



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTERIRA SUL**  
**CAMPUS ERECHIM**  
**CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA**

**EDUARDA ROBERTA BORDIN**

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOCOMPOSTOS VISANDO A REDUÇÃO NO  
USO DE HERBICIDAS**

**ERECHIM - RS**

**2017**

**EDUARDA ROBERTA BORDIN**

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOCOMPOSTOS VISANDO A REDUÇÃO NO  
USO DE HERBICIDAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS – *Campus* Erechim, como parte das exigências para obtenção do título de Engenheira Ambiental e Sanitarista.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Helen Treichel

**ERECHIM - RS**

**2017**

**EDUARDA ROBERTA BORDIN**

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOCOMPOSTOS VISANDO A REDUÇÃO NO  
USO DE HERBICIDAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
à Universidade Federal da Fronteira Sul –  
UFFS – *Campus* Erechim, como parte das  
exigências para obtenção do título de  
Engenheira Ambiental e Sanitarista.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Helen Treichel (Orientadora)  
UFFS – Erechim

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marília Teresinha Hartmann  
UFFS – Erechim

---

Mestranda PPGCTA Vanusa Rossetto  
UFFS – Erechim

Erechim/RS, novembro de 2017.

## AGRADECIMENTOS

A toda a minha família, em especial meu pai Carlos Alberto Bordin e minha mãe Cleunice Bordin, por todo carinho e apoio dedicado a mim, desde o início e durante o momento de todas as escolhas que levaram até a conclusão desta etapa da minha vida acadêmica. Com amor, vocês foram e são essenciais para que eu possa alcançar meus objetivos.

De forma especial, gostaria de agradecer minha orientadora, professora Helen Treichel, por todo conhecimento passado de forma simples e inspiradora, por estar sempre presente e disponível, sem medir esforços para ajudar durante toda a realização do trabalho, e durante toda a minha jornada atuando nas atividades do laboratório. Da mesma forma, minha coorientadora, Simone M. Golunski, por toda presteza, e todo conhecimento repassado durante a realização das minhas atividades no grupo de pesquisa.

A todos os integrantes do grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos, que contribuíram com a troca de conhecimentos, com as conversas e com a convivência alegre, o que somou para que o estudo pudesse ser concluído de forma tranquila, meu muito obrigada.

Aos grupos de pesquisa do Laboratório de Ecologia e Conservação e do Laboratório de Agroecologia, meu agradecimento, por estarem dispostos a contribuir para a realização dos testes que foram de suma importância para o trabalho.

A professora Cristiane Funghetto Fuzinato, muito obrigada por aceitar fazer parte da banca na avaliação do trabalho, e por ter contribuído com a orientação para a realização dos testes solicitados. E da mesma forma, a Vanusa Rossetto, muito obrigada por aceitar o convite para compor a banca, e por toda a contribuição no desenvolvimento do trabalho.

A professora da disciplina Marília Hartmann, meu agradecimento, por dispor de todas as informações necessárias para a realização da redação e da apresentação do trabalho, e pela disponibilidade dispensada.

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta, influenciaram e contribuíram para o aprendizado durante a minha vida acadêmica, muito obrigada.

## RESUMO

O crescimento da população mundial aliado ao desenvolvimento socioeconômico, acarreta em consequências geradas ao meio ambiente. A preocupação com os impactos ambientais negativos relacionados ao uso desregrado de herbicidas químicos, faz com que sejam pensadas novas tecnologias de manejo que visam minimizar estes impactos. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi otimizar a produção de um biocomposto a partir do microrganismo *Trichoderma koningiopsis*, bem como analisar os efeitos de sua aplicação, e ainda avaliar a toxicidade aguda do mesmo utilizando o microcrustáceo *Daphnia magna*. Para tanto, uma sequência de planejamentos experimentais foi utilizada, iniciada pelo delineamento experimental do tipo Plackett & Burman (PB), onde foram realizados 15 ensaios para selecionar previamente as variáveis, seguida de uma fermentação em triplicata com as melhores condições apresentadas, e após um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR2<sup>3</sup>), com 17 ensaios para realizar uma análise entre todos os fatores investigados. As variáveis independentes (respostas) avaliadas foram as atividades enzimáticas de amilases, celulasas, lipases e peroxidases, e ainda foi quantificada a biomassa fúngica produzida. Uma análise estatística foi realizada sobre as variáveis para verificar suas significâncias e também a validade do modelo proposto. Os resultados obtidos para atividade enzimática e produção de biomassa demonstraram uma ampla distinção, sendo que o biocomposto produzido a partir de um ensaio composto por 3,00 mg/L de glicose, 0,75 mg/L de peptona e 0,37 mg/L de extrato de levedura, apresentou maiores valores de atividade enzimática para amilases, celulasas e lipases, e em outro experimento, composto por 2,25 mg/L de glicose, 2,76 mg/L de peptona e 0,75 mg/L de extrato de levedura, foi obtida uma maior atividade enzimática para peroxidases e maior quantificação de biomassa fúngica. Portanto, estes biocompostos foram utilizados para avaliação quanto a toxicidade aguda, e também foram aplicados na planta *Euphorbia heterophylla* para verificação dos efeitos de fitotoxicidade. Sendo assim, os resultados obtidos para os testes de toxicidade aguda foram uma CE<sub>50-48h</sub> de 58.637,99 mg/L e 13.583,17 mg/L para o primeiro e o segundo biocomposto, respectivamente, e com relação a aplicação preliminar, o primeiro biocomposto demonstrou maior fitotoxicidade quando comparado ao segundo, demonstrando como efeito o amarelecimento das folhas da planta. Tendo em vista que este trabalho é de caráter inicial, são relatados grandes avanços relacionados ao tema, e passam a ser alternativas para trabalhos futuros, a utilização de adjuvantes para a aplicação dos bioprodutos, o aumento de escala, e uma investigação avaliando o potencial de outros microrganismos em outras plantas alvo.

**Palavras-chave:** atividade enzimática, biomassa fúngica, planejamento experimental, toxicidade.

## ABSTRACT

The growth of the world population together with socioeconomic development has consequences for the environment. Concern about the negative environmental impacts related to the unregulated use of chemical herbicides causes new management technologies to be devised to minimize these impacts. In this sense, the objective of this work was to optimize the production of a biocomposite starting from the microorganism *Trichoderma koningiopsis*, as well as to analyze the effects of its application, and to evaluate the acute toxicity of the same using the microcrustacean *Daphnia magna*. In order to do so, a sequence of experimental planning was used, starting with the Plackett & Burman Experimental Design (PB), where 15 trials were carried out to select the previously variables, followed by a triplicate fermentation with the best conditions presented, and after a Rotational Central Compound Design (DCCR2<sup>3</sup>), with 17 trials to perform an analysis among all investigated factors. The independent variables (responses) evaluated were the enzymatic activities of amylases, cellulases, lipases and peroxidases, and the fungal biomass produced was also quantified. A statistical analysis was performed on the variables to verify their significance and also the validity of the proposed model. The results obtained for enzymatic activity and biomass production showed a wide distinction, being that the biocomposite produced from an assay composed by 3.00 mg/L of glucose, 0.75 mg/L of peptone and 0.37 mg/L of yeast extract presented higher values of enzymatic activity for amylases, cellulases and lipases, and in another experiment, composed of 2.25 mg/L glucose, 2.76 mg/L peptone and 0.75 mg/L of yeast extract, a higher enzymatic activity was obtained for peroxidases and greater quantification of fungal biomass. Therefore, these biocomposites were used for evaluation of acute toxicity, and were also applied in the *Euphorbia heterophylla* plant to verify the effects of phytotoxicity. Thus, the results obtained for the acute toxicity tests were EC<sub>50-48h</sub> of 58,637.99 mg/L and 13,583.17 mg/L for the first and second biocomposites, respectively, and with respect to preliminary application, the first biocomposite showed greater phytotoxicity when compared to the second one, demonstrating as effect the yellowing of the leaves of the plant. Considering that this work is of an initial character, great advances related to the subject are reported, and are alternatives for future works, the use of adjuvants for the application of bioproducts, the increase of scale, and an investigation evaluating the potential of other microorganisms in other target plants.

**Key-words:** enzymatic activity, fungal biomass, experimental planning, toxicity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01.</b> (A) Microrganismo <i>Trichoderma koningiopsis</i> obtido do banco de microrganismos do laboratório de Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul - Campus Erechim/RS. (B) Microrganismo <i>Trichoderma koningiopsis</i> repicado em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA). .....	14
<b>Figura 02.</b> Processo de filtração do meio fermentado para obtenção do extrato enzimático e da biomassa fúngica.....	16
<b>Figura 03.</b> Testes de toxicidade aguda realizados em duplicata para diferentes diluições utilizando o microcrustáceo <i>Daphnia magna</i> .....	19
<b>Figura 04.</b> Gráficos de Pareto gerados para indicar os efeitos das variáveis investigadas no Planejamento experimental Plackett & Burman para a produção de biomassa fúngica e para a atividade de amilases, celulases, lipases e peroxidases. ....	23
<b>Figura 05.</b> Superfícies de resposta geradas para avaliação do comportamento da biomassa em função de: (a) Extrato de levedura x Glicose, (b) Peptona x Glicose, e (c) Peptona x Extrato de levedura. ....	30
<b>Figura 06.</b> Gráfico de Pareto gerado para indicar os efeitos das variáveis investigadas sobre a atividade de enzimas amilases.....	33
<b>Figura 07.</b> Superfícies de resposta geradas para avaliação da atividade enzimática de celulases em função de: (a) Extrato de levedura x Glicose, (b) Peptona x Glicose, e (c) Peptona x Extrato de levedura. ....	35
<b>Figura 08.</b> Superfícies de resposta geradas para avaliação da atividade enzimática de lipases em função de: (a) Extrato de levedura x Glicose, (b) Peptona x Glicose, e (c) Peptona x Extrato de levedura. ....	39
<b>Figura 09.</b> Gráfico de Pareto gerado para indicar os efeitos das variáveis investigadas sobre a atividade de enzimas peroxidases.....	42
<b>Figura 10.</b> Efeitos da fitotoxicidade observados nas folhas da planta <i>Euphorbia heterophylla</i> (leiteiro) após 14 dias da aplicação do biocomposto produzido no ensaio 2. ....	46

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01.</b> Parâmetros avaliados para a otimização do processo fermentativo no delineamento experimental do tipo Plackett & Burman (PB).....	15
<b>Tabela 02.</b> Condições fixadas dos parâmetros investigados para a realização da fermentação em triplicata. ....	15
<b>Tabela 03.</b> Parâmetros avaliados para a otimização do processo fermentativo no planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR 2 <sup>3</sup> ).....	15
<b>Tabela 04.</b> Diluições-teste para avaliação da toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i> a partir dos biocompostos produzidos.....	20
<b>Tabela 05.</b> Matriz do delineamento experimental PB (valores reais e codificados) utilizada para a otimização do processo fermentativo, e resultados das medidas de atividade enzimática para amilases, celulasas, lipases e peroxidases, e quantificação da biomassa fúngica obtidas no delineamento experimental PB.....	22
<b>Tabela 06.</b> Médias e erros padrão das medidas de atividade enzimática para amilases, celulasas, lipases e peroxidases, e quantificação da biomassa fúngica obtidas na fermentação realizada em triplicata com condições fixas. ....	24
<b>Tabela 07.</b> Comparação entre os valores dos parâmetros avaliados no delineamento experimental Plackett & Burman (ensaio 7) e na fermentação realizada em triplicata com condições fixas. ....	25
<b>Tabela 08.</b> Matriz do planejamento experimental DCCR 2 <sup>3</sup> (valores reais e codificados) utilizado para a otimização da produção do biocomposto, e resultados das medidas de atividade enzimática para amilases, celulasas, lipases e peroxidases, e quantificação da biomassa fúngica obtidas no planejamento experimental DCCR 2 <sup>3</sup> . ....	27
<b>Tabela 09.</b> Análise de variância dos dados obtidos para a validação da significância estatística do modelo proposto para a produção de biomassa fúngica. ....	30
<b>Tabela 10.</b> Análise de variância dos dados obtidos para a validação da significância estatística do modelo proposto para a atividade de enzimas celulasas.....	35
<b>Tabela 11.</b> Análise de variância dos dados obtidos para a validação da significância estatística do modelo proposto para a atividade de enzimas lipases. ....	38
<b>Tabela 12.</b> Valores de CE <sub>50-48h</sub> obtidos para diferentes herbicidas comerciais através da avaliação da toxicidade utilizando o microcrustáceo <i>D. magna</i> . ....	45

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 METODOLOGIA.....</b>	<b>13</b>
2.1 REPIQUE DO MICRORGANISMO.....	13
2.2 PROCESSO FERMENTATIVO .....	14
2.3 QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA FÚNGICA.....	16
2.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	16
2.4.1 <i>Atividade Enzimática de Amilases</i> .....	17
2.4.2 <i>Atividade Enzimática de Celulases</i> .....	17
2.4.3 <i>Atividade Enzimática de Lipases</i> .....	18
2.4.4 <i>Atividade Enzimática de Peroxidases</i> .....	18
2.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE.....	19
2.5.1 <i>Avaliação da toxicidade aguda utilizando o microcrustáceo Daphnia magna</i> .....	19
2.6 APLICAÇÃO PRELIMINAR DOS BIOCOMPOSTOS PRODUZIDOS .....	20
2.7 ANÁLISE DOS DADOS .....	20
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>21</b>
3.1 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO .....	21
3.1.1 <i>Delineamento Experimental do tipo Plackett &amp; Burman</i> .....	21
3.1.2 <i>Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR 2<sup>3</sup>)</i> .....	25
3.1.3 <i>Análise Estatística</i> .....	29
3.1.3.1 <i>Biomassa</i> .....	29
3.1.3.2 <i>Amilases</i> .....	33
3.1.3.3 <i>Celulases</i> .....	34
3.1.3.4 <i>Lipases</i> .....	38
3.1.3.5 <i>Peroxidases</i> .....	41
3.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA .....	44
3.3 APLICAÇÃO PRELIMINAR DOS BIOCOMPOSTOS PRODUZIDOS .....	45
<b>4 CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DA PESQUISA .....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>48</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>56</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O aumento da produção agrícola devido ao crescimento da população mundial corroborou com a incessante busca por novas tecnologias de manejo visando à ampliação da produtividade (ALMEIDA, 2014). Entretanto, a intensificação da produção agrícola acarreta, direta ou indiretamente, em impactos ao meio ambiente, principalmente por consequência do aumento de cerca de dois milhões de toneladas no uso de pesticidas por ano, incluindo fungicidas (17,5%), herbicidas (47,5%), inseticidas (29,5%), ou quaisquer outros produtos (5,5%) utilizados para o controle de agentes infestantes nas plantações (FAO & ITPS, 2015).

As plantas infestantes, ou plantas daninhas são descritas por Blanco (1972) como toda planta que germine de forma espontânea, e que influenciem de maneira negativa as atividades agropecuárias e as áreas de interesse humano. Também são identificadas por crescerem em outras culturas podendo reduzir a eficiência da colheita (YORK et al., 2005). De acordo com Zanine e Santos (2004), a competição por recursos como água, luz e nutrientes do solo faz com que as plantas daninhas prejudiquem o desenvolvimento das culturas. No entanto, para seu controle realizam-se, na época adequada, aplicações sequenciais de herbicidas, que além de evitar a competição, evitam a interferência negativa na produtividade e mantém as lavouras isentas de plantas daninhas por períodos maiores (ZAGONEL et al., 2000; ZAGONEL & FERNANDES, 2007).

A utilização dos herbicidas tornou-se essencial às práticas de proteção de culturas agrícolas, além de os mesmos também desempenharem ações de controle de espécies invasoras em áreas não agrícolas, como estradas, locais industriais e áreas de conservação em reservas naturais (PROSSER et al., 2016). Porém, o processo de degradação ambiental é acelerado devido ao uso indiscriminado e contínuo desses herbicidas, por provocarem efeitos nocivos aos agroecossistemas, como a possibilidade de residuais em alimentos e a possível contaminação dos aplicadores (GALON et al., 2016).

Prosser et al. (2016) em seu estudo sobre os efeitos indiretos dos herbicidas em ambientes terrestres de borda de campo, destacam que os habitats adjacentes aos campos agrícolas são mais propensos a exposição de herbicidas, pois estão sujeitos a excessos da pulverização, e do transporte realizado via erosão do solo e do vento. Morillo e Villaverde (2017) enfatizam que a utilização excessiva de pesticidas acarreta na poluição grave do solo, e deteriora a qualidade do ambiente por estes serem dispersos através da água, do ar e do solo.

Diante das consequências negativas da utilização dos herbicidas químicos é significativo considerar o manejo sustentável das plantas daninhas integrado ao uso de novas ferramentas como os herbicidas biológicos (ASH, 2010; CORDEAU et al., 2016). De acordo

com Souza et al. (2017) e Reichert Júnior (2017), um herbicida biológico pode, em alguns casos, não causar o mesmo efeito de um herbicida sintético, entretanto, ele possui o potencial de através do controle ou do retardo do crescimento e desenvolvimento das plantas daninhas, proporcionar vantagem na competitividade das culturas.

Cordeau et al. (2016) ainda apresenta outros benefícios da utilização dos herbicidas produzidos por microrganismos, como a diminuição dos impactos sobre o meio ambiente, a promoção da agricultura sustentável, e a redução da dependência de herbicidas sintéticos. Segundo Bailey (2014), os produtos bioherbicidas destinados ao controle de plantas daninhas são obtidos através de organismos vivos, incluídos os metabólitos naturais produzidos durante o crescimento e desenvolvimento desses organismos. As origens biológicas dos bioherbicidas em sua maioria são microbianas (fungos e bactérias), minerais ou produtos resultados de plantas (BAILEY, 2014).

Segundo Reichert Júnior (2017), o bom resultado da aplicação de um bioherbicida decorre, dentre outros fatores, da interação entre o patógeno e a planta alvo. Esse fator determinante na viabilidade de um herbicida biológico tem relação com a especificidade que o microrganismo adquire para uma determinada espécie ou gênero de hospedeiro, evidenciada como *formae specialis* (ASH, 2010; REICHERT JÚNIOR, 2017). Além do mais, adjuvantes podem ser empregados devido a sua capacidade de modificar certas propriedades da solução, melhorando o desempenho da aplicação, minimizando a deriva da pulverização e afetando a formação de espuma, para que se tenha a melhor formulação e o sucesso de um biocomposto com potencial herbicida (ALMEIDA, 2014; CUNHA et al., 2003; LI et al., 2003).

Diversos estudos realizados na área da produção de bioherbicidas utilizam processos de fermentação submersa ou fermentação em estado sólido. Porém, a fermentação em estado sólido é menos difundida devido à dificuldade de controlar as condições da cultura, a complexidade da recuperação dos esporos microbianos, e aos custos elevados (MUPONDWA et al., 2015). Sendo assim, a fermentação submersa é o processo mais utilizado (KLAIC et al., 2015), por apresentar vantagens como propiciar o domínio sobre as condições dos meios de cultivo, possuir facilidade operacional (SOUZA, 2015), ser um processo bem estabelecido industrialmente (BRUN et al., 2016), apresentar elevado crescimento celular de espécies de microrganismos, e ser favorável para o aumento de escala (KLAIC, 2014; KLAIC et al., 2015) destacando-se, dessa forma, como uma interessante opção para a produção dos biocompostos com potencial herbicida (ALMEIDA, 2014).

Além disso, uma grande variedade de microrganismos, especialmente fungos, por produzirem metabólitos secundários denominados fitotoxinas (LI et al., 2003), está sendo

mencionada frequentemente em estudos que visam o efetivo controle biológico de plantas daninhas (ALMEIDA, 2014). Similarmente são citadas algumas enzimas, como lipases ou celulases, por possuírem a capacidade de ser o meio de entrada desses microrganismos ou dessas fitotoxinas nas plantas alvo, e degradarem a membrana lipídica e a parede celular, respectivamente (CORDEAU et al., 2016).

O microrganismo *Trichoderma koningiopsis* é uma espécie comumente encontrada em latitudes tropicais (SAMUELS et al., 2006), muito utilizado por ser de fácil isolamento e cultivo, para o seu crescimento rápido em uma grande variedade de substratos (SANTOS et al., 2012). Também é reconhecido por provocar resistência do hospedeiro contra patógenos, ser potencial no controle biológico de fungos e insetos, e responsável por causar manchas foliares em plantas daninhas (QIAN et al., 2013). Reichert Júnior (2017) estudou a produção de um bioherbicida através de fermentação submersa utilizando o microrganismo *Trichoderma koningiopsis*, e obteve resultados significativos na planta *Euphorbia heterophylla* (leiteiro) mostrando que são requeridos maiores estudos nesta área.

Para tanto, através de uma metodologia de otimização de processos utilizando uma estratégia sequencial de planejamento de experimentos, é possível delimitar as melhores condições para a produção dos bioherbicidas (KLAIC, 2014), além de analisar os efeitos de uma série de variáveis e admitir quais condições são estatisticamente significativas para levarem ao aumento da concentração de biomassa fúngica, e das atividades enzimáticas (KLAIC et al., 2014).

Diante disso e das principais consequências já citadas devido ao uso desregrado dos herbicidas sintéticos, torna-se promissor pensar em alternativas viáveis tanto do ponto de vista ambiental quanto do ponto de vista econômico, para realizar uma gestão sustentável das plantas daninhas. Com isso, o objetivo deste estudo foi otimizar a produção de biocompostos via fermentação submersa, utilizando o fungo *Trichoderma koningiopsis*, para utilização como controle de plantas daninhas em cultivos agrícolas, além de avaliar sua fitotoxicidade através de aplicações na planta *E. heterophylla*, e determinar a toxicidade aguda dos compostos.

## 2 METODOLOGIA

O presente trabalho de conclusão de curso foi realizado no laboratório de Microbiologia e Bioprocessos da Universidade Federal da Fronteira Sul - *Campus* Erechim/RS, onde, para a otimização da produção dos biocompostos com potencial herbicida foi proposta uma sequência de planejamentos experimentais. Os experimentos foram iniciados pela metodologia de delineamento experimental do tipo Plackett & Burman (PB) com 12 ensaios mais 3 pontos centrais, por esta realizar uma seleção prévia das variáveis (RODRIGUES e IEMMA, 2005). Neste planejamento foram investigados: pH (5,0 - 7,0); glicose (0,75 - 2,25 g/mL); extrato de levedura (0,75 - 1,50 g/mL); peptona (0,75 - 2,25g/mL); sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (0,00 - 0,15 g/mL); sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) (0,00 - 0,15 g/mL); sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) (0,00 - 0,30 g/mL) e sulfato de manganês (MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) (0,00 - 0,30 g/mL) (REICHERT JÚNIOR, 2017; SOUZA, 2015). Em seguida, uma fermentação com as condições que apresentaram melhores resultados no planejamento do tipo PB foi conduzida em triplicata, e após esta etapa, foi realizado o Delineamento Composto Central Rotacional com três fatores investigados (DCCR 2<sup>3</sup>), o qual foi composto pelos pontos fatoriais, por 6 pontos axiais e 3 repetições do ponto central, totalizando 17 ensaios (RODRIGUES e IEMMA, 2005). Os parâmetros avaliados neste último planejamento foram: glicose (0,99 - 3,51 g/mL), extrato de levedura (0,24 - 2,76 g/mL) e peptona (0,12 - 1,30 g/mL).

### 2.1 REPIQUE DO MICRORGANISMO

O microrganismo *Trichoderma koningiopsis*, escolhido para as análises de controle de plantas daninhas, foi obtido no banco de microrganismos do Laboratório de Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul - *Campus* Erechim/RS (Figura 01A). Este microrganismo foi isolado a partir da planta daninha *Digitaria horizontalis* (milhã) no município de Quatro Irmãos/RS por Reichert Júnior (2017), o qual é apresentado em seu trabalho pelo código 2QI1. O fungo *Trichoderma koningiopsis* foi selecionado para utilização neste trabalho por apresentar resultados promissores quando comparado com os demais microrganismos testados por Reichert Júnior (2017) no controle de plantas daninhas, destacando-se por seus efeitos fitotóxicos na planta *Euphorbia heterophylla* (leiteiro).

Para a realização das análises, foram efetuadas uma série de repiques em câmara de fluxo laminar, visando a obtenção de um número necessário de placas para atender a todos os ensaios. O repique do microrganismo deu-se em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA) para o crescimento do fungo, esse meio foi preparado

pesando-se 42 g de BDA para cada litro de meio, com aproximadamente 20 mL de meio estimado para cada placa. Após, os mesmos foram incubados em estufa bacteriológica (AmericanLab) por um período de 7 dias a uma temperatura de 28 °C (REICHERT JÚNIOR, 2017; SOUZA, 2015). A Figura 01B apresenta o microrganismo já repicado em uma placa de Petri.

**Figura 01.** (A) Microrganismo *Trichoderma koningiopsis* obtido do banco de microrganismos do laboratório de Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul - Campus Erechim/RS. (B) Microrganismo *Trichoderma koningiopsis* repicado em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA).



**Fonte:** Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos.

## 2.2 PROCESSO FERMENTATIVO

O processo fermentativo utilizado para a obtenção do extrato enzimático e da biomassa fúngica foi a fermentação submersa, baseado em estudos de Reichert Júnior (2017) e Souza (2015). Dessa forma, os parâmetros analisados variaram para cada ensaio de acordo com a estratégia sequencial de planejamentos experimentais composta pelo delineamento experimental do tipo Plackett & Burman (PB) (Tabela 01), experimentos intermediários (Tabela 02) e Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR 2<sup>3</sup>) (Tabela 03).

Para tanto, foram preparados os ensaios contendo as variáveis constituintes do meio nas proporções apresentadas respectivamente para cada planejamento. As diferentes proporções foram adicionadas a erlenmeyers (300 mL) que posteriormente foram completados com água destilada até atingirem um volume de 150 mL de meio de cultura. O meio foi diluído com o auxílio de um agitador magnético (GOstirrer - MS-H-S), e o pH dos ensaios foi ajustado com o auxílio de um pHmetro (TECNAL), seguindo o estabelecido nos planejamentos experimentais.

**Tabela 01.** Parâmetros avaliados para a otimização do processo fermentativo no delineamento experimental do tipo Plackett & Burman (PB).

Variável	Níveis		
	-1	0	+1
pH	5,00	6,00	7,00
Glicose (g/mL)	0,75	1,50	2,25
Extrato de levedura (g/mL)	0,75	1,12	1,50
Peptona (g/mL)	0,75	1,50	2,25
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/mL)	0,00	0,30	0,15
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g/mL)	0,00	0,07	0,15
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g/mL)	0,00	0,15	0,30
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O (g/mL)	0,00	0,15	0,30

**Tabela 02.** Condições fixadas dos parâmetros investigados para a realização da fermentação em triplicata.

Parâmetro	Condição fixada
pH	6,00
Glicose (g/mL)	1,50
Extrato de levedura (g/mL)	1,12
Peptona (g/mL)	1,50
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g/mL)	0,07
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O (g/mL)	0,15

**Tabela 03.** Parâmetros avaliados para a otimização do processo fermentativo no planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR 2<sup>3</sup>).

Variável	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Glicose (g/mL)	0,99	1,50	2,25	3,00	3,51
Extrato de levedura (g/mL)	0,24	0,75	1,50	2,25	2,76
Peptona (g/mL)	0,12	0,37	0,75	1,12	1,30

Os meios de cultura definidos, foram esterilizados em autoclave (Phoenix Lufenco) a uma temperatura de 121 °C durante um período de 30 minutos. Após atingirem a temperatura ambiente, os mesmos foram alocados na capela de fluxo laminar devidamente higienizada e esterilizada, e uma pequena quantidade desse meio foi vertida para as placas de Petri contendo o microrganismo *Trichoderma koningiopsis* já isolado, os esporos foram raspados com o auxílio de uma alça de platina, e após, vertidos novamente para os erlenmeyers.

As fermentações foram realizadas a uma temperatura de 28 °C em agitador orbital (New Brunswick™ Innova® 42), sob agitação de 120 rpm, onde permaneceram nestas condições por 72 horas. O meio obtido após a fermentação foi posteriormente filtrado, como apresentado na Figura 02, para obtenção da biomassa fúngica e do extrato enzimático, sendo que o extrato foi armazenado em embalagens de polietileno e mantido em refrigerador a uma

temperatura de aproximadamente 5 °C para a posterior determinação das atividades enzimáticas.

**Figura 02.** Processo de filtração do meio fermentado para obtenção do extrato enzimático e da biomassa fúngica.



**Fonte:** Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos.

### 2.3 QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA FÚNGICA

Para a quantificação da biomassa fúngica foi utilizado o método de massa do micélio seco por mL de meio de cultura (GERN, 2005). Primeiramente os papéis filtro Whatman número 1 juntamente com as respectivas placas de Petri de cada ensaio foram pesados. A biomassa obtida após a filtração, foi pesada para obtenção do peso úmido, e após permaneceu em estufa (SOLAB) para secagem a uma temperatura de 40 °C por aproximadamente 48 horas. Depois de atingirem a temperatura ambiente, alocadas em dessecadores para não reterem umidade, as placas foram pesadas novamente para a obtenção da massa micelial seca. A biomassa fúngica do microrganismo *Trichoderma koningiopsis* foi calculada pela diferença de massa, e foi dada em g/L.

### 2.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática foi determinada para as enzimas amilases, celulasas, lipases e peroxidases, por serem enzimas relatadas em estudos nesta área, além de suas metodologias serem compatíveis com os equipamentos e reagentes disponíveis no laboratório. Para a determinação das atividades enzimáticas foram realizadas triplicatas de cada ensaio. A unidade de atividade enzimática (U/mL), por definição, foi a quantidade de enzima capaz de

catalisar a reação com formação de 1  $\mu\text{mol}$  por minuto de produto nas condições de reação (PEREIRA, 2013).

#### **2.4.1 Atividade Enzimática de Amilases**

A atividade das enzimas amilases foi estabelecida pelo método descrito por Fuwa (1954) e Pongsawadi e Yagisawa (1987), com algumas alterações. Para tanto, amido solúvel foi diluído em tampão acetato 100 mM, pH 5,0 na proporção de 1:100 (m:V). Após, 1 mL do amido diluído foi pipetado juntamente com 1 mL do extrato enzimático em tubos de ensaio, e deixados em banho termostático com circulação interna (NOVA Instruments) por 10 minutos a uma temperatura de 38 °C. Para o controle (branco), o extrato enzimático foi substituído por 1 mL de água destilada.

A atividade foi determinada utilizando o método de DNS (ácido dinitrossalicílico) descrito por Miller (1959), onde 0,5 mL da solução mais 0,5 mL de DNS foram adicionados em tubos de ensaio e mantidos em banho termostático por um período de 10 minutos a uma temperatura de aproximadamente 100 °C. Após 10 minutos, os tubos de ensaio foram adicionados ao banho de gelo até atingirem a temperatura ambiente, e neste momento foram adicionados 8 mL de tartarato de sódio para posterior leitura em espectrofotômetro UV-VIS 540 nm (FEMTO - Cirrus 80).

#### **2.4.2 Atividade Enzimática de Celulases**

Para a determinação da atividade das enzimas celulases foi seguido o proposto por Ghose (1987), porém com algumas alterações. Dessa forma, foram pesados aproximadamente 50 mg (7 fragmentos de 1  $\text{cm}^2$ ) de papel filtro Whatman número 1, responsável pela fonte de celulose. Os mesmos foram adicionados a tubos de ensaio contendo 2 mL de tampão acetato 0,2 M, pH 5,5. Após, 1 mL da solução enzimática foi adicionada aos tubos de ensaio, e os mesmos foram mantidos em banho termostático a uma temperatura de 50 °C por um período de 1 hora. No controle, a solução enzimática foi substituída por 1 mL de água destilada.

A liberação de açúcares redutores foi determinada pelo método de ácido dinitrossalicílico (DNS), descrito por Miller (1959), como apresentado anteriormente.

A medida de atividade das enzimas celulases foi realizada utilizando a Equação 1:

$$ABS = 0,2672 * [ ]ART$$

$$[ ]ART = \frac{ABS}{0,2672}$$

Equação (1)

Onde ART corresponde aos açúcares redutores totais.

#### **2.4.3 Atividade Enzimática de Lipases**

A medida de atividade das enzimas lipases foi determinada de acordo com o proposto por Treichel et al. (2016), onde 1 mL da solução enzimática foi pipetado em 9 mL de emulsão. A emulsão foi composta por 5% (v/v) de goma arábica, 10% (v/v) de óleo de oliva e tampão fosfato 100 mM, pH 6,0, a mistura foi homogeneizada com o auxílio de um mixer. Posteriormente, os béqueres contendo a solução foram levados ao agitador orbital por 32 minutos a uma temperatura de 35 °C e 165 rpm. Para cessar a reação, depois de retirados do agitador orbital, foram adicionados 10 mL da solução acetona etanol (1:1, v/v). Os mesmos foram titulados, adicionando-se hidróxido de sódio (NaOH) 0,049 M até a solução atingir pH 11. O controle (branco reacional) foi composto por 9 mL de emulsão, 10 mL de acetona etanol, e 1 mL da enzima, porém, o mesmo não foi levado ao agitador orbital.

Para a determinação da atividade enzimática foi utilizada a Equação 2:

$$At = \frac{(\bar{A}a - Vb) * MNaOH}{t * Vc} * 1000$$

Equação (2)

Onde,

$\bar{A}a$  = média dos valores observados;

$Vb$  = valor apresentado pelo controle;

$MNaOH$  = molaridade do Hidróxido de sódio;

$t$  = tempo de reação;

$Vc$  = volume enzimático utilizado.

#### **2.4.4 Atividade Enzimática de Peroxidases**

Para determinar a atividade das enzimas peroxidases foi seguido o proposto por Khan e Robinson (1994), onde foi necessário preparar um meio reacional, em tubos de ensaio, contendo 1,5 mL de tampão fosfato 5 mM, pH 5,0; 2 mL de água destilada; 0,5 mL de guaiacol (1%) e 1 mL de peróxido de hidrogênio (8%). O meio reacional foi exposto a banho termostático por um período de 10 minutos a uma temperatura de 35 °C. Após a estabilização da temperatura foi adicionado 1 mL do extrato enzimático ao meio reacional, mantendo-o por 20 minutos em banho termostático. O controle (branco) foi preparado nas mesmas condições, porém o extrato enzimático foi substituído por água destilada. A leitura de absorbância foi

realizada em espectrofotômetro UV-VIS 470 nm. O cálculo da medida de atividade foi realizado através da média dos valores da triplicata multiplicado por 1000.

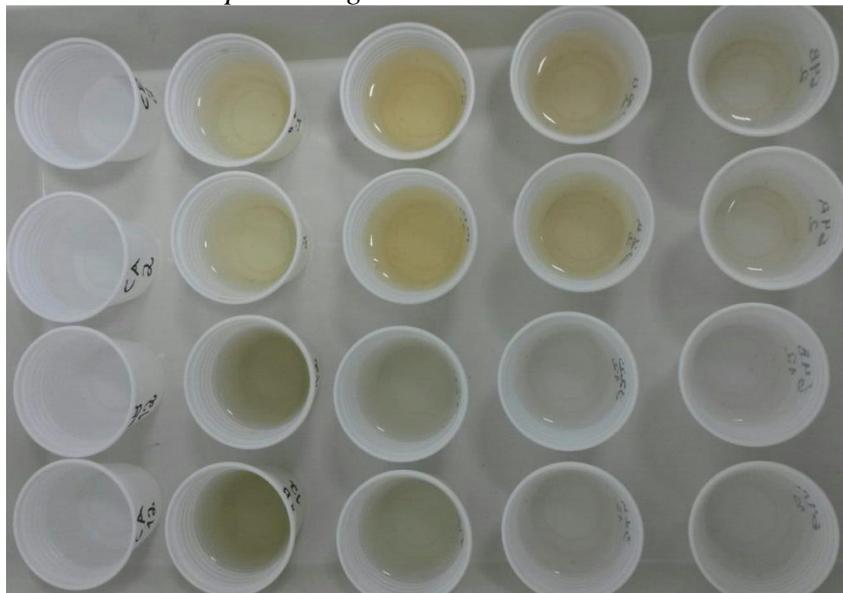
## 2.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

A avaliação da toxicidade dos biocompostos foi realizada através de testes agudos utilizando o microcrustáceo *Daphnia magna*.

### 2.5.1 Avaliação da toxicidade aguda utilizando o microcrustáceo *Daphnia magna*

Nos testes de toxicidade aguda são observadas as manifestações de certo efeito, em um espaço de tempo curto, depois da administração de uma única dose de determinada substância (MATIAS, 2005). Para tanto, os testes de toxicidade aguda foram realizados de acordo com a NBR 12.713 da ABNT (2004), no Laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade Federal da Fronteira Sul - *Campus* Erechim/RS. Os testes tiveram uma duração de 48 horas, onde indivíduos jovens (2 até 26 horas de vida) do microcrustáceo *Daphnia magna* foram colocados em recipientes como apresentado na Figura 03.

**Figura 03.** Testes de toxicidade aguda realizados em duplicata para diferentes diluições utilizando o microcrustáceo *Daphnia magna*.



**Fonte:** A autora.

Para tanto, em cada diluição, no período de 24 e 48 horas, foram verificados quantos organismos estavam imóveis. Os testes foram realizados em duplicata, e em cada recipiente com capacidade de 50 mL, foram adicionadas diluições com um volume máximo de 25 mL.

O teste foi estático, não ocorreu a troca do meio e nem houve alimentação. O ensaio controle foi constituído somente com água ISO, composta por soluções de cloreto de cálcio,

sulfato de magnésio, cloreto de potássio e bicarbonato de sódio. A Tabela 04 apresenta as diluições utilizadas para a avaliação da toxicidade aguda dos biocompostos produzidos.

**Tabela 04.** Diluições-teste para avaliação da toxicidade aguda com *Daphnia magna* a partir dos biocompostos produzidos.

Diluição da amostra	Fator de diluição FD	Concentração da solução-teste (%)	Volume da amostra (mL)
Controle	-	-	-
1:1	1	100,00	50,00
1:4	4	25,00	12,50
1:8	8	12,50	6,26
1:16	16	6,25	3,13
1:32	32	3,12	1,56
1:64	64	1,56	0,78
1:128	128	0,78	0,39

**Fonte:** Knie e Lopes (2004), adaptado pela autora.

## 2.6 APLICAÇÃO PRELIMINAR DOS BIOCOMPOSTOS PRODUZIDOS

Após a produção dos biocompostos, com a cooperação do grupo de pesquisa do Laboratório de Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul - *Campus Erechim/RS*, o extrato obtido em sua forma bruta e filtrada, foi administrado na planta *Euphorbia heterophylla* (leiteiro), com aplicações de até três repetições. O extrato filtrado foi aplicado sob pulverização com o auxílio de um borrifador de jardim, e o extrato bruto foi aplicado com o auxílio de um pincel, sendo os mesmos aplicados diretamente sobre a parte aérea da planta.

As análises foram realizadas de forma visual, após 7 e 14 dias da aplicação, onde a fitotoxicidade foi analisada a partir de uma escala diagramática descrita por Nunes & Alves (2012) com algumas adaptações, a qual está apresentada no Anexo A.

## 2.7 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos através da realização dos ensaios de fermentação foram analisados com auxílio do Software STATISTICA 8.0 através da análise de variância (ANOVA), e a análise do teste de toxicidade aguda foi realizada utilizando o Software GraphPad prism.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO

A otimização do processo fermentativo deu-se através de uma sequência de planejamentos experimentais que visaram atingir os maiores resultados de atividade enzimática para amilases, celulasas, lipases e peroxidases, e igualmente a maior quantificação de biomassa fúngica, para maximizar a produção e diminuir os custos dos biocompostos com potencial herbicida.

##### *3.1.1 Delineamento Experimental do tipo Plackett & Burman*

A metodologia de delineamento experimental do tipo Plackett & Burman foi selecionada por ser eficiente na verificação dos principais efeitos. Os resultados obtidos para as atividades enzimáticas e a quantificação da biomassa fúngica após seguir este primeiro planejamento experimental realizado estão apresentados na Tabela 05, onde é possível identificar que todos os ensaios apresentaram respostas distintas para os parâmetros avaliados, e sendo assim, pode-se afirmar que a quantidade de cada componente presente no meio de cultura tem uma forma de influência diferente na atividade das enzimas analisadas, e também na produção da biomassa fúngica. Segundo Neves (2003), as enzimas são responsáveis pela regulação do metabolismo dos microrganismos, porém, os mesmos podem modificar seu metabolismo devido a alterações no meio.

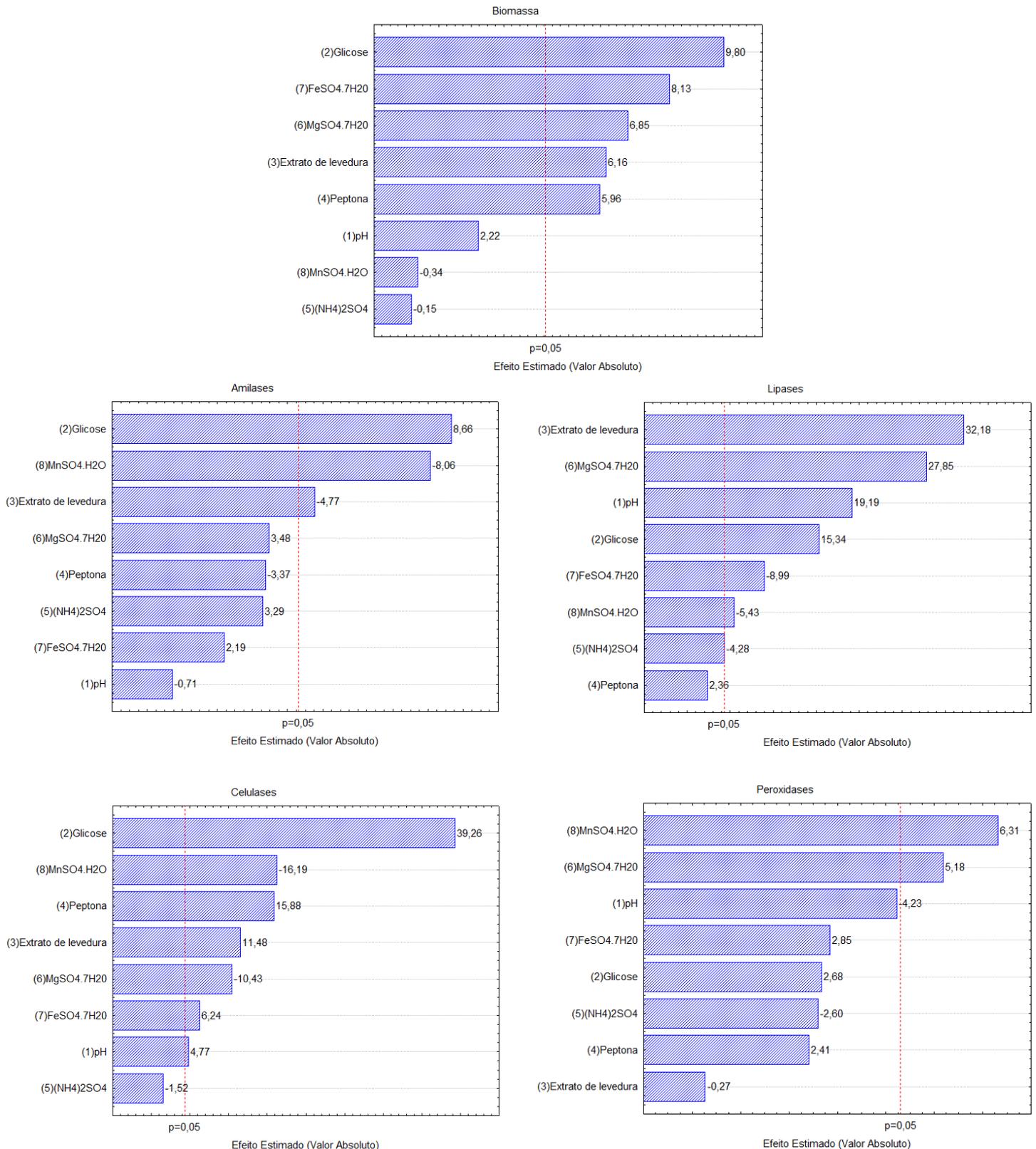
De acordo com os resultados expressos na Tabela 05, verifica-se que cada ensaio apresentou maiores resultados para algum dos parâmetros avaliados, como no caso do ensaio 7, responsável pela maior produção de biomassa fúngica (10,20 g/L). Quanto as atividades enzimáticas, o ensaio 5 apresentou maior atividade para amilases (1,70 U/mL) e celulasas (0,38 U/mL), o ensaio 6 maior atividade para lipases (15,26 U/mL), e o ensaio 11 maior atividade para peroxidases (131,00 U/mL). Porém, foi possível perceber que não houve maiores valores de atividade enzimática ou biomassa em um único ensaio.

**Tabela 05.** Matriz do delineamento experimental PB (valores reais e codificados) utilizada para a otimização do processo fermentativo, e resultados das medidas de atividade enzimática para amilases, celulasas, lipases e peroxidases, e quantificação da biomassa fúngica obtidas no delineamento experimental PB.

Ensaio	pH	Glicose	Extrato de levedura	Peptona	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	Amilases (U/mL)	Celulasas (U/mL)	Lipases (U/mL)	Peroxidases (U/mL)	Biomassa (g/L)
1	(7,0) 1	(0,75) -1	(1,50) 1	(0,75) -1	(0,00) -1	(0,00) -1	(0,30) 1	(0,30) 1	0,02	0,15	2,91	56,00	5,93
2	(7,0) 1	(2,25) 1	(0,75) -1	(2,25) 1	(0,00) -1	(0,00) -1	(0,00) -1	(0,30) 1	0,52	0,26	1,28	49,00	4,80
3	(5,0) -1	(2,25) 1	(1,50) 1	(0,75) -1	(0,15) 1	(0,00) -1	(0,00) -1	(0,00) -1	1,33	0,36	1,28	41,33	4,80
4	(7,0) 1	(0,75) -1	(1,50) 1	(2,25) 1	(0,00) -1	(0,15) 1	(0,00) -1	(0,00) -1	0,45	0,25	9,85	68,00	6,60
5	(7,0) 1	(2,25) 1	(0,75) -1	(2,25) 1	(0,15) 1	(0,00) -1	(0,30) 1	(0,00) -1	1,70	0,38	2,35	51,67	8,73
6	(7,0) 1	(2,25) 1	(1,50) 1	(0,75) -1	(0,15) 1	(0,15) 1	(0,00) -1	(0,30) 1	1,08	0,15	15,26	53,00	8,00
7	(5,0) -1	(2,25) 1	(1,50) 1	(2,25) 1	(0,00) -1	(0,15) 1	(0,30) 1	(0,00) -1	1,34	0,29	10,61	67,33	10,20
8	(5,0) -1	(0,75) -1	(1,50) 1	(2,25) 1	(0,15) 1	(0,00) -1	(0,30) 1	(0,30) 1	0,04	0,15	0,31	67,67	5,87
9	(5,0) -1	(0,75) -1	(0,75) -1	(2,25) 1	(0,15) 1	(0,15) 1	(0,00) -1	(0,30) 1	0,53	0,07	0,00	86,00	5,07
10	(7,0) 1	(0,75) -1	(0,75) -1	(0,75) -1	(0,15) 1	(0,15) 1	(0,30) 1	(0,00) -1	1,40	0,08	1,68	22,00	4,67
11	(5,0) -1	(2,25) 1	(0,75) -1	(0,75) -1	(0,00) -1	(0,15) 1	(0,30) 1	(0,30) 1	1,33	0,24	0,51	131,00	7,33
12	(5,0) -1	(0,75) -1	(0,75) -1	(0,75) -1	(0,00) -1	(0,00) -1	(0,00) -1	(0,00) -1	0,94	0,04	0,25	21,00	2,47
13	(6,0) 0	(1,50) 0	(1,12) 0	(1,50) 0	(0,30) 0	(0,07) 0	(0,15) 0	(0,15) 0	0,85	0,07	0,41	55,67	8,53
14	(6,0) 0	(1,50) 0	(1,12) 0	(1,50) 0	(0,30) 0	(0,07) 0	(0,15) 0	(0,15) 0	0,60	0,08	1,73	116,33	9,13
15	(6,0) 0	(1,50) 0	(1,12) 0	(1,50) 0	(0,30) 0	(0,07) 0	(0,15) 0	(0,15) 0	0,65	0,08	2,35	71,33	8,40

Após o tratamento estatístico dos dados, foi possível gerar o gráfico de Pareto para os parâmetros com o intuito de verificar os efeitos das variáveis investigadas (Figura 04).

**Figura 04.** Gráficos de Pareto gerados para indicar os efeitos das variáveis investigadas no Planejamento experimental Plackett & Burman para a produção de biomassa fúngica e para a atividade de amilases, celulases, lipases e peroxidases.



Nesse sentido, foi verificado que para praticamente todos os parâmetros analisados, os sais sulfato de manganês ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) e sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) apresentaram significância ( $p < 0,05$ ) negativa e positiva, respectivamente, enquanto o sal sulfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) não apresentou significância ( $p > 0,05$ ) para nenhum dos parâmetros. Ainda com relação a significância das variáveis, as fontes de carbono e nitrogênio (glicose, extrato de levedura e peptona), foram significantes ( $p < 0,05$ ) para todos os parâmetros, exceto pra peroxidases. Convém salientar que este tipo de planejamento de experimentos é fatorial fracionário, e assim não são feitas todas as combinações possíveis entre as variáveis. Este fato não permite que modelos matemáticos estatísticos sejam construídos e os próximos experimentos são delineados após a análise de efeitos.

Assim, após a análise dos dados, foi proposta a realização de uma nova fermentação, levando em conta a avaliação de significância das variáveis e os maiores resultados para a produção de biomassa e atividade enzimática, onde os sais sulfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) e sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) foram retirados por não se mostrarem significativos ( $p > 0,05$ ) na maioria dos parâmetros. Além disso, as condições das variáveis presentes nos ensaios que apresentaram os maiores resultados para produção de biomassa e maior atividade enzimática no delineamento experimental PB foram avaliadas, e valores fixos foram estabelecidos para estes parâmetros visando obter um incremento nos resultados. Sendo assim, optou-se por conduzir uma nova fermentação em triplicata com condições fixas, onde os valores da média e o erro padrão de atividade enzimática para as enzimas estudadas e para a quantidade de biomassa produzida resultantes estão apresentados na Tabela 06.

**Tabela 06.** Médias e erros padrão das medidas de atividade enzimática para amilases, celulasas, lipases e peroxidases, e quantificação da biomassa fúngica obtidas na fermentação realizada em triplicata com condições fixas.

<b>Medidas de Atividade Enzimática</b>				
<b>Amilases (U/mL)</b>	<b>Celulasas (U/mL)</b>	<b>Lipases (U/mL)</b>	<b>Peroxidases (U/mL)</b>	<b>Biomassa (g/L)</b>
0,72±0,02	0,09±0,01	4,59±0,79	22,44±1,68	3,41±0,04

Observando os valores da Tabela 06, verificou-se uma diminuição considerável tanto na quantidade de biomassa fúngica quanto nas atividades enzimáticas para todas as enzimas em estudo. Como os resultados não foram os esperados, uma vez que foram conduzidos nas condições do planejamento PB que apresentaram maiores respostas, realizou-se uma comparação entre os dois casos. Nesse sentido, foram comparadas as condições desta última fermentação com as condições de fermentação do delineamento experimental PB. Os ensaios

que resultaram em maior quantidade de biomassa foram equiparados, por esse fator indicar a maior afinidade do microrganismo pela composição do meio de fermentação, pois de acordo com Costa et al. (2010) a quantidade de biomassa fúngica produzida está intimamente relacionada com as exigências nutricionais dos microrganismos.

Desse modo, a Tabela 07 equipara as condições dos parâmetros entre a fermentação realizada em triplicata com condições fixas, e o ensaio 7 do delineamento experimental do tipo Plackett & Burman por ser o ensaio que apresentou a maior quantidade de biomassa fúngica.

**Tabela 07.** Comparação entre os valores dos parâmetros avaliados no delineamento experimental Plackett & Burman (ensaio 7) e na fermentação realizada em triplicata com condições fixas.

<b>Parâmetro</b>	<b>Plackett &amp; Burman (ensaio 7)</b>	<b>Fermentação em triplicata</b>
pH	5,00	6,00
Glicose (g/mL)	2,25	1,50
Extrato de levedura (g/mL)	1,50	1,12
Peptona (g/mL)	2,25	1,50
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/mL)	0,00	0,00
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g/mL)	0,15	0,07
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g/mL)	0,30	0,00
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O (g/mL)	0,00	0,15

A partir da comparação entre os dois processos fermentativos não foi possível chegar a uma conclusão de quais eram as melhores condições para a produção do biocomposto. Logo, com os resultados destes testes preliminares, pode-se apenas estabelecer uma faixa de pH favorável, além de verificar a necessidade da presença de alguns sais, e analisar a abrangência das quantidades de cada componente presentes do meio de cultura. Dessa maneira, optou-se pela realização de um delineamento fatorial completo, por se tratar de um planejamento que engloba todas as combinações possíveis entre os níveis fatoriais sondados (MENDONÇA, 2012).

### **3.1.2 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR 2<sup>3</sup>)**

O Delineamento Composto Central Rotacional com três fatores investigados (DCCR 2<sup>3</sup>) teve as variáveis (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O fixadas em 0,60 g/mL e 0,30 g/mL, respectivamente. O pH também foi fixado (5,0), porém, seus valores foram medidos antes e após a fermentação para verificar a necessidade de ajuste caso diferisse muito do valor fixado. No entanto, não houve uma disparidade considerável nos valores de pH determinados antes e

após o processo fermentativo, e isto pode estar relacionado ao equilíbrio entre a relação C:N no meio, pois de acordo com Marçal et al. (2015), esta relação é essencial para que a variação no pH não ocorra. Além disso, os sais  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  e  $MnSO_4 \cdot H_2O$  foram retirados após a avaliação dos testes precedentes, uma vez que testados seus valores fixos, ocorreu a diminuição de todas as respostas estudadas.

A metodologia seguida foi a mesma dos demais planejamentos. Entretanto, salienta-se que para a determinação das respostas de atividade enzimática nos ensaios 2, 5, 6, 9, 10, 11, 13, 15 e 17 para amilases, e nos ensaios 1, 2, 5, 6, 9, 10, 11, 13, 15 e 17 para celulases, houve a necessidade de realizar uma diluição na ordem de 1:5, com água destilada, pois os valores obtidos na leitura de absorbância em espectrofotômetro, ultrapassavam o valor limite da curva de calibração de concentração de açúcares redutores. Para os demais ensaios de todas as enzimas estudadas não houve necessidade de diluição.

Dessa forma, buscou-se avaliar os efeitos das fontes de carbono (glicose) e nitrogênio (extrato de levedura e peptona) (HASAN, 2017), na produção de biomassa fúngica e na atividade das enzimas mencionadas, buscando a possibilidade de aplicação dos biocompostos. Os valores para as atividades enzimáticas e a quantificação da biomassa fúngica resultantes do planejamento experimental DCCR 2<sup>3</sup> estão apresentadas na Tabela 08.

**Tabela 08.** Matriz do planejamento experimental DCCR 2<sup>3</sup> (valores reais e codificados) utilizado para a otimização da produção do biocomposto, e resultados das medidas de atividade enzimática para amilases, celulases, lipases e peroxidases, e quantificação da biomassa fúngica obtidas no planejamento experimental DCCR 2<sup>3</sup>.

<b>Ensaio</b>	<b>Glicose</b>	<b>Extrato de levedura</b>	<b>Peptona</b>	<b>Amilases (U/mL)</b>	<b>Celulases (U/mL)</b>	<b>Lipases (U/mL)</b>	<b>Peroxidases (U/mL)</b>	<b>Biomassa (g/L)</b>
<b>1</b>	(1,50) -1	(0,75) -1	(0,37) -1	3,45	6,51	1,89	36,33	1,44
<b>2</b>	(3,00) +1	(0,75) -1	(0,37) -1	17,25	10,62	3,22	41,00	1,85
<b>3</b>	(1,50) -1	(2,25) +1	(0,37) -1	0,36	0,16	0,61	116,33	7,97
<b>4</b>	(3,00) +1	(2,25) +1	(0,37) -1	0,82	0,38	8,22	56,00	7,43
<b>5</b>	(1,50) -1	(0,75) -1	(1,12) +1	9,06	5,15	3,62	46,33	2,18
<b>6</b>	(3,00) +1	(0,75) -1	(1,12) +1	14,43	8,53	0,00	60,00	2,37
<b>7</b>	(1,50) -1	(2,25) +1	(1,12) +1	0,65	0,21	0,00	125,67	9,71
<b>8</b>	(3,00) +1	(2,25) +1	(1,12) +1	0,71	0,36	0,00	90,67	9,81
<b>9</b>	(0,99) -1,68	(1,50) 0	(0,75) 0	5,94	3,08	0,00	54,00	3,43
<b>10</b>	(3,51) +1,68	(1,50) 0	(0,75) 0	12,64	7,59	0,00	73,33	6,80
<b>11</b>	(2,25) 0	(0,24) -1,68	(0,75) 0	12,11	6,76	0,05	44,00	1,57
<b>12</b>	(2,25) 0	(2,76) +1,68	(0,75) 0	0,79	0,34	0,41	127,00	9,25
<b>13</b>	(2,25) 0	(1,50) 0	(0,12) -1,68	11,57	7,49	1,89	71,33	2,38
<b>14</b>	(2,25) 0	(1,50) 0	(1,30) +1,68	0,68	0,34	0,00	169,00	6,17
<b>15</b>	(2,25) 0	(1,50) 0	(0,75) 0	9,76	6,37	0,00	78,00	4,60
<b>16</b>	(2,25) 0	(1,50) 0	(0,75) 0	0,53	0,35	0,00	132,33	5,58
<b>17</b>	(2,25) 0	(1,50) 0	(0,75) 0	8,38	4,55	0,00	72,67	3,62

Desta maneira, é possível observar que o ensaio 8 foi o responsável pela maior produção de biomassa fúngica (9,81 g/L), e este fato pode estar vinculado a composição do meio, uma vez que o mesmo foi suplementado pelas maiores quantidades de glicose (3,51 g/mL), extrato de levedura (2,76 g/mL) e peptona (1,30 g/mL), ocasionando uma alta disponibilidade de carbono, aminoácidos e nitrogênio para o microrganismo (NEVES, 2003; SBARDELOTTO et al., 2013). Quanto as atividades enzimáticas, os ensaios que apresentaram maiores respostas foram o ensaio 2 para amilases (17,25 U/mL) e celulasas (10,62 U/mL), composto pela maior concentração de glicose (3,00 g/mL), o ensaio 4 para lipases (8,22 U/mL), composto pelas maiores concentrações de glicose e extrato de levedura (3,00 g/mL e 2,25 g/mL, respectivamente), e o ensaio 14 para peroxidases (169,00 U/mL), composto pela maior concentração de peptona (1,30 g/mL). Da mesma forma que no planejamento PB, nenhum dos ensaios se sobressaiu em todos os parâmetros avaliados, e embora as atividades enzimáticas não tenham sido elevadas em alguns ensaios, destaca-se a ampla gama de atividades para as enzimas estudadas em todos os biocompostos, indicando potencial para variadas aplicações na degradação de diversos substratos (GRIEBELER et al., 2015).

No estudo de Reichert Júnior (2017) sobre a produção de um bioherbicida, os valores para as atividades de amilases (1,32 U/mL), celulasas (11,45 U/mL), lipases (9,84 U/mL) e peroxidases (261,33 U/mL) foram semelhantes aos maiores resultados encontrados neste trabalho, para as mesmas enzimas citadas. É possível verificar um aumento significativo na atividade de amilases, e da mesma maneira, um decréscimo na atividade de peroxidases. No entanto, houve uma otimização do meio fermentativo neste trabalho, uma vez que os sais  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  e  $MnSO_4 \cdot H_2O$  foram retirados, e os sais  $(NH_4)_2SO_4$  e  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , além do pH tiveram seus valores fixados. Se pensado do ponto de vista econômico, é vantajosa a produção otimizada, pois mesmo com a ausência de dois dos sais, as atividades se mantiveram similares, além de ocorrer o acréscimo da atividade para amilases.

Outro fato que pode ser observado na Tabela 08 corresponde aos ensaios que apresentaram maior quantidade de biomassa fúngica e igualmente maior atividade enzimática para peroxidases. Esta ocorrência pode estar relacionada a quantidade de glicose presente no meio, pois de acordo com Baptista et al. (2012), se a glicose é utilizada como co-substrato nutricional juntamente com outras fontes de carbono, a produção de algumas enzimas é potencializada, o que pode ser verificado em seu estudo com relação a lignina-peroxidase. No estudo de Faria (2010) quando a suplementação do meio ocorreu com glicose e milhocina, houve simultaneamente um aumento do crescimento de biomassa e da produção de

manganês-peroxidase. Schneider et al. (2016), da mesma forma, encontrou o maior crescimento micelial e também a maior produção de manganês-peroxidase quando ocorria a maior concentração de glicose. Ainda quanto a glicose, Muller (2016) afirma que se utilizada como fonte de carbono, é de fácil assimilação e causa o aumento rápido do crescimento de microrganismos.

Também foi possível verificar que as maiores respostas de atividade enzimática para amilases e celulasas se apresentaram nos mesmos biocompostos, o que pode indicar uma correlação entre as atividades destas enzimas, podendo induzir interações para as aplicações futuras. Jurado et al. (2014), verificou que as oito enzimas, incluindo amilases, celulasas e lipases, analisadas em seu estudo sobre compostagem, estavam correlacionadas. Os autores sugerem que este fato poderia contribuir para relações entre diversos grupos microbianos, além de substratos orgânicos de plantas.

### **3.1.3 Análise Estatística**

A partir dos resultados satisfatórios obtidos, os dados foram analisados estatisticamente com auxílio do Software STATISTICA 8.0, e dessa forma foi possível identificar quais foram as variáveis significativas e não significativas para os testes realizados, além de verificar a validação dos modelos empíricos propostos.

#### **3.1.3.1 Biomassa**

A produção de biomassa fúngica teve seu modelo validado com uma confiança de 95%, sendo o modelo matemático proposto, de primeira ordem, apresentado na Equação 3. Os parâmetros estatisticamente não significativos ( $p > 0,05$ ) foram retirados do modelo.

$$\text{Produção de biomassa} = 4,57 + 2,92 * \text{Extrato de Levedura} + 0,86 * \text{Peptona}$$

Equação (3)

Percebe-se que a produção de biomassa fúngica está intimamente relacionada com a quantidade de extrato de levedura e de peptona presentes no meio fermentativo, sendo que as duas variáveis demonstraram significância ( $p < 0,05$ ) positiva, indicando que quanto maiores as quantidades destes dois produtos utilizadas, maior será a biomassa produzida.

Além disso, a análise de variância (ANOVA) foi efetuada, e através da verificação da Tabela 09 é possível identificar a validade do modelo, uma vez que o F calculado (9,97) foi maior que o F tabelado (3,68), com um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 93%, mostrando um bom ajuste dos dados ao modelo proposto.

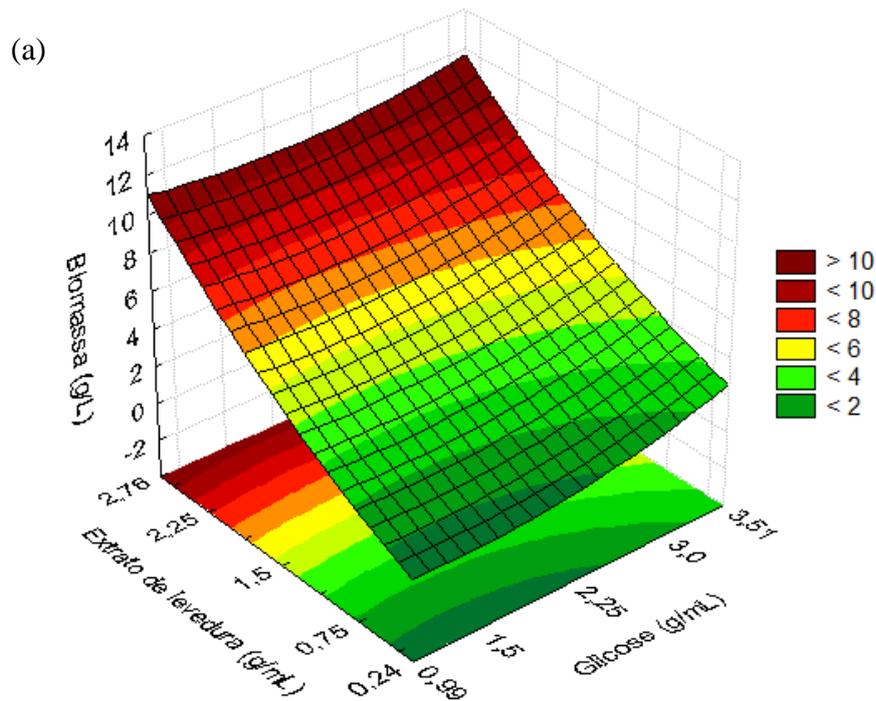
**Tabela 09.** Análise de variância dos dados obtidos para a validação da significância estatística do modelo proposto para a produção de biomassa fúngica.

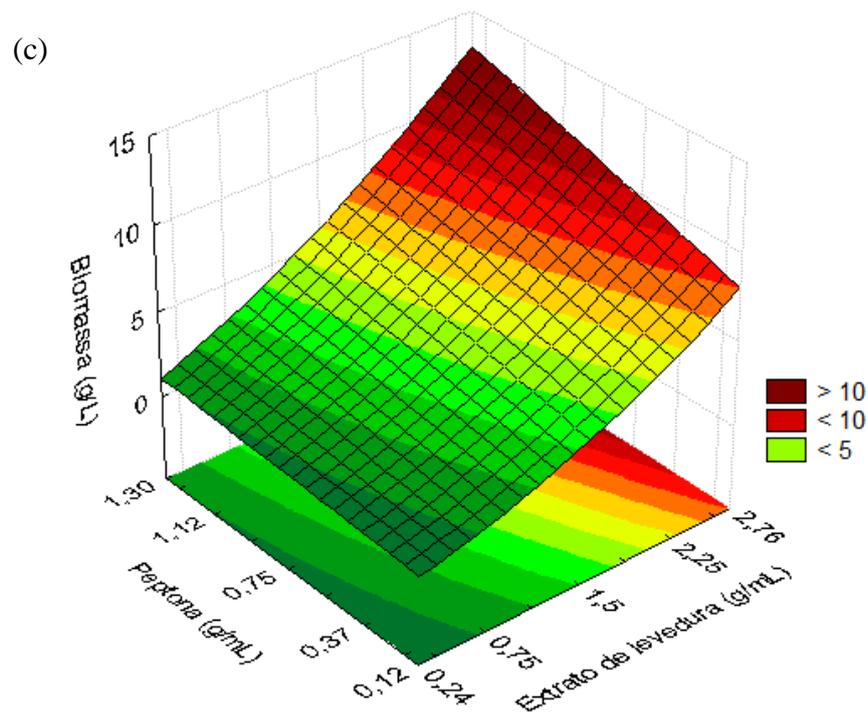
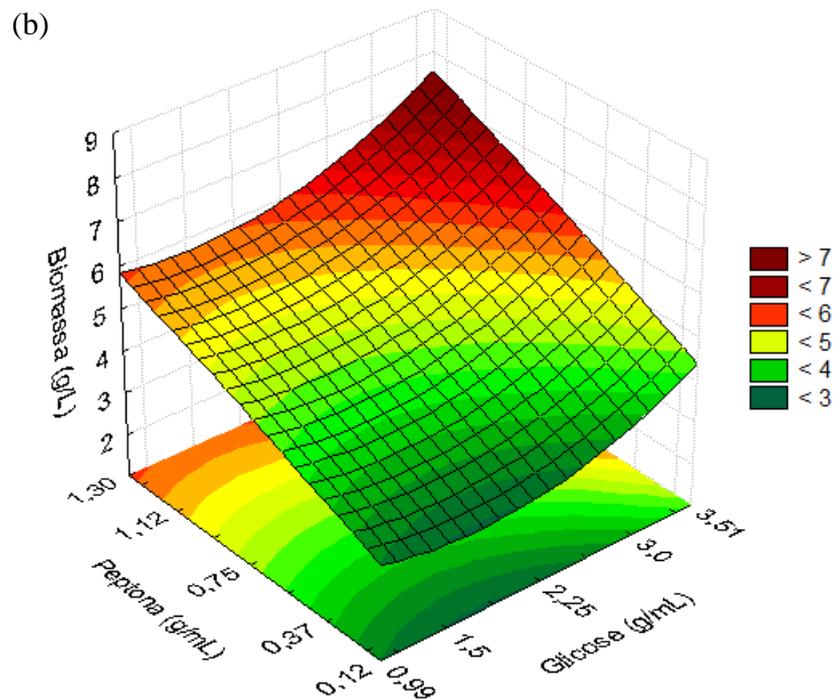
Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado
Regressão	133,16	9	14,79	9,97
Resíduo	10,38	7	1,48	
Total	143,54	16		

\* F tabelado  $_{95\%; 9;7} = 3,68$

Depois de validado o modelo matemático para a produção de biomassa fúngica, foram geradas as superfícies de resposta apresentadas na Figura 05.

**Figura 05.** Superfícies de resposta geradas para avaliação do comportamento da biomassa em função de: (a) Extrato de levedura x Glicose, (b) Peptona x Glicose, e (c) Peptona x Extrato de levedura.





Pode-se analisar na Figura 05(a) que apresenta a relação entre extrato de levedura e glicose, que o aumento da quantidade de biomassa produzida é proporcional as maiores quantidades dos dois produtos avaliados, além de que o extrato de levedura tem maior influência sobre a produção de biomassa do que a glicose, fato que foi provado através da validade do modelo. O mesmo pode ser observado nas Figuras 05(b) e 05(c), onde a maior produção de biomassa ocorreu quando nas maiores quantidades de peptona e glicose, e

peptona e extrato de levedura, respectivamente. Porém, como foi demonstrado na validação do modelo matemático, a glicose é a variável que não apresentou efeito significativo ( $p > 0,05$ ), se mostrando de menor influência quando comparada a peptona como na Figura 05(b). Além disso, é possível verificar na Figura 05(c) que a relação peptona x extrato de levedura foi a que apresentou maior resposta para a produção de biomassa, e na mesma superfície de resposta, ainda se verifica que o extrato de levedura é mais influente do que a peptona. Portanto, estudando as três superfícies geradas, verifica-se que as melhores condições para a produção de biomassa ocorreram nos valores máximos das três variáveis, extrato de levedura (2,76 g/mL), glicose (3,51 g/mL) e peptona (1,30 g/mL).

Dessa forma, é possível observar o efeito significativo positivo das fontes de nitrogênio (extrato de levedura e peptona), salientando que concentrações elevadas destes dois produtos acarretam no aumento da produção de biomassa. No estudo de Souza (2015), a variável peptona se mostrou de maior significância para o crescimento de biomassa fúngica, quando utilizada uma confiança de 90%, sendo que a quantidade de peptona (15 g/L) utilizada em seu ensaio que apresentou maiores resultados para o crescimento de biomassa (16,93 g/L) foi 5,8 g/L maior do que a utilizada neste trabalho que resultou em 9,81 g/L de biomassa fúngica.

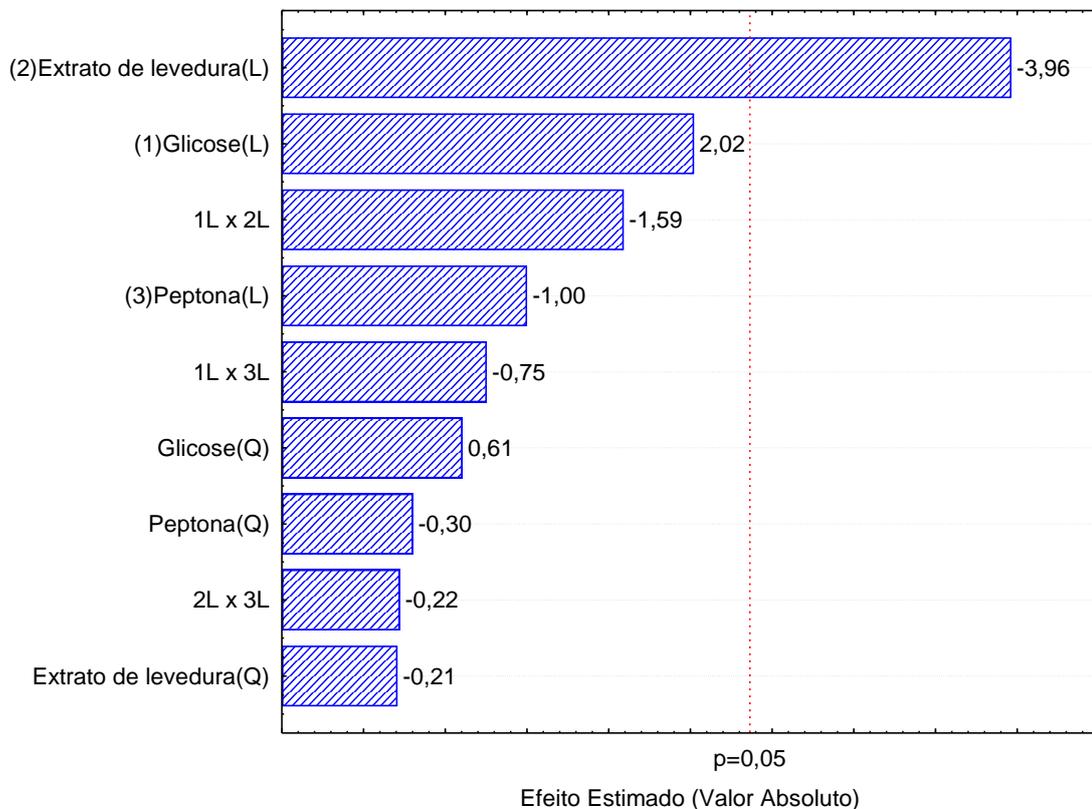
Zhai (2016) obteve em seu estudo sobre a produção de biomassa micelial, que peptona e maltose geram um efeito significativo positivo, sendo o efeito da concentração de peptona mais importante do que da concentração de maltose. O autor utilizou uma confiança de 99%, e seu coeficiente de determinação foi 0,96. A concentração de peptona otimizada pelo autor foi de 3,44 g/L, prevendo uma produção máxima de biomassa micelial de 11,95 g/L. Da mesma forma que foi comprovada neste trabalho, percebe-se a relevância da peptona para o crescimento da biomassa fúngica. Marçal et al. (2015) também destacaram o efeito significativo da proteína de soja, como fonte de nitrogênio, utilizada para o crescimento de biomassa, e ainda determinaram como ponto ótimo 40 g/L deste componente quando estudado o microrganismo *Bacillus thuringiensis*.

Outro caso que serve para comparação é o estudo de Klaic et al. (2014), onde a influência da glicose e da peptona foi positiva para o aumento da concentração de biomassa fúngica, com uma confiança de 90%. O valor para glicose e peptona otimizado pelos autores foi de 20 g/L, e para o extrato de levedura de 7,5 g/L, obtendo uma quantidade de biomassa máxima de 22 g/L.

### 3.1.3.2 Amilases

A atividade para amilases não teve seu modelo validado quando utilizado uma confiança de 95%, uma vez que o F calculado foi inferior ao F tabelado. Porém, apresentou efeito significativo ( $p < 0,05$ ) negativo para o extrato de levedura, indicando que devem ser testadas menores quantidades desta variável no meio fermentativo. O gráfico de Pareto gerado para indicar os efeitos influenciáveis na atividade de amilases está apresentado na Figura 06.

**Figura 06.** Gráfico de Pareto gerado para indicar os efeitos das variáveis investigadas sobre a atividade de enzimas amilases.



Observando o gráfico, verifica-se que a glicose utilizada neste trabalho como fonte de carbono não apresentou efeito significativo ( $p > 0,05$ ), porém, Hasan et al. (2017) consideraram a glicose como a melhor fonte de carbono para a produção de amilases por *Chryseobacterium* sp. Qureshi et al. (2016) utilizaram extrato de levedura como fonte principal de nitrogênio para a fermentação realizada em estado sólido com *Bacillus* sp., e obtiveram uma atividade para amilases de 1,577 U/g de matéria seca. No entanto, quando palha de trigo foi utilizada como substrato, o pico para atividade de amilases foi de 6900 U/g de matéria seca após 5 dias de fermentação. Os autores ainda expuseram a eficácia desta enzima para a remoção de amido no tecido utilizado para seus testes.

De acordo com Freitas (2002), o amido encontrado em órgãos de reserva das plantas, é o componente de maior abundância processado pelas células vegetais, atrás apenas da celulose, sendo mobilizado por hidrólise (BUCKERIDGE et al., 2000), e sintetizado nos plastídios presentes em folhas (SINDHU, BINOD, PANDEY, 2017). As enzimas amilases possuem a capacidade de catalisar a hidrólise do amido em açúcares, e a  $\beta$ -amilase através da hidrolização de ligações glicosídicas produz maiores quantidades de açúcares redutores do amido (SOTTIRATTANAPAN et al., 2017). Uma vez que o amido, composto por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 (CURVELO-SANTANA et al., 2010), está presente nos tecidos vegetais como fonte de armazenamento de energia (FREITAS, 2002), a enzima citada atuaria na degradação desta substância, proporcionando a intervenção dos biocompostos.

Vidal et al. (2017), expõem que a presença desta enzima impede a redução, durante a fermentação, da micotoxina DON (Deoxinivalenol), encontrada em produtos do trigo, e afirma que o aumento de DON foi verificado quando nas maiores atividades da enzima  $\alpha$ -amilase. Outros autores, como Vidal et al. (2016), enfatizam que  $\alpha$ -amilase e celulasas são importantes para o aumento do DON durante o processo fermentativo, e esse fato pode ocorrer devido a liberação de DON por meio da catálise enzimática.

Além disso, os valores altos de atividade enzimática para esta enzima, indicam a eficiência para a hidrólise do amido unido a plastídios nos tecidos de armazenamento e nas folhas de plantas, sendo que estas enzimas produzidas por fungos se destacam em aplicações industriais, o que incentiva demais estudos (SINDHU, BINOD, PANDEY, 2017).

### 3.1.3.3 Celulasas

Da mesma forma que ocorreu para a atividade de amilases, quando utilizada uma confiança de 95%, o modelo matemático não foi validado para atividade de celulasas. No entanto, quando testada uma confiança de 90%, sem utilizar os pontos axiais, o modelo matemático foi validado para a atividade de celulasas, como um modelo de primeira ordem, apresentado na Equação 4.

$$\text{Atividade enzimática para celulasas} = 3,92 - 3,71 * \text{Extrato de Levedura}$$

Equação (4)

É possível perceber que a atividade enzimática para celulasas está relacionada com a quantidade de extrato de levedura presente no meio fermentativo, sendo sua significância ( $p < 0,1$ ) negativa, o que indica que quanto maiores as quantidades deste produto, menor será a atividade para a enzima estudada.

Além disso, também foi realizada a análise de variância (ANOVA) com o intuito da validação deste modelo. Assim, através da verificação da Tabela 10 é possível observar a validade do modelo, uma vez que o F calculado (215,50) foi superior ao F tabelado (2,92), com um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 87%.

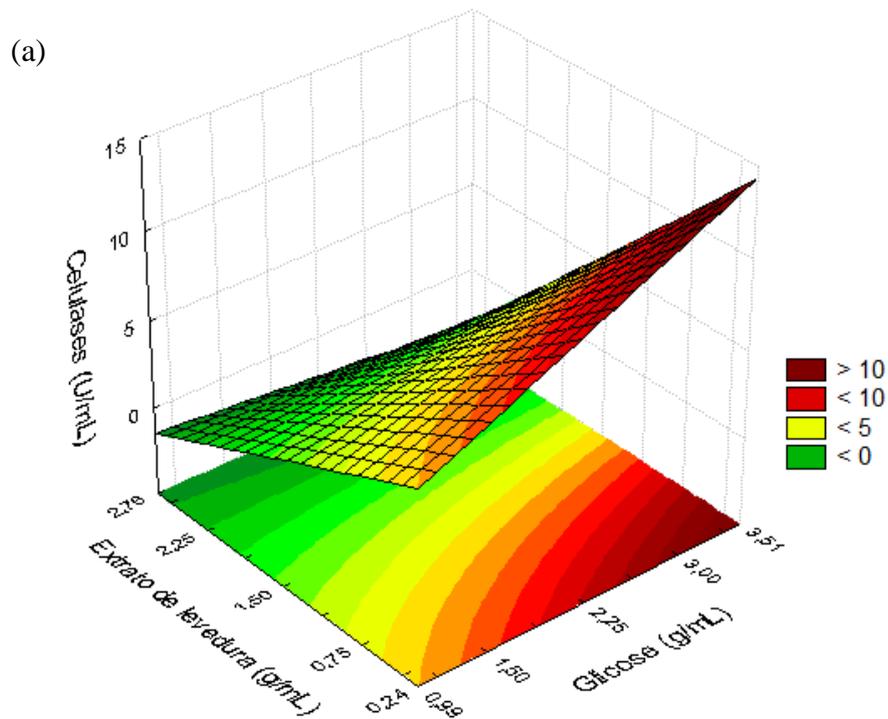
**Tabela 10.** Análise de variância dos dados obtidos para a validação da significância estatística do modelo proposto para a atividade de enzimas celulases.

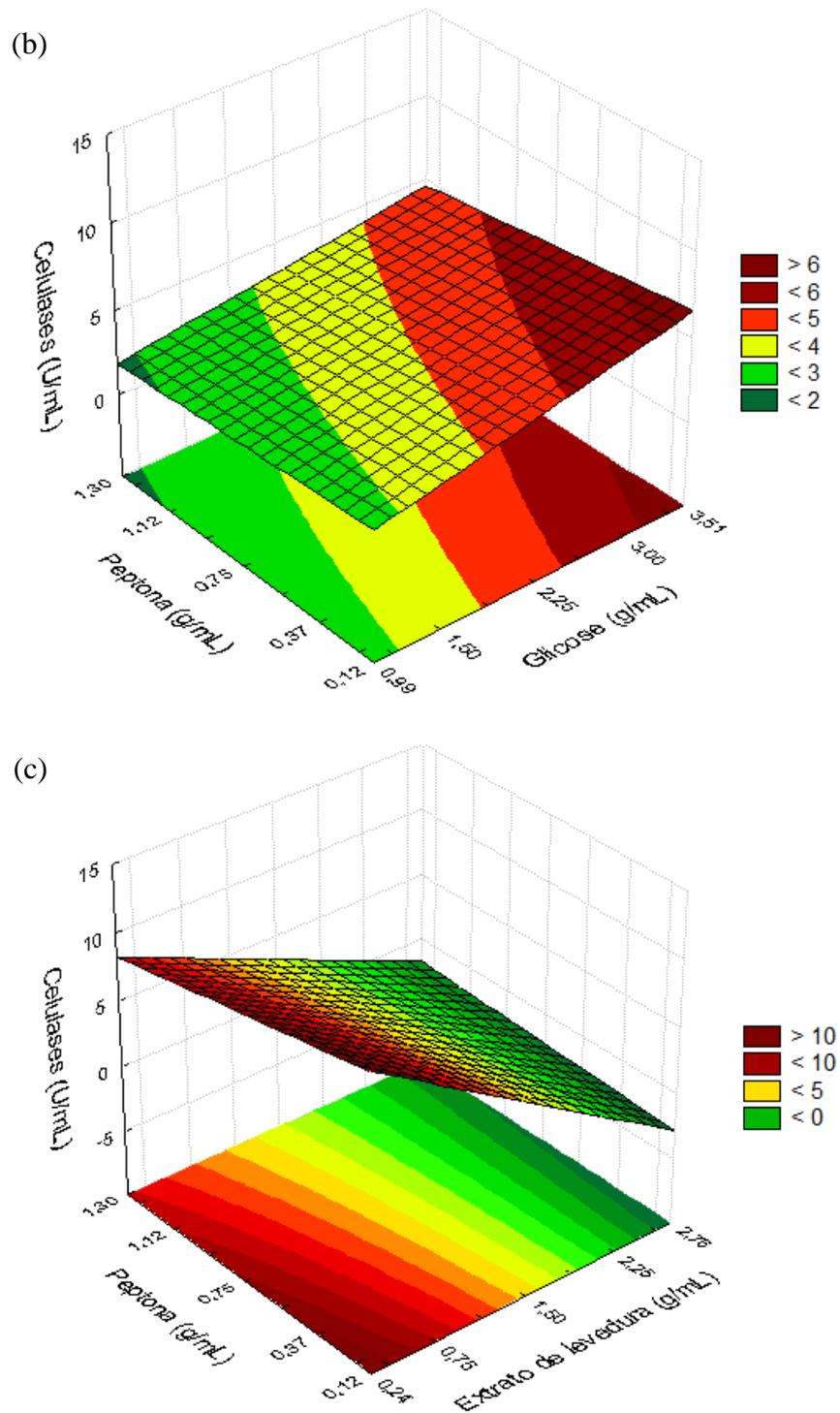
Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado
Regressão	146,51	8	18,31	215,50
Resíduo	0,17	2	0,08	
Total	146,68	10		

\* F tabelado  $_{90\%; 8;2} = 2,92$

Após a validação do modelo matemático para a atividade enzimática de celulases, foram geradas superfícies de resposta apresentadas na Figura 07.

**Figura 07.** Superfícies de resposta geradas para avaliação da atividade enzimática de celulases em função de: (a) Extrato de levedura x Glicose, (b) Peptona x Glicose, e (c) Peptona x Extrato de levedura.





Estudado as superfícies criadas observa-se na Figura 07(a) que na relação entre extrato de levedura e glicose, a atividade é maior quando nas maiores concentrações de glicose e nas menores concentrações de extrato de levedura, afirmando o efeito negativo do extrato de levedura. Na Figura 07(b) verifica-se novamente a influência positiva da glicose sobre a atividade de celulases, enquanto a peptona é importante apenas nas menores quantidades. Porém, quando comparada a relação entre peptona e extrato de levedura (Figura 07(c)),

novamente é verificada a significância negativa do extrato de levedura, uma vez que a atividade enzimática foi maior nas menores concentrações de extrato de levedura e também de peptona. Portanto, analisando as superfícies de resposta, verificou-se que a atividade enzimática para celulasas é maior quando nas maiores concentrações de glicose (3,51 g/mL), e nas menores concentrações de extrato de levedura (0,24 g/mL) e peptona (0,12 g/mL).

Segundo Melo (2010), a glicose é uma variável que influencia na produção de celulasas, pois na presença de altas concentrações de glicose, sua produção é reprimida. De acordo com Manisha (2017) celulasas juntamente com outras enzimas são utilizadas para proteger culturas de patógenos de plantas, através da degradação de sua parede celular. Além disso, o autor também afirma que o microrganismo *Trichoderma* sp. é um fungo celulolítico, conhecido como uma das principais fontes de celulasas. Nesse sentido, a alta atividade de celulasas produzidas por *Trichoderma* sp. é afirmada Xue et al. (2017), e da mesma forma, Aguiar Filho (2008), expõem que *Trichoderma reesei* atua provavelmente como o melhor organismo na degradação de sistemas celulósicos.

A parede celular de vegetais, composta prioritariamente por celulose, desempenha o papel de prevenir a ruptura da membrana plasmática, e promover a defesa contra fungos e bactérias (APPEZZATO-DA-GLÓRIA & CARMELL-GUERREIRO, 2016). Melo (2010), afirma que alguns microrganismos produzem um conjunto de enzimas, como as celulasas, responsáveis pela degradação de polissacarídeos como a celulose (FARINAS, 2011), que é encarregada de desempenhar um papel estrutural e promover resistência mecânica, uma vez que está presente na parede celular de plantas.

A atividade enzimática de celulasas neste estudo foi consideravelmente elevada. De acordo com Pereira (2013), o complexo multienzimático (sistema celulolítico), é responsável pelo processo de hidrólise enzimática da celulose em açúcares solúveis, ou seja, a catálise atuante sobre a fibra de celulose. Nesse sentido, com a degradação do principal constituinte da estrutura das células vegetais (PEREIRA, 2013), a entrada do microrganismo, ou até mesmo dos metabólitos secundários produzidos por estes microrganismos, é facilitada, para aumentar a fitotoxicidade dos biocompostos (REICHERT JÚNIOR, 2017).

Aguiar Filho (2008), destaca que as vias de degradação tanto da celulose quanto da lignina podem estar interligadas, e podem haver aspectos similares na regularização das atividades celulolíticas e lignolíticas, sendo uma diminuta parcela da celulose inacessível, uma vez que se encontra coberta por lignina. Neste sentido, a atuação conjunta das enzimas presentes nos biocompostos auxiliaria a entrada do microrganismo atuante.

### 3.1.3.4 Lipases

A atividade de lipases teve seu modelo matemático validado com uma confiança de 95%, sendo o modelo obtido de segunda ordem apresentado na Equação 5.

$$\text{Atividade enzimática para lipases} = - 2,86 * \text{Peptona} + 2,74 * \text{Glicose} * \text{Extrato de levedura} \\ - 3,47 * \text{Glicose} * \text{Peptona}$$

Equação (5)

Percebe-se que a atividade de enzimas lipases está intimamente relacionada com a quantidade de glicose, peptona e extrato de levedura presentes no meio, sendo que a variável peptona demonstrou significância ( $p < 0,05$ ) negativa, indicando que quanto maiores suas quantidades, menor será a atividade enzimática para lipases. Da mesma forma, quando ocorre a relação entre glicose e peptona, tem-se a significância ( $p < 0,05$ ) negativa, porém, quando a relação acontece entre glicose e extrato de levedura, sua significância ( $p < 0,05$ ) é positiva. Neste caso, a peptona poderia ter sua quantidade reduzida, ou mesmo testada sua ausência no meio fermentativo.

Além disso, a análise de variância (ANOVA) foi efetuada, e verificando a Tabela 11 é possível identificar a validade do modelo, uma vez que o F calculado (7,69) foi maior que o F tabelado (3,68), com um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 91%.

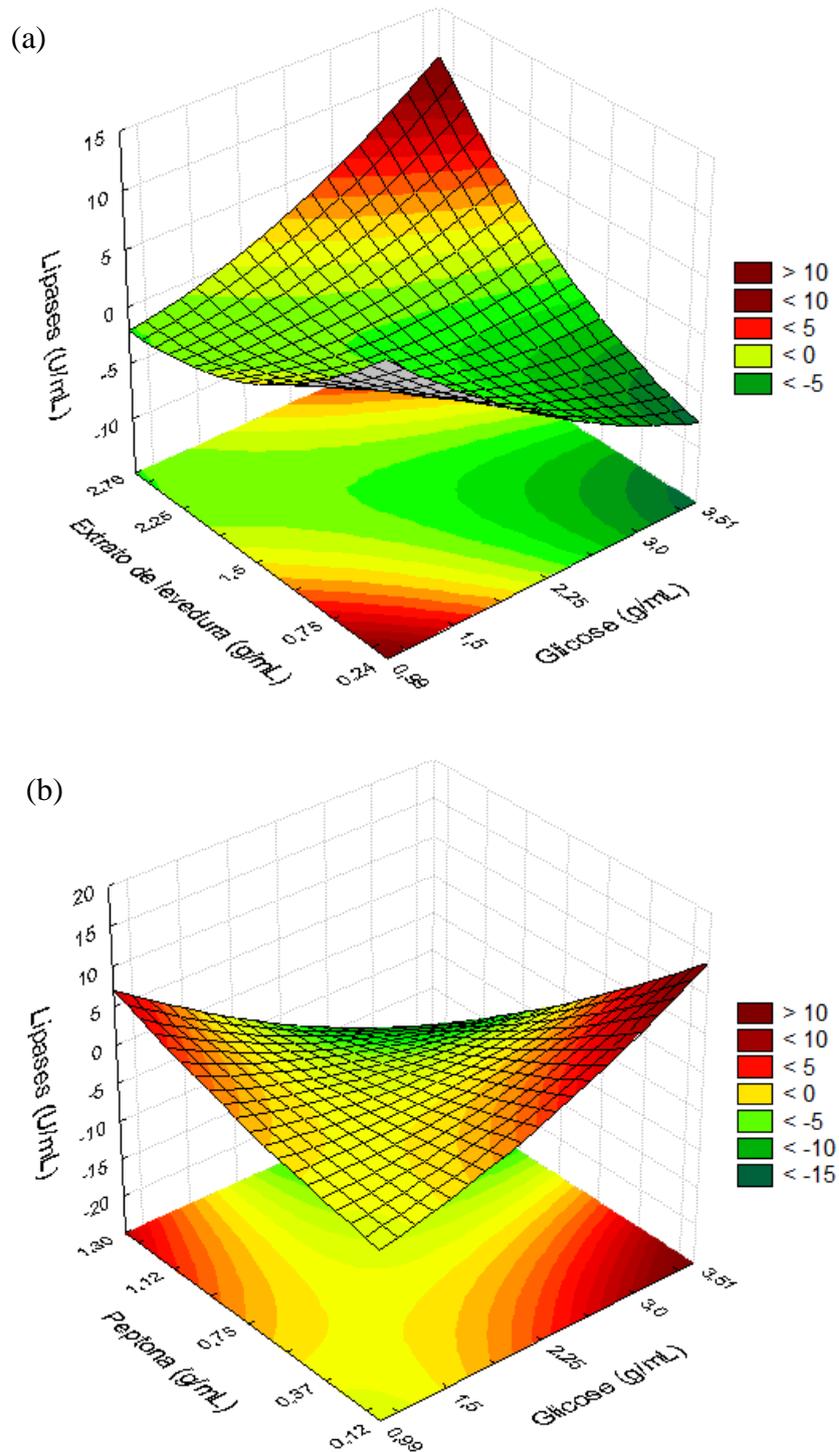
**Tabela 11.** Análise de variância dos dados obtidos para a validação da significância estatística do modelo proposto para a atividade de enzimas lipases.

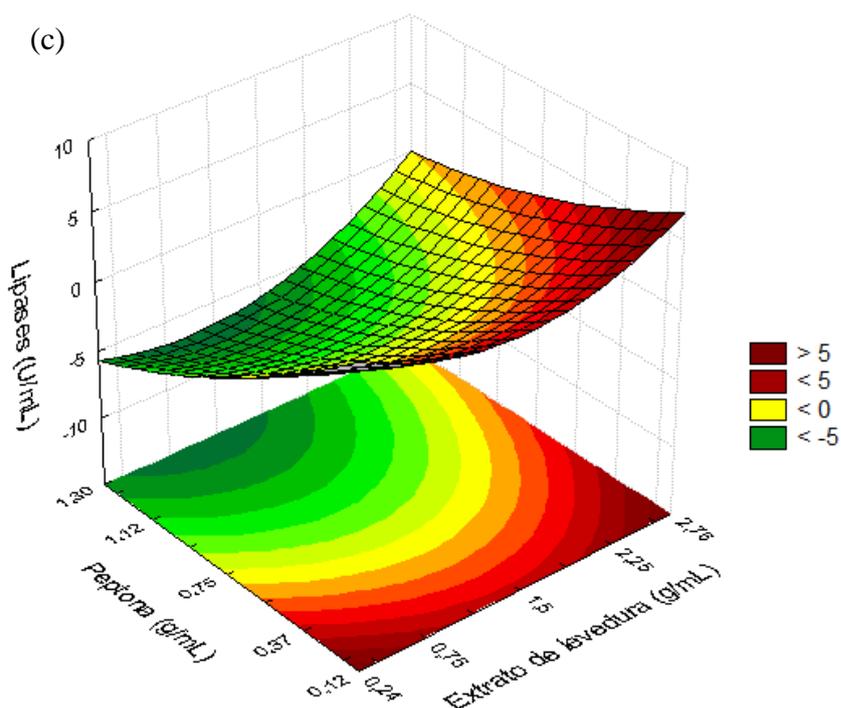
Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado
Regressão	306,55	9	34,06	7,69
Resíduo	31,02	7	4,43	
Total	337,57	16		

\* F tabelado  $_{95\%; 9;7} = 3,68$

Na Figura 08 abaixo, estão apresentadas as superfícies de resposta adquiridas para a atividade das enzimas lipases depois de validado o modelo matemático.

**Figura 08.** Superfícies de resposta geradas para avaliação da atividade enzimática de lipases em função de: (a) Extrato de levedura x Glicose, (b) Peptona x Glicose, e (c) Peptona x Extrato de levedura.





Observando a Figura 08(a) percebe-se que ocorre um modelo de segunda ordem devido a superfície parabólica formada, onde a maior atividade para lipases ocorreu quando nas maiores concentrações de extrato de levedura e glicose, e da mesma forma, quando nas menores concentrações das mesmas variáveis. Analisando a Figura 08(b), igualmente ao caso anterior, ocorre um modelo de segunda ordem, indicado pela superfície parabólica, onde a maior atividade para lipases acontece na maior concentração de glicose e menor concentração de peptona, e na menor concentração de glicose e maior concentração de peptona. Já na Figura 08(c), é confirmado que a atividade para lipases é maior quando nas maiores concentrações de extrato de levedura, indicando seu efeito significativo positivo, e nas menores concentrações de peptona, indicando seu efeito significativo negativo. Portanto, através do estudo das superfícies de resposta geradas, as melhores condições para a atividade de lipases são nas maiores concentrações de extrato de levedura (2,76 g/mL) e glicose (3,51 g/mL), e na menor concentração de peptona (0,12 g/mL).

Através da análise dos dados, enfatiza-se a interferência negativa da fonte de nitrogênio (peptona) em relação ao meio. Sbardelotto (2013), da mesma forma, obteve melhor resposta para atividade lipásica na menor concentração da fonte suplementar de nitrogênio (ureia). Além disso, através da análise estatística, a autora encontrou uma significância negativa para a fonte de nitrogênio utilizada, entretanto, quando esta fonte de nitrogênio se

relacionou com a umidade do meio sua significância foi positiva, indicando a interferência da umidade presente.

Na parede celular dos vegetais existem substâncias orgânicas como lignina, lipídios e proteínas, sendo que as substâncias lipídicas como ceras fazem com que a parede celular seja impermeável à água (APPEZZATO-DA-GLÓRIA & CARMELL-GUERREIRO, 2006). Turati (2015) afirma que além das lipases, existem outras enzimas como cutinases, capazes de degradar a cutina, encontrada na cutícula de algumas plantas, e composta por ácidos graxos. O autor ainda destaca que este polímero é responsável pela proteção da planta contra patógenos, e sua degradação através de enzimas é primordial para o processo de infecção.

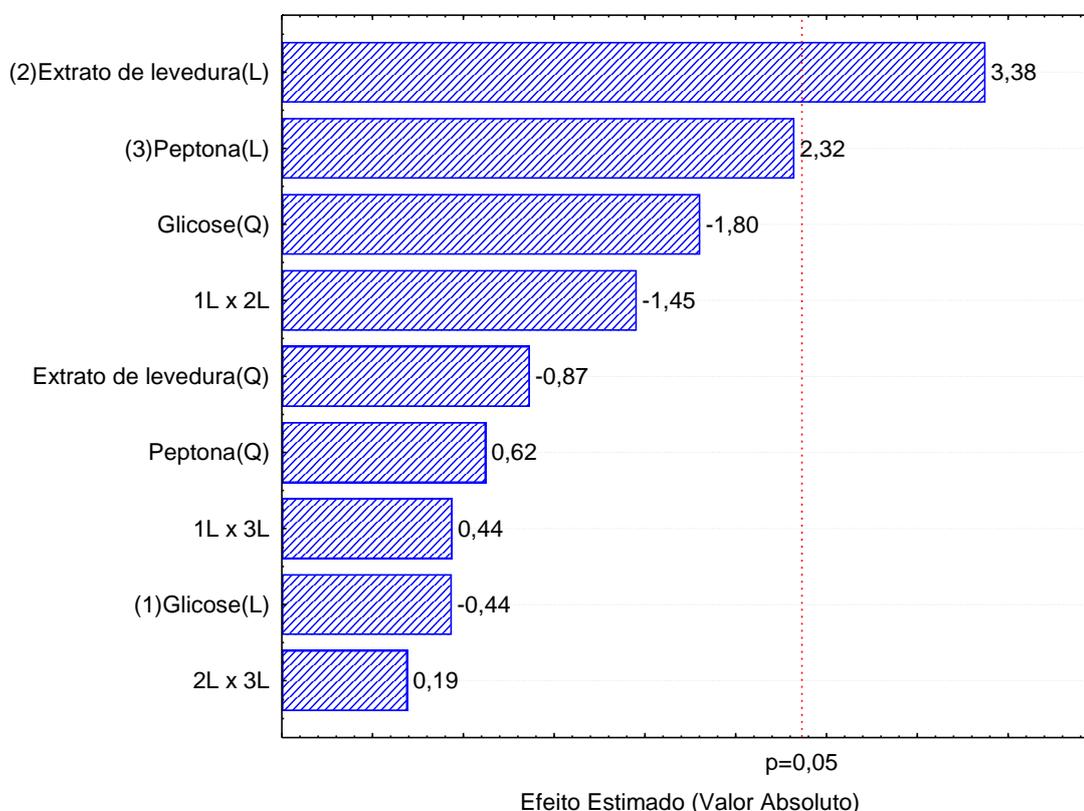
As lipases são enzimas responsáveis pelo metabolismo lipídico nos organismos vivos, e na biocatálise, estas enzimas são de grande interesse por possuírem elevado potencial biotecnológico (MOUNGUENGUI et al., 2013). De acordo com Seth et al. (2014), as lipases são encontradas principalmente em sementes de plantas, sendo que as mesmas contêm alta quantidade de lipídios como reservatório de energia. As lipases vegetais têm como principal função fisiológica a quebra dos triglicerídeos acumulados nas sementes, para então liberar os ácidos graxos, e dessa forma, fornecer energia para o crescimento do embrião (TURATI, 2015).

Ainda, as enzimas lipases podem atuar na degradação da membrana plasmática, pois estas são compostas por bicamadas de fosfolipídeos, os quais constituem uma classe de lipídeos (TAIZ, ZEIGER, 2004). Esta membrana atua no controle de entrada e saída de substâncias da célula, e possibilita sua manutenção funcional. Nesse sentido, os lipídios geralmente são identificados em maiores quantidades, porém, a composição da membrana difere para células distintas (APPEZZATO-DA-GLÓRIA & CARMELLO-GUERREIRO, 2006).

#### *3.1.3.5 Peroxidases*

O modelo matemático para a atividade de enzimas peroxidases não foi validado quando utilizada uma confiança de 95%. No entanto, o gráfico de Pareto foi gerado para apresentar os efeitos significativos, e encontra-se ilustrado na Figura 09.

**Figura 09.** Gráfico de Pareto gerado para indicar os efeitos das variáveis investigadas sobre a atividade de enzimas peroxidases.



Neste gráfico é possível verificar que o extrato de levedura apresentou significância ( $p < 0,05$ ) positiva para a atividade de peroxidases. Além disso, os sais presentes no meio também podem ter influenciado na atividade desta enzima, pois de acordo com Fang e Kao (2000), que testaram a influência de soluções contendo  $\text{FeSO}_4$  e  $\text{K}_2\text{SO}_4$  na atividade de peroxidases, a atividade desta enzima é induzida por íons de ferro.

Mesmo não sendo validado seu modelo, a atividade para peroxidases relatada neste trabalho é conveniente se pensado na aplicação dos biocompostos, uma vez que peroxidases são enzimas oxidativas responsáveis pela oxidação de peróxidos (MEDINA et al., 2017). As peroxidases são relatadas por muitos autores como enzimas responsáveis pela degradação da lignina, que se encontra presente na parede celular de plantas, e possui a função de suporte estrutural à parede secundária, bem como confere maior resistência contra agressão microbiana (AGUIAR FILHO, 2008; MEDINA et al., 2017), além de ser um polímero que constitui a estrutura da biomassa vegetal (CASCIELLO et al., 2017).

De acordo com Medina et al. (2017), as lignina-peroxidase, manganês-peroxidase e peroxidases de rábano são as maiores enzimas responsáveis pela degradação da lignina. A lignina-peroxidase e a manganês-peroxidase, na presença de peróxido de hidrogênio, podem

degradar a lignina, sendo que existem relatos da degradação, por enzimas ligninolíticas, da lignina presente em efluentes (AGUIAR FILHO, 2008). Aguiar Filho (2008) ainda afirma que a manganês-peroxidase desenvolve um papel relevante no ataque a lignina, e as estruturas da lignina são cooxidadas aos poucos quando estas enzimas peroxidam ácidos graxos.

Além disso, o complexo enzimático, que inclui as peroxidases de fungos, demonstra alta atividade e especificidade para a biossíntese da lignina. As lignina-peroxidase e manganês-peroxidase podem degradar a biomassa lignocelulósica, como palha de trigo e bagaço de cana-de-açúcar, e essas enzimas e microrganismos podem realizar um pré-tratamento biológico dessa biomassa, destacando-se de forma importante como tratamento biológico ou enzimático (MEDINA et al., 2017).

A utilização do biocomposto com elevada atividade desta enzima também pode ser empregada para a desativação de micotoxinas, presentes em cereais utilizados para a produção de alimentos, como o Deoxinivalenol (DON) (SCAPINI et al., 2016), sendo as peroxidases responsáveis pela destruição de seu anel epoxi (GARDA-BUFFON & BADIALE-FURLONG, 2010). Neste caso, a enzima atuaria prevenindo a atuação da micotoxina, e não induzindo a toxicidade através do biocomposto, tendo em vista que peroxidases estão relacionadas com a resistência a patógenos em plantas terrestres (GOLUNSKI, 2015).

Portanto, acompanhando a análise estatística realizada para todos os parâmetros, pode-se observar características em comum entre alguns componentes da avaliação. Isto pode ser verificado quando comparados os efeitos significativos para produção de biomassa e atividade de peroxidases, pois os mesmos apresentaram efeito significativo positivo para o extrato de levedura. Se incentivada a produção do biocomposto do ensaio 12, que apresentou maiores respostas para estes parâmetros, pode-se pensar em aumentar a quantidade de extrato de levedura no meio de fermentação, uma vez que demonstrou significância positiva, e dessa forma, direcionar sua aplicação para o controle de plantas que apresentem peculiaridades compatíveis com esta enzima.

Outros parâmetros avaliados que apresentaram similaridade entre seus resultados na análise estatística foram as atividades de amilases e celulasas, uma vez que ambas demonstraram significância negativa para o extrato de levedura. Nesse sentido, se pensado em sua aplicação, pode-se estimular a produção do biocomposto do ensaio 2, que apresentou maiores respostas de atividade para estas enzimas, diminuindo a quantidade de extrato de levedura presente no meio, e visando a aplicação deste produto em plantas com individualidades que possam ser influenciadas por esta composição.

Em contrapartida, as enzimas lipases tiveram seu modelo validado, porém, seus efeitos significativos e não significativos não retrataram semelhança com os demais parâmetros avaliados como foi o caso das similaridades citadas acima. Além disso, as atividades enzimáticas para lipases foram baixas ou nulas, e dessa forma, deve-se pensar em novos estudos para avaliar o aumento de sua atividade, e otimizar a produção de um biocomposto que apresente as melhores características para estas enzimas visando sua aplicação para a degradação da membrana lipídica de plantas infestantes.

Com isso, após a otimização do processo fermentativo, chegou-se à conclusão de que os ensaios 2 e 12 apresentaram melhores características para serem utilizados como bioherbicida, pois o ensaio 2 apresentou maiores respostas para a atividade de amilases, celulases e lipases, e o ensaio 12 apresentou maiores respostas para a quantificação de biomassa fúngica e para a atividade de peroxidases. Dessa forma, estes biocompostos foram escolhidos para avaliação quanto a toxicidade aguda, e também aplicados sobre a planta *Euphorbia heterophylla* (leiteiro) para verificação dos efeitos de fitotoxicidade.

### 3.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

Para a avaliação dos biocompostos selecionados quanto a toxicidade aguda utilizando o microcrustáceo *D. magna*, foram utilizadas diluições para os fatores 1, 4, 8, 16, 32 e 64 quando avaliado o biocomposto produzido através do ensaio 2, enquanto para o biocomposto produzido através do ensaio 12 foram necessárias diluições para os fatores 1, 4, 8, 16, 32, 64 e 128, como apresentado na Tabela 04.

Os resultados encontrados nesta avaliação expressaram a concentração efetiva dos biocompostos que causou imobilidade a 50% da população de *D. magna* exposta durante o período de 48 horas ( $CE_{50-48h}$ ) (CESAR et al., 1997). Sendo assim, o resultado obtido para a  $CE_{50-48h}$  do biocomposto produzido a partir do ensaio 2 foi 58.637,99 mg/L com um fator de diluição 32, e para o biocomposto produzido a partir do ensaio 12 a  $CE_{50-48h}$  obtida foi 13.583,17 mg/L com um fator de diluição 128. De acordo com Mendonça et al. (2007) e Costa et al. (2008), valores de  $CE_{50}$  menores indicam maior toxicidade para o organismo teste.

A Tabela 12 apresenta valores de  $CE_{50-48h}$  obtidos para diferentes herbicidas comerciais quando suas toxicidades foram avaliadas utilizando o microcrustáceo *D. magna*.

**Tabela 12.** Valores de CE<sub>50-48h</sub> obtidos para diferentes herbicidas comerciais através da avaliação da toxicidade utilizando o microcrustáceo *D. magna*.

Herbicida comercial	CE <sub>50-48h</sub> (mg/L)	Referência
Atrazina	50,41	(MOREIRA et al., 2014)
Basagran 600	> 125	(BASF, 2009)
Direct	> 100	(MONSANTO (a), 2013)
Glifosato Técnico Monsanto	243,61	(MONSANTO (a), 2014)
Radar	2,12	(MONSANTO (a), 2015)
Roundup Original	2,12	(MONSANTO (b), 2015)
Roundup Original DI	11	(MONSANTO (b), 2014)
Scout	> 100	(MONSANTO (b), 2013)

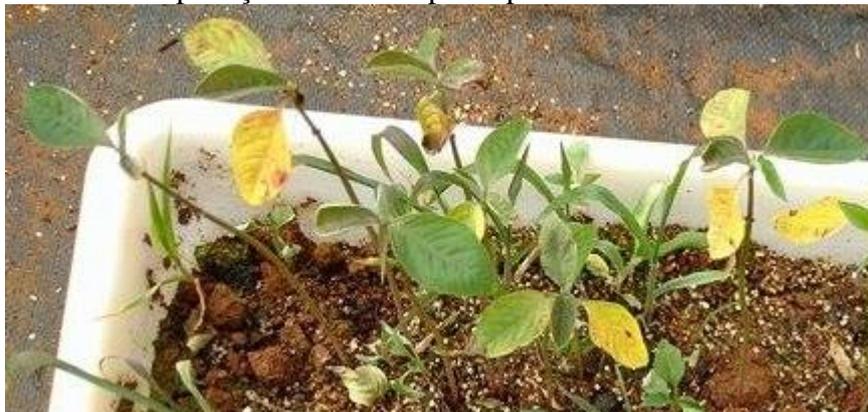
Nesse sentido, observando os valores de CE<sub>50-48h</sub> apresentados na Tabela 12 para uma diversidade de herbicidas comerciais já consolidados no mercado, é perceptível uma toxicidade aguda consideravelmente inferior tanto do biocomposto produzido através do ensaio 2 quanto do biocomposto produzido através do ensaio 12, evidenciando a viabilidade ambiental dos bioherbicidas produzidos neste estudo. Cordeau et al. (2016) afirmam que é fundamental abordar os efeitos ecotoxicológicos dos bioherbicidas, pois estas informações permitem otimizar as condições de aplicações, bem como desenvolver e incentivar a utilização destes bioprodutos.

### 3.3 APLICAÇÃO PRELIMINAR DOS BIOCOMPOSTOS PRODUZIDOS

Os efeitos de fitotoxicidade dos biocompostos produzidos foram verificados 7 e 14 dias após a aplicação preliminar. Nesse sentido, pode-se verificar efeitos de fitotoxicidade de até 90% na área foliar das plantas *E. heterophylla* (leiteiro) que obtiveram aplicações com três repetições do biocomposto produzido através do ensaio 2 não filtrado (Figura 10). Entretanto, quando este biocomposto foi aplicado de forma filtrada, não apresentou fitotoxicidade.

Com relação ao biocomposto produzido através do ensaio 12, quando aplicado em sua forma não filtrada, apresentou uma fitotoxicidade de até 60% na área foliar utilizando três repetições de aplicações, e diferentemente do biocomposto produzido através do ensaio 2, este apresentou uma fitotoxicidade de 50% quando aplicado em sua forma filtrada com aplicações de três repetições.

**Figura 10.** Efeitos da fitotoxicidade observados nas folhas da planta *Euphorbia heterophylla* (leiteiro) após 14 dias da aplicação do biocomposto produzido no ensaio 2.



**Fonte:** Laboratório de Agroecologia.

Dessa forma, pode-se verificar que os biocompostos não filtrados apresentaram maior fitotoxicidade, o que pode indicar que o microrganismo presente é o agente causador dos danos, e não os possíveis metabólitos produzidos por ele, uma vez que após o processo de filtração, os efeitos observados não foram os mesmos. Além disso, percebe-se que os maiores danos foram causados quando utilizadas as maiores repetições de aplicações. Aarestrup (2007) afirma que a espécie *E. heterophylla* possui difícil controle, e para tanto são necessárias várias aplicações, bem como combinações de diversos herbicidas.

Reichert Júnior (2017), em seu estudo, obteve danos de até 10% na área foliar da planta *E. heterophylla* (leiteiro) após 7 dias da aplicação do biocomposto produzido, uma porcentagem de fitotoxicidade inferior a obtida neste trabalho. Ferreira et al. (2003) e Magiero (2009), afirmam que os principais obstáculos foliares potenciais à penetração de herbicidas na planta *E. heterophylla* (leiteiro), são a cutícula da face adaxial muito espessa, e o alto teor de cera epicuticular.

Souza (2015) avaliou a fitotoxicidade de um biocomposto produzido a partir do fungo *Diaporthe* sp. e aplicado sobre plântulas de *Cucumis Sativus* (pepino), tendo como efeitos manchas foliares e amarelecimento das folhas, danos que foram igualmente observados neste trabalho. Klaic (2014), também verificou o branqueamento das folhas da planta alvo (*Cucumis sativus*) quando avaliou a fitotoxicidade de um bioherbicida produzido a partir do fungo *Phoma* sp., sendo que estes efeitos foram observados apenas nas folhas que entraram em contato com o bioherbicida.

#### 4 CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DA PESQUISA

Foi possível otimizar e desenvolver a composição de um meio fermentativo utilizando o microrganismo *Trichoderma koningiopsis* para ser aplicado com função bioherbicida, sendo que o trabalho atingiu os objetivos propostos, também relacionados a verificar os efeitos de fitotoxicidade e análise de toxicidade aguda.

Como foram registradas atividades enzimáticas para as diferentes enzimas analisadas nos biocompostos, estas agiram conjuntamente na planta teste visando a degradação dos substratos e permitindo a atuação do microrganismo, o que pode ser verificado através da aplicação preliminar, onde foram confirmados os efeitos dos bioherbicidas, causando o amarelecimento das folhas da planta *E. heterophylla*. Além disso, a toxicidade aguda apresentada pelos dois biocompostos analisados foi consideravelmente inferior a relatada para herbicidas comerciais utilizados no controle de plantas daninhas, confirmando a funcionalidade ambiental dos mesmos.

É importante destacar que este trabalho possui caráter inicial, onde foram evidenciados avanços relacionados a produção e a aplicação preliminar de bioherbicidas. Porém, mais estudos devem ser desenvolvidos, com o objetivo de testar outros microrganismos passíveis de causar danos em plantas daninhas, bem como, avaliar os efeitos fitotóxicos em demais plantas indesejáveis em plantações.

Dessa forma, sabendo-se as diluições indicadas para cada biocomposto produzido, para que não ocorra a imobilidade a nenhum dos organismos nos testes de toxicidade aguda, podem ser realizados em trabalhos futuros, testes adicionais da aplicação dos biocompostos diluídos para verificar os efeitos fitotóxicos gerados. Também pode ser considerado o uso de adjuvantes, visando a fixação dos biocompostos, e o auxílio para que permaneçam por mais tempo em contato com as plantas alvo.

Para trabalhos posteriores, também pode-se pensar em identificar quais são as enzimas específicas presentes nos biocompostos, e quais as fitotoxinas produzidas durante a fermentação que atuam nas plantas teste. O aumento de escala para a produção destes biocompostos é outro fator importante, visando a consolidação das técnicas de aplicação e dos efeitos gerados, além de identificar formas e condições de armazenamento para serem mantidas as características dos biocompostos por tempos determinados.

## REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, J. R. **Análise genética e morfofisiológica de *Euphorbia heterophylla* L. (*Euphorbiaceae*)**. 74 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 12.713: Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade Aguda - Método de Ensaio com *Daphnia spp.* (Cladocera, Crustacea)**. Rio de Janeiro, 2004. 21 p.
- AGUIAR FILHO, J. M. M. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar**. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Área de concentração: Microbiologia Agrícola, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.
- ALMEIDA, T. C. **Formulação de um herbicida biológico produzido através da fermentação submersa em biorreator**. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Processos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**, 2 ed. 438 p. Viçosa: Editora UFV, 2006.
- ASH, G. J. The science, art and business of successful bioherbicides. **Biological Control**, v. 52, n. 3, p. 230-240, mar. 2010.
- BAILEY, K. L. The Bioherbicide Approach to Weed Control Using Plant Pathogens. **Integrated Pest Management**, p. 245-266, dez. 2014.
- BAPTISTA, N. M. Q.; SANTOS, A. C.; ARRUDA, F. V. F.; GUSMÃO, N. B. Produção das Enzimas Lignina Peroxidase e Lacase por Fungos Filamentosos. **Scientia Plena**, v. 8, n. 1, jan. 2012.
- BASF. Ficha de Segurança: **Basagran 600**. 2009. Disponível em: <[http://www.agro.basf.com.br/agr/ms/pt\\_BR/function/conversions:/publish/content/APBrazil/solutions/herbicides/FISPQ/BASAGRAN600.PDF](http://www.agro.basf.com.br/agr/ms/pt_BR/function/conversions:/publish/content/APBrazil/solutions/herbicides/FISPQ/BASAGRAN600.PDF)>. Acesso em: 01, nov. 2017.
- BLANCO, H. G. **A importância dos estudos ecológicos nos programas de controle de plantas daninhas**. O Biológico, São Paulo, v. 38, p. 343-350, 1972.
- BRUN, T.; RABUSKE, J. E.; TODERO, I.; ALMEIDA, T. C.; JUNIOR, J. J. D.; ARIOTTI, G.; CONFORTIN, T.; ARNEMANN, J.; KUHN, R. C.; GUEDES, J. V. C.; MAZUTTI, M. A. Production of bioherbicide by *Phoma* sp. in a stirred-tank bioreactor. **3 Biotech**, dez. 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-016-0557-9>.
- BUCKERIDGE, M. S.; TINÉ, M. A. S.; SANTOS, H. P.; LIMA, D. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 137-162, 2000.
- CASCIELLO, C.; TONIN, F.; BERINI, F.; FASOLI, E.; MARINELLI, F.; POLLEGIONI, L.; ROSINI, E. A valuable peroxidase activity from the novel species *Nonomuraea gerezanensis* growing on alkali lignin. **Biotechnology Reports**, v. 13, p. 49-57, mar. 2017.

CESAR, A.; SILVA, S. L. R.; SANTOS, A. R. **Testes de Toxicidade Aquática no Controle da Poluição**, 37 p. Universidade Santa Cecília - UNISANTA - Santos, São Paulo, Brasil, 1997.

CORDEAU, S.; TRIOLET, M.; WAYMAN, S.; STEINBERG, C.; GUILLEMIN, J. P. Bioherbicidas: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. **Crop Protection**, v. 87, p. 44-49, set. 2016.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

COSTA, D. C.; NUNES, A. S.; SANTOS, I. C. C.; DAMASCENO, A. A.; SILVA, A. C., CARMO, C. C. Produção de biomassa por fungos coletados na região do baixo Amazonas (município de Parintins/AM) em meio suplementado com farinha de tucumã (*Astrocaryum aculeatum Meyer*). In: 62º Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. 2010. Natal/RN.

CUNHA, J. P. A. R.; TEIXEIRA, M. M.; COURRY, J. R.; FERREIRA, L. R. Avaliação de estratégias para redução da deriva de agrotóxicos em pulverizações hidráulicas. **Planta Daninha**, Viçosa - MG, v. 21, n. 2, p. 325-332, mai./ago. 2003.

CURVELO-SANTANA, J. C.; EHRHARDT, D. D.; TAMBOURGI, E. B. Optimizing of alcohol production from manioc starch. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 613-617, jul./set. 2010.

FANG, W. C.; KAO, C. H. Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. **Plant Science**, v. 158, p. 71-76, jun. 2000.

FAO; ITPS. 2015. Status of the World's Soil Resources (SWSR) - Main Report. Food and Agriculture Organization of the United Nations and Intergovernmental Technical Panel on Soils, Rome, Italy.

FARIA, R. A. **Estudo da produção de enzimas ligninolíticas por *Ceriporiopsis subvermispora***. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

FARINAS, C. S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. São Carlos: **Embrapa Instrumentação**, 13 p. 2011.

FERREIRA, E. A., PROCÓPIO, S. O., SILVA, E. A. M., SILVA, A. A., RUFINO, R. J. N. **Estudos Anatômicos de Folhas de Espécies de Plantas Daninhas de Grande Ocorrência no Brasil. IV - *Amaranthus deflexus*, *Amaranthus spinosus*, *Alternanthera tenella* e *Euphorbia heterophylla***. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v. 21, n. 2, p. 263-271, 2003.

FREITAS, F. O. Uso de grãos de amido na identificação e análise de materiais arqueológicos vegetais. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 26 p. 2002.

FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. **Journal of Biochemistry**. v. 41, p. 583-603, jun. 1954.

GALON, L.; MOSSI, A. J.; REICHERT JUNIOR, F. W.; REIK, G. G.; TREICHEL, H.; FORTE, C. T. Manejo biológico de plantas daninhas - Breve revisão. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 15, n. 1, p. 116-125, jan./mar. 2016.

GARDA-BUFFON, J. & BADIALE-FURLONG, E. Kinetics of deoxynivalenol degradation by *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae* in submerged fermentation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 4, p. 710-714. 2010.

GERN, R. M. M. **Estudo de Meios de Cultivo para Produção de Biomassa e Polissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 em cultivo submerso**. 2005. 156 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.

GOLUNSKI, S. M. **Avaliação da atividade de peroxidases e lipases em diferentes sistemas reacionais**. 2015. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, 2015.

GRIEBELER, N. E.; BORTOLI, V.; ASTOLFI, A. L.; DARONCH, N. A.; SCHUMANN, A. C.; SALAZAR, L. N.; CANSIAN, R. L.; BACKES, G. T.; ZENI, J. Seleção de fungos filamentosos produtores de amilases, proteases, celulasas e pectinases. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 13, n. 685, p. 13-22, 2015.

HASAN, M. M.; MARZAN, L. W.; HOSNA, A.; HAKIM, A.; AZAD, A. K. Optimization of some fermentation conditions for the production of extracellular amylases by using *Chryseobacterium* and *Bacillus* isolates from organic kitchen wastes. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 59-68, jun. 2017.

JURADO, M. M.; SUÁREZ-ESTRELLA, F.; VARGAS-GARCÍA, M. C.; LÓPEZ, M. J.; LÓPEZ-GONZÁLEZ, J. A.; MORENO, J. Evolution of enzymatic activities and carbon fractions throughout composting of plant waste. **Journal of Environmental Management**, v. 133, p. 355-364, jan. 2014.

KHAN, A. A.; ROBINSON, D. S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. **Food Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 407-410, 1994.

KLAIC, R. **Produção de bioherbicida por processos fermentativos a partir do fungo *Phoma* sp.** 2014. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Processos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

KLAIC, R.; KUHN, R. C.; FOLETTO, E. L.; DAL PRÁ, V.; JACQUES, R. J. S.; GUEDES, J. V. C.; TREICHEL, H.; MOSSI, A. J.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; JAHN, S. L.; MAZUTTI, M. A. An overview regarding bioherbicide and their production methods by fermentation. **Fungal Biomolecules: Sources, Applications and Recent Developments**. 1 ed.: John Wiley & Sons, Ltda. p. 183-199, 2015.

KLAIC, R.; SALLET, D.; KUHN, R. C.; SALBEGO, P.; CENTENARO, G. S.; JACQUES, R. J. S.; GUEDES, V. C.; JAHN, S. L.; MAZUTTI, M. A. Optimization of fermentation media for the growth of a fungus used as bioherbicida, p. 2089-2096. In: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014**. Florianópolis/SC: 2014.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes Ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004.

LI, Y.; SUN, Z.; ZHUANG, X.; XU, L.; CHEN, S.; LI, M. Research progress on microbial herbicides. **Crop Protection**, v. 22, n. 2, p. 247-252, mar. 2003.

MAGIERO, E. C. **Fisiologia da floração e atividade alelopática de *Artemisia annua* L. cultivar *Artemis cultivada* em clima subtropical úmido**. 2009. 56 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2009.

MANISHA, YADAV, S.K. Technological advances and applications of hydrolytic enzymes for valorization of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, maio. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.066>.

MARÇAL, G.; MEDEIROS, T. D. M.; COELHO, D. F.; ZANCHETTA, B.; MAZZOLA, P. G.; CARDOSO, V. L.; COUTINHO-FILHO, U.; GOULART, L. R.; SILVEIRA, E. Otimização de meio de cultura para produção de biomassa de *Bacillus thuringiensis* por metodologia de superfície de resposta, p. 1144-1149. In: **Anais do XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica - COBEQIC 2015**. Campinas/SP: 2015.

MATIAS, W. G. **Introdução a Toxicologia**. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFSC, Florianópolis. 2005.

MEDINA, J. C. D.; WOICIECHOWSKI A. L.; GUIMARÃES, L. R. C.; KARP, S. G.; SOCCOL, C. R. Peroxidases. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**, p. 217-232, 2017.

MELO, G. R. **Produção de celulases e xilanases pelo fungo termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea* em diferentes substratos lignocelolósicos**. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

MENDONÇA, E.; CUNHA, M. A.; PICADO, A.; LEITÃO, S.; PAIXÃO, S. M.; SILVA, L.; BRITO, F. Avaliação directa da toxicidade de águas residuais: um caso de estudo. **Recursos Hídricos**, v. 28, n. 1, p. 84-92, 2007.

MENDONÇA, L. A. **Desempenho do Delineamento Composto Central em experimentos com alto coeficiente de variação**. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Estatística Aplicada e Biometria, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426, 1959.

MONSANTO (a). Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos. **Direct**. 2013. Disponível em: <<http://www.monsantoglobal.com/global/br/produtos/Documents/direct-fispq.pdf>>. Acesso em: 01, nov. 2017.

MONSANTO (a). Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos. **Glifosato Técnico Monsanto**. 2014. Disponível em: <<http://www.monsantoglobal.com/global/br/produtos/Documents/glifosate-tecnico-monsanto.pdf>>. Acesso em: 01, nov. 2017.

MONSANTO (a). Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos. **Radar**. 2015. Disponível em: <<http://www.monsantoglobal.com/global/br/produtos/Documents/radar-fispq.pdf>>. Acesso em: 01, nov. 2017.

MONSANTO (b). Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos. **Roundup Original**. 2015. Disponível em: <<http://www.monsantoglobal.com/global/br/produtos/Documents/fispq-roundup-original.pdf>>. Acesso em: 01, nov. 2017.

MONSANTO (b). Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos. **Roundup Original DI**. 2014. Disponível em: <<http://www.monsantoglobal.com/global/br/produtos/Documents/roundup-original-di-fispq.pdf>>. Acesso em: 01, nov. 2017.

MONSANTO (b). Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos. **Scout**. 2013. Disponível em: <<http://www.monsantoglobal.com/global/br/produtos/Documents/scout-fispq.pdf>>. Acesso em: 01, nov. 2017.

MOUNGUENGUI, R. W. M.; BRUNSCHWIG, C.; BARÉA, B.; VILLENEUVE, P.; BLIN, J. Are plant lipases a promising alternative to catalyze transesterification for biodiesel production? **Progress In Energy And Combustion Science**, v. 39, n. 5, p. 441-456, out. 2013.

MOREIRA, R. A.; MANSANO, A. S.; SILVA, L. C.; ROCHA, O. A comparative study of the acute toxicity of the herbicide atrazine to cladocerans *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestrii* and *Macrothrix flabelligera*. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 26, n. 1, p. 1-8, mar. 2014.

MORILLO, E.; VILLAVERDE, J. Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 576-597, mai. 2017.

MULLER, S. **Estudo da produção de biocompostos via fermentação submersa utilizando a técnica de planejamento de experimentos**. 31 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, 2016.

MUPONDWA, E.; LI, X.; BOYETCHKO, S.; HYNES, R.; GEISLER, J. Technoeconomic analysis of large scale production of pre-emergent *Pseudomonas fluorescens* microbial bioherbicide in Canada. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 517-528, jan. 2015.

NEVES, L. C. M. **Obtenção da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase utilizando 'Saccharomyces cerevisiae' W303-181**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Fermentações) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

NUNES, C. C.; ALVES, S. A. M. Elaboração e validação de escala diagramática para quantificação da severidade de entomosporiose em folhas de pereira. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 3, p. 239-244, 2012.

PEREIRA, D. E. P. **Análise de celulases e xilanases por fungo isolado a partir do Bioma Cerrado**. 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

PONGSAWASDI, P.; YAGISAWA, M. Screening and identification of a cyclomalto-dextrin glucanotransferase-producing bacteria. **Journal Fermentation Technology**, v. 65, n. 4, p. 463-467, 1987.

PROSSER, R. S.; ANDERSON, J. C.; HANSON, M. L.; SOLOMON, K. R.; SIBLEY, P. K. Indirect effects of herbicides on biota in terrestrial edge-of-field habitats: A critical review of the literature. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Canada, v. 232, p. 59-72, set. 2016.

QIAN, Y. S.; CAI, S.; HUO, Y. N.; MAO, P. P.; WANG, H. Z.; WU, J. B. First report of leaf blight disease of *Curcuma wenyujin* caused by *Trichoderma koningiopsis* in China. **Journal of Plant Pathology**, v. 95, p. 77, 2013.

QURESHI, A. S.; KHUSHK, I.; ALI, C. H.; CHISTI, Y.; AHMAD, A.; MAJEED, H. Coproduction of protease and amylase by thermophilic *Bacillus* sp. BBXS-2 using open solid-state fermentation of lignocellulosic biomass. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, v. 8, p.146-151, out. 2016.

REICHERT JÚNIOR, F. W. **Controle de plantas daninhas e seletividade a culturas pela aplicação de isolados fúngicos**. 2017. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, 2017.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. 1 ed. Campinas/SP: Casa do Pão Editora, 2005.

SAMUELS, G. J.; DODD, S. L.; LU, B. S.; PETRINI, O.; SCHROERS, H. J.; DRUZHININA, I. S. The *Trichoderma koningii* aggregate species. **Studies in Mycology**, v. 56, p. 67-133, 2006.

SANTOS, A.; GARCÍA, M.; COTES, A. M.; VILLAMIZAR, L. Efecto de la formulación sobre la vida útil de bioplaguicidas a base de dos aislamientos colombianos de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 29, n. 3, p. 150-156, jul./set. 2012.

SBARDELOTTO, M.; DALL AGNOL, A.; VENTURIN, B.; MULINARI, J.; TREICHEL, H.; VARGAS, G. D. L. P. Avaliação da produção de lipase microbiana a partir de *Aspergillus* sp., utilizando torta de canola como substrato. In: III SIMBBTEC. **Anais**, Londrina/PR, 2013.

SCAPINI, T.; VARGAS, G. D. P.; GOLUNSKI, S. M.; TREICHEL, H. Avaliação da atividade de peroxidases comerciais e não comerciais em sistema de ultrassom e micro-ondas. In: VI Jornada de Iniciação Científica e Tecnológica, **Anais**, Chapecó. 2016.

SCHNEIDER, W. D. H.; FONTANA, R. C.; DILLON, A. J. P.; MENDONÇA, S.; SIQUEIRA, F. G.; CAMASSOLA, M. **Efeito de concentrações de glicose e caseína na produção de fenoloxidasas de *Marasmiellus palmivorus* VE111 em biorreator com agitação mecânica**. In: XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática – ENZITEC. 2016.

SETH, S.; CHAKRAVORTY, D.; DUBEY, V. K.; PATRA, S. An insight into plant lipase research - challenges encountered. **Protein Expression and Purification**, v. 95, p. 13-21, mar. 2014.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A.  $\alpha$ -Amylases. **Current Developments In Biotechnology And Bioengineering**, p. 3-24, 2017.

SOTTIRATTANAPAN, P.; NANTACHAI, K.; DADUANG, S.; FUNAHASHI, T.; YAMADA, M. Purification and characterization of amylase from roots of *Paederia foetida* Linn. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 329-335, abr. 2017.

SOUZA, A. R. C. **Obtenção de isolados a partir de recursos biológicos do bioma pampa com potencial no controle de plantas daninhas**. 2015. 74 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

SOUZA, A. R. C.; BALDONI, D. B.; LIMA, J.; PORTO, V.; MARCUZ, C.; MACHADO, C.; FERRAZ, R. C.; KUHN, R. C.; JACQUES, R. J. S. Selection, isolation, and identification of fungi for bioherbicide production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 101-108, jan./mar. 2017.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TREICHEL, H.; SBARDELOTTO, M.; VENTURIN, B.; DALL AGNOL, A.; MULINARI, J.; GOLUNSKI, S. M.; BALDONI, D. B.; BEVILACQUA, C. B.; JACQUES, R. J. S.; VARGAS, G. D. L. P.; MOSSI, A. J. Lipase production from a newly isolated *Aspergillus niger* by solid state fermentation using canola cake as substrate. **Current Biotechnology**, v. 5, p. 1-7, nov. 2015.

TURATI, D. F. M. **Purificação, imobilização e caracterização bioquímica de lipase produzida por *Penicillium sect. Gracilentia* CBMAI 1583 em cultivo submerso**. 2015. 147 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio Claro, 2015.

VIDAL, A.; AMBROSIO, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J.; MARÍN, S. Enzyme bread improvers affect the stability of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside during breadmaking. **Food Chemistry**, v. 208, p. 288-296, out. 2016.

VIDAL, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J.; MARÍN, S. Effect of xylanase and  $\alpha$ -amylase on DON and its conjugates during the breadmaking process, **Food Research International**, ago. 2017, doi: 10.1016/j.foodres.2017.08.021.

XUE, Y.; WANG X.; CHEN, X.; HU, J.; GAO, M. T.; LI, J. Effects of different cellulases on the release of phenolic acids from rice straw during saccharification. **Bioresource Technology**, v. 234, p. 208-216, jun. 2017.

YORK, A. C.; BEAM, J. B.; CULPEPPER, A. S. WEED SCIENCE: Control of volunteer glyphosate-resistant soybean in cotton. **Journal of Cotton Science**, v. 9, p. 102-109, 2005.

ZAGONEL, J., FERNANDES, E. C. Controle de plantas daninhas e seletividade do herbicida tembotrione na cultura do milho. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 6, n. 2, p. 42-49, jul./dez. 2007.

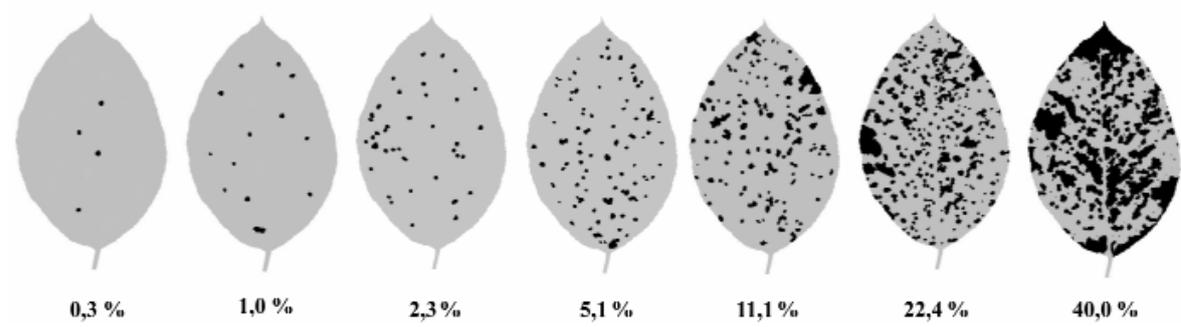
ZAGONEL, J.; VENÂNCIO, W. S.; KUNZ, P. R. Efeitos de métodos e épocas de controle das plantas daninhas na cultura do milho. **Planta Daninha**, v. 18, p. 143-150, 2000.

ZANINE, A. M.; SANTOS, E. M. Competição entre espécies de plantas - Uma revisão. **Revista da FZVA**, Uruguiana, v. 11, n. 1, p. 10-30, 2004.

ZHAI, F. H.; HAN, J. R. Mycelial biomass and intracellular polysaccharides yield of edible mushroom *Agaricus blazei* produced in wheat extract medium. **Lwt - Food Science And Technology**, v. 66, p. 15-19, mar. 2016.

**ANEXOS**

ANEXO A – Escala diagramática utilizada para avaliação da fitotoxicidade nas folhas da planta teste (*E. heterophylla*).



Fonte: Nunes & Alves (2012).