

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

THIARLES BRUN

**PRODUÇÃO DE HERBICIDA POR FERMENTAÇÃO
SUBMERSA A PARTIR DO FUNGO *Phoma* sp. EM
BIORREATOR**

Santa Maria, RS
2016

Thiarles Brun

**PRODUÇÃO DE HERBICIDA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA A PARTIR DO
FUNGO *Phoma* sp. EM BIORREATOR**

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

Dr. Marcio Antonio Mazutti

Santa Maria, RS, Brasil
2016

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

Brun, Thiarles
PRODUÇÃO DE HERBICIDA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA
A PARTIR DO FUNGO *Phoma* sp. EM BIORREATOR / Thiarles
Brun.-2016.
55 p.; 30cm

Orientador: Marcio Antonio Mazutti
Coorientadores: Altemir José Mossi, Jerson Carús
Guedes
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Agrícola, RS, 2016

1. Produção de herbicida por rotas biológicas 2.
Fermentação submersa 3. Microrganismos 4. *Phoma* sp. 5.
Efeito fitotóxico I. Antonio Mazutti, Marcio II. José
Mossi, Altemir III. Carús Guedes, Jerson IV. Título.

Thiarles Brun

PRODUÇÃO DE HERBICIDA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA A PARTIR DO FUNGO *Phoma* sp. EM BIORREATOR

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

Aprovado em 16 de fevereiro de 2016:

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Ana Paula Manera, Dra. (UNIPAMPA)

Adriano Arrué Melo, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

Quero dedicar este trabalho primeiramente a Deus, por iluminar o meu caminho. E agradecer a todas as pessoas que me ajudaram e torceram por mim durante esta etapa da minha vida acadêmica.

Agradeço aos meus pais Elcides José Brun e Simone Teresinha Avrella Brun, por todo o amor e confiança que em mim depositaram e nunca me deixaram faltar nada, sendo que abriram mão de muita coisa para poder me ajudar e incentivar nos estudos, para poder alcançar meus objetivos. Tudo o que tenho e o que sou devo a vocês meus pais amados. Agradeço aos meus irmãos Willian e Reule, pelas brincadeiras, parceria e paciência.

Agradeço a minha namorada Jéssica Emilia Rabuske, pelo amor e apoio incondicional, principalmente na condução dos trabalhos e por me apoiar nos momentos difíceis.

Agradeço ao meu orientador, professor Marcio Antonio Mazutti, pela confiança depositada em mim e pela ótima orientação na condução dos trabalhos do mestrado.

Agradeço a todos os meus familiares, irmãos tios, padrinhos, avôs e avós e primos pelo apoio. E a toda a família da minha namorada, meu sogro e sogra, cunhada, concunhado e afilhados, que são minha família também e me ajudaram muito nessa fase da minha vida.

Agradeço a todos os amigos e colegas, pela ajuda nos trabalhos do laboratório de bioprocessos e pela parceria. Obrigado a todos pela companhia, pelas conversas, risadas e pelo mate de cada dia. E saibam que podem sempre contar comigo para o que der e vier.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Maria ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Agrícola e a todos os professores e funcionários pelo apoio para a condução do trabalho.

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

*“O dinheiro faz homens ricos,
o conhecimento faz homens sábios
e a humildade faz grandes homens!”
(Mahatma Gandhi)*

RESUMO

PRODUÇÃO DE HERBICIDA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA APARTIR DO FUNGO *Phoma* sp. EM BIORREATOR

AUTOR: THARLES BRUN

ORIENTADOR: Dr. MARCIO ANTONIO MAZUTTI

Existem diversos fatores que interferem no potencial produtivo das culturas agrícolas, dentre eles, destaca-se a incidência de plantas daninhas em meio aos cultivos. Entre os métodos de controle disponíveis, predomina o controle químico por ser mais eficiente, porém quando utilizados de maneira incorreta, traz consequências graves aos seres vivos e ao meio ambiente. O uso de metabólitos produzidos por fungos com potencial herbicida, apresenta-se como uma boa alternativa para redução dos impactos causados pelos herbicidas sintéticos ao meio ambiente. Para isso, a otimização de sua produção é indispensável para garantir a viabilidade do processo. O objetivo desse trabalho foi produzir um herbicida por fermentação submersa com efeito sobre as espécies de *Cucumis sativus* var. wisconsin (pepino) e *Sorghum bicolor* (sorgo) e caracterização química dos compostos presentes no meio fermentado, por cromatografia gasosa. O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Bioprocessos e em casa de vegetação da Universidade Federal de Santa Maria. O preparo do pré-inoculo com *Phoma* sp. foi realizado através de cultivo em Shaker sob agitação de 120 rpm e 28°C, durante 5 dias, foram otimizadas as condições de agitação (40, 50 e 60 rpm) e aeração (1, 2 e 3 L.min⁻¹) em biorreator para fermentação submersa, sendo que após cada fermentação de sete dias, era realizada a separação da biomassa do caldo fermentado contendo a fitotoxina. Para a avaliação do potencial herbicida foram realizados alguns bioensaios, como testes em pré-emergência, pós-emergência e em folha destacada com as espécies *Cucumis sativus* var. wisconsin (pepino) e *Sorghum bicolor* (sorgo). Os resultados encontrados nos bioensaios, indicam que os metabólitos produzidos por *Phoma* sp. possuem efeito herbicida sobre as espécies avaliadas. O maior potencial herbicida encontrado em ambos os ensaios realizados, foi no T3 para a espécie *Cucumis sativus* e T4 para *Sorghum bicolor*, sendo que no teste de germinação todos os tratamentos, com exceção da testemunha apresentaram inibição de 100% da germinação de ambas as espécies, já no teste em folhas destacadas, a maioria dos tratamentos provocaram lesões amareladas em *Cucumis sativus* ou lesões necrosadas em folhas de *Sorghum bicolor*. Para o teste em pós-emergência, foram observados uma variação da fitotoxicidade de 25 a 66%, para a espécie de *Cucumis sativus* e de 32 a 58% em *Sorghum bicolor*. Já para a avaliação de altura de plantas, MV e MS, houve pouca diferença entre os tratamentos avaliados, porém estas características foram indispensáveis para a seleção do melhor tratamento. A aplicação dos metabólitos secundários produzidos por fermentação submersa de *Phoma* sp. apresentam ação herbicida em pré-emergência, pós-emergência e em folhas destacadas de *Cucumis sativus* e *Sorghum bicolor*, podendo tornar-se uma alternativa no futuro para o controle de plantas daninhas.

Palavras-Chave: microrganismos; metabólitos secundários; biotecnologia; aplicação.

ABSTRACT
HERBICIDE PRODUCTION IN SUBMERGED FERMENTATION FROM FUNGUS
***Phoma* sp. BIOREACTOR**

AUTHOR: THIAERLES BRUN

ADVISOR: Dr. MARCIO ANTONIO MAZUTTI

There are several factors that affect the productive potential of crops, among them the incidence of weeds. Chemical control is the predominant method used for weed control because it is more efficient, but when used incorrectly, leaves serious consequences to living and the environment. The use of metabolites produced by fungi with potential herbicide is presented as a good alternative to reduce impacts of synthetic herbicides to the environment. For this, the optimization of production is needed to ensure the viability of the process. The objective of this work was to produce a herbicide by submerged fermentation with effect on the species of *Cucumis sativus* var. *visconsin* (cucumber) and *Sorghum bicolor* (sorghum) and to carry out the chemical characterization of the compounds present in the fermentation broth by gas chromatography. This study was conducted in bioprocess laboratory and in a greenhouse at the Federal University of Santa Maria. The preparation of the pre-inoculum with *Phoma* sp. was performed by cultivation on shaker under orbital agitation of 120 rpm and 28°C for 5 days. The variables studied in the submerged stirred tank bioreactor were stirring rate (40, 50, and 60 rpm) and aeration (1, 2 and 3 L.min⁻¹) for 7 days, when biomass was separated and . After every seven days, was performed to separate the biomass and the fermentation broth containing the phytotoxin. To assess the potential herbicidal some the bioassays used to determine the effectiveness of bioherbicide were tests in pre-emergence, post-emergence and in a detached leaves of *Cucumis sativus* var species. *visconsin* (cucumber) and *Sorghum bicolor* (sorghum). The results of the bioassays indicate that metabolites produced by *Phoma* sp. have herbicidal effect on the studied species. The greatest potential herbicide found in both trials was in T3 for the species *Cucumis sativus* and T4 for *Sorghum bicolor*. The bioherbicide showed showed 100% inhibition of germination of both species in the pre-emergence tests. From detached leaves tests was verified yellowish lesions in *Cucumis sativus* and necrotic lesions on leaves of *Sorghum bicolor*. For the post-emergence test, it was observed a variation of the phytotoxicity from 25 to 66% for the species *Cucumis sativus* and from 32 to 58% by *Sorghum bicolor*. The evaluation of plant height, green dry and matter mass there was little difference among the treatments, but it was essential for selecting the best treatment. The application of secondary metabolites produced by submerged fermentation of *Phoma* sp. present action herbicide pre-emergence, post-emergence and detached leaves of *Cucumis sativus* and *Sorghum bicolor* and can become alternative in the future for weed control.

Keywords: microorganisms, secondary metabolites, biotechnology, application.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Matriz experimental de um Delineamento Composto Central 2 ² com três repetições no ponto central, para avaliar o potencial herbicida dos fermentados produzidos.....	27
Tabela 2 - Porcentagem de inibição da germinação na primeira e segunda contagem de <i>Cucumis sativus</i> e <i>Sorghum bicolor</i> para cada tratamento do DCC.....	33
Tabela 4 - Matriz experimental do Delineamento Composto Central 2 ² com três repetições no ponto central, para avaliar a fitotoxicidade provocadas em <i>Cucumis sativus</i> e <i>Sorghum bicolor</i> aos 7 DAA.	40
Tabela 5 - Avaliação da altura de plantas de <i>Cucumis sativus</i> e <i>Sorghum bicolor</i> , avaliadas durante sete dias após a aplicação dos tratamentos.	43
Tabela 6 - Caracterização química dos compostos presentes no tratamento com maior efeito herbicida (T3) sobre o de <i>Cucumis sativus</i> por CG.....	46
Tabela 7 - Caracterização química dos compostos presentes no tratamento com maior efeito herbicida (T4) sobre o de <i>Sorghum bicolor</i> por CG.....	46

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Placa de <i>Phoma</i> sp.	19
Figura 2 - Fluxograma para o preparo do inóculo	25
Figura 3 - Biorreator Tecnal	26
Figura 4 - Visão geral do biorreator e outros equipamentos	27
Figura 5 - Teste de germinação realizado em caixas gerbox em espécies de <i>S. bicolor</i> (A) e <i>C. sativus</i> (B).....	29
Figura 6 - Teste em folha destacada realizada com a aplicação de 1 microlitro dos tratamentos, com pipeta automática (A), em folhas de <i>C. sativus</i> (B) e <i>S. bicolor</i> (C).....	30
Figura 7 - Estufa climatizada (A), disposição dos tratamentos em casa de vegetação (B) e aplicação dos tratamentos com borrifador (B).	31
Figura 8 - Extração Líquido-líquido com diferentes solventes orgânicos, onde (A) agitador magnético, balão de fundo redondo, condensador e banho termostático; (B) Tubo de ensaio para separação das frações.....	31
Figura 9 – Inibição da germinação de <i>C. sativus</i> , 10 dias após a aplicação dos tratamentos...	35
Figura 10 – Inibição da germinação de <i>Sorghum bicolor</i> , 10 dias após a aplicação dos tratamentos.	36
Figura 11 - Imagens dos efeitos da aplicação dos tratamentos em folhas destacadas de <i>Cucumis sativus</i> após 72 horas em BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas luz/escuro.	37
Figura 12 - Imagens dos efeitos da aplicação dos tratamentos em folhas destacadas de <i>Sorghum bicolor</i> após 72 horas em BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas luz/escuro.	38
Figura 13 - Imagens das lesões causadas pela aplicação em pós-emergência na cultura de <i>Cucumis sativus</i> 4 dias após a aplicação dos tratamentos.	41
Figura 14 - Imagens das lesões causadas pela aplicação em pós-emergência na cultura de <i>Sorghum bicolor</i> , 4 dias após a aplicação dos tratamentos.	42
Figura 15 - Gráfico da altura de plantas de <i>Cucumis sativus</i> e <i>Sorghum bicolor</i> , avaliadas durante sete dias após a aplicação dos tratamentos.	44
Figura 16 - Massa verde e massa seca da parte aérea e radicular de <i>Cucumis sativus</i> e <i>Sorghum bicolor</i> , nos diferentes tratamentos.	45

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	OBJETIVOS.....	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1	PLANTAS DANINHAS.....	16
3.2	CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS	16
3.3	CONTROLE BIOLÓGICO	17
3.4	METABÓLITOS PRODUZIDOS POR FUNGOS	18
3.5	<i>Phoma</i> sp.....	19
3.6	FERMENTAÇÃO SUBMERSA	20
3.7	BIORREADORES	21
3.8	BIOENSAIOS.....	21
3.9	CROMATOGRAFIA.....	22
4.	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	Localização	24
4.2	Obtenção e manutenção da cepa.....	24
4.3	Pré-inÓculo	24
4.4	Substratos.....	25
4.5	Biorreator	25
4.6	Condições de cultivo em biorreator	26
4.7	Delineamento experimental	27
4.8	Bioensaios de atividade herbicida.....	27
4.8.1	Pré-emergência.....	28
4.8.2	Folha destacada	29
4.8.3	Pós-emergência	30
4.9	Extração com solventes	31
4.10	Cromatografia	32
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1	Pré-emergência	33
5.2	Folha destacada.....	36
5.3	Pós-emergência.....	39

5.4	Caracterização química.....	45
6.	CONCLUSÃO	49
	Sugestões para trabalhos futuros	50
	REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

Existem diversos fatores que interferem no potencial produtivo das culturas agrícolas, dentre eles, destaca-se a incidência de plantas daninhas em meio aos cultivos. As plantas daninhas possuem alta capacidade de competir com plantas cultivadas por espaço, água, luz, nutrientes, energia térmica e dióxido de carbono, podendo causar perdas na qualidade e na produtividade das culturas (BARTON, 2004), (BOYETCHOKO, et al., 2002), (PENARIOL, 2008), (QIANG, 2001).

Como alternativas de controle, predomina o uso de herbicidas sintéticos, sendo este muito eficiente, porém quando ele é utilizado de maneira incorreta, pode causar riscos a saúde e ao meio ambiente. Com o aumento da procura e preferência das pessoas por alimentos mais seguros, surge a demanda de um manejo mais sustentável da agricultura. Desta forma o desenvolvimento de herbicidas não-poluentes, seguros e ambientalmente corretos, tornou-se indispensável (YANG et al., 2014).

O controle biológico de plantas daninhas pode ser considerado um método alternativo ao uso de herbicidas químicos, principalmente devido a biodiversidade de microrganismos presentes no meio ambiente, causando baixo impacto ambiental e menores riscos aos animais e seres humanos, pois degradam-se facilmente no ambiente. Para tal, é necessário que se faça o cultivo e inoculação do agente com potencial herbicida nas plantas. Entretanto muitos bioherbicidas microbianos requerem água ou um período de orvalho para que ocorra a infecção no hospedeiro, sendo que várias formulações e ingredientes são utilizados em tentativas para substituir esses requisitos (CHARUDATHAN, 2005; GLOSHEH, 2005; HALLETT, 2005; WEIDMAN et al., 1995).

Entre os produtos biológicos utilizados para a produção de herbicidas, destaca-se a aplicação direta de microrganismos (fungos, bactérias) ou de seu metabólito produzido por processos fermentativos. A aplicação direta consiste da formulação e aplicação de esporos ou propágulos de microrganismos, os quais irão colonizar os tecidos foliares, liberando toxinas e causando efeitos danosos as plantas alvos. Já os metabólitos secundários, também chamados de fitotoxinas, são produzidos por meio de processos fermentativos, podendo ter efeito fitotóxico sobre algumas espécies de plantas (ALMEIDA, 2014).

Existem vários compostos encontrados na natureza, que quando sintetizados podem contribuir significativamente no desenvolvimento de produtos naturais para uso no meio agrícola. A maioria das plantas e fungos possuem a habilidade de biossintetizar uma diversidade de compostos, estes sendo mais conhecidos como metabólitos secundários

(SIDDIQUE, 2012). Geralmente os metabólitos secundários dos fungos, são observados na classe dos polipeptídeos, terpenóides e peptídeos (FOX; HOWLETT, 2008). A classe dos polipeptídeos de origem fúngica é considerada a mais importante no estudo de metabólitos secundários, além de possuir uma das maiores diversidades estruturais, principalmente nos produtos de origem animal (SCHÜMANN; HERTWECK, 2006).

Trabalhos mostraram que, ao isolar uma toxina de *Botrytis cinerea* a uma concentração de 100 mg L⁻¹, houve a inibição no crescimento de algumas espécies de plantas daninhas como *Digitaria sanguinalis* L. e *Amaranthus retroflexus*, como também foi capaz de inibir completamente a germinação de sementes de *D. sanguinalis* L. e *Amaranthus retroflexus* L. na concentração de 50 mg.L⁻¹. Deste modo, pode-se dizer então, que a atividade herbicida de estirpes de bactérias e isolados de fungos, está diretamente relacionada com a concentração da toxina presente em seu extrato bruto (ZHANG, et al, 2006).

A produção de metabólitos utilizando fungos do gênero *Phoma*, com potencial herbicida, vem ganhando destaque no mundo todo. O setor farmacêutico e o controle biológico de plantas daninhas são os principais responsáveis pelo aumento dos estudos para a produção de metabólitos secundários através de fungos, principalmente os do gênero *Phoma*, estes podem produzir uma diversidade de metabólitos secundários importantes que inclui fitotoxinas, antimicrobianos e alguns microherbicidas (RAI et al., 2009).

Desta forma, o isolamento de patógenos de plantas, bem como o estudo dos agentes de controle e produção de metabólitos secundários são os principais caminhos para desenvolvimento de herbicidas de origem microbiana (YANG, et al., 2014). Porém o desenvolvimento de produtos de origem biológica para comercialização, requer a otimização de sua produção. Os processos fermentativos são de grande importância para o estudo dos parâmetros que interferem no crescimento microbiano, como o pH, temperatura, oxigênio e meio de cultivo, visando a máxima produção e o menor custo possível do processo de produção de metabólitos.

A capacidade de produção de metabólitos secundários sofre influência direta do tipo de fermentação e das condições de cultivo, como o tempo de fermentação, temperatura e agitação (VAREJÃO et al., 2013). A fermentação submersa é considerada por muitos pesquisadores, um método ideal para a produção de bioprodutos de origem fúngica (ASH, 2010; CHENG et al., 2003, GIBBS et al., 2000). A fermentação submersa caracteriza-se pela presença de nutrientes dissolvidos no meio líquido, tendo o maior número de ferramentas para o controle do processo, como temperatura, pH, aeração e agitação do meio de cultura, garantindo assim, maior homogeneidade do processo de produção dos metabólitos

secundários (SINHA; SINHA, 2009). A biossíntese de fitotoxinas sofre influência de vários fatores inerentes a produção, assim recomenda-se o cultivo inicial do fungo em diferentes meios de cultura e sob diferentes condições de crescimento (VAREJÃO et al., 2013).

Os bioensaios são realizados para avaliar a atividade herbicida de bioprodutos, entretanto estes precisam ser simples, baratos, de fácil execução (HOAGLAND E WILLIAMS, 2003). Geralmente, as concentrações de fitotoxinas de fungos em meios de cultura são baixas, por isso o bioensaio deve ser suficientemente sensível para detectar a atividade das fitotoxinas, mesmo quando a fitotoxina está diluída nos filtrados de cultura (VAREJÃO, 2013). Por isso, a etapa de identificação e isolamento das moléculas por cromatografia é indispensável para garantir a eficácia dos bioprodutos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse trabalho foi a produção de um herbicida por fermentação submersa, fracionamento do herbicida com diferentes solventes e caracterização química dos compostos presentes neste por cromatografia gasosa (CG).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Definir as melhores condições de fermentação (agitação e aeração), para a produção de metabólitos de *Phoma* sp. com efeito herbicida.
- ✓ Avaliar o efeito dos metabólitos produzidos sobre a pré-emergência de *Cucumis sativus* var. visconsin (pepino) e *Sorghum bicolor* (sorgo).
- ✓ Avaliar o efeito dos metabólitos produzidos sobre folhas destacadas de *Cucumis sativus* var. visconsin (pepino) e *Sorghum bicolor* (sorgo).
- ✓ Avaliar o efeito dos metabólitos produzidos em pós-emergência *Cucumis sativus* var. visconsin (pepino) e *Sorghum bicolor* (sorgo).
- ✓ Caracterização química dos compostos presentes no meio fermentado, por cromatografia gasosa.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PLANTAS DANINHAS

Muitas plantas cultivadas, também podem ser consideradas plantas daninhas, quando crescem de forma espontânea e interferem no crescimento da cultura de interesse, podendo ser denominada de planta voluntária, já uma planta que cresce espontaneamente em meio a uma cultura de interesse e que apresenta características especiais que permitam sua sobrevivência no ambiente é denominada de planta daninha verdadeira (SILVA et al., 2007). O milho ou o trigo, em uma lavoura de soja, são plantas daninhas, denominadas comuns. Já a guanxuma, a trapoeraba ou outras espécies quaisquer são chamadas de plantas daninhas verdadeiras (ALMEIDA, 2014).

As plantas daninhas, geralmente causam impactos negativos em algumas atividades humanas, tanto na área agrícola, florestal, pecuária, ornamental, náutica, produção de energia, etc. A incidência de plantas daninhas em áreas cultivadas causa a redução da produtividade, devido a interferência negativa causada no desenvolvimento da cultura de interesse. As perdas variam conforme a espécie cultivada e podem, inclusive, inviabilizar a colheita (FONTES et al., 2003). O nível de incidência pode variar conforme o tipo de vegetação infestante (espécie, densidade e distribuição), da cultura (cultivar, espaçamento e densidade), do ambiente (solo, clima e manejo) e do tempo de convivência da planta daninha com as plantas cultivadas (DUARTE et al., 2002).

Estudos relatam que, as plantas daninhas podem reduzir em média até 34% a produtividade das culturas (OERKE, 2006). As plantas daninhas podem causar reduções médias de produtividade em algumas culturas de grande interesse agrícola: trigo 23%, soja 37%, 37% do arroz, milho 40%, algodão 36% e batata 30% (OERKE, 2006).

3.2 CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS

Desde o início da agricultura a capina manual, a mecânica e as aplicações de herbicidas, têm sido as mais utilizadas como métodos de controle de plantas daninhas (GRIEPENTROGE; DEDOUSIS, 2010; BERGIN, 2011; RUEDA-AYALA et al., 2011; CHAUVEL et al., 2012). Apesar da contribuição desses métodos de controle para o aumento da produtividade das culturas, o controle de plantas daninhas na agricultura ainda apresenta alguns desafios. Na capina manual, o principal desafio está na redução da disponibilidade de

mão-de-obra, aumento dos custos de trabalho, além da baixa eficiência no controle (CARBALLIDO et al., 2013; GIANESSI, 2013; JABRAN et al., 2015). Já o controle mecânico de plantas daninhas, requer o revolvimento do solo, danificando a estrutura e reduzindo a fertilidade do mesmo (SMITH et al., 2011; JABRAN et al., 2015).

Amplamente utilizados na agricultura, os herbicidas químicos possuem papel importante na economia mundial. Estudos relatam que nos próximos anos a demanda global por produtos de origem agrícola deve dobrar, aumentando ainda mais a pressão para a produção de alimentos, principalmente devido ao aumento da população mundial (FAO, 2050). Tal aumento, deve ocorrer mais intensamente em países em desenvolvimento e conseqüentemente os mais ricos em biodiversidade do planeta (BAUDRON; GILLER, 2014).

O uso sucessivo e indiscriminado dos herbicidas químicos aumenta o número de espécies de plantas daninhas resistentes a determinados herbicidas (ANNETT et al., 2014; HOPPIN, 2014; POWLES, 2008; STARLING et al., 2014). Além disso, o manejo de plantas daninhas com herbicidas químicos causa impactos ao meio ambiente e danos a saúde humana e animal. A maioria dos problemas com o manejo de plantas daninhas, citados acima, podem ser minimizados com o estudo e criação de uma diversidade de práticas para o controle alternativo de plantas daninhas (JABRAN et al., 2015).

3.3 CONTROLE BIOLÓGICO

O controle biológico de plantas daninhas é explorado em todo o mundo, sendo a estratégia inundativa, a mais utilizada para a aplicação de microrganismos em áreas de cultivo, utilizando níveis elevados de inóculo para que haja efeito sobre a população de plantas daninhas (CHARUDATTAN, 1988, DANIEL et al., 1973, TEMPLETON et al., 1979) não dependendo do agente de controle ser auto sustentável (HINTZ et al., 2001). Como as doses aplicadas são altas, é de interesse dos pesquisadores o estudo da toxicidade dos destes agentes de biocontrole (COOK et al., 1996, HINTZ; SHAMOUR, 1996; HINTZ et al., 2001, TE BEEST et al., 1992, TENG; YANG, 1993, WAPSHERE, 1974).

O fungo *Myrothecium verucaria*, isolado de *Cassia obtusifolia*, mostrou-se bastante virulento para as plantas e com potencial para a utilização como bioherbicida (WALKER; TILLEY, 1997). Outros trabalhos relataram a eficiência contra espécies de *Ipomea* spp. (HOAGLAND et al., 2011), *Euphorbia esula*, (YANG; JONG, 1995) *Brumichia ovata* e *Capsis radicans* (BOYETTE et al., 2006) *Pueraria lovata* (BOYETTE et al., 2002).

Alguns autores ainda relatam que, um agente de controle biológico quando aplicado no campo, possui movimento limitado no solo, pois os microrganismos estão sujeitos a adversidades ambientais (BAILEY; DERBY, 2001).

Muitos trabalhos de pesquisa foram conduzidos sobre herbicidas de origem fúngica, no entanto sua aplicação em grande escala apresenta limitações, como requisitos estritamente ambientais, baixo rendimento de produção, dificuldade no desenvolvimento da formulação, além dos requisitos rigorosos para o armazenamento (YANG et al., 2014).

3.4 METABÓLITOS PRODUZIDOS POR FUNGOS

Os metabólitos secundários são conhecidos por possuírem a estrutura das moléculas heterogênea e de baixo peso molecular. Os microrganismos podem produzir uma elevada gama de metabólitos secundários, principalmente os fungos e bactérias que habitam o solo, dada a complexidade dos ecossistemas que estes microrganismos interagem e competem com outros organismos. É provável que a evolução dos metabólitos secundários se deu a milhões de anos, quando os microrganismos utilizavam estes como sinais químicos para se comunicarem, defender seu habitat ou inibir o crescimento de competidores, sendo que, a maioria desses compostos são denominados de produtos naturais (BRAKHAGE, 2013).

A diversidade de sítios de ação dos metabólitos secundários dificulta a escolha de métodos padrões, para estabelecer o modo de ação dos compostos encontrados na natureza (ALMEIDA, 2014). Um dos métodos descritos por Duke et al., (1997), consiste em selecionar um composto específico e testá-lo em todos os sítios-alvos conhecidos para herbicidas, sendo que existem para herbicidas, em torno de 30 sítios-alvos identificados para toxinas.

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

Os metabólitos secundários produzidos por fungos, quando utilizados em mistura com herbicidas químicos, podem exercer um efeito sinérgico no controle de plantas daninhas, além de reduzir a dose do produto sintético (HOAGLAND, 1990). Alguns estudos foram realizados, com relação a mistura de bioherbicidas por meio da aplicação inundativa de

esporos de fitopatógenos (HOAGLAND, 1996). Desta forma, o isolamento de patógenos de plantas, bem como o estudo dos agentes de controle e produção de metabólitos secundários são os principais caminhos para desenvolvimento de herbicidas de origem microbiana. (YANG et al., 2014).

3.5 *Phoma* sp.

Figura 1 - Placa de *Phoma* sp.



Fonte: o autor

Diversas espécies do fungo do gênero *Phoma* sp. são consideradas como candidatos para o controle biológico de algumas espécies de ervas daninhas no Canadá, como cardo (GUSKE, et al., 2004), e dente de leão (STEWART-WADE, et al., 2002). Trabalhos mostram que, o uso do fungo do gênero *Phoma* sp. como agente herbicida, tem mostrado bons resultados quando aplicados em algumas plantas daninhas (BAILEY et al., 2011; GRAUPNER et al., 2006).

Geralmente a forma de controle é através do micélio de *Phoma macrostoma*, aplicados em grânulos para o controle de plantas daninhas em gramados. Bailey et al. (2011) observaram que o fungo da espécie *P. macrostoma* foi eficiente para o controle de 38 espécies de 12 famílias, entretanto 57 espécies de 25 famílias foram consideradas resistentes a esse

patógeno. Dessa forma, é observado que este bioherbicida pode apresentar um comportamento seletivo entre as diferentes espécies de plantas daninhas (HALLETT, 2005).

Existem varias espécies que produzem metabólitos fitotóxicos, como: *Phoma lairdenone*, *P. lingam*; nonenolides produzidos por *P. herbarum*; epoxydonesters a partir de um *Phoma* sp. não identificada e putaminoxin a partir de *P. putaminum*. A espécie *Phoma macrostoma montagne* é capaz de provocar clorose em plantas, além de manchas foliares, necrose e podridão negra das folhas de alcachofra. A espécie *Phoma macrostoma* é capaz de produzir fitotoxinas, conhecidas como macrocidinas, que são moléculas com potencial para serem sintetizadas para a formulação de herbicidas (SCHOBERT; BARNICKEL, 2010).

Alguns trabalhos relatam os efeitos causados por algumas espécies do gênero *Phoma*. Ao aplicar um filtrado de cultura de *Phoma herbarum*, livre de células, foi observada uma fitotoxicidade alta sobre *Lantana camara*, causando clorose, deformações e colapso das folhas, após 48 horas de tratamento (PANDEY, 2002).

Foram encontrados dez isolados de *Phoma macrostoma*, com efeito bioherbicida sobre plantas daninhas. A aplicação destes isolados resultou em clorose e morte de várias espécies de ervas daninhas de folha larga, não tendo efeito sobre monocotiledôneas (BAILEY; DERBY, 2001). Porém o mesmo não foi observado por Graupner et al., (2003, 2006), quando houve ação do fungo da espécie *Phoma macrostoma* sobre plantas monocotiledôneas.

3.6 FERMENTAÇÃO SUBMERSA

A fermentação em meio líquido, é um dos processos mais utilizados na produção comercial e industrial de bioprodutos de origem microbiana (GIBBS et al., 2000), pois representa grande parte das pesquisas, sobre instrumentações e controle do processo, isto torna esta mais acessível do que a fermentação semi sólida, além de apresentar maior facilidade no monitoramento do processo (FUGLSANG, 2002).

A fermentação submersa é considerada por muitos pesquisadores, o melhor método para a produção de bioprodutos de origem fúngica. Estes fungos caracterizam-se por produzir conídios ou outras formas de propágulos em cultura líquida, podendo ser formulados e aplicados como bioherbicidas (ASH, 2010; CHENG et al., 2003; GIBBS et al., 2000).

Dessa forma, são otimizadas as condições de crescimento fúngico conforme a maior fitotoxicidade desse extrato fermentado, para posterior isolamento dos compostos fitotóxicos (PEDRAS; AHIAHONU, 2004; BERESTETSKIY et al., 2010).

3.7 BIORREATORES

Para que um processo de produção microbiana tenha sucesso e possa ser produzido industrialmente, este precisa passar por algumas fases importantes que vão desde a produção em pequena escala até a produção em nível industrial. O uso de biorreatores para fermentação submersa, são uma grande ferramenta para a otimização das condições de crescimento microbiano em escala laboratorial.

Para a escolha do tipo de biorreator, é importante considerar as variáveis que interferem no crescimento microbiano, tais como, a transferência de oxigênio, menor atrito entre as células, capacidade de fornecimento de nutrientes para as células e remoção do subproduto a partir delas (ALMEIDA, 2014). Quando realiza-se fermentação com fungos, o tipo de biorreator escolhido tem grande influência no crescimento fúngico. Estudos desenvolvidos por Klaic (2014), demonstram que, os fungos precisam de uma agitação mais branda em comparação com bactérias, sendo que as altas taxas de agitação causam um aumento do atrito entre as células no biorreator prejudicando o crescimento do micélio e comprometendo a produção de fitotoxinas.

Os estudos para a produção de herbicidas de origem biológica, utilizando biorreatores do tipo STR ainda são escassos, alguns deles tiveram o objetivo de otimizar as condições do processo, tais como agitação, aeração, temperatura, pH e tempo de fermentação (VURRO et al., 2012; BOYETTE et al., 2008, MENDIZÁBAL et al., 2012), além disso, alguns pesquisadores ainda utilizaram resíduos da agroindustriais como meio de fermentação para reduzir os custos operacionais (BOYETTE et al., 2008) ou otimizar meios de cultivo sintéticos (VURRO et al., 2012). Estas variáveis são de grande importância para maximizar a produção e reduzir os custos e obter um processo viável.

3.8 BIOENSAIOS

Para a seleção da melhor condição de produção de herbicidas por fermentação, recomenda-se a realização de vários ensaios biológicos, através do uso de folhas, sementes e mudas de plantas de diferentes espécies, selecionando a mais sensível para orientar nos procedimentos de fracionamento (VAREJÃO et al., 2013).

Os ensaios de germinação de sementes e crescimento radicular são muito utilizados em pesquisas envolvendo controle de plantas por metabólitos secundários (PES, 2015). As sementes podem ser depositadas em placas de Petri, sendo que o papel filtro deve ser

umedecido com a solução teste do processo fermentativo. As placas de Petri são mantidas em câmaras de germinação em condições de temperatura e luz controladas por determinado período de tempo (JAVAID; ALI, 2011).

Nos bioensaios com plântulas, são realizadas aplicações na parte aérea das plantas. As avaliações são realizadas em períodos de tempo distintos, considerando as variáveis como, controle de plantas, comprimento de parte aérea, comprimento de raiz e massa seca da parte aérea (JAVAID; ALI, 2011, JAVAID et al., 2011).

Os testes em folhas destacadas são mais recomendados para o fracionamento dos compostos fitotóxicos, pois demandam baixo volume. Dentre eles, está o teste de punctura, onde é depositado um pequeno volume da solução teste, sobre punções produzidas na superfície das folhas (face adaxial ou abaxial) e monitorando o desenvolvimento de lesões ao longo do tempo. Os furos são feitos utilizando uma agulha, lâmina de bisturi ou capilar de vidro. Após o cultivo de plantas as folhas destacadas ou discos de folhas são colocadas em placas de Petri contendo ágar ou papel de filtro umedecido com água destilada. A partir daí estas são acondicionadas em uma câmara com controle de temperatura e iluminação e monitorados até o aparecimento de lesões, como necrose, clorose ou amarelecimento (VAREJÃO et al., 2013).

3.9 CROMATOGRAFIA

Para a caracterização química das moléculas presentes no meio fermentado por meio da cromatografia, torna-se necessário realizar algumas etapas anteriores. A extração líquido-líquido é uma alternativa importante, pois não requer grandes quantidades de energia ou equipamento especial quando o solvente não é volátil, o que facilita a recuperação do solvente. Desta forma a separação de misturas complexas, pode ser realizada de modo a causar o mínimo de danos possíveis ao meio ambiente, tais características fazem desse método, um dos mais utilizados em larga escala por mais de uma década (BARNICKI et al., 2006).

O princípio da extração por solventes é que o soluto se distribui entre dois solventes praticamente imiscíveis, por meio do contato entre as fases. A distribuição do soluto depende de sua preferência por um ou outro líquido, que está diretamente relacionado com sua solubilidade em cada um deles (HACKBART, 2007).

Diferentes técnicas cromatográficas podem ser usadas em todo o processo de fracionamento e purificação, dependendo da natureza química e a quantidade de amostra a ser

tratada. Estas técnicas incluem a cromatografia preparativa em camada fina (TLC), cromatografia direta e de fase reversa em coluna aberta (CC), cromatografia flash em coluna (FCC), cromatografia em coluna de vácuo (VCL), filtração em gel ou cromatografia de exclusão de tamanho, cromatografia de permuta iónica e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia gasosa (CG) (HARWOOD; MOODY, 1989; SARKER et al., 2006).

O uso intensivo da cromatografia gasosa (CG) e o avanço do desenvolvimento tecnológico resultaram numa poderosa técnica de separação que possibilita a detecção de compostos. Como técnica analítica ela depende da qualidade da etapa de preparo da amostra, pois quase nenhuma matriz pode ser diretamente injetada num cromatógrafo gasoso. A CG possui inúmeras vantagens, dentre elas, elevada resolução, alta eficiência na introdução de amostra, baixo ruído de fundo devido à elevada pureza do gás inerte empregado como fase móvel (FM) e possibilidade de emprego de padrão interno (BISINOTI, 2004).

A espectrometria de massas (MS) utiliza o movimento de íons em campos elétricos e magnéticos para classificá-los de acordo com sua relação massa-carga. Desta maneira, a espectrometria de massas é uma técnica analítica por meio da qual as substâncias químicas se identificam, separando os íons gasosos em campos elétricos e magnéticos. O dispositivo que realiza esta operação e utiliza meios elétricos para detectar os íons classificados é conhecido como espectrômetro de massas (BONATO, 1995).

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS) destaca-se como uma possibilidade valiosa. A viabilização da técnica CG-MS depende significativamente da qualidade da etapa de preparo da amostra, e quase nunca se deve analisar matrizes na forma bruta, pois elas possuem interferentes em quantidades incompatíveis com as colunas cromatográficas e detectores, além de mascarar os reais valores a serem obtidos (VALENTE; AUGUSTO, 2000).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCALIZAÇÃO

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Bioprocessos e em casa de vegetação da Universidade Federal de Santa Maria. Neste trabalho foi realizado o aumento de escala para a produção de fitotoxinas com atividade herbicida, por meio de fermentação submersa de *Phoma* sp. em biorreator.

4.2 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DA CEPA

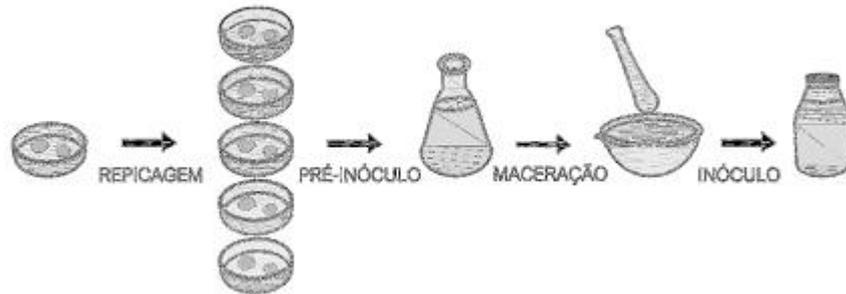
A estirpe de *Phoma* sp. (NRRL Y-7571) foi obtida no *National Center for Agricultural Utilization Research*– EUA (ARS). A cultura foi mantida em batata dextrose ágar (BDA), a 4-6 °C e sub-cultivadas a cada 15 dias.

4.3 PRÉ-INÓCULO

O preparo do pré-inóculo foi realizado a partir de placas sub-cultivadas durante 7 dias em estufa a 28°C. Para o pré-inóculo utilizou-se dois frascos de Erlenmeyers de 250 ml contendo 100 ml de meio de cultivo cada, conforme a composição definida a seguir: 200 g.L⁻¹ de batata, 20 g.L⁻¹ de dextrose, 10 g.L⁻¹ peptona, 7.5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 2.0 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 1.0 g.L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O, 1.0 g.L⁻¹ de MnSO₄.H₂O e 0,5 g.L⁻¹ de MgSO₄ (PARRA et al., 2005, ZHANG et al., 2012, SELBMANN et al., 2002, YU et al., 1998).

Na figura 1, são apresentados um fluxograma para o preparo do inóculo, sendo que o meio de cultivo foi esterilizado em autoclave a 121°C durante 30 min e, após estar em temperatura ambiente, com o auxílio de um tubo de ensaio, adicionou-se dois discos de 2 cm de diâmetro das placas subcultivadas em cada frasco. Todo o manuseio, preparo e inoculação do fungo *Phoma* sp. foi realizado em capela de fluxo laminar e completa assepsia dos materiais utilizados, de modo que eliminasse a interferência externa ou possível contaminação com organismos indesejáveis. O fungo foi cultivado durante 5 dias em shaker, com agitação de 120 rpm e 28°C, em seguida macerados e inoculados no meio de fermentação submersa (biorreator).

Figura 2 - Fluxograma para o preparo do inóculo



Fonte: (ALMEIDA, 2014)

4.4 SUBSTRATOS

O substrato utilizado para compor o meio de fermentação no biorreator foi a água de maceração de milho (AMM), obtida junto a Empresa Corn Products Brasil (Mogi Guaçu, SP, Brasil) e sacarose de qualidade alimentar (Açúcar Cristal), comprado em um mercado local, formando assim um meio de cultivo no estado líquido.

4.5 BIORREATOR

Conforme pode-se observar na Figura 2 foi utilizado um biorreator STR de tanque agitado encamisado da marca Tecnal, com volume de 4,5 litros, altura de 43 cm e largura de 32 cm, conectado a um banho termostático TE-2005, com refrigeração e controlador independente, conectado também a um compressor.

Figura 3 - Biorreator Tecnal



Fonte: O autor

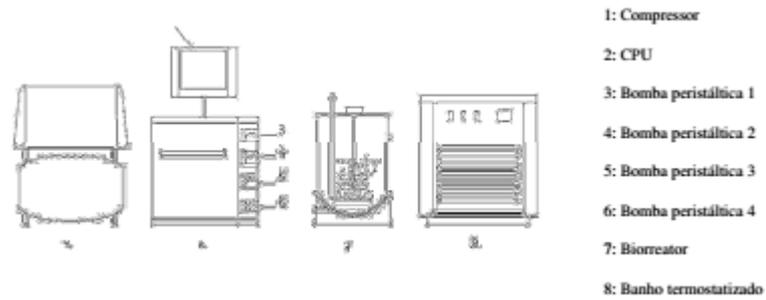
4.6 CONDIÇÕES DE CULTIVO EM BIORREATOR

O meio de cultura foi composto por 10% de AMM e 20 g.L⁻¹ de açúcar, utilizado 250 ml de AMM e 50 g de açúcar. Estas proporções foram descritas por Klaic (2014), assim como o cultivo do fungo em pH inicial de 6,0, tempo de cultivo de 7 dias e temperatura de 28°C. Como variáveis independentes foram avaliadas a aeração (1,0; 2,0 e 3,0 L.min⁻¹) e a agitação (40; 50 e 60 rpm). Para a esterilização do biorreator, o mesmo foi acondicionado em autoclave a 121°C por 45 min.

Logo após a esterilização, todos os acessórios foram conectados, sendo estes as mangueiras de circulação de água, mangueiras de aeração, sensor de temperatura e rotor de agitação. Após atingir a temperatura ajustada, foi colocado o inóculo e um anti-espumante siliconado, sendo o primeiro bombeado manualmente por meio de bombas peristálticas e na presença de espuma era adicionado o anti-espumante.

Após cada fermentação de sete dias, realizou-se a separação da biomassa e do caldo fermentado contendo a fitotoxina. A biomassa foi esterilizada e descartada e o caldo fermentado foi filtrado com o auxílio de um papel filtro, eliminando qualquer forma viva de fungo no caldo fermentado, como esporos e micélios. Estes foram armazenados em refrigerador a 4°C, para posterior avaliação do seu efeito nos bioensaios.

Figura 4 - Visão geral do biorreator e outros equipamentos



Fonte: (ALMEIDA, 2014)

4.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os parâmetros estudados foram avaliados por meio da realização de planejamentos experimentais com de um Delineamento Composto Central 2^2 (DCC), (BOX et al., 2005) com três repetições do ponto central, conforme a Tabela 1. As médias foram comparadas por meio do teste de Scoot-Knott utilizando o software Assistat 7,7 (DEAG-CTRN-UFCG, Campina Grande, PB, Brasil), considerando um nível de significância de 95%.

Tabela 1 - Matriz experimental de um Delineamento Composto Central 2^2 com três repetições no ponto central, para avaliar o potencial herbicida dos fermentados produzidos.

Ensaio	Agitação (rpm)	Aeração (L.Min ⁻¹)
Água destilada	--	--
1	40 (-1)	1 (-1)
2	60 (1)	1 (-1)
3	40 (-1)	3 (1)
4	60 (1)	3 (1)
5	50 (0)	2 (0)
6	50 (0)	2 (0)
7	50 (0)	2 (0)

4.8 BIOENSAIOS DE ATIVIDADE HERBICIDA

Para avaliar o desempenho do herbicida de origem biológica produzido por *Phoma* sp. foram realizados diversos testes, tanto em pré-emergência, pós-emergência e em folha destacada com as espécies de *Cucumis sativus* var. wisconsin (pepino) e *Sorghum bicolor*

(sorgo). Estas, mesmo não sendo plantas daninhas, são utilizadas em testes com herbicidas químicos, pois são sensíveis a estes e são de uso frequente em bioensaios para detecção de resíduos de herbicidas sintéticos no solo (ALMEIDA, 2014). Em cada ensaio, os tratamentos utilizados foram os mesmos do DCC mais uma testemunha.

4.8.1 Pré-emergência

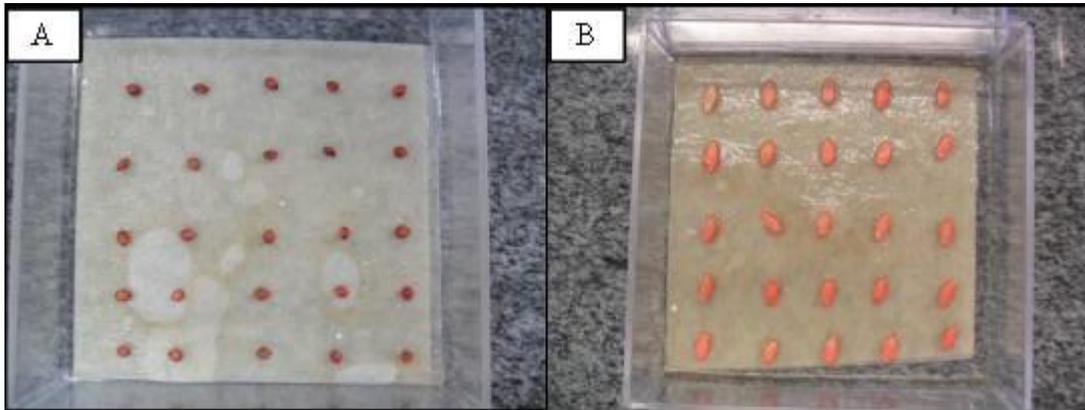
Conforme representados na figura 4, os testes de germinação foram realizados em caixas gerbox previamente desinfetadas com álcool 70% e forradas com duas folhas de papel filtro (Germitest[®]) umedecidas. Para a avaliação do efeito do fermentado, o papel filtro foi umedecido com os tratamentos, com a aplicação de um volume correspondente a 2,5 vezes o peso do papel, de acordo com as Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009).

Logo após, foram semeadas 4 repetições de 25 sementes, totalizando 100 sementes por tratamento e acondicionados em sala climatizada, com temperatura constante (25°C) e fotoperíodo de 12/12 horas de luz/escuro. Para a avaliação em pré-emergência, foi utilizado o Delineamento Composto Central (DCC) com 8 tratamentos e quatro repetições para cada espécie.

Foram realizados testes de germinação, quando contabilizou-se o número de sementes germinadas e o número de sementes que germinaram e tornaram-se plantas normais, posteriormente esses dados foram expressos em percentagem de inibição de germinação ou de plantas anormais (plantas que não tiveram seu crescimento normal). Para ambas as espécies, a primeira avaliação do número de sementes germinadas foi feita aos 4 dias após a instalação do experimento, seguida de uma segunda avaliação aos 7 e 10 dias, para *C. sativus* e *S. bicolor*, respectivamente. Para esse teste, foram contabilizadas como germinadas, as sementes que apresentaram crescimento da radícula superior a 2 mm, segundo descrito na RAS (BRASIL, 2009).

O número de plantas normais foi contabilizado aos 7 dias para pepino e aos 10 dias para o sorgo, segundo a RAS. Considerou-se como plantas normais, aquelas que apresentaram similaridade de crescimento entre a raiz e parte aérea, ou seja, se ocorrer somente o crescimento da raiz ou a parte aérea, a mesma era considerada como anormal (BRASIL, 2009).

Figura 5 - Teste de germinação realizado em caixas gerbox em espécies de *S. bicolor* (A) e *C. sativus* (B).



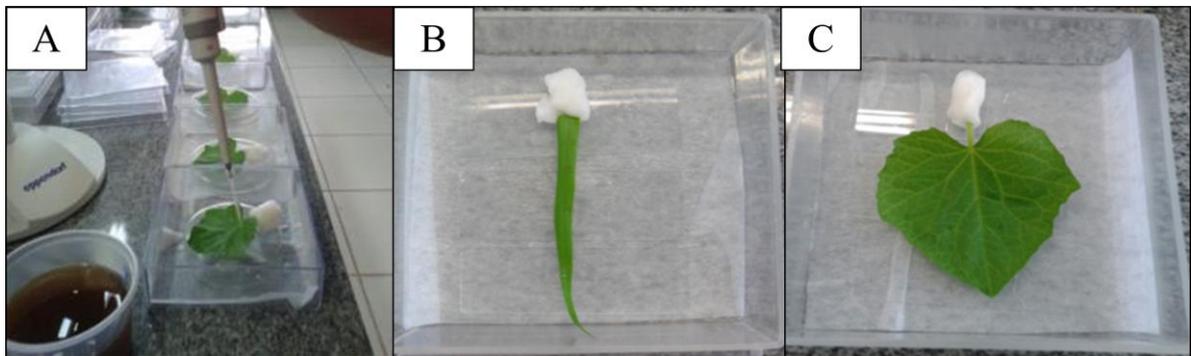
Fonte: O autor

4.8.2 Folha destacada

Conforme observadas na figura 5, para a realização do teste de aplicação em folha destacada, foram coletadas folhas jovens de *C. sativus* e *S. bicolor* e dispostas em caixas gerbox previamente desinfestadas com álcool 70% e forradas com duas folhas de papel filtro umedecidas. Para evitar o ressecamento das folhas, foi colocado um algodão embebido em água destilada no pecíolo dos mesmos. Os ferimentos ou puncturas foram feitos na face adaxial das folhas, com auxílio de agulhas.

Os tratamentos foram aplicados com o auxílio de uma pipeta automática (figura 5A). Foi adicionado 1 microlitro em cada punctura, em três pontos da folha, base, ápice e centro. Os tratamentos foram acondicionados em sala climatizada com temperatura constante (25°C) e fotoperíodo de 12/12 horas de luz/escuro. Varejão et al. (2013) destacam que alguns metabólitos possuem atividade fitotóxica na presença e outros na ausência de luz, por isso os testes foram realizados sob iluminação alternada, evitando perdas na detecção de atividades fitotóxicas influenciada pela luz. A avaliação da eficácia do produto foi feita 72 horas após a aplicação dos tratamentos, nesta foi observada a incidência e intensidade de lesões, conforme a metodologia descrita por EVIDENTE et al. (2008b).

Figura 6 - Teste em folha destacada realizada com a aplicação de 1 microlitro dos tratamentos, com pipeta automática (A), em folhas de *C. sativus* (B) e *S. bicolor* (C).



Fonte: O autor

4.8.3 Pós-emergência

Conforme a figura 6, os testes em pós-emergência foram realizados em casa de vegetação, com ambiente controlado, onde realizou-se o cultivo de sorgo e pepino para posterior aplicação e avaliação dos bioprodutos produzidos.

Nesta avaliação foram considerados os tratamentos do DCC, mais uma testemunha, onde aplicou-se somente água, sendo que em cada tratamento havia 4 repetições, representados por 4 vasos por repetição. As unidades experimentais foram vasos de polietileno com volume de 200 ml, preenchidos com substrato comercial Macplant[®], onde foram semeadas três sementes em cada vaso, de ambas as espécies e logo após a emergência realizou-se o raleio, mantendo somente uma planta por vaso e sendo estas cultivadas durante 7 dias. Para acomodar os vasos com plantas de *C. sativus* e *S. bicolor*, foram utilizadas bandejas grandes, sendo cada uma delas considerada um tratamento, para ambas as espécies (figura 6B).

Após 7 dias de crescimento das plantas, foi realizada a aplicação dos tratamentos. A aplicação via superfície foliar, foi realizada com um borrifador manual, utilizando um volume de 50 ml de caldo fermentado em cada tratamento (figura 6C).

Foram avaliadas 7 variáveis: Fitotoxicidade (%), massa seca parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), massa verde da parte aérea (MVP), massa verde da raiz (MVR) e altura de planta (cm). A fitotoxicidade foi avaliada aos 7 dias após a aplicação (DAA) tanto para *C. sativus* e *S. bicolor*. A avaliação foi realizada por meio dos efeitos visuais estimados, utilizando a escala desenvolvida por Franz e Crowley (1986), por meio de notas de 0 a 100% de fitotoxicidade, conforme os efeitos causados na parte aérea da planta.

Figura 7 - Estufa climatizada (A), disposição dos tratamentos em casa de vegetação (B) e aplicação dos tratamentos com borrifador (B).

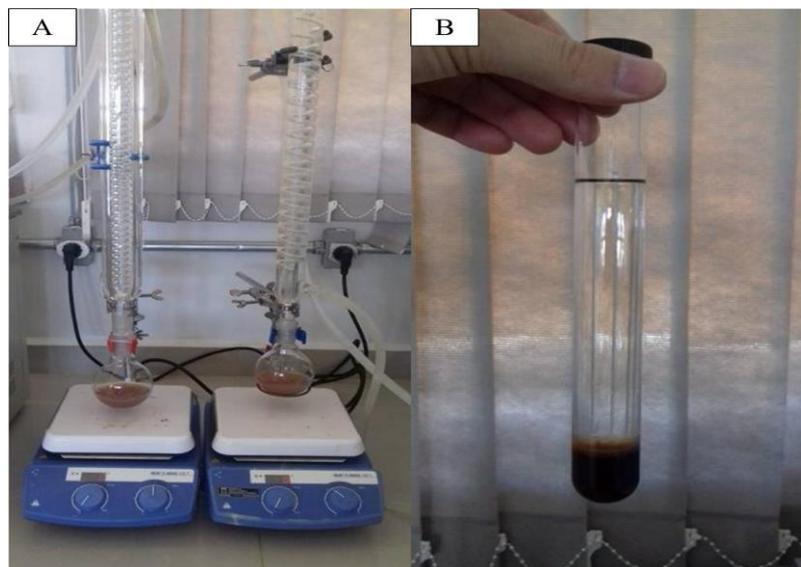


Fonte: O autor

4.9 EXTRAÇÃO COM SOLVENTES

Conforme pode-se observar na figura 7, o caldo fermentado foi submetido a extração líquido-líquido usando solventes orgânicos de diferentes polaridades (metanol, etanol e acetato de etila). Para este processo, foi adicionado 10 ml de caldo fermentado e 50 ml de solvente sendo estes mantidos sob agitação constante durante 24 horas em um balão de fundo redondo, conectado a um condensador com manutenção da temperatura por meio de um banho termostático com recirculação de água a 10°C. A agitação foi realizada com um bastão magnético acionados por agitadores magnéticos.

Figura 8 - Extração Líquido-líquido com diferentes solventes orgânicos, onde (A) agitador magnético, balão de fundo redondo, condensador e banho termostático; (B) Tubo de ensaio para separação das frações.



Fonte: O autor

Após a agitação, iniciou-se o processo de decantação em tubos de ensaio, com duração aproximada de 24 horas, verificando após este período a formação de duas fases límpidas e transparentes com interface definida. Logo, com o auxílio de uma pipeta, foi retirada uma alíquota da fração solvente (fração superior) e este foi armazenado em frascos de 10 ml e refrigerados para posterior identificação e caracterização dos compostos por cromatografia.

4.10 CROMATOGRAFIA

Nos extratos orgânicos brutos obtidos, o metabólito fitotóxico alvo são geralmente misturado com uma variedade de outros compostos orgânicos, ou secretada pelo fungo ou constituintes do meio de cultura. Assim, procedimentos cromatográficos são necessários para fracionar o extrato orgânico, resultando no isolamento dos seus constituintes fitotóxicos.

As análises por cromatografia gasosa foram efetuadas em um cromatógrafo gasoso da Agilent Technologies 6890 acoplado a um espectrômetro de Massas Agilent Technologies 5975 B inert XL EI/CI MSD, com injetor automático Agilent Technologies 7683 B. Coluna J&W Scientific DB5-MS -Temperatura máxima de 325°C - (30 mx0.32 mm, 0.25 µm). Fluxo de gás Hélio 2 mL/min, pressão de 5.05 psi. Temperatura do injetor 250°C; Seringa de 10 µL, com injeção de 1 µL; Temperatura inicial do forno de 60°C por 1min e após aquecimento de 15°C por min até 280°C. Para a fragmentação dos compostos foi utilizado uma energia de 70 eV no espectrômetro de massas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesta seção do trabalho tem o objetivo de mostrar o potencial de *Phoma* sp. em produzir um herbicida por fermentação submersa.

5.1 PRÉ-EMERGÊNCIA

A tabela 2 apresenta os resultados dos testes realizados em pré-emergência, quando foram avaliados a porcentagem de inibição da germinação de *C. sativus* e *S. bicolor*, na primeira e segunda contagem, após serem aplicados os extratos fermentados, conforme o DCC. Todos os tratamentos apresentaram efeito inibitório na germinação de *C. sativus* e *S. bicolor* na primeira e segunda contagem, sendo que na segunda contagem a inibição foi de 100% na germinação em todos os tratamentos do DCC, diferente da testemunha onde não houve inibição da germinação para nenhuma das espécies, conforme dados que podem ser observados nas figuras 8 e 9. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram crescimento da radícula superior a 2 mm, segundo descrito na RAS (BRASIL, 2009).

Tabela 2 – Porcentagem de inibição da germinação na primeira e segunda contagem de *Cucumis sativus* e *Sorghum bicolor* para cada tratamento do DCC.

Ensaio	Agitação (rpm)	Aeração (L.Min ⁻¹)	<i>Cucumis sativus</i>		<i>Sorghum bicolor</i>	
			1º contagem (%)	2º contagem (%)	1º contagem (%)	2º contagem (%)
T0	--	--	0 b*	0 b	0 c	0 b
T1	40 (-1)	1 (-1)	12 a	100 a	55 b	100 a
T2	60 (1)	1 (-1)	24 a	100 a	81 a	100 a
T3	40 (-1)	3 (1)	29 a	100 a	61 b	100 a
T4	60 (1)	3 (1)	40 a	100 a	72 a	100 a
T5	50 (0)	2 (0)	16 a	100 a	51 b	100 a
T6	50 (0)	2 (0)	12 a	100 a	84 a	100 a
T7	50 (0)	2 (0)	26 a	100 a	80 a	100 a

*Médias não seguidas pelas mesmas letras nas colunas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

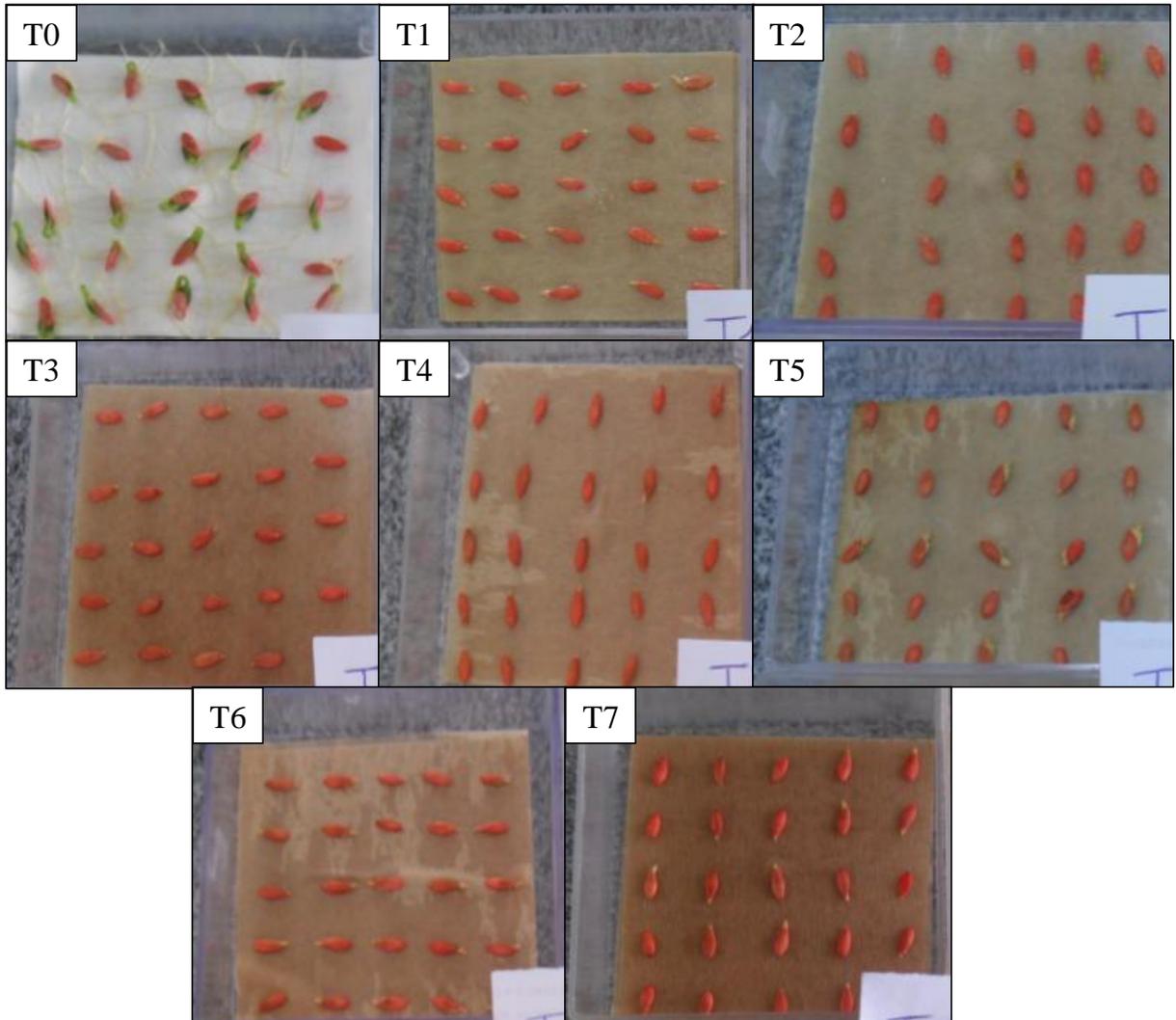
Conforme a tabela 2, na primeira contagem o tratamento que causou maior interferência na germinação do *Cucumis sativus* foi o T4, com 40% de inibição, já para o *Sorghum bicolor* o melhor tratamento foi o T6, apresentando 84% de inibição na primeira contagem de germinação.

Pode-se observar que neste trabalho os metabólitos produzidos por *Phoma* sp. possuem um amplo espectro de ação de herbicida em pré-emergência, pois apresenta efeito sobre plantas do grupo das monocotiledôneas (*Sorghum bicolor*) e dicotiledôneas (*Cucumis sativus*). O mesmo foi observado por Almeida (2014), quando os resultados do efeito inibitório da germinação tanto de monocotiledôneas como de dicotiledôneas, foram semelhantes.

Em estudos realizados por Pes (2015) para a produção de herbicidas com *Diaporthe* sp. foram encontrados resultados de porcentagem de inibição da germinação de 100% nas sementes de *G. max*, *C. sativus*, *T. aestivum*, *O. sativa*, *L. multiflorum* e *S. halepense*, sendo que as sementes foram consideradas não germinadas quando não apresentaram a protusão radicular. Já Bailey et al. (2011) realizaram estudos para produção de um bioherbicida com o fungo *Phoma* sp., evidenciando um efeito maior deste nas sementes de dicotiledôneas do que em monocotiledôneas.

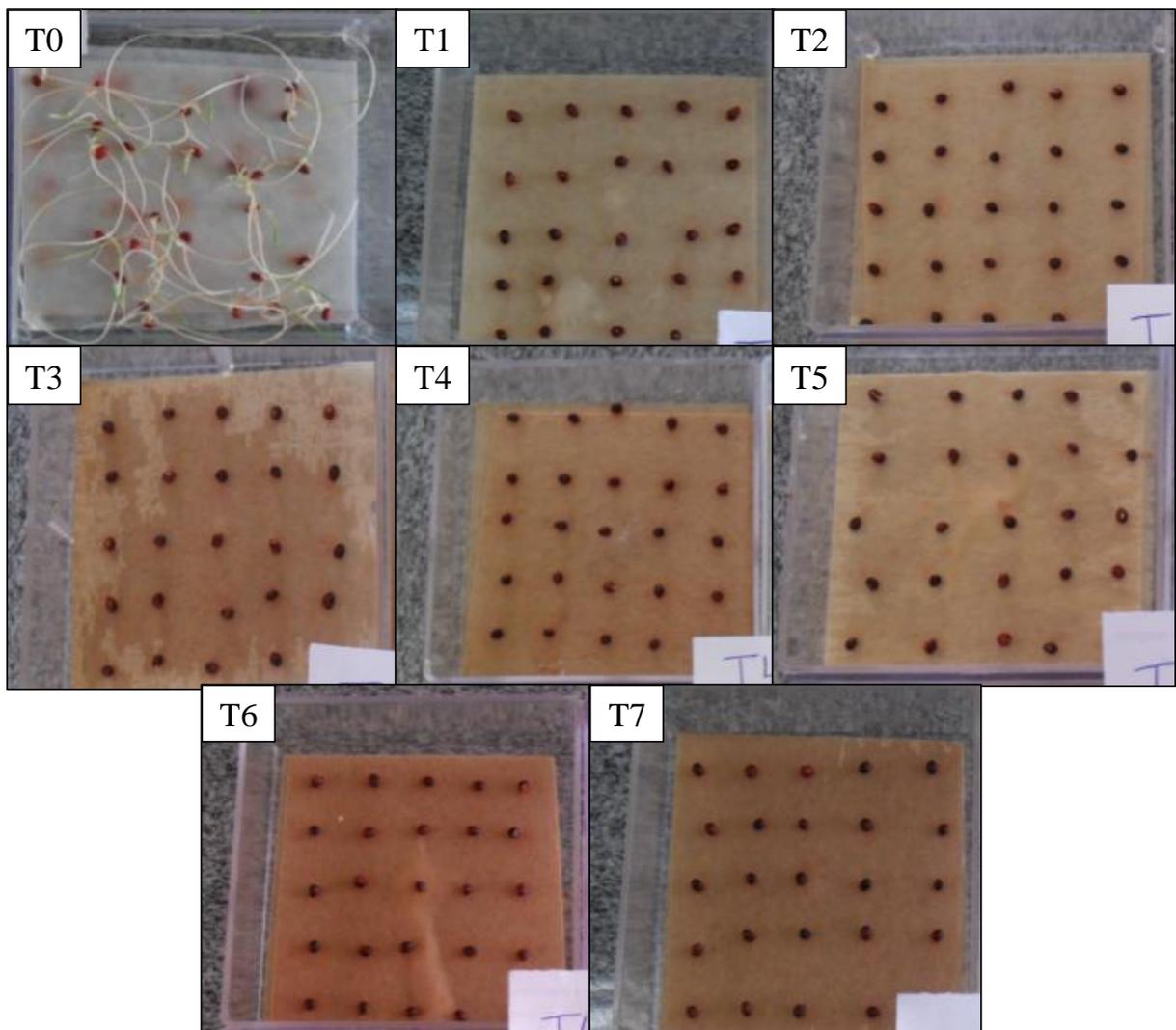
Os resultados apresentados na tabela 2, mostram que as variáveis utilizadas no DCC, não foram significativas para determinar a melhor condição de produção de metabólitos com ação herbicida por fermentação submersa de *Phoma* sp. em biorreator, pois mesmo apresentando inibição da germinação das espécies utilizadas, não houve diferença significativa entre os ensaios realizados. O mesmo foi observado em estudos realizados por Almeida (2014), quando houve inibição na germinação de 100% em sementes de monocotiledôneas e dicotiledôneas, quando submetidas a aplicação de herbicidas de *Phoma* sp. produzidos por fermentação submersa em biorreator.

Figura 9 – Inibição da germinação de *C. sativus*, 10 dias após a aplicação dos tratamentos.



Fonte: O autor

Figura 10 – Inibição da germinação de *Sorghum bicolor*, 10 dias após a aplicação dos tratamentos.



Fonte: O autor

5.2 FOLHA DESTACADA

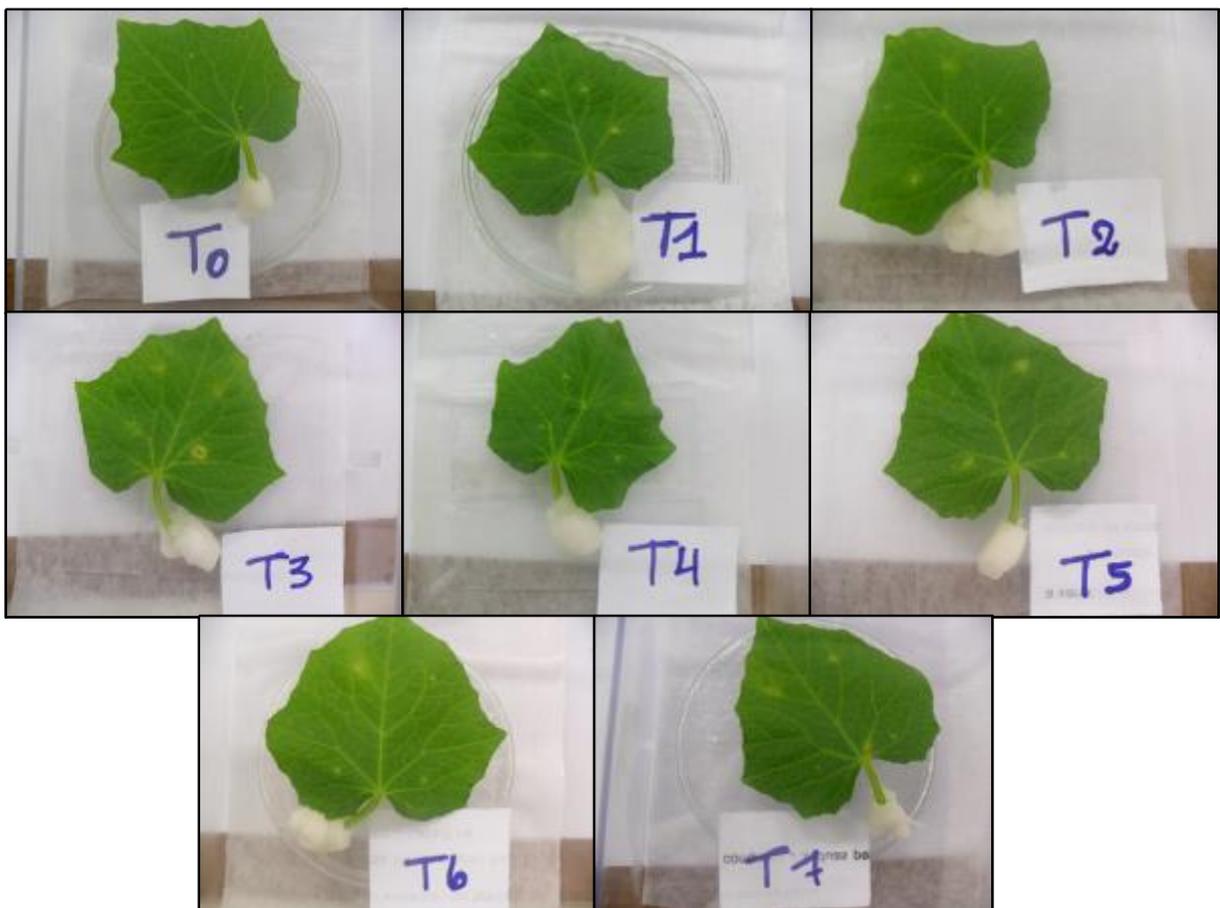
Na tabela 3 estão representados os efeitos causados pelos tratamentos do DCC sobre folhas destacadas de *C. sativus* e *S. bicolor*. Em ambas as espécies foram observados a ocorrência de lesões como leve amarelecimento e leve necrose nas folhas destacadas de *C. sativus* e *S. bicolor*, respectivamente. Estas manchas foram observadas logo no primeiro dia após a avaliação e intensificou-se até a última avaliação, que foi realizada 72 horas após a aplicação dos tratamentos, conforme as figuras 10 e 11.

Tabela 3 – Matriz experimental do Delineamento Composto Central 2² com três repetições no ponto central, para avaliar o efeito inibitório dos metabólitos secundários de *Phoma* sp. sobre folhas destacadas de *C. sativus* e *S. bicolor*.

Tratamentos	Agitação (rpm)	Aeração (L.Min ⁻¹)	Pepino	Sorgo
T0 (Água destilada)	-	-	N*	N
T1	40 (-1)	1 (-1)	-	+
T2	60 (1)	1 (-1)	-	+
T3	40 (-1)	3 (1)	--	+
T4	60 (1)	3 (1)	-	++
T5	50 (0)	2 (0)	-	+
T6	50 (0)	2 (0)	-	+
T7	50 (0)	2 (0)	-	+

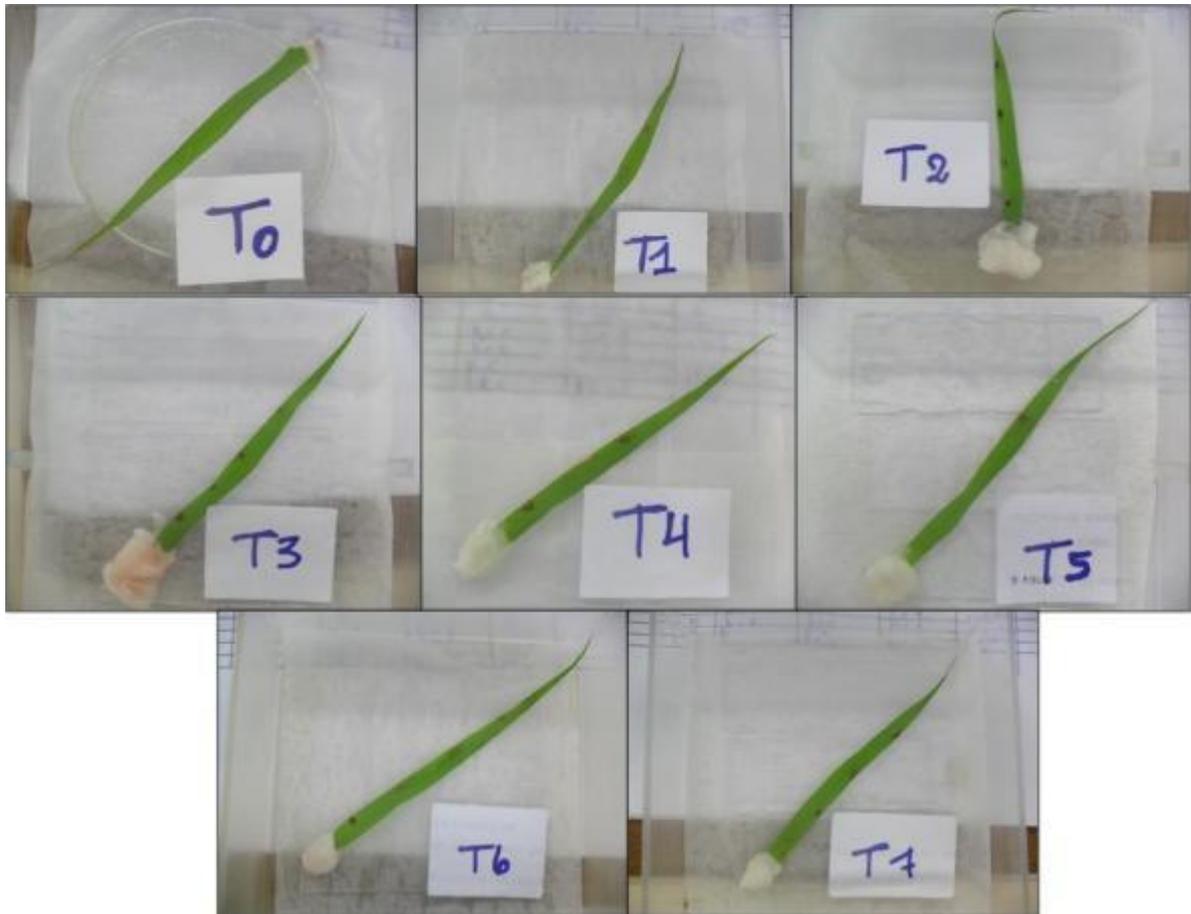
*(N): Sem efeito; (-): Leve amarelecimento; (--): Amarelecimento acentuado; (+): Leve necrose; (++) : Necrose acentuada.

Figura 11 - Imagens dos efeitos da aplicação dos tratamentos em folhas destacadas de *Cucumis sativus* após 72 horas em BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas luz/escuro.



Fonte: O autor

Figura 12 - Imagens dos efeitos da aplicação dos tratamentos em folhas destacadas de *Sorghum bicolor* após 72 horas em BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas luz/escuro.



Fonte: O autor

De acordo com a tabela 3, os danos mais acentuados foram encontrados nos tratamentos T3 para a espécie de *C. sativus* e no T4 para *S. bicolor*, estes apresentaram lesões como amarelecimento acentuado em folhas de *C. sativus* e necrose acentuada em folhas de *S. bicolor*, conforme observadas nas figuras 10 e 11. Pode-se observar que nos tratamentos T3 e T4, os quais causaram lesões em folhas de pepino e sorgo, a melhor condição de aeração para a fermentação, foi de 3 L.min⁻¹, já a condição de agitação que causou o maior efeito inibitório foi de 40 rpm para o *C. sativus* e de 60 rpm para o *S. bicolor*. Para avaliação dos tratamentos os mesmos foram comparados com a testemunha, sendo que nesta não houve danos nas folhas de ambas as espécies. Autores como Vikrant et al. (2006), ao aplicar os filtrados de cultura de *Phoma herbarum* obtidos por fermentação submersa sobre folhas destacadas de *Parthenium hysterophorus* (losna branca), observou rápido amarelecimento seguida por necrose e morte das folhas 48 h após a aplicação do tratamento.

Em um ensaio de punctura, realizado com folhas de *Stellaria media* (Morugem), *Urtica dioica* (Urtiga), *Sonchus arvensis* (Serralha), *Parietaria officinalis* (Furaparedes), *Lactuca serriola* (alface-brava), *Helianthus annuus* (Girassol), para testar a ação dos metabólitos produzidos pelo fungo *Phoma chenopodiicola*, o mesmo mostrou-se eficiente, pois causou lesões como clorose e necrose nos tecidos foliares (EVIDENTE et al. 2015).

Conforme pode-se observar nas figuras 10 e 11, os resultados da aplicação dos tratamentos em folhas destacadas de *C. sativus* e *S. bicolor*, causaram lesões amareladas ou necrosadas, porém com baixa intensidade. Por isso o teste em folha destacada não foi considerado significativo para a escolha da melhor condição de produção dos metabólitos com ação herbicida. Tais resultados, podem estar relacionados à baixa concentração dos metabólitos presentes no extrato fermentado, sendo que as aplicações foram realizadas com o extrato bruto fermentado e com volume de 1 microlitro por punctura na folha, dificultando a capacidade do herbicida expressar o seu potencial de controle sobre as espécies estudadas. Varejão et al. (2013) já haviam relatado que, frequentemente as fitotoxinas estão presentes em baixas concentrações no filtrado oriundo dos processos fermentativos de microrganismos.

5.3 PÓS-EMERGÊNCIA

Os resultados apresentados na tabela 3 mostram a porcentagem de fitotoxicidade dos tratamentos em *Cucumis sativus* e *Sorghum bicolor*. Os tratamentos que apresentaram a maior porcentagem de fitotoxicidade em plantas de *Cucumis sativus* foram o T3 (66,8%), T4 (65,0%), T5 (61,2%) e T6 (56,8%), já para o *Sorghum bicolor*, os melhores resultados foram encontrados no T1 (58,1%) e T4 (58,1%), nestes tratamentos, não houve diferença significativa para ambas as espécies, de acordo com o teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Mesmo não havendo diferença significativa entre os tratamentos com maior potencial fitotóxico sobre as espécies avaliadas, nas figuras 12 e 13 é possível observar que as lesões foram mais intensas nos tratamentos T3 para o *Cucumis sativus* e T4 para o *Sorghum bicolor*. Nestes ensaios as condições foram 40 rpm de agitação e 3 L. min⁻¹ para o T3 e 60 rpm de agitação e 3 L.min⁻¹ para o T4.

O menor potencial fitotóxico para a espécie de *Cucumis sativus* foi encontrado nos tratamentos T1 (49,3%) e T7 (45,6 %), já para o *Sorghum bicolor* os tratamentos T2 (43,1%), T3 (41,2%), T5 (32,5%), T6 (40,6%) e T7 (39,3%) foram os que tiveram a menor fitotoxicidade, não havendo diferença significativa entre os mesmos, pelo teste Scott-Knott,

$p < 0,05$ (tabela 3). A testemunha foi considerada como 0% de fitotoxidade, não apresentando lesão nas plantas de *Cucumis sativus* e *Sorghum bicolor*.

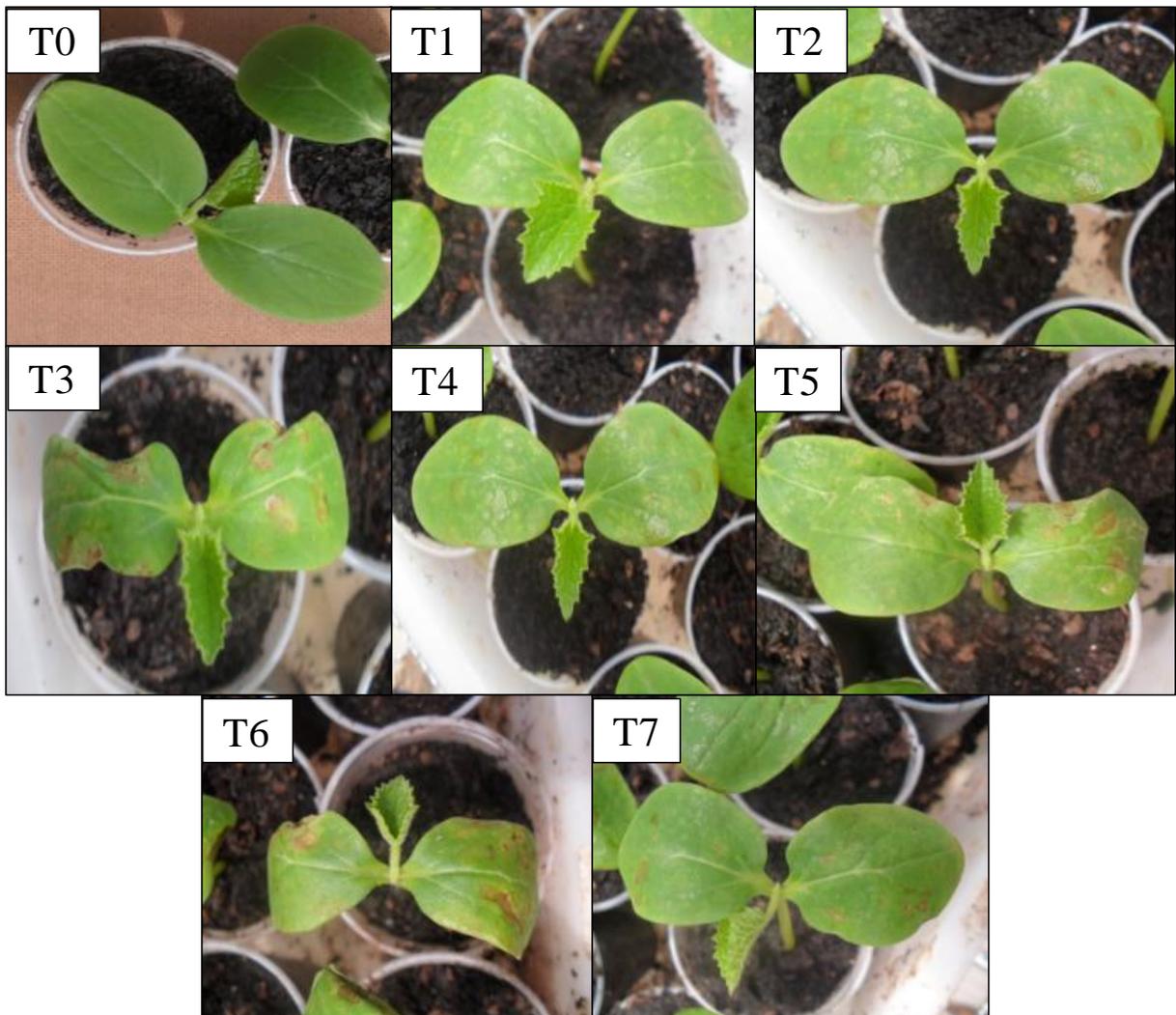
Tabela 3 - Matriz experimental do Delineamento Composto Central 2² com três repetições no ponto central, para avaliar a fitotoxidade provocadas em *Cucumis sativus* e *Sorghum bicolor* aos 7 DAA.

Ensaio	Agitação (rpm)	Aeração (L.Min-1)	Fitotoxidade (%)	
			Pepino	Sorgo
T0 (Água destilada)	-	-	0 d*	0 c
1	40 (-1)	1 (-1)	49,4 b	58,1 a
2	60 (1)	1 (-1)	25,0 c	43,1 b
3	40 (-1)	3 (1)	66,9 a	41,2 b
4	60 (1)	3 (1)	65,0 a	58,1 a
5	50 (0)	2 (0)	61,2 a	32,5 b
6	50 (0)	2 (0)	56,9 a	40,6 b
7	50 (0)	2 (0)	45,6 b	39,4 b

*Médias não seguidas pelas mesmas letras nas colunas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Conforme as figuras 12 e 13, os danos provocado pela aplicação dos tratamentos com fermentados de *Phoma* sp. se configuram em lesões, que variam desde um amarelecimento leve até o aparecimento de murchas ou lesões necróticas. Vikrant et al. (2006), ao aplicar os filtrados de cultura de *Phoma herbarum* obtidos por fermentação submersa, observaram danos como: amarelecimento, seguido de murcha acentuada e colapso completo de mudas de *Parthenium hysterophorus* (losna branca). Posteriormente Cimmino et al. (2013b), ao testar o potencial do metabólito chenopodolin, produzido pelo fungo *Phoma chenopodicola*, em folhas de *Cirsium arvense* (cardo-rasteiro) e *Setaria viride* (milhã-de-cabecinha), uma monocotiledônea e uma dicotiledônea, descreveram sintomas como: lesões por necrose, murchamento e degradação dos tecidos foliares de um modo geral.

Figura 13 - Imagens das lesões causadas pela aplicação em pós-emergência na cultura de *Cucumis sativus* 4 dias após a aplicação dos tratamentos.



Fonte: O autor

Na tabela 4, são apresentados os resultados da altura de plantas de pepino e sorgo, avaliados diariamente durante 7 dias após a aplicação dos tratamentos. Não houve diferença significativa na altura de plantas de *Cucumis sativus* entre os tratamentos T3 e T6 em todos os dias avaliados. Porém, o maior efeito herbicida foi observado no T3, o qual causou a redução da altura das plantas de *Cucumis sativus*. Já na espécie de *Sorghum bicolor*, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos em todos os dias avaliados, no entanto o tratamento T4 foi o que apresentou de forma geral a menor redução no crescimento de *Sorghum bicolor* (tabela 4).

Os resultados apresentados na figura 14, mostram a diferença na altura das plantas de *Cucumis sativus* e *Sorghum bicolor* submetidas a aplicação de extratos fermentados de *Phoma* sp., estas medidas realizadas durante 7 DAA. Neste gráfico é possível observar que a

aplicação dos tratamentos não causou uma inibição significativa do crescimento das plantas, porém esta análise também serviu como base para selecionar o tratamento com maior potencial herbicida.

Figura 14 - Imagens das lesões causadas pela aplicação em pós-emergência na cultura de *Sorghum bicolor*, 4 dias após a aplicação dos tratamentos.



Fonte: o autor

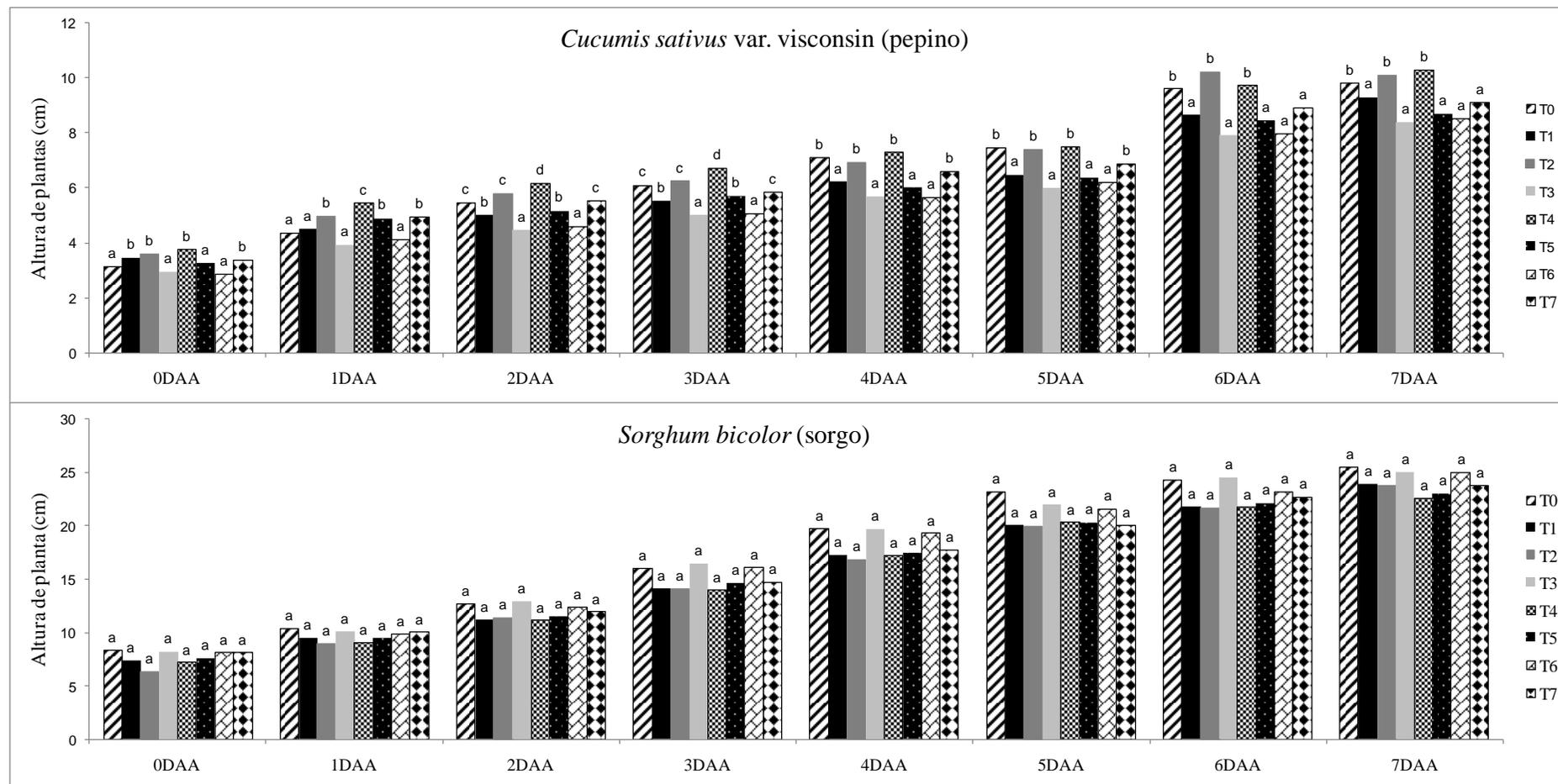
Tabela 4 - Avaliação da altura de plantas de *Cucumis sativus* e *Sorghum bicolor*, avaliadas durante sete dias após a aplicação dos tratamentos.

Altura de planta (cm)								
TRAT	0DAA	1DAA	2DAA	3DAA	4DAA	5DAA	6DAA	7DAA
<i>Cucumis sativus</i> var. wisconsin (pepino)								
T0	3,13 a*	4,35 a	5,45 c	6,09 c	7,08 b	7,44 b	9,58 b	9,79 b
T1	3,46 b	4,49 a	5,01 b	5,52 b	6,21 a	6,47 a	8,63 a	9,28 a
T2	3,59 b	4,96 b	5,78 c	6,24 c	6,92 b	7,40 b	10,21 b	10,08 b
T3	2,94 a	3,93 a	4,45 a	4,99 a	5,66 a	5,98 a	7,88 a	8,38 a
T4	3,74 b	5,43 c	6,15 d	6,70 d	7,28 b	7,47 b	9,70 b	10,28 b
T5	3,26 a	4,89 b	5,17 b	5,71 b	5,99 a	6,37 a	8,44 a	8,66 a
T6	2,84 a	4,12 a	4,59 a	5,06 a	5,66 a	6,21 a	7,95 a	8,50 a
T7	3,39 b	4,94 b	5,51 c	5,84 c	6,59 b	6,86 b	8,89 a	9,08 a
<i>Sorghum bicolor</i> (sorgo)								
T0	8,28 a	10,36 a	12,65 a	15,94 a	19,67 a	23,10 a	24,21 a	25,42 a
T1	7,32 a	9,48 a	11,15 a	14,10 a	17,21 a	20,01 a	21,71 a	23,86 a
T2	6,37 a	8,94 a	11,40 a	14,08 a	16,83 a	19,93 a	21,64 a	23,71 a
T3	8,19 a	10,04 a	12,87 a	16,42 a	19,66 a	21,91 a	24,46 a	24,98 a
T4	7,16 a	8,98 a	11,08 a	13,91 a	17,12 a	20,26 a	21,68 a	22,48 a
T5	7,57 a	9,44 a	11,43 a	14,59 a	17,42 a	20,28 a	22,08 a	22,98 a
T6	8,09 a	9,78 a	12,36 a	16,05 a	19,23 a	21,53 a	23,12 a	24,96 a
T7	8,08 a	9,98 a	11,89 a	14,68 a	17,67 a	19,98 a	22,64 a	23,66 a

*Médias não seguidas pelas mesmas letras nas colunas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

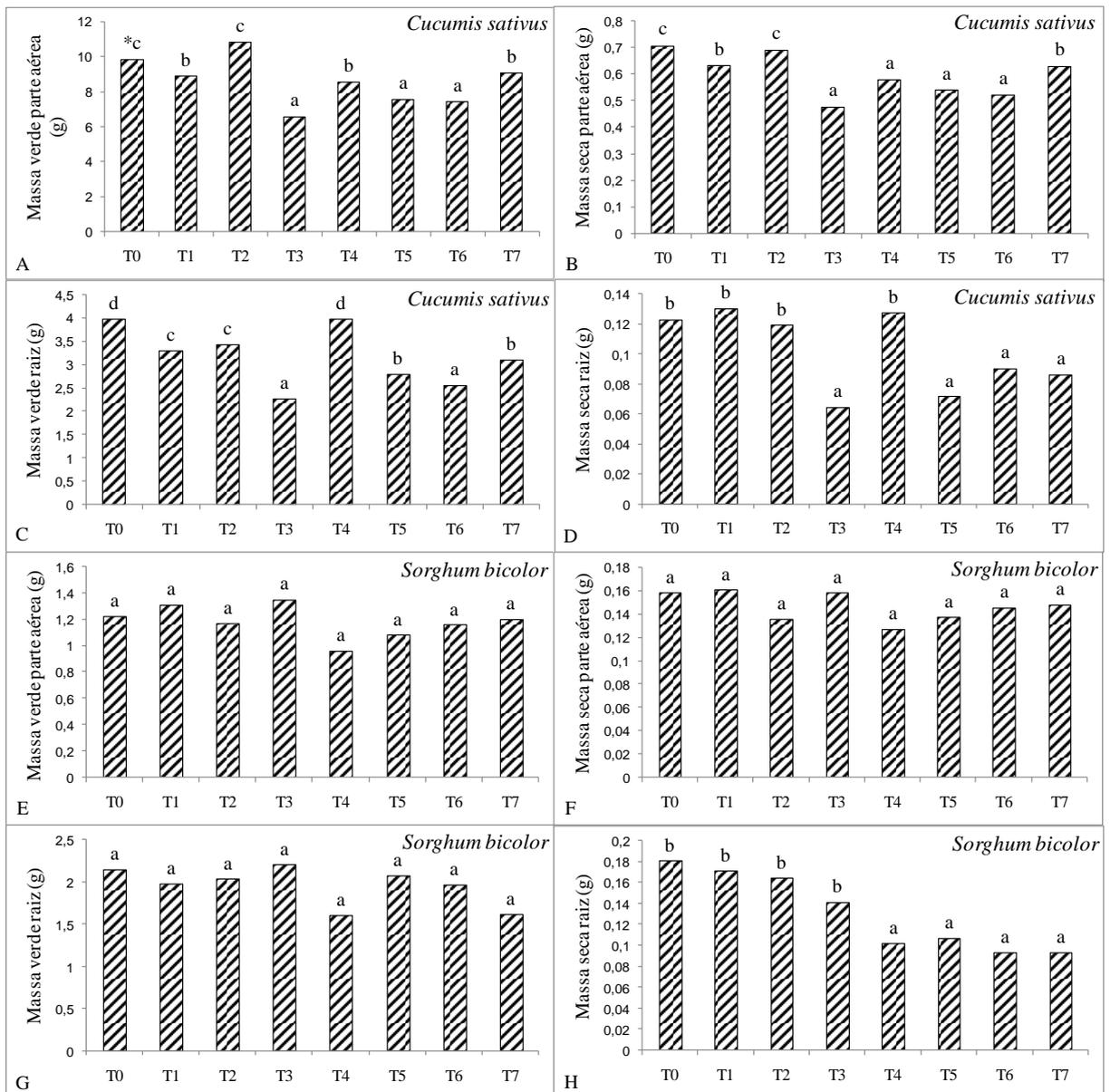
Na figura 15 estão apresentados os resultados da produção de MV e MS da parte aérea e sistema radicular de *Cucumis sativus* e *Sorghum bicolor* após 7 dias da aplicação dos tratamentos. Os dados apresentados mostram que, para a espécie *Cucumis sativus* o tratamento T3 interferiu diretamente na redução da quantidade de MV e MS da parte aérea (Fig. 15A e 15B) e do sistema radicular (Fig. 15C e 15D). Já para a espécie *Sorghum bicolor*, o maior efeito inibitório foi observado no T4, este apresentou redução, tanto na quantidade MV e MS da parte aérea (Fig. 15E e 15F), como da raiz (Fig. 15G e 15H).

Figura 15 - Gráfico da altura de plantas de *Cucumis sativus* e *Sorghum bicolor*, avaliadas durante sete dias após a aplicação dos tratamentos.



Fonte: o autor

Figura 16 - Massa verde e massa seca da parte aérea e radicular de *Cucumis sativus* e *Sorghum bicolor*, nos diferentes tratamentos.



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

Fonte: o autor

5.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

A melhor condição encontrada no DCC para produção de herbicida foi obtida nos tratamentos 3 e 4, para as espécies de *Cucumis sativus* e *Sorghum bicolor*, respectivamente. Com base nestes resultados, realizou-se a separação dos compostos por solventes e a caracterização química. Conforme as tabelas 6 e 7 foram encontrados vários compostos, sendo que o aparecimento destes variou conforme o tipo de solvente utilizado para a extração

liquido-liquido. Porém alguns compostos foram encontrados com maior frequência em ambas as frações analisadas, destacando-se o Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahidro-3-(2-methylpropyl), este foi observado em maior abundância para a maioria das frações analisadas, apresentando sempre a maior área de picos e a maior porcentagem em relação ao total. Geralmente o tempo de retenção (TR) encontrado para este composto foi entre 12,5 e 12,7 minutos.

Tabela 5 - Caracterização química dos compostos presentes no tratamento com maior efeito herbicida (T3) sobre o de *Cucumis sativus* por CG.

Pico	Nome do composto	Estrutura	TR	Área (ua)	% total
Solvente Metanol					
1	2-Oxiraneethanol, 2-t-butyl(dimethylsilyloxymethyl)- acetate	C13H26O4Si	9,077	24551	1,088
2	Acetate, [3-(acetyloxy)-4,5-dihydro-5-isoxazolyl]methyl	C8H11NO5	11,117	19396	0,86
3	1,4-Diacetyl-3-acetoxymethyl-2,5-methylene-l-rhamnitol	C14H22O8	11,485	186646	8,273
4	Uric acid	C5H4N4O3	11,518	15193	0,673
5	Spermine	C10H26N4	11,548	10497	0,465
6	12-Methyl-oxa-cyclododecan-2-one	C12H22O2	11,594	16,766	0,743
7	3,7-Diazabicyclo[3.3.1]nonane, 9,9-dimethyl-	C9H18N2	11,778	128511	5,696
9	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahidro-3-(2-methylpropyl)-	C11H18N2O2	12,547	1454291	64,463
10	12-Dimethylamino-10-oxododecanoic acid	C14H27NO3	12,666	400130	17,736
Solvente Etanol					
1	Methyl 4,6-decadienyl ether	C11H20O	11,147	6864	0,548
2	3-Trifluoroacetyloxydodecane	C14H25F3O2	11,316	26446	2,11
3	5-Dodecanol acetate	C14H28O2	11,58	30363	2,423
4	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahidro-	C7H10N2O2	11,612	64921	5,18
5	3,7-Diazabicyclo[3.3.1]nonane, 9,9-dimethyl-	C9H18N2	11,809	21095	1,683
6	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahidro-3-(2-methylpropyl)-	C11H18N2O2	12,559	1103547	88,056
Solvente Acetato de etila					
1	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahidro-3-(2-methylpropyl)-	C11H18N2O3	12,699	18577	43,020
2	2,2-Dipropyl-N-ethylpiperidine	C13H27N	12,778	15358	35,564

TR: Tempo de retenção.

Tabela 6 – Caracterização química dos compostos presentes no tratamento com maior efeito herbicida (T4) sobre o de *Sorghum bicolor* por CG.

Pico	Nome do composto	Estrutura	TR	Área (ua)	% total
Solvente Metanol					
1	3-Trifluoroacetyloxydodecane	C14H25F3O2	11,102	10502	0,016
2	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahidro-	C7H10N2O2	11,467	129668	0,192
3	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahidro-3-(2-methylpropyl)-	C11H18N2O2	12,54	1278230	1,89
4	Hydroquinine, 2'-propoxy-	C23H32N2O3	18,689	57121572	84,444
5	Acetic acid, 3-acetoxy-5-pentyl-2-(4,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]nonane)-	C25H34O4	22,333	9104318	13,459
Solvente Etanol					
1	Uric acid	C5H4N4O4	11,77	699460	19,921
2	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahidro-	C7H10N2O2	12,429	2328303	66,313
3	1-Undecanethiol	C11H24S	12,66	456483	13,001
4	3,7-Diazabicyclo[3.3.1]nonane, 9,9-dimethyl-	C9H18N2	15,373	14231	0,405
5	Pregn-4-ene-3,20-dione, 17,21-dihydroxy-, bis(O-methylxime	C23H36N2O4	16,182	12601	0,359
Solvente Acetato de etila					
1	2,4,7-Trioxabicyclo[4.4.0]dec-9-ene, 8-decyloxy-3-phenyl-	C23H34O4	12,023	7694	33,481
2	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahidro-3-(2-methylpropyl)-	C11H18N2O2	12,705	11368	49,465

TR: Tempo de retenção.

Segundo Klaic (2014), o potencial herbicida do caldo fermentado, está relacionada com a produção de metabólitos secundários fitotóxicos durante a fermentação. Ao realizar a caracterização química de fermentados produzidos a partir de condições otimizadas de cultivo de *Phoma* sp. foram identificadas oito compostos, entre eles, hexa-hidro-3- (2-metilpropil) pirrolo [1,2-a] pirazina-1,4-diona, que tem semelhanças com dois outros metabólitos fitotóxicos com potencial herbicida extraído do fungo *Alternaria alternata* chamado Maculosin -1 {I}, (3S-cis) 3-hexahidro- [(4-hidroxifenil) metil] pirrolo [1,2-a] pirazina-1,4-diona} e {2-Maculosin (II) (3S cis) -hexahidro-3-metil fenil pirrolo [1,2-a] pirazina-1,4-diona} (BOBYLEV, et al., 2000). Os três compostos são derivados a partir do composto químico Pirazina. Um herbicida de contato que tem um ciclo de Pirazina na sua molécula é chamado de dibrometo de Diquat. Os compostos de 2,2,5-trimetil-3,4-hexanodiona e 5,10-dietoxi-2,3,7,8-tetrahidro-1H, 6H-dipyrrolo [1,2-a; 1', 2' d] pirazina têm sido estudados na indústria farmacêutica como agente antifúngico (OLIVEIRA et al., 2014).

Melo et al. (2014), ao realizar o fracionamento de extratos de *Mortierella alpina* com diferentes solventes orgânicos, obtiveram potencial antibacteriano na fração Clorofórmio. Logo após realizaram a caracterização química dos extratos por meio de CG-MS, indicando a presença de uma classe química dos alcalóides pyrrolopyrazine (a) pirrolo [1,2-a] pirazina-1,4-diona, hexahidro-3- (2-metilpropil) com pico ao tempo de retenção de 32,65; (b) pirrolo [1,2-a] pirazina-1,4-diona, hexahidro-3- (fenilmetil) com pico ao tempo de retenção de 40,61.

Outros trabalhos indicam que, alcalóides como pyrrolopyrazine ocorre em muitos endófitos. Estes compostos foram isolados a partir de *Epichloe* e espécies de *Neotyphodium* spp. que são gramíneas de regiões frias, sendo estes utilizados para proteger as plantas contra vermes e fitopatógenos (NAN; LI, 2000, SCHARDL; LEUCHTMANN 2004, MALINOWSKI; BELESKI 2005, ZHANG et al., 2012). Este metabólito obtido por fungos consiste em uma estrutura de anel heterocíclico com pyrrolopyrazine lipofílica e uma cadeia lateral de guanidínio hidrofílico. Este composto está relacionado com outra dicetopiperazina-micotoxinas, tais como ácido aspergílico e derivados de pirazina que são produzidos por espécies de *Aspergillus* e *Candida* (ZHANG et al., 2012).

Baseado nos resultados encontrados na literatura, podemos sugerir que o composto chamado Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl), encontrado na caracterização química dos extratos fermentados de *Phoma* sp. tem efeito herbicida sobre plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas. E conforme os resultados das tabelas 6 e 7, a maior abundância desse composto foi encontrado no T3, onde as condições de agitação eram mínimas (40 rpm), porém com maior aeração (3 L.min⁻¹). Tais resultados podem estar

relacionados com a exigência de oxigênio pelos fungos, proporcionados pela aeração possibilitando uma maior produção do composto de interesse. Já a agitação, não foi considerada um fator limitante para a produção destes compostos mostrando que uma agitação mínima é suficiente, para homogeneizar o meio de cultivo, sem interferir negativamente no crescimento microbiano.

6. CONCLUSÃO

Dos parâmetros avaliados para a produção de herbicida por fermentação submersa de *Phoma* sp. em biorretor, o maior efeito herbicida sobre a espécie de *Cucumis sativus* foi encontrada no T3 com agitação de 40 rpm e aeração de 3 L.min⁻¹, já para o *Sorghum bicolor* a melhor condição foi encontrada no T4 com agitação de 60 rpm e aeração de 3 L.min⁻¹. Tais resultados foram observados em ambos os bioensaios realizados.

A aplicação dos metabólitos secundários produzidos por fermentação submersa de *Phoma* sp. apresentam ação herbicida em pré-emergência, pós-emergência e em folhas destacadas de *Cucumis sativus* e *Sorghum bicolor*, podendo tornar-se uma alternativa no futuro para o controle de plantas daninhas.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Purificação dos fermentados produzidos;
- ✓ Realização da extração líquido-líquido com um maior número de solventes orgânicos;
- ✓ Avaliação do potencial herbicida das frações com solventes, por meio de bioensaios;
- ✓ Caracterização química das frações com maior potencial herbicida, por cromatografia.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, T. C. **Formulação de um herbicida biológico produzido através da fermentação submersa em biorreator**. 2014. 91 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos)- Universidade Federal de Santa Maria, 2014.
- ANNETT, R.; HABIBI, H.R.; HONTELA, A. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. **Journal of Applied Toxicology**, v.34, 458-479, 2014.
- ASH, G. J. The science art business of successful bioherbicides. **Biological Control**, v. 52, 230–240, 2010.
- BAILEY, K.L.; DERBY, J. Fungal isolates and biological control compositions for the control of weeds. **US Patent Application** Serial No. 60/294475. Filed May 20, 2001.
- BAILEY, K. L. et al. The effects of *Phoma macrostoma* on nontarget plant and target weed species. **Biological Control**. v. 58, 379–386, 2011.
- BARNICKI S. D.; HOYME C.A.; SIROLA J.J. **Separação processos de síntese**, Kirk **Othmer-Encyclopedia of Chemical Technology** Wiley Library Online, 2006.
- BARTON, J. How good are we at predicting the Field host-range of fungal pathogens used for classical biological control of weeds? **Biological Control**, v. 31, 99–112, 2004.
- BAUDRON, F.; GILLER, K.E. Agriculture and nature: trouble and strife? **Biol. Conserv.** v. 170, 232–245. 2014.
- BERGIN, D. Weed Control Options for Coastal Sand Dunes: a Review. New Zealand **Forest Research Institute LTD**, pp. 5-13, 2011.
- BERESTETSKIY, A. O. et al. Isolation, identification, and characteristics of the phytotoxin produced by the fungus *Alternaria cirsinioxia*. **Applied Biochemistry and Microbiology** v. 46, 75-79, 2010.
- BISINOTI, M. C.; JARDIM, W. F., **O emprego de Técnicas Analíticas na especificação de metais pesados e a sua importância para o estudo do Ambiente**. Caderno Temático Vol. 02 Unicamp, SP, 2004.
- BONATO, P. S. Cromatografia gasosa. In: C.H. COLLINS, G.L. BRAGA, P.S. Bonato (coords.) **Introdução a métodos cromatográficos**. 6a ed. Campinas Unicamp – 1995
- BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. **Statistics for experimenters: design, innovation, end discovery**. 2. Ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2005.
- BOYETCHOKO, S. M., et al. Biological Weed Control with Pathogens: Search for Candidates to Applications. **Agriculture and Food Production**. v. 2, 239–266, 2002.

- BOYETTE, C. D.; WALKER, H. L.; ABBAS, H. K. Biological control of kudzu (*Pueraria lobata*) with an isolate of *Myrothecium verrucaria*. **Biocontrol Sci Technol** 12:75–82, 2002.
- BOYETTE, C. D.; REDDY, K. N.; HOAGLAND, R. E. Glyphosate and bioherbicide interaction for controlling kudzu (*Pueraria lobata*), red vine (*Brunnichia ovata*), and trumpet creeper (*Campsis radicans*). **Biocontrol Sci Technol**, v. 16, 1067–1076, 2006.
- BOYETTE, C.D., M.A. WEAVER, R.E. HOAGLAND AND K.C. STETINA. Submerged culture of a mycelial formulation of a bioherbicidal strain of *Myrothecium verrucaria* with mitigated mycotoxin production. **World J. Microbiol Biotechnol.** v. 24, 2721–2726, 2008.
- BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 21–32, 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Regras para análise de sementes. Brasília: **Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária**, 399p, 2009.
- CARBALLIDO, J. et al. Field sprayer for inter and intra-row weed control: performance and labor savings. **J. Agricultural Research**, v. 11, 642-651, 2013.
- CHARUDATTAN, R. Inundative control of weeds with indigenous fungal pathogens. In: Burge, M.N. (Ed.). Manchester University Press, New York, **Fungi in Biological Control Systems** pp. 86–110, 1988.
- CHARUDATTAN, R. The mycoherbicide approach with plant pathogens, In: **Microbial Control of Weeds**, D. O. Tebeest, ed., New York, Chapman and Hall, p.24-57.1991.
- CHARUDATTAN, R. Ecological, practical, and political inputs into selection of weed targets: What makes a good biological control target? **Biological Control** v. 35, 183-196, 2005.
- CHAUVEL, B. et al. History of chemical weeding from 1944 to 2011 in France: changes and evolution of herbicide molecules. **Crop Protection**. 42, 320 e 326, 2012.
- CHENG, J. D. et al. Production, survival and *Coniothyrium minitans* conidia produced in shaken liquid culture. **FEMS Microbiology Letters**. v. 227, 127-131, 2003.
- CIMMINO, A et al. *Chenopodolin*: A Phytotoxic Unrearranged ent -Pimaradiene Diterpene Produced by *Phoma chenopodicola* , a Fungal Pathogen for *Chenopodium album* Biocontrol. **Journal of Natural Products**, 26 jul. v. 76, n. 7, p. 1291–1297. b). 2013.
- COOK, R. J. et al. Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: a framework for scientific evaluation. **Biological Control**, v. 7, 333– 351, 1996.
- DANIEL, J. T. et al. Biological control of northern joint vetch in rice with an endemic fungal disease. **Weed Science**. v. 21, 303–307, 1973.
- DUARTE, N. F.; SILVA, J. B.; SOUZA, I. F. Competição de plantas daninhas com a cultura do milho no município de Ijaci, MG. **Ciênc. agrotec.** Lavras, n.5, p. 983-992, 2002.

- DUKE, S. O. et al. Natural products as leads for new herbicide modes of action. Proceedings, Brighton, **Crop Protection Conference Weeds**, v. 2, p. 579-586, 1997.
- EL-SAYED, W. Biological control of weeds with pathogens: Current status and future trends. **Journal of Plant Diseases and Protection**. v. 112, 209-221. 2005.
- EVIDENTE, A. et al. Stagonolides G–I and Modiolide A, Nonenolides Produced by *Stagonospora cirsii*, a Potential Mycoherbicide for *Cirsium arvense*. **Journal of Natural Products**, dez. v. 71, n. 11, p. 1897–1901. 2008 (b).
- EVIDENTE, M. et al. Phytotoxins produced by *Phoma chenopodiicola*, a fungal pathogen of *Chenopodium album*. **Phytochemistry**. v. 117, p. 482–488. set. 2015.
- FAO. How to Feed the World in 2050. Disponível em: http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf> Acessado em: 27 de março de 2016.
- FISCHER, A. J. et al. Herbicide resistant *Echinochloa oryzoides* and *E. phyllopogon* in California *Oryza sativa* fields. **Weed Science**, v. 48, 225-230, 2000.
- FONTES, J. R. A. et al. Manejo Integrado de Plantas Daninhas. **Planaltina: Embrapa Cerrados**, (Documentos Embrapa), 2003.
- FOX, E. M.; HOWLETT, B. J. Secondary metabolism: Regulation and role in fungal biology. **Current Opinion Microbiology**, v. 11, p. 481–487, 2008.
- FRANS, R.; CROWLEY, H. Experimental design and techniques for measuring and Analyzing plant responses to weed control practices. In: **Southern Weed Science Society. Research methods in weed science**, Clemson, 3ª ed., p 29-45, 1986.
- FUGLSANG, A.; NILSSON, D.; NYBORG, N. C. B. Cardiovascular effects of fermented milk containing angiotensin-converting enzyme inhibitors evaluated in permanently catheterized, spontaneously hypertensive rats. **Applied and Environmental Microbiology**,. v. 68, n. 7, p. 3566–3569, 2002.
- GIANESSI, L. P. The increasing importance of herbicides in world wide crop production. **Pest Management Science**, v. 69, 1099-1105, 2013.
- GIBBS, P. A., SEVIOUR, R. J., SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 20, n. 1, p. 17-48, 2000.
- GLOSHEH, H. Z. Constraints in implementing biological weed control: A review. **Weed Biology and Management**, v. 5, 83-92, 2005.
- GRAUPNER, P. R. et al. The macrocidins: novel cyclic tetramic acids with herbicidal activity produced by *Phoma macrostoma*. **Natural Products**. v. 66, 1558-1561, 2003.
- GRAUPNER, P.R. et al. Chlorosis inducing phytotoxic metabolites: new herbicides from *Phoma macrostoma*. In: Rimando, A.M., Duke, S.O. (Eds.), **Natural Products for Pest Management**. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 37– 47, 2006.

GRIEPENTROG, H. W.; DEDOUSIS, A. P. Mechanical Weed Control, Soil Engineering. **Springer**, pp. 171-179, 2010.

GUSKE, S.; SCHULZ, B.; BOYLE, C. Biocontrol options for *Cirsium arvense* with indigenous fungal pathogens. **Weed Research** v. 44, 107–116, 2004.

HACKBART, L. M. **Equilíbrio Líquido-Líquido de Sistemas Contendo Fenol Água-solvente: Obtenção e Modelagem Termodinâmica**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Térmicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, 2007.

HALLETT S.G. Where are all the bioherbicides? **Weed Science** v. 48, 474-480, 2005.

HARWOOD, L. M.; MOODY, C. J. **Experimental de Química Orgânica: Princípios e Práticas** Blackwell Science, Oxford -1989.

HINTZ, W. E.; SHAMOUN, S.F. Environmental fate and risk assessment of a novel forest-weed biocontrol agent. In: Proceeding sand Papers from the 1996 Risk Assessment **Research Symposium**, June 23–25, Ottawa, Canada. Retrieved January 29, 2004. From <http://www.isb.vt.edu/brarg/brasym96/hintz96.htm>), 1996.

HINTZ, W.E. et al. Development of genetic markers for risk assessment of biological control agents. *Can. J. Plant Pathol.* v. 23, 13–18, 2001.

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

HOAGLAND, R. E. Chemical interactions with bioherbicides to improve efficacy. **Weed Technology**, v. 10, 651– 674, 1996.

HOAGLAND, R. E. et al. Effects of *Myrothecium verrucaria* on morning-glory (Ipomoea) species. **Allelopath J.** v. 27, 151–162, 2011.

HOAGLAND, R. E.; WILLIAMS, R. D. Bioassays – useful tools for the study of allelopathy. **CRC Press**, Boca Raton, pp. 315–351, 2003.

HOPPIN, J. A. Pesticides and respiratory health: where do we go from here? **Occupational and Environmental Medicine**, v. 71, 80, 2014.

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

JAVAID, A.; ALI, S.; AKBAR, M. Herbicidal potential of *Drechslera* spp. Culture filtrates against *Parthenium hysterophorus* L. **Chilean journal of agricultural research**, Chillán, Chile, v. 71, n. 4, 2011. Nota científica.

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

- KLAIC, R. **Produção de bioherbicida por processos fermentativos a partir do fungo *Phoma* sp.** 2014. 90 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos)- Universidade Federal de Santa Maria, 2014.
- LI, M. Z. et al. Screening of bacterial herbicide strain *Xanthomonas campestris* sp. *Retroflexus* from rhizosphere. **Acta Microbiologica Sinica**.v.44, 226-229, (in Chinese), 2004.
- MALINOWSKI, D. P.; BELESKY, D. P.; LEWIS, G. C. Abiotic stresses in endophyte grasses. In: **Craig AR, Charles PW, Donald ES** (eds) *Neotyphodium* in cool-season grasses. Blackwell, Ames, pp 187–199, 2005.
- MELO, I. S. et al. Isolation and biological activities of an endophytic *Mortierella alpine* strain from the Antarctic moss *Schistidium antarctici*. PMID: 24126742: **Extremophiles: Life Under Extreme Conditions**, jan. v. 18, n. 1, p. 15–23, 2014.
- MENDIZÁBAL, V. Y. I. et al. Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. **Biological Control**. v. 60, 280–289, 2012.
- NAN, Z. B.; LI, C. J. *Neotyphodium* in native grasses in China and observations on endophyte-host interaction. In: **Paul VH, Dapprich PD** (eds). Proceedings of the 4th international neotyphodium-grass interactions symposium, Soest, pp 41–50, 2000.
- OERKE, E. C. Crop losses to pests. **J. Agric. Sci.** v. 144, 31–43, 2006.
- PARRA, R., ALDRED, D., MAGAN, N. Medium optimization for the production of the secondary metabolite squalestatin S1 by a *Phoma* sp. combining orthogonal design and response surface methodology. **Enzyme Microb. Tech.**, v. 37, 704-711, 2005.
- PANDEY, A. **Screening and characterization of mycoherbicides for management of *Hyptis suaveolens* (L) Poit.** PhD Thesis, Rani Durgawati University, Jabalpur, India, 2002.
- PEDRAS, M. S. C.; AHIAHONU, P. W. K. Phytotoxin production and phytoalexin elicitation by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Chemical Ecology** v. 30, 2163-2179, 2004.
- PENARIOL, M. C.; MONTEIRO, A. C.; PITELLI, R. A. Growth and sporulation of *bipolaris euphorbiae* cultivated under different nutritional conditions. **Ciência Rural Santa Maria**. v. 38, 1907-1913, 2008.
- PES, M. P. **Metabólitos secundários obtidos de *Diaporthe* sp. aplicados para o controle de plantas daninhas.** 2015. 65 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Santa Maria, 2015.
- POWLES, S. B. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. **Pest Management Science**, v. 64, 360-365, 2008.
- QIANG, S. China Agriculture Press, Beijing. **Weed Science**. (in Chinese), 2001.

- RAI, M. *et al.* *Phoma saccardo*: Distribution, secondary metabolite production and biotechnological applications. **Critical Reviews in Microbiology**. v. 35, n. 3, p. 182–196, 2009.
- RAMESH, K. Weed Problems, Ecology, and Management Options in Conservation Agriculture: Issues and Perspectives. **Advances in Agronomy**, v. 131, p. 251–303. 2015.
- RUEDA-AYALA, V. *et al.* The influence of post-emergence weed harrowing on selectivity, crop recovery and crop yield indifferent growth stages of winter wheat. **Weed Research**, v. 51, 478-488, 2011.
- SARKER, S.D.; LATIF, Z.; CINZA A.I. **Natural Products Isolation**. 2ª ed. Humana Press, New Jersey, 2006.
- SCHARDL, C. L.; LEUCHTMANN, A. The *Epichloe* endophytes of grasses and the symbiotic continuum. In: **Dighton J, White JF, Oudemans P** (eds) *The fungal community*, 3rd edn. CRC Press, Boca Raton, pp 475–503, 2004.
- SCHOBERT, R.; BARNICKEL, B. Toward the macrocidins: Macrocyclization via williamson etherification of a phenolate. **JOC note**. v. 75, 6716–6719, 2010.
- SCHUMANN, J.; HERTWECK, C. Advances in cloning, functional analysis and heterologous expression of fungal polyketide synthase genes. **Journal of Biotechnology**, v.124, p. 690-703, 2006.
- SELBMANN, L. *et al.* Production and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE 5080. *Res. Microbiol.*, v. 153, 585–592, 2002.
- SIDDIQUE, M. H. Study of the biosynthesis pathway of the geosmin in *Penicillium expansum*. **Institut National Polytechnique de Toulouse**, Laboratoire de Engenharia Química, França, 2012.
- SCHOBERT, R.; BARNICKEL, B. Toward the macrocidins: Macrocyclization via williamson etherification of a phenolate. **JOC note**. v. 75, 6716–6719, 2010.
- SILVA, A. A.; SILVA, J. F. (Eds. 3). *Tópicos em manejo de plantas daninhas*. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, p.7, 2007.
- SINHA, S.; SINHA, S. Studies on the production of acid protease by submerged fermentation. **International Journal of Food Engineering**, v. 5, 2009.
- SMITH, R. G., RYAN, M. R., MENALLED, F. D. Direct and indirect impacts of weed management practices on soil quality. In: Hatfield, J. L., Sauer, T. J. (Eds.), *Soil Management: Building a Stable Base for Agriculture*. **Soil Science Society of America**, pp. 275 e 286. <http://dx.doi.org/10.2136/2011.soilmanagement.c18>, 2011.
- STARLING, A. P. *et al.* Pesticide use and incident diabetes among wives of farmers in the agricultural health study. **Occupational and Environmental Medicine**. v. 71, 629-635 oemed-2013-101659, 2014.

- STEWART-WADE, S. M.; NEUMANN, S. L.; COLLINS, L.; BOLAND, L. The biology of Canadian weeds. 117. *Taraxacum officinale* G. H. Webw ex Wiggers. **Canadian Journal of Plant Science** v. 82. 825-853, 2002.
- TEBEEST, D. O.; YANG, X. B.; CISAR, C. R. The status of biological control of weeds with fungal pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol.** v. 30, 637–657, 1992.
- TENG, P. S.; YANG, X. B. Biological impact and risk assessment inplant pathology. **Annu. Rev. Phytopathol.** v. 31, 495–521, 1993.
- TEMPLETON, G. E.; TEBEEST, D. O.; SMITH J. R., R. J. Biological weed control with mycoherbicides. **Annu. Rev. Phytopathol.** v. 17, 301–310, 1979.
- VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Micro extração por Fase Sólida. **Química Nova**, n.23, v.4, pp.523-530, 2000.
- VAREJÃO, E. V. V. et al. Phytotoxic Effects Of Metabolites From *Alternaria euphorbiicola* Against Its Host Plant *Euphorbia heterophylla*. **Química Nova**, v.36. n.7, p. 1004-1007, 2013.
- VASILAKOGLU, I. B.; ELEFTHEROHORINOS, I. G.; DHIMA, K. V. Propanil-resistant barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*) biotypes found in Greece. **Weed Technology**, v. 14, 524-529, 2000.
- VIKRANT, P. et al. Characterization of a phytotoxin from *Phoma herbarum* for management of *Parthenium hysterophorus* L. **Journal of Phytopathology**, 2006. v. 154, n. 7-8, p. 461–68.
- VURRO, M. et al. Optimization of the production of herbicidal toxins by the fungus *Ascochyta caulina*. **Biological Control**. v. 60, 192-198, 2012.
- WALKER, H. L.; TILLEY, A. M. Evaluation of an isolate of *Myrothecium verrucaria* from sicklepod (*Senna obtusifolia*) as a potential mycoherbicide agent. **Biological Control**, v. 10, 104–112, 1997.
- WAPSHERE, A. J. A strategy for evaluating the safety of organisms for biological weed control. **Ann. Appl. Biol.** v. 77, 201–211, 1974.
- WEIDEMANN G. J.; BOYETTE C. D.; TEMPLETON G. E. Utilization criteria for mycoherbicides. In: Hall FR, Barry JW, editors. Biorational pest control agents: formulation and delivery. ACS Symposium Series, No.595. **American Chemical Society**, Washington, DC. pp 238 -251. 1995.
- YANG, J. et al. Isolation, Identifiation, and Herbicidal Activity of Metabolites Produced by *Pseudomonas aeruginosa* CB-4. **Journal of Integrative Agriculture**. v. 13: 1719-1726. 2014.
- YANG, S. M; JONG, S. C. Factors influencing pathogenicity of *Myrothecium verrucaria* isolated from *Euphorbia esula* on species of *Euphorbia* plant. **Plant. Dis.** v. 79, 998–1002, 1995.

YASUOR, H. et al. Responses to clomazone and 5-ketoclomazone by *Echinochloa phyllopogon* resistant to multiple herbicides in Californian rice fields. **Pest Management Science**, v. 64, 1031-1039, 2008.

YU, X.; HALLETT, S.G.; SHEPPARD, J.; WATSON, A. K. Effects of carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio on growth, conidiation, spore germination and efficacy of the potential bioherbicide *Colletotrichum coccodes*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 20, 333–338, 1998.

ZHANG, J. L. et al. The herbicidal activity of mutant isolates from *Botrytis cinerea*. **Agricultural Sciences in China**, v. 5, 101-105, 2006.

ZHANG, X.; LI, C.; NAN, Z. Effects of cadmium stress on seed germination and seedling growth of *Elymus dahuricus* infected with the *Neotyphodium endophyte*. **Sci China Life Sci.** v. 55(9), 793–799, 2012.

ZHOU, L.; BAILEY, K. L.; DERBY, J. Plant colonization and environmental fate of the biocontrol fungus *Phoma macrostoma*. **Biological Control**, v. 30, n. 3, p. 634–644. 2004.

ANEXO A - ESCALA ADAPTADA DE FRANZ & CROWLEY PARA A AVALIAÇÃO DO PERCENTUAL DE FITOTOXICIDADE.

%	Descrição das categorias principais	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