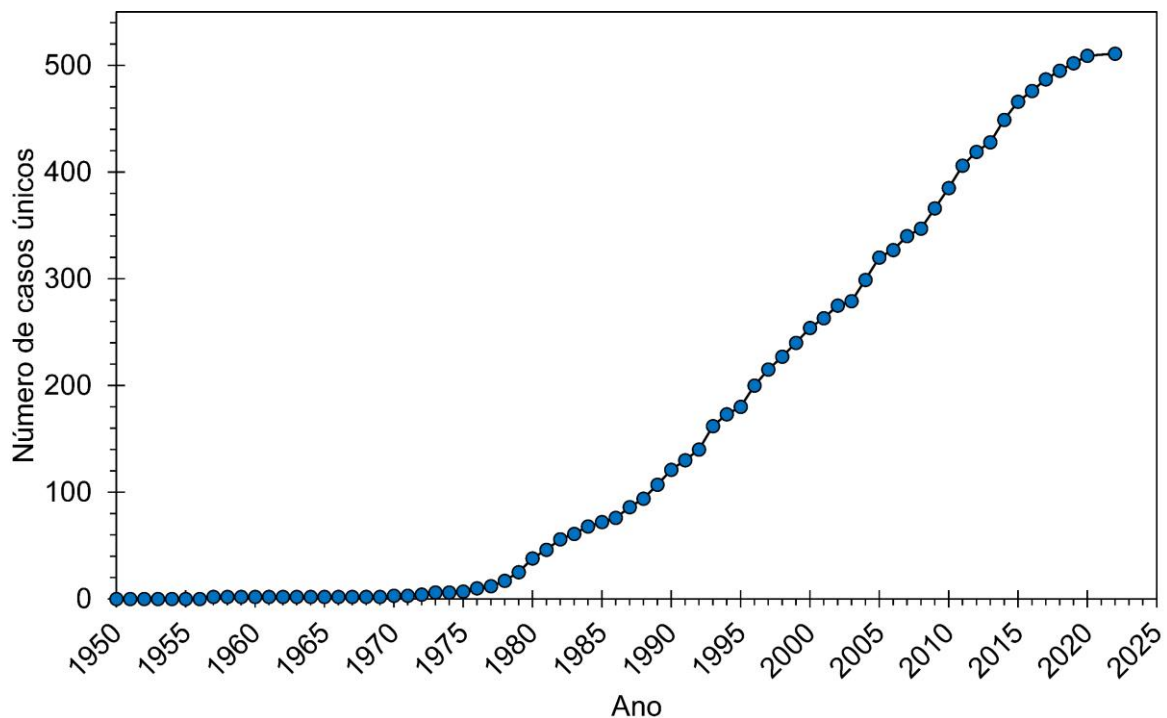
Resistência de plantas daninhas é a capacidade que as plantas daninhas adquirem em sobreviver a determinada aplicação de dose de herbicida (PEROTTI et al., 2020). Esse fenômeno pode ocorrer tanto naturalmente ou pelo uso repetitivo de determinada molécula herbicida, fazendo com que a planta adquira a capacidade de sobreviver (GAINES et al., 2020).

O glifosato é o herbicida mais comercializado mundialmente, e logo após os primeiros relatos de plantas daninhas resistentes a esse princípio ativo, iniciaram-se estudos em empresas públicas e privadas para desenvolver novas alternativas, de modo que os produtores tenham opções de gerir a resistência das plantas daninhas (GREEN, 2009; IBAMA, 2021).

Diversas plantas vêm sendo registradas como resistentes aos herbicidas químicos (IWAKAMI et al., 2019), conforme demonstrado na Figura 1, há um aumento cronológico de

resistência de plantas daninhas no mundo. De acordo com o *International Herbicide-Resistant Weed Database* (Banco de dados Internacional de Ervas daninhas resistentes a herbicidas), atualmente, no mundo, existem 511 casos únicos de resistência (espécie x herbicida), com 266 espécies, sendo 153 dicotiledôneas e 113 monocotiledôneas (HEAP, 2022).

Figura 1 – Aumento cronológico de plantas daninhas resistentes no mundo.



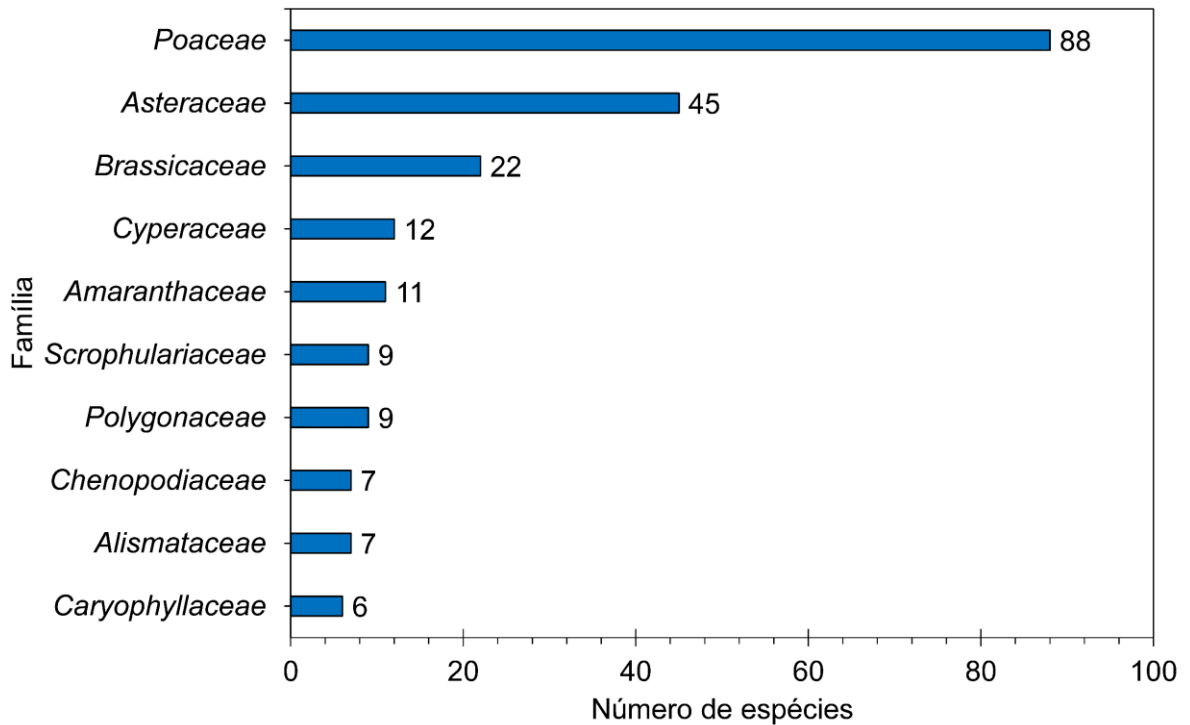
Fonte: HEAP, 2022.

O Banco de dados Internacional de Ervas Daninhas resistentes a herbicidas apresenta também o número de espécies de cada família das plantas daninhas que mais apresentam números representativos de resistência (Figura 2) (HEAP, 2022).

O número de herbicidas químicos eficazes tem diminuído nos últimos anos, pois a taxa de evolução de plantas daninhas resistentes é maior que a taxa de descoberta de novos herbicidas (GAINES; BUSI; KÜPPER, 2021). Diante de todos esses problemas e visando o desenvolvimento sustentável, têm-se a necessidade de encontrar alternativas ambientalmente amigáveis para o controle dessas plantas indesejáveis (KLAIC et al., 2017). Estudos vêm sendo realizados buscando substituição parcial ou total de herbicidas químicos por compostos naturais

e ambientalmente viáveis devido à grande importância na agricultura e conseqüentemente para à saúde humana e ao meio ambiente (MORRA; POPOVA; BOYDSTON, 2018).

Figura 2 – Números de espécies de acordo com a família de plantas daninhas.



Fonte: HEAP, 2022.

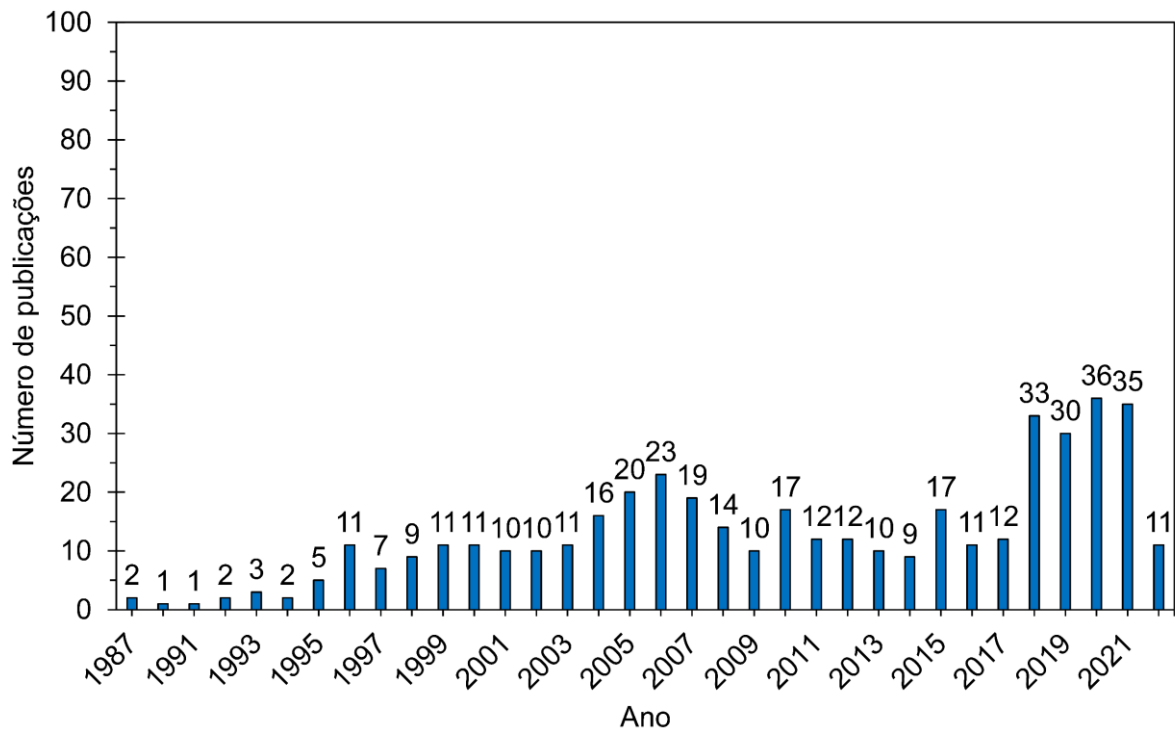
3.5. BIOHERBICIDAS PARA CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS

O termo bioherbicida faz referência a um herbicida que se baseia em agentes vivos naturais (ANEJA et al., 2013). Bactérias, fungos, vírus, nematóides, rizobactérias e os metabólitos produzidos durante o crescimento de microrganismos têm sido utilizados para a produção de bioherbicida (HARDING; RAIZADA, 2015; STEFANSKI et al., 2020; STENBERG et al., 2021).

Uma investigação científica foi realizada em Abril/2022 na base de dados Scopus®, com a combinação das palavras-chaves “*bioherbicide*” e “*weed control*”, para avaliar o número de estudos que vêm sendo realizados diante da necessidade de novos produtos de origem biológica. A abordagem resultou em 443 documentos científicos. Destes, 369 documentos são artigos científicos que envolvem controle de plantas daninhas e bioherbicidas. 34 documentos são do tipo *review* e os demais documentos são livros, capítulos de livros, artigos de

conferências e notas técnicas. A Figura 3 apresenta o número de publicações científicas dos anos de 1987 a 2021, mostrando a evolução da temática ao longo dos anos.

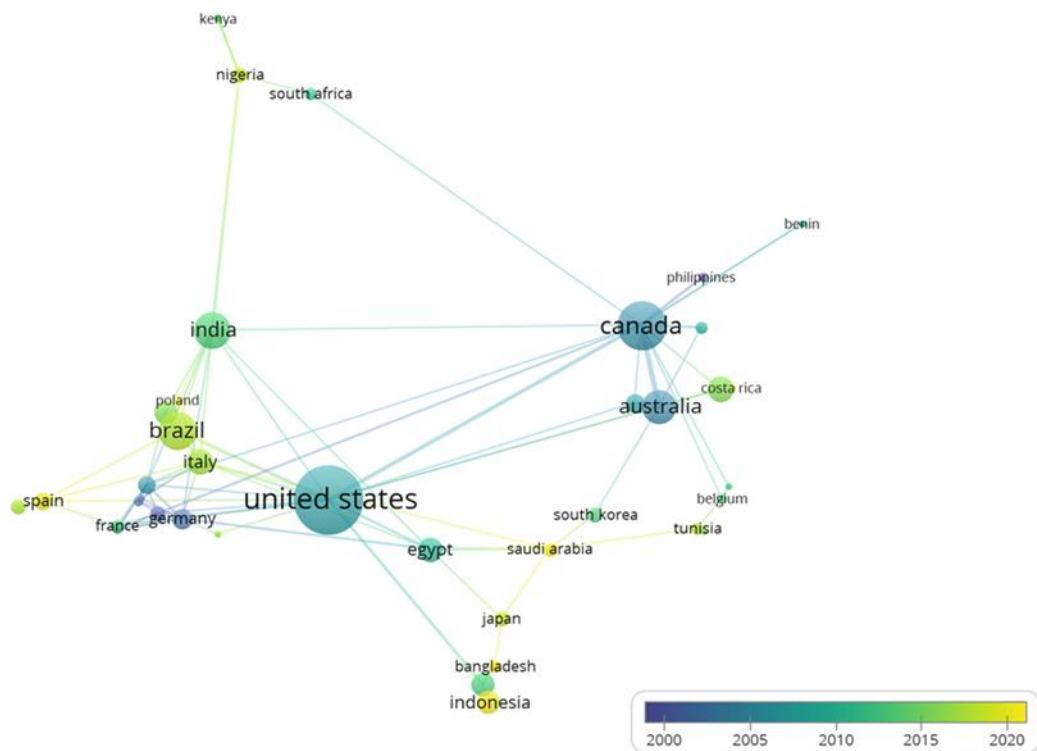
Figura 3 - Publicações com as palavras-chave “*bioherbicide*” e “*weed control*” de 1987 até 2021 (n = 443). Pesquisa realizada em Abril/2022.



Fonte: Base nos dados Scopus®.

A produção científica aumentou a partir do ano de 2004, tendo um pico em 2007 e oscilando até 2018. Nos últimos 4 anos, a média de publicações é de 33 documentos. Esse aumento do número de publicações pode estar relacionado à demanda de bioprodutos e a abordagem sustentável que vem sendo empregada mundialmente. Assim, avaliando a produção científica em âmbito geográfico (Figura 4), também baseados na base de dados *Scopus* até abril de 2022, observa-se que o Brasil ocupa a terceira posição, estando atrás apenas dos Estados Unidos e Canadá, além de demonstrar a busca e o desenvolvimento de novas tecnologias ambientalmente amigáveis em diferentes países.

Figura 4 – Países que mais produzem publicações quando combinado as palavras-chaves “*bioherbicide*” e “*weed control*”.



Fonte: Base nos dados Scopus®.

3.6. MICRORGANISMOS PARA A PRODUÇÃO DE BIOHERBICIDAS

Bioherbicidas consistem em fitotoxinas derivadas de insetos, extratos de plantas ou microrganismos (HASAN et al., 2021). Microrganismos produzem diversas biomoléculas por meio de processos fermentativos ou derivações de seus compostos, com variadas características biológicas e estruturais (DE ALMEIDA et al., 2020). Fitotoxinas de fungos e bactérias vem sendo estudados para a produção de bioprodutos para diversas áreas, incluindo para a agricultura (BORDIN et al., 2021).

As fitotoxinas são capazes de danificar as plantas daninhas, através da penetração na folha, seguida da destruição da parede celular induzindo a lesões necróticas. Além disso, podem atuar em caules e frutos, não sendo tóxicos ao homem, aos animais e ao meio ambiente (JABRAN et al., 2015; TODERO et al., 2019). Os fungos caracterizam-se por possuírem maior capacidade de biossintetizar uma gama de compostos naturais, que possuem papéis importantes no desenvolvimento de sintomas de doenças em plantas, como manchas foliares, folhas murchas, clorose, necrose e inibição e promoção de crescimento (AHMED et al., 2001; BO et

al., 2019; XU et al., 2021). A produção de cianeto de hidrogênio, ácido indolacético, amônia, dimetil dissulfeto, compostos voláteis tóxicos e outros metabólitos inibidores de crescimento de plantas, são exemplos de fitotoxinas oriundas de células bacterianas ou fúngicas que retardam o crescimento das plantas (RADHAKRISHNAN; ALQARAWI; ABD ALLAH, 2018).

Apesar de possuírem período de atividade biológica curto e com baixas concentrações, comparadas aos herbicidas químicos, apresentam vantagens por serem biodegradáveis e menos propensos a causar contaminação do solo e água (KREMER, 2019). A Tabela 2 apresenta alguns estudos já desenvolvidos na produção de bioherbicidas provenientes de microrganismos apresentando diversos sintomas em plantas-teste ou plantas daninhas.

Tendo em vista que o ecossistema é composto por inúmeros microrganismos, tem-se uma alternativa para a produção de bioprodutos com a utilização de recursos genéticos da biodiversidade brasileira. Dentre as possibilidades, destaca-se a seleção de microrganismos, no próprio meio ambiente, que possam ser usados na produção de bioherbicidas. O Brasil apresenta uma grande diversidade biológica, com diferentes características climáticas e composto por seis biomas (Pampa, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Pantanal e Floresta Amazônica). O Rio Grande do Sul possui uma grande diversidade de solo, clima e relevo, sendo composto por dois grandes biomas: a Mata Atlântica e o Pampa (VERDUM et al., 2019). Alguns estudos já apontaram a exploração de microrganismos nestes biomas, como *Fusarium fujikuroi* (DANIEL et al., 2018), *Fusarium oxysporum*, *Fusarium ploriferatum*, *Trichoderma koningiopsis* (REICHERT JÚNIOR et al., 2019) e *Diaporthe* sp. (SOUZA et al., 2017), mas, como é provável que novas espécies de microrganismos possam ser descobertas, há a necessidade de novas investigações.

Tabela 2 – Microrganismos que apresentam efeitos fitotóxicos em plantas por meio de metabólitos ou células.

Microrganismo	Metabólito/ Biomassa	Efeito fitotóxico	Planta alvo	Referência
<i>Diaporthe schini</i>	Metabólitos	Redução da massa seca da parte aérea e raiz	<i>B. pilosa</i> , <i>A. viridis</i> , <i>E. crusgalli</i> , <i>L. multiflorum</i>	(BRUN et al., 2022)
<i>Phoma</i> sp.	Metabólitos	Fitotoxicidade	<i>Bidens pilosa</i> , <i>Amaranthus retroflexus</i> , <i>Conyza canadensis</i>	(TODERO et al., 2018)
<i>Fusarium fujikuroi</i>	Metabólitos	Clorose; necrose; diminuição da altura e raiz da planta	<i>Cucumis sativus</i> L., <i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	(DANIEL et al., 2018)
<i>Ascochyta agropyrina</i>	Metabólitos	Redução do crescimento da raiz	<i>Chenopodium album</i> L., <i>Cirsium arvense</i> (L.), <i>Mercurialis annua</i> L., <i>Sonchus oleraceus</i> L., <i>Setariavirdis</i> (L.)	(CIMMINO et al., 2013)
<i>Diaporthe gulyae</i>	Metabólitos	Necrose	<i>Papaver rhoeas</i> L., <i>Urtica dioica</i> L.	(ANDOLFI et al., 2015)
<i>Phoma herbarum</i>	Fração de metabólitos/ extraídos com solvente	metabólitos Efeito total	<i>P. hysterophorus</i> , <i>Lantana camara</i> L., <i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Piot., <i>Sida acuta</i> Burm.f	(KALAM; KHAN; SINGH, 2014)
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	Cultura líquida	Inibição de germinação	<i>Solanum lycopersicum</i> L., <i>Amaranthus hybridus</i> L., <i>E. crusgalli</i>	(ADETUNJI; OLOKE; OSEMWEGIE, 2018)
<i>Myrothecium roridum</i>	Suspensão de esporos com formulação	Necrose	<i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.)	(PIYABOON et al., 2016)
<i>Sclerotium rolfsii</i>	Cultura líquida/inóculo	Diminuição da densidade populacional	<i>Solidago canadensis</i> L.	(ZHANG et al., 2019)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Metabólitos	Inibição de germinação e crescimento	<i>A. hybridus</i>	(ADETUNJI et al., 2019)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Cultura líquida	Redução de germinação e de crescimento de raiz	<i>Bromus tectorum</i> L., <i>Aegilops cylindrical</i> Host, <i>Taeniatherum caput-medusae</i> (L.) Nevski	(KENNEDY, 2018)
<i>Fusarium solani</i>	Metabólitos	Inibição de germinação	<i>Striga hermonthica</i>	(AHMED et al., 2001)
<i>Fusarium nygamai</i>	Metabólitos	Clorose, necrose, inibição do crescimento de raiz e mortalidade	<i>Striga hermonthica</i>	(CAPASSO et al., 1996)
<i>Alternaria alternata</i>	Metabólitos	Necrose e mortalidade	<i>Digitaria sanguinalis</i> <i>Ageratina adenophora</i>	(CHEN; QIANG, 2017)

3.7. PROCESSOS PARA A PRODUÇÃO DE BIOHERBICIDA

3.7.1. Fermentação submersa

Cada vez mais a indústria vem buscando metodologias de otimização de processos, tornando-os mais eficientes em termos de qualidade, energia, tempo e economia (GOGATE; KABADI, 2009). Dentre os métodos de fermentação, a fermentação submersa é a mais empregada industrialmente para a produção de uma variedade de produtos microbianos, e comumente utilizada na produção de produtos voltados à agricultura, como os bioherbicidas (GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000; KLAIC et al., 2015).

A fermentação submersa é definida como a fermentação na presença de excesso de água, sob agitação, onde ocorre a produção de biomassa e metabólitos secundários (SINGHANIA et al., 2010). Dentre as vantagens da fermentação submersa destaca-se a redução das possibilidades de contaminações e maior facilidade de recuperação do produto desejado. As condições do processo fermentativo, como meio e tempo de fermentação, agitação, aeração, temperatura, pH, tempo de incubação, influenciam diretamente na produção de biomassa e metabólitos secundários (ASH, 2010; SAEED et al., 2022).

Fungos, cultivados em cultura líquida, produzem conídios ou propágulos secundários, como microscleródios ou clamidósporos de hifas ou de conídios, tornando-se ideais para a produção de bioherbicidas (ASH, 2010; GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000; KLAIC et al., 2015). A concentração de fitotoxinas na fermentação submersa é relativamente baixa, uma vez que se encontram diluídos em grande volume de meio (TODERO et al., 2019). Assim, diversas etapas fazem-se necessárias para garantir a efetividade e viabilidade da produção de bioherbicidas, como a purificação e concentração, emprego de ultrassom e formulação.

3.7.2. Extração Assistida por Ultrassom (EAU)

O ultrassom tem sido usado para diversas finalidades com objetivo de intensificar processos físicos ou químicos, podendo ser aplicado em sólidos, líquidos e gases (NAVEENA; ARMSHAW; TONY PEMBROKE, 2015). Os meios líquidos contêm gases dissolvidos que podem ser expandidos e colapsados pela ação do ultrassom, esse fenômeno é conhecido como cavitação (EHGARTNER; HERWIG; FRICKE, 2017; LUO; FANG; SMITH, 2014; NAVEENA; ARMSHAW; TONY PEMBROKE, 2015; VEITER; RAJAMANICKAM; HERWIG, 2018).

A cavitação normalmente é definida como a expansão, crescimento e colapso de bolhas que liberam um volume muito grande de energia em uma área muito pequena (JADHAV et al., 2016). A turbulência do fluido que é causada pela cavitação é capaz de quebrar partículas, reduzindo o tamanho da partícula, aumentando a transferência de massa através da membrana celular e permitindo a liberação e dissolução de material intracelular (JADHAV et al., 2016; ZHANG et al., 2008).

Esse fenômeno gera uma série de alterações físicas ou químicas no meio em que é aplicado (ASHOKKUMAR, 2011; CAPOCELLI et al., 2014; COCHRAN; PRAUSNITZ, 2001; JADHAV et al., 2016; SAVE; PANDIT; JOSHI, 1994). Radicais livres podem ser gerados no processo de cavitação, devido a dissociação de vapores presos nas bolhas cavitantes, intensificando reações químicas ou alterando mecanismos de reação (GOGATE; KABADI, 2009). Além disso, causam ondas de choque, turbulência e forças de cisalhamento, bastante utilizados em emulsificações, extrações e limpezas (VEITER; RAJAMANICKAM; HERWIG, 2018).

A cavitação pode ser classificada com base no seu modo de geração, acústico, hidrodinâmico, óptico e de partículas, porém apenas a cavitação acústica e a hidrodinâmica são capazes de gerar intensidades capazes de produzir mudanças físicas ou químicas (GOGATE; KABADI, 2009). A amplitude, pressão, temperatura, viscosidade e a concentração do meio são variáveis que interferem no tipo de cavitação gerado durante a intensificação do processo (NAVEENA; ARMSHAW; TONY PEMBROKE, 2015).

O ultrassom pode ser classificado de acordo com o nível de frequência. Alta frequência e baixa potência, consiste na faixa de 2 a 10 MHz e é utilizado em imagens médicas e análises químicas. Ultrassom de baixa frequência e alta potência, faixa de 20 a 100 kHz, é frequentemente utilizado para aplicações sonoquímicas (ROKHINA; LENS; VIRKUTYTE, 2009). Alta intensidade aplicado em células microbianas tem como principal finalidade quebrar as células para liberação de moléculas intracelulares, e quando aplicado em baixas intensidades, melhora a produtividade de alguns processos de fermentação sem danificar as células (HERRÁN et al., 2008).

O emprego do ultrassom vem sendo amplamente utilizado na extração de pigmentos, lipídios, polissacarídeos, enzimas e proteínas (ZHENG et al., 2021). Como os resultados promissores encontrados com o uso de ultrassom na fermentação de *Beauveria bassiana* para a produção de quitinase e β -1,3-glucanase (SCHMALTZ et al., 2021). Em estudos com a utilização de ultrassom para a produção de açúcares fermentescíveis a partir de resíduos de cervejaria também se mostraram eficientes (LUFT et al., 2019). Aromas, antioxidantes,

pigmentos, fenóis, carotenóides e antocianinas também foram extraídos, com eficiência, utilizando metodologias de emprego de ultrassom (CHEMAT et al., 2017; CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011; SAFDAR; KAUSAR; NADEEM, 2017).

3.7.3. Co-cultivo

Os microrganismos possuem um grande e importante histórico de fonte de novos produtos (BERTRAND et al., 2014). A ideia de realizar junção de microrganismos através de co-cultura tem como objetivo otimizar a produção de compostos que não são produzidos em monocultura e encontrar novas estruturas químicas (BORUTA; MILCZAREK; BIZUKOJC, 2019; GEHLOT; SINGH, 2018; SARI; KUSHARYOTO; BRAZIA, 2020).

O co-cultivo é uma abordagem que envolve dois microrganismos ou mais, através das interações entre espécies em um mesmo ambiente confinado e pode ser conseguida por meio sólido ou líquido (BERTRAND et al., 2014; BORUTA; MILCZAREK; BIZUKOJC, 2019; HARWANI; BEGANI; LAKHANI, 2018). As culturas interagem uma com as outras através do contato célula a célula ou molécula sinalizadora que podem levar a descoberta de novas substâncias químicas (HARWANI; BEGANI; LAKHANI, 2018). Como consequência, a existência de diferentes microrganismos no mesmo meio pode afetar a morfologia do microrganismo, desenvolvimento e síntese de metabólitos secundários (SANDLAND; RODGERS; MINCHELLA, 2007). O co-cultivo fúngico por via submersa que visa a produção de metabólitos secundários ainda é pouco explorado e requer investigações (BORUTA; MILCZAREK; BIZUKOJC, 2019).

3.8. FORMULAÇÃO DE BIOHERBICIDAS

É conhecido que a produção de bioherbicidas requer diferentes etapas no processo, e para investigar e aprimorar os conhecimentos acerca de metabólitos secundários por meio da fermentação submersa, comumente os caldos fermentados passam por algumas etapas de purificação, caracterização e formulação (CHAVES NETO et al., 2021; VERMEER; BAUR, 2007).

A formulação auxilia na estabilidade final do produto, melhora a molhabilidade e a capacidade de se espalhar e penetrar na planta, e, conseqüentemente, melhora a ação do produto (ANA et al., 2020; GASIC; TANOVIC, 2013). O uso de adjuvantes durante a formulação se

faz importante devido a capacidade de reforçar as propriedades físico-químicas presentes no caldo fermentado (DE RUITER et al., 2003; GASIC; TANOVIC, 2013).

Dentre os adjuvantes, os ativadores modificam certas características dos herbicidas como tamanho das partículas, viscosidade, taxa de purificação, distribuição de pulverização, e tendem a reduzir a tensão superficial da água melhorando o espalhamento do produto, assim aumentando a atividade herbicida. Nesse grupo de adjuvantes, incluem-se os surfactantes, que agem principalmente na capacidade de penetração do produto à planta, os agentes umectantes que ajudam a espalhar o produto de forma mais uniforme e os óleos que são adicionados para aumentar o tempo de retenção do produto nas folhas, aumentando a absorção do herbicida (CHAVES NETO et al., 2021; DE RUITER et al., 2003; SS; RANA, 2016; VERMEER; BAUR, 2007).

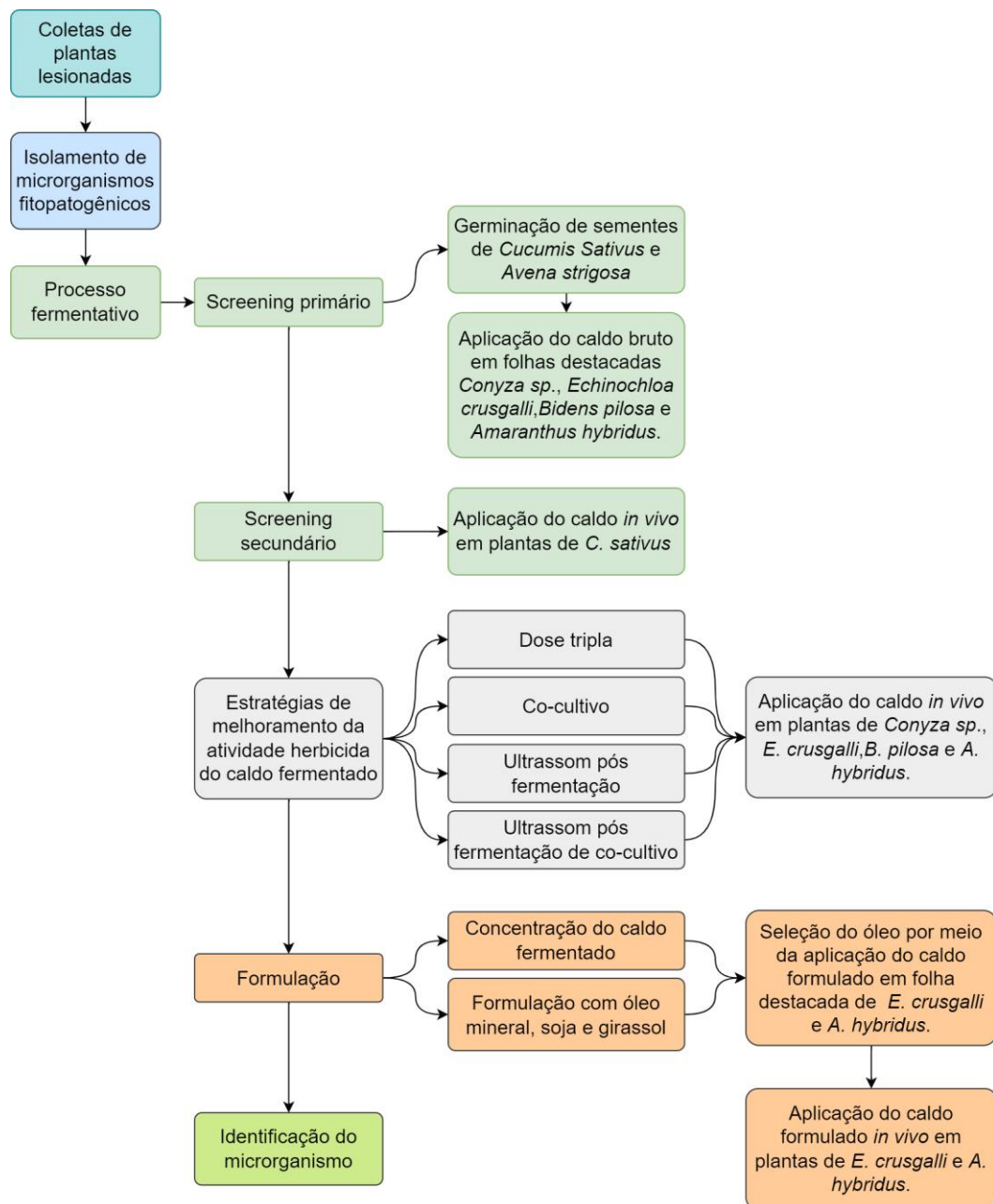
Diversos óleos vegetais são conhecidos por ser fonte de ingredientes e apresentam grande potencial como matéria prima (PRÁ et al., 2019). O uso de óleos vegetais surge como uma alternativa de incorporação de compostos em uma formulação por meio de emulsões. Esse fenômeno consiste na mistura de dois líquidos imiscíveis, onde gotículas líquidas ficam dispersas no outro líquido, essas gotículas variam de 0,1 a 10 μm e torna a mistura estável. As emulsões podem ser tanto água em óleo (A/O) quanto óleo em água (O/A). Quando se combinam mais de um tensoativo, baseia-se que eles possuem uma propriedade em comum, apresentam um equilíbrio entre as porções hidrofílicas e lipofílicas na sua estrutura molecular, chamado Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico (EHL), que pode variar de 1 (lipofílico) a 20 (hidrofílico). Valores de EHL entre 4 e 7 são favoráveis para emulsões A/O e EHL alto para emulsões O/A (DE RUITER et al., 2003).

Atualmente, pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de rastrear óleos e agentes emulsificantes para melhorar as formulações na área de biopesticidas (ANA et al., 2020; DE ALMEIDA et al., 2020; DE OLIVEIRA et al., 2019; TABAN; SAHARKHIZ; KHORRAM, 2020; TODERO et al., 2018). Estudos de formulações com óleo de palma e Tween[®]80 demonstraram-se eficientes e potencializaram os efeitos bioherbicida de metabólitos produzidos por *Phoma* sp. em pré e pós-emergência de *B. pilosa*, *C. canadenses* e *A. retroflexus* (TODERO et al., 2018). Os efeitos da formulação também foram observados em experimentos realizados com *C. sativus* e *S. bicolor*, tanto em pré e pós-emergência (DE ALMEIDA et al., 2020).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Nessa seção serão apresentadas as metodologias experimentais desenvolvidas ao longo do trabalho. O resumo destas atividades está apresentado no fluxograma da Figura 5.

Figura 5 – Fluxograma das atividades realizadas no decorrer do trabalho.



Fonte: autoria própria.

4.1. COLETA DE PLANTAS LESIONADAS

Microrganismos patogênicos foram isolados a partir de plantas daninhas que apresentavam sintomas de doença e lesões possivelmente ocasionadas por algum agente biológico, localizado em diferentes municípios do Rio Grande do Sul, Brasil. A coleta se deu no período de novembro 2019 a março de 2020. A Tabela 3 apresenta os locais de coleta das plantas, as espécies coletadas, bem como as coordenadas geográficas e o número de microrganismos isolados de cada localidade.

Tabela 3 – Área coletada, plantas coletadas e número de microrganismos isolados.

Nome da área coletada	Plantas coletadas	Coordenadas Geográficas Latitude/Longitude	Número de microrganismos isolados
Santa Maria (SM)	<i>Conyza</i> sp. Contaminações*	-29.6914 / -53.8008	31
Cerro Largo (CL)	<i>Conyza</i> sp. <i>B. pilosa</i>	-28.1506 / -54.7386	6
Marcelino Ramos (MR)	<i>Conyza</i> sp. <i>Spermacoce latifolia</i> <i>Echinochloa crusgalli</i>	-27.4673 / -51.9085	26

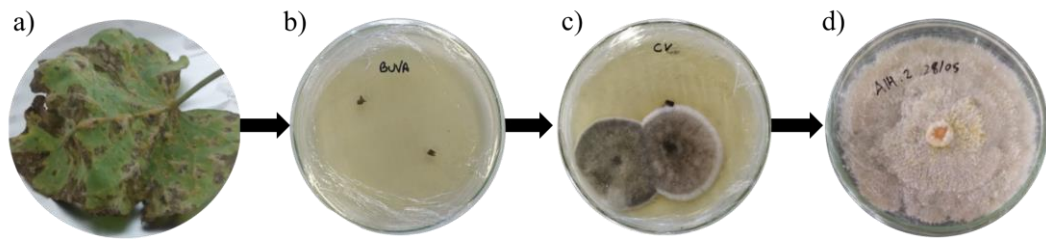
*Contaminações de fungos durante os isolamentos dos microrganismos.

Fonte: autoria própria.

4.2. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS FITOPATOGÊNICOS

Após a coleta, as amostras foram armazenadas em sacolas plásticas e mantidas a 4°C e transportadas em caixa térmica até o Laboratório de Bioprocessos da Universidade Federal de Santa Maria, campus Santa Maria, para o isolamento dos microrganismos (Figura 6). Posteriormente foi realizada a retirada dos tecidos na área lesionada e com o auxílio de uma pinça colocado os fragmentos em um béquer contendo álcool 70% por 2 min. Na sequência, os fragmentos foram passados para outro béquer contendo hipoclorito de sódio 0,5%. A lavagem dos fragmentos foi realizada transferindo-os para béqueres contendo água destilada por três vezes. Após, os fragmentos foram transferidos para uma placa de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata Dextrose Agar) e incubado em uma estufa de germinação com fotoperíodo de 12 horas, durante 7 dias, a 25 °C.

Figura 6 – a) Planta lesionada; b) Isolamento da área lesionada; c) Crescimento dos microrganismos; d) Cultura pura obtida por meio de repicagens sucessivas.



Fonte: autoria própria.

Após esse período, os microrganismos foram segregados entre fungos e bactérias através da morfologia. Foram realizadas repicagens sucessivas com o mesmo meio de cultivo, até se obter a cultura pura. Os microrganismos de morfologia fúngica foram repicados realizando a transferência de um disco de 6 mm de diâmetro para uma nova placa de Petri contendo BDA. Já os microrganismos de morfologia bacteriana foram isolados com o auxílio de uma alça de platina, na qual utilizou-se a técnica de semeadura por estrias simples. O isolamento foi realizado em placas de petri contendo $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de carne, $5,0 \text{ g L}^{-1}$ de peptona, $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de levedura, $5,0 \text{ g L}^{-1}$ de NaCl, $15,0 \text{ g L}^{-1}$ de ágar, previamente esterilizados em autoclave a $120 \text{ }^\circ\text{C}$, com pressão relativa de 1 kgf/cm^2 acima da pressão absoluta, por 20 min (RABINOVITCH; DE OLIVEIRA, 2015). As culturas puras foram incubadas em estufa microbiológica, a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 dias e posteriormente armazenadas na geladeira a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ até seu uso.

4.3. PROCESSO FERMENTATIVO

Os microrganismos foram separados de acordo com a sua morfologia e foram submetidos a diferentes meios de cultivo para a fermentação submersa. Para o preparo das fermentações com microrganismos com morfologia fúngica (FSm-F), utilizou-se $10,0 \text{ g L}^{-1}$ de glicose, $10,0 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de levedura, $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de peptona, $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de MgSO_4 , pH 6,0 (DANIEL et al., 2018). Já para os microrganismos que apresentavam morfologia bacteriana (FSm-B), utilizou-se $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de carne, $5,0 \text{ g L}^{-1}$ de peptona bacteriológica, $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de levedura, 5 g L^{-1} de NaCl e pH 7,4 (RABINOVITCH; DE OLIVEIRA, 2015).

Para o preparo dos caldos de fermentação, transferiu-se dois discos de 6 mm, com auxílio de uma espátula, para o erlenmeyer de 250 mL contendo 125 mL do meio de cultivo, previamente esterilizados em autoclave a 120 °C, com pressão relativa de 1 kgf/cm² acima da pressão absoluta, por 20 min, assim como todos os materiais utilizados no preparo. Posteriormente, os erlenmyers foram incubados em um agitador orbital (New Brunswick, modelo Innova 44) a 28 °C e 120 rpm, onde manteve-se os microrganismos com morfologia fúngica por 7 dias e os microrganismos de morfologia bacteriana por 3 dias. Após a fermentação, as células foram filtradas e separadas por centrifugação a 4000 rpm por 20 min (Eppendorf, modelo 5804R), e o sobrenadante foi submetido à filtração por membrana 0,45 µm (Millipore), 47 mm. O sobrenadante filtrado foi utilizado nos bioensaios. Os 63 microrganismos foram considerados como tratamentos distintos para os testes, e a atividade bioherbicida foi avaliada por uma série de análises.

4.4. ESTRATÉGIAS DE MELHORAMENTO DA ATIVIDADE HERBICIDA DO CALDO FERMENTADO

4.4.1. Co-cultivo

Foram realizadas combinações em placas de petri com microrganismos selecionados após a avaliação em plantas de *Cucumis sativus* L. var wisconsin. Cada combinação era composta por dois microrganismos. O número de combinações foi determinado através de análise combinatória para combinações simples, de acordo com a Equação 1:

$$C_{n,r} = \frac{n!}{(r!(n-r)!)} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde C é o número de combinações, n é o número total de elementos e r é o número de elementos escolhidos.

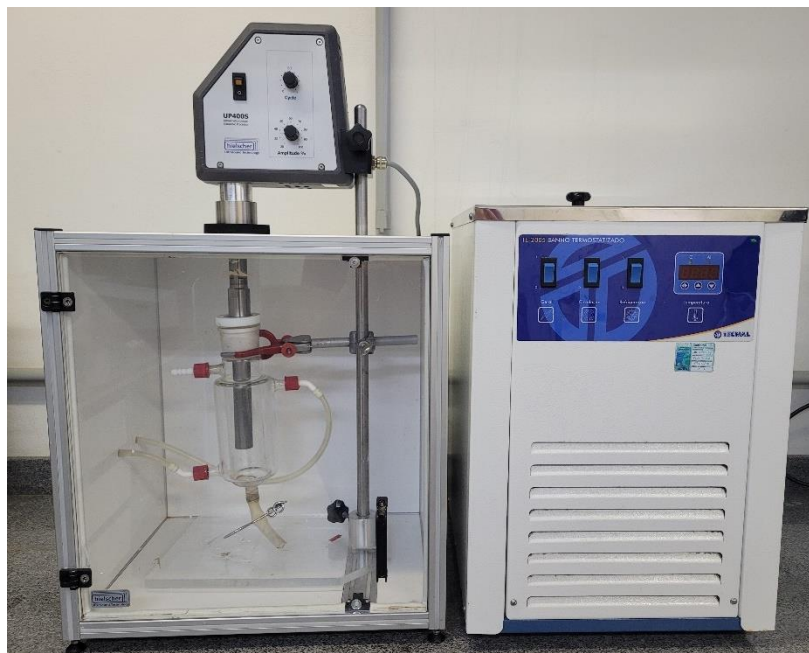
As combinações se deram com a inoculação de um disco de 6 mm de cada microrganismo em uma placa de petri contendo BDA, previamente esterilizado e preparado. As combinações de microrganismos que apresentaram crescimento de ambas as cepas na placa de petri foram selecionadas. Após a seleção, foi realizada a fermentação e fez-se o uso de meio de cultivo específico para cada morfologia. Para combinações entre microrganismos que apresentavam morfologia fúngica, foi utilizado o meio FSm-F (DANIEL et al., 2018).

Combinações entre microrganismos com morfologia bacteriana o meio de cultivo utilizado foi o meio FSm-B (RABINOVITCH; DE OLIVEIRA, 2015). E para as combinações com fungos e bactérias, foi realizada a adição de todos os componentes de ambos os meios (FSm-F mais FSm-B) (DANIEL et al., 2018; RABINOVITCH; DE OLIVEIRA, 2015). Os meios de cultivo foram incubados e mantidos nas condições conforme já descrito no item 4.3.

4.4.2. Extração assistida por ultrassom (EAU) pós fermentação

Nessa etapa, após os 7 dias de fermentação, os caldos fermentados com a biomassa foram submetidos ao ultrassom (Figura 7). Foi utilizado um processador ultrassônico UP400S (Hielscher Ultrasonics GmbH), sonotrodo H22 (Hielscher Ultrasonics GmbH), diâmetro 22 mm. A sonicação foi realizada diretamente acoplado uma célula de sonicação com banho de refrigeração a 10 °C e dentro da célula foi preenchido com o caldo de fermentação com a biomassa. As condições utilizadas foram amplitude de 90%, ciclo de 0,5 s durante 40 min.

Figura 7 – Equipamento de ultrassom utilizado para a extração dos produtos pós fermentação.



Fonte: autoria própria

4.4.3. Estratégias de co-cultivo associada a EAU pós-fermentação

Foram realizados ensaios associando o co-cultivo com o emprego de EAU pós-fermentação. O co-cultivo foi realizado conforme descrito no item 4.4.1 e, após os dias de fermentação, o caldo e a biomassa foram submetidos ao EAU, conforme já descrito no item 4.4.2.

4.4.4. Formulação

A etapa de formulação foi dividida em três etapas: (1) concentração dos caldos; (2) avaliação da eficiência de diferentes óleos em formulações com Break-Thru[®] e Tween[®] 80, em folhas destacadas de *A. hybridus* e *E. crusgalli*.; (3) aplicação da melhor formulação em plantas de *A. hybridus* e *E. crusgalli*.

4.4.4.1. Concentração por membranas

A concentração do caldo foi realizada utilizando membranas planas de ultrafiltração UP010 (NADIR[®]), 4,1 cm de diâmetro, de material PES, abertura de poro 10 kDa, fluxo de água $>150 \text{ L m}^{-2}\text{h}^{-1}$. O sistema de filtração foi montado em modo convencional (*dead end filtration*), somente sendo coletado após atingir o volume de caldo desejado. Os ensaios foram conduzidos a temperatura ambiente (25 °C) e pressão de 6 bar. O aparato experimental (Figura 8) consistia nos seguintes componentes: linha de gás nitrogênio comprimido, válvulas reguladoras de pressão, módulo de filtração convencional de aço inoxidável com capacidade de 500 mL.

Figura 8 – Aparato experimental para filtração.



Fonte: autoria própria.

4.4.4.2. Escolha dos óleos

As formulações foram realizadas através de preparo de emulsões, utilizando mistura dos adjuvantes Break-Thru[®] (Equilíbrio hidrófilo-lipófilico (EHL = 8,4)), Tween[®]80 (EHL=15) e óleo mineral, de soja e de girassol, conforme a Tabela 4.

Tabela 4 – Descrição das formulações com os caldos já preparados e concentrados em combinação com adjuvantes e diferentes óleos.

Formulações	Base lipofílica		Break-Thru [®] (g)	Tween [®] 80 (g)	Base hidrofílica		EHL
	Tipo	Massa (g)			Tipo	Massa (g)	
B22.2_US	Mineral	0,574	0,065	0,131	Caldo	6,23	12,8
	Soja	0,574	0,065	0,131	Caldo	6,23	12,8
	Girassol	0,574	0,065	0,131	Caldo	6,23	12,8
A14.2_US	Mineral	0,574	0,065	0,131	Caldo	6,23	12,8
	Soja	0,574	0,065	0,131	Caldo	6,23	12,8
	Girassol	0,574	0,065	0,131	Caldo	6,23	12,8
B14 γ	Mineral	0,574	0,065	0,131	Caldo	6,23	12,8
	Soja	0,574	0,065	0,131	Caldo	6,23	12,8
	Girassol	0,574	0,065	0,131	Caldo	6,23	12,8
Controle	Mineral	0,574	0,065	0,131	Água	6,23	12,8
	Soja	0,574	0,065	0,131	Água	6,23	12,8
	Girassol	0,574	0,065	0,131	Água	6,23	12,8

Fonte: autoria própria.

A formulação consistia em 8,2% de óleo, 2,2% de adjuvantes e o restante de caldo. Primeiramente, a pesagem foi realizada. Em seguida, misturou-se o Break-Thru[®] ao óleo específico de cada formulação (mistura A), homogeneizou-se a 7000 rpm por 1 min com o auxílio do homogeneizador Turrax. Na sequência, misturou-se o caldo concentrado fermentado ao Tween[®] 80 por 1 min (mistura B). A mistura A foi adicionada, aos poucos, à mistura B e manteve-se em agitação, 7000 rpm por 5 min (CHAVES NETO et al., 2021; PRÁ et al., 2019; TODERO et al., 2018).

Foram realizadas análises de pH e tensão superficial na caracterização físico-química. O pH foi medido com o uso de um pHmetro de bancada (Servylab), temperatura de 20 °C. A tensão superficial foi determinada em um tensiômetro (KRÜSS, Alemanha), pelo método de gota.

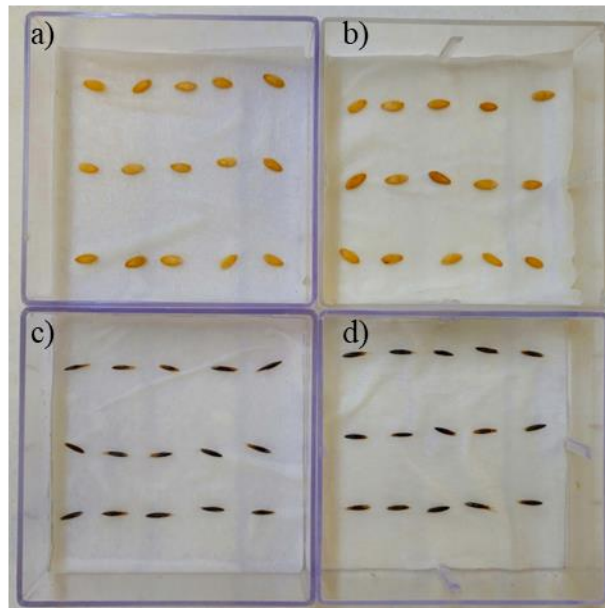
4.5. SCREENING PRIMÁRIO

4.5.1. Germinação de *Cucumis sativus* L. var *wisconsin* e *Avena strigosa*

Sementes de *C. sativus* L. var *wisconsin* e *A. strigosa* foram utilizadas para os testes de germinação de sementes. Essas sementes apresentam germinação rápida e são comumente utilizadas em testes de germinação. Os testes de germinação foram realizados em caixas gerbox (Figura 9), previamente desinfetados com álcool 70%, forrados com duas folhas de papel filtro (Germitest[®]) e umedecidas com o sobrenadante. O volume de caldo utilizado para umedecer o papel filtro corresponde a 2,5 vezes o peso do papel, de acordo com as Regras para análise de sementes (RAS) (BRASIL, 2009).

Os ensaios foram realizados em duplicatas de 15 sementes, totalizando 30 sementes de cada cultura. Após, as caixas gerbox foram armazenadas em sacolas plásticas, para evitar a perda de umidade, e acondicionadas em estufa B.O.D., com fotoperíodo 12/12 horas de luz/escuro, a 28 °C. O teste de controle consistiu em substituir o sobrenadante por água destilada. A germinação foi avaliada no 5º dia após a aplicação do sobrenadante. O número de sementes germinadas foi contabilizado utilizando como critério de germinação o crescimento de radícula com tamanho mínimo de 2 mm.

Figura 9 – Teste de germinação em caixa gerbox, (a) e (b) duplicata de *C. sativus* L. var wisconsin; (c) e (d) duplicata de *A. strigosa*.



Fonte: autoria própria.

4.5.2. Aplicação do caldo fermentado *in vivo* em plantas de *C. sativus* L. var wisconsin

Foram testados os 63 microrganismos isolados, sendo considerados tratamentos distintos. A semeadura foi realizada em bandejas, após a emergência as mudas foram replantadas em vasos de 1 L contendo 50% de terra e 50% de substrato comercial Mecplant®. As sementes foram obtidas no comércio local, sem nenhum tratamento pré-semeadura. Nessa primeira etapa, cada tratamento foi composto por quatro plantas, cada planta foi considerada uma repetição (unidade experimental). A aplicação se deu com o auxílio de um borrifador e foi aplicado 1 mL por planta, diretamente na parte aérea da planta. A aplicação ocorreu 9 dias após a semeadura. A avaliação visual de fitotoxicidade se deu em 21 dias após a aplicação (DAA), de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5 – Descrição dos conceitos aplicados para a avaliação fitotóxica.

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

Fonte: FRANS; CROWLEY, 1986.

4.5.3. Aplicação do caldo de fermentação em folha destacada de plantas daninhas

Os melhores microrganismos obtidos do teste *in vivo* de *C. sativus* foram utilizados para teste em folha destacada de plantas daninhas: *Conyza* sp., *E. crusgalli*, *B. pilosa* e *A. hybridus*. *E. crusgalli* e *A. hybridus* foram cultivadas através da semeadura de sementes e posteriormente replantadas em vasos para o cultivo. *Conyza* sp. e *B. pilosa* foram selecionadas mudas e replantadas e cultivadas para os ensaios. As folhas foram seccionadas na base do pecíolo e, dispostas em caixas gerbox previamente desinfetadas com álcool 70%. No pecíolo da folha foi colocado um algodão embebido com 1 mL da solução obtida em cada tratamento (BRUN et al., 2022). O controle se deu em substituir o tratamento por água destilada. Alguns metabólitos fitotóxicos possuem atividades na presença de luz, já outros na ausência de luz, assim os testes foram realizados em uma estufa com fotoperíodo, 12/12 horas de luz/escuro, a 28 °C, prevenindo perdas na detecção das atividades fitotóxicas (TODERO et al., 2019). Após 72 h foi avaliado a eficácia do tratamento e a intensidade das lesões.

Para os ensaios com folha destacada aplicando os caldos formulados, foram realizados em folhas de *E. crusgalli* e *A. hybridus*. Realizou-se a aplicação correspondente a 200 L ha⁻¹ de caldo formulado diretamente na folha com o auxílio de um borrifador, e as avaliações foram realizadas em 3 e 5 dias.

4.6. SCREENING SECUNDÁRIO

4.6.1. Aplicação em cultivo plantas daninhas

Os testes dos cinco melhores tratamentos obtidos por meio do *screening* em plantas de pepino foram realizados em plantas daninhas. As plantas-alvo utilizadas para a determinação da atividade herbicida com caldo bruto foram as mesmas utilizadas em teste de folhas destacadas: *A. hybridus*, *Conyza* sp., *B. pilosa* e *E. crusgalli*. As plantas foram semeadas e replantadas para vasos de 1 L contendo substrato comercial Mecplant® e mantidas em uma estufa localizada no município de Santa Maria – Brasil. A aplicação se deu com o auxílio de um borrifador manual, com aplicação de 1 mL de caldo bruto por planta, em 4 repetições, e cada planta foi considerada uma repetição. Para as plantas testemunha, a aplicação consistiu em substituir o caldo por água destilada. As avaliações foram realizadas em 21 DAA.

Os testes de melhoramento da eficiência do caldo bruto para o aumento dos efeitos, consistiu somente na aplicação em *A. hybridus* e *E. crusgalli*. Replantou-se em vasos uma muda de *A. hybridus* e 2 a 3 mudas para *E. crusgalli*, cada vaso foi considerado um ensaio (repetição). Para uma das metodologias, aplicou-se o triplo de caldo bruto, ou seja, 3 mL por planta, as demais seguiram como já descrito anteriormente. As aplicações se deram em 7 plantas e as avaliações foram realizadas em 14 DAA.

Na avaliação dos caldos formulados, a aplicação se deu em mudas de *E. crusgalli* com 2 folhas e nas de *A. hybridus* 4 a 5 folhas verdadeiras. A aplicação foi realizada com um borrifador manual, aplicando 300 L ha⁻¹ e, passados 5 dias, foi realizado uma reaplicação, totalizando 600 L ha⁻¹ com o auxílio de um borrifador. A determinação do volume aplicado equivalente a 300 e 600 Lha⁻¹ foi estimada a partir da área ocupada pelas plantas. As avaliações se deram em 14 DAA.

Para todas as aplicações em plantas daninhas foram avaliados altura da planta (AP), comprimento de raiz (CR), massa verde da parte aérea (MVPA), massa verde da raiz (MVR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e fitotoxicidade.

4.7. IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

A identificação molecular foi realizada no Instituto Biológico de São Paulo. Onde o DNA dos isolados foi extraído conforme método descrito por Doyle e Doyle (1987) a partir do microrganismo crescido em meio de cultura. A amostra de DNA genômico extraído foi

submetida à reação em cadeia pela polimerase (PCR) para amplificação da região ITS (internal transcribed spacer) do rDNA (isolados A14.2 e B22.2); segmento do gene da beta-tubulina (isolado γ) e segmento do gene *gyrB* (isolado B14). Os oligonucleotídeos iniciadores para a região ITS foram SR6R (5' – AAGWAAAAGTCGTAACAAGG – 3') e LR1 (5' – GGTGGTTTCTTTTCCT – 3') (Vilgalys e Hester, 1990); para o gene da beta-tubulina foram TUB2Fd (5' – GTBCACCTYCARACCGGYCARTG – 3') e TUB4Rd (5' – CCRGAYTGRCCRAARACRAAGTTGTC – 3') (AVESKAMP et al., 2009) e para o gene *gyrB* foram *gyrB*-F (5' – GTNYAYCGTGAYGGNAAAATYCA – 3') e *gyrB*-R (5' – GCAGARTCWCCCTCTACRATATA – 3') (desenvolvidos por R. Harakava, Instituto Biológico). A mistura para a PCR consistiu de 1 μ L de DNA, 1 μ L de cada primer a 10 μ M, 10 μ L de tampão para PCR 5X, 1 μ L de dNTPs a 10 mM, 0,2 μ L de GoTaq DNA polimerase 5 U μ L⁻¹ (Promega) e 35,8 μ L H₂O MilliQ autoclavada, para um volume final de 50 μ L. O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 94 °C durante 2 min seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 10 s, anelamento a 54 °C durante 30 s, extensão a 72 °C durante 45 s, e extensão final a 72 °C durante 4 min. A verificação dos produtos amplificados foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. Os produtos amplificados foram purificados através de precipitação com polietilenoglicol (SCHMITZ; RIESNER, 2006), submetidos à reação de sequenciamento pelo método de terminação de cadeia empregando-se o reagente Big Dye 3.1 (Applied Biosystems) e analisados em sequenciador capilar automático 3500 xL (Applied Biosystems). Para a construção das árvores filogenéticas, foi utilizado o método de Neighbor Joining com bootstrap de 1000 repetições, no programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013).

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias foram comparadas pelo Teste *t de Student*, no software Statistica, versão 8.0, usando como critério de diferença significativa uma probabilidade de erro menor que 5% ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. SCREENING PRIMÁRIO

5.1.1. Germinação de *C. sativus* e *A. strigosa*

Na primeira etapa de *screening*, 63 microrganismos foram submetidos ao teste de germinação. Cada um dos caldos, após filtrados e centrifugados, foram avaliados com o potencial bioherbicida em pré-emergência de *C. sativus* e *A. strigosa*. Ambas as sementes são comumente utilizadas em bioensaios por se tratar de plantas sensíveis aos herbicidas químicos (DE SOUZA et al., 2015). Os resultados obtidos na etapa de germinação de sementes são apresentados nas Tabela 6 e Tabela 7.

Tabela 6 – Porcentagem de inibição de germinação em sementes *A. strigosa*.

Tratamento	Inibição (%)	Tratamento	Inibição (%)	Tratamento	Inibição (%)	Tratamento	Inibição (%)
B28.2	100,0	B14	100,0	B24.1	96,7	B22.3	93,3
J1	100,0	B12	100,0	K10	96,7	K5	90,0
K7	100,0	B18	100,0	ξ	96,7	J2.1	90,0
K8	100,0	B17	100,0	B29	96,7	B24.2	83,3
B37.2	100,0	B23	100,0	B31	96,7	B27.1	83,3
B25	100,0	B15	100,0	B35.2	96,7	B36	80,0
η	100,0	B17.1	100,0	B13	96,7	K9	43,3
B19	100,0	A13	100,0	B11	96,7	A14.2	6,7
B20	100,0	K3	100,0	A14.1	96,7	B37.1	3,3
B21	100,0	J2	100,0	B26	93,3	ε	3,3
B30	100,0	K1	100,0	K2	93,3	B22.2	0,0
B32	100,0	B34.2	100,0	K4	93,3	B16	0,0
C8	100,0	B27.2	100,0	B28.1	93,3	A14.3	0,0
B35.1	100,0	δ	96,7	K7.1	93,3	0	0,0
C7	100,0	B37.3	96,7	B22.1	93,3	γ	0,0
C9	100,0	K6	96,7	β	93,3	Controle	0,0

Fonte: autoria própria.

Nos ensaios com sementes de *A. strigosa*, todos os tratamentos apresentaram grande potencial para inibir a germinação, tendo uma média de 83% de inibição, com destaque para os tratamentos B28,2, J1, K7, K8, B37.2, B25, η , B16, B20, B21, B30, B32, C8, B35.1, C7, C9, B14, B12, B18, B17, B23, B15, B17.1, A13, K3, J2, K1, B34.2, B27.2 que atingiram 100% de inibição. 25 dos microrganismos com morfologia bacteriana apresentaram inibição completa da semente de *A. strigosa*.

Tabela 7 – Porcentagem de inibição de germinação em sementes *C. sativus*.

Tratamento	Inibição (%)	Tratamento	Inibição (%)	Tratamento	Inibição (%)	Tratamento	Inibição (%)
B19	26,7	C7	16,7	A14.1	13,3	A14.2	10,0
B32	26,7	B22.3	16,7	B34.2	13,3	θ	10,0
B14	26,7	δ	13,3	ε	13,3	B27.2	10,0
J2.1	23,3	B24.2	13,3	K5	10,0	K9	6,7
K8	23,3	B24.1	13,3	B28.2	10,0	K6	6,7
K2	23,3	B37.2	13,3	B26	10,0	K7	6,7
K4	23,3	B22.1	13,3	B25	10,0	B36	6,7
B23	23,3	β	13,3	K10	10,0	A14.3	6,7
C8	20,0	ξ	13,3	B35.1	10,0	J2	6,7
B18	20,0	B20	13,3	B35.2	10,0	γ	6,7
B17.1	20,0	B29	13,3	B13	10,0	Controle	6,7
J1	16,7	B31	13,3	B11	10,0	B27.1	3,3
K7.1	16,7	B22.2	13,3	B12	10,0	B28.1	3,3
η	16,7	B16	13,3	B37.1	10,0	C9	3,3
B21	16,7	B15	13,3	B17	10,0	K1	3,3
B30	16,7	K3	13,3	A13	10,0	B37.3	0,0

Fonte: autoria própria.

Em sementes de *C. sativus* o contrário foi observado, aproximadamente 87% das sementes apresentaram germinação. É percebido que ambas as espécies apresentaram sensibilidade distinta quando testadas contra os mesmos tratamentos. Essa diferença pode estar associada à quantidade e o tipo de metabólitos produzidos, podendo eles serem seletivos ou interagirem com as sementes em graus diferentes de acordo com a estrutura biológica (DANIEL et al., 2018).

Diversos microrganismos, dentre bactérias e fungos, são considerados potenciais no biocontrole de plantas daninhas (HYNES, 2018). A primeira etapa, a de germinação de sementes, é bastante estudada quando se trata em prospecção de microrganismos para atividades bioherbicidas. *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp. e *Bacillus* spp., foram identificados através do isolamento de 436 rizobactérias e da avaliação da inibição da germinação de sementes de *Amaranto palmer* (VERDUGO-NAVARRETE et al., 2021). Estudos com cepas bacterianas de rizosfera de trigo com diferentes diluições demonstraram que a diluição do caldo de fermentação afeta o efeito inibitório em sementes de *Avena fatua* (LI; SHEN; CHEN, 2021).

O *Phoma* sp. é um dos fungos que vem apresentando grande destaque na literatura em estudos de germinação de sementes. Em sementes de *Senna obtusifolia*, a inibição foi aproximadamente 100% (CHAVES NETO et al., 2020). Em sementes de *C. sativus* e *Sorghum bicolor*, a inibição foi de 100% e 84%, respectivamente (BRUN et al., 2016), e em sementes de *B. pilosa* e *Amaranthus retroflexus*, avaliando caldos em diferentes concentrações, mesmo com

o bioherbicida diluído, foi observada inibição de 100% em ambas as espécies (TODERO et al., 2019).

Resultados promissores também são observados na literatura para tratamentos com filtrado bruto do fungo *N. oryzae* em sementes de *E. crusgalli* (MOHAMMED; BADAWY, 2020). Estudos com os fungos *Aspergillus niger*, *Trichoderma asperlium*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma harzanium*, *Trichoderma longibrachatum* e *Trichoderma viride* apresentaram efeitos satisfatórios na inibição na germinação e no crescimento inicial de sementes de *B. pilosa* (DABA et al., 2021).

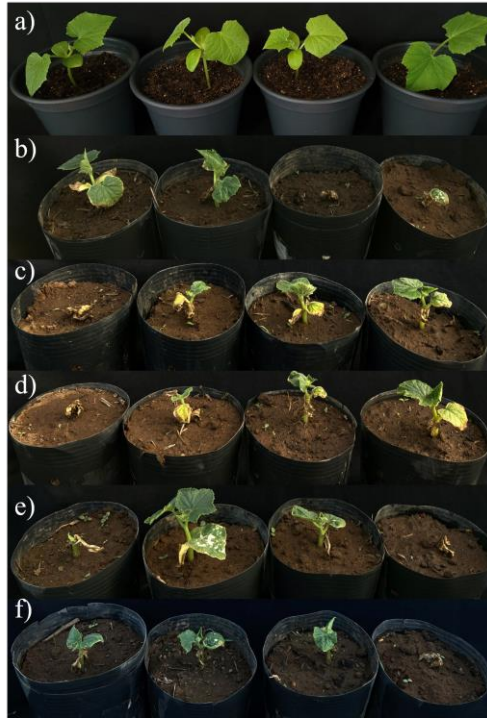
Apesar de ambas as sementes apresentarem efeitos inibitórios distintos, não se conseguiu selecionar microrganismos que apresentem destaques em ambas as espécies. Dessa forma, optou-se por dar sequência nos testes, *in vivo*, em plantas de *C. sativus*, por ser uma planta sensível aos herbicidas e por apresentar sintomas fitotóxicos em poucos dias após a aplicação (SOUZA et al., 2017). Essa nova aplicação teve como objetivo afunilar e encontrar um microrganismo que apresente efeito diretamente na parte aérea da planta.

5.1.2. Aplicação do caldo fermentado em *C. Sativus*

As Figura 10 e Figura 11 apresentam os resultados de fitotoxicidade obtidos nos bioensaios. Dos 63 microrganismos isolados, 21 microrganismos apresentaram efeitos nas plantas de *C. sativus*, já na primeira semana de avaliação, causando necrose, amarelamento e mancha nas folhas, já os demais não apresentaram efeitos visuais nas plantas.

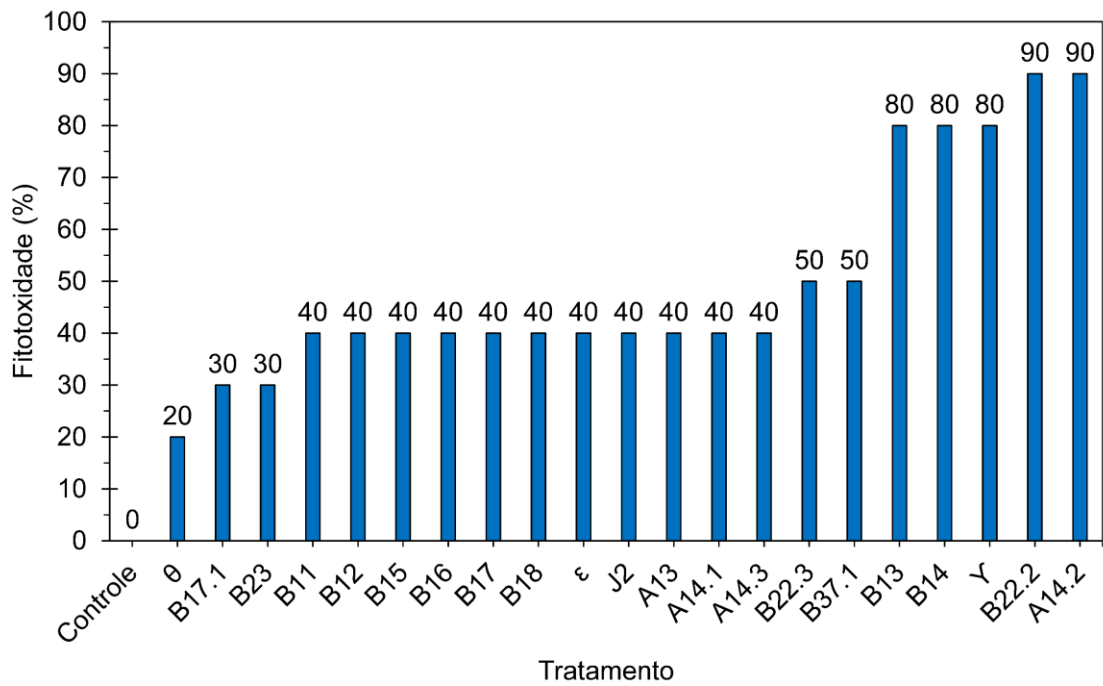
Cinco microrganismos se destacaram em relação a fitotoxicidade, B22.2, γ , A14.2, B13 e B14. Eles apresentaram a mortalidade de pelo menos uma das plantas do estande e fitotoxicidade igual ou superior a 80%. Dessa forma, pode-se afirmar que esses tratamentos são promissores para a sequência de testes avaliando o potencial bioherbicida dos mesmos. Os demais microrganismos apresentaram efeitos, como necrose, porém, em menor intensidade fazendo com que houvesse a recuperação das plantas.

Figura 10 – Melhores resultados de fitotoxicidade obtidos com a aplicação do caldo fermentado em plantas de *C. sativus*.



Fonte: autoria própria.

Figura 11 – Fitotoxicidade (%) ocasionada em plantas de *C. sativus* com a aplicação do caldo fermentado dos diferentes tratamentos.



Fonte: autoria própria.

C. sativus é comumente utilizado para a realização de bioensaios por ser uma planta com alta sensibilidade a compostos fitotóxicos e de fácil cultivo (DANIEL et al., 2018; DE SOUZA et al., 2015). Amarelamento, manchas nas folhas também foram relatados em estudos que levaram a seleção e identificação do fungo *Diaporthe* sp. (SOUZA et al., 2017). O fungo *Fusarium fujikuroi* também foi selecionado através da prospecção de microrganismos testados em *C. sativus*, apresentando manchas escuras e clorose nas folhas (DANIEL et al., 2018).

5.1.3. Folha destacada

Após avaliação da fitotoxicidade em plantas de *C. sativus*, selecionou-se tratamentos que apresentaram a morte de pelo menos uma planta (fitotoxicidade igual ou superior a 80%). Então, os microrganismos pré-selecionados foram testados contra plantas daninhas, entretanto, dessa vez os testes prosseguiram em folhas destacadas, para avaliar potencial atividade bioherbicida dos metabólitos produzidos por esses microrganismos.

A Tabela 8 demonstra o efeito inibitório do sobrenadante produzido pela fermentação submersa em folhas destacadas de *Conyza* sp., *B. pilosa*, *A. hybridus* e *E. crusgalli*.

Tabela 8 – Efeito inibitório em folhas destacadas *Conyza* sp., *B. pilosa*, *A. hybridus* e *E. crusgalli*.

<i>Conyza</i> sp.		<i>A. hybridus</i>	
γ	Necrose média	γ	Leve amarelamento
B22.2	Necrose acentuada	B22.2	Leve amarelamento
A14.2	Necrose acentuada	A14.2	Leve amarelamento
B13	Necrose média	B13	Leve amarelamento
B14	Necrose média	B14	Leve amarelamento
Controle	Sem efeito	Controle	Sem efeito
<i>B. pilosa</i>		<i>E. crusgalli</i>	
γ	Sem efeito	γ	Leve amarelamento com necrose
B22.2	Necrose acentuada	B22.2	Amarelamento acentuado com necrose média
A14.2	Sem efeito	A14.2	Amarelamento acentuado com necrose média
B13	Necrose média	B13	Amarelamento acentuado
B14	Sem efeito	B14	Amarelamento acentuado
Controle	Sem efeito	Controle	Sem efeito

Fonte: autoria própria.

Apesar de todas as folhas das plantas apresentarem lesões, as folhas de *Conyza* sp. se destacaram. Os tratamentos das cepas B22.2 e A14.2 apresentaram necrose acentuada e os demais tratamentos necrose média. B22.2 também fez com que as folhas de *Conyza* sp. e *E. crusgalli* apresentassem necrose acentuada e média, respectivamente. Todos os tratamentos apresentaram leve amarelamento em folhas de *A. hybridus*, e esse sintoma também foi

predominante em folhas de *E. crusgalli*. O tratamento B14 somente apresentou sintomas de necrose em folhas de *B. pilosa*, e amarelamento em *A. hybridus* e *E. crusgalli*. Ressalta-se que as folhas de *Conyza* sp. foram as que menos foram danificadas pelos tratamentos, exceto tratamento B22.2 e A14.2. O tratamento B13 ocasionou necrose em folhas de *B. pilosa* e *Conyza* sp. e amarelamento em *A. hybridus* e *E. crusgalli*.

O amarelamento das folhas é um indicativo de uma possível diminuição na fotossíntese, visto que as moléculas de clorofila desempenham um papel importante na fotossíntese da planta. Uma das características relevante no tecido vegetal das plantas é a capacidade de responder a mudanças variáveis. O estresse oxidativo está entre essas mudanças que podem levar a alterações na morfologia, fisiologia e respostas bioquímicas da planta, e é um dos fatores principais para a geração de necrose (HASAN et al., 2021).

A literatura apresenta microrganismos já identificados que apresentaram sintomas em folhas destacadas tanto de dicotiledôneas como monocotiledôneas (ADETUNJI; OLOKE; OSEMWEGIE, 2018; BRUN et al., 2022; CHAVES NETO et al., 2020; TODERO et al., 2019). Estudos foram realizados com folhas de *C. sativus*, para avaliar o potencial bioherbicida de *Diaporthe schini*, resultados positivos foram observados, como acentuada necrose (BRUN et al., 2022). Os resultados das folhas de *E. crusgalli* corroboram com estudos realizados em plantas monocotiledôneas, *Senna obtusifolia*, que foi avaliada com aplicação de caldo fermentado de *Phoma dimospha* e apresentou necrose foliar e mortalidade das folhas (Chaves Neto et al., 2020b).

Isolados bacterianos da rizosfera produziram diferentes graus de necrose foliar em *E. crusgalli* e *A. hybridus*, aplicando 1 microlitro do filtrado por folha. Dos isolados a que mais apresentou atividade necrótica foi identificada como *Pseudomonas aeruginosa* (ADETUNJI; OLOKE; OSEMWEGIE, 2018).

Pesquisas com *Trichoderma polysporum* cepa HZ-31, isolada da planta *Cirsium arvense*, apresentou danos de até 50% em folhas de *Polygonum lapathifolium* e sintomas graves em folhas de *Polygonum aviculare* L. e *Avena fatua* L. quando testados *in vitro*. E ao avaliar a atividade *in vivo* apresentou atividade bioherbicida *in vivo* em seis diferentes plantas daninhas *Elsholtzia densa*, *Polygonum lapathifolium* L., *Lepyrodiclis holosteoides*, *Avena fatua* L., *Chenopodium album* L. e *Polygonum aviculare* L. (ZHU et al., 2020). A avaliação em folha destacada apresenta um indicativo de atividade bioherbicida em determinada planta. Assim, estudos devem ser realizados para que se avalie o potencial bioherbicida *in vivo* de plantas daninhas.

5.2. SCREENING SECUNDÁRIO: APLICAÇÃO *IN VIVO* DE PLANTAS DANINHAS

5.2.1. Caldo fermentado bruto

A Tabela 9 apresenta a avaliação quantitativa em seis diferentes variáveis, sendo elas altura da planta (AP), comprimento da raiz (CR), massa verde da parte aérea (MVPA), massa verde da raiz (MVR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR).

Tabela 9 – Efeitos fitotóxicos dos metabólitos dos microrganismos em plantas de *Conyza* sp., *B. pilosa*, *A. hybridus* e *E. crusgalli* após 21DAA.

	AP (cm)	CR (cm)	MVPA (g)	MSPA (g)	MVR (g)	MSR (g)
<i>E. crusgalli</i>						
B13	37,0 ± 5,4	32,5 ± 2,5 ^C	12,48 ± 3,79 ^I	2,57 ± 0,12 ^I	7,28 ± 2,44	3,32 ± 0,97
B14	31,0 ± 1,4 ^I	29,0 ± 7,0	8,46 ± 3,68 ^I	1,93 ± 0,89 ^I	5,06 ± 2,10 ^I	2,26 ± 0,85 ^I
A14.2	31,0 ± 4,3 ^I	28,9 ± 7,8	12,15 ± 3,55 ^I	3,52 ± 1,03	7,86 ± 3,76	3,21 ± 1,17
B22.2	37,5 ± 3,5	25,4 ± 4,3	9,37 ± 2,09 ^I	2,59 ± 0,35 ^I	6,73 ± 2,29	3,12 ± 0,67
γ	34,1 ± 1,4 ^I	24,0 ± 1,8	16,87 ± 4,15 ^I	3,88 ± 0,88	15,66 ± 9,62	4,80 ± 0,85
Testemunha	38,3 ± 2,3	24,0 ± 1,8	25,73 ± 1,87	4,70 ± 0,53	10,63 ± 2,67	4,20 ± 0,56
<i>A. hybridus</i>						
B13	18,0 ± 5,6 ^I	17,5 ± 2,1	2,47 ± 1,08 ^I	0,90 ± 0,39 ^I	1,17 ± 0,73	0,61 ± 0,39
B14	29,5 ± 1,7	22 ± 2,4	5,23 ± 1,06 ^I	2,54 ± 0,54	2,49 ± 0,66	1,68 ± 0,36
A14.2	24,8 ± 0,5 ^I	18,3 ± 2,6	7,25 ± 0,53	2,22 ± 0,16 ^I	1,50 ± 0,40	0,55 ± 0,17
B22.2	21,9 ± 11,5	18,1 ± 2,7	4,72 ± 3,69	1,46 ± 1,19 ^I	1,93 ± 1,21	0,85 ± 0,53
γ	24,9 ± 8,1	17,3 ± 6,8	3,99 ± 2,89 ^I	1,32 ± 0,95 ^I	1,47 ± 1,17	0,70 ± 0,58
Testemunha	31,0 ± 1,5	22,5 ± 5,8	8,36 ± 1,06	3,34 ± 0,04	2,45 ± 1,34	1,25 ± 0,77
<i>B. pilosa</i>						
B13	22,9 ± 2,4	27,3 ± 4,1	6,48 ± 2,12	1,86 ± 0,43	1,43 ± 0,46	0,88 ± 0,04 ^C
B14	22,0 ± 2,9	28,8 ± 3	4,86 ± 1,75	1,63 ± 0,80	1,11 ± 0,41	0,79 ± 0,14
A14.2	23,4 ± 2	29 ± 0	4,14 ± 0,87	1,78 ± 0,39	0,96 ± 0,27	0,76 ± 0,20
B22.2	16,5 ± 5,1 ^I	26,3 ± 5,6	2,57 ± 1,44	0,85 ± 0,56	0,66 ± 0,47	0,39 ± 0,27
γ	20,5 ± 1,3 ^I	14 ± 1	4,35 ± 2,08	1,21 ± 0,70	1,00 ± 0,63	0,44 ± 0,26
Testemunha	24,6 ± 1,9	25,5 ± 10,7	4,46 ± 1,89	1,55 ± 0,37	1,09 ± 0,58	0,52 ± 0,18
<i>Conyza</i> sp.						
B13	21,0 ± 2,2	18,3 ± 2,5	9,70 ± 3,69	2,37 ± 0,55	8,29 ± 2,28	1,90 ± 0,47 ^C
B14	22,5 ± 3	23,5 ± 7,7	12,18 ± 4,41	2,52 ± 0,82	12,80 ± 0,48 ^C	2,32 ± 1,01 ^C
A14.2	18,0 ± 5	18,5 ± 5,2	6,29 ± 3,04	1,52 ± 0,77	6,54 ± 2,35	1,51 ± 0,65
B22.2	25,5 ± 5,2	24 ± 5,8	13,49 ± 6,62	2,71 ± 1,37	12,14 ± 6,08	2,27 ± 1,59
γ	19,3 ± 5,1	14,8 ± 4,5	10,78 ± 6,37	2,36 ± 1,33	8,24 ± 4,47	1,74 ± 1,05
Testemunha	24,5 ± 4,7	19 ± 0,8	10,59 ± 4,83	2,01 ± 1,07	6,26 ± 2,33	0,85 ± 0,42

^I variáveis que apresentaram diferença significativa de inibição e ^C de crescimento, de acordo com o teste t de *student*, 95% de confiança.

Fonte: autoria própria.

Em plantas de *Conyza* sp. não foram observados efeitos inibitórios significativos. É conhecido que essa espécie é uma das mais resistentes aos herbicidas químicos (DANIEL et

al., 2020; DUARTE; SANTOS; BARRETO, 2016; GREEN, 2014). O gênero *Conyza* sp. possui registros de resistência aos herbicidas químicos Paraquat, glifosato e 2,4-D (HEAP, 2022).

Resultados semelhantes foram encontrados para a espécie *B. pilosa*, que apresentou somente a redução da altura da planta em B22.2 (33%) e em γ (16%). As demais variáveis não apresentaram efeitos de inibição. Os baixos efeitos podem estar associados à baixa concentração de metabólitos no sobrenadante (TODERO et al., 2019). Estudos relataram a redução de altura, massa fresca e seca da parte aérea e das raízes com metabólitos do fungo *Diaphorte schini* (BRUN et al., 2022).

As plantas de *E. crusgalli* e *A. hybridus* demonstraram maior sensibilidade aos tratamentos aplicados. Nas plantas de *E. crusgalli*, todos os tratamentos apresentaram efeitos inibitórios de massas verde e seca, tanto da parte aérea como da raiz. O tratamento B14 apresentou os melhores índices de inibição na AP (19%) e teve variações entre 52 e 67% de inibição nas variáveis MVPA, MVR, MSPA, MSR. Os resultados corroboram com os encontrados utilizando metabólitos de *D. schini* que demonstraram ser promissores na inibição de massas de *E. crusgalli* (BRUN et al., 2022).

Os resultados observados na planta de *A. hybridus* demonstram capacidade do tratamento B13 com redução em AP, MVPA e MSPA, tendo percentuais de redução entre 22 e 73%. Também foram relatadas reduções nas massas frescas e secas da parte aérea de *Amaranthus viridis* com a aplicação de metabólitos de *D. schini* (BRUN et al., 2022).

A redução da massa verde em plantas daninhas também foi observada com a aplicação de metabólitos secundários de *Phoma dimorfa* em plantas de *S. obtusifolia* (CHAVES NETO et al., 2020). Ainda, existem poucos estudos que apresentam o comportamento biológico da planta quando submetida a fitotoxinas de metabólitos secundários (RADHAKRISHNAN; ALQARAWI; ABD ALLAH, 2018). O retardamento e/ou a inibição do crescimento das plantas podem estar associados à interferência da fitotoxina na biossíntese de aminoácidos, como valina, leucina e isoleucina, que são essenciais para o crescimento e melhor performance das plantas (BRUN et al., 2022; MAIQUEL et al., 2016).

Sabe-se que plantas daninhas competem por nutrientes (WANG; SHOWALTER; UNGAR, 2005; WEINER, 1990). A competição assimétrica, que é o compartilhamento desigual de recursos, acarreta a diminuição dessas variáveis (AP e MVPA) e contribuem para o crescimento e desenvolvimento da cultura de interesse em detrimento das plantas daninhas. A redução da altura da planta diminui a intensidade de luz disponível, devido ao sombreamento causado pela cultura de interesse, afetando sua fotossíntese. Já a redução do comprimento/massa das raízes diminui a captação de nutrientes, como absorção de água,

compostos nitrogenados e minerais, reduzindo o desenvolvimento da própria planta daninha, bem como, aumentando a disponibilidade desses nutrientes para a cultura de interesse (ANTEN; HIROSE, 2001; COHAVI; COHEN; RACHMILEVITCH, 2020; WANG; SHOWALTER; UNGAR, 2005).

Além disso, não foram observadas lesões de fitotoxicidade visível em nenhum dos tratamentos e plantas. A baixa concentração de metabólitos pode estar associada à falta de resultados fitotóxicos bem como a rápida volatilização do produto, fazendo com que o caldo não seja absorvido pelos tecidos das plantas (GASIC; TANOVIC, 2013; TABAN; SAHARKHIZ; KHORRAM, 2020; TODERO et al., 2018; VERMEER; BAUR, 2007). Dessa forma, alguns bioherbicidas de origem microbiológica necessitam de etapas pós fermentação, bem como emprego de adjuvantes, em busca de métodos que melhorem a eficiência do produto (DE OLIVEIRA et al., 2019; GASIC; TANOVIC, 2013).

5.3. ESTRATÉGIAS PARA AUMENTO DA ATIVIDADE BIOHERBICIDA DO CALDO DE FERMENTADO

A partir dos resultados obtidos nos testes de aplicação do caldo bruto, foram selecionadas as duas espécies que sofreram efeitos significativos (*E. crusgalli* e *A. hybridus*). Foram realizados testes com diferentes métodos posteriores a fermentação que teve como objetivo de potencializar os efeitos inibitórios observados na etapa anterior do trabalho. As Tabela 10 e 11 trazem os resultados de todas os métodos propostos e aplicados em plantas *E. crusgalli* e *A. hybridus*.

Tabela 10 – Efeitos dos metabólitos originados a partir da aplicação do caldo bruto, dose tripla e das metodologias EAU, co-cultivo e co-cultivo + EAU sobre parâmetros de desenvolvimento de *E. crusgalli* avaliados em 14DAA.

	AP (cm)		CR (cm)		MVPA (g)		MSPA (g)		MVR (g)		MSR (g)	
<i>E. crusgalli</i>												
Caldo Bruto – dose tripla												
B13	53,9	± 3,1	29,3	± 3,6 ^I	17,10	± 4,01 ^I	1,70	± 0,31 ^I	3,01	± 0,90	0,31	± 0,04 ^I
B14	55,6	± 4,2	27,7	± 1,1 ^I	16,22	± 4,91 ^I	1,73	± 0,38 ^I	2,01	± 0,54 ^I	0,25	± 0,08 ^I
B22.2	56,4	± 3,2	31,3	± 3,8	16,44	± 3,37 ^I	2,01	± 0,28 ^I	2,30	± 0,32	0,44	± 0,08
γ	55,0	± 4,8	22,7	± 2,4 ^I	9,74	± 2,00 ^I	1,21	± 0,38 ^I	0,54	± 0,18 ^I	0,13	± 0,05 ^I
A14.2	55,4	± 2,7	32,9	± 2,6	22,64	± 2,68	2,29	± 0,31	3,80	± 0,86 ^C	0,46	± 0,09
Caldo Bruto - EAU												
B13	61,4	± 4,8	30,7	± 4,4	22,39	± 2,61	1,81	± 0,24 ^I	2,42	± 0,34	0,25	± 0,03 ^I
B14	55,9	± 2,3	28	± 2,5 ^I	16,36	± 5,43 ^I	1,72	± 0,44 ^I	1,74	± 0,66 ^I	0,31	± 0,13 ^I
B22.2	49,0	± 3,9 ^I	28,4	± 2,2 ^I	9,00	± 2,59 ^I	1,30	± 0,19 ^I	1,48	± 0,51 ^I	0,23	± 0,05 ^I
γ	61,6	± 4,2	31,1	± 4,3	22,93	± 5,73	2,14	± 0,55	2,68	± 0,62	0,30	± 0,09 ^I
A14.2	47,7	± 1,9 ^I	26,9	± 2,7 ^I	12,10	± 1,87 ^I	0,99	± 0,24 ^I	1,79	± 0,27 ^I	0,20	± 0,08 ^I
Co-cultivo												
A14.2/B22.2	53,4	± 2,9	30,4	± 4,4	15,17	± 2,80 ^I	1,70	± 0,29 ^I	1,41	± 0,48 ^I	0,27	± 0,09 ^I
B13/B14	55,1	± 3,0	34,4	± 3,4	20,06	± 4,06	2,03	± 0,50	2,30	± 0,57	0,37	± 0,13
B14/γ	63,3	± 3,9 ^C	30,3	± 4,0	25,73	± 3,92	2,23	± 0,29	2,94	± 0,50	0,35	± 0,07
B22.2/γ	57,7	± 3,6	31,1	± 3,4	23,79	± 3,93	2,38	± 0,37	3,22	± 0,64	0,41	± 0,11
Co-cultivo - EAU												
A14.2/B22.2	57,1	± 4,4	29,6	± 3,8 ^I	12,99	± 2,18 ^I	1,44	± 0,20 ^I	1,43	± 0,39 ^I	0,19	± 0,06 ^I
B13/B14	59,4	± 3,4	32,9	± 3,2	19,93	± 5,06	2,04	± 0,36 ^I	2,43	± 0,58	0,28	± 0,07 ^I
B14/γ	56,9	± 3,6	27,1	± 1,9 ^I	15,89	± 3,86 ^I	1,70	± 0,33 ^I	0,92	± 0,17 ^I	0,20	± 0,08 ^I
B22.2/γ	59,9	± 1,8	30,3	± 1,8 ^I	18,42	± 4,00 ^I	1,83	± 0,41 ^I	1,82	± 0,64 ^I	0,26	± 0,11 ^I
TESTEMUNHA	57,4	± 4,5	33,7	± 2,9	22,30	± 1,98	2,43	± 0,23	2,77	± 0,53	0,44	± 0,08

^I variáveis que apresentaram diferença significativa de inibição e ^C de crescimento, de acordo com o teste t de *student*, 95% de confiança.

Fonte: autoria própria.

Tabela 11 – Efeitos dos metabólitos originados a partir da aplicação do caldo bruto, dose tripla e das metodologias EAU, co-cultivo e co-cultivo + EAU sobre parâmetros de desenvolvimento de *A. hybridus* avaliados em 14DAA.

	AP (cm)		CR (cm)		MVPA (g)		MSPA (g)		MVR (g)		MSR (g)	
<i>A. hybridus</i>												
Caldo Bruto – dose tripla												
B13	19,0	± 3,0	32,1	± 5,6	3,83	± 1,28 ^C	0,57	± 0,14 ^C	0,66	± 0,24 ^C	0,10	± 0,04 ^C
B14	16,2	± 2,0 ^I	36,00	± 6,9 ^C	3,02	± 0,70	0,48	± 0,09	0,50	± 0,15 ^C	0,08	± 0,03
B22.2	19,0	± 2,2	39,4	± 5,7 ^C	3,77	± 0,89 ^C	0,60	± 0,13 ^C	0,51	± 0,18 ^C	0,11	± 0,04 ^C
γ	16,0	± 2,4 ^I	25,9	± 7,5	2,47	± 1,10	0,46	± 0,12	0,31	± 0,14	0,06	± 0,03
A14.2	23,0	± 3,8	45,00	± 8,2 ^C	5,66	± 1,40 ^C	0,80	± 0,10 ^C	0,95	± 0,30 ^C	0,16	± 0,04 ^C
Caldo Bruto - EAU												
B13	21,0	± 2,8	30,4	± 2,4	3,57	± 0,83 ^C	0,45	± 0,20	0,52	± 0,13 ^C	0,09	± 0,02 ^C
B14	18,4	± 2,3	35,1	± 9,4	2,73	± 0,63	0,46	± 0,08	0,29	± 0,06	0,06	± 0,02
B22.2	18,6	± 4,0	30,1	± 6,00	3,37	± 1,12	0,54	± 0,12 ^C	0,55	± 0,23 ^C	0,08	± 0,04
γ	21,1	± 2,3	18,1	± 5,1 ^I	0,84	± 0,27 ^I	0,20	± 0,04 ^I	0,08	± 0,04 ^I	0,02	± 0,01 ^I
A14.2	11,6	± 2,4 ^I	36,4	± 6,9 ^C	4,57	± 1,44 ^C	0,69	± 0,17 ^C	0,79	± 0,29 ^C	0,13	± 0,05 ^C
Co-cultivo												
A14.2/B22.2	23,4	± 3,4	24,9	± 7,9	3,38	± 1,02	0,47	± 0,11	0,44	± 0,26	0,07	± 0,02
B13/B14	19,0	± 1,7	25,3	± 4,3	2,66	± 0,51	0,41	± 0,06	0,31	± 0,11	0,06	± 0,02
B14/γ	16,3	± 2,3 ^I	20,1	± 3,3 ^I	1,42	± 0,39 ^I	0,27	± 0,04 ^I	0,13	± 0,07 ^I	0,03	± 0,01 ^I
B22.2/γ	17,4	± 2,6	25,0	± 2,9	2,14	± 0,44	0,40	± 0,04	0,23	± 0,05 ^I	0,04	± 0,01 ^I
Co-cultivo - EAU												
A14.2/B22.2	22,7	± 5,6	37,0	± 6,4 ^C	4,97	± 1,66 ^C	0,68	± 0,20 ^C	0,90	± 0,26 ^C	0,14	± 0,04 ^C
B13/B14	16,6	± 4,1	27,4	± 11,5	2,13	± 1,00	0,43	± 0,14	0,27	± 0,06	0,06	± 0,03
B14/γ	19,8	± 2,6	31,1	± 3,00	3,37	± 0,651 ^C	0,61	± 0,15 ^C	0,48	± 0,14 ^C	0,09	± 0,03 ^C
B22.2/γ	18,5	± 3,9	27,3	± 1,9	2,70	± 0,709	0,46	± 0,07	0,31	± 0,09	0,05	± 0,01
TESTEMUNHA	20,2	± 2,3	27,3	± 5,2	2,57	± 0,504	0,41	± 0,05	0,31	± 0,08	0,06	± 0,01

^I variáveis que apresentaram diferença significativa de inibição e ^C de crescimento, de acordo com o teste t de *student*, 95% de confiança.

Fonte: autoria própria.

5.3.1. Aplicação de dose tripla

A aplicação de maiores dosagens de produtos é comumente utilizada na agricultura, pois visa aumentar a eficácia do produto aplicado (HAARMANN; YOUNG; JOHNSON, 2021). O aumento da dose de caldo aplicado também busca simular o efeito equivalente da aplicação de caldos com maior concentração de metabólitos.

Em plantas de *E. crusgalli* (Tabela 10), os melhores tratamentos com a aplicação de dosagem tripla foram B14 e γ , que somente não alteraram a AP. B14 permaneceu com a mesma quantidade de inibição que apresentado no caldo bruto com uma só dosagem. Os tratamentos B13 e B14 apresentaram alguns sintomas de murchidão nas plantas de *E. crusgalli* após 3 DAA, indicando possíveis efeitos. Porém, as plantas se recuperaram até o final do experimento. Sintomas de murchidão também foram observados com a aplicação de metabólitos secundários produzidos por *Phoma sp.* (TODERO et al., 2018). Os tratamentos com B13 e γ demonstraram que a aplicação de mais dosagens influencia na inibição, dobrando o número de variáveis inibidas, indicando que esses microrganismos possuem potencial na atividade bioherbicida em *E. crusgalli*. O contrário foi observado no tratamento com B22.2, onde não foi observado resultados melhores com maior volume de caldo aplicado.

Na Tabela 11, onde são apresentados os resultados de *A. hybridus*, percebe-se maior resistência em relação às plantas de *E. crusgalli*. As diferenças significativas em sua grande maioria referem-se ao crescimento. Houve somente inibição na altura da planta em B14 e em γ . Efeitos de crescimento são observados sistematicamente em todas as metodologias empregadas (EAU e co-cultivos) contra *A. hybridus* como será descrito nas próximas seções, onde nota-se que as médias de todos os parâmetros das testemunhas foram menores que a maioria dos tratamentos. Essa observação pode estar diretamente relacionada ao desenvolvimento inadequado das plantas testemunhas, pois alguns fatores influenciam a evolução da planta, como água, temperatura e a luz que é a variável mais importante que afeta a fotossíntese, o crescimento e desenvolvimento das plantas (YAVARI et al., 2021). Estudos indicam que o aumento da dose aplicada potencializa os efeitos esperado nas plantas, pois consequentemente aumenta quantidade de metabólitos dispostos na planta (SYAHRI; WIDARYANTO; PUJI WICAKSONO, 2017; TODERO et al., 2018).

5.3.2. Caldo bruto submetido a EAU

Nesse método, os tratamentos B13, B14 e B22.2, não apresentaram efeitos de inibição significativos nas plantas de *A. hybridus*. Os resultados foram melhores com a aplicação do caldo sem a submissão ao US do que quando comparados com US. Esse baixo efeito com a aplicação do US em bactérias (B13 e B14) pode estar associado ao microrganismo ser sensível aos efeitos do processo. Bactérias apresentam poucas estruturas complexas como compartimentos de proteínas que possuem algumas enzimas necessárias para o metabolismo celular, não havendo muitos produtos intracelulares a serem extraídos (TANAKA; SAWAYA; YEATES, 2010; YEATES et al., 2008).

O melhor efeito em de *A. hybridus* foi quando aplicado o tratamento γ , que apresentou resultados significativos em CR (33%), MVPA (67%), MSPA (52%), MVR (73%), MSR (70%). Comparando com a aplicação do caldo sem a metodologia de extração assistida por US, percebeu-se o melhoramento da atividade bioherbicida, evidenciando o potencial desse microrganismo, principalmente após etapa de rompimento celular.

As inibições foram maiores em plantas de *E. crusgalli*, onde os tratamentos B22.2 e A14.2 apresentaram os melhores efeitos inibitórios, influenciando no desenvolvimento de todas as variáveis. As inibições variaram de 15% a 60% para B22.2 e 17% a 60% para A14.2.

Comparando com a aplicação do caldo bruto, observou-se que o caldo pós fermentação submetido ao US melhorou a eficiência da maior parte dos tratamentos aplicados em *E. crusgalli*. Alguns metabólitos podem ocasionar lesões e danificar mais algumas espécies de plantas daninhas do que outras (BAILEY et al., 2011). Isto foi observado no tratamento γ que apresentou grandes resultados em *A. hybridus* e não em *E. crusgalli*. O uso dessa metodologia indica que os possíveis metabólitos do meio intracelular apresentam efeitos mais acentuados em gramíneas.

Observou-se com essa metodologia, a eficiência do método principalmente em microrganismos com metodologia fúngica, sinalizando que o uso do ultrassom pode extrair novos metabólitos intracelulares que auxiliam no objetivo proposto. Os resultados podem estar associados à morfologia dos fungos que tem grande impacto no desempenho de um bioprocessamento (EHGARTNER; HERWIG; FRICKE, 2017). O crescimento de fungos pode ser na forma filamentosa, com hifas dispersas ou em forma de pellets esféricos, constituídos por hifas compactas (EHGARTNER; HERWIG; FRICKE, 2017; VEITER; RAJAMANICKAM; HERWIG, 2018). Ambos os microrganismos apresentavam crescimento em forma de pellets, o que pode interferir no transporte de substratos para o interior da célula, podendo ter efeitos

significativos no metabolismo celular quanto na síntese de produtos e mecanismos de defesa (PAPAGIANNI, 2004).

Como os fungos são organismos eucariontes, a complexidade do meio intracelular é evidentemente maior, quando comparada com as células procariontes de bactérias (PAPAGIANNI, 2004). Os fungos apresentam uma gama de organelas, podendo destacar os vacúolos fúngicos que são responsáveis por produzir e armazenar enzimas digestivas, entre outras funções (EL-GENDI et al., 2022; LI; KANE, 2009). Considerando essas diferenças entre as células de fungos e bactérias, a EAU dos componentes intracelulares provenientes de fungos, tende a ser mais promissora em comparação com as bactérias, tendo em vista a maior riqueza de metabólitos, principalmente enzimas digestivas encontradas nas células fúngicas (EL-GENDI et al., 2022).

5.3.3. Co-cultivo

O ecossistema é composto por uma vasta diversidade de microrganismos e a interação entre eles é um aspecto fundamental de sobrevivência, independentemente de serem próximos filogeneticamente ou não (ALACID; RICHARDS, 2021; ASIMA; RAJAT KUMAR, 2018). Dessa forma, no ramo da biotecnologia industrial, está cada vez mais interessante estudar condições de co-cultivo. Essa técnica promove vantagens na melhoria da qualidade, são potenciais na substituição de substratos, mas principalmente destacam-se pelo aumento no rendimento do produto (OGAWA et al., 2020).

A seleção dos microrganismos foi realizada por 10 combinações e selecionou-se as combinações onde ambos os microrganismos conseguiram se desenvolver em placa de petri contendo BDA e não ocasionaram a anulação do outro. A matriz é apresentada pela Tabela 12 e os ensaios foram desenvolvidos com a junção dos microrganismos da linha e coluna. Os dados são expressos primeiro símbolo referente a linha e o segundo referente a coluna.

Tabela 12 – Matriz dos resultados de inibições e crescimento das 10 combinações dos microrganismos em placa de petri.

	γ	B22.2	B14	B13	A14.2
A14.2	- +	++	- +	- +	
B13	- +	+ -	++		
B14	++	+ -			
B22.2	++				
γ					

– indica efeito de inibição e + efeito de crescimento do microrganismo.

Fonte: autoria própria.

O processo de co-cultivo pode aumentar o rendimento dos metabólitos secundários e induzir a produção de novos compostos e podem contribuir na atividade bioherbicida em plantas daninhas (CAUDAL; TAPISSIER-BONTEMPS; EDRADA-EBEL, 2022). As combinações selecionadas foram A14.2B22.2, B13B14, B14 γ , B22.2 γ . Nesta metodologia, o caldo da co-cultivo dos microrganismos B14 e γ apresentou desempenho melhor que os demais tratamentos na aplicação em plantas de *A. hybridus*, obtendo, inclusive melhor performance do que quando avaliados isoladamente. Diferentes metabólitos podem ter sido produzidos pelo co-cultivo, que melhoraram o desempenho do tratamento com o microrganismo γ e reforçando o potencial bioherbicida do microrganismo B14, que vinha já demonstrando eficiência em outras metodologias. Isso se deve à competição entre os microrganismos, que quando inoculados juntos ficam expostos a fatores indutores de estresse que estimulam os complexos genéticos que ainda não foram expressos em condições de cultura normal e podem induzir a produção de novos compostos (CAUDAL; TAPISSIER-BONTEMPS; EDRADA-EBEL, 2022; MARMANN et al., 2014). Para os demais tratamentos, o co-cultivo não se mostrou mais eficiente que o caldo bruto nas plantas de *A. hybridus*. Além da produção de novos compostos, também pode ocorrer a perda de alguns metabólitos, presentes na cultura, quando submetidos à co-cultivo (CAUDAL; TAPISSIER-BONTEMPS; EDRADA-EBEL, 2022).

O tratamento A14.2B22.2 não apresentou efeitos em *A. hybridus*, mas o contrário foi observado em plantas de *E. crusgalli*, onde esse tratamento foi o único que apresentou a inibição de variáveis. As inibições observadas foram nas massas verde e seca, tanto da parte aérea como das raízes. Estudos afirmam que *Amaranthus* está entre as espécies mais difíceis de se controlar no mundo e nos experimentos *A. hybridus* tem se demonstrado mais resistente às aplicações dos tratamentos do que *E. crusgalli* (TRANDEL, 2021).

5.3.4. Co-cultivo com EAU

Avaliando as plantas de *E. crusgalli* com o tratamento oriundo de co-cultivo submetido em seguida ao EAU, foi observada uma melhora significativa comparado ao tratamento sem EAU e com o caldo bruto. Isso ocorre, possivelmente, em função da necessidade de um processo que consiga quebrar as células da biomassa, excretando substâncias capazes de agirem nas plantas daninhas. Em *E. crusgalli*, A14.2B22.2 apresentou a redução de CR (12%), variável que não havia sido reduzida na etapa sem ultrassom e também apresentou maior porcentagem de redução das variáveis comparado com o tratamento somente do co-cultivo. Os metabólitos dos co-cultivos B14 γ e B22.2 γ sem o EAU não haviam apresentado inibições. Já com a técnica de EAU, ambas apresentaram inibição de 5 variáveis em *E. crusgalli*.

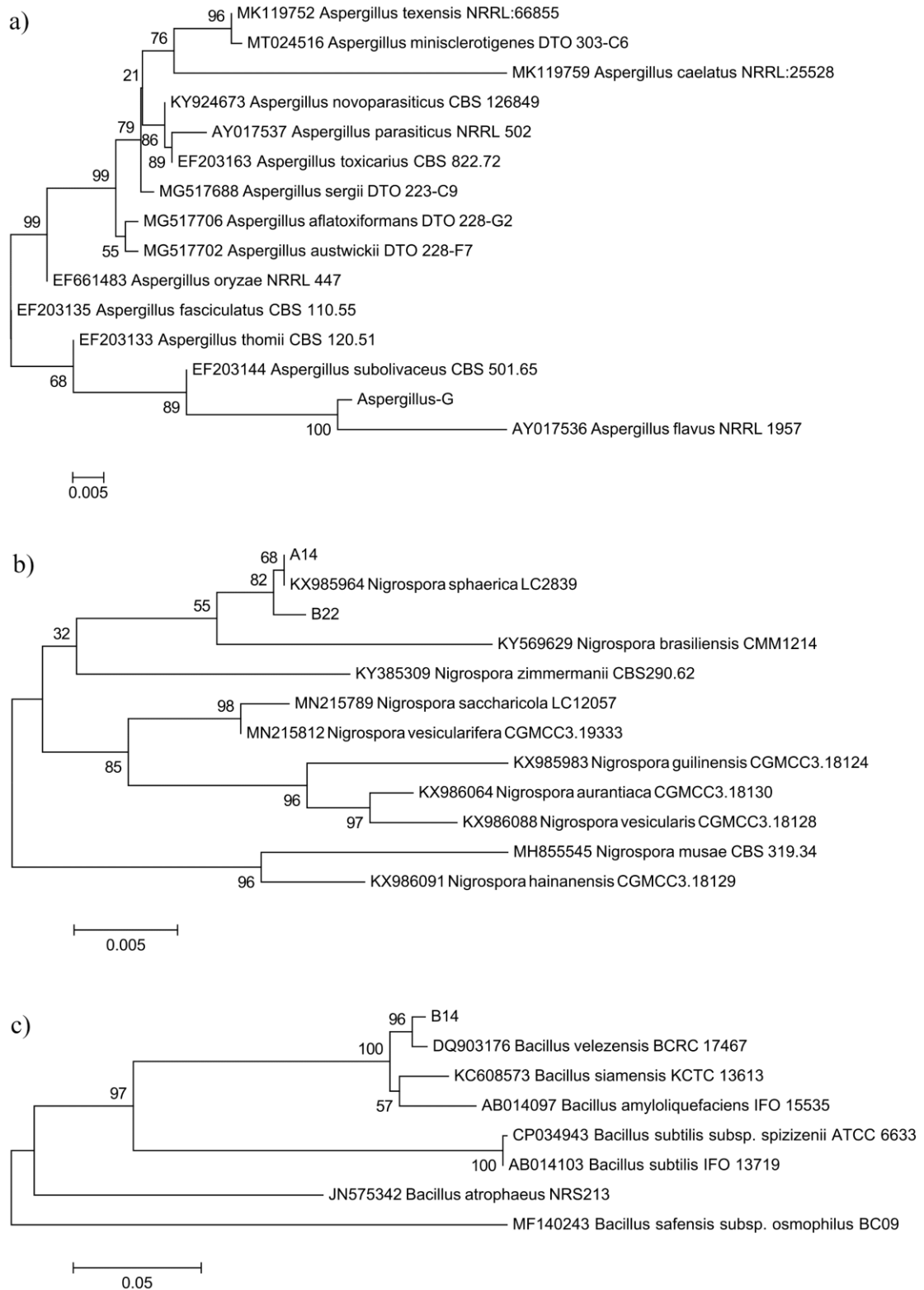
Em *A. hybridus*, os tratamentos não apresentaram resultados promissores, demonstrando que as possíveis substâncias excretadas pela quebra da biomassa não influenciam na inibição do crescimento desta espécie ou, como já descrito anteriormente, há a suspeita no crescimento da testemunha. Mesmo que os tratamentos não apresentaram resultados tão promissores para *A. hybridus* nos diferentes métodos testados, os resultados foram promissores com o caldo bruto. Com isso, optou-se por seguir para a próxima etapa utilizando *A. hybridus*, juntamente com *E. crusgalli*.

5.4. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Os tratamentos B14 γ , A14.2.US e B22.2.US inibiram todas as variáveis nas metodologias anteriormente estudadas e foram selecionados para identificação. A identificação molecular foi realizada pelo Instituto Biológico de São Paulo/Brasil e as árvores filogenéticas são apresentadas na Figura 12. A bactéria B14 foi identificada como *Bacillus velezensis* – GenBank DQ903176, γ como *Aspergillus flavus* – GenBank AY017536 e A14.2 e B22.2 pertencentes a mesma espécie *Nigrospora sphaerica* – GenBank KX985964.

As propriedades bem como as aplicações de *B. velezensis* vem sendo estudadas tanto na agricultura como na indústria de fermentação. Este microrganismo é de fácil cultivo e possui alta capacidade de resistir ao estresse (YE et al., 2018). Na literatura há relatos de aplicações como pesticida no combate aos fungos classificados do ar ou de doenças do solo (YE et al., 2018). *N. sphaerica* apresenta relatos contra o aguapé (SHARMA; PANDEY, 2022). Os microrganismos apresentados pela prospecção realizada nesse trabalho, trazem uma alternativa e grande potencial de produção de metabólitos secundários para o controle de plantas daninhas.

Figura 12 – Árvores filogenéticas dos microrganismos que apresentaram atividade bioherbicida selecionados para identificação, sendo a) cepa γ , b) cepa A14.2 e cepa B22.2, c) cepa B14.



Fonte: autoria própria.

5.5. FORMULAÇÃO

Os tratamentos B14 γ , A14.2.US e B22.2.US inibiram todas as variáveis nas metodologias anteriormente estudadas e foram selecionados para identificação e para formulação.

A formulação consiste na adição de adjuvantes que melhoram o espalhamento do caldo e auxiliam na capacidade do caldo penetrar os tecidos das plantas (DE RUITER et al., 2003). Os adjuvantes são os mais importantes componentes para a atividade de produtos de origem biológica (VERMEER; BAUR, 2007), uma vez que auxiliam o produto a ultrapassar barreiras como a cutícula, a parede celular e a membrana celular da planta (BASTOS et al., 2017).

Inicialmente, foi realizada a concentração dos caldos mantendo 30% do volume original e avaliado a formulação com três óleos: óleo de soja, óleo mineral e óleo de girassol e analisada a fitotoxicidade em folhas destacadas de *A. hybridus* e *E. crusgalli*. A Tabela 13 apresenta os resultados físico-químicos obtidos com a concentração e formulação do caldo.

Tabela 13 – Resultados físico-químicos obtidos com a formulação dos caldos.

Caldos e óleo	pH	TS (mNm⁻¹)	
B22.2_US			
Bruto	6,48 ± 0,03	59,36 ± 1,08	
Concentrado	7,14 ± 0,03	64,53 ± 0,86	
Soja	7,63 ± 0,14	32,84 ± 0,35	
Mineral	7,72 ± 0,01	37,32 ± 0,31	
Girassol	7,90 ± 0,29	35,80 ± 1,36	
A14.2_US			
Bruto	6,63 ± 0,30	58,72 ± 1,43	
Concentrado	6,78 ± 0,11	62,02 ± 1,23	
Soja	7,44 ± 0,06	41,12 ± 1,95	
Mineral	7,38 ± 0,05	38,69 ± 1,34	
Girassol	7,26 ± 0,10	31,71 ± 0,75	
B14γ			
Bruto	7,49 ± 0,05	60,57 ± 1,32	
Concentrado	7,52 ± 0,08	58,74 ± 1,07	
Soja	7,83 ± 0,07	39,60 ± 1,03	
Mineral	7,90 ± 0,01	38,48 ± 0,59	
Girassol	8,25 ± 0,34	36,98 ± 0,54	
Controle			
Soja	6,74 ± 0,09	39,30 ± 0,62	
Mineral	6,87 ± 0,04	41,86 ± 0,89	
Girassol	7,14 ± 0,04	40,09 ± 0,73	

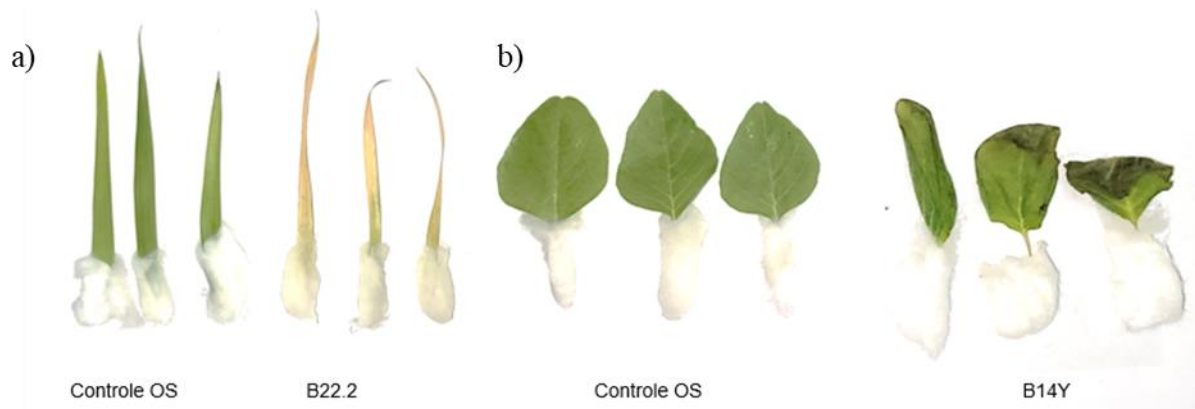
TS: Tensão superficial

Fonte: autoria própria.

Os resultados sugerem que as moléculas produzidas por esses microrganismos são hidrofílicas, pois apresentaram efeitos promissores com EHL alto que normalmente são mais eficazes, pois aumentam a hidratação da cutícula da planta e promove melhor permeabilidade do produto (BASTOS et al., 2017; HESS; FOY, 2000). A adição de adjuvantes modifica as propriedades físico-químicas, principalmente na diminuição da tensão superficial (TS) (HESS; FOY, 2000). Em todos os tratamentos observou-se a diminuição da tensão superficial, chegando a $31,72 \text{ mNm}^{-1}$ para o tratamento de A14.2 com óleo de girassol. Resultados apresentados na literatura apresentam diminuição acentuada nos valores de tensão superficial em função da formulação em caldo de *Phoma* sp. (TODERO et al., 2018).

Os resultados encontrados de TS para o caldo bruto reforçam a ideia de que os caldos possuíam baixa capacidade de retenção e rápida volatilização quando aplicados na planta, pois não apresentaram fitotoxicidade aparente nas plantas avaliadas com as metodologias anteriormente realizadas. Também foi realizada a leitura dos valores de pH dos caldos bruto, concentrado e formulado, que permaneceram na faixa de 6,48 a 8,3.

A fitotoxicidade já foi vista na avaliação das folhas destacadas de *E. crusgalli* em 3 DAA, onde todos os formulados apresentavam clareamento e atrofiamento das folhas. O tratamento de formulação com óleo de soja não apresentou lesões no controle e apresentou amarelamento severo nos demais formulados. Para *A. hybridus*, as avaliações foram realizadas em 5DAA, onde visualizou-se o aparecimento de sintomas mais severos e permanentes. Assim como os demais testes já realizados, foi observado que mesmo com o tratamento formulado, as folhas apresentam certa resistência e não apresentam lesões muito acentuadas. O tratamento B14 γ , que já havia demonstrado ser promissor em planta de *A. hybridus*, apresentou lesões como atrofia em todas as folhas aplicadas com o formulado de óleo de soja. Os danos mais severos se deram com as formulações utilizando óleo de soja, conforme a Figura 13, que representa os sintomas mais severos dos ocasionados pela aplicação dos formulados com óleo de soja.

Figura 13 – Fitotoxicidade acentuada em folhas destacadas de a) *E. crusgalli* e b) *A. hybridus*.

Fonte: autoria própria.

Desta forma, os ensaios com as plantas *E. crusgalli* e *A. hybridus* em casa de vegetação se deram com a formulação com óleo de soja e os resultados são apresentados pelas Tabela 14 e Tabela 15.

Tabela 14 – Resultados das formulações com aplicação de 300 L ha⁻¹ e 600 L ha⁻¹ em plantas de *E. crusgalli*.

	AP (cm)	CR (cm)	MVPA (mg)	MSPA (mg)	MVR (mg)	MSR (mg)	Fitotox. (%)
<i>E. crusgalli</i>							
300 L ha⁻¹ – tratamentos x controle OS							
B22.2OS	16,6 ± 2,7	13,8 ± 3,7	195 ± 84	25 ± 23	27 ± 17 ¹	4 ± 2	20
A14.2OS	10,1 ± 3,2 ¹	8,7 ± 2,6	77 ± 48 ¹	8 ± 4 ¹	9 ± 5	11 ± 24	60
B14OS	14,1 ± 3,7	8,9 ± 3,2	129 ± 55	13 ± 6	7 ± 6	3 ± 1	30
CONT.OS	14,6 ± 2,6	11,7 ± 3,4	133 ± 41	13 ± 4	7 ± 3	4 ± 1	20
600 L ha⁻¹ – tratamentos x controle OS							
B22.2OS	10,6 ± 3,5	7,9 ± 2,6	76 ± 34	9 ± 4	2 ± 1	3 ± 3	40
A14.2OS	8,8 ± 1,1 ¹	5,6 ± 2,1 ¹	40 ± 18 ¹	7 ± 2 ¹	3 ± 1	1 ± 1	70
B14γOS	10,5 ± 3,4	7,2 ± 3,9	42 ± 33	8 ± 3	3 ± 2	1 ± 1	60
CONT.OS	14,2 ± 3,2	9,3 ± 3,5	92 ± 55	12 ± 5	4 ± 3	3 ± 2	40
300 L ha⁻¹ – tratamentos x controle água							
B22.2OS	16,6 ± 2,7 ¹	13,8 ± 3,7	76 ± 84	9 ± 23	2 ± 17	3 ± 2	20
A14.2OS	10,1 ± 3,2 ¹	8,7 ± 2,6 ¹	77 ± 48 ¹	8 ± 4 ¹	9 ± 5	11 ± 24	60
B14γOS	14,1 ± 3,7 ¹	8,9 ± 3,2 ¹	129 ± 55 ¹	13 ± 6 ¹	7 ± 6 ¹	3 ± 1 ¹	30
CONT.OS	14,6 ± 2,6	11,7 ± 3,4	133 ± 41	13 ± 4	7 ± 3	4 ± 1	20
600 L ha⁻¹ – tratamentos x controle água							
B22.2OS	10,6 ± 3,5 ¹	7,9 ± 2,6 ¹	76 ± 34 ¹	9 ± 4 ¹	2 ± 1 ¹	3 ± 3 ¹	40
A14.2OS	8,8 ± 1,1 ¹	5,6 ± 2,1 ¹	40 ± 18 ¹	7 ± 2 ¹	3 ± 1 ¹	1 ± 1 ¹	70
B14γOS	10,5 ± 3,4 ¹	7,2 ± 3,9 ¹	42 ± 33 ¹	8 ± 3 ¹	3 ± 2 ¹	1 ± 1 ¹	60
CONT.OS	14,2 ± 3,2	9,3 ± 3,5	92 ± 55	12 ± 5	4 ± 3 ¹	3 ± 2	40
ÁGUA	20,3 ± 3,3	15,7 ± 3,8	279 ± 125	26 ± 11	32 ± 28	6 ± 3	0

¹ variáveis que apresentaram diferença significativa de inibição e ^c de crescimento, de acordo com o teste t de *student*, 95% de confiança

Fonte: autoria própria.

Tabela 15 – Resultados das formulações com aplicação de 300 L ha⁻¹ e 600 L ha⁻¹ em plantas de *A. hybridus*.

	AP (cm)	CR (cm)	MVPA (mg)	MSPA (mg)	MVR (mg)	MSR (mg)	Fitotox. (%)
<i>A. hybridus</i>							
300 L ha⁻¹ – tratamentos x controle OS							
B22.2OS	8,1 ± 3,1	18,0 ± 12,6	772 ± 501	85 ± 52	35 ± 30	9 ± 7	20
A14.2OS	7,5 ± 2,4	14,0 ± 7,4	690 ± 393	73 ± 32	24 ± 16	8 ± 6	10
B14γOS	9,8 ± 1,5	16,9 ± 9,7	843 ± 284	84 ± 28	24 ± 21	8 ± 4	20
CONT. OS	10 ± 2,5	16,6 ± 5,8	1042 ± 586	98 ± 53	43 ± 41	11 ± 7	10
600 L ha⁻¹ – tratamentos x controle OS							
B22.2OS	8,3 ± 2,0	19,4 ± 7,8	718 ± 334	81 ± 36	58 ± 53	8 ± 5	30
A14.2OS	7,6 ± 2,4	13,4 ± 3,0	656 ± 338	68 ± 32	51 ± 31	8 ± 3	20
B14γOS	8,3 ± 1,9	15,0 ± 5,4	599 ± 178	69 ± 19	27 ± 6	6 ± 2	30
CONT.OS	8,1 ± 2,4	19,9 ± 7,5	790 ± 281	89 ± 31	41 ± 21	10 ± 5	10
300 L ha⁻¹ – tratamentos x controle água							
B22.2OS	8,1 ± 3,1	18,0 ± 12,6	772 ± 501	85 ± 52	35 ± 30	9 ± 7	20
A14.2OS	7,5 ± 2,4	14,0 ± 7,4	690 ± 393 ^I	73 ± 32 ^I	24 ± 16 ^I	8 ± 6	10
B14γOS	9,8 ± 1,5	16,9 ± 9,7	843 ± 284 ^I	84 ± 28 ^I	24 ± 21 ^I	8 ± 4	20
CONT.OS	10 ± 2,5	16,6 ± 5,8	1042 ± 586	98 ± 53	43 ± 41	11 ± 7	10
600 L ha⁻¹ – tratamentos x controle água							
B22.2OS	8,3 ± 2,0	19,4 ± 7,8	718 ± 334 ^I	81 ± 36 ^I	58 ± 53	8 ± 5	30
A14.2OS	7,6 ± 2,4	13,4 ± 3,0	656 ± 338 ^I	68 ± 32 ^I	51 ± 31	8 ± 3	20
B14γOS	8,3 ± 1,9	15,0 ± 5,4	599 ± 178 ^I	69 ± 19 ^I	27 ± 6 ^I	6 ± 2	30
CONT.OS	8,1 ± 2,4	19,9 ± 7,5	790 ± 281	89 ± 31	41 ± 21	10 ± 5	10
ÁGUA	10 ± 1,9	20,9 ± 9,4	1159 ± 121	121 ± 14	51 ± 14	33 ± 54	0

^I variáveis que apresentaram diferença significativa de inibição e ° de crescimento, de acordo com o teste t de *student*, 95% de confiança

Fonte: autoria própria.

Os resultados estatísticos de significância foram realizados comparando os tratamentos com seus respectivos controles e posteriormente os tratamentos e controles comparando com o controle de água.

Não foram observadas diferenças significativas de grande destaque nas variáveis que já vinha sendo estudadas, porém, é nítida a diferença de fitotoxicidade em plantas de *E. crusgalli* comparando os ensaios com e sem formulação. Nota-se o aumento da fitotoxicidade com a aplicação de 600 L ha⁻¹, o que indica que alguns bioherbicidas requerem dosagens maiores de aplicação para obter-se o efeito esperado (TODERO et al., 2018). O tratamento A14.2 atingiu 70% de fitotoxicidade em plantas de *E. crusgalli* com a aplicação de duas dosagens (Figura 14). As plantas, em todos os tratamentos, reportaram uma ou mais folhas com mortalidade, fazendo com que a planta aparentasse não ter estrutura para o seu desenvolvimento. Alguns microrganismos possuem quantidades muito baixas de metabólitos secundários e com a concentração já pode se obter melhores resultados (DE ALMEIDA et al., 2020). A concentração junto com a formulação tende a potencializar o efeito bioherbicida nas plantas daninhas pois diminui a evaporação e tende a realizar o espalhamento mais uniforme na planta (DE ALMEIDA et al., 2020; HESS; FOY, 2000; KNOWLES, 2001; TODERO et al., 2019).

Figura 14 – Comparativo do crescimento de plantas de *E. crusgalli* com diferentes tratamentos e aplicação de 600 L ha^{-1} .



Fonte: autoria própria.

Não foram evidenciados efeitos fitotóxicos promissores em *A. hybridus* como em *E. crusgalli*, os sintomas permaneceram leves e apresentaram atrofia, porém não interferiram na estrutura e no desenvolvimento da planta.

6. CONCLUSÃO

O trabalho desenvolvido, com as respectivas metodologias apresentadas, é promissor na obtenção de um bioherbicida para controle de plantas daninhas por meio da produção de metabólitos por fermentação. Os maiores efeitos de inibição de crescimento em plantas de *E. crusgalli* foram obtidos quando o caldo e a biomassa de *N. sphaerica* foram submetidos ao EAU para rompimento celular. Os metabólitos da co-cultivo de *B. velezensis* com *A. flavus* demonstraram-se mais eficiente na inibição do desenvolvimento de *A. hybridus*. A fitotoxicidade somente foi visível com a formulação desses caldos, atingindo 70% e 30% em *E. crusgalli* e *A. hybridus*, respectivamente, com a aplicação de 600 L ha⁻¹ com formulado de *N. sphaerica*. Os resultados também foram promissores com a formulação do caldo de co-cultivo de *B. velezensis* com *A. flavus* para ambas as espécies. A utilização de metodologias como co-cultivo e extração assistida por ultrassom demonstram ser boas ferramentas para a obtenção de novos compostos, que podem ser promissores na produção de um bioherbicida. Os resultados obtidos permitem propor o desenvolvimento de mais estudos de concentração e formulação para a potencialização da atividade bioherbicida dos metabólitos vindo dos microrganismos encontrados na prospecção realizada nesse trabalho.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Purificação e avaliação de diferentes concentrações dos caldos fermentados;
- Avaliação de fitotoxicidade dos bioherbicidas em culturas de interesse de aplicação, como soja, milho, algodão;
- Testes de fitotoxicidade em diferentes plantas daninhas, além daquelas avaliadas nesse trabalho;
- Avaliação de diferentes formulações com diferentes óleos e surfactantes;
- Desenvolvimento de metodologia para isolamento e caracterização química das toxinas.

7. REFERÊNCIAS

- ABBAS, T. et al. Limitations of Existing Weed Control Practices Necessitate Development of Alternative Techniques Based on Biological Approaches. **Advances in Agronomy**, v. 147, p. 239–280, 2018.
- ADETUNJI, C. O. et al. Isolation, structural elucidation and bioherbicidal activity of an eco-friendly bioactive 2-(hydroxymethyl) phenol, from *Pseudomonas aeruginosa* (C1501) and its ecotoxicological evaluation on soil. **Environmental Technology & Innovation**, v. 13, p. 304–317, 1 fev. 2019.
- ADETUNJI, C. O.; OLOKE, J. K.; OSEMWEGIE, O. O. Environmental fate and effects of granular pest formulation from strains of *Pseudomonas aeruginosa* C1501 and *Lasiodiplodia pseudotheobromae* C1136 on soil activity and weeds. **Chemosphere**, v. 195, p. 98–107, 1 mar. 2018.
- AHMED, N. E. et al. Effects of *Fusarium solani* Isolates and Metabolites on *Striga* Germination. **Weed Science**, v. 49, n. 3, p. 354–358, 2001.
- ALACID, E.; RICHARDS, T. A. A cell–cell atlas approach for understanding symbiotic interactions between microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 64, p. 47–59, 1 dez. 2021.
- ANA, C. R. M. et al. Formulation and pathogenicity of a bioherbicide for wild poinsettia control. **African Journal of Microbiology Research**, v. 14, n. 4, p. 129–135, 2020.
- ANDOLFI, A. et al. Gulypyrones A and B and Phomentrioloxins B and C Produced by *Diaporthe gulyae*, a Potential Mycoherbicide for Saffron Thistle (*Carthamus lanatus*). **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 4, p. 623–629, 24 abr. 2015.
- ANEJA, K. R. et al. Potential Bioherbicides: Indian Perspectives. Em: **Biotechnology: Prospects and Applications**. New Delhi: Springer India, 2013. v. 9788132216834p. 197–215.
- ANTEN, N. P.; HIROSE, T. Limitations on photosynthesis of competing individuals in stands and the consequences for canopy structure. **Oecologia**, v. 129, n. 2, p. 186–196, 1 out. 2001.
- ASH, G. J. The science, art and business of successful bioherbicides. **Biological Control**, v. 52, n. 3, p. 230–240, mar. 2010.
- ASHOKKUMAR, M. The characterization of acoustic cavitation bubbles – An overview. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 864–872, jul. 2011.
- ASIMA, T.; RAJAT KUMAR, P. Symbiotic Interactions, Law of Purposive Association and the +/+ Nature of all Co-evolution. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 11, n. 43, p. 1–12, 1 nov. 2018.

- AVESKAMP, M. M. et al. DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. **Mycologia**, v. 101, n. 3, p. 363–382, 20 maio 2009.
- BAILEY, K. L. et al. The effects of *Phoma macrostoma* on nontarget plant and target weed species. **Biological Control**, v. 58, n. 3, p. 379–386, set. 2011.
- BASTOS, B. DE O. 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. 2, p. 135, 8 jun. 2017.
- BERTRAND, S. et al. Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 6, p. 1180–1204, 2014.
- BO, A. B. et al. Isolation, identification and characterization of *Streptomyces* metabolites as a potential bioherbicide. **PLoS ONE**, v. 14, n. 9, p. 1–18, 2019.
- BONNY, S. Genetically Modified Herbicide-Tolerant Crops, Weeds, and Herbicides: Overview and Impact. **Environmental Management**, v. 57, n. 1, p. 31–48, 22 jan. 2016.
- BORDIN, E. R. et al. Current production of bioherbicides: mechanisms of action and technical and scientific challenges to improve food and environmental security. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 39, n. 5, p. 346–359, 3 set. 2021.
- BORUTA, T.; MILCZAREK, I.; BIZUKOJC, M. Evaluating the outcomes of submerged co-cultivation: production of lovastatin and other secondary metabolites by *Aspergillus terreus* in fungal co-cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 14, p. 5593–5605, 20 jul. 2019.
- BRASIL. **Regras para análise de sementes** (ACS, Ed.). Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009.
- BRUN, T. et al. Production of bioherbicide by *Phoma* sp. in a stirred-tank bioreactor. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, 2016.
- BRUN, T. et al. Weed control by metabolites produced from *Diaporthe schini*. **Environmental Technology**, v. 43, n. 1, p. 139–148, 2 jan. 2022.
- CAPASSO, R. et al. Fusaric and 9,10-dehydrofusaric acids and their methyl esters from *Fusarium nygamai*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 4, p. 1035–1039, mar. 1996.
- CAPOCELLI, M. et al. Comparison between hydrodynamic and acoustic cavitation in microbial cell disruption. **Chemical Engineering Transactions**, v. 38, p. 13–18, 2014.
- CAUDAL, F.; TAPISSIER-BONTEMPS, N.; EDRADA-EBEL, R. A. Impact of Co-Culture on the Metabolism of Marine Microorganisms. **Marine Drugs** 2022, Vol. 20, Page 153, v. 20, n. 2, p. 153, 21 fev. 2022.

CHAVES NETO, J. R. et al. Bioherbicidal action of *Phoma dimorpha* fermented broth on seeds and plants of *Senna obtusifolia*. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 50, p. 1–8, 2020.

CHAVES NETO, J. R. et al. *Phoma dimorpha* phytotoxic activity potentialization for bioherbicide production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 33, 1 maio 2021.

CHEMAT, F. et al. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**. Elsevier B.V., 1 jan. 2017.

CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**. **Anais...Elsevier B.V.**, 2011.

CHEN, S.; QIANG, S. Recent advances in tenuazonic acid as a potential herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 143, p. 252–257, nov. 2017.

CIMMINO, A. et al. Agropyrenol, a phytotoxic fungal metabolite, and its derivatives: A structure-activity relationship study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 8, p. 1779–1783, 27 fev. 2013.

COHAVI, A.; COHEN, I. H.; RACHMILEVITCH, S. The role of different root orders in nutrient uptake. **Environmental and Experimental Botany**, v. 179, 1 nov. 2020.

COCHRAN, S. A.; PRAUSNITZ, M. R. Sonoluminescence as an indicator of cell membrane disruption by acoustic cavitation. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 27, n. 6, p. 841–850, jun. 2001.

CORDEAU, S. et al. Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. **Crop Protection**, v. 87, p. 44–49, set. 2016.

DABA, A. et al. Evaluation of the herbicidal potential of some fungal species against *Bidens pilosa*, the coffee farming weeds. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 11, p. 6408–6416, nov. 2021.

DANIEL, J. J. et al. *Fusarium fujikuroi*: A novel source of metabolites with herbicidal activity. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, n. October 2017, p. 314–320, abr. 2018.

DANIEL, J. J. et al. Association of adjuvants with culture filtrate from *Fusarium Fujikuroi* for increasing the control of *Conyza* sp. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 10, n. 5, p. 6481–6487, 2020.

DAYAN, F. E. et al. Herbicide Mechanisms of Action and Resistance. Em: **Comprehensive Biotechnology**. Third Edit Elsevier, 2019. v. 4p. 36–48.

DE ALMEIDA, T. C. et al. Production and formulation of a bioherbicide as environment-friendly and safer alternative for weed control. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 5938–5943, 23 abr. 2020.

DE OLIVEIRA, C. T. et al. Production of cutinase by solid-state fermentation and its use as adjuvant in bioherbicide formulation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 5, p. 829–838, 9 maio 2019.

DE RUITER, H. et al. Influence of adjuvants and formulations on the emission of pesticides to the atmosphere. **Plant Research International**, 2003.

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

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, p. 11–15, 1987.

DUARTE, L. L.; SANTOS, F. M. C.; BARRETO, R. W. Mycobiota of the weed *Conyza canadensis* (Asteraceae) in Brazil. **Fungal Biology**, v. 120, n. 9, p. 1118–1134, 2016.

EHGARTNER, D.; HERWIG, C.; FRICKE, J. Morphological analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum* using flow cytometry—the fast alternative to microscopic image analysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 20, p. 7675–7688, 1 out. 2017.

EL-GENDI, H. et al. A Comprehensive Insight into Fungal Enzymes: Structure, Classification, and Their Role in Mankind's Challenges. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 1, 1 jan. 2022.

FRANS, R.; CROWLEY, H. Experimental design and techniques for measuring and analyzing plant responses to weed control practices. In: **Southern Weed Science Society. Research methods in weed science**, Clemson, 3^a ed., p 29-45, 1986.

GAINES, T. A. et al. Mechanisms of evolved herbicide resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 30, p. 10307–10330, jul. 2020.

GAINES, T. A.; BUSI, R.; KÜPPER, A. Can new herbicide discovery allow weed management to outpace resistance evolution? **Pest Management Science**, v. 77, n. 7, p. 3036–3041, 2021.

GASIC, S.; TANOVIC, B. Biopesticide formulations, possibility of application and future trends. **Pesticidi i fitomedicina**, v. 28, n. 2, p. 97–102, 2013.

GEHLOT, P.; SINGH, J. **Fungi and their role in sustainable development: Current perspectives**. Springer Singapore, 2018.

GEORGIEVA, N. G. et al. Possibility for weed control by using of an organic product with herbicidal effect. **Banat's Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 17, p. 60–68, 2015.

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHMID, F. Growth of Filamentous Fungi in Submerged Culture: Problems and Possible Solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 17–48, 29 jan. 2000.

GOGATE, P. R.; KABADI, A. M. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. **Biochemical Engineering Journal**, 15 abr. 2009.

GREEN, J. M. Evolution of Glyphosate-Resistant Crop Technology. **Weed Science**, v. 57, n. 1, p. 108–117, 2009.

GREEN, J. M. Current state of herbicides in herbicide-resistant crops. **Pest Management Science**, v. 70, n. 9, p. 1351–1357, 2014.

HAARMANN, J. A.; YOUNG, B. G.; JOHNSON, W. G. Control of *Palmer amaranth* (*Amaranthus palmeri*) regrowth following failed applications of glufosinate and fomesafen. **Weed Technology**, v. 35, n. 3, p. 464–470, 1 jun. 2021.

HARDING, D. P.; RAIZADA, M. N. Controlling weeds with fungi, bacteria and viruses: a review. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 28 ago. 2015.

HARWANI, D.; BEGANI, J.; LAKHANI, J. Co-cultivation Strategies to Induce De Novo Synthesis of Novel Chemical Scaffolds from Cryptic Secondary Metabolite Gene Clusters. Em: **Fungi and their Role in Sustainable Development: Current Perspectives**. Singapore: Springer Singapore, 2018. p. 617–631.

HASAN, M. et al. Bioherbicides: An Eco-Friendly Tool for Sustainable Weed Management. **Plants**, v. 10, n. 6, p. 1212, 15 jun. 2021.

HEAP, I. **The International Herbicide-Resistant Weed Database**. Disponível em: <www.weedscience.org>. Acesso em: 21 abr. 2022.

HERRÁN, N. S. et al. Effects of ultrasound on culture of *Aspergillus terreus*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, n. 5, p. 593–600, maio 2008.

HESS, F. D.; FOY, C. L. Interaction of Surfactants with Plant Cuticles. **Weed Technology**, v. 14, n. 4, p. 807–813, out. 2000.

HYNES, R. K. *Phoma macrostoma* : as a broad spectrum bioherbicide for turf grass and agricultural applications. **CABI Reviews**, v. 2018, n. 005, p. 1–9, 4 abr. 2018.

IBAMA. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#sobreosrelatorios>>. Acesso em: 13 set. 2021.

IWAKAMI, S. et al. CYP81A P450s are involved in concomitant cross-resistance to acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase herbicides in *Echinochloa phyllopogon*. **New Phytologist**, v. 221, n. 4, p. 2112–2122, 1 mar. 2019.

JABRAN, K. et al. Allelopathy for weed control in agricultural systems. **Crop Protection**. Elsevier Ltd, 1 jun. 2015.

JADHAV, A. J. et al. Acoustic Cavitation as a Novel Approach for Extraction of Oil from Waste Date Seeds. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 4, n. 8, p. 4256–4263, 1 ago. 2016.

- JURADO, A. et al. Herbicides: the Face and the Reverse of the Coin. An in Vitro Approach to the Toxicity of Herbicides in Non-Target Organisms. Em: **Herbicides and Environment**. InTech, 2011.
- KALAM, S.; KHAN, N. A.; SINGH, J. A novel phytotoxic phenolic compound from *Phoma herbarum* FGCC#54 with herbicidal potential. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 50, n. 4, 2014.
- KENNEDY, A. C. Selective soil bacteria to manage downy brome, jointed goatgrass, and medusahead and do no harm to other biota. **Biological Control**, v. 123, p. 18–27, ago. 2018.
- KLAIC, R. et al. An overview regarding bioherbicide and their production methods by fermentation. Em: **Fungal Biomolecules**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. p. 183–199.
- 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, abr. 2017.
- KNOWLES, A. Adjuvants for agrochemicals. **Pesticide Outlook**, v. 12, n. 5, p. 183–184, 7 nov. 2001.
- KOŁODZIEJCZYK, M. The effect of living mulches and conventional methods of weed control on weed infestation and potato yield. **Scientia Horticulturae**, v. 191, p. 127–133, 6 ago. 2015.
- KREMER, R. J. Bioherbicides and nanotechnology: Current status and future trends. Em: **Nano-Biopesticides Today and Future Perspectives**. Columbia: Elsevier, 2019. p. 353–366.
- LI, S. C.; KANE, P. M. The yeast lysosome-like vacuole: Endpoint and crossroads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1793, n. 4, p. 650–663, abr. 2009.
- LI, W.; SHEN, S.; CHEN, H. Bio-herbicidal potential of wheat rhizosphere bacteria on *Avena fatua* L. grass. **Bioengineered**, v. 12, n. 1, p. 516–526, 2021.
- LI, Y. et al. Research progress on microbial herbicides. **Crop Protection**, v. 22, n. 2, p. 247–252, mar. 2003.
- LUFT, L. et al. Ultrasound Technology Applied to Enhance Enzymatic Hydrolysis of Brewer's Spent Grain and its Potential for Production of Fermentable Sugars. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 8, p. 2157–2164, 1 ago. 2019.
- LUO, J.; FANG, Z.; SMITH, R. L. Ultrasound-enhanced conversion of biomass to biofuels. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 41, n. 1, p. 56–93, 2014.
- MAIQUEL, P. 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, 20 out. 2016.

MARMANN, A. et al. Co-Cultivation—A Powerful Emerging Tool for Enhancing the Chemical Diversity of Microorganisms. **Marine Drugs**, v. 12, n. 2, p. 1043–1065, 17 fev. 2014.

MATHUR, M.; GEHLOT, P. Recruit the Plant Pathogen for Weed Management: Bioherbicide – A Sustainable Strategy. Em: **Fungi and their Role in Sustainable Development: Current Perspectives**. Singapore: Springer Singapore, 2018. p. 159–181.

MOHAMMED, Y. M. M.; BADAWEY, M. E. I. Potential of phytopathogenic fungal isolates as a biocontrol agent against some weeds. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 30, n. 1, p. 92, 13 dez. 2020.

MORRA, M. J.; POPOVA, I. E.; BOYDSTON, R. A. Bioherbicidal activity of *Sinapis alba* seed meal extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 115, n. February, p. 174–181, 2018.

NAVEENA, B.; ARMSHAW, P.; TONY PEMBROKE, J. Ultrasonic intensification as a tool for enhanced microbial biofuel yields. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 140, 15 dez. 2015.

OGAWA, M. et al. Mapping the intracellular metabolome of yeast biocapsules - Spherical structures of yeast attached to fungal pellets. **New Biotechnology**, v. 58, p. 55–60, 25 set. 2020.

ÖZKARA, A.; AKYIL, D.; KONUK, M. Pesticides, Environmental Pollution, and Health. Em: **Environmental Health Risk - Hazardous Factors to Living Species**. InTech, 2016.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 3, p. 189–259, jan. 2004.

PEROTTI, V. E. et al. Herbicide resistant weeds: A call to integrate conventional agricultural practices, molecular biology knowledge and new technologies. **Plant Science**, v. 290, p. 110255, 1 jan. 2020.

PIYABOON, O. et al. Pathogenicity, host range and activities of a secondary metabolite and enzyme from *Myrothecium roridum* on water hyacinth from Thailand. **Weed Biology and Management**, v. 16, n. 3, p. 132–144, 1 set. 2016.

PRÁ, V. D. et al. Formulation and characterization of ultrasound-assisted nanoemulsions containing palm oil (*Elaeis guineensis* Jacq) in water. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 2, p. 941–947, 2019.

RABINOVITCH, L.; DE OLIVEIRA, E. J. **Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de Bacillus e gêneros esporulados aeróbios correlatos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Montenegro Comunicação, 2015. v. 1

RADHAKRISHNAN, R.; ALQARAWI, A. A.; ABD ALLAH, E. F. Bioherbicides: Current knowledge on weed control mechanism. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 158, n. April, p. 131–138, 2018.

REICHERT JÚNIOR, F. W. et al. New perspectives for weeds control using autochthonous fungi with selective bioherbicide potential. **Heliyon**, v. 5, n. 5, p. 0–6, 2019.

- ROKHINA, E. V.; LENS, P.; VIRKUTYTE, J. Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. **Trends in Biotechnology**, maio 2009.
- SAEED, S. et al. Microbial conversion of pomegranate peels to biovanillin using submerged fermentation and process optimization through statistical design. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 31 jan. 2022.
- SAFDAR, M. N.; KAUSAR, T.; NADEEM, M. Comparison of Ultrasound and Maceration Techniques for the Extraction of Polyphenols from the Mango Peel. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 4, 1 ago. 2017.
- SANDLAND, G. J.; RODGERS, J. K.; MINCHELLA, D. J. Interspecific antagonism and virulence in hosts exposed to two parasite species. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, n. 1, p. 43–47, set. 2007.
- SARI, M.; KUSHARYOTO, W.; BRAZIA, A. C. Profiling bioactive compounds in secondary metabolites from co-cultivation between actinomycetes and pathogenic bacteria. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 439, n. 1, p. 012009, 1 fev. 2020.
- SAVE, S. S.; PANDIT, A. B.; JOSHI, J. B. Microbial cell disruption: role of cavitation. **The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal**, v. 55, n. 3, p. B67–B72, out. 1994.
- SCHMALTZ, S. et al. Ultrasound-assisted fermentation for production of β -1,3-glucanase and chitinase by *Beauveria bassiana*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 96, n. 1, p. 88–98, 17 jan. 2021.
- SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical Biochemistry**, v. 354, n. 2, p. 311–313, 15 jul. 2006.
- SHARMA, S.; PANDEY, L. M. Prospective of fungal pathogen-based bioherbicides for the control of water hyacinth: A review. **Journal of Basic Microbiology**, v. 62, n. 3–4, p. 415–427, 1 mar. 2022.
- SILVA, M. C. D. C.; BRAUN, H.; COELHO, F. S. Manejo e controle de plantas daninhas na cultura da batata. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 1, n. 1, p. 60–67, 2011.
- SINGHANIA, R. R. et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 7, p. 541–549, jun. 2010.
- SOUZA BARROS, V. M. et al. Herbicides of biological origin: a review. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 96, n. 3, p. 288–296, 4 maio 2021.
- SOUZA, A. R. C. DE et al. Selection, isolation, and identification of fungi for bioherbicide production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 101–108, 2017.

SS, R.; RANA, M. C. **Principles and Practices of Weed Management**. 1. ed. Palampur: CSK Himachal Pradesh Krishi Vishvavidyalaya, 2016. v. 1

STEFANSKI, F. S. et al. Potential Use of Biological Herbicides in a Circular Economy Context: A Sustainable Approach. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 4, n. October, p. 1–14, 2020.

STENBERG, J. A. et al. When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. **Journal of Pest Science**, v. 94, n. 3, p. 665–676, 13 jun. 2021.

SYAHRI, R.; WIDARYANTO, E.; PUJI WICAKSONO, K. Bioactive compound from mangoes leaves extract as potential soil bioherbicide to control amaranth weed (*Amaranthus spinosus* Linn.). **Journal of Degraded and Mining Lands Management**, v. 04, n. 03, p. 829–836, 1 abr. 2017.

TABAN, A.; SAHARKHIZ, M. J.; KHORRAM, M. Formulation and assessment of nano-encapsulated bioherbicides based on biopolymers and essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 149, 1 jul. 2020.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, dez. 2013.

TANAKA, S.; SAWAYA, M. R.; YEATES, T. O. Structure and Mechanisms of a Protein-Based Organelle in *Escherichia coli*. **Science**, v. 327, n. 5961, p. 81–84, 1 jan. 2010.

TODERO, I. et al. Formulation of a bioherbicide with metabolites from *Phoma* sp. **Scientia Horticulturae**, v. 241, n. July, p. 285–292, 2018.

TODERO, I. et al. Concentration of metabolites from *Phoma* sp. using microfiltration membrane for increasing bioherbicidal activity. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 40, n. 18, p. 2364–2372, 11 ago. 2019.

TODERO, I. et al. Concentration of exopolysaccharides produced by *Fusarium fujikuroi* and application of bioproduct as an effective bioherbicide. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 41, n. 21, p. 2742–2749, 2020.

TRANDEL, P. J. Herbicide resistance in *Amaranthus tuberculatus*. **Pest Management Science**. John Wiley and Sons Ltd, , 1 jan. 2021.

TRIOLET, M. et al. Fungal-based bioherbicides for weed control: a myth or a reality? **Weed Research**, v. 60, n. 1, p. 60–77, 25 fev. 2020.

TROGNITZ, F. et al. The role of plant-microbiome interactions in weed establishment and control. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 10, p. 1–34, 2016.

VASILAKOGLU, I. B.; ELEFTHROHORINOS, I. G.; DHIMA, K. V. Propanil-Resistant Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) Biotypes Found in Greece 1. **Weed Technology**, v. 14, n. 3, p. 524–529, 2000.

- VEITER, L.; RAJAMANICKAM, V.; HERWIG, C. The filamentous fungal pellet—relationship between morphology and productivity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 7, p. 2997–3006, 22 abr. 2018.
- VERDUGO-NAVARRETE, C. et al. Selection of rhizobacteria isolates with bioherbicide potential against *Palmer amaranth* (*Amarathus palmeri* S. Wats.). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 1443–1450, 6 set. 2021.
- VERDUM, R. et al. Pampa: The South Brazil. Em: **The Physical Geography of Brazil**. 1. ed. Switzerland: Springer, 2019. p. 7–20.
- VERMEER, R.; BAUR, P. O-TEQ®, a formulation concept that overcomes the incompatibility between water and oil. **Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer**, 2007.
- WANG, L. W.; SHOWALTER, A. M.; UNGAR, I. A. Effects of intraspecific competition on growth and photosynthesis of *Atriplex prostrata*. **Aquatic Botany**, v. 83, n. 3, p. 187–192, nov. 2005.
- WEINER, J. Asymmetric competition in plant populations. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 5, n. 11, p. 360–364, nov. 1990.
- XU, D. et al. Phytotoxic Secondary Metabolites from Fungi. **Toxins**, v. 13, n. 4, p. 261, 6 abr. 2021.
- YAVARI, N. et al. The effect of light quality on plant physiology, photosynthetic, and stress response in *Arabidopsis thaliana* leaves. **PLoS ONE**, v. 16, n. 3 March, 1 mar. 2021.
- YE, M. et al. Characteristics and Application of a Novel Species of *Bacillus*: *Bacillus velezensis*. **ACS Chemical Biology**, v. 13, n. 3, p. 500–505, 16 mar. 2018.
- YEATES, T. O. et al. Protein-based organelles in bacteria: Carboxysomes and related microcompartments. **Nature Reviews Microbiology**, 2008.
- YOUNG, S. L.; PIERCE, F. J.; NOWAK, P. Introduction: Scope of the problem—rising costs and demand for environmental safety for weed control. Em: **Automation: The Future of Weed Control in Cropping Systems**. Switzerland: Springer Netherlands, 2014. p. 1–8.
- ZHANG, Y. et al. Biological control of *Solidago canadensis* using a bioherbicide isolate of *Sclerotium rolfsii* SC64 increased the biodiversity in invaded habitats. **Biological Control**, v. 139, p. 104093, dez. 2019.
- ZHANG, Z. S. et al. Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed. **Separation and Purification Technology**, v. 62, n. 1, p. 192–198, 1 ago. 2008.
- ZHENG, S. et al. Progress in ultrasound-assisted extraction of the value-added products from microorganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 71, 25 abr. 2021.
- ZHU, H. et al. Biological weed control using *Trichoderma polysporum* strain HZ-31. **Crop Protection**, v. 134, n. May 2019, p. 105161, ago. 2020.