



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

FÁBIO SPITZA STEFANSKI

**UTILIZAÇÃO DE MICROALGAS RECUPERADAS E USO DE *Trichoderma*
koningiopsis NA PRODUÇÃO DE BIOCOMPOSTOS COM APLICAÇÕES
AMBIENTAIS**

ERECHIM - RS

2020

FÁBIO SPITZA STEFANSKI

UTILIZAÇÃO DE MICROALGAS RECUPERADAS E USO DE *Trichoderma koningiopsis* NA PRODUÇÃO DE BIOCOMPOSTOS COM APLICAÇÕES AMBIENTAIS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS – *Campus* Erechim, como requisito para obtenção do título de Engenheiro Ambiental e Sanitarista.

Orientadora: Prof. Dra. Helen Treichel
Coorientador: Prof. Me. William Michelon

ERECHIM - RS

2020

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Stefanski, Fábio Spitzza
UTILIZAÇÃO DE MICROALGAS RECUPERADAS E USO DE
Trichoderma koningiopsis NA PRODUÇÃO DE BIOCOMPOSTOS COM
APLICAÇÕES AMBIENTAIS / Fábio Spitzza Stefanski. -- 2020.
54 f.:il.

Orientadora: Doutora Helen Treichel
Co-orientador: Mestre William Michelin
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Engenharia Ambiental e Sanitária,
Erechim, RS, 2020.

1. Enzimas. Bioherbicidas. Efluentes têxteis.
Biomassa de microalgas. I. Treichel, Helen, orient. II.
Michelon, William, co-orient. III. Universidade Federal
da Fronteira Sul. IV. Título.

FÁBIO SPITZA STEFANSKI

UTILIZAÇÃO DE MICROALGAS RECUPERADAS E USO DE *Trichoderma koningiopsis* NA PRODUÇÃO DE BIOCOMPOSTOS COM APLICAÇÕES AMBIENTAIS

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 21/09/2020

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr.^a Helen Treichel
Orientadora

Prof. Me. William Michelon
Coorientador

Prof. Dr.^a Marília Teresinha Hartmann
UFFS - Erechim

Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior
UFFS - Chapecó

Dedico esse trabalho à minha família que exerceu um alicerce importante durante toda minha jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força, sabedoria, motivação em todos os momentos.

Ao meu avô João *in memoriam*, pelo exemplo de vida e por compartilhar diversos momentos importantes ao longo da minha vida e da minha graduação.

Aos meus pais Adecir e Zolene, por serem meu pilar, estarem ao meu lado e fazer acreditar que tinha força necessária para finalizar esse trabalho. Por entenderem o motivo das minhas ausências, pela paciência, por vibrarem comigo em todas as conquistas e pelo apoio recebido durante toda a graduação. Pai, obrigado pelos inúmeros e gostosos cafés da manhã com pratos de torrada e torres de sanduíche que tornavam-se o combustível matinal para enfrentar os desafios do decorrer do dia. Mãe, agradeço por todas orações e por ser tão compreensiva. Obrigado pelos deliciosos cafés que eram degustados noite a dentro, ao lado das intermináveis listas de cálculo, física e disciplinas com projeto. Essa conquista também é de vocês!

À minha irmã Francine pela cumplicidade, generosidade e por ser uma companheira de vida. Por dividir empréstimos na biblioteca e tirar 5 minutinhos para um café na cantina ao longo desses 5 anos. A todos os meus familiares pelo apoio, pela torcida, pelo carinho e pela contribuição valiosa nesse trabalho.

Agradeço aos meus orientadores, Prof^ª. Dr^ª. Helen Treichel e Prof. Me. William Michelin, pela disponibilidade, sugestões, incentivo e por me acompanharem no decorrer dessa trajetória. Em especial a Prof^ª. Dr^ª. Helen Treichel pelo apoio oferecido desde muito antes do início dessa pesquisa e com quem compartilho 3 anos de jornada científica! Muito obrigado por ter aberto as portas do laboratório e me mostrar o mundo da pesquisa (até hoje lembro-me do primeiro e-mail ((risos)). Obrigado por todo apoio, confiança, incentivo, dedicação, aprendizado, amizade e por inúmeras oportunidades que possibilitaram o meu desenvolvimento como pessoa e pesquisador. Também agradeço ao William, pelo fornecimento das microalgas utilizadas nesse trabalho. Gratidão por tudo!

Também, um agradecimento especial à Prof^ª. Dr^ª. Gislaïne Fongaro, uma das motivadoras deste trabalho, com quem tive a oportunidade de aprender muito durante sua

passagem pelo LAMIBI e durante meu estágio na UFSC. Obrigado por todo carinho, amizade e por ser esse ser humano incrível que és. Gratidão!

Não posso deixar de agradecer também a esta universidade e ao seu corpo docente por todo o conhecimento compartilhado no decorrer desse período.

Aos colegas e amigos do LAMIBI que mais do que isso, tornaram-se uma família para mim! Obrigado por toda ajuda, apoio e incentivo nas horas difíceis e de cansaço. Sou muito grato por ter encontrado vocês em minha caminhada universitária. Foi um grande privilégio aprender, trabalhar e conviver com vocês. Vocês foram muito importantes nesse trabalho. Quero levar essa amizade por muitos e muitos anos. Obrigado por tudo e por tanto!

Aos amigos que construí ao longo desse percurso e que vou levar para a vida. Ficarão as saudades das jantas, das rodas de chimarrão durante o intervalo das aulas e dos trabalhos em grupos.

Aos pesquisadores do Laboratório de Agroecologia da UFFS que contribuíram diretamente para a realização desse trabalho.

As demais pessoas que contribuíram direta e indiretamente para a realização desse trabalho.

A EMBRAPA pela disponibilização da biomassa de microalgas.

*“Seja fiel nas pequenas coisas porque é nelas
que mora a sua força”*

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

A busca por meios de cultura alternativos aos meios sintéticos convencionais, tem se concentrado em muitos subprodutos da agricultura e pecuária, devido ao potencial de servir como matéria-prima em processos fermentativos. Visando agregar valor ao uso de biomassa e tornar processos fermentativos mais baratos, este trabalho concentrou-se na utilização de biomassa de microalgas recuperadas do polimento terciário de efluentes da suinocultura como substrato em fermentação. Nesse sentido, o objetivo central deste estudo foi investigar o potencial de biocompostos produzidos por fermentação submersa, utilizando *Trichoderma koningiopsis* e biomassa de microalgas recuperadas em três diferentes aplicações: (I) Agentes bioherbicidas na pré e pós-emergência de *Cucumis sativus* e plantas daninhas (*Bidens pilosa*, *Conyza bonariensis*, *Urochloa plantaginea* e *Euphorbia heterophylla*), respectivamente; (II) Produção de enzimas com interesse industrial e ambiental; (III) Degradação de corantes sintéticos (vermelho, azul, amarelo e marrom) utilizados pela indústria têxtil. Para isso, foram realizados testes preliminares utilizando a biomassa fresca e liofilizada, com e sem pré-tratamento por ultrassom. Posteriormente um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi realizado para investigar o efeito de parâmetros operacionais como temperatura (20-45 °C), agitação (0-200 RPM) e pH (3-14) no desempenho fúngico e nos perfis de produção enzimática. Os biocompostos produzidos neste estudo foram relevantes para o controle na pré-emergência da planta modelo *Cucumis sativus*, com índices de vigor de até 8,05% e na pós-emergência da planta daninha *Conyza bonariensis* com danos fitotóxicos de até 100% após 15 dias de aplicação. Dentre as enzimas analisadas, as peroxidases foram as que apresentaram maiores atividades e o corante marrom foi o que apresentou a degradação mais promissora dentre os corantes têxteis testados (cerca de 54,42% de degradação). Nesse estudo, a integração de bioprocessos e economia circular, por meio da recuperação de matéria-prima, é promissora, tanto para a valorização da biomassa, quanto para a produção de biocompostos de alto valor agregado e com diferentes funcionalidades, com zelo à sustentabilidade e ao meio ambiente.

Palavras chave: Enzimas. Bioherbicidas. Efluentes têxteis. Biomassa de microalgas

ABSTRACT

The search for alternative culture media to the conventional synthetic media has been concentrated in many by-products of agriculture and livestock, due to the potential to serve as raw material in fermentation processes. In order to add value to the use of biomass and make fermentation processes cheaper, this work focuses on the use of biomass from microalgae recovered from the tertiary polishing of swine effluents as substrate in fermentation. In this sense, the central objective of this study was to investigate the potential of biocomposites produced by submerged fermentation, using *Trichoderma koningiopsis* and recovered microalgae biomass in three different applications: (I) Bioherbicidal agents in the pre and post-emergence of *Cucumis sativus* and weeds (*Bidens pilosa*, *Conyza bonariensis*, *Urochloa plantaginea* and *Euphorbia heterophylla*) respectively; (II) Production of enzymes of industrial and environmental interest; (III) Degradation of synthetic dyes (red, blue, yellow and brown) used by the textile industry. For this, preliminary tests were carried out using fresh and freeze-dried biomass, with and without pre-treatment by ultrasound. Subsequently, a Central Rotational Compound Design (CCRD) was performed to investigate the effect of operational parameters such as temperature (20-45 °C), agitation (0-200 RPM) and pH (3-14) on fungal performance and enzyme production profiles. The biocomposites produced in this study were relevant for the control in the pre-emergence of the model plant *Cucumis sativus*, with vigor rates of up to 8.05% and in the post-emergence of the weed *Conyza bonariensis* with phytotoxic damage of up to 100% after 15 days of application. Among the enzymes analyzed, peroxidases were the ones that showed the highest activity, and the brown dye was the one that showed the most promising degradation among the tested textile dyes (about 54.42% of degradation). In this study, the integration of bioprocesses and circular economy, through the recovery of raw material, it is promising, both for the valorization of biomass and for the production of biocomposites with high added value and with different functionalities with zeal for sustainability and environment.

Keywords: Enzymes. Bioherbicides. Textile effluents. Microalgae biomass.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	METODOLOGIA	18
3.1	AQUISIÇÃO DA MICROALGA E FUNGO	18
3.1.1	Obtenção da biomassa de microalga.....	18
3.1.2	Obtenção do fungo.....	19
3.2	PROCESSO FERMENTATIVO	20
3.3	ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	21
3.3.1	Lipase.....	22
3.3.2	Celulase.....	22
3.3.3	Amilase	22
3.3.4	Peroxidase	23
3.3.5	Lacase	23
3.4	BIOCOMPOSTOS COM APLICAÇÃO AMBIENTAL	23
3.4.1	Testes de germinação na pré-emergência de <i>Cucumis sativus</i>	24
3.4.2	Pós-emergência em plantas daninhas resistentes	25
3.4.3	Degradação de efluentes sintéticos da indústria têxtil	25
3.5	TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	26
4	RESULTADOS e discussão	26
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA.....	26
4.2	PRODUÇÃO DE ENZIMAS E INTERAÇÃO COM O SUBSTRATO	26
4.3	APLICAÇÃO EM PLANTAS DANINHAS RESISTENTES	28
4.4	DESEMPENHO FÚNGICO E ANÁLISE DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA EM DIFERENTES CONDIÇÕES OPERACIONAIS	32
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
4.6	APLICAÇÃO EM <i>CUCUMIS SATIVUS</i>	36
4.7	AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS	41
5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	45
	REFERÊNCIAS	47
	APÊNDICE A – ARTIGO SUBMETIDO COMO PRODUTO DESTE TRABALHO ...	56

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, houve um crescente interesse no potencial biotecnológico das microalgas, principalmente devido à identificação de diversas substâncias sintetizadas por estes organismos. A grande variabilidade na composição bioquímica da biomassa obtida das culturas microalgais, aliadas ao estabelecimento de tecnologia de cultivo em grande escala e uso do melhoramento genético vêm permitindo que determinadas espécies sejam comercialmente utilizadas (DERNER et al., 2006; ODJADJARE; MUTANDA, OLANIRAN, 2015).

A biomassa de microalgas tem sido usada principalmente como matéria-prima para várias *bio-comodities* como biodiesel, biogás, biohidrogênio e outros biocombustíveis (RODOLFI et al., 2009; MARKOU et al., 2012; WANG et al., 2017; KUMAR et al., 2018). Sistemas de cultivo baseado em águas residuais agrícolas e dos efluentes da digestão anaeróbia, são considerados uma valiosa fonte alternativa e econômica de nutrientes para o crescimento de microalgas em larga escala. O desenvolvimento de microalgas nesses ambientes, além de produzir uma biomassa relativamente valiosa, oferece vantagens significativas em termos do tratamento de águas residuais, reduzindo assim possíveis riscos de eutrofização com a descarga incorreta dos efluentes da digestão anaeróbia (JI et al., 2014; PRANDINI et al., 2016).

O uso de tecnologias simples para o cultivo de microalgas nesses ambientes, é visto como uma excelente abordagem para promover a melhor gestão desse resíduo, incluindo o tratamento e a geração de biomassa com alto valor agregado no mercado e aos interesses biotecnológicos, que juntos desenvolvem o conceito de economia circular em um processo de biodigestão.

A utilização de biomassa de microalgas em processos de fermentação é um assunto relativamente recente e que tem sido muito explorado nos últimos dez anos. Em processos fermentativos, a busca por meios de crescimento alternativos aos meios sintéticos convencionais existentes tem merecido ampla atenção. Segundo Basu et al. (2015), os processos fermentativos passaram por diversas mudanças ao longo do tempo, mas alguns desafios ainda permanecem, como especificidade de substratos, custos do processo e ampliação de escala. Existe uma ampla exploração sobre a capacidade de fontes alternativas atenderem a especificidade no crescimento de diferentes microrganismos, como também para a redução de custos em fermentações em grande escala; processos esses tão necessários e fundamentais para a biotecnologia (BASU et al., 2015; KLAIC et al., 2015).

De acordo com Wösten et al. (2019), os fungos filamentosos são utilizados há mais de um século como fábricas celulares versáteis e altamente produtores de enzimas, antibióticos, ácidos orgânicos, entre outros compostos. Segundo Verma et al. (2007), espécies de *Trichoderma* spp. têm sido utilizados em uma ampla gama de produções comerciais de enzimas como celulasas, hemicelulasas, proteases, β -1,3-glucanase, peroxidase e lacase. Recentemente, Bordin et al. (2018) estudaram o efeito de biocompostos produzidos por *Trichoderma koningiopsis* como atividade herbicida em plantas daninhas relacionando o efeito de fitotoxicidade por meio da ação de enzimas como amilase, celulase, lipase e peroxidase presentes no extrato fermentado, obtendo-se resultados satisfatórios para a espécie *Euphorbia heterophylla*.

Um dos maiores gargalos da agricultura moderna para manter a produtividade é lidar com a presença de ervas daninhas resistentes nesses ambientes. Esse processo pode ser devido à dinâmica natural do ecossistema, mas sabe-se que as aplicações de herbicidas como ferramenta de controle para essas plantas têm um grande efeito no ponto de vista da resistência (PEROTTI et al., 2020). A forte dependência do uso intensivo e desordenado de herbicidas sintéticos para o controle de plantas daninhas tem sido questionado por muitos anos, e os problemas decorrentes de seu uso exagerado têm sido cada vez mais frequentes e significativos (CORDEAU et al., 2016).

Antes da década de 1990, agricultores tinham a disposição herbicidas com diferentes modos de ação que eram lançados no mercado a intervalos de poucos anos. Isso fazia com que a resistência das ervas daninhas fosse combatida, já que os produtos atingiam diferentes locais-alvo das plantas (DUKE, 2011). Porém nos últimos 20 anos não houve a implantação de nenhum importante herbicida com modo de ação diferente dos já existentes, fazendo com que o surgimento de novas plantas daninhas resistentes aumentasse (DUKE, 2012). Atualmente, a preocupação do público com a segurança ambiental dos herbicidas sintéticos tem aumentado o interesse no desenvolvimento de métodos alternativos que sejam eficientes no controle de plantas daninhas e também na minimização de impactos ambientais (CORDEAU et al., 2016).

Por isso, o manejo sustentável de ervas daninhas é especialmente importante para amenizar as pressões ambientais que a agricultura mundial enfrenta, permitindo aos agricultores serem economicamente sustentáveis reduzindo os impactos ambientais na agricultura e garantindo maior segurança alimentar e social (CORDEAU et al., 2016). Os bioherbicidas são definidos como produtos de origem natural que podem ser organismos vivos, relacionados especificamente a microrganismos ou os metabólitos que são formados ao longo de seu crescimento e desenvolvimento (BAILEY, 2014). O uso desses microrganismos na agricultura

pode promover o retardo no desenvolvimento de plantas invasoras agindo como uma forma de biocontrole e proteção ao meio ambiente (BOYETTE; HOAGLAND, 2015; RADHAKRISHNAN; ALQARAWI; ABD_ALLAH, 2018). No entanto, poucos trabalhos elucidam a fisiologia das plantas quando realizada a interação com os bioherbicidas, porém alguns estudos trazem processos metabólicos significativos que ocorrem (fotossíntese, antioxidantes, nutrientes e hormônios), após o estresse na planta, afetando diretamente as funções celulares regulares como a divisão celular, síntese de pigmentos, absorção de nutrientes e reguladores de crescimento (RADHAKRISHNAN; ALQARAWI; ABD_ALLAH, 2018). Entretanto, embora considerados promissores os estudos nessa área, a pesquisa sobre bioherbicidas tem recebido menor apoio de administradores e agências financiadoras do que os herbicidas convencionais, o que pode se caracterizar como o maior obstáculo da introdução de novos agentes de controle biológico no mercado (KLAIC et al., 2015).

O interesse em enzimas de baixo custo e que atendam especificidades desejadas em várias áreas também é um tema forte de pesquisa. A tecnologia enzimática é um campo bastante promissor dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado, o que torna possível a aplicação de diversas enzimas, seja para qualidade final de um produto, ou na redução de custos de processos (MALDONADO, 2006). De acordo com uma pesquisa da *Business Communication Company* (2018), o mercado global de enzimas deve atingir até US\$ 7,0 bilhões em 2023. Nesse mercado são predominantes as hidrolases como por exemplo, amilases, celulases, lipases e proteases (BILAL; IQBAL, 2019). As projeções de mercado preveem um direcionamento forte para a indústria de alimentos, têxtil, papel, couro, detergente, alimentação animal e biocombustível. Na última década a indústria de enzimas experimentou um crescimento significativo. Isso revela um forte indicativo que para os próximos anos esse mercado tende a crescer ainda mais em virtude da demanda global por tecnologias mais limpas e ecológicas para proteger o meio ambiente (BUSINESS COMMUNICATION COMPANY, 2018).

Na área ambiental, a aplicação de enzimas para o tratamento de efluentes foi proposta pela primeira vez em 1930. Porém, a sua utilização na remoção de poluentes químicos específicos só foi desenvolvida no ano 1976 (DEMARCHE et al., 2012). Uma revisão recente abordou as notáveis potencialidades biocatalíticas de lacases e peroxidases para degradar diferentes classes de poluentes orgânicos. Por apresentar propriedades catalíticas exclusivas e alta seletividade, estas enzimas são candidatas biocatalíticas na transformação biológica de uma série de contaminantes tóxicos em parcelas inofensivas para o meio ambiente (MORSI et al., 2020). A abordagem biológica que utiliza enzimas oxidorreduzidas, por exemplo, as

peroxidases, para degradação de poluentes é uma área de pesquisa relativamente nova e promissora. Entretanto, apesar de muitas vantagens, é importante mencionar que alguns desafios precisam ser superados, como os altos custos dos biocatalisadores, reutilização enzimática e alteração da conformação em condições ambientais adversas (PANDEY et al., 2017; MORSI et al., 2020).

A fonte comercial mais utilizada de peroxidase é a de raiz forte (*horseradish* peroxidase), muito cultivada em países de clima frio e em pequena escala de produção, o que torna os custos de produção da enzima elevados em virtude da disponibilidade limitada da planta (SILVA et al., 2011). Dessa forma, a aplicação dessas enzimas no contexto ambiental, inviabiliza economicamente sua utilização no que se refere por exemplo, ao tratamento de efluentes líquidos para remoção de compostos recalcitrantes. Portanto, há um interesse crescente por novas fontes desta enzima e por processos de obtenção de baixo custo, que possibilitem a sua utilização como biocatalisador ambiental.

O tratamento de efluentes sintéticos da indústria têxtil utilizando extratos enzimáticos brutos contendo peroxidase e lacase é uma das investigações que foi realizada neste trabalho. Os corantes sintéticos são projetados para serem geralmente resistentes ao desbotamento. Sua estrutura aromática, altamente complexa, os torna resistentes às atividades ambientais degradantes. Eles não apenas precisam manter o ambiente alcalino ou ácido, mas também precisam resistir à lavagem com sabonetes e agentes clareadores, além de serem resistentes à irradiação leve e ultravioleta (ALI et al., 2013).

Uma quantidade bastante relevante (10-15%) do total de corantes da indústria têxtil, após o processo de tingimento é descarregada no meio ambiente como efluentes (SAROJ et al., 2014). Estima-se que apenas as indústrias têxteis gerem cerca de 4500 milhões de quilolitros de águas residuais por ano (SINGH et al., 2013). Em virtude da grande variedade de estrutura desses compostos não existe uma metodologia que seja universalmente utilizada para o tratamento de efluentes têxteis. Dentre as técnicas que vêm sendo desenvolvidas, pode-se citar os tratamentos biológicos, que apresentam grande potencial de remoção de cor (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Várias investigações relataram o uso de peroxidases para a remoção de corantes azo, obtendo porcentagens de descoloração que variam de 50 a 90% em diferentes condições operacionais (MARCHIS et al, 2011; NOUREN; NAWAZ, 2015; SILVA et al., 2012). Apesar da variedade de fontes de peroxidases, não foram encontrados relatos anteriores nos principais bancos de dados científicos (*Web of Science* e *Scopus*, período: *all years*) relacionados à aplicação de peroxidases obtidas da fermentação fúngica utilizando um subproduto do

tratamento de dejetos da suinocultura para remoção de cores. O levantamento de artigos ocorreu com a inserção das seguintes palavras-chave: “*microalgae biomass**” AND “*fungus fermentation**” AND “*degradation of synthetic dyes**”. O campo de busca consistiu em título do artigo, resumo e palavras-chave.

Nesse sentido, a proposta deste trabalho foi investigar o potencial de biocompostos produzidos por fermentação submersa, utilizando *Trichoderma koningiopsis* e biomassa de microalgas recicladas em três diferentes aplicações: (I) Agentes bioherbicidas na pré e pós-emergência de *Cucumis sativus* e plantas daninhas respectivamente; (II) Produção de enzimas com interesse industrial e ambiental; (III) Degradação de corantes sintéticos similares aos utilizados pela indústria têxtil. Considerando a importância do conhecimento dos fatores que influenciam o crescimento de fungos em cultura submersa, foram investigadas também diferentes condições operacionais para o crescimento de *Trichoderma koningiopsis*. A integração do conceito de economia circular com uma abordagem na produção de bioherbicidas, enzimas e tratamento de efluentes sintéticos de indústria têxtil ainda é um assunto não explorado na literatura. Em ampla pesquisa realizada na literatura (*Web of Science, Scopus* considerando os últimos 50 anos) este parece ser o primeiro estudo focado nesse processo, que busca um ciclo fechado no tratamento de efluentes da suinocultura com a recuperação de matéria-prima resultante do polimento de efluentes para o cultivo de microrganismos visando à produção de biocompostos com diferentes interesses biotecnológicos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial da utilização de biomassa de microalgas em processos fermentativos submersos, visando produção de biocompostos com aplicações ambientais.

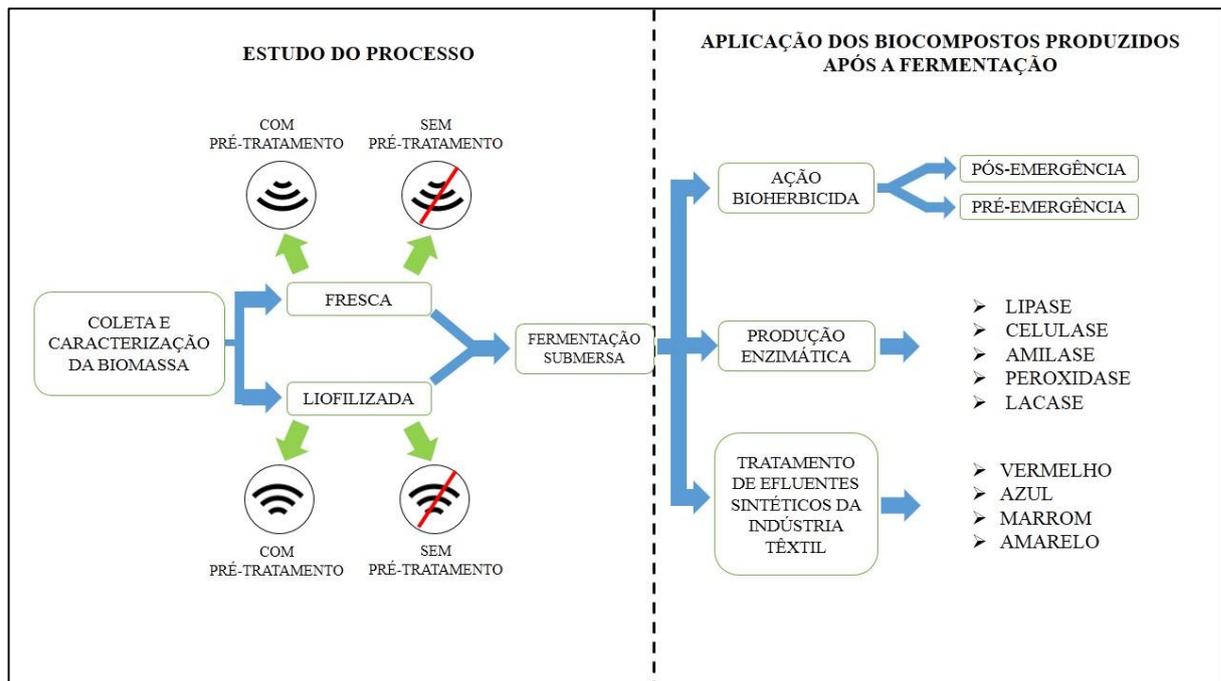
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a capacidade de crescimento de *Trichoderma koningiopsis* em meio de cultura utilizando biomassa de microalgas recuperadas do polimento terciário de efluentes da suinocultura;
- Investigar parâmetros operacionais utilizando a metodologia de planejamento experimental;
- Aplicar biocompostos produzidos como ação bioherbicida na pós-emergência de plantas daninhas resistentes e na pré-emergência de *Cucumis sativus*;
- Avaliar a produção de biocatalisadores enzimáticos;
- Avaliar o potencial dos biocompostos na degradação de efluentes sintéticos.

3 METODOLOGIA

Neste item serão abordadas as metodologias utilizadas para a realização deste trabalho. Com base no fluxograma apresentado na Figura 1, é possível apresentar de forma esquemática as principais etapas que foram realizadas. Os processos aqui descritos serão detalhados ao longo deste tópico.

Figura 1: Esquemática das etapas realizadas neste trabalho.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1 AQUISIÇÃO DA MICROALGA E FUNGO

3.1.1 Obtenção da biomassa de microalga

Neste estudo, foi utilizado um consórcio microalgal, sendo predominante composta (>95 %) por microalga *Chlorella* spp. A biomassa foi cedida pela Embrapa Suínos e Aves (Concórdia, SC), sendo resultante do processo de fitorremediação da água residuária da suinocultura, após o tratamento anaeróbio (UASB). A caracterização da biomassa microalgal ocorreu na própria Embrapa.

No sistema de fitorremediação, as microalgas foram cultivadas em batelada sob condições não estéreis, em um reator de 500L (Ø 121,2 cm e altura 58,4 cm), sob a luz natural ($321,5 \pm 411,4 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$) e temperatura controlada de 25 °C. O reator foi mantido sob agitação contínua - *aquarium pump* (S300, Sarlobetter®, BR). O cultivo foi realizado utilizando

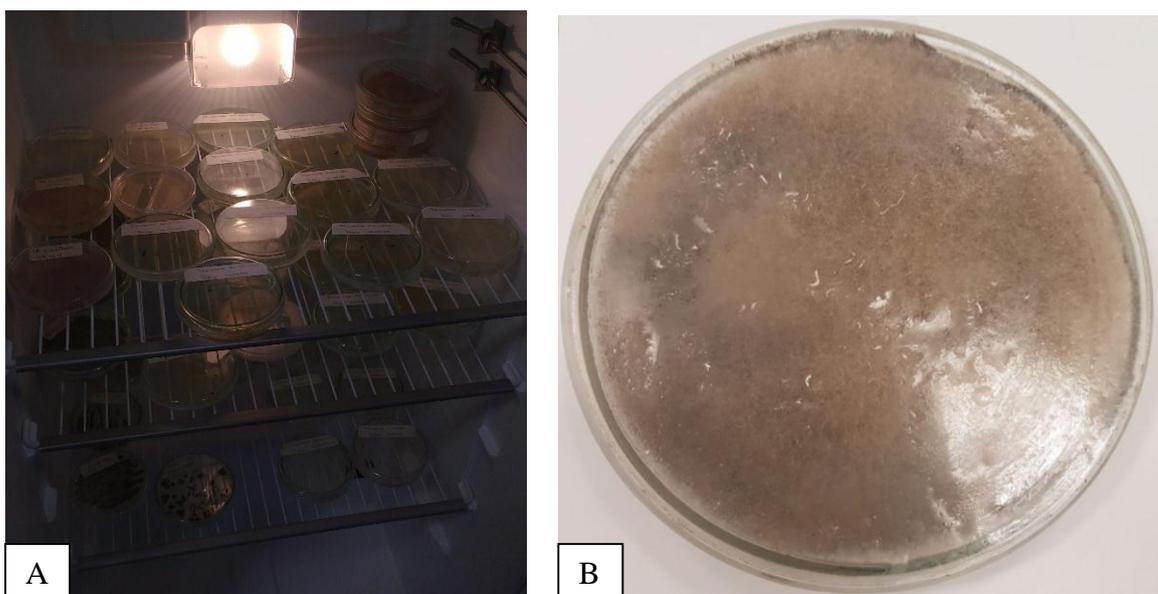
digestato anaeróbico (6% v/v), pós UASB, inoculado com 30% (v/v), aproximadamente 70 mg de microalga (biomassa seca)/L. Após 12 dias de cultivo, a biomassa presente no reator (3 - 4 g biomassa fresca/L) foi separada por centrifugação (3,000×g, em 25°C por 30 min; EVODOS, T10, Netherlands). Após a centrifugação a biomassa foi imediatamente congelada (-80 °C) ou liofilizada (72 horas; -50°C e pressão de vácuo) (Model 030-JJ LJI Scientific) para posterior utilização no processo fermentativo (MICHELON et al., 2016).

3.1.2 Obtenção do fungo

O microrganismo utilizado para a produção dos biocompostos foi o *Trichoderma koningiopsis* (Figura 2), obtido no banco de microrganismos do Laboratório de Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul - *Campus* Erechim/RS. O fungo utilizado foi selecionado por apresentar resultados satisfatórios ao controle de plantas daninhas em testes preliminares sendo isolado a partir da planta daninha *Digitaria ciliares*, no município de Quatro Irmãos no Rio Grande do Sul (REICHERT JR. et al., 2019).

Para a manutenção e crescimento das cepas utilizou-se a técnica de repicagem em placas Petri (Figura 2) contendo meio de cultivo Ágar Batata Dextrose (ABD). As placas foram mantidas em estufa bacteriológica por 7 dias a 28 °C até serem utilizadas para as fermentações.

Figura 2. Crescimento de *Trichoderma koningiopsis* em estufa bacteriológica (A). *Trichoderma koningiopsis* após 7 dias de cultivo em PDA (B).



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2 PROCESSO FERMENTATIVO

Buscando relacionar a composição bioquímica da microalga com a composição química de meios sintéticos otimizados por Bordin et al. (2018), realizaram-se testes preliminares utilizando a biomassa microalgal em diferentes condições: 1) biomassa bruta (com 89% umidade); 2) biomassa liofilizada; 3) biomassa bruta e liofilizada pré-tratadas com sonda de ultrassom (potência 80%, tempo 10 min e 3 pulsos). A Tabela 1 descreve a composição e condições utilizadas nos testes fermentativos iniciais.

Tabela 1. Descrição dos testes realizados utilizando biomassa de microalgas como única fonte de carbono.

Ensaio	Microalga	Descrição
F1	Fresca	7,5% (m/v) de microalga + 10^6 esporos/mL <i>T. koningiopsis</i>
F2	Fresca	7,5% (m/v) de microalga pré-tratada com sonda de ultrassom + 10^6 esporos/mL <i>T. koningiopsis</i>
F3	Fresca	10% (m/v) de microalga pré-tratada com sonda de ultrassom + 10^6 esporos/mL <i>T. koningiopsis</i>
F4	Fresca	10% (m/v) de microalga + 10^6 esporos/mL <i>T. koningiopsis</i>
L1	Liofilizada	7,5% (m/v) de microalga + 10^6 esporos/mL <i>T. koningiopsis</i>
L2	Liofilizada	7,5% (m/v) de microalga pré-tratada com sonda de ultrassom + 10^6 esporos/mL <i>T. koningiopsis</i>
L3	Liofilizada	10% (m/v) de microalga pré-tratada com sonda de ultrassom + 10^6 esporos/mL <i>T. koningiopsis</i>
L4	Liofilizada	10% (m/v) de microalga + 10^6 esporos/mL <i>T. koningiopsis</i>

* O processo de pré-tratamento foi realizado imediatamente antes da inoculação dos esporos fúngicos com base na condição 3 anteriormente citada.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O meio fermentativo foi realizado em frascos erlenmeyers de 300 mL com volume útil de 150 mL e esterilizado em autoclave por 20 min e 121 °C. Após, inoculou-se 10^6 esporos/mL do microrganismo *T. koningiopsis*. A fermentação foi conduzida em agitador orbital a 28 °C, 120 RPM, por 72 horas (BORDIN et al. 2018).

Após testes preliminares, foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com o intuito de avaliar a influência dos parâmetros operacionais temperatura (20-45 °C), agitação (0-200 RPM) e pH (3-14) no desempenho fúngico e, concomitantemente, na

quantificação enzimática. Ao final dos testes enzimáticos os biocompostos foram aplicados em testes de germinação de *Cucumis sativus* na pré-emergência.

A biomassa final (contendo microalgas mais micélio fúngico) foi determinada pelo método da massa celular seca, expressa em gramas de biomassa seca por litro (GERN, 2005). Primeiramente identificou-se e pesou-se papéis filtro Whatman nº1 juntamente com placas de Petri, anotando-se os valores. Toda biomassa presente no frasco Erlenmeyer foi filtrada nos respectivos papéis filtro e posteriormente conduzidos para secagem em estufa por 48 h a 60°C. Após o período de secagem, as amostras foram alocadas em dessecadores até atingir a temperatura ambiente e posteriormente pesados. A biomassa final foi calculada pela diferença de massa entre as pesagens. O extrato líquido (filtrado, denominado por este estudo como biocomposto) foi utilizado para quantificação enzimática. A figura 3 demonstra a obtenção dos extratos pela filtragem do biocomposto após o processo fermentativo.

Figura 3. Filtragem e obtenção dos extratos enzimáticos após o processo fermentativo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Para avaliar a atividade enzimática presente nos extratos, cinco enzimas foram selecionadas nesse estudo: celulase, lipase, amilase, peroxidase e lacase, que, conforme documentadas na literatura, podem se relacionar com efeitos de biocontrole em plantas daninhas (BORDIN et al., 2018; REICHERT JR. et al., 2019) e no tratamento de efluentes da indústria têxtil (BILAL et al., 2018; MORSI et al., 2020).

3.3.1 Lipase

Para a quantificação dessa enzima foi utilizado a metodologia proposta por Treichel et al. (2016) preparando-se uma emulsão de azeite de oliva a 10% (m/v) e 5% (m/v) de goma arábica diluídos em 90% (v/v) de solução tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6. A mistura foi homogeneizada com o auxílio de um agitador de bancada. Cada amostra foi composta por 9 mL dessa emulsão acrescentando-se 1 mL do extrato fermentado sendo submetidas a agitação orbital de 165 rpm por 32 minutos a 35 °C. Posteriormente, para cada amostra foi adicionado 10 mL de solução acetona/etanol (1:1 v/v) para cessar a reação e as amostras foram submetidas em processo titulométrico utilizando NaOH 0,050 M como titulante até atingir pH 11. Para o controle, a adição de acetona/etanol foi antecipada da adição do extrato fermentado, para garantir que a reação não ocorra. Para a determinação da atividade lipásica foi utilizado a Equação 1.

$$At = \frac{(Aa-Vb)*MNaOH}{t*Vc} * 1000 \quad \text{Equação (1)}$$

Sendo que: Aa = média das amostras; Vb = valor do controle; $MNaOH$ = molaridade do Hidróxido de sódio; t = tempo reacional; Vc = volume do extrato utilizado.

3.3.2 Celulase

Para quantificação dessa enzima foi seguida a metodologia proposta de Ghose (1987) utilizando 50 mg de papel filtro Whatman número 1 como fonte de celulose. As 50 mg foram adicionadas em tubos de ensaio contendo 2 mL de tampão acetato 0,2 M e pH 5,5. Para promover a reação, adicionou-se 1 mL do extrato fermentado aos tubos de ensaio e posteriormente levados em banho termostático por 1 hora a 50 °C. Para o controle negativo utilizou-se 1 mL de água destilada ao invés do extrato enzimático. Após decorrido o tempo de reação avaliou-se a liberação de açúcares redutores totais das amostras pelo método de DNS (ácido 3,5 dinitrosalissílico) em comprimento de onda de 540 nm (MILLER, 1959). Para a celulase a unidade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de açúcar redutor por minuto nas condições da reação.

3.3.3 Amilase

A quantificação de enzimas amilase presentes no extrato fermentado foi baseada em estudos desenvolvidos por Fuwa (1954) e Pongsawasdi e Yagisawa (1987). Utilizou-se amido

solúvel como substrato diluídos na proporção 1:100 (m/v) em tampão acetato 100 mM e pH 5,0. Após, 1 mL dessa solução foi transferida para tubos de ensaio adicionando-se também 1 mL do extrato enzimático produzido pela fermentação. As amostras foram levadas em banho termostático por um período de 10 minutos e temperatura de 38 °C. Da mesma forma que para a celulase, o controle foi realizado com a substituição do extrato enzimático por água destilada. A atividade enzimática também foi determinada por meio do método DNS (ácido 3,5 dinitrosalissílico) (MILLER, 1959). Para a amilase a unidade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de açúcar redutor por minuto nas condições da reação.

3.3.4 Peroxidase

A enzima peroxidase foi quantificada com base na metodologia de Devaiah e Shetty (2009), utilizando 1,5 mL de tampão fosfato 5 mM e pH 5,0, 2 mL de água destilada, 0,5 mL de guaiacol 1% (v/v) e 1 mL de peróxido de hidrogênio 0,08% (v/v). Todos os reagentes que compõe o meio reacional foram adicionados em tubos de ensaio e acrescidos de 1 mL do extrato fermentado e submetidos em banho termostático por um período de 10 minutos e temperatura de 35 °C. A reação frente ao guaiacol foi avaliada em espectrofotômetro UV-VIS 470 nm (KHAN; ROBINSON, 1994). Uma unidade da atividade da peroxidase representou a oxidação de 1 μ mol de guaiacol em 1 min nas condições de ensaio.

3.3.5 Lacase

Para determinar a atividade da lacase, adaptou-se a metodologia proposta por Hou et al., (2004), utilizando 2,2'-azino-di- (3-etilbenzotiazolzin-6-sulfônico) (ABTS) como substrato enzimático. A mistura de reação continha 0,4 mL de ABTS 10 mM e 3,4 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 e 0,2 mL do extrato enzimático, levados a um banho termostático a 40°C por 5 minutos. As amostras foram analisadas por espectrofotômetro a 420 nm. Uma unidade de atividade (U) foi definida como o número de μ mol de ABTS oxidados por minuto.

3.4 BIOCÓMPÓSTOS COM APLICAÇÃO AMBIENTAL

Além do estudo da produção enzimática conforme visualizado no item 3.3, o biocómposto também foi estudado quanto ao potencial bioherbicida na pré e pós-emergência

de plantas e também, quanto a degradação de efluentes sintéticos similares aos utilizados pela indústria têxtil.

3.4.1 Testes de germinação na pré-emergência de *Cucumis sativus*

A ação dos extratos bioherbicidas provenientes do DCCR foi avaliada na germinação da espécie *Cucumis sativus* (Pepino Esmeralda tipo Caipira). Os ensaios foram realizados em caixas gerbox previamente desinfetadas com álcool 70% e forradas com folha de papel filtro (Germitest®) umedecidas com o respectivo tratamento (biocomposto produzido) correspondendo um volume de 2,5 vezes o peso do papel (8 mL), de acordo com as Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009).

Após, foram semeadas 4 repetições de 25 sementes, totalizando 100 sementes por tratamento e acondicionados em estufa incubadora (tipo BOD), com temperatura constante (25 °C) e fotoperíodo de 12/12 horas de luz/escuro.

Para a análise do teste de germinação, contabilizou-se o número de sementes germinadas e o número de sementes que germinaram e tornaram-se plantas saudáveis. Posteriormente, esses dados foram expressos em percentagem de inibição de germinação ou de plantas anormais (plantas que não tiveram seu crescimento saudável). A avaliação do número de sementes germinadas foi feita aos 4 e aos 8 dias após a instalação do experimento, seguida de outra avaliação aos 10 dias para medição do comprimento do hipocótilo e da raiz primária (plantas com germinação hipógea), com o auxílio de paquímetro (PDV 1500 - Vonder - Brasil). Para esse teste, foram contabilizadas como germinadas, as sementes que apresentaram crescimento da radícula superior a 2 mm, segundo descrito na RAS (BRASIL, 2009).

A germinação foi calculada por meio da equação:

$$(\%)G = \frac{ni1+ni2+ni3+ni4}{A} * 100 \quad \text{Equação (2)}$$

Em que: ni: é o número de sementes germinadas em cada repetição; A, total de sementes utilizadas.

E o índice de vigor (IV) calculado por meio da equação:

$$\text{Índice de vigor (IV)} = (\text{Hipocótilo} + \text{Raiz primária}) * (\%)G \quad \text{Equação (3)}$$

3.4.2 Pós-emergência em plantas daninhas resistentes

Os biocompostos obtidos foram avaliados quanto sua ação bioherbicida frente a plantas daninhas cultivadas em casa de vegetação, com controle de temperatura (24 °C) e sem controle de luminosidade. Foram utilizados os biocompostos que apresentaram melhores desempenhos das atividades enzimáticas obtidas nos ensaios preliminares. O biocomposto foi aplicado com a ajuda de um pincel devido à viscosidade do extrato. Os danos foliares foram avaliados após 7 e 15 dias de tratamento com base de metodologias recomendadas pela Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas (1995). As plantas selecionadas para o estudo compreendem aquelas que apresentam resistência por herbicidas sintéticos como: *Bidens pilosa* (picão preto), *Conyza bonariensis* (buva), *Urochloa plantaginea* (papuã) e *Euphorbia heterophylla* (leiteiro) (HEAP, 1999; CERDEIRA et al., 2007; DIAS et al., 2018; HEAP, 2019).

3.4.3 Degradação de efluentes sintéticos da indústria têxtil

Os extratos brutos produzidos após o processo fermentativo também foram avaliados quanto a capacidade de degradação de corantes sintéticos similares aos utilizados pela indústria têxtil. Primeiramente escolheu-se um dos extratos provenientes da fermentação preliminar para avaliar a especificidade enzimática em quatro corantes diretos utilizados na indústria têxtil: vermelho (455 nm), azul (595 nm), amarelo (414 nm) e marrom (530 nm). Para cada corante, foram realizados dois ensaios. Um usando 5 mL e outro 10 mL do extrato enzimático bruto. As amostras foram preparadas com 100 mg/L de cada corante e 40 mg/L de peróxido de hidrogênio a 35%, totalizando um volume final de 0,1 L (MARQUES et al., 2017). A reação enzimática foi conduzida em agitador orbital por 5 horas a 160 RPM e 25 °C. Posteriormente, a degradação foi analisada usando espectrofotômetro com os respectivos comprimentos onda para cada corante mencionados acima. A quantidade de corante degradado foi determinado por meio da Equação 4 expressa a seguir.

$$\text{Degradação (\%)} = \frac{ABS_{INICIAL} - ABS_{FINAL}}{ABS_{INICIAL}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Em que: $ABS_{INICIAL}$ = Absorbância inicial; ABS_{FINAL} = Absorbância final.

Após os estudos preliminares com os diferentes corantes têxteis também foram aplicados os extratos obtidos no DCCR para o corante que apresentou a degradação mais

promissora. Essa etapa consistiu em analisar a relação entre as diferentes atividades observadas pelos 17 ensaios com a degradação dos corantes.

3.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Os dados obtidos através da realização dos ensaios foram analisados com auxílio do *Software Protimiza Experimental Design* (<https://experimental-design.protimiza.com.br>), sendo realizado a análise de efeito das variáveis, bem como a análise de variância (ANOVA) (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA

A composição da biomassa microalgal após o processo de fitorremediação do digestato resultante da produção de biogás apresentou os seguintes resultados: 56,1% de proteínas, 34,7% de carboidratos, 1,7% de lipídios e 7,8% de minerais (MICHELON et al., 2016). Visando encontrar uma quantidade equivalente (em massa) de biomassa, essa caracterização foi relacionada com meios quimicamente definidos utilizados para crescimento de *Trichoderma koningiopsis* em pesquisas anteriores realizadas pelo grupo de pesquisa (BORDIN, et al., 2018). A descrição sobre a composição do meio de cultivo e as quantidades de massa utilizadas estão apresentadas na seção 3.2. A Tabela 2 apresenta os resultados do processo fermentativo realizado.

4.2 PRODUÇÃO DE ENZIMAS E INTERAÇÃO COM O SUBSTRATO

A partir dos ensaios iniciais de fermentação que foram realizados com a utilização de diferentes tipos de microalga (bruta e liofilizada), verificou-se que houve uma grande produção de peroxidases com a utilização de biomassa liofilizada e que o pré-tratamento ultrassônico não foi determinante para a produção dessa enzima (Tabela 2). Em comparação com resultados encontrados por Bordin et al. (2018), utilizando meio sintético para crescimento do fungo, observa-se uma maior produção de peroxidases utilizando biomassa de microalga. Para as demais enzimas a substituição do meio sintético pela biomassa não foi promissor.

Tabela 2. Atividade enzimática e produção de biomassa após fermentação utilizando *T. koningiopsis* com biomassa microalgal fresca e liofilizada sob diferentes condições.

Condições		Biomassa fresca**				Biomassa liofilizada**				Meio sintético*
		F1	F2	F3	F4	L1	L2	L3	L4	
Atividade enzimática (U/mL)	Peroxidase	0,00	0,00	666,67	766,67	2966,70	133,30	15400,00	16200,00	41,00
	Celulase	0,50	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00	3,99	5,99	10,62
	Amilase	0,00	0,00	2,25	0,00	0,00	0,00	0,00	6,98	17,25
	Lipase	0,00	0,00	0,75	1,57	0,00	0,00	0,00	0,00	3,22
Biomassa (g/L)		2,26	2,09	4,78	4,75	11,44	13,21	14,31	14,05	1,85

*Resultados de produção enzimática utilizando meios sintéticos para crescimento de *T. koningiopsis* que representaram melhor efeito bioherbicida em *H. heterophylla* (BORDIN et al., 2018).

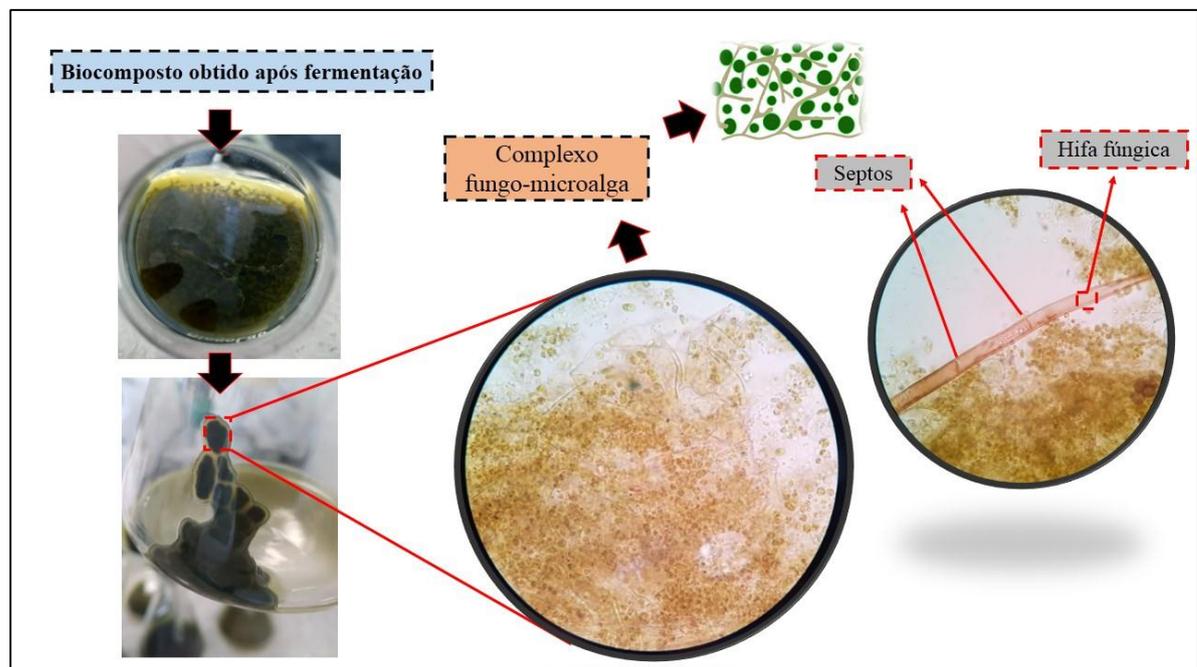
**A composição dos ensaios F1; F2; F3; F4; L1; L2; L3; L4 está descrita na Tabela 1.

O ensaio L4 foi o maior produtor de peroxidase e amilase (16.200,00 e 6,98 U/mL, respectivamente). O ensaio L3 apresentou a maior produção de celulase e biomassa. A celulose é o principal carboidrato na parede celular das microalgas e é propensa à degradação enzimática, enquanto o amido, substrato da amilase, é encontrado nos plastídeos (intracelulares) (CHU et al., 1982; SANDER; MURTHY, 2009; VELAZQUEZ-LUCIO et al., 2018). A alta produção de biomassa pode estar ligada à maior existência de substrato e também aos maiores rendimentos de celulase que quebram a celulose e geram um substrato valioso para o crescimento de fungos, a glicose.

Também houve produções de amilase somente quando se detectou a presença de peroxidase com lipase (ensaio F3) e peroxidase com celulase (ensaio L4) sugerindo que possivelmente existe um sinergismo entre essas enzimas na dissolução de membranas e na quebra dos polissacarídeos presentes na parede celular da microalga tornando acessível carboidratos como o amido para o crescimento fúngico que está presente intracelularmente (VELAZQUEZ-LUCIO et al., 2018). Enzimas exógenas como estas já foram relatadas por perturbarem significativamente as paredes celulares das microalgas liberando nutrientes presos com importante valor nutricional (COELHO et al., 2019).

Estudos que analisaram o co-cultivo de microalga com fungos filamentosos em processos de peletização para remoção de células microalgais do meio líquido, afirmam que as células de microalgas foram incorporadas na malha das hifas fúngicas com aumento na produção de biomassa e sem alteração na composição de lipídios (XIE et al., 2013). Esse mesmo efeito pode ser visualizado na Figura 4. Os autores também enfatizam que o efeito sinérgico de produção de biomassa e acúmulo de lipídios se deve a utilização fúngica dos carboidratos na parede celular das microalgas (XIE et al., 2013).

Figura 4. Demonstração da incorporação de hifas fúngicas com a biomassa de microalgas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 APLICAÇÃO EM PLANTAS DANINHAS RESISTENTES

Foram selecionadas quatro plantas daninhas resistentes aos herbicidas comerciais para averiguação dos efeitos fitotóxicos por meio do biocomposto formado. Decidiu-se aplicar as melhores condições obtidas das respostas enzimáticas (ensaio F4 e L4) para avaliar os efeitos da aplicação utilizando os extratos produzidos com a biomassa fresca e com biomassa liofilizada. A tabela 3 apresenta os resultados dos danos fitotóxicos encontrados e uma comparação com demais trabalhos na literatura. A porcentagem dos efeitos foi relacionada com o ensaio controle ao qual utilizou-se somente água destilada.

Tabela 3. Análise de fitotoxicidade em plantas daninhas após o 7° e 15° dia da aplicação dos biocompostos F4 e L4 e comparação com estudos realizados por Bordin et al. (2018), Reichert Jr. et al. (2019) e Camargo et al. (2019).

Espécies	Respostas aos danos foliares em (%)						
	Biocomposto F4		Biocomposto L4		Bordin et al. (2018)	Reichert Jr. et al. (2019)	Camargo et al. (2019)
	7º dia	15º dia	7º dia	15º dia	15º dia	7º dia	15º dia
<i>Bidens pilosa</i>	Nd	1	5	5	NA	Nd	100
<i>C. bonariensis</i>	70	100	80	40	NA	NA	100
<i>E. heterophylla</i>	2	3	30	20	90	10	100
<i>U. plantaginea</i>	Nd	Nd	5	5	NA	Nd	NA

Biocomposto F4: Obtido da fermentação com a microalga fresca. *Biocomposto L4*: Obtido da fermentação com a microalga liofilizada. NA: Não aplicado; Nd: Efeito não detectado.

A partir dos resultados de aplicação desse estudo, verificou-se um efeito seletivo dos biocompostos F4 e L4 sobre a erva daninha *C. bonariensis* pela presença de maiores efeitos fitotóxicos. Essa espécie pode produzir um número excessivo de sementes não dormentes viáveis que são capazes de germinar e completar vários ciclos de vida em apenas 1 ano (WU et al., 2007). A diminuição do efeito fitotóxico após o 15° dia com a aplicação do biocomposto L4 pode evidenciar a forte resistência dessa erva daninha. Efeito semelhante foi encontrado em *E. heterophylla* por Reichert Jr. et al. (2019). Segundo os autores, após a verificação dos danos em 10% durante os 7 dias da aplicação, a planta iniciou a emissão de novos rebentos evidenciando uma resposta hipersensível de defesa da planta (REICHERT JR. et al. 2019).

Os efeitos fitotóxicos após o 15° dia em *C. bonariensis* foram maiores com a utilização do biocomposto produzido a partir da biomassa fresca na fermentação do que em relação ao uso da biomassa liofilizada. Além de possibilitar uma redução de custos com o processo de secagem da microalga por liofilização, esses resultados mostram-se interessantes por terem apresentado um controle satisfatório de uma espécie considerada altamente resistente aos herbicidas convencionais. Trabalhos como de Hosseinizand et al. (2017), revelam que processos de secagem de microalga, podem produzir efeitos adversos na cor, estrutura, composição de lipídios e carboidratos da superfície de *Chlorella* spp. Nesse caso, esses efeitos adversos podem estar influenciando a excreção de enzimas e outros metabólitos bioativos na fermentação com *T. koningiopsis* e por consequência alterando as características de biocontrole em *C. bonariensis* entre os dois biocompostos.

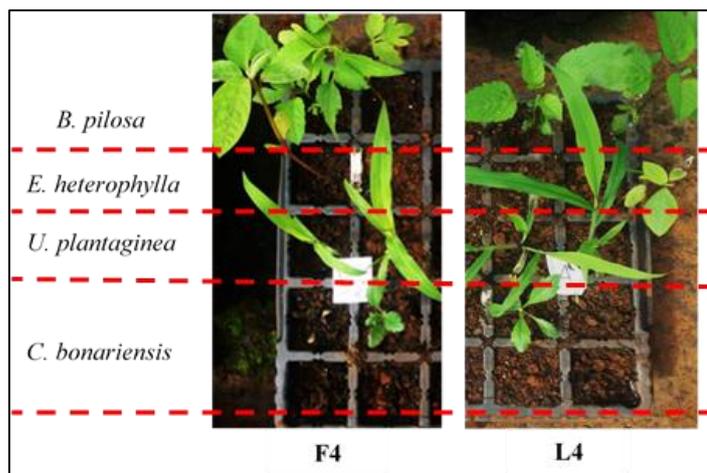
A ação de enzimas tem sido descrita como um mecanismo chave para possibilitar a entrada de microrganismos e seus compostos na planta alvo, facilitando a entrada e a dispersão de patógenos através do hospedeiro (REICHERT JR et al., 2019). Diversos microrganismos são reportados por possuir enzimas e outros metabólitos secundários bioativos que conseguem

combater ou evitar os mecanismos de defesa de plantas e agir na regulação do crescimento vegetal (KEEN; STASKAWICZ, 1988; VINALE et al., 2008). Além disso, algumas cepas de *Trichoderma* spp. são produtores prolíficos de enzimas, incluindo aquelas necessárias para degradar as paredes celulares de plantas (HARMAN et al., 2004). Essas enzimas já foram relatadas como agentes auxiliares na atenuação dos efeitos fitotóxicos apresentados em plantas durante o controle biológico devido seus possíveis mecanismos de ação sobre as plantas (BORDIN et al., 2018; REICHERT JR. et al, 2019).

Os efeitos de seletividade para a planta daninha *C. bonariensis*, pode ter relação também com possíveis compostos liberados pela microalga durante a degradação enzimática no processo fermentativo, pois os resultados de fitotoxicidade em trabalhos que utilizaram o fungo *T. koningiopsis* para crescimento em meios comerciais (glicose, peptona, extrato de levedura e outros sais) foram específicos para a espécie *Euphorbia heterophylla* (BORDIN et al., 2018; REICHERT JR et al, 2019). Recentemente Coelho et al. (2019), constatou que a degradação da parede celular de *Chlorella vulgaris* a partir de um “mix” enzimático acarreta na liberação de alguns compostos bioativos como proteínas, ácidos graxos saturados e monoinsaturados, aminoácidos e alguns tipos de carotenoides como β -caroteno, astaxantina, cantaxantina e luteína (COELHO et al., 2019), que possuem atividade antioxidante (GOUVEIA et al., 2005). Peptídeos com atividades antioxidantes foram produzidos ao longo do processo de fitocorremediação da água residuária da suinocultura (MICHELON, et al. 2016). Especula-se que esses compostos, juntamente com os metabólitos e outras enzimas produzidas pelo fungo atuam de modo sinérgico, fazendo com que o biocomposto apresente características mais promissoras e adequadas para o biocontrole de *C. bonariensis* do que para as demais plantas. Entretanto o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não é claro.

Em comparação com demais estudos apresentados na Tabela 3, resultados promissores utilizando o fungo *T. koningiopsis* também foram encontrados por Camargo et al. (2019) em *B. pilosa*, *C. bonariensis* e *E. heterophylla* com até 100% de fitotoxicidade. No estudo, os autores apresentaram uma solução inovadora combinando herbicidas sintéticos (ácido 2,4-diclorofenoxiacético, glifosato e glufosinato de amônio) na fermentação com *T. koningiopsis* gerando um composto eficaz e com ação sinérgica entre bioherbicidas e herbicidas sintéticos no controle das três plantas. Nos estudos de Reichert et al. (2019), foram encontrados resultados promissores com o uso de adjuvantes e repetição da aplicação sobre as plantas alvo, em até 8 vezes dentro de um período de 30 dias. Na Figura 5 é possível observar o desenvolvimento das plantas após o 15º dia do tratamento com os biocompostos.

Figura 5: Ilustração após o 15º dia de tratamento com os biocompostos obtidos do ensaio F4 e L4.



Fonte: Laboratório de Agroecologia.

Alguns estudos mostram que, quando expostas a condições de estresse, as plantas produzem um grande número de espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas substâncias oxidam e modificam componentes celulares, como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, impedindo-os de desempenhar suas funções originais e são altamente nocivos em altas concentrações. As EROs agem para regular o comportamento estomático, a defesa de patógenos e regular vários processos, incluindo a morte celular programada (APEL, HIRT, 2004; MITTLER et al., 2004; GILL; TUTEJA, 2010; HOSEINI; ZARGARI, 2013; SCHIPPERS et al., 2016; HUANG et al., 2019). Um dos mecanismos utilizados pelas plantas para contornar essa situação é baseado em sistemas de defesa antioxidante enzimática (catalase, peroxidase, superóxido dismutase, glutathione redutase etc.) e não enzimáticos que agem de forma sinérgica e interativa para neutralizar os radicais livres formados e eliminar EROs (APEL; HIRT, 2004; BENAVIDES et al., 2005; HUANG et al., 2019). Quando há um desequilíbrio nas células entre os sistemas de eliminação e os níveis de EROs, as células entram em um estado oxidativo que pode levar à sua morte (HUANG et al., 2019). Os efeitos fitotóxicos observados podem, portanto, estar relacionados a esse desequilíbrio que culmina com o estresse oxidativo e a morte das células da planta. Também é interessante mencionar que *Trichoderma* spp. já foi descrito como um micro-organismo que aumenta a produção de enzimas vegetais relacionadas à defesa, incluindo várias peroxidases, quitinases, β -1,3-glucanases e a via de hidroperóxido-liase de lipoxigenase (KOIKE et al., 2001; HOWELL, 2003; VINALE et al., 2012).

4.4 DESEMPENHO FÚNGICO E ANÁLISE DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA EM DIFERENTES CONDIÇÕES OPERACIONAIS

A utilização de substratos de baixo custo nos meios para produção de enzimas em grandes quantidades com maior estabilidade e alta atividade é uma demanda cada vez maior para seus usos ambientais e industriais (DEBNATH, SAHA, 2020). O interesse deste trabalho na análise da quantificação enzimática durante o processo de produção do biocomposto também é atribuído a inúmeros estudos que justificam os efeitos da inibição e regulação do crescimento das plantas pela ocorrência de diferentes enzimas (BORDIN et al. 2018; REICHERT JR. et al. 2019; CAMARGO et al. 2019). Portanto, as condições estudadas no planejamento visam explorar as respostas de quantificação enzimática resultantes da interação do fungo *T. koningiopsis* e seu substrato (a biomassa de microalgas).

Uma das limitações à implementação industrial de microrganismos isolados do ambiente, como no caso de *T. koningiopsis*, é que o espectro do produto geralmente varia com as expectativas termodinâmicas, mesmo que o sistema seja sistemático e repetível (TEMUDO et al., 2007). Essa limitação ocorre principalmente devido à falta de entendimento de como os fatores operacionais afetam a comunidade/funcionalidade microbiana e, portanto, o espectro do produto (MOHD-ZAKI et al., 2016).

Estudos anteriores já mostraram que alterações na morfologia dos fungos podem ser influenciadas pela composição do meio, pH, temperatura de cultura, agitação, aeração, entre outros (PAPAGIANNI, 2004; LIAO et al., 2007). Cada fator mencionado tem importância diferente nas morfologias do crescimento, como, por exemplo, algumas linhagens de *Rhizopus* sp. requerem forte agitação, enquanto cepas de *Penicillium chrysogenum* exigem altos valores de pH (METZ, KOSSEN 1977).

Com os resultados satisfatórios obtidos com o uso da biomassa fresca e isenta de pré-tratamento nos testes iniciais, optou-se continuar com esse tipo de biomassa no projeto experimental, descartando duas operações unitárias que consomem alta energia no processo: secagem por liofilização e pré-tratamento da biomassa por ultrassom.

Devido à alta produção de peroxidases nos testes preliminares, optou-se por adicionalmente analisar uma possível produção de lacases, que também atua com processos oxidativos. A Tabela 4 apresenta a matriz de planejamento e as respostas encontradas.

Tabela 4. Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2³ (valores codificados e reais) com respectivas respostas em termos de quantificação enzimática e produção de biomassa.

Condições				Atividades enzimáticas*					Biomassa (g/L)
Ensaio	Temperatura (°C)	Agitação (RPM)	pH	Amilase	Celulase	Lipase	Peroxidase	Lacase	
E1	-1 (26,1)	-1 (40,5)	-1 (5,2)	0,00	0,000	0,00	50,00	0,060	5,70
E2	1 (44)	-1 (40,5)	-1 (5,2)	0,17	0,048	0,90	274,33	0,017	4,26
E3	-1 (26,1)	1 (160)	-1 (5,2)	0,17	0,051	0,00	381,33	0,009	4,34
E4	1 (44)	1 (160)	-1 (5,2)	0,15	0,087	2,30	612,67	0,029	4,09
E5	-1 (26,1)	-1(40,5)	1 (11,7)	0,00	0,000	0,00	340,00	0,025	3,35
E6	1 (44)	-1 (40,5)	1 (11,7)	0,11	0,064	0,00	403,00	0,020	4,47
E7	-1 (26,1)	1 (160)	1 (11,7)	0,16	0,097	0,55	556,00	0,024	4,18
E8	1 (44)	1 (160)	1 (11,7)	0,19	0,146	1,90	818,33	0,040	2,99
E9	-1,68 (20)	0 (100)	0 (8,5)	0,20	0,080	1,70	460,33	0,006	4,47
E10	1,68 (50)	0 (100)	0 (8,5)	0,08	0,056	2,05	135,67	0,00	4,39
E11	0 (35)	-1,68 (0)	0 (8,5)	0,05	0,026	2,50	73,33	0,00	5,11
E12	0 (35)	1,68 (200)	0 (8,5)	0,21	0,115	4,90	725,33	0,029	3,75
E13	0 (35)	0 (100)	-1,68 (3,0)	0,00	0,00	0,00	156,67	0,055	4,66
E14	0 (35)	0 (100)	1,68 (14)	0,00	0,00	0,00	550,00	0,00	2,87
E15	0 (35)	0 (100)	0 (8,5)	0,00	0,00	1,20	528,00	0,068	4,01
E16	0 (35)	0 (100)	0 (8,5)	0,00	0,00	0,90	566,00	0,067	4,28
E17	0 (35)	0 (100)	0 (8,5)	0,00	0,00	0,00	466,67	0,065	4,15

*Atividades apresentadas em U/mL.

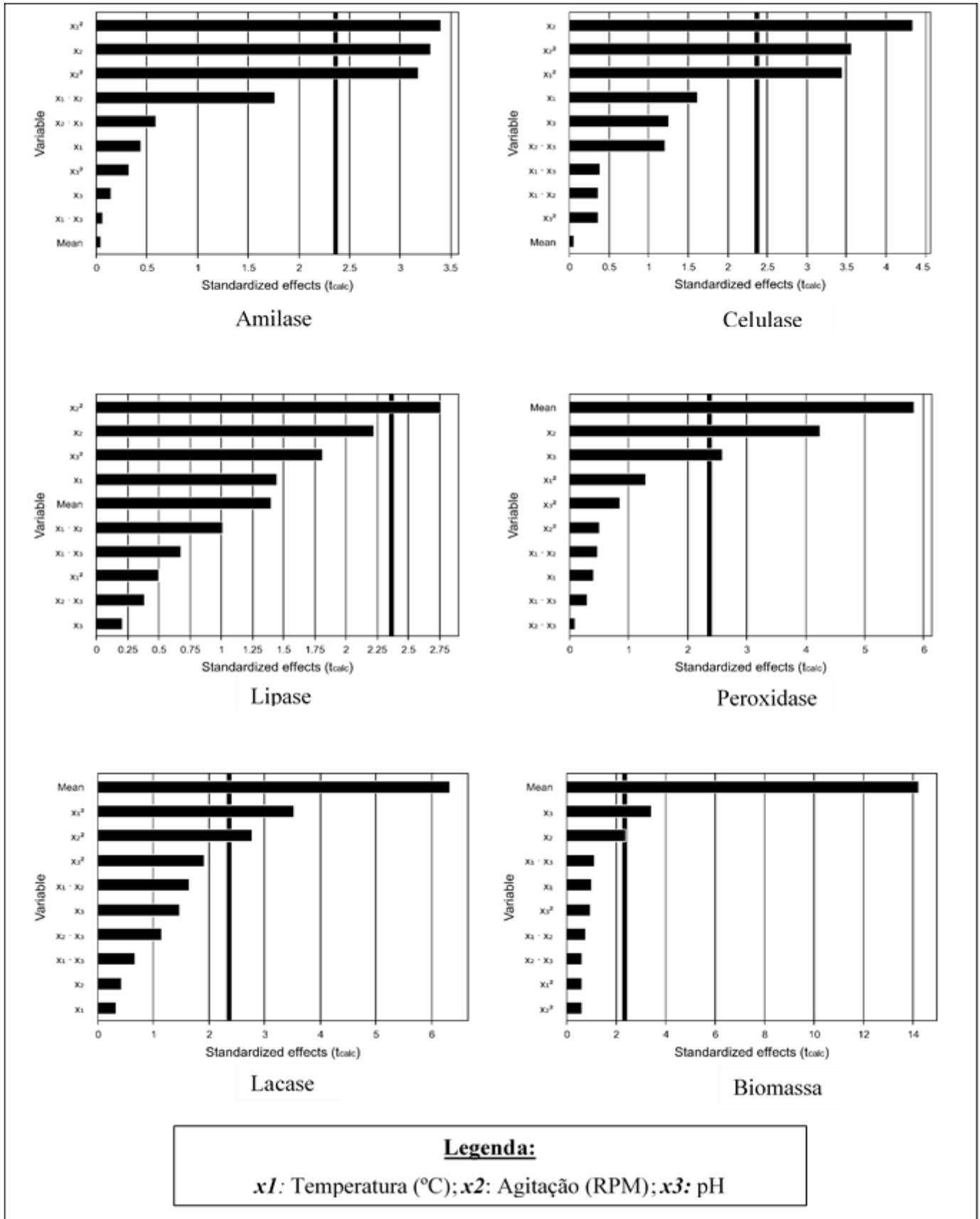
Espécies de *Trichoderma* como *T. harzianum* já demonstraram potencial de produção de lacase, e os efeitos da temperatura e do pH durante o crescimento de microrganismos foram determinantes na produção de enzimas. A atividade máxima encontrada pelos autores foi de 0,971 U/mL após 12 dias de incubação a pH 5,5 e 30°C (RANIMOL et al. 2018). Outros estudos também relatam que as atividades com lacase provam ser positivas quando há uma fonte adicional de nitrogênio no meio. Peptona e caseína, duas fontes de nitrogênio orgânico são apresentadas na literatura como melhores indutores de lacase quando comparadas às fontes de nitrogênio inorgânico (MIKIASHVILI et al., 2006; BETTIN et al., 2009; SCHNEIDER et al., 2018). Neste trabalho, nenhuma fonte externa de nitrogênio foi adicionada, o que pode explicar os baixos rendimentos de lacase. No entanto, os resultados obtidos após 72 horas de incubação com *T. koningiopsis* na biomassa de microalgas são promissores em comparação aos encontrados por Ranimol et al. (2018) em que as melhores atividades foram em 12 dias de fermentação em meio sintético quimicamente definido.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizando o *software Protimiza Experimental Design*, foram analisados os efeitos das variáveis estudadas, bem como sua interação na determinação de atividades enzimáticas e produção de biomassa. A Figura 6 apresenta os gráficos de Pareto, com uma confiança estatística de 95%.

A agitação afetou positivamente a produção de amilase ($p < 0,05$). De acordo com a Tabela 4, a produção máxima de amilase foi nos ensaios de agitação mais alta (200 RPM), indicando que uma agitação forte poderia facilitar a biodisponibilidade de amido no interior da célula de microalgas como substrato da amilase. O efeito da agitação também foi significativo e positivo para as atividades de celulase e peroxidase, mas significativo e negativo para a produção de biomassa. Esses resultados sugerem que a alta agitação produz uma condição de estresse para o fungo, pelo efeito ser contrário à produção de biomassa. No caso das enzimas, o aumento dos valores de agitação dentro da faixa estudada, incrementaria a produção de amilase, celulase e peroxidase. No entanto, para a lacase e lipase, nenhum parâmetro físico dos analisados foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$), indicando que uma análise mais profunda da interação dos fungos filamentosos com as microalgas nos processos fermentativos deve ser estudada (XIE et al., 2013).

Figura 6. Gráfico de Pareto mostrando a influência de três variáveis (temperatura, agitação e pH) na determinação da atividade enzimática e produção de biomassa.



Em relação a atividade da celulase, foi possível validar, através da análise de variância, um modelo empírico, conforme apresentado na Equação 5. Este modelo representa a resposta em função das variáveis independentes estudadas com 95% de confiança, sendo o $F_{\text{Calculado}}$ (5,1) maior que F_{tabelado} (3,68) e o coeficiente de determinação (R^2) de 86,66%.

$$\text{Celulase} = 0 + 0,01x_1 + 0,03x_1^2 + 0,03x_2 + 0,03x_2^2 + 0,01x_3 + 0,01x_2x_3 \quad \text{Equação (5)}$$

As variáveis (x_1 , x_2 e x_3) referem-se às condições descritas na legenda da Figura 6.

4.6 APLICAÇÃO EM *CUCUMIS SATIVUS*

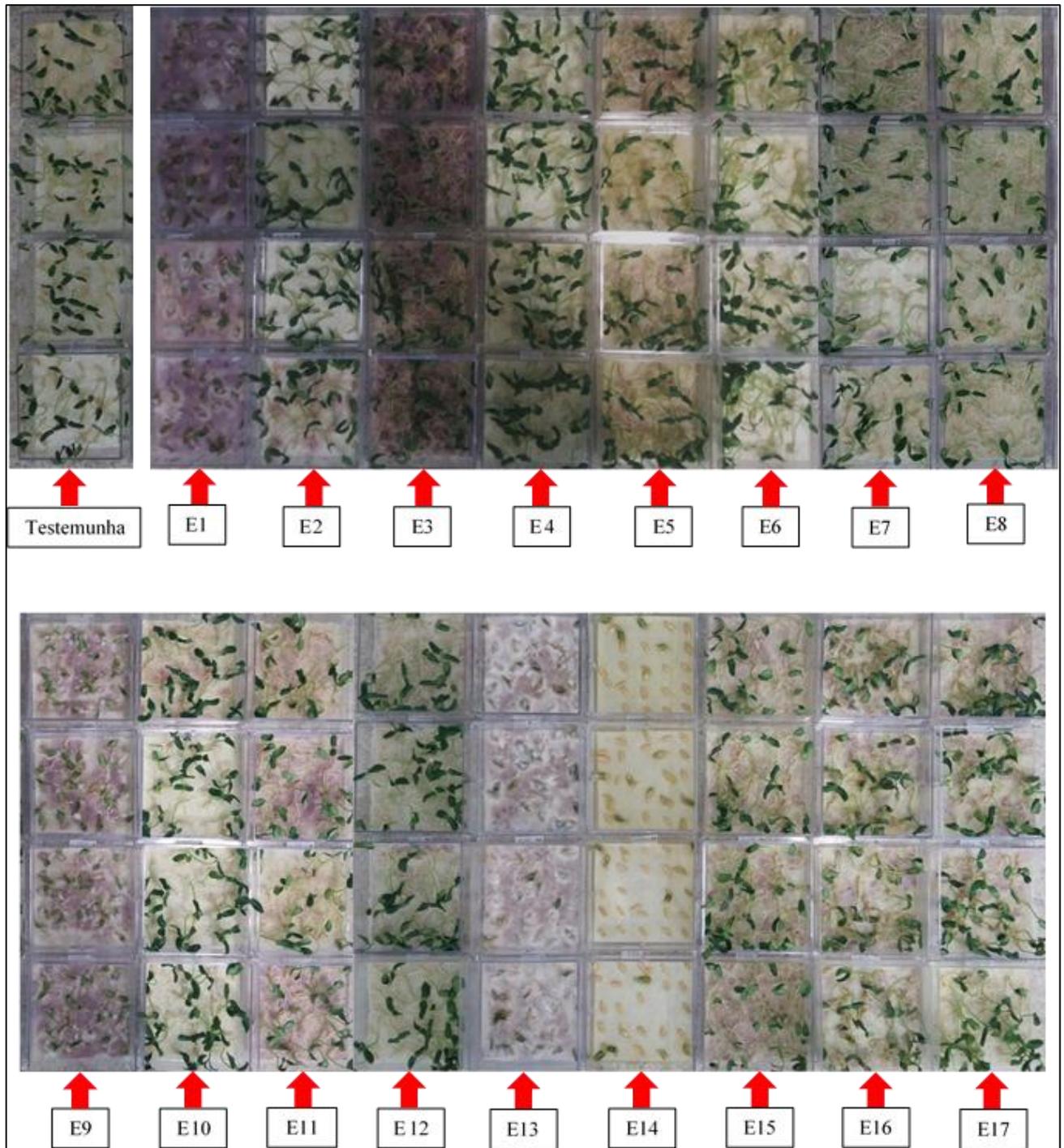
Os biocompostos produzidos no planejamento experimental foram aplicados e analisados em relação à pré-germinação das sementes (Tabela 5). Os valores obtidos pelo teste de germinação foram a porcentagem de germinação e o índice de vigor de sementes de *Cucumis sativus*. Geralmente, as espécies de pepino são usadas como plantas modelo, pois são ótimos bioindicadores (REDDA et al. 2018; TODERO et al. 2018). A Tabela 5, juntamente com a Figura 7, mostra os resultados encontrados nas sementes da espécie *Cucumis sativus*.

Tabela 5. Testes de germinação em sementes de *Cucumis sativus* com biocompostos líquidos produzidos no DCCR (2³) após 8 dias de aplicação.

Ensaio	% G	Σ % G	Hipocótilo (mm)	σ Hipocótilo	Raiz (mm)	σ Raiz	Índice de vigor
Testemunha	100%	± 0	44,27	± 2,80	66,59	± 8,94	110,86
E1	98%	± 0,57	2,51	± 3,64	5,70	± 2,21	8,05
E2	100%	± 0	46,78	± 2,53	60,12	± 16,63	106,90
E3	100%	± 0	33,14	± 5,21	34,40	± 2,53	67,55
E4	100%	± 0	39,22	± 2,73	61,12	± 21,49	100,35
E5	98%	± 0,57	42,88	± 7,12	50,74	± 24,80	91,75
E6	100%	± 0	64,64	± 10,99	64,78	± 13,88	129,42
E7	100%	± 0	58,28	± 16,23	63,33	± 8,57	121,61
E8	100%	± 0	55,36	± 1,45	57,82	± 29,63	113,18
E9	99%	± 0,5	4,16	± 1,25	18,26	± 3,166	22,20
E10	100%	± 0	35,23	± 5,28	43,40	± 10,90	78,64
E11	99%	± 0,5	37,37	± 6,58	45,14	± 24,70	81,69
E12	100%	± 0	44,79	± 3,45	97,03	± 11,75	141,80
E13	100%	± 0	nd	nd	10,90	± 4,47	nd
E14	0%	± 0	nd	nd	nd	nd	nd
E15	100%	± 0	37,57	± 6,26	30,84	± 7,98	68,42
E16	100%	± 0	32,56	± 3,56	30,03	± 2,73	62,59
E17	100%	± 0	37,24	± 4,79	66,30	± 11,33	103,55

* σ = ± SD; %G = Percentual de germinação aos 8 dias após a aplicação dos biocompostos; **Raiz** = Raiz primária medida 10 dias após a aplicação do biocomposto; **nd** = Não detectado.

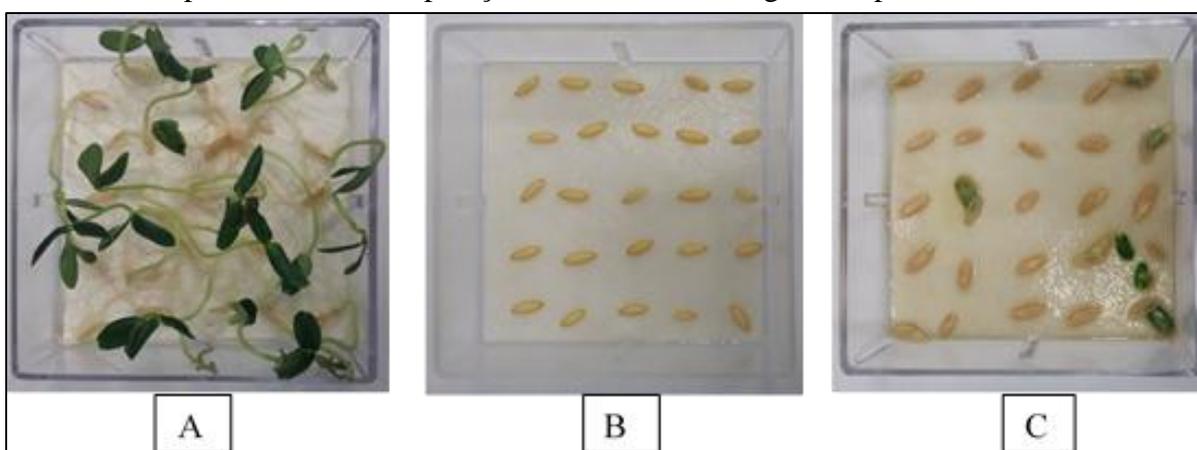
Figura 7. Visualização dos resultados da aplicação de biocompostos produzidos em pré-emergência de *Cucumis sativus*.



O efeito bioherbicida de pré-emergência foi demonstrado em *C. sativus*. Um caso especial foi o resultado da inibição da germinação para o teste E14. Não foram observadas medidas de hipocótilo e raiz primária ou índices de vigor. A não germinação pode ser explicada pelo alto pH (14), pois foi realizado um controle positivo somente com água em pH 14 e

nenhuma taxa de germinação foi registrada (Figura 8). Mesmo com efeitos promissores, não enquadra-se como objetivo deste trabalho gerar um biocomposto com efeitos bioherbicidas em pH 14, pois em aplicações reais, o uso de um agente bioherbicida em pH extremo pode gerar consequências indesejáveis para outras culturas, micro-organismos e até mesmo para o meio ambiente. A justificativa para ter analisado uma ampla faixa de pH, foi para a análise do desempenho dos microrganismos envolvidos no processo de fermentação e sua concomitante produção de enzimas.

Figura 8. Efeito do pH 14 na germinação de *C. sativus* considerando o tratamento realizado com o biocomposto E14 em comparação com o controle negativo e positivo.



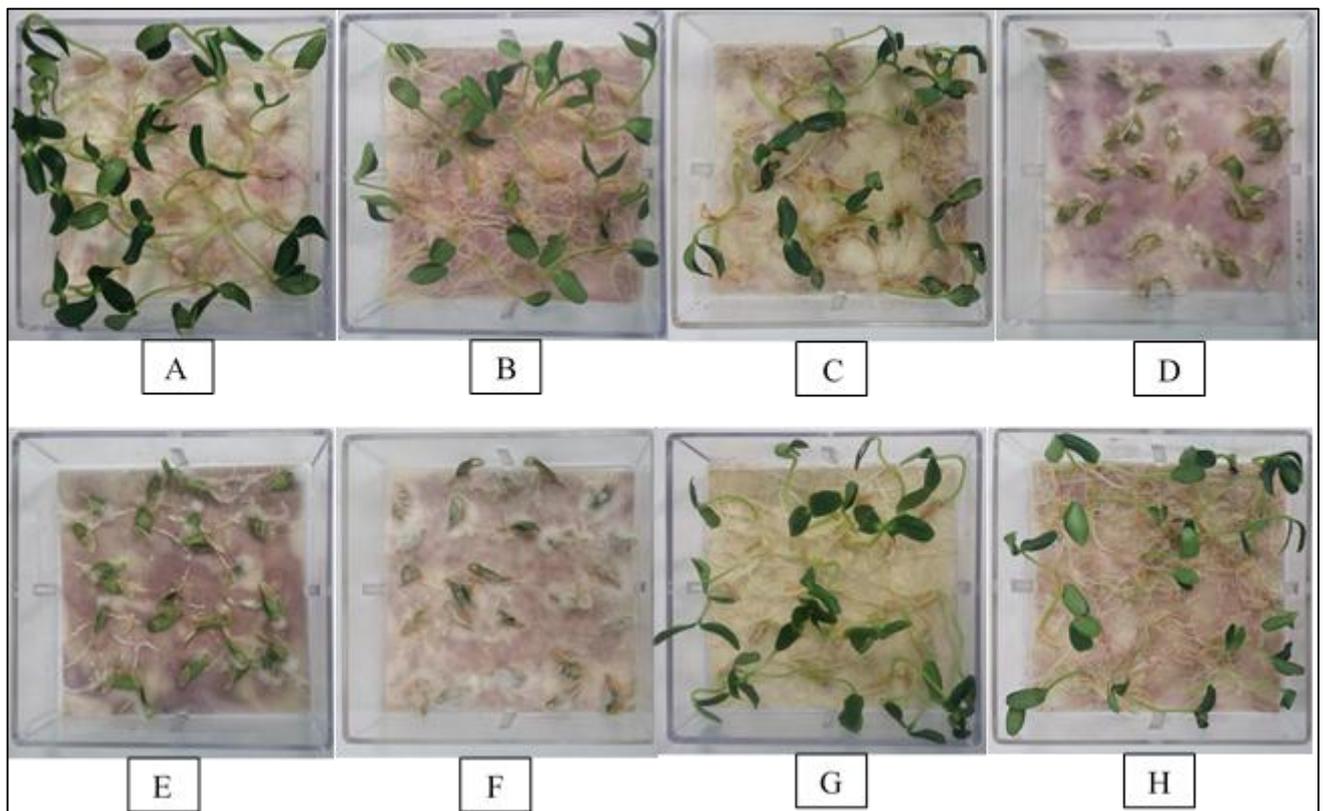
*(A) Controle negativo com água destilada; (B) controle positivo com água destilada a pH 14; (C) Ensaio E14.

Os demais resultados das taxas de germinação não mostraram efeito inibitório sobre *C. sativus*. Resultados abaixo de 100% de germinação são atribuídos a repetições que tiveram entre 23 a 24 sementes germinadas nas caixas Gerbox, gerando 98% de germinação para E1 e E5 e 99% para E9 e E11.

Os principais dados utilizados como base para interpretação, foram representados pela testemunha com sementes embebidas apenas em água destilada, que ainda não apresentaram os melhores resultados de crescimento de hipocótilo e de raiz primária conforme visualizado na tabela 5. Em comparação com a testemunha, foi observado um efeito estimulatório dos biocompostos E2, E6, E7 e E8 em relação a parte aérea (hipocótilo), porém reduzido em relação ao comprimento da raiz. Resultados similares foram encontrados por Ribeiro et al. (2017), que avaliaram a germinação e o crescimento inicial de *C. sativus* utilizando extratos aquosos de *Leucaena leucocephala*, indicando que a redução do crescimento da raiz e o estímulo do hipocótilo provém da auxina, um hormônio de regulação de crescimento quando a planta é submetida a estresse oxidativo (COTHREN, OOSTERHUIS, 2010; RIBEIRO et al., 2017).

Alguns tratamentos também mostraram efeito na deficiência das plantas conforme demonstrado pela figura 9, de forma que, mesmo apresentando desenvolvimento radicular e de hipocótilo, continham estruturas físicas frágeis, muito sensíveis a qualquer tipo de contato. Exemplos são plantas que foram tratadas com biocompostos E2 (Figura 9A), E11 (Figura 9B) e E16 (Figura 9C).

Figura 9. Visualização de biocompostos que apresentaram resultados satisfatórios de efeito bioherbicida em *Cucumis sativus*.



*(A) Biocomposto E2; (B) Biocomposto E11; (C) Biocomposto E16; (D) Biocomposto E1; (E) Biocomposto E9; (F) Biocomposto E13; (G) Biocomposto E7; (H) Biocomposto E15.

As plantas que estavam em contato com o biocomposto E11, por exemplo, também tiveram um desenvolvimento reduzido de hipocótilo com médias de 37,37 mm. O mesmo ocorreu com plantas expostas ao biocomposto E16 que, além de demonstrar deficiências no desenvolvimento e sensibilidade à quebra, apresentavam baixos índices de comprimento de hipocótilo de apenas 32,56 mm e raiz primária de 30,03 mm.

Assim, os resultados apresentados na Tabela 5 mostram que os tratamentos foram eficientes principalmente para o biocontrole de sementes expostas ao biocomposto E1 com 2,51 mm para o desenvolvimento de hipocótilo e raiz primária de 5,70 mm (Figura 9D); para o biocomposto E9 de 4,16 mm para desenvolvimento de hipocótilo e raiz de 18,26 mm (Figura

9E); e para o biocomposto E13 que não mostrou nenhum tipo de desenvolvimento de hipocótilo (possivelmente pelo grau de acidez do biocomposto: pH = 3,0), mas raízes com 10,90 mm (Figura 9F).

Vale ressaltar também que, embora o biocomposto E7 tenha proporcionado bom desenvolvimento de hipocótilo com 58,28 mm e comprimento de raiz primária de 63,33 mm, seu sistema radicular era muito delgado com o conjunto de raízes deficientes e sensíveis (Figura 9G). O mesmo acontece com o biocomposto E15 que, além de ter raízes frágeis, apresentou deficiências no desenvolvimento foliar (Figura 9H).

Embora, neste estudo, tenham sido observados ótimos comportamentos germinativos nas sementes de *C. sativus*, descobrimos que todos os biocompostos afetavam a morfologia das plantas em relação ao controle, após 8 dias de aplicação (Figura 7). Ou seja, os efeitos de biocontrole foram percebidos somente após a germinação indicando que o possível agente também apresenta performance para atuar no controle de plantas durante a fase de pré-emergência. A abordagem genética e de oposição às investigações fisiológicas realizadas neste estudo poderiam ajudar a explicar as alterações morfológicas ocorridas durante o desenvolvimento da planta após a germinação. Essa abordagem poderia elucidar os efeitos causados pelas enzimas durante o estágio de desenvolvimento, pois as taxas de germinação e o índice de vigor consideram apenas parâmetros fisiológicos.

Estudos já demonstraram que a colonização de *Trichoderma* spp. nas raízes das plantas causou alterações metabólicas e ativações de proteínas relacionadas à patogênese que induziram maior resistência das plantas ao ataque subsequente por numerosos patógenos microbianos (VINALE et al. 2012).

Substâncias aleloquímicas presentes em extratos bioativos podem alterar o metabolismo das plantas e afetar a redução da atividade celular devido aos danos na membrana celular (GHOLAMI; FARAVANI; KASHKI, 2011; CHENG; CHENG, 2015). Estudos já constataram que o estresse oxidativo provocado pela elevação dos índices de peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica e ação de enzimas oxidativas podem produzir um acúmulo de espécies reativas de oxigênio e desregular o desempenho fisiológico nas sementes (AUMONDE et al., 2013). Da mesma forma que discutido no item 4.2, verificou-se que as EROs em situações de pré-emergência interagem com modificadores epigenéticos e hormônios que influenciam a expressão de vários genes e controlam os processos de desenvolvimento das plantas (GILL, TUTEJA, 2010; ZENG et al. 2017; KONG et al. 2018).

4.7 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS

Os quatro corantes escolhidos foram avaliados com a utilização do extrato enzimático bruto, denominado F4 proveniente dos ensaios iniciais de fermentação. Os resultados estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6. Análise da degradação enzimática de corantes com a aplicação do extrato bruto F4 após 5 horas de reação.

Quantidade de extrato enzimático bruto	Degradação (%)			
	Vermelho	Marrom	Amarelo	Azul
5 mL	2,75	54,42	3,19	0
10 mL	3,30	45,46	4,20	22,37

Pode-se observar que as maiores degradações ocorreram com o corante marrom (54,42% e 45,46%). Os diferentes valores observados de degradação indicam o efeito da diversidade estrutural na composição dos corantes (DAWKAR et al., 2009). Sabe-se que a peroxidase é uma enzima muito empregada em pesquisas envolvendo o tratamento de efluentes da indústria têxtil como os apresentados pela tabela acima. Devido à natureza oxidativa, existem diversas áreas onde a peroxidase poderia substituir as técnicas atuais como oxidante químico (HAMID, REHMAN, 2009). Apesar de muitas peroxidases já terem sido amplamente estudadas, a maioria dos trabalhos empregam enzimas comerciais e de alto custo inviabilizando possíveis aplicações ambientais.

Nesse trabalho, a enzima produzida pelo processo fermentativo em questão, apresentou especificidade para a degradação do corante marrom. Este resultado mostra-se promissor, comparado aos trabalhos na literatura que utilizaram peroxidases não comerciais para a degradação de corantes. Por exemplo, a peroxidase extraída do resíduo industrial da soja foi eficiente na degradação de Direct Blue 2 (70% de degradação) (MIRANDA-MANDUJANO et al., 2018), e a peroxidase obtida de macrófitas apresentou bom desempenho na degradação de corantes diretos azoicos como amaranto e amido preto (93% e 87% respectivamente após 120 horas de reação) (HADDAJI et al., 2014). Também para Direct Blue, as peroxidases de *Ipomea palmata* e *Saccharum spontaneum* apresentaram degradações de 15% e 70% respectivamente, indicando diferentes especificidades das enzimas ao mesmo corante (SHAFFIQU et al., 2002). Reações de degradação conduzidas em sistemas de micro-ondas e agitador orbital utilizando

peroxidases de farelo de arroz apresentaram afinidade para o corante vermelho e removeram 38,9% e 100% da cor respectivamente (KLANOVICZ et al., 2020).

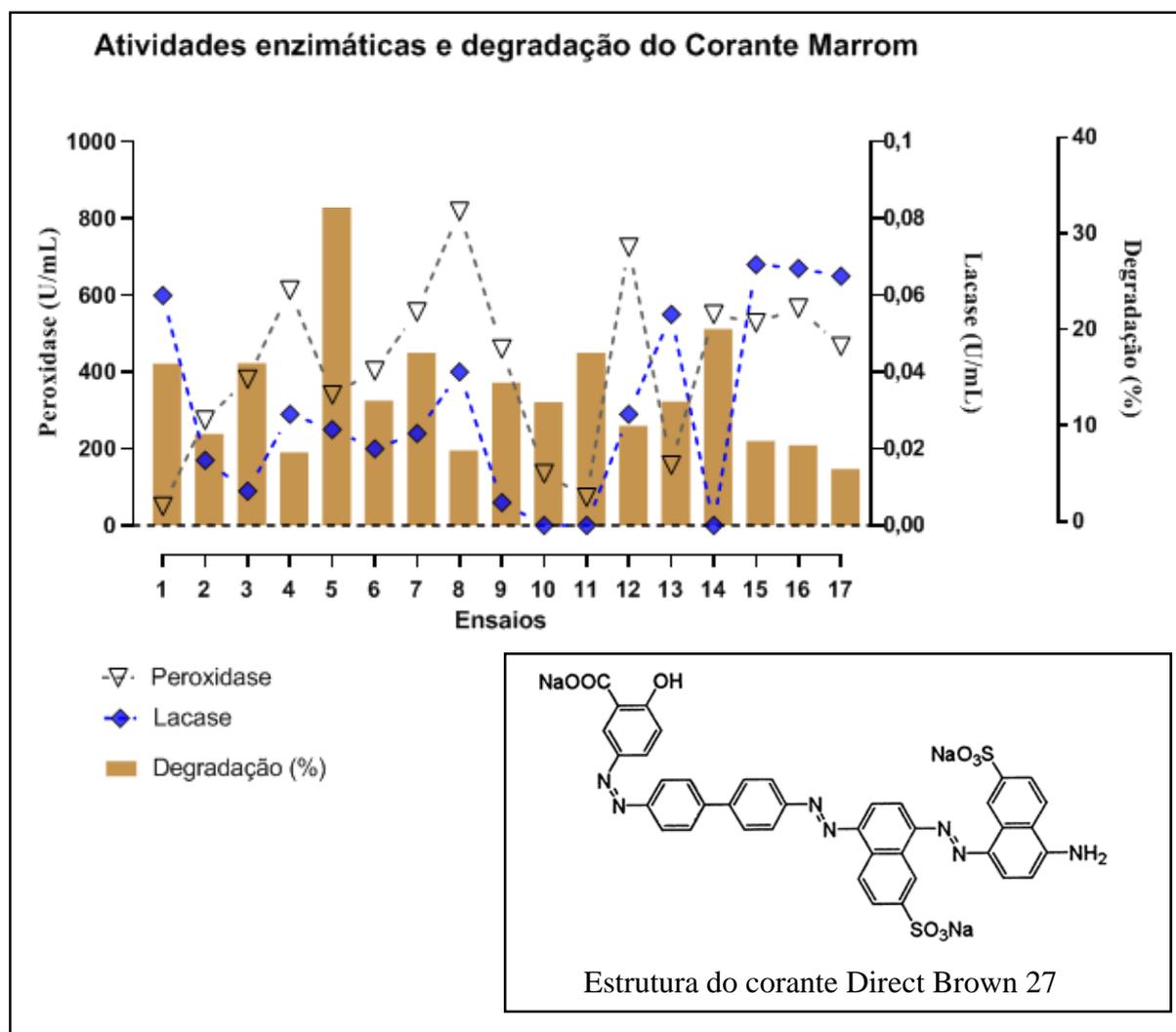
Silva (2011) investigou a descoloração de corantes puros com a enzima peroxidase de nabo como Turqueza Remazol G 133%, Remazol Brilliant Blue R, Levafix Brilliant Green ESBA –RG21, Remazol vermelho ultra RGB, Remazol brilliant Orange 3R e Acid Blue 62, obtendo remoção de cor de 58%, 66%, 66%, 5,5%, 9%, 47%, respectivamente. Com base nesses resultados, os autores constataram uma maior afinidade da enzima peroxidase de nabo em corantes ftalocianínicos, antraquinona e triarilmetano e baixa eficiência na remoção de corantes azo. Para dois corantes a base de antraquinona (Acid Blue 62 e Remazol Brilliant Blue R), os autores também observaram cinéticas de degradação muito distintas, indicando a presença de grupos distintos no anel aromático.

Como visto, cada corante apresenta uma estrutura molecular diferente, que transmite as características de cor e tingimento. A relação entre a estrutura e a biodegradabilidade enzimática depende do tipo, quantidade e posição (orto ou para) dos grupos ligados ao anel aromático dos corantes, sejam eles benzenos ou naftalenos. A presença em diferentes posições pode acelerar, retardar ou até mesmo provocar a completa inibição da enzima (DAWKAR et al., 2009).

Para compreender melhor a relação entre os perfis de atividade enzimática e a biodegradabilidade, os extratos enzimáticos obtidos no planejamento experimental foram aplicados ao corante marrom, visto que este apresentou as maiores degradações nos testes iniciais. Como também avaliou-se a atividade lacase no planejamento, e por ela estar relacionada à processos de oxidação de compostos aromáticos (THURSTON, 1994), buscou-se investigar o efeito da atividade das duas enzimas na degradação. As peroxidases e lacases são as enzimas mais usadas nos estudos de remediação enzimática devido à sua alta capacidade de degradar diferentes contaminantes orgânicos (ALNEYADI et al., 2018). A figura 10 apresenta os resultados alcançados.

As condições de reação para os 17 ensaios, foram similares aos testes iniciais de degradação para o corante marrom, utilizando 5 mL de extrato enzimático bruto. Aqui, a diferença se apresenta quanto aos perfis de atividade enzimática de peroxidase e lacase que foram decorrentes da mudança dos parâmetros operacionais no processo fermentativo. Nesse experimento a maior degradação ocorreu para o Ensaio 5 (32,08%). As atividades enzimáticas de peroxidase e lacase foram 350 U/mL e 0,025 U/mL respectivamente, que mesmo assim, não representaram as maiores atividades dentre os 17 ensaios.

Figura 10. Representação das atividades enzimáticas de peroxidase e lacase (Dispersão) e degradação do corante sintético têxtil Direct Brown 27 (Barras).



Também é possível observar que as maiores atividades peroxidase (Ensaio 4, 8, e 12), não representaram as maiores degradações (6,83, 7,03 e 9,33% respectivamente). Acredita-se que as condições extremas utilizadas durante a produção da enzima favoreceram sua atividade nos três ensaios, mas afetaram seu desempenho na aplicação para remoção de cor. Efeito similar foi observado em trabalhos que avaliaram atividades de peroxidases de manganês (MnP) e independentes de manganês (MIP) (SHRIVASTAVA, CHRISTIAN, VYAS, 2005). Os autores verificaram diferença entre a atividade das enzimas e a atividade na descoloração de corantes sintéticos. As variações na descoloração refletem as diferenças na composição de isoenzimas das atividades de MnP e MIP acarretando diferença nas constantes cinéticas e também na especificidade do substrato (SHRIVASTAVA, CHRISTIAN, VYAS, 2005). Outro estudo também observou que a reação conduzida somente com enzima lacase, não degradou

determinados tipos de corantes. Quando se adicionaram mediadores, a degradação alcançou eficiência >90% com 2/5 da atividade utilizada para a reação com a enzima sem mediadores (SOARES, et al., 2001). Peroxidase de manganês de *Trametes versicolor* resultou em 100% de degradação em 1 h. Da mesma forma, a lacase isolada de *Pycnoporus cinnabarinus* degradou 70% do corante Chicago Sky Blue em 1 hora (KAUSHIK, MALIK, 2009).

Os resultados demonstrados pela Figura 10 indicam que a mudança dos parâmetros operacionais no crescimento fúngico, além de terem proporcionado variações na atividade enzimática, devem ter influenciado na composição de isoenzimas ligadas à peroxidase e lacase influenciando a atividade de descoloração.

Vale ressaltar que nenhum método de melhoramento enzimático foi empregado nesse estudo, sugerindo que possíveis técnicas de purificação, imobilização, adição de mediadores ou emprego de engenharia molecular poderiam aumentar ainda mais a eficiência de degradação ou modificar a especificidade da enzima para outros corantes. É importante mencionar que o extrato enzimático obtido após a fermentação, encontra-se na forma bruta, com a presença de outras enzimas e metabólitos que também podem estar influenciando o desempenho das oxidorreduções.

A aplicação das enzimas de forma separada poderia trazer resultados mais conclusivos, tornando-se uma sugestão para continuidade da pesquisa. Como os resultados na literatura referente ao corante marrom são escassos quanto ao tratamento enzimático, verifica-se uma oportunidade para explorar a reação nesse caso.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Nesse trabalho, o processo fermentativo utilizando *T. koningiopsis* e biomassa de microalgas recuperada do polimento de efluentes da suinocultura mostrou-se promissor para obtenção de biocompostos com diferentes funcionalidades. A integração do conceito de economia circular nos processos biotecnológicos serviu neste estudo como estratégia para minimizar os custos no processo de produção de um biocomposto. Após verificação das diferentes características da microalga optou-se por trabalhar com a microalga fresca sem processo de secagem nem pré-tratamentos, reduzindo assim o número de operações unitárias no sistema de fermentação.

Resultados satisfatórios de biocontrole e seleção foram obtidos durante a pré-emergência na planta modelo de *Cucumis sativus* e na pós-emergência de *C. bonariensis*, com efeitos sinérgicos de metabólitos secundários e enzimas produzidas durante o estágio de fermentação. Para *C. sativus* foi constatada uma germinação satisfatória (acima de 98%), porém o índice de vigor da planta foi comprometido com valores encontrados de até 8,05% após 8 dias do tratamento. Para *C. bonariensis* efeitos com 100% de fitotoxicidade foram encontradas após 15 dias indicando um potencial para biocontrole.

Na análise da produção enzimática, destacou-se a grande produção de peroxidases. Essas enzimas representam uma promissora alternativa no cenário ambiental para tratamento de uma diversidade de efluentes industriais com grande risco para o meio ambiente. Por isso, encontrar fontes mais baratas para obtenção dessa enzima visando esse fim, ainda é motivo de extensa procura para garantir uma aplicação mais viável nesse aspecto.

Já na aplicação para degradação de corantes sintéticos da indústria têxtil, o biocomposto formado por oxidoredutases mostrou uma especificidade para o corante marrom. Os resultados alcançaram 54% de degradação em reações de 5 horas. Esse resultado também mostra o potencial do biocomposto para o tratamento desse tipo de efluente.

Visando o grande potencial do biocomposto para as três diferentes aplicações e distinguindo os esforços para cada uma, recomenda-se como sugestão de pesquisa no aspecto de:

- Bioherbicidas:

-Avaliar o escalonamento do processo em biorreator com o uso da biomassa e testar a aplicação a campo com a existência de culturas.

-Investigar o uso de adjuvantes no momento da aplicação para contribuir com uma melhor fixação e maior absorção de todos ativos presentes no bioherbicida.

-Investigar o processo de secagem da biomassa final após o processo fermentativo, promovendo a criação de um bioherbicida sólido, favorecendo o uso para o aplicador no campo.

- Enzimas:

- Realizar a caracterização química e física das enzimas que foram produzidas em potencial para descobrir as condições ótimas de reação.

- Analisar a estabilidade.

- Avaliar métodos de purificação.

- Efluentes têxteis:

- Investigar adição de mediadores enzimáticos que favorecem a ação de oxidoredutases no processo de catálise de compostos aromáticos.

- Avaliar a aplicação dos biocompostos em efluentes industriais reais de indústria têxtil.

- Investigar o efeito isolado de peroxidase e lacase produzidas neste estudo e a relação com a biodegradabilidade dos diferentes corantes testados.

REFERÊNCIAS

- ALI, L.; ALGAITHI, R.; HABIB, H. M.; SOUKA, U.; RAUF, M. A.; ASHRAF, S.S Soybean peroxidase-mediated degradation of an azo dye – a detailed mechanistic study. **BMC Biochemistry**, v. 14, p. 14-35, 2013.
- ALNEYADI, A. H.; RAUF, M. A.; ASHRAF, S. S. Oxidoreductases for the remediation of organic pollutants in water—a critical review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, p. 971-988, 2018.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373–99, 2004.
- AUMONDE, T. Z.; MARTINAZZO, E. G.; PEDÓ, T.; BORELLA, J.; AMARANTE, L.; VILLELA, F. A.; MORAES, D. M. Respostas fisiológicas de sementes e plântulas de alface submetidas ao extrato de *Philodendron bipinnatifidum*. **Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, p. 3181-3192, 2013.
- BAILEY, K. L. The bioherbicide approach to weed control using plant pathogens. In: ABROL, D. P. (Ed.). *Integrated Pest Management: Current concepts and ecological perspective*. Elsevier (Academic Press), p. 245–266, 2014.
- BASU, S.; BOSE, C.; OJHA, N.; DAS, N.; DAS, J.; PAL, M.; KHURANA, S. Evolution of bacterial and fungal growth media. **Bioinformatics**, v. 11, p. 182-184, 2015.
- BENAVIDES, M. P.; GALLEGOS; TOMARO, M. L. Cadmium Toxicity in Plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, p. 21–34, 2005.
- BETTIN, F.; MONTANARI, Q.; CALLONI, R.; GAIO, T. A.; SILVEIRA, M. M.; DILLON, A. J. P. Production of laccases in submerged process by *Pleurotus Sajor* – Caju PS-2001 in relation to carbon and organic nitrogen sources, antifoams and Tween 80. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 1-9, 2008.
- BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. Sustainable bioconversion of food waste into high-value products by immobilized enzymes to meet bio-economy challenges and opportunities – A review. **Food Research International**, v. 123, p. 226-240, 2019.
- BILAL, M.; RASHEED, T.; IQBAL, H. M. N.; YAN, Y. Peroxidases-assisted removal of environmentally-related hazardous pollutants with reference to the reaction mechanisms of industrial dyes. **Science of The Total Environment**, v. 644, p. 1-13, 2018.
- BORDIN, E. R.; CAMARGO, A. F.; ROSSETTO, V.; SCAPINI, T.; MODKOVSKI, T. A.; WEIRICH, S.; CAREZIA, C.; FRANCESCHETTI, M. B.; BALEM, A.; GOLUNSKI, S. M.; GALON, L.; FUZINATTO, C. F.; REICHERT JÚNIOR, R.W.; FONGARO, G.; MOSSI, A. J.; TREICHEL, H. Non-toxic bioherbicides obtained from *Trichoderma koningiopsis* can be applied to the control of weeds in agriculture crops. **Industrial Biotechnology**, v.14, p. 157-163, 2018.
- BOYETTE, C. D.; HOAGLAND, R. E. Bioherbicidal potential of *Xanthomonas campestris* for controlling *Conyza Canadensis*. **Biocontrol Science and Technology**, v.25, p.229-237, 2015.

BUSINESS COMMUNICATION COMPANY (BCC). **Global Markets for enzymes in Industrial Applications**. BCC Research, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. **Secretaria de Defesa Agropecuária**. – Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.

CAMARGO, A. F.; STEFANSKI, A. F.; SCAPINI, T.; WEIRICH, S. N.; ULKOVSKI, C.; CAREZIA, C.; BORDIN, E. R.; ROSSETTO, V.; REICHERT JÚNIOR, F.; GALON, L.; FONGARO, G.; MOSSI, A. J.; TREICHEL, H. Resistant Weeds Were Controlled by the Combined Use of Herbicides and Bioherbicides. **Environmental Quality Management**, v. 29, p. 37-42, 2019.

CERDEIRA, A. L.; GAZZIERO, D. L. P.; DUKE, S. O.; MATALLO, M. B.; SPADOTTO, C. A. Review of potential environmental impacts of transgenic glyphosate-resistant soybean in Brazil. **Journal of Environmental Science and Health**, v.42, p. 539-549, 2007.

CHENG, F.; CHENG, Z. Research progress on the use of plant allelopathy in agriculture and the physiological and ecological mechanisms of allelopathy. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 1020, 2015.

CHU, F-L. E.; DUPUY, J. L.; WEBB, K. L. Polysaccharide Composition of Five Algal Species Used as Food for Larvae of the American Oyster, *Crassostrea Virginica*. **Aquaculture**, v. 29, p. 241–252, 1982.

COELHO, D.; LOPES, P. A.; CARDOSO, V.; PONTE, P.; BRÁS, J.; MADEIRA, M. S.; ALFAIA, C. M.; BANDARRA, N. M. Novel Combination of Feed Enzymes to Improve the Degradation of *Chlorella Vulgaris* Recalcitrant Cell Wall. **Scientific Reports**, v. 9, 5382, 2019.

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

COTHREN, J. T.; OOSTERHUIS, D. M. Use of growth regulators in cotton production. In: STEWART, J. M. C. D.; OOSTERHUIS, D. M.; HEITHOLT, J. J.; MAUNEY, J. R. (Eds.). **Physiology of cotton**. New York: Springer, p. 289-303, 2010.

DAWKAR, V.V.; JADHAV, U. U.; TELKE, A. A.; GOVINDWAR, S. P. Peroxidase from *Bacillus* sp. VUS and its role in the decolorization of textile dyes. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, p. 361-368, 2009.

DEBNATH, R.; SAHA, T. Na insight into the production strategies and applications of the ligninolytic enzyme laccase from bacteria and fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, In press, 2020.

DEMARCHE, P.; JUNGHANN, C.; NAIR, R. R.; AGATHOS, S. N. Harnessing the power of enzymes for environmental stewardship. **Biotechnology advances**, v. 30, p. 933-953, 2012.

- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, S. M. C.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1959-1967, 2006.
- DEVAIAH, S. P.; SHETTY, H. S. Purification of an infection-related acidic peroxidase from pearl millet seedlings. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 94, p. 119-126, 2009.
- DIAS, M. F.; KRENCHINSKI, F. H.; PEREIRA, V. G. C.; MORENO, G.; ALBRECHT, L. P.; ALBRECHT, A. J. P. Phytosociological survey of weeds in glyphosate resistant and susceptible soybean cultivation areas. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 13, e5592, 2018
- DUKE, S. O. Why have no new herbicide modes of action appeared in recent years? **Pest Management Science**, v. 68, p. 505-512, 2012.
- FUWA, H. A. New method for microdetermination of amylase activity by the use of amylase as the substrate. **Journal of Biochemistry**, v. 41, p. 583-603, 1954.
- 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
- GHOLAMI, B. A.; FARAVANI, M.; KASHKI, M. T. Allelopathic effects of aqueous extract from *Artemisia kopetdaghensis* and *Satureja hortensis* on growth and seed germination of weeds. **Journal of Applied Environmental and Biological Sciences**, v. 1, n. 9, 283-290, 2011.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.
- GILL, S. S.; TUTEJA, A. N. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Machinery in Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909-930, 2010.
- GOUVEIA, L.; RAYMUNDO, A.; BATISTA, A. P.; SOUSA, I.; EMPIS, J. *Chlorella Vulgaris* and *Haematococcus Pluvialis* Biomass as Colouring and Antioxidant in Food Emulsions. **European Food Research and Technology**, v. 222, p. 362-67, 2005.
- GUARATINI, I. C. C.; ZANONI, M. V. Corantes Têxteis. **Química Nova**, v. 23, p. 71-78, 2000.
- HADDAJI, D.; BOUSSELMI, L.; SAADANI, O.; NOUAIRI, I.; GHRABI-GAMMAR. Z. Enzymatic degradation of azo dyes using three macrophyte species: *Arundo donax*, *Typha angustifolia* and *Phragmites australis*. **Desalination and Water Treatment**, v. 53, p. 1129-1138, 2014.
- HAMID, M.; REHMAN, K. Potential applications of peroxidases. **Food Chemistry**. v. 115, p. 1177-1186, 2009.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. H.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. Trichoderma Species - Opportunistic, Avirulent Plant Symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2 p. 43–56, 2004.

HEAP, I. M. **The International Survey of Herbicide Resistant Weeds**. (2019). Online. Disponível em: < www.weedscience.org>. Acesso em: 16 jun. 2019.

HEAP, I. M. The occurrence of herbicide-resistant weeds worldwide. **Pesticide Science**, v. 51, p. 235-243, 1999.

HOSEINI, S. M.; ZARGARI, F. Cadmium in Plants: A Review. **International Journal of Farming and Allied Sciences**, v. 2, p. 579–581, 2013.

HOSSEINIZAND, H.; SOKHANSANJ, S.; LIM, C. J. Studying the drying mechanism of microalgae *Chlorella vulgaris* and the optimum drying temperature to preserve quality characteristics. **Drying Technology**, v. 36, p. 1049–1060, 2017.

HOU, H.; ZHOU, J.; WANG, J.; DU, C.; YAN, B. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1415–1419, 2004.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v. 87, p. 4-10, 2003.

HUANG, H.; ULLAH, F.; ZHOU, D-X.; YI, M.; ZHAO, Y. Mechanisms of ROS Regulation of Plant Development and Stress Responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1-10, 2019.

Jl, F.; LIU, Y.; HAO, R.; LI, G.; ZHOU, Y.; DONG, R. Biomass production and nutrients removal by a new microalgae strain *Desmodesmus sp.* in anaerobic digestion wastewater. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 200-207, 2014.

KAUSHIK, P.; MALIK, P. Fungal dye decolourization: recent advances and future potential. **Environmental International**, v. 35, p. 127-141, 2009.

KEEN, N. T.; STASKAWICZ, B. Host range determinants in plant pathogens and symbionts. **Annual Review of Microbiology**, v. 42, p. 421-440, 1988.

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

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. In: An overview regarding bioherbicide and their production methods by fermentation. **Fungal Biomolecules: Sources, Applications and Recent Developments**. 1 ed.: John Wiley & Sons, Ltda, 2015.

KLANOVICZ, N.; CAMARGO, A. F.; STEFANSKI, F. S.; ZANIVAN, J.; SCAPINI, T.; POLLON, R.; WARKEN, A.; PALIGA, L.; PRECZESKI, K. P.; RIBEIRO, A. A. G. A.; GARDA-BUFFON, J.; FONGARO, G.; TREICHEL, H. Advanced oxidation processes

applied for color removal of textile effluent using a home-made peroxidase from rice bran. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, p. 261-272, 2020.

KOIKE, N.; HYAKUMACHI, M.; KAGEYAMA, K.; TSUYUMU, S.; DOKE, N. Induction of systemic resistance in Cucumber against several diseases by plant growth-promoting fungi: lignification and superoxide generation. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p. 523–533, 2001.

KONG, X.; TIAN, H.; YU, Q.; ZHANG, F.; WANG, R.; GAO, S.; XU, W.; LIU, J.; SHANI, E.; FU, C.; ZHOU, G.; ZHANG, L.; ZHANG, X.; DING, Z. PHB3 maintains root stem cell niche identity through ROS-responsive AP2/ERF transcription factors in arabidopsis. **Cell Reports**, v. 22, p.1350–1363, 2018.

KUMAR, G.; NGUYEN, D. D.; SIVAGURUNATHAN, P.; KOBAYASHI, T.; XU, K.; CHANG, S. W. Cultivation of microalgal biomass using swine manure for biohydrogen production: Impact of dilution ratio and pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 260, p. 16-22, 2018.

LIAO, W.; LIU, Y.; FREAR, C.; CHEN, S. A new approach of pellet formation of a filamentous fungus – *Rhizopus Oryzae*. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3415–3423, 2007.

MALDONADO, R. R. **Produção, purificação e caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais**. 2006. 129p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/255031>>. Acesso em: 10 jun. 2020.

MARCHIS, T.; AVETTA, P.; FABBRI, D.; VISCARDI, G.; LAURENTI, E. Oxidative degradation of Remazol Turquoise Blue G 133 by soybean peroxidase. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, p. 321-327, 2011.

MARKOU, G.; ANGELIDAKI, I.; GEORGAKAKIS, D. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 631-645, 2012.

MARQUES, C. T.; GOLUNSKI, S. M.; VENTURIN, B. D.; CAMARGO, A. F.; SCAPINI, T.; BALDISSARELLI, D. P.; MODKOVSKI, T. A.; PRECZESKI, K. P.; ROSA, C. D.; VARGAS, G. D.; BUFFON, J. G.; ROSIN, C. K.; ARENZON, A.; MOSSI, A. J.; TREICHEL, H. Removal of a red dye using noncommercial peroxidase extracted from rice bran. **Environmental Quality Management**, v. 27, p. 25-31, 2017.

METZ, B.; KOSSEN, N. W. F. The growth of molds in the form of pellets-a literature review. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 19, p. 781-799, 1977.

MICHELON, W.; SILVA, M. L. B.; MEZZARI, M. P. PIROLI, M.; PRANDINI, J. M.; SOARES, H. M. Effects of Nitrogen and Phosphorus on Biochemical Composition of Microalgae Polyculture Harvested from Phycoremediation of Piggery Wastewater Digestate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, p. 1407–1419, 2016

MIKIASHVILI, N.; WASSER, S. P.; NEVO, E.; ELISASHVILI, V. Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 999–1002, 2006.

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

MIRANDA-MANDUJANO, E.; MOELLER-CHÁVEZ, G.; VILLEGAS-ROSAS, O.; BUITRÓN, G.; GARZÓN-ZÚÑIGA, M. A. Decolourization of Direct Blue 2 by peroxidase obtained from an industrial soybean waste. **Water SA**, v. 44, p. 204-210, 2018.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; BREUSEGEM, F. V. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 490-498, 2004.

MOHD-ZAKI, Z.; BASTIDAS-OYANEDEL, J.; LU, Y.; HOELZLE, R.; PRATT, S.; SLATER, F. R.; BATSTONE, D. Influence of pH regulation mode in glucose fermentation on product section and process stability. **Microrganisms**, v. 4, 2016.

MORSI, R.; BILAL, M.; IQBAL, H. M. N.; ASHRAF, S. S. Laccases and peroxidases: The smart greener and futuristic biocatalytic tools to mitigate recalcitrant emerging pollutants. **Science of The Total Environment**, v. 714, 2020.

NOUREN, S.; NAWAZ, B. A. Mechanistic study of degradation of basic violet 3 by citrus limon peroxidase and phytotoxicity assessment of its degradation products. **Biochemical Engineering Journal**, v. 95, p. 9-19, 2015.

ODJADJARE, E. C.; MUTANDA, T.; OLANIRAN, A. O. Potential biotechnological application of microalgae a critical review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, p. 37-52, 2015.

PANDEY, K.; SINGH, B.; PANDEY, A.; BADRUDDIN, I.; PANDEY, S.; MISHRA, V.; JAINA, D. Application of microbial enzymes in industrial waste water treatment. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, p. 1243-1254, 2017.

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

PEROTTI, V. E.; LARRAN, A. S.; PALMIERI, V. E.; MARTINATTO, A. K.; PERMINGEAT, H. R. Herbicide resistant weeds: A call to integrate conventional agricultural practices, molecular biology knowledge and new technologies. **Plant Science**, v. 290, 110255, 2020.

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

PRANDINI, J. M.; DA SILVA, M. L. B.; MEZZARI, M. P.; PIROLI, M.; MICHELON, W.; SOARES H. M. Enhancement of nutrient removal from swine wastewater digestate

coupled to biogas purification by microalgae *Scenedesmus spp.* **Bioresource Technology**, v. 202, p. 67-75, 2016.

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

RANIMOL, G.; VENUGOPAL, T.; GOPALAKRISHNAN, S.; SUNKAR, S. Production of laccase from *Trichoderma harzianum* and its application in dye decolourisation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.16, p. 400-404, 2018.

REDDA, E. T.; MA, J.; MEI, J.; LI, M.; WU, B.; JIANG, X. Biological control of soilborne pathogens (*Fusarium Oxysporum* F. Sp. Cucumerinum) of Cucumber (*Cucumis Sativus*) by *Trichoderma* sp.. **Journal of Life Sciences**, v. 12, p. 1-12, 2018.

REICHERT JÚNIOR, F. W.; SCARIOT, M. A.; FORTE, C. T.; PANDOLFI, L.; DIL, J. M.; WEIRICH, S.; CAREZIA, C.; MULINARI, J.; MAZUTTI, M. A.; FONGARO, G.; GALON, L.; TREICHEL, H.; MOSSI, A. J. New perspectives for weeds control using autochthonous fungi with selective bioherbicide potential. **Heliyon**, v. 5, e01676, 2019.

RIBEIRO, V. M.; SPIASSI, A.; MARCON, T. R.; LIMA, G. P.; CORSATO, J. M. FORTES, A. M. T. Antioxidative enzymes of *Cucumis sativus* seeds are modulated by *Leucaena leucocephala* extracts. **Acta Scientiarum**, v. 39, n. 3, p. 373-380, 2017.

RODOLFI, L.; CHINI ZITTELLI, G.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. R. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, p. 100-112, 2009.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Experimental Design and Process Optimization**. 1st ed. Florida: CRC Press, 2014.

SANDER, K. B.; MURTHY, G. S. Enzymatic degradation of microalgal cell walls.” In: **American Society of Agricultural and Biological Engineers (ASABE)**, n. 096054, 2009, St. Joseph, Mich. Nevada. Disponível em: <<https://elibrary.asabe.org/abstract.asp?aid=27044>>. Acesso em: 03 dez. 2019.

SAROJ, S.; KUMAR, K.; PAREEK, N.; PRASAD, R.; SINGH, R. P. Biodegradation of azo dyes Red 183, Direct Blue 15 and Direct Red 75 by the isolate *Penicillium oxalicum* SAR-3. **Chemosphere**, v. 107, p. 240, 248, 2014.

SHAFFIQU, T. S.; ROY, J. J.; NAIR, R. A.; ABRAHAM, T. E. Degradation of textile dyes mediated by plant peroxidases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 102, p. 315-326, 2002.

SCHIPPERS, J. H. M.; FOYER, C. H.; VAN DONGEN, J. T. Redox regulation in shoot growth, SAM maintenance and flowering. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 29, p. 121-128, 2016.

SCHNEIDER, W. D. H.; FONTANA, R. C.; MENDONÇA, S.; SIQUEIRA, F. G.; DILLON, A. J. P.; CAMASSOLA, M. High level production of laccases and peroxidases from the newly isolated white-rot basidiomycete *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a stirred-tank bioreactor in response to different carbon and nitrogen sources. **Process Biochemistry**, v. 69, p. 1-11, 2018.

SHRIVASTAVA, R.; CHRISTIAN, V.; VYAS, B. R. M. Enzymatic decolorization of sulfonphthalein dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 333-337, 2005.

SILVA, M. C. **Degradação de corantes e remediação de efluentes têxteis por extrato bruto de peroxidase de nabo**. Tese (Doutorado em Agroquímica e Agrobioquímica) - Universidade Federal de Lavras, Programa de pós-graduação em Agroquímica, Lavras, MG, 2011.

SILVA, M. C.; DUARTE, C. A.; SOUSA, P. M. T.; AMORIM, P. P.; ARRIEL, T. J.; BATISTA, C. P. M. Decolorization of the phthalocyanine dye reactive blue 21 by turnip peroxidase and assessment of its oxidation products. **Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic**, v. 77, p. 9-14, 2012.

SINGH, M. P.; VISHWAKARMA, S. K.; SRIVASTAVA, A. K. Bioremediation of direct blue 14 and extracellular ligninolytic enzyme production by white rot fungi: *Pleurotus* spp. **BioMed research international**, 180156, 2013.

SOARES, G. M. B.; AMORIM, M. T. P.; COSTA-FERREIRA, M. Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 123-129, 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS. **Procedimentos para instalação, avaliação e análise de experimentos com herbicidas**. Londrina: SBCPD, 1995.

TEMUDO, M. F.; KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Influence of the pH on (open) mixed culture fermentation of glucose: A chemostat study. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, p. 69-79, 2007.

THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, v. 140, p. 19-26, 1994.

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

TREICHEL, H.; SBARDELOTTO, M.; VENTURIN, B.; DALL AGNOL, A.; MULINARI, J.; GOLUNSKI, S. M.; BALSONI, D. B.; BEVILACQUA, C. B.; JAQUES, R. J. S. Lipase production from a newly isolated *Aspergillus niger* by solid state fermentation. **Current Biotechnology**, v. 5, p. 1-7, 2016.

VELAZQUEZ-LUCIO, J.; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M.; COLLA, L. M.; SÁENZ-GALINDO, A.; CERVANTES-CISNEROS, D.; AGUILAR, C. N.; FERNANDES, B. D.;

RUIZ, H. A. Microalgal biomass pretreatment for bioethanol production: A review. **Biofuel Research Journal**, v. 5, p. 780–791, 2018.

VERMA, M.; BRAR, S. K.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y.; VALÉRO, J. R. Antagonistic fungi, *Trichoderma spp.*: panoply of biological control. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 37, p. 1-20, 2007.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; MARRA, R.; WOO, S. L.; LORITO, M. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 1-10, 2008.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; RUOCCO, M.; WOO, S.; LORITO, M. *Trichoderma* secondary metabolites that affect plant metabolism. **Natural Product Communications**, v. 7, p. 1545–1550, 2012.

WANG, Y.; HO, S-H.; CHENG, C-L.; NAGARAJAN, D.; GUO, W-Q.; LIN, C.; LI, S.; REN, N.; CHANG, J-S. Nutrients and COD removal of swine wastewater with an isolated microalgal strain *Neochloris aquatica* CL-M1 accumulating high carbohydrate content used for biobutanol production. **Bioresource Technology**, v. 242, p. 7-14, 2017.

WÖSTEN, H. A. B. Filamentous fungi for the production of enzymes, chemicals and materials. **Current Opinion in Biotechnology**, v.59, p.65-70, 2019.

WU, H.; WALKER, S.; ROLLIN, M. J.; TAN, D. K. Y.; ROBINSON, G.; WERTH, J. Germination, persistence, and emergence of flaxleaf fleabane (*Conyza bonariensis* [L.] cronquist). **Weed Biology and Management**, v. 7, p. 192–199, 2007.

XIE, S.; SUN, S.; DAI, S. Y.; YUAN, J. S. Efficient coagulation of microalgae in cultures with filamentous fungi. **Algal Research**, v. 2, p. 28-33, 2013.

ZENG, J.; DONG, Z.; WU, H.; TIAN, Z.; ZHAO, Z. Redox regulation of plant stem cell fate. **The EMBO Journal**, v. 36, p. 2844-2855, 2017.

APÊNDICE A – ARTIGO SUBMETIDO COMO PRODUTO DESTE TRABALHO



Potential use of biological herbicides in a circular economy context: A sustainable approach

Fábio S. Stefanski¹, Aline F. Camargo¹, Thamarys Scapini¹, Charline Bonatto², Bruno Venturin¹, Sabrina N. Weirich¹, Cleiton Ulkovski¹, Carine Carezia¹, Alessandro Ulrich¹, William Michelin², Hugo M. Soares², Alexandre Mathiensen², Gislaïne Fongaro², Altemir J. Mossi¹, Helen Treichel^{1*}

¹Universidade Federal da Fronteira Sul, Brazil, ²Federal University of Santa Catarina, Brazil, ³Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA), Brazil

Submitted to Journal:
Frontiers in Sustainable Food Systems

Specialty Section:
Agroecology and Ecosystem Services

Article type:
Original Research Article

Manuscript ID:
521102

Received on:
17 Dec 2019

Frontiers website link:
www.frontiersin.org