



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL — CAMPUS ERECHIM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

ALINE FRUMI CAMARGO

**ANÁLISE DO POTENCIAL BIOHERBICIDA DE FUNGOS SELVAGENS
CULTIVADOS EM BIOMASSA MICROALGAL**

ERECHIM-RS

2021

ALINE FRUMI CAMARGO

**ANÁLISE DO POTENCIAL BIOHERBICIDA DE FUNGOS SELVAGENS
CULTIVADOS EM BIOMASSA MICROALGAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental - PPGCTA da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS *Campus* Erechim, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Helen Treichel
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Gislaine Fongaro

ERECHIM-RS

2021

ALINE FRUMI CAMARGO

**ANÁLISE DO POTENCIAL BIOHERBICIDA DE FUNGOS SELVAGENS
CULTIVADOS EM BIOMASSA MICROALGAL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental - PPGCTA da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS *Campus* Erechim, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Helen Treichel
Coorientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Gislaine Fongaro

Esta dissertação de mestrado foi defendida e aprovada pela banca examinadora em:

____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior - UFFS

Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti - UFSM

Prof^ª. Dr^ª. Helen Treichel - UFFS (orientadora)

Prof^ª. Dr^ª. Gislaine Fongaro - UFSC (coorientadora)

**ERECHIM-RS
2021**

Dedico este estudo aos que compartilharam comigo esta caminhada desafiadora e a todos que buscam através da ciência e da empatia um universo mais sensato e amável, especialmente a elas, as mulheres cientistas.

AGRADECIMENTOS

Desenvolvi esta dissertação em meio à pandemia que todos nós vivenciamos no ano de 2020 e então posso lhes dizer que o que mais quero fazer são agradecimentos... principalmente pelo meu lugar de privilégio em estar segura e saudável em casa, enquanto muitas pessoas não tiveram a mesma oportunidade. Sem dúvida, foi um ano desafiador e de muito aprendizado.

Aos meus grandes motivadores, minha Mãe Clenir e meu Pai José, gratidão por serem os primeiros a me ensinar sobre relacionamentos humanos; estes últimos anos têm mostrado o quão importante estes relacionamentos são. Mãe, obrigada por ser uma mulher tão forte e me inspirar. Pai, obrigada por estar presente e incentivar meu autoconhecimento.

Aos meus irmãos, Arthur e Ana Clara, gratidão por me ensinarem a respeitar espaços; vocês foram universos diferentes em etapas diferentes da minha vida... espero que possamos sempre cuidar uns dos outros.

Ao meu grande amor, minha afilhada Martina, gratidão pelas revoluções que causaste em mim e por me aceitar exatamente como eu sou! Obrigada Carina e Gustavo, por serem responsáveis por essa parte importante (risos) e por serem meus incentivadores também.

Ao meu companheiro de vida, gratidão pela parceria e aprendizados da vida adulta, pelo suporte, carinho e respeito em minhas escolhas, espero que possamos continuar cultivando nossa relação. Obrigada, Felipe!

Às minhas grandes inspirações, Helen e Gislaine, obrigada por serem mulheres tão fortes e corajosas. Gratidão por todo empenho de vocês em continuarmos fazendo ciência de qualidade apesar de todos os desafios. Espero que possamos compartilhar muitas publicações, muito carinho e muitas jornadas, com vocês do meu lado eu vou para qualquer batalha!

Aos pesquisadores do Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos, gratidão por vocês existirem na minha vida! Obrigada por todo o aprendizado compartilhado durante minha caminhada como iniciante científica, como mestranda e quem sabe como doutoranda!? Em especial, agradeço a Thamarys, minha parceira e eterna dupla do mestrado, a Caroline pela disponibilidade em me dar uma mão, braços e pernas nos experimentos da dissertação, e a Charline por sua luz... agradeço ao LAMIBI pelo companheirismo, sintonia e pela oportunidade de compartilhar tantas coisas boas com vocês; a possibilidade de evoluirmos juntos é única.

Aos pesquisadores do Laboratório de Agroecologia agradeço pela disponibilidade em fazer parte deste trabalho, organizando todos os experimentos para aplicação dos extratos, em especial ao Professor Altemir, que foi um pouquinho orientador também, aceitou esse desafio e disponibilizou diversos recursos para a realização deste trabalho. Agradeço de coração, aos

colegas Lindomar e Alessandro pela dedicação e cuidado com nossos experimentos. Gratidão ao colega e amigo William, cultivador das microalgas que utilizamos nos experimentos.

À psicóloga Keyla e a instrutora de Yoga Stephani, gratidão por me darem suporte durante o meu processo de autoconhecimento e por me auxiliarem a organizar o meu turbilhão de sentimentos durante a pandemia. Sei que esta jornada apenas começou, teremos um lindo trabalho pela frente!

Professores são as pessoas mais admiráveis e importantes do mundo. Tive professores incríveis em todas as áreas da minha vida, alguns me ensinaram a como ser, outros como não ser! Gratidão a todos vocês... vou compartilhar o que foi aprendido. Aproveito para agradecer aos Professores Sérgio e Marcio pela disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos e contribuir em nossos estudos, principalmente como avaliadores desta dissertação; é uma honra tê-los ao meu lado neste momento.

Enfim, a todos que de alguma forma, me impulsionaram e apoiaram durante a minha vida acadêmica, muito obrigada por todas as vibrações de amor, por me incentivarem a ser parte da solução e nunca parte do problema!

“Os momentos mais fortes de nossas vidas acontecem quando amarramos as pequenas luzinhas criadas pela coragem, pela compaixão e pelo vínculo, e as vemos brilhar na escuridão de nossas batalhas.”

Brené Brown

RESUMO

Plantas daninhas causam perturbações no crescimento de culturas por apresentarem um crescimento rápido e incomum, competindo por espaço e recursos com outras espécies, prejudicando assim o ambiente, o rendimento e a qualidade de culturas de interesse agrícola. Muitas vezes o controle de plantas daninhas é realizado por meio do uso de herbicidas químicos em conjunto com outros métodos convencionais, mas que acabam gerando preocupações no âmbito de saúde humana e ambiental. Devido a estas questões, buscaram-se métodos alternativos para o controle de plantas daninhas, que promovam a segurança alimentar e a manutenção de um ecossistema saudável. Neste sentido, este estudo buscou avaliar o potencial bioherbicida de fungos selvagens cultivados em biomassa de microalgas provenientes do tratamento de digestato da produção de biogás. Para isso, a biomassa microalgal foi separada após tratamento terciário de efluente de suinocultura e uma massa de 10 gramas foi utilizada como substrato para as fermentações que ocorreram de forma submersa e sólida contendo 10^6 esporos/mL de cada microrganismo. Os extratos provenientes de fermentações distintas (sólida e submersa) foram misturados, na proporção de 1:1 v/v, a fim de avaliar a eficiência de um extrato misto. Foram utilizados quatro isolados fúngicos: *Trichoderma koningiopsis*, que foi isolado da planta daninha *Digitaria ciliares*, *Fusarium* sp. e dois fungos com crescimento associado, *Fusarium denticulatum* e *Mucor circinelloides*, que foram isolados do intestino de lagartas militares (*Spodoptera frugiperda*). Os extratos foram avaliados quanto à atividade das enzimas amilase, celulase, peroxidase, lipase e lacase. A atividade bioherbicida foi avaliada, através da aplicação em *Cucumis sativus* e o dano foliar foi visualmente estimado conforme a escala recomendada pela Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas. Uma caracterização preliminar dos extratos também foi realizada por meio de uma extração líquido-líquido, em que os produtos da reação foram identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. O extrato que apresentou maior potencial fitotóxico também foi submetido a testes de liofilização e secagem visando concentrar sua atividade enzimática. A toxicidade dos extratos foi verificada com testes em meristemas apicais de *Allium cepa*, dos quais calculou-se o índice mitótico. Numa visão global do estudo, os microrganismos demonstraram potencial como agentes produtores de um *pool* enzimático pelos dois métodos fermentativos testados. Dentre os extratos produzidos por fermentação em estado sólido, os obtidos pelos fungos *Fusarium denticulatum* em consórcio com *Mucor circinelloides* e *Fusarium* sp. demonstraram maiores níveis de danos foliares ($80-100 \pm 3,00$ %). Já na fermentação submersa, com os fungos *Trichoderma koningiopsis* e *Fusarium* sp., obteve-se danos foliares irreversíveis nas culturas testadas. O extrato combinado proveniente da fermentação submersa do fungo *Fusarium* sp. e pela fermentação sólida do consórcio de fungos *Fusarium denticulatum* e *Mucor circinelloides*, apresentou um efeito fitotóxico severo ($98,00 \pm 3,00$ %), que demonstra a atuação sinérgica na planta alvo, provavelmente pelo *pool* enzimático presente neste extrato ser composto por amilase, celulase, lipase e peroxidase. O perfil de compostos presentes nos extratos se refere está basicamente em compostos orgânicos, mas ainda não se sabe ao certo suas contribuições na ação bioherbicida. Para todas as enzimas analisadas, a técnica de liofilização foi a mais eficiente no processo de concentração. Quanto à toxicidade, os resultados demonstraram efeitos positivos, com baixo potencial de contaminação. Por meio dos testes realizados, pode-se inferir que as cepas microbianas são potenciais agentes de controle biológico de plantas invasoras, que em conjunto com a biomassa de microalgas, ofereceram as condições adequadas para se obter um *pool* enzimático de relevância biotecnológica e com características promissoras a serem explorados como bioherbicida, abordando aspectos no âmbito da sustentabilidade ambiental.

Palavras-chave: Controle biológico. Processos biotecnológicos. Enzimas. Segurança alimentar. Cepas microbianas.

ABSTRACT

Weeds cause disturbances in the crop growth by presenting a rapid and unusual growth, competing for space and resources with other species, thus harming the environment, yield and quality of crops of agricultural interest. Weed control is often carried out through the use of chemical herbicides in conjunction with other conventional methods, but which end up raising concerns in the area of human and environmental health. Due to these issues, alternative methods for weed control are sought, which promote food security and the maintenance of a healthy ecosystem. In this sense, this study sought to evaluate the bioherbicidal potential of wild fungi grown in microalgae biomass from the treatment of the digestate of biogas production. For this, the microalgal biomass was separated after tertiary treatment of swine effluent and a mass of 10 g was used as a substrate for the fermentations that occurred in a submerged and solid form containing 10^6 spores/mL of each microorganism. The extracts from different fermentations (solid and submerged) were mixed, in the proportion of 1:1 v/v, in order to evaluate the efficiency of a mixed extract. Four fungal isolates were used: *Trichoderma koningiopsis*, which was isolated from the weed *Digitaria ciliaris*, *Fusarium* sp. and two fungi with associated growth, *Fusarium denticulatum* and *Mucor circinelloides*, which were isolated from the intestines of military caterpillars (*Spodoptera frugiperda*). The extracts were evaluated for the activity of the enzymes amylase, cellulase, peroxidase, lipase and laccase. Bioherbicidal activity was evaluated through application on *Cucumis sativus* and leaf damage was visually estimated according to the scale recommended by the Brazilian Society of Weed Science. A preliminary characterization of the extracts was also carried out by means of a liquid-liquid extraction, in which the reaction products were identified by gas chromatography coupled with mass spectrometry. The extract with the highest phytotoxic potential was also subjected to lyophilization and drying tests in order to concentrate its enzymatic activity. The toxicity of the extracts was verified with tests on apical meristem of *Allium cepa*, from which the mitotic index was calculated. In a global view of the study, the microorganisms showed potential as producers of an enzymatic pool by the two fermentative methods. Among the extracts produced by solid state fermentation, those obtained by the fungi *Fusarium denticulatum* in consortium with *Mucor circinelloides* and *Fusarium* sp. demonstrated higher levels of leaf damage ($80-100 \pm 3.00\%$). In submerged fermentation, with the fungi *Trichoderma koningiopsis* and *Fusarium* sp., irreversible leaf damage was obtained in the tested cultures. The combined extract from the submerged fermentation of the fungus *Fusarium* sp. and by the solid fermentation of the *Fusarium denticulatum* and *Mucor circinelloides* fungi consortium, it presented a severe phytotoxic effect ($98.00 \pm 3.00\%$), which demonstrates the synergistic action on the target plant, probably because the enzyme pool present in this extract is composed of amylase, cellulase, lipase and peroxidase. The profile of compounds present in the extracts is basically organic compounds, but their contributions to the bioherbicidal action are not yet known. For all analyzed enzymes, the lyophilization technique was the most efficient in the concentration process. As for toxicity, the results showed positive effects, with low potential for contamination. Through the tests carried out, it can be inferred that the microbial strains are potential agents of biological control of invasive plants, which together with the biomass of microalgae, offered the appropriate conditions to obtain an enzymatic pool of biotechnological relevance and with promising characteristics to be explored as a bioherbicide, addressing aspects of environmental sustainability.

Keywords: Biological control. Biotechnological processes. Enzymes. Food security. Microbial strains.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma contendo um resumo das etapas desenvolvidas durante a dissertação.	19
Figura 2 – Efeito fitotóxico dos extratos obtidos por fermentação submersa dos fungos <i>Trichoderma koningiopsis</i> e <i>Fusarium</i> sp. após 14 dias da aplicação em <i>Cucumis sativus</i>	36
Figura 3 – Efeito fitotóxico dos extratos obtidos por fermentação sólida dos fungos <i>Fusarium denticulatum</i> em consórcio com <i>Mucor circinelloides</i> e <i>Fusarium</i> sp. após 14 dias da aplicação em <i>Cucumis sativus</i>	37
Figura 4 – Efeito fitotóxico dos extratos obtidos por meio da combinação de extratos provenientes das fermentações submersa e sólida dos fungos <i>Trichoderma koningiopsis</i> , <i>Fusarium denticulatum</i> em consórcio com <i>Mucor circinelloides</i> e <i>Fusarium</i> sp.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Misturas realizadas com extratos provenientes das fermentações em estado submerso e sólido, utilizando como substrato microalgas e os microrganismos <i>Trichoderma koningiopsis</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Fusarium denticulatum</i> e <i>Mucor circinelloides</i>	23
Tabela 2 - Descrição da escala aplicada para as avaliações do potencial bioherbicida dos extratos fermentados, de acordo com a SBCPD.....	27
Tabela 3 – Resultados da produção enzimática de amilase, celulase, lacase, lipase e peroxidase, presente nos extratos obtidos pela fermentação submersa dos fungos <i>Trichoderma koningiopsis</i> , <i>Fusarium denticulatum</i> em consórcio com <i>Mucor circinelloides</i> e <i>Fusarium</i> sp.	30
Tabela 4 - Resultados da produção enzimática de amilase, celulase, lacase, lipase e peroxidase, presente nos extratos obtidos pela fermentação sólida dos fungos <i>Trichoderma koningiopsis</i> , <i>Fusarium denticulatum</i> em consórcio com <i>Mucor circinelloides</i> e <i>Fusarium</i> sp.	31
Tabela 5 - Resultados da produção enzimática de amilase, celulase, lacase, lipase e peroxidase, obtidos por meio da combinação de extratos provenientes das fermentações submersa e sólida dos fungos <i>Trichoderma koningiopsis</i> , <i>Fusarium denticulatum</i> em consórcio com <i>Mucor circinelloides</i> e <i>Fusarium</i> sp.....	33
Tabela 6 - Resultados da aplicação em <i>Cucumis sativus</i> dos extratos obtidos por fermentação submersa e sólida dos fungos <i>Trichoderma koningiopsis</i> , <i>Fusarium denticulatum</i> em consórcio com <i>Mucor circinelloides</i> e <i>Fusarium</i> sp.	35
Tabela 7 - Resultados da aplicação em <i>Cucumis sativus</i> dos extratos obtidos por meio da combinação de extratos provenientes das fermentações submersa e sólida dos fungos <i>Trichoderma koningiopsis</i> , <i>Fusarium denticulatum</i> em consórcio com <i>Mucor circinelloides</i> e <i>Fusarium</i> sp.	39
Tabela 8 - Resultados da produção enzimática de amilase, celulase, lacase, lipase e peroxidase, obtidos por meio dos testes de concentração enzimática para o extrato proveniente da mistura 6.	43
Tabela 9 – Resultado dos Índices Mitóticos (IM) em meristemas apicais de <i>Allium cepa</i> para as amostras brutas e diluídas de microalgas, Mistura 6 e dos testes de concentração enzimática.	45
Tabela 10 – Compostos identificados no extrato etanólico derivatizado do controle da fermentação submersa em GC-MS.....	53

Tabela 11 - Compostos identificados no extrato etanólico derivatizado do <i>Trichoderma koningiopsis</i> da fermentação submersa em GC-MS.....	55
Tabela 12 - Compostos identificados no extrato etanólico derivatizado do <i>Fusarium</i> sp. da fermentação submersa em GC-MS.....	56
Tabela 13 - Compostos identificados no extrato etanólico derivatizado do <i>Fusarium denticulatum</i> em consórcio com <i>Mucor circinelloides</i> da fermentação submersa em GC-MS.	58
Tabela 14 - Compostos identificados no extrato etanólico derivatizado do controle da fermentação sólida em GC-MS.	59
Tabela 15 - Compostos identificados no extrato etanólico derivatizado do <i>Trichoderma koningiopsis</i> da fermentação sólida em GC-MS.	61
Tabela 16 - Compostos identificados no extrato etanólico derivatizado do <i>Fusarium</i> sp. da fermentação sólida em GC-MS.	63
Tabela 17 - Compostos identificados no extrato etanólico derivatizado do <i>Fusarium denticulatum</i> em consórcio com <i>Mucor circinelloides</i> da fermentação sólida em GC-MS.	65
Tabela 18 - Compostos identificados no extrato etanólico derivatizado da mistura 6 da fermentação submersa do <i>Fusarium</i> sp. e da fermentação sólida do <i>Fusarium denticulatum</i> em consórcio com <i>Mucor circinelloides</i> em GC-MS.....	67

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 BIOMASSA DE MICROALGA	20
3.2 MICRORGANISMOS	20
3.3 FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	22
3.4 FERMENTAÇÃO SÓLIDA	22
3.5 COMBINAÇÃO DE EXTRATOS PROVENIENTES DAS FERMENTAÇÕES SUBMERSA E SÓLIDA	23
3.6 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA	23
3.6.1 Amilase.....	24
3.6.2 Celulase	24
3.6.3 Lacase	24
3.6.4 Lipase	25
3.6.5 Peroxidase.....	25
3.7 APLICAÇÃO DOS EXTRATOS EM <i>Cucumis sativus</i>	26
3.8 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NOS EXTRATOS FERMENTADOS.....	27
3.9 CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS FERMENTADOS	28
3.10 TOXICIDADE DOS EXTRATOS FERMENTADOS	28
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 BIOMASSA DE MICROALGA	30
4.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.....	30

4.2.1 Extratos obtidos por fermentação submersa e sólida	30
4.2.2 Combinação dos extratos.....	33
4.3 ANÁLISE PRELIMINAR DA ATIVIDADE BIOHERBICIDA	35
4.3.1 Extratos obtidos por fermentação submersa e sólida	35
4.3.2 Combinação dos extratos.....	38
4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NOS EXTRATOS FERMENTADOS.....	42
4.5 CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS FERMENTADOS.....	43
4.6 TOXIDADE DOS EXTRATOS FERMENTADOS	44
5 CONCLUSÃO.....	46
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	47
REFERÊNCIAS	48
APÊNDICES	53
ANEXOS – PRODUÇÕES REFERENTES AO PERÍODO DE MESTRADO VÍNCULADAS AO TEMA DA DISSERTAÇÃO (2019-2021).....	69
ANEXOS – OUTRAS PRODUÇÕES REFERENTES AO PERÍODO DE MESTRADO (2019-2021)	81

1 INTRODUÇÃO

Uma das grandes questões do setor agrícola sempre foi a manutenção de sua produtividade visando atender as necessidades de uma população em constante desenvolvimento. Herbicidas têm sido amplamente utilizados como estratégia para garantir a segurança de culturas e também para evitar que plantas daninhas se proliferem rapidamente nestes ambientes. Essa estratégia de controle já vem sendo empregada desde o fim da década de 60. As plantas daninhas apresentam características agressivas e competem por nutrientes com outras culturas. Além disso, com o uso contínuo de herbicidas, algumas populações tornaram-se resistentes, resultando em rendimento reduzido e altos custos para sustentar a produção de alimentos (REICHERT JÚNIOR et al., 2019; PEROTTI et al., 2020; VERMA et al., 2020).

Uma alternativa segura para garantir a disponibilidade de alimentos saudáveis e mais sustentáveis é o uso de bioherbicidas como forma de reduzir a aplicação de herbicidas sintéticos. Os bioherbicidas são produtos baseados em organismos biologicamente ativos ou em metabólitos secundários e enzimas produzidos por eles. O uso de produtos naturais como forma de manejo de plantas invasoras oferece algumas vantagens frente aos herbicidas sintéticos, como especificidade de atuação, rápida degradação e baixo risco de contaminação ambiental. Embora vários produtos naturais tenham sido testados para atividade bioherbicida, poucos podem ser obtidos comercialmente. Dentre esses compostos, nove bioherbicidas comerciais têm formulação baseada em cepas fúngicas (CORDEAU et al., 2016; RADHAKRISHNAN; ALQARAWI; ABD ALLAH, 2018).

A essência da formulação de um bioherbicida está na definição do composto biologicamente ativo, que fará as interações necessárias com a planta alvo. Os fungos ocupam um lugar relevante neste cenário, já que geralmente são utilizados esporos fúngicos que são facilmente aplicados na superfície foliar de plantas. Existe uma gama de possíveis cepas microbianas com potencial bioherbicida; o ambiente abriga uma infinidade de microrganismos que podem ser aplicados em diversas áreas biotecnológicas. Nesse sentido, a bioprospecção de cepas microbianas é fundamental para a descoberta de novas espécies relevantes neste cenário. Fungos dos gêneros *Fusarium* e *Trichoderma* são muito utilizados como agentes de controle biológico; eles atuam formando metabólitos (fitohormônios, 2-(hidroximetil)fenol, ácidos orgânicos, álcoois, reguladores de crescimento vegetal, entre outros) e enzimas que degradam a parede celular de plantas. Com isso, os fungos acessam facilmente o interior das folhas causando estresse oxidativo e, conseqüentemente, a morte celular (RADHAKRISHNAN;

ALQARAWI; ABD ALLAH, 2018; SINDHU et al., 2018; ADETUNJI et al., 2019; MEHDIZADEH; MUSHTAQ, 2020; VERMA et al., 2020).

Os bioherbicidas podem ter mecanismos de ação semelhantes aos herbicidas sintéticos, como glifosato e triazina (revisado por BORDIN et al., 2020). A produção de um composto com efeito bioherbicida relevante depende do crescimento microbiano e da produção enzimática, que ocorre por meio de processos fermentativos, os quais sofrem influência de diversos fatores. A adição de adjuvantes, como nutrientes, óleos e enzimas, pode incrementar o efeito do bioherbicida além de auxiliar na sobrevivência do patógeno e proteção do ingrediente ativo em condições adversas de armazenamento (ASH, 2010; AITA et al., 2019). A aplicação direta de enzimas degradantes da parede celular para o controle de plantas daninhas tem sido estudada na literatura. Formadas por longas cadeias de aminoácidos com ligações peptídicas, as enzimas são biocatalizadores que tem por função o controle dos processos de transformação de nutrientes em energia, e a quebra de nutrientes complexos em estruturas mais simples. Quando comparadas aos catalisadores químicos, as enzimas apresentam vantagens por sua especificidade, alta atividade catalítica, baixa agressividade ao meio ambiente e atuação em condições brandas de pH e temperatura (DE OLIVEIRA et al., 2020).

Enzimas fúngicas aplicadas como agentes fitotóxicos podem atuar por meio de diferentes mecanismos de ação, alterando a captação de nutrientes e a permeabilidade da membrana, resultando em doenças, inibição de crescimento e redução nas taxas de síntese proteica. De forma mais específica, as lipases podem atuar na catalise de lipídios e proteínas do endosperma de plantas daninhas, as peroxidases podem submeter a planta à um estresse oxidativo, catalisando a conversão de superóxidos nos cloroplastos, mitocôndrias, citoplasma e peroxissomos, já enzimas hidrolíticas como amilase e celulase podem ser iniciadoras de danos à membrana celular, inibindo processos bioquímicos, mitose e a germinação de sementes (BORDIN et al., 2018; RADHAKRISHNAN; ALQARAWI; ABD ALLAH, 2018; AITA et al., 2019; REICHERT JÚNIOR et al., 2019; CAMARGO et al., 2020; DE ALMEIDA et al., 2020).

Produtos naturais são mais complexos de serem produzidos, pois para um desenvolvimento adequado deve-se levar em consideração o crescimento microbiano apropriado e o potencial de produção enzimática. Esse processo sofre influência das condições operacionais, e o meio fermentativo precisa ser suficientemente nutritivo para que o microrganismo possa se desenvolver. Estudos recentes destacaram o potencial de microalgas como uma alternativa sustentável para a produção de bioherbicidas. Dependendo de suas condições de cultivo, as microalgas podem oferecer um substrato rico em carboidratos e

proteínas, o que tornaria possível utilizá-las como matéria-prima para a produção de bioherbicidas (COSTA et al., 2019).

O custo de produção de um bioherbicida ainda é alto, o que não o torna competitivo frente a outros produtos químicos disponíveis no mercado. Uma alternativa seria a utilização de um meio fermentativo mais barato, agregando valor ao produto final. Para isso, microalgas resultantes do tratamento de dejetos da suinocultura apresentam uma possibilidade de aplicação como substrato de fácil obtenção, visto que o Brasil é o quarto maior exportador de proteína suína (aproximadamente 4 milhões de toneladas em 2019) também haverá a produção de grandes volumes de águas residuais, contendo alto teor de matéria orgânica, nutrientes e outros compostos (ABPA, 2019; MICHELON et al., 2021).

A possibilidade de cultivar microalgas como forma de tratamento do digestato proveniente da produção de biogás é atraente no sentido de pensarmos em uma abordagem integrada para obtenção de frentes como: biocombustíveis, compostos bioquímicos, bioherbicidas, biofertilizantes, entre outros. Em termos gerais, um m³ de digestato poderá produzir 14,6 kg de sólidos voláteis de microalga ao fixar 22,2 kg de CO₂, estes valores são dependentes da concentração do efluente, da turbidez, cor e presença de sólidos, por isso o efluente é variável com o processo (XIA; MURPHY, 2016). A inserção desta biomassa em outro processo seria uma solução sustentável para agregar valor às microalgas e reduzir o custo final do bioherbicida (MICHELON et al., 2016; COSTA et al., 2019).

Com isso, este estudo propõe avaliar o potencial de fungos selvagens cultivados em biomassa de microalgas provenientes do tratamento do digestato da produção de biogás, visando a obtenção de bioherbicidas fúngicos. Acredita-se que estes estudos incentivem a formulação de bioherbicidas seguros, de baixo custo e com potencial para comercialização, além de utilizar um meio de cultivo alternativo, inserindo esse estudo dentro dos escopos da economia circular e da biotecnologia.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial bioherbicida de fungos selvagens cultivados em biomassa de microalgas provenientes do tratamento do digestato suinícola proveniente da cadeia de biogás.

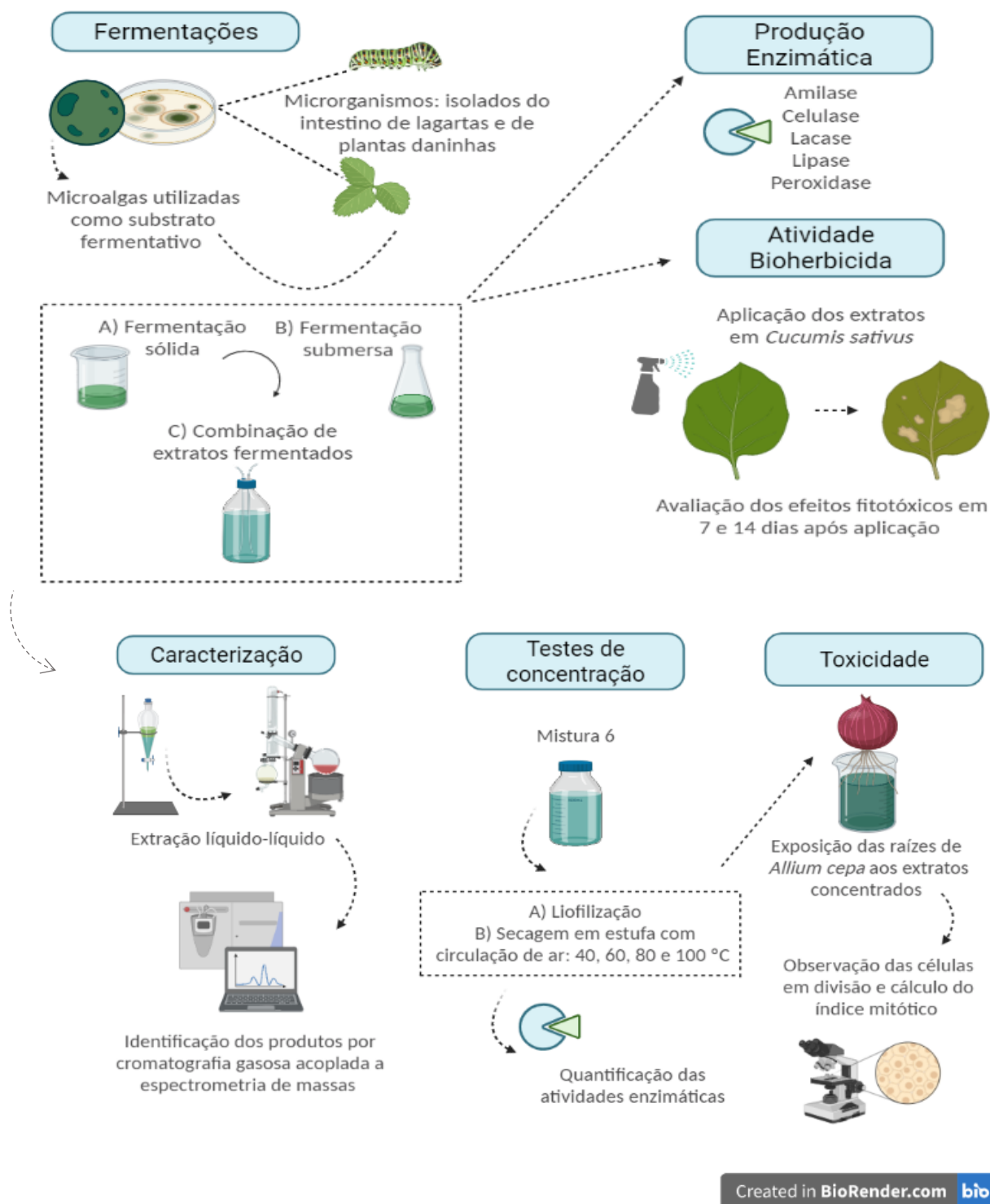
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial de diferentes fungos isolados de planta daninha e do intestino de lagartas militares em processos de fermentação submerso e sólido, usando microalgas como substrato;
- Quantificar enzimas envolvidas na atividade bioherbicida (amilase, celulase, lacase, lipase e peroxidase) nos extratos obtidos por diferentes processos fermentativos e potencializar suas atividades;
- Validar a atividade bioherbicida dos extratos fermentados frente ao controle de *Cucumis sativus* em casa de vegetação;
- Caracterizar os compostos presentes nos extratos fermentados;
- Determinar a toxicidade dos potenciais bioherbicidas, para fins de controle e segurança ambiental.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Na Figura 1 estão apresentadas as etapas de desenvolvimento deste estudo.

Figura 1 - Fluxograma contendo um resumo das etapas desenvolvidas durante a dissertação.



3.1 BIOMASSA DE MICROALGA

A microalga utilizada como substrato para as fermentações corresponde a *Chlorella* spp. A biomassa microalgal foi obtida na Embrapa Suínos e Aves (Concórdia, SC), e é resultante do processo de tratamento visando a remoção de amônia e fósforo da porção residual sólida (digestato) da produção de biogás, proveniente de dejetos da suinocultura e realizada por meio de um reator biológico com manta de lodo de fluxo ascendente (MICHELON et al., 2016).

O cultivo das microalgas ocorre sob condições naturais de campo e não estéreis, em biorreatores de 500 L (Ø 121,2 cm e altura 58,4 cm) em uma casa de vegetação, sob a luz natural ($321,5 \pm 411,4 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e sob temperatura média ambiente de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ (essas medidas foram realizadas pela manhã (8h), meio dia (12h) e tarde (16h)). Os reatores foram inoculados com 30% de inóculo (em volume) contendo 70 mg de microalgas L^{-1} de massa seca. O meio de crescimento consiste em 6% v/v de efluente digerido (digestato) diluído no volume total de água do reator, que foi misturado continuamente usando uma bomba mecânica submersa (vazão de 1.200 L h^{-1}). Após 12 dias de cultivo, a biomassa no reator atinge 0,3 - 0,4 g de microalgas L^{-1} de massa seca, então é colhida, centrifugada ($3.000 \times g$, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min; EVODOS, T10, Holanda) e armazenada sob refrigeração (-80°C) até a sua utilização.

A caracterização da biomassa foi realizada na Embrapa Suínos e Aves (Concórdia, SC), e os ensaios de umidade foram realizados a partir de uma amostra da biomassa de 2 g, que foi pesada em cadinhos de porcelana (pré-calcinados à $500 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 hora em uma mufla) em balança de precisão. As amostras, em triplicata, foram mantidas em uma mufla (Prolab, Brasil) a $105 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 hora, após este período foram mantidas em um dessecador até o seu resfriamento. Posteriormente, observou-se a variação de peso das amostras a cada 2 minutos. O processo foi concluído quando o peso das amostras estabilizou.

3.2 MICRORGANISMOS

Para a produção dos extratos com potencial bioherbicida foram utilizados quatro isolados fúngicos. O primeiro deles, da espécie *Trichoderma koningiopsis* (código de identificação no GenBank MK860714), foi isolado da planta daninha *Digitaria ciliares* e apresentou resultados promissores de produção enzimática e no controle de plantas daninhas em estudos preliminares do Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos (LAMIBI) em parceria com o Laboratório de Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul - Campus Erechim/RS (BORDIN et al., 2018; CAMARGO et al., 2019; REICHERT JÚNIOR et al., 2019). As outras três cepas microbianas foram isoladas do intestino de lagartas militares (*Spodoptera frugiperda*) em parceria com o Laboratório de Bioquímica e Genética da

Universidade Federal de Fronteira Sul, Campus Chapecó. Para isso, 100 lagartas foram submetidas ao processo de dissecação, submersas por 1 minuto em etanol 70%, com subsequente lavagem em solução salina a 0,85% para impedir eventual contaminação por microrganismos da superfície externa do animal. Em seguida, foram feitas incisões nos dorsos das lagartas para a retirada efetiva dos intestinos, que, em condições assépticas, foram diretamente colocados em frascos Erlenmeyer (10 intestinos por frasco) contendo meio sintético mínimo YNB (6,7 g/L de base nitrogenada de leveduras – SIGMA-Aldrich) acrescido de 10 g/L de xilose e 0,2 g/L de cloranfenicol. Os frascos foram mantidos a 30°C sob 145 rpm até que a turbidez decorrente do crescimento microbiano pudesse ser percebida (CADETE et al., 2017; BARRETTO et al., 2018). Na sequência, para a obtenção de colônias isoladas, foram feitos esgotamentos em placas de Petri com o mesmo meio de cultura acima descrito, adicionalmente contendo 20 g/L de ágar.

Dentre as cepas isoladas, duas culturas apresentaram potencial e foram identificadas molecularmente (Neoprospecta, Florianópolis-Brasil) como *Fusarium* sp. e dois fungos com crescimento associado, *Fusarium denticulatum* e *Mucor circinelloides*. O DNA dos fungos isolados dos intestinos das lagartas foi extraído por meio do micélio cultivado em meio de cultura (DOYLE; DOYLE, 1897). Neste método, a amostra de DNA foi submetida à reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar a região do espaçador transcrito interno do rDNA (ITS). Os iniciadores para a região ITS foram: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE; BRUNS; TAYLOR, 1989). A reação PCR totalizou de 50 µL e ocorreu com uma mistura de 1 µl de DNA, 1 µl de cada iniciador a 10 µM, 10 µl de tampão de 5X, 1 µl de dNTPs 10 mM, 0,2 µl de GoTaq DNA polimerase 5 U/µL (Promega) e 35,8 µL de água ultrapura esterilizada. A amplificação consistiu na desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 10 s, anelamento a 54 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 45 s e uma extensão final a 72 °C por 4 min. Os produtos do processo de amplificação foram verificados por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, corados com brometo de etídio e purificados por precipitação com polietilenoglicol. Os fragmentos foram sequenciados por meio da análise de terminação em cadeia com o reagente Big Dye 3.1 (Applied Biosystems) em sequenciador capilar automático 3.500 XL (Applied Biosystems). Após, as sequências obtidas para os fungos isolados foram comparadas com o banco de dados GenBank por meio da ferramenta BLAST (sigla em inglês: Basic Local Alignment Search Tool) (SCHMITZ; RIESNER, 2006).

As cepas foram repicadas e mantidas em placas de Petri, contendo meio de cultivo *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Merck, Alemanha), por 7 dias a 28 °C para o crescimento fúngico. Posteriormente, foram utilizadas nas fermentações.

3.3 FERMENTAÇÃO SUBMERSA

O processo fermentativo em estado submerso foi realizado em Erlenmeyers de 300 mL com volume efetivo de 100 mL. O meio foi composto por 10 g de biomassa microalgal úmida, visando atender a suplementação de um meio fermentativo sintético para a produção de bioherbicida (BORDIN et al., 2018) e 90 mL de água destilada. Os Erlenmeyers foram autoclavados a 120 °C, por 20 minutos a 1 atm. Após a esterilização, os meios foram inoculados com 10 mL de uma suspensão contendo 10^6 esporos/mL de cada microrganismo: *Trichoderma koningiopsis*, *Fusarium* sp., *Fusarium denticulatum* e *Mucor circinelloides*.

A suspensão de esporos para cada cepa fúngica foi obtida adicionando 100 mL de solução Tween 80 0,1% (v/v) a Erlenmeyeres contendo os microrganismos já desenvolvidos. Desta suspensão, 0,1 mL foi utilizado para realizar a contagem de esporos presente no meio, utilizando câmara de Neubauer e microscópio óptico (Olympus, Japão).

Os Erlenmeyers inoculados foram mantidos em um agitador orbital (New Brunswick™, Alemanha) a 120 rpm, por 72 horas e 28 °C. Após a fermentação, os extratos foram filtrados por prensagem manual em tecido sintético, o sólido retido foi esterilizado e descartado, o permeado líquido centrifugado (NT 815 - NovaTecnica, Brasil) a 2000 rpm, 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante proveniente da centrifugação foi utilizado para as etapas subsequentes.

3.4 FERMENTAÇÃO SÓLIDA

A fermentação sólida foi realizada em béqueres de polipropileno (250 mL) contendo meio composto apenas por 10 g de biomassa microalgal úmida, sem suplementação. Os béqueres foram cobertos com manta acrílica, papel alumínio e autoclavados a 120 °C, por 20 minutos a 1 atm. Após esterilização, os meios foram inoculados com 1 mL de suspensão contendo 10^6 esporos/mL de cada microrganismo: *Trichoderma koningiopsis*, *Fusarium* sp., *Fusarium denticulatum* e *Mucor circinelloides*, conforme descrito anteriormente.

A fermentação ocorreu em uma incubadora, tipo B.O.D (Solab, Brasil) por 72 horas, a uma temperatura fixa de 28 °C e umidade relativa de 70 %. Após a fermentação, adicionou-se 90 mL de água destilada as amostras fermentadas para realizar a extração. Essa solução permaneceu sob agitação de 200 rpm, durante 60 minutos a 30 °C. Os extratos foram filtrados por prensagem manual em tecido sintético, o sólido retido foi esterilizado e descartado, o

permeado líquido centrifugado (NT 815 - NovaTecnica, Brasil) a 2000 rpm, a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante proveniente da centrifugação foi utilizado para as etapas subsequentes.

3.5 COMBINAÇÃO DE EXTRATOS PROVENIENTES DAS FERMENTAÇÕES SUBMERSA E SÓLIDA

Para a combinação de extratos, foram realizadas misturas dos extratos provenientes de fermentações distintas, sempre combinando um extrato obtido por fermentação submersa e outro obtido por fermentação sólida, após a etapa de centrifugação, na proporção de 1:1 v/v, a fim de avaliar a eficiência de um extrato misto. Na Tabela 1 estão apresentados os extratos combinados. A escolha dos extratos combinados se deu a partir de testes preliminares de aplicação em *Cucumis sativus*, sendo que os extratos que apresentaram potencial bioherbicida foram combinados entre si.

As misturas foram homogeneizadas em um agitador de tubos, do tipo vortex a 3800 rpm por 60 segundos.

Tabela 1 – Misturas realizadas com extratos provenientes das fermentações em estado submerso e sólido, utilizando como substrato microalgas e os microrganismos *Trichoderma koningiopsis*, *Fusarium* sp., *Fusarium denticulatum* e *Mucor circinelloides*.

Teste	Extratos Misturados (1:1 v/v)
1	FS <i>Trichoderma koningiopsis</i> + FES <i>Trichoderma koningiopsis</i>
2	FS <i>Fusarium denticulatum</i> e <i>Mucor circinelloides</i> + FES <i>Fusarium denticulatum</i> e <i>Mucor circinelloides</i>
3	FS <i>Fusarium</i> sp. + FES <i>Fusarium</i> sp.
4	FS <i>Trichoderma koningiopsis</i> + FES <i>Fusarium denticulatum</i> e <i>Mucor circinelloides</i>
5	FS <i>Trichoderma koningiopsis</i> + FES <i>Fusarium</i> sp.
6	FS <i>Fusarium</i> sp. + FES <i>Fusarium denticulatum</i> e <i>Mucor circinelloides</i>

* FS = Fermentação submersa; FES = Fermentação sólida.

3.6 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

Para avaliar a presença de um *pool* enzimático nos extratos, foram selecionadas as seguintes enzimas: amilase, celulase, lacase, lipase e peroxidase. A escolha dessas enzimas está baseada em estudos anteriores (BORDIN et al., 2018; CAMARGO et al., 2019; REICHERT JÚNIOR et al., 2019) e na possibilidade de que elas possam atuar de forma sinérgica no

biocontrole de plantas daninhas.

Os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicata e sempre contendo um controle reacional, sem a presença dos extratos enzimáticos.

3.6.1 Amilase

A atividade da enzima amilase foi quantificada utilizando como substrato amido solúvel diluído 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 em que se adicionou mais 1 mL dos extratos fermentados. As amostras foram mantidas em banho termostático por 10 minutos em temperatura de 38 °C (FUWA, 1954; PONGSAWASDI; YAGISAWA, 1987). Após decorrido o tempo de reação, a atividade enzimática foi avaliada por meio da liberação de açúcares redutores totais pelo método de DNS (ácido 3,5 dinitrosalissílico) (MILLER, 1959). A absorbância das amostras foi quantificada em espectrofotômetro (UV-M51-Bel, Itália), utilizando o comprimento de onda de 540 nm. Uma unidade da atividade de amilase (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de glicose por minuto nas condições de reação.

3.6.2 Celulase

Para quantificação de celulase total utilizou-se 50 mg de papel filtro Whatman número 1 como fonte de celulose para a enzima, os resultados foram expressos como atividade de celulase do papel filtro (FPase). Em tubos de ensaio contendo 50 mg de papel filtro foram adicionados 2 mL de tampão acetato 0,2 M e pH 5,5 e 1 mL dos extratos fermentados. A reação ocorreu a 50 °C por 1 hora. Após decorrido o tempo de reação, a atividade enzimática foi avaliada por meio da liberação de açúcares redutores totais pelo método de DNS (ácido 3,5 dinitrosalissílico) (MILLER, 1959). A absorbância das amostras foi quantificada em espectrofotômetro (UV-M51-Bel, Itália), utilizando o comprimento de onda de 540 nm. Uma unidade da atividade de FPase (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de glicose por minuto nas condições de reação.

3.6.3 Lacase

Para a determinação da atividade da enzima lacase, utilizou-se 2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolozin-6-sulfônico (ABTS) como o substrato para a reação enzimática. A mistura da reação foi composta por 0,4 mL de ABTS 10 mM, 3,4 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 e 0,2 mL do extrato fermentado. A reação ocorreu em banho termostático a 40 °C por um período de 4 minutos (HOU et al., 2004). A absorbância das amostras foi quantificada em

espectrofotômetro (UV-M51-Bel, Itália), utilizando o comprimento de onda de 420 nm. Uma unidade da atividade de lacase (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de formar 1 μmol de ABTS^+ por minuto nas condições de reação.

3.6.4 Lipase

Para a quantificação dessa enzima utilizou-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 emulsão foi homogeneizada com o auxílio de um mixer. Cada amostra foi composta por 9 mL de emulsão e 1 mL do extrato fermentado. Após, foram submetidas a agitação orbital de 165 rpm por 32 minutos a 35 °C. Posteriormente, em cada amostra foi adicionado 10 mL de solução acetona/etanol (1:1 v/v) para cessar a reação. As amostras foram submetidas ao processo titulométrico utilizando NaOH 0,050 M como titulante até atingir pH 11 (TREICHEL et al., 2015). Para o controle a adição de acetona/etanol foi antecipada da adição do extrato fermentado para garantir que a reação não ocorresse. Para a determinação da atividade lipásica foi utilizada a Equação 1.

$$At = \left(\frac{(V_a - V_b) * M * 1000}{t * V_c} \right) * 1000 \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo que:

V_a = o volume médio de NaOH utilizado na titulação das amostras (mL);

V_b = o volume de NaOH utilizado na titulação do branco reacional (mL);

M = a molaridade do NaOH;

t = o tempo de reação (min.);

V_c = o volume de extrato enzimático bruto utilizado na reação (mL).

Uma unidade de atividade lipásica (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 μmol de substrato por minuto nas condições de reação.

3.6.5 Peroxidase

Para a atividade da enzima peroxidase, o meio reacional foi composto de 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), 1 mL de peróxido de hidrogênio 0,08 % (v/v) e 1 mL dos extratos fermentados. Os tubos de ensaio contendo o meio reacional foram submetidos ao banho termostático por um período de 10 minutos e temperatura de 35 °C. A absorbância das amostras foi quantificada em espectrofotômetro (UV-M51-Bel, Itália), utilizando o comprimento de onda de 470 nm. Uma

unidade da atividade de peroxidase (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de causar incremento da unidade de absorvância em 0,001 por minuto nas condições de reação.

3.7 APLICAÇÃO DOS EXTRATOS EM *Cucumis sativus*

A avaliação preliminar da atividade bioherbicida dos extratos produzidos pelos fungos *Trichoderma koningiopsis*, *Fusarium* sp., *Fusarium denticulatum* e *Mucor circinelloides* por meio de fermentações submersa, sólida e as combinações de extratos foi realizada através da aplicação em *Cucumis sativus*. A escolha pela aplicação e avaliação preliminar nesta espécie deve-se a seu potencial como planta modelo, pois é utilizada em testes com herbicidas químicos (TODERO et al., 2018).

A aplicação dos extratos ocorreu em casa de vegetação com condições controladas de temperatura e umidade (26 °C e 70 %). As sementes foram cultivadas por 10 dias e quando atingiram 3 folhas, aproximadamente 5 mL dos extratos foram aplicados manualmente na superfície foliar da planta com o auxílio de um pincel e em parceria com o Laboratório de Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul - Campus Erechim/RS.

Para os testes de aplicação, foram utilizadas algumas amostras como controle, com o intuito de verificar se apresentariam algum efeito bioherbicida sobre *Cucumis sativus*. O controle A consistiu no meio de cultivo (microalga + água destilada) utilizado nas fermentações submersas, sem a adição dos microrganismos. O controle B consistiu no meio de cultivo (microalga) utilizado nas fermentações sólidas, sem a adição dos microrganismos e após ao processo de extração. O controle C consistiu em um grupo controle, o qual não recebeu nenhum tipo de tratamento, apenas aplicação com água destilada.

A avaliação do potencial bioherbicida dos extratos foi aos 7 e 14 dias após a aplicação. O dano foliar foi visualmente estimado como uma redução percentual do crescimento em comparação aos controles (Controle C) não tratados. O percentual de dano foliar foi estabelecido conforme a escala recomendada pela Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas (SBCPD), apresentada detalhadamente na Tabela 2 (BRAZILIAN WEED SCIENCE SOCIETY, 1995).

Para os ensaios com *Cucumis sativus*, cada tratamento foi composto por 36 plantas e 12 testemunhas (sem tratamento), todos com 4 repetições.

Tabela 2 - Descrição da escala aplicada para as avaliações do potencial bioherbicida dos extratos fermentados, de acordo com a SBCPD.

Percentual (%)	Descrição detalhada
0-20	Nenhum efeito
20-40	Efeito leve e/ou redução do crescimento com recuperação rápida
40-60	Efeito moderado e/ou redução do crescimento com recuperação lenta
60-80	Efeito grave e/ou redução do crescimento não recuperável
80-100	Destruição completa das culturas ou apenas algumas plantas vivas

Fonte: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas (SBCPD), 1995.

3.8 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NOS EXTRATOS FERMENTADOS

A caracterização dos compostos presentes nos extratos fermentados ocorreu por meio da análise dos produtos gerados a partir da extração líquido-líquido dos caldos fermentados via processo submerso e sólido dos fungos: *Trichoderma koningiopsis*, *Fusarium sp.*, *Fusarium denticulatum* e *Mucor circinelloides*. A mistura 6, que apresentou maior potencial bioherbicida, também foi analisada. Além disso, um controle de cada fermentação foi avaliado. Este controle consistiu apenas no meio fermentativo.

Para isso, utilizou-se como solvente orgânico acetato de etila (Et₂O), que na proporção de 1:1 (v/v) foi misturado com os extratos em um funil de separação. A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica foi filtrada e seca com sulfato de amônio. As amostras seguiram para um rotaevaporador (Evaporador Rotativo - Q344B, QUIMIS, Brasil) até que fosse observado a redução do volume da amostra devido a evaporação do solvente orgânico, as condições do processo de evaporação foram: banho a 30 °C e agitação de 120 rpm (sob vácuo).

Os produtos da reação foram identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/MS – QP2010, Shimadzu, Japão), usando a coluna NST 05ms – 3025025 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). A temperatura da coluna seguiu a programação: 80 °C/3 min, 6 °C/min até 218 °C, 2 °C/min até 240 °C, 7 °C/min até 300 °C. O gás de arraste foi hélio (He), a temperatura do injetor e do detector foram ajustadas para 280 °C e 1,0 µL da solução (Derivatização: 1:1:1 (extrato:acetato de etila:BSTFA (*N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida) + TMCS (Trimetilclorossilano) (1%) à 60 °C por 1 h) foi injetada no sistema GC/MS com uma razão split de 1:10. O aparelho operou com um fluxo de 19,1 mL/min no modo de impacto eletrônico de 70 V e com a pressão da coluna em 100 kPa. A identificação dos compostos foi realizada comparando os espectros de massa com aqueles da biblioteca Wiley e por comparação adicional do tempo de retenção de GC de compostos padrão. Os produtos foram parcialmente

quantificados pela porcentagem da área de cada pico em relação à área total do pico (LERIN et al., 2010).

3.9 CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS FERMENTADOS

A mistura que apresentou maior potencial bioherbicida foi submetida a dois processos de redução de volume por meio da retirada da umidade das amostras com o intuito de concentrar os compostos responsáveis pela ação bioherbicida. As duas técnicas utilizadas foram a liofilização e a secagem. As atividades enzimáticas foram verificadas como respostas, com intuito de validar os testes de concentração.

As amostras foram ultracongeladas durante 48 horas e a liofilização ocorreu até que a água fosse totalmente retirada (72 h), utilizando um liofilizador (L101-LIOBRAS, Brasil) acoplado a uma bomba de vácuo, a -55 °C. Já a secagem do bioherbicida fúngico ocorreu em uma estufa com circulação de ar (400-5ND, Ethik Technology, Brasil) até que as amostras atingiram a metade do seu volume inicial. Foram avaliadas diferentes temperaturas de secagem: 40, 60, 80 e 100 °C (TODERO et al., 2020).

3.10 TOXICIDADE DOS EXTRATOS FERMENTADOS

O estudo de toxicidade foi realizado utilizando células meristemáticas de *Allium cepa*, pois são consideradas bioindicadores de monitoramento ambiental devido à alta sensibilidade, ao baixo preço e fácil manuseio.

Os bulbos de *Allium cepa* foram colocados em frascos com água em temperatura ambiente para o enraizamento por 48 h. As raízes foram expostas aos seguintes tratamentos: extratos concentrados (liofilizados e secos), mistura 6, a microalga bruta e um controle (raízes expostas à água destilada), que foram mantidos no escuro por 24 h. Os tratamentos em que se utilizou a microalga bruta foi verificada a necessidade de diluição. Nestes casos, as diluições foram 1:16 e 1:32. Após o período de tratamento, as raízes foram hidrolisadas com HCl (1 mol/L) por 10 min em banho termostático a 60 °C e lavadas com água. Para o preparo das lâminas, foram feitos esfregaços que após a secagem em temperatura ambiente as células foram coradas com o Kit Panótico Rápido®. Posteriormente, as células foram analisadas por microscopia e quantificou-se o Índice Mitótico (IM) segundo a Equação 2. Foram observadas pelo menos 500 células em cada lâmina (DÜSMAN et al., 2014).

$$IM = \frac{\text{número de células em divisão}}{\text{número de células observadas}} \times 100 \quad (\text{Equação 2}).$$

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram tratados estatisticamente através do uso de análise de variância seguida de teste de Tukey, considerando um nível de significância de 95% ($p < 0,05$). Para isso, foi utilizado o software Statistica 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 BIOMASSA DE MICROALGA

As microalgas foram consideradas substratos adequados devido às suas características nutricionais, compostas de $58,90 \pm 1,30$ % de proteínas (proporcional ao teor de nitrogênio), $25,20 \pm 0,90$ % de carboidratos e $3,00 \pm 0,50$ % de lipídios (MICHELON et al., 2016). Já o teor de umidade da biomassa encontrado neste estudo, foi de $88,99 \pm 0,50$ %, valor próximo aos encontrados em outras espécies de microalgas, como *Coccomyxa parasitica*, *Thalassiosira pseudonana* e *Tetraselmis suecica*, com cerca de 80% de teor de umidade (CANCELA et al., 2019).

Os teores nutricionais oferecidos pela biomassa de microalga possibilitaram aos microrganismos condições adequadas para o desenvolvimento e produção de metabólitos de interesse, e a biomassa microalgal resultante do tratamento do digestato da produção de biogás demonstrou potencial para ser utilizada como substrato fermentativo, visando a produção enzimática e extratos com atividade bioherbicida.

4.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

4.2.1 Extratos obtidos por fermentação submersa e sólida

Os resultados de atividade das enzimas amilase, celulase, lacase, lipase e peroxidase obtidas por fermentação submersa estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados da produção enzimática de amilase, celulase, lacase, lipase e peroxidase, presente nos extratos obtidos pela fermentação submersa dos fungos *Trichoderma koningiopsis*, *Fusarium denticulatum* em consórcio com *Mucor circinelloides* e *Fusarium sp.*

Microrganismo	Atividades Enzimáticas FS (U/mL)				
	Amilase	Celulase (FPase)	Lacase	Lipase	Peroxidase
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	$10,29 \pm 0,01^a$	$1,11 \pm 0,01^a$	nd	$0,80 \pm 0,09^a$	$36,03 \pm 0,01^a$
<i>Fusarium denticulatum</i> <i>Mucor circinelloides</i>	$3,43 \pm 0,01^b$	$0,43 \pm 0,01^b$	nd	$1,80 \pm 0,34^b$	$37,15 \pm 0,01^b$
<i>Fusarium sp.</i>	$2,80 \pm 0,01^c$	$0,33 \pm 0,01^c$	nd	nd	$18,63 \pm 0,01^c$

^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) entre os microrganismos fermentadores. Letras iguais não diferem entre si significativamente.

nd: não detectado.

Os microrganismos demonstraram potencial como agentes produtores de um *pool* enzimático via fermentação em estado submerso. A biomassa de microalgas utilizada como

substrato ofereceu um meio de cultivo propício para que os microrganismos pudessem produzir algumas enzimas de interesse no controle biológico de plantas daninhas.

As enzimas hidrolíticas, amilase e celulase, apresentaram menor atividade em comparação às outras enzimas investigadas. A atividade lipásica observada na fermentação realizada pelos fungos associados *Fusarium denticulatum* e *Mucor circinelloides* foi o maior dentre os ensaios realizados por fermentação submersa, com o valor de $1,80 \pm 0,34$ (U/mL), isso provavelmente está relacionado ao fato de o fungo *Mucor circinelloides* ser conhecido por acumular alto conteúdo lipídico em seu metabolismo e, por consequência, ser um potencial produtor de lipases microbianas (KAMOUN et al., 2019).

As atividades peroxidases foram as mais elevadas nos extratos obtidos em fermentação em estado submerso. Estudos anteriores utilizando o fungo *Trichoderma koningiopsis* e espécies do gênero *Fusarium* já demonstravam que estes fungos são bons produtores de peroxidases (BORDIN et al., 2018; REICHERT JÚNIOR et al., 2019). Utilizando os fungos associados *Fusarium denticulatum* e *Mucor circinelloides* atingiu-se uma atividade enzimática de $37,15 \pm 0,01$ (U/mL), a máxima obtida entre os extratos enzimáticos produzidos por fermentação submersa. Esse fato pode estar atrelado à atuação conjunta dos fungos, estabelecendo uma espécie de sinergismo, potencializando a produção enzimática (RODRIGUES et al., 2020).

A produção enzimática referente aos extratos obtidos por fermentação sólida está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados da produção enzimática de amilase, celulase, lacase, lipase e peroxidase, presente nos extratos obtidos pela fermentação sólida dos fungos *Trichoderma koningiopsis*, *Fusarium denticulatum* em consórcio com *Mucor circinelloides* e *Fusarium* sp.

Microrganismo	Atividades Enzimáticas FES (U/mL)				
	Amilase	Celulase (FPase)	Lacase	Lipase	Peroxidase
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	$0,83 \pm 0,06^a$	$0,83 \pm 0,01^a$	nd	nd	$9,25 \pm 0,01^a$
<i>Fusarium denticulatum</i> <i>Mucor circinelloides</i> .	$1,78 \pm 0,05^b$	$1,78 \pm 0,05^b$	nd	Nd	$12,53 \pm 0,01^b$
<i>Fusarium</i> sp.	$2,54 \pm 0,28^c$	$2,54 \pm 0,02^c$	nd	nd	$16,88 \pm 0,01^c$

^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) entre os microrganismos fermentadores. Letras iguais não diferem entre si significativamente.

nd: não detectado.

Dentre os extratos obtidos por fermentação sólida, o extrato fermentado pelo microrganismo *Fusarium* sp. atingiu as maiores concentrações enzimáticas de amilase, celulase e peroxidase, demonstrando que este fungo é um interessante produtor de enzimas nas condições fermentativas que foram disponibilizadas e utilizando biomassa de microalgas como substrato. O metabolismo de espécies do gênero *Fusarium* tem relação com a fonte nutricional utilizada. Quando o seu metabolismo está associado a presença de nitrogênio podem ser detectadas enzimas hidrolíticas, como amilase e celulase. Por outro lado, quando expostos a condições leves de estresse demonstram a capacidade de produzir enzimas oxidativas como as peroxidases (DA ROSA-GARZON et al., 2019).

Os resultados das atividades enzimáticas obtidas por meio dos microrganismos fermentadores *Fusarium denticulatum* associado a *Mucor circinelloides* e o *Fusarium* sp. atingiram maiores valores de atividade frente ao *T. koningiopsis*, dentre elas amilase, celulase e peroxidase. Estes dados estão de acordo com a literatura, na qual foi possível obter a produção de diversas enzimas por meio de outras espécies de *Fusarium*, como *F. oxysporum* demonstrando que esse gênero fúngico se adapta facilmente a diferentes condições fermentativas a que é submetido (PRECZESKI et al., 2020).

Já para a enzima lipase, não se identificou a sua produção via fermentação em estado sólido. Esse fato pode ter relação com a composição do meio de cultivo, visto que, quando têm-se meios fermentativos com a presença de algum óleo, o fungo *Fusarium* sp. torna-se um potencial produtor de lipases microbianas (DE OLIVEIRA et al., 2020). Por outro lado, quando *Fusarium denticulatum* associado a *Mucor circinelloides* foram submetidos a fermentação submersa, produziram lipase, provavelmente porque, durante a produção desta enzima, em ambientes com alto conteúdo de lipídeo e baixa quantidade de água (fermentação em estado sólido), ocorre a formação de micelas reversas à base de fosfolipídios que capturam água, podendo resultar na inativação enzimática. Nesse sentido, quanto maior for o teor de água disponível no substrato, maior será a possibilidade de produção lipásica, talvez por esse motivo, o meio submerso (disponibilidade de água e pouca agitação) tenha sido o mais adequado para estes fungos atingirem a produção de lipase microbiana (AMOAHA et al., 2016; PESSÔA et al., 2017).

Com o fungo *Trichoderma koningiopsis* obteve-se os menores valores de atividade enzimática quando comparados aos outros fungos. Apesar do *T. koningiopsis* apresentar-se de forma versátil, pelo seu desempenho observado em outros estudos, possivelmente esse fungo adapte-se melhor para fermentações submersas (BORDIN et al., 2018; CAMARGO et al., 2019; REICHERT JÚNIOR et al., 2019).

Os extratos obtidos por fermentação submersa e sólida, também foram investigados quanto a produção de lacase, mas nenhum dos fungos testados demonstrou facilidade para produzir esta enzima. Geralmente, as lacases fúngicas são difíceis de serem obtidas, pois necessitam de substratos que contenham indutores químicos como compostos fenólicos, aromáticos ou íons de cobre; isso faz com que a produção de lacase só seja detectada após uma fermentação mais complexa e otimizada (RODRÍGUEZ et al., 2019). Além disso, os fungos testados podem ter produzido formas distintas (isoformas) desta enzima, que talvez pudessem ser detectadas após um processo de purificação enzimática (LI et al., 2018).

Os valores enzimáticos obtidos estão diretamente ligados às quantidades de nitrogênio e de carbono disponibilizados pelo meio de cultivo, e como a biomassa microalgal utilizada possui elevado teor de nitrogênio, algumas enzimas podem não ter sido produzidas por conta de inibição causada por excesso de substrato. Um ponto relevante é que a biomassa de microalgas utilizada como substrato ofereceu um meio de cultivo propício aos microrganismos, estimulando a produção de proteínas de interesse (COSTA et al., 2019).

4.2.2 Combinação dos extratos

Os resultados de atividade das enzimas amilase, celulase, lacase, lipase e peroxidase obtidas por meio da combinação dos extratos via fermentação submersa e sólida estão apresentados na Tabela 5. Essas combinações tiveram o intuito de verificar o comportamento enzimático e atividade bioherbicida após a mistura de extratos obtidos por processos distintos.

Tabela 5- Resultados da produção enzimática de amilase, celulase, lacase, lipase e peroxidase, obtidos por meio da combinação de extratos provenientes das fermentações submersa e sólida dos fungos *Trichoderma koningiopsis*, *Fusarium denticulatum* em consórcio com *Mucor circinelloides* e *Fusarium* sp.

Mistura*	Atividades Enzimáticas (U/mL)				
	Amilase	Celulase (FPase)	Lacase	Lipase	Peroxidase
1	4,74 ± 0,02 ^a	0,30 ± 0,02 ^c	nd	2,08 ± 0,27 ^{a,b}	30,35 ± 0,02 ^a
2	2,10 ± 0,01 ^b	0,17 ± 0,03 ^{a,b}	nd	nd	26,43 ± 0,01 ^b
3	1,25 ± 0,03 ^c	0,21 ± 0,02 ^a	nd	2,35 ± 0,31 ^b	16,75 ± 0,02 ^c
4	7,10 ± 0,01 ^d	0,44 ± 0,02 ^d	nd	nd	39,33 ± 0,01 ^d
5	4,98 ± 0,03 ^e	0,71 ± 0,02 ^e	nd	nd	17,80 ± 0,02 ^e
6	nd	0,21 ± 0,02 ^a	nd	1,60 ± 0,17 ^a	30,37 ± 0,02 ^a

*A combinação dos extratos está detalhada na Tabela 1.

^{a,b,c,d,e} Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey, com nível de confiança de 95% (p<0,05). Letras iguais não diferem entre si significativamente.

nd: não detectado.

A enzima lacase, seguiu a mesma tendência observada nos extratos avaliados individualmente, ou seja, não foi detectada a presença de atividade desta enzima.

A mistura 4 apresentou resultados interessantes quanto a produção enzimática de amilases ($7,10 \pm 0,01$ U/mL) e peroxidases ($39,33 \pm 0,01$ U/mL) e refere-se à combinação do extrato produzido por fermentação submersa de *Trichoderma koningiopsis* + extrato produzido por fermentação sólida de *Fusarium denticulatum* e *Mucor circinelloides*. Os dois extratos combinados demonstraram diferença significativa quanto aos demais testes para a mesma enzima. No extrato produzido pelo fungo *Trichoderma koningiopsis* já era esperada alta atividade de peroxidases, mas a sua combinação com os fungos *Fusarium denticulatum* e *Mucor circinelloides* incrementou essa atividade. Estudos que combinaram *Trichoderma asperellum* e *Mucor circinelloides* observaram que os fungos tiveram uma ação positiva, como bons produtores de enzimas (ZHANG et al., 2018).

A produção lipásica foi detectada nos ensaios 1, 3 e 6, e não apresentaram diferença significativa. Nesse sentido, a mistura 3, que produziu uma maior atividade enzimática ($2,35 \pm 0,31$ U/mL), é composta pelos extratos obtidos pelas fermentações submersa e sólida do fungo *Fusarium* sp, já a mistura 1 foi obtida pelos extratos do fungo *Trichoderma koningiopsis* ($2,08 \pm 0,27$ U/mL). Nestes dois casos, é possível perceber que a combinação dos extratos produziu uma mistura com maior concentração enzimática, o que tornou possível a verificação de atividade. Um extrato combinado é relevante pois oferece uma composição enzimática diferenciada, um *pool* com potencial de atuar por meio de especificidades distintas de forma mais abrangente (ALVES et al., 2020).

As atividades enzimáticas da celulase foram semelhantes aos valores obtidos pelos extratos analisados isoladamente. Para essa enzima, a combinação de extratos não foi uma opção de melhoramento na sua produção. A baixa produção de celulase obtida nos diferentes processos fermentativos, pode estar atrelada à composição da biomassa de microalgas, visto que a fração de carboidratos pode ser formada por polissacarídeos como amido e celulose. O conteúdo (possivelmente baixo) destes polissacarídeos pode limitar a produção das enzimas, já que não se tem certeza da presença destes compostos na biomassa utilizada como substrato (NARESH KUMAR et al., 2020).

Com a combinação de extratos, foi possível observar que a maior parte dos ensaios que obtiveram produção enzimática foram realizadas pela combinação do extrato obtido por fermentação submersa do fungo *Trichoderma koningiopsis* e os fungos em consórcio *Fusarium denticulatum* e *Mucor circinelloides* no extrato produzido por fermentação sólida. Assim, os resultados obtidos demonstram que a combinação de extratos provenientes de diferentes

processos fermentativos é uma alternativa para aumentar a produção de enzimas e obter *pools* com atuação sinérgica.

4.3 ANÁLISE PRELIMINAR DA ATIVIDADE BIOHERBICIDA

4.3.1 Extratos obtidos por fermentação submersa e sólida

A análise preliminar da atividade bioherbicida ocorreu por meio da aplicação dos extratos em *Cucumis sativus*. Na Tabela 6 estão dispostos os valores em percentual de dano foliar observado, 7 e 14 dias após as aplicações, conforme a escala recomendada pela Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas (SBCPD). O valor de pH dos extratos também foi verificado, já que um pH mais ácido poderia ter relação com os danos foliares observados.

Tabela 6 - Resultados da aplicação em *Cucumis sativus* dos extratos obtidos por fermentação submersa e sólida dos fungos *Trichoderma koningiopsis*, *Fusarium denticulatum* em consórcio com *Mucor circinelloides* e *Fusarium* sp.

Microrganismo	Fermentação Submersa		Fermentação Sólida	
	7 dias (%)	14 dias (%)	7 dias (%)	14 dias (%)
Controles A e B	2,00 ± 0,05 ^a	4,00 ± 0,06 ^a	nd	nd
Controle C	nd	nd	nd	nd
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	8,00 ± 2,00 ^b	98,00 ± 0,01 ^b	40,00 ± 3,00 ^a	70,00 ± 3,00 ^a
<i>Fusarium denticulatum</i> <i>Mucor circinelloides</i> .	8,00 ± 1,90 ^b	94,00 ± 6,80 ^b	20,00 ± 2,50 ^b	95,00 ± 1,00 ^b
<i>Fusarium</i> sp.	4,00 ± 0,50 ^c	100,00 ± 0,01 ^b	20,00 ± 2,50 ^b	98,00 ± 3,00 ^b

^{a,b,c}. Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey, com nível de confiança de 95% (p<0,05). Letras iguais não diferem entre si significativamente.

Controle A = meio de cultivo (microalga + água destilada) utilizado nas fermentações submersas, sem a adição dos microrganismos e após ao processo de extração;

Controle B = meio de cultivo (microalga) utilizado nas fermentações sólidas, sem a adição dos microrganismos e após ao processo de extração;

Controle C = grupo controle, o qual não recebeu nenhum tipo de tratamento;

nd: não detectado.

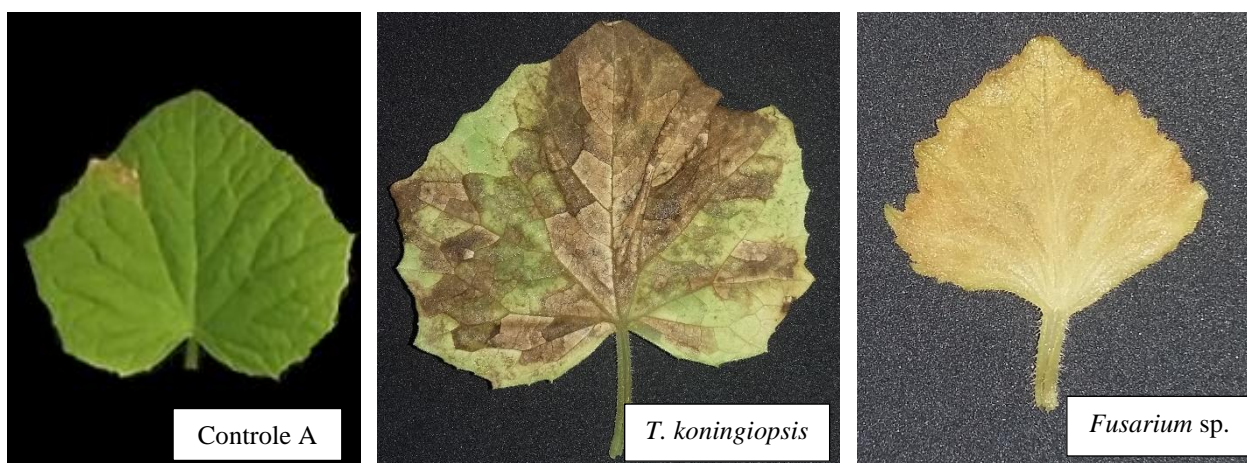
O valor de pH dos extratos variou de 7,00 a 8,71, permanecendo próximo a neutralidade.

O controle A, que se refere ao meio de cultivo da fermentação em estado submerso, apresentou um baixo dano foliar 4,00 ± 0,06 % após 14 dias de aplicação, que pode estar atrelado a um baixo potencial bioherbicida presente na biomassa microalga. Nenhum dano foliar foi observado quanto ao Controle B (meio de cultivo da fermentação em estado sólido). Esses valores podem estar relacionados a uma maior presença de água livre no extrato obtido

por fermentação submersa (Controle A), o que facilitaria a entrada de metabólitos presentes na microalga na superfície foliar, causando um pequeno dano. Além disso, estudos recentes consideram microalgas como potenciais agentes de controle biológico, devido a sua característica de produzir compostos biologicamente ativos, como metabólitos secundários que podem atuar inibindo o crescimento de plantas invasoras (COSTA et al., 2019).

Os extratos produzidos por fermentação submersa apresentaram percentual de dano maior em comparação com os extratos produzidos por fermentação sólida. Utilizando os fungos *Trichoderma koningiopsis* e *Fusarium* sp. obteve-se o controle completo das culturas, com apenas algumas plantas vivas, de acordo com a escala recomendada pela Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas (SBCPD). Esse efeito pode ser visualizado na Figura 2.

Figura 2 – Efeito fitotóxico dos extratos obtidos por fermentação submersa dos fungos *Trichoderma koningiopsis* e *Fusarium* sp. após 14 dias da aplicação em *Cucumis sativus*.



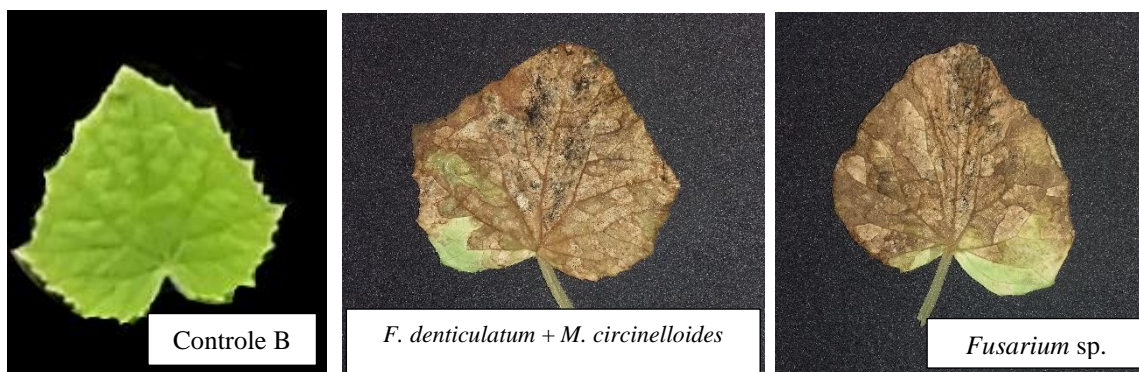
Fonte: Elaboração própria (2021).

O extrato produzido por *T. koningiopsis* apresentou produção da enzima peroxidase em concentrações significativas, essa enzima é uma das responsáveis por eliminar espécies reativas de oxigênio (EROs), que são indicadoras de estresse na planta. Quando aplicado na planta esse extrato rico em peroxidases aumenta a concentração de radicais de superóxido e peróxido de hidrogênio, resultando em danos ao DNA e membranas celulares (RADHAKRISHNAN; ALQARAWI; ABD ALLAH, 2018). Esse efeito pode ser visualizado na Figura 2, em que a aplicação do extrato do *Trichoderma koningiopsis* atuou na inibição do crescimento da planta, causando necroses na superfície foliar.

Diversas espécies de *Fusarium* apresentam características para o controle de plantas invasoras, como *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. tumidum* e *F. ploriferatum*. Esse gênero atua na indução de doenças em plantas, mas principalmente na biossíntese de etileno, estimulando o amadurecimento e amarelando as folhas, como pode ser visualizado na Figura 2, quando se aplicaram extratos de *Fusarium* sp. em *Cucumis sativus* (RADHAKRISHNAN; ALQARAWI; ABD ALLAH, 2018; REICHERT JÚNIOR et al., 2019).

Dentre os extratos produzidos por fermentação sólida, os que foram obtidos pelos fungos *Fusarium denticulatum* em consórcio com *Mucor circinelloides* e *Fusarium* sp. demonstraram maiores níveis de danos foliares, os quais podem ser classificados na escala mais severa (80-100%), conforme recomendação da Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas (SBCPD). Na Figura 3 estão apresentadas as folhas em que foram aplicados o Controle B, referente ao meio de cultivo na fermentação sólida, extrato produzido por *Fusarium denticulatum* em consórcio com *Mucor circinelloides* e o extrato obtido por *Fusarium* sp.

Figura 3 – Efeito fitotóxico dos extratos obtidos por fermentação sólida dos fungos *Fusarium denticulatum* em consórcio com *Mucor circinelloides* e *Fusarium* sp. após 14 dias da aplicação em *Cucumis sativus*.



Fonte: Elaboração própria (2021).

No controle não foi observado nenhum dano foliar. Nas plantas em que foram aplicados os extratos dos fungos *Fusarium denticulatum* em consórcio com *Mucor circinelloides* e *Fusarium* sp. não houve diferença significativa entre os danos causados, possivelmente pela presença do gênero *Fusarium* sp. nos dois extratos. Estes extratos apresentaram uma produção enzimática relevante das enzimas peroxidase, celulase e amilase. Esse fato pode ter relação com os danos causados nas folhas. Dentre as enzimas presentes nos extratos, a celulase é importantíssima pois serviria como porta de entrada do fungo nas estruturas foliares, atuando

na degradação da celulose presente na parede celular de vegetais. Já as peroxidases e amilases podem auxiliar na degradação de outras estruturas foliares (REICHERT JÚNIOR et al., 2019).

Os sintomas causados por estes extratos já foram identificados aos 7 dias após a aplicação em *Cucumis sativus*, diferentemente dos extratos produzidos por fermentação submersa. Esses sintomas podem estar associados a características específicas das enzimas presentes nestes extratos frente aqueles obtidos por fermentação submersa (AITA et al., 2019).

O gênero *Fusarium* sp. é um dos mais estudados visando o biocontrole de plantas invasoras, como gramíneas e plantas daninhas (DANIEL et al., 2018; ALAMRI et al., 2019). No entanto, não foi observado nenhum relato quanto a utilização de *Fusarium denticulatum* na sua forma isolada ou em consórcio microbiano para atuar como agente biológico em bioherbicidas.

4.3.2 Combinação dos extratos

A avaliação preliminar da atividade bioherbicida dos extratos combinados também ocorreu por meio da aplicação dos extratos em *Cucumis sativus*. Na Tabela 7 estão dispostos os valores em percentual de dano foliar observado, 7 e 14 dias após as aplicações, conforme a escala recomendada pela Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas (SBCPD). O valor de pH dos extratos foi verificado e variou de 7,00 a 8,20, permanecendo próximo a neutralidade.

Tabela 7 - Resultados da aplicação em *Cucumis sativus* dos extratos obtidos por meio da combinação de extratos provenientes das fermentações submersa e sólida dos fungos *Trichoderma koningiopsis*, *Fusarium denticulatum* em consórcio com *Mucor circinelloides* e *Fusarium* sp.

Misturas	Fitotoxicidade (%)	
	7 dias	14 dias
Controle	nd	Nd
1	nd	21,00 ± 0,06 ^a
2	8,00 ± 0,01 ^a	11,00 ± 1,00 ^b
3	2,00 ± 0,05 ^b	12,00 ± 0,60 ^b
4	2,00 ± 0,60 ^b	18,00 ± 0,60 ^a
5	4,00 ± 0,60 ^c	7,00 ± 0,60 ^c
6	nd	98,00 ± 3,00 ^d
Microalga bruta	nd	20,00 ± 1,00 ^a

^{a,b,c,d}Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Letras iguais não diferem entre si significativamente.

Controle = grupo controle, o qual não recebeu nenhum tipo de tratamento.

nd: não detectado.

Dentre os extratos combinados, a maioria deles apresentou danos foliares leves (misturas 1, 2, 3, 4 e 5). Nestes casos, possivelmente a combinação dos extratos não foi benéfica em relação a atividade bioherbicida. Além disso, essas combinações envolvem variáveis biológicas (fungos, enzimas, microalga), que podem ter sofrido inibições por conta das suas interações.

O uso da microalga bruta, sem passar pela esterilização em autoclave, apresentou fitotoxicidade de $20,00 \pm 1,00$ %, considerado dano foliar leve e que pode ser atribuído à compostos biologicamente ativos com atividade tóxica produzidos por microalgas e que são indicados para o controle de plantas daninhas, como fenóis, aleloquímicos, óleos, entre outros (COSTA et al., 2019). A aplicação da microalga bruta demonstra que, mesmo que a microalga apresente nível leve de fitotoxicidade, o potencial fitotóxico pode ser ampliado quando ela é utilizada como substrato para produção de bioherbicidas fúngicos. Isto pode ser observado nas atividades bioherbicidas dos extratos aplicados isoladamente (provenientes das fermentações submersa e sólida) e da mistura 6. Assim pode-se afirmar que a microalga isoladamente não tem o mesmo potencial de controle biológico do que quando aplicada em consórcio com os fungos e metabólitos produzidos por eles.

Por meio da aplicação da mistura 6, que se refere à combinação dos extratos obtidos por fermentação submersa do fungo *Fusarium* sp. e o extrato obtido por fermentação sólida do consórcio de fungos *Fusarium denticulatum* e *Mucor circinelloides* (FS *Fusarium* sp. + FES *Fusarium denticulatum* e *Mucor circinelloides*), o dano foliar em *Cucumis sativus* foi considerado severo ($98,00 \pm 3,00$ %). Os resultados da aplicação dos extratos combinados podem ser visualizados na Figura 4.

Figura 4 – Efeito fitotóxico dos extratos obtidos por meio da combinação de extratos provenientes das fermentações submersa e sólida dos fungos *Trichoderma koningiopsis*, *Fusarium denticulatum* em consórcio com *Mucor circinelloides* e *Fusarium* sp.



Fonte: Elaboração própria (2021).

O efeito fitotóxico causado pela mistura 6 provavelmente tem relação com sua composição, que resultou em um extrato atuando de forma sinérgica. O coquetel enzimático presente neste extrato é composto por amilase, celulase, lipase e peroxidase (Tabela 5), sendo que a produção destas enzimas não atingiu as maiores atividades dentre os ensaios observados. Os resultados sugerem que as enzimas formaram um *pool* enzimático equilibrado, o que também foi favorável para outros componentes biológicos envolvidos neste processo, que dessa forma atuaram de maneira sinérgica na planta alvo, causando necroses e a morte celular. Essa

situação de equilíbrio entre as enzimas não é observada nas outras misturas, como a mistura 5 por exemplo, em que há uma alta produção de peroxidase, baixa concentração de amilases e celulases e não foi detectada a presença de lipases. Quando aplicado em *Cucumis sativus*, a mistura 5 não apresentou características para se tornar um potencial bioherbicida, atingindo uma fitotoxicidade de $7,00 \pm 0,60$ %. O efeito observado após aplicação da mistura 6, pode ter relação com alguns metabólitos produzidos por espécies de *Fusarium* sp., que são denominados toxinas emergentes ou Fusariotoxinas, como a moniliformina e a beauvericina. A moniliformina é um sal que apresenta efeito citotóxico, já a beauvericina é um inibidor e induz a fragmentação de DNA (JAJIĆ et al., 2019; CALONI et al., 2020). Estas toxinas podem ter relação com os efeitos observados em *Cucumis sativus*.

Com as combinações dos extratos produzidos por processos fermentativos distintos é possível perceber que as possibilidades de uso e obtenção de um bioherbicida são amplas e que seus efeitos e especificidades serão dependentes de sua fonte biológica. Deste mesmo modo, os diferentes mecanismos de ação envolvidos desde o processo de obtenção dos extratos permitem que a planta alvo seja infectada mais rapidamente e por diferentes vias metabólicas (CORDEAU et al., 2016). Essas podem ter sido as explicações para que os extratos combinados apresentem efeitos fitotóxicos distintos aos extratos aplicados individualmente.

Os fungos do gênero *Fusarium* demonstraram potencial biotecnológico tanto para a produção enzimática como para atividade bioherbicida. Geralmente a produção enzimática de *Fusarium* sp. é relacionada com a sua patogenicidade, pois esse fungo favorece a produção de diversas enzimas hidrolíticas e oxidativas, capazes de degradar a parede celular de plantas. A presença dessas enzimas pode ativar mecanismos de defesa contra o aumento dos níveis de EROs, resultando em indução de doenças e destruição dos tecidos de plantas (SAREMI; ROSTAMI; SAREMI, 2018; DA ROSA-GARZON et al., 2019). Quando a planta está sob uma condição de estresse, seus níveis de prolina são desregulados. Esse aminoácido está relacionado à lignificação da parede celular e à capacidade de influenciar a atividade de peroxidases. A prolina tem a função de manter o fluxo de elétrons entre as membranas celulares, eliminando muitas vezes radicais livres que causam fotoinibição. Neste caso, o aumento de atividade da peroxidases nos tecidos das plantas levaria a uma intoxicação, causando morte celular (ALAMRI et al., 2019).

Além disso, as enzimas produzidas, mesmo que em reduzidas concentrações, podem apresentar especificidade, atuando de forma complexa e sinérgica, enviando sinais de resistência sistêmica e induzindo as plantas a se defenderem com respostas de alterações bioquímicas, que podem afetar o desenvolvimento das plantas (AITA et al., 2019).

Deve-se levar em consideração o fato de que os fungos que demonstraram maior potencial para atividade bioherbicida foram isolados de lagartas, e que suas características como produtores de enzimas e biocontroladores ainda estão em etapas preliminares. Com base nos resultados obtidos, é possível considerar que os fungos isolados de lagarta são robustos, eficientes e extremamente adaptáveis, visto que foram testados em meios de crescimento alternativos, como a biomassa de microalgas. Além disso, deve-se destacar que não foram encontrados estudos nessa mesma linha de pesquisa, combinando extratos obtidos por estes microrganismos isolados e por diferentes processos fermentativos para fins de aplicação bioherbicida.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NOS EXTRATOS FERMENTADOS

Os compostos caracterizados e obtidos pelo processo de extração estão descritos nos Apêndices (A ao I). Cerca de 40 compostos foram identificados no controle da fermentação submersa e 26 no controle da fermentação sólida, já para os extratos fúngicos e para a mistura 6 os valores foram reduzidos entre 21 e 17 compostos identificados. Este fato pode estar relacionado ao processo de fermentação, em que os fungos talvez apresentem a capacidade de sintetizar e/ou assimilar alguns dos compostos (LLAMAS et al., 2020; CHU et al., 2021).

O perfil de compostos presentes nos extratos se refere basicamente a compostos orgânicos. A fração de ácidos graxos presentes nos extratos como, por exemplo, ácido pentanóico, ácido hexanóico, ácido octanóico, ácido linolênico, entre outros, quando aplicados nas plantas de *Cucumis sativus* podem ter atuado na permeabilidade das trocas metabólicas da parede celular, resultando na destruição da membrana e até mesmo alterando processos de fotossíntese (ALAMSJAH et al., 2008). Ácidos graxos podem apresentar efeitos fitotóxicos em plantas daninhas, e por esse motivo são considerados compostos com propriedades alelopáticas, definidas como a condição na qual as plantas apresentam uma vantagem competitiva, e por meio de metabólitos secundários produzidos por microrganismos ou plantas influenciam de forma a estimular ou regular o desenvolvimento de outras plantas ou organismos (WU et al., 2006; LI; AMIST; BAI, 2019).

Já os compostos orgânicos e voláteis podem ser responsáveis por alguns efeitos fitotóxicos em plantas e, neste sentido, tem-se apenas alguns indicativos de possíveis compostos fitotóxicos, como eicosano (PARDO-MURAS et al., 2018) e 2-feniletil (NORSWORTHY; MEEHAN, 2005). Não se tem certeza da atuação de cada um dos compostos identificados, visto que a atividade bioherbicida possivelmente é o resultado das interações entre todas as

fitotoxinas presentes em cada extrato (KHANH et al., 2006; ULLOA-BENÍTEZ et al., 2016), já que novas moléculas de fungos podem apresentar diferentes mecanismos de ação que até mesmo podem ser desconhecidos até o momento (TRIOLET et al., 2019).

Dentre os compostos identificados, o ácido linolênico é um composto que se aplicado em concentrações mais baixas podem estimular o crescimento de plantas. Isso é um ponto positivo para um bioherbicida seletivo, se for possível que a sua formulação reduza o crescimento de plantas invasoras e estimule o desenvolvimento de culturas de interesse agrônômico (MICHALAK; CHOJNACKA, 2015; TUBEILEH; SOUIKANE, 2020; MICHELON et al., 2021). Neste cenário, englobaríamos uma forma mais saudável de produção se comparada as técnicas convencionais, utilizando um produto ao mesmo tempo bioestimulante e bioregulador para plantas.

4.5 CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS FERMENTADOS

Para os testes de concentração utilizou-se apenas a mistura 6, devido ao seu potencial bioherbicida quando aplicada em *Cucumis sativus*. A medida de atividade enzimática da mistura seca em estufa seguiu a mesma metodologia empregada nos testes anteriores, já para a mistura que foi liofilizada diluiu-se 1 g da amostra liofilizada em 100 mL de água destilada. Na Tabela 8 estão apresentados os resultados dos testes de concentração, na qual a mistura 6 refere-se a mistura bruta, sem nenhum tratamento.

Tabela 8 - Resultados da produção enzimática de amilase, celulase, lacase, lipase e peroxidase, obtidos por meio dos testes de concentração enzimática para o extrato proveniente da mistura 6.

Testes	Atividade Enzimática (U/mL)				
	Amilase	FPase	Lacase	Lipase	Peroxidase
Mistura 6 (sem tratamento)	nd	0,21 ± 0,02 ^a	nd	1,60 ± 0,17 ^a	30,37 ± 0,02 ^a
Liofilização	4,45 ± 0,02 ^a	15,07 ± 0,02 ^b	38,85 ± 0,20 ^a	5,85 ± 0,14 ^b	50,95 ± 0,02 ^b
Secagem 40 °C	3,05 ± 0,01 ^b	0,96 ± 0,01 ^c	nd	nd	43,00 ± 0,01 ^c
Secagem 60 °C	5,69 ± 0,01 ^c	1,33 ± 0,20 ^d	nd	nd	43,80 ± 0,01 ^c
Secagem 80 °C	3,69 ± 0,20 ^d	1,11 ± 0,20 ^{c,d}	nd	nd	29,90 ± 0,02 ^d
Secagem 100 °C	3,43 ± 0,20 ^d	1,17 ± 0,20 ^{c,d}	nd	1,35 ± 0,08 ^a	39,05 ± 0,05 ^c

^{a,b,c,d,e} Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey, com nível de confiança de 95% (p<0,05). Letras iguais não diferem entre si significativamente.

nd: não detectado.

Para todas as enzimas analisadas a técnica de liofilização foi a mais promissora no processo de concentração. Este fato pode estar relacionado ao processo de liofilização ocorrer em baixas temperaturas e pressão, fazendo com que os cristais de gelo da amostra sublimem, o que é benéfico para as enzimas que são sensíveis ao calor (UNTERLANDER; CHAMPAGNE; PLAXTON, 2017). Além disso, as amostras liofilizadas podem apresentar maior estabilidade e possibilidade de armazenamento prolongado, visto que a disponibilidade de água é reduzida. Além disso, as amostras liofilizadas poderiam ser mantidas e até mesmo transportadas em temperatura ambiente, fatores também positivos para a comercialização de um produto (GRZEGORCZYK et al., 2018).

Dentre as temperaturas de evaporação testadas para a mistura 6, a de 60 °C resultou em maior atividade para as enzimas amilase, celulase e peroxidase (valores superiores se comparados a mistura 6 bruta). Este resultado pode ser atribuído à uma ativação enzimática na qual a temperatura utilizada pode ter estabilizado estruturas conformacionais da enzima, alterando até mesmo seus sítios ativos e resultando em uma concentração de enzimas ativas. A temperatura também pode afetar as forças de interações hidrofóbicas no meio, e as enzimas são moléculas que dependem destas interações. Assim sendo, a atividade catalítica também sofre transições conforme a temperatura aplicada. Deve-se levar em consideração que a adaptação das enzimas a diferentes temperaturas também pode estar relacionada à sua origem, neste caso, à adaptação microbiana e às condições em que tais enzimas foram obtidas, conferindo-lhes características únicas de ação (DANIEL et al., 2008; TODERO et al., 2020).

O efeito da temperatura na atividade enzimática é dependente de estabilidade térmica da enzima, da duração de exposição e da temperatura aplicada. Neste estudo, utilizando a temperatura de 100 °C observa-se uma diminuição da atividade enzimática se comparada com a temperatura de 60 °C. Isto pode ser explicado pela inativação enzimática, devido à alta temperatura. Por outro lado, quando o extrato foi exposto à 100 °C detectou-se produção enzimática, mesmo em alta temperatura, sendo assim, pode ter ocorrido apenas a inativação de algumas enzimas, pensando no extrato como um todo isto gera a ideia de uma menor atividade (DANIEL et al., 2008).

4.6 TOXIDADE DOS EXTRATOS FERMENTADOS

Dentre todas as amostras avaliadas, a microalga diluída foi a que apresentou maior toxicidade, enquanto as amostras que foram fermentadas, liofilizadas ou evaporadas demonstraram Índices Mitóticos (IM) mais reduzidos. Na Tabela 9 estão os resultados dos IM.

Tabela 9 – Resultado dos Índices Mitóticos (IM) em meristemas apicais de *Allium cepa* para as amostras brutas e diluídas de microalgas, Mistura 6 e dos testes de concentração enzimática.

Testes	Índice Mitótico (IM) (%)
Controle	2,61 ± 0,05 ^a
Microalga bruta*	-
Microalga (1:32)	15,40 ± 0,03 ^b
Mistura 6*	-
Mistura 6 (1:16)	7,00 ± 0,02 ^c
Liofilizada (1:16)	2,80 ± 0,19 ^a
Secagem 40 °C	3,20 ± 0,01 ^d
Secagem 60 °C	2,22 ± 0,01 ^e
Secagem 80 °C	5,69 ± 0,20 ^f
Secagem 100 °C	5,43 ± 0,20 ^f

^{a,b,c,d,e,f} Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Letras iguais não diferem entre si significativamente.

* Não foi possível visualizar as células. Por esse motivo as amostras foram diluídas para que pudessem ser calculados os IM.

Os dados de citotoxicidade indicaram que as amostras avaliadas apresentam uma baixa toxicidade. É importante considerar que em nenhuma amostra observou-se a ocorrência de alterações cromossômicas, como formação de micronúcleos ou danos ao material genético; apenas foi observado uma maior frequência de divisões celulares na amostra que foi exposta a microalga diluída (DÜSMAN et al., 2014; KLANOVICZ et al., 2020).

Considerando que as amostras avaliadas quanto à toxicidade poderão ser aplicadas como bioherbicida é possível que apresentem baixo potencial de contaminação do solo e de recursos hídricos. Essa seria uma condição relevante para um bioherbicida, avaliando que se fossem aplicados a campo estariam expostos à chuva e à irrigação e sofreriam uma pequena diluição até atingir o solo e recursos hídricos (CAMARGO et al., 2020). Assim, estes resultados demonstram aspectos positivos frente à produção de bioherbicida seguro ambientalmente.

5 CONCLUSÃO

A biomassa de microalgas pode ser considerada um meio de cultivo alternativo aos sintéticos para fins fermentativos, rico em nutrientes e com valor agregado, levando em consideração o seu processo de obtenção e reciclo.

Os fungos utilizados neste estudo destacam a relevância de pesquisas na área de bioprospecção de novas cepas microbianas com potencial biotecnológico. Os microrganismos demonstraram características pertinentes, como bons produtores de enzimas e facilidade em se adaptar a diferentes condições fermentativas e substrato alternativo. Nenhum dos fungos se sobressaiu dentre os testes realizados. No entanto, quando utilizados em consórcio obteve-se resultados mais promissores. A produção enzimática a partir das cepas fúngicas em conjunto com a biomassa de microalgas ofereceram as condições adequadas para obter um coquetel enzimático para fins bioherbicidas.

Por meio dos testes preliminares realizados em *Cucumis sativus*, pode-se inferir que as cepas microbianas são potenciais agentes de controle biológico. Estudos ainda precisam ser delineados frente ao impacto da permanência destes bioherbicidas no solo e qual o período de sobrevivência dos resíduos da aplicação destes extratos no ambiente, além da adaptação destas aplicações a campo.

Os testes de concentração demonstram-se promissores para o incremento da atividade enzimática, principalmente quando o extrato foi liofilizado, esta pode ser uma alternativa para solucionar a questão de bioherbicidas oferecerem atividade reduzida devido às baixas concentrações de fitotoxinas responsáveis por causar os efeitos tóxicos nas plantas alvo.

Com a caracterização dos extratos foi possível obter informações significativas sobre os extratos fermentados, identificar alguns compostos e associar seus prováveis efeitos de fitotoxicidade para melhor compreender os mecanismos de ação envolvidos na atividade bioherbicida final.

Por fim, alguns dos desafios envolvidos em tornar cepas selvagens bem-sucedidas em um bioprocessamento viável foram superados. Resultados de baixa toxicidade dos extratos sugerem que os bioherbicidas apresentam a possibilidade de aplicação em escala real em um futuro próximo, isto porque o baixo potencial de contaminação em conjunto com as condições benéficas ao controle de plantas daninhas fará com que o uso destes bioherbicidas apresente viabilidade e segurança alimentar e ambiental, além de oferecer à agricultores e cientistas ferramentas para controlar plantas invasoras de forma inovadora e mais sustentável.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Durante o desenvolvimento do estudo foi possível identificar alguns gargalos e desafios, que surgem como oportunidade de novas descobertas científicas por meio da pesquisa. Dessa forma, seguem algumas sugestões para trabalhos futuros:

- Produtos microbianos têm sido utilizados há anos na agricultura, mas recentemente receberam mais atenção devido aos impactos negativos do uso restrito de produtos químicos. Neste sentido, para que estes bioherbicidas possam ser comercializadas em grande escala é preciso estudar uma formulação que atenda as necessidades de produtores, seja eficaz, versátil os requisitos de entrega e comercialização, impulsionando o interesse pelo consumo de produtos biológicos. Para isso, indústrias ou *startups* precisarão investir em pesquisas de desenvolvimento de processos e produtos biológicos, o que também exigirá parcerias entre organizações públicas e privadas.
- Avaliar se a formulação do bioherbicida manterá sua eficácia mesmo armazenada em condições adversas como, alta temperatura, umidade e exposição à luz. Neste caso, produtos desidratados são mais baratos, fáceis de transportar e têm menor probabilidade de contaminação.
- Aspectos como a seletividade do bioherbicida, permanência no ambiente, local (semente, folha ou raiz) e tempo de aplicação precisam ser avaliados, visto que os produtos biológicos têm uma ação mais lenta, muitas vezes controlando as plantas invasoras pela supressão e não necessariamente causando a morte, isso pode abrir brechas para danos à cultura. Por isso, pesquisadores e produtores precisam conhecer o ciclo de vida da planta alvo, assim será mais garantido que a aplicação do produto ocorrerá nas condições e no tempo certo.
- A formulação do bioherbicida deve levar em consideração a aplicação do produto, pois precisa ser compatível com os equipamentos disponíveis no mercado e utilizados pelos agricultores.

REFERÊNCIAS

- ABPA. **Associação Brasileira de Proteína Animal - Relatório anual (2018)**. São Paulo: 2019. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2018.pdf>>. Acesso em: 10 de jan. de 2021.
- ADETUNJI, C. O. et al. Isolation, structural elucidation and bioherbicidal activity of an eco-friendly bioactive 2-(hydroxymethyl) phenol, from *Pseudomonas aeruginosa* (C1501) and its ecotoxicological evaluation on soil. **Environmental Technology & Innovation**, v. 13, p. 304–317, 2019.
- AITA, B. C. et al. Production of cell-wall degrading enzymes by solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, p. 103193, 2019.
- ALAMRI, S. A. M. et al. Biological control of root rot in lettuce caused by *Exserohilum rostratum* and *Fusarium oxysporum* via induction of the defense mechanism. **Biological Control**, v. 128, p. 76–84, 2019.
- ALAMSJAH, M. A. et al. Algicidal activity of polyunsaturated fatty acids derived from *Ulva fasciata* and *U. pertusa* (Ulvaceae, Chlorophyta) on phytoplankton. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, p. 713–720, 2008.
- ALVES, E. A. et al. Process development to obtain a cocktail containing cell-wall degrading enzymes with insecticidal activity from *Beauveria bassiana*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 156, p. 107484, 2020.
- AMOAHA, J. et al. Converting oils high in phospholipids to biodiesel using immobilized *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalysts expressing *Fusarium heterosporum* lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 105, p. 10–15, 2016.
- ASH, G. J. The science, art and business of successful bioherbicides. **Biological Control**, v. 52, p. 230–240, 2010
- BORDIN, E. R. et al. 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.
- BORDIN, E. R. et al. Current production of bioherbicides: mechanisms of action and technical and scientific challenges to improve food and environmental security. **Biocatalysis and Biotransformation**, p. 1–14, 2020.
- BRAZILIAN WEED SCIENCE SOCIETY. **Procedures for Installation, Evaluation and Analysis of Experiments with Herbicides**. 1995.
- CALONI, F. et al. Beauvericin: The beauty and the beast. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 75, p. 103349, 2020.
- CAMARGO, A. F. et al. Resistant weeds were controlled by the combined use of herbicides and bioherbicides. **Environmental Quality Management**, v. 29, p. 37–42, 2019.
- CAMARGO, A. F. et al. A Low-Genotoxicity Bioherbicide Obtained from *Trichoderma koningiopsis* Fermentation in a Stirred-Tank Bioreactor. **Industrial Biotechnology**, v. 16, p. 176–181, 2020.

- CANCELA, Á. et al. Microalgae cultivation and harvesting for bioenergy production. **Bioresource Technology Reports**, v. 8, p. 100333, 2019.
- CHU, R. et al. A review on co-cultivation of microalgae with filamentous fungi: Efficient harvesting, wastewater treatment and biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 139, p. 110689, 2021.
- CORDEAU, S. et al. Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. **Crop Protection**, v. 87, p. 44–49, 2016.
- COSTA, J. A. V. et al. Potential of microalgae as biopesticides to contribute to sustainable agriculture and environmental development. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 54, p. 366–375, 2019.
- DA ROSA-GARZON, N. G. et al. *Fusarium oxysporum* cultured with complex nitrogen sources can degrade agricultural residues: Evidence from analysis of secreted enzymes and intracellular proteome. **Renewable Energy**, v. 133, p. 941–950, 2019.
- DANIEL, J. J. et al. *Fusarium fujikuroi*: A novel source of metabolites with herbicidal activity. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 314–320, 2018.
- DANIEL, R. M. et al. The effect of temperature on enzyme activity: new insights and their implications. **Extremophiles**, v. 12, p. 51–59, 13 jan. 2008.
- DE ALMEIDA, T. C. et al. Development of a solid bioherbicide formulation by spray drying technology. **Agriculture (Switzerland)**, v. 10, p. 1–11, 2020.
- DE OLIVEIRA, B. H. et al. Biocatalytic benefits of immobilized *Fusarium* sp. (GFC) lipase from solid state fermentation on free lipase from submerged fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 147, p. 112235, 2020.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11–15, 1897.
- DÜSMAN, E. et al. *Allium cepa* L. as a bioindicator to measure cytotoxicity of surface water of the Quatorze River, located in Francisco Beltrão, Paraná, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, p. 1793–1800, 2014.
- FUWA, H. A new method for microdetermination modified method of that described by McCready. **The Journal of Biochemistry**, v. 41, p. 583–603, 1954.
- GRZEGORCZYK, M. et al. The effect of lyophilization and storage time on the survival rate and hydrolytic activity of *Trichoderma* strains. **Folia Microbiologica**, v. 63, p. 433–441, 2018.
- HOU, H. et al. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1415–1419, 2004.
- JAJIĆ, I. et al. Emerging fusarium mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin in serbian maize. **Toxins**, v. 11, p. 1–14, 2019.
- KAMOUN, O. et al. Suitable carbon sources selection and ranking for biodiesel production by oleaginous *Mucor circinelloides* using multi-criteria analysis approach. **Fuel**, v. 257, p. 116117, 2019.
- KHANH, T. D. et al. Weed suppression by *Passiflora edulis* and its potential allelochemicals.

Weed Research, v. 46, p. 296–303, 2006.

KLANOVICZ, N. et al. 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.

LERIN, ET AL. Microorganisms screening for limonene oxidation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 399–405, 2010.

LI, Z.R; AMIST, N; BAI, L. Allelopathy in sustainable weeds management. **Allelopathy Journal**, v. 48, p. 109–138, 2019.

LI, W. et al. Rational design for fungal laccase production in the model host *Aspergillus nidulans*. **Science China Life Sciences**, v. 62, p. 84–94, 2018.

LLAMAS, M. et al. Microalgae-based anaerobic fermentation as a promising technology for producing biogas and microbial oils. **Energy**, v. 206, p. 118184, 2020.

MEHDIZADEH, M.; MUSHTAQ, W. Biological Control of Weeds by Allelopathic Compounds From Different Plants: A BioHerbicide Approach. In: **Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control**. Elsevier Inc., 2020. p. 107–117.

MICHALAK, I.; CHOJNACKA, K. Algae as production systems of bioactive compounds. **Engineering in Life Sciences**, v. 15, p. 160–176, 2015.

MICHELON, W. et al. 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.

MICHELON, W. et al. Amino acids, fatty acids, and peptides in microalgae biomass harvested from phycoremediation of swine wastewaters. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2021. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01263-2>

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426–428, 1959.

NARESH KUMAR, A. et al. Deoiled algal biomass derived renewable sugars for bioethanol and biopolymer production in biorefinery framework. **Bioresource Technology**, v. 296, p. 122315, 2020.

NORSWORTHY, J. K.; MEEHAN, J. T. Use of isothiocyanates for suppression of Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*), pitted morningglory (*Ipomoea lacunosa*), and yellow nutsedge (*Cyperus esculentus*). **Weed Science**, v. 53, p. 884–890, 2005.

PARDO-MURAS, M. et al. On the bioherbicide potential of *Ulex europaeus* and *Cytisus scoparius*: Profiles of volatile organic compounds and their phytotoxic effects. **PLOS ONE**, v. 13, p. e0205997, 2018.

PESSÔA, M. G. et al. *Fusarium* species—a promising tool box for industrial biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, p. 3493–3511, 2017.

PONGSAWASDI, P.; YAGISAWA, M. Screening and Identification of a Cyclomaltodextrin Glucanotransferase-Producing Bacteria. **Journal of Fermentation Technology**, v. 65, p. 463–467, 1987.

PRECZESKI, K. P. et al. *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus* sp. as Keratinase Producers Using Swine Hair From Agroindustrial Residues. **Frontiers in Bioengineering and**

Biotechnology v. 8, p. 1–8, 2020.

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.

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

RODRIGUES, P. DE O. et al. Lignocellulose-degrading enzymes production by solid-state fermentation through fungal consortium among Ascomycetes and Basidiomycetes. **Renewable Energy**, v. 145, p. 2683-2693, 2020.

RODRÍGUEZ, R. D. et al. Enhancing laccase production by white-rot fungus *Funalia floccosa* LPSC 232 in co-culture with *Penicillium commune* GHAIE86. **Folia Microbiologica**, v. 64, p. 91–99, 2019.

SAREMI, H.; ROSTAMI, A.; SAREMI, H. *Fusarium oxysporum* a possible agent for biological control of *Papaver somniferum* in the Middle East. **Crop Protection**, v. 114, p. 187–194, 2018.

SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical Biochemistry**, v. 354, p. 311–313, 2006.

SINDHU, S. S. et al. Bioherbicidal Potential of Rhizosphere Microorganisms for Ecofriendly Weed Management. In: **Role of Rhizospheric Microbes in Soil**. Singapore: Springer Singapore, 2018. p. 331–376.

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

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

TREICHEL, H. et al. Lipase Production from a Newly Isolated *Aspergillus niger* by Solid State Fermentation Using Canola Cake as Substrate. **Current Biotechnology**, v. 6, 2015.

TRIOLET, M. et al. Fungal-based bioherbicides for weed control : a myth or a reality ? **Weed Research**, v. 60, , p. 60–77, 2019.

TUBEILEH, A. M.; SOUIKANE, R. T. Effect of olive vegetation water and compost extracts on seed germination of four weed species. **Current Plant Biology**, v. 22, p. 100150, 2020.

ULLOA-BENÍTEZ, Á. et al. Phytotoxic and antimicrobial activity of volatile and semi-volatile organic compounds from the endophyte *Hypoxylon anthochroum* strain Blaci isolated from *Bursera lancifolia* (Burseraceae). **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, p. 380–400, 2016.

UNTERLANDER, N.; CHAMPAGNE, P.; PLAXTON, W. C. Lyophilization pretreatment facilitates extraction of soluble proteins and active enzymes from the oil-accumulating microalga *Chlorella vulgaris*. **Algal Research**, v. 25, p. 439–444, 2017.

VERMA, D. et al. Microbial Control of Pests and Weeds. In: **Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control**. Elsevier Inc., 2020. p. 119–126.

WHITE, T.J., BRUNS, T., TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal

ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS M.A., D.H. GELFAND, J.J. SNINSKY, AND T. J. W. (Ed.). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. Academic Press.1989, p. 315–322.

WU, J.-T. et al. Cytotoxic effects of free fatty acids on phytoplankton algae and cyanobacteria. **Aquatic Toxicology**, v. 80, p. 338–345, dez. 2006.

ZHANG, X. et al. Ecotoxicology and Environmental Safety Biochemical mechanism of phytoremediation process of lead and cadmium pollution with *Mucor circinelloides* and *Trichoderma asperellum*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 157, p. 21–28, 2018.

**APÊNDICE A – COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO EXTRATO CONTROLE DA
FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM GC-MS.**

Tabela 10 – Compostos identificados no extrato etanólico derivatizado do controle da fermentação submersa em GC-MS.

Nº	RT (Min.)	Compound name	Quality (%)	% of total	Molecular Formula	Mol Wt
1	3.22	2,4,4-Trimethyl-1 pentanol	80	0.24	C8H18O	130
2	3.37	2-Penten-1-ol	92	0.51	C8H18OSi	158
3	3.49	Butanoic acid, 2-methyl	93	1.36	C8H18O2Si	174
4	3.64	Butanoic acid, 3-methyl	96	1.66	C8H18O2Si	174
5	4.01	Ethylamine	77	0.51	C8H23NSi2	189
6	4.17	Heptane, 2,2,4-trimethyl	83	0.21	C10H22	142
7	4.30	Ethylene glycol	90	4.16	C8H22O2Si2	206
8	4.43	Pentanoic acid	94	0.34	C8H18O2Si	174
9	5.73	Propane-1,2-diol	93	2.27	C9H24O2Si2	220
10	5.85	cis-2-Hexen-1-ol	79	0.87	C9H20OSi	172
11	5.94	Butane, 2,3-dihydroxy	97	2.74	C10H26O2Si	234
12	6.22	1,3 Propanediol	95	1.14	C9H24O2Si2	220
13	6.33	Propanoic acid, 2- hydroxy	96	10.76	C9H22O3Si2	234
14	6.50	Hexanoic acid	96	1.16	C9H20O2Si	188
15	10.30	2-phenylethyl	94	3.77	C11H18OSi	194
16	10.76	Pentanoic acid, 4-methyl- 2-hydroxy	78	0.29	C12H28O3Si	276
17	10.91	Diethylene glycol	88	0.26	C10H26O3Si	250
18	11.27	Octanoic acid	90	0.44	C11H24O2Si	216
19	11.38	3-Acetoxybutyric acid	78	1.28	C9H18O4Si	218
20	11.66	Dodecane, 4,6-dimethyl	92	0.26	C14H30	198
21	11.86	Glycerol	95	3.17	C12H32O3Si	308
22	12.74	Nonanoic acid	86	2.43	C12H26O2Si	230

23	13.18	Pyrimidine, 2,4-dihydroxy	94	3.73	C ₁₀ H ₂₀ N ₂ O	256
24	14.69	Pyrimidine, 5-methyl-2,4-dihydroxy	93	2.03	C ₁₁ H ₂₂ N ₂ O	270
25	16.66	Tetradecane	93	0.93	C ₁₄ H ₃₀	198
26	17.62	Hexadecane	91	0.45	C ₁₆ H ₃₄	226
27	17.76	1,3-Benzoxazol-2-amine	78	1.13	C ₁₃ H ₂₂ N ₂ O	278
28	17.82	Dodecanoic acid, 2,3-bis(acetyloxy)propyl ester	73	0.32	C ₁₉ H ₃₄ O ₆	358
29	18.34	4-Hydroxyphenylethanol	87	0.47	C ₁₄ H ₂₆ O ₂ Si	282
30	20.11	3-hydroxy stearic acid	79	1.36	C ₂₄ H ₅₂ O ₃ Si	444
31	21.06	Heptadecane	92	0.69	C ₁₇ H ₃₆	240
32	23.88	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	88	0.84	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278
33	24.86	7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione	85	0.91	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	276
34	25.00	Eicosane	92	0.51	C ₂₀ H ₄₂	282
35	26.68	alpha.-Linolenic acid	88	3.79	C ₂₁ H ₃₈ O ₂ Si	350
36	27.10	Hexadecanoic acid	94	22.91	C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si	328
37	30.70	17-Octadecynoic acid	72	1.64	C ₂₁ H ₄₀ O ₂ Si	352
38	31.12	Octadecanoic acid	86	14.93	C ₂₁ H ₄₄ O ₂ Si	356
39	39.92	Hexadecanoic acid, 2,3-dihydroxy propyl ester	90	1.57	C ₂₅ H ₅₄ O ₄ Si	474
40	43.26	Octadecanoic acid, 2,3-dihydroxy propyl ester	91	1.96	C ₂₇ H ₅₈ O ₄ Si	502

APÊNDICE B – COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO EXTRATO DE *Trichoderma koningiopsis* DA FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM GC-MS.

Tabela 11 - Compostos identificados no extrato etanólico derivatizado do *Trichoderma koningiopsis* da fermentação submersa em GC-MS.

Nº	RT (Min.)	Compound name	Quality (%)	% of total	Molecular Formula	Mol Wt
1	4.17	Heptane, 2,2,4-trimethyl	86	0.81	C10H22	142
2	6.33	Propanoic acid, 2-hydroxy	96	5.91	C9H22O3Si2	234
3	16.66	Tetradecane	93	1.64	C14H30	198
4	21.06	Heptadecane	94	1.29	C17H36	240
5	23.88	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	90	3.13	C16H22O4	278
6	24.86	7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione	89	2.20	C17H24O3	276
7	25.00	Eicosane	93	1.11	C20H42	282
8	27.10	Hexadecanoic acid	88	41.65	C19H40O2Si	328
9	29.67	3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	87	1.14	C23H48OSi	368
10	30.70	17-Octadecynoic acid	72	1.54	C21H40O2Si	352
11	31.12	Octadecanoic acid	92	31.66	C21H44O2Si	356
12	39.92	Hexadecanoic acid, 2,3-dihydroxy propyl ester	92	2.70	C25H54O4Si	474
13	42.72	2-Monopalmitin	80	1.99	C25H54O4Si2	474
14	43.26	Octadecanoic acid, 2,3-dihydroxy propyl ester	92	3.23	C27H58O4Si	502

**APÊNDICE C – COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO EXTRATO DE *Fusarium* sp.
DA FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM GC-MS.**

Tabela 12 - Compostos identificados no extrato etanólico derivatizado do *Fusarium* sp. da fermentação submersa em GC-MS.

Nº	RT (Min.)	Compound name	Quality (%)	% of total	Molecular Formula	Mol Wt
1	4.01	Ethylamine	81	1.60	C ₈ H ₂₃ NSi ₂	189
2	4.17	Heptane, 2,2,4-trimethyl	82	0.35	C ₁₀ H ₂₂	142
3	4.30	Ethylene glycol	90	10.15	C ₈ H ₂₂ O ₂ Si ₂	206
4	6.22	1,3 Propanediol	89	0.42	C ₉ H ₂₄ O ₂ Si ₂	220
5	6.33	Propanoic acid, 2-hydroxy	95	6.16	C ₉ H ₂₂ O ₃ Si ₂	234
6	11.38	3-Acetoxybutyric acid	77	0.66	C ₉ H ₁₈ O ₄ Si	218
7	11.66	Dodecane, 4,6-dimethyl	92	0.47	C ₁₄ H ₃₀	198
8	11.86	Glycerol	95	3.30	C ₁₂ H ₃₂ O ₃ Si	308
9	16.66	Tetradecane	93	1.50	C ₁₄ H ₃₀	198
10	17.62	Hexadecane	92	0.65	C ₁₆ H ₃₄	226
11	17.76	1,3-Benzoxazol-2-amine	77	1.69	C ₁₃ H ₂₂ N ₂ O	278
12	21.06	Heptadecane	93	1.32	C ₁₇ H ₃₆	240
13	23.88	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	91	2.19	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278
14	24.86	7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione	79	1.04	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	276
15	25.00	Eicosane	91	0.94	C ₂₀ H ₄₂	282
16	27.10	Hexadecanoic acid	95	35.36	C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si	328
17	30.70	17-Octadecynoic acid	72	2.35	C ₂₁ H ₄₀ O ₂ Si	352
18	31.12	Octadecanoic acid	93	22.60	C ₂₁ H ₄₄ O ₂ Si	356
19	39.92	Hexadecanoic acid, 2,3-dihydroxy propyl ester	91	2.79	C ₂₅ H ₅₄ O ₄ Si	474
20	42.72	2-Monopalmitin	83	1.18	C ₂₅ H ₅₄ O ₄ Si ₂	474

21	43.26	Octadecanoic acid, 2,3-dihydroxy propyl ester	91	3.27	C ₂₇ H ₅₈ O ₄ Si	502
----	-------	---	----	------	---	-----

APÊNDICE D – COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO EXTRATO DE *Fusarium denticulatum* EM CONSÓRCIO COM *Mucor circinelloides* DA FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM GC-MS.

Tabela 13 - Compostos identificados no extrato etanólico derivatizado do *Fusarium denticulatum* em consórcio com *Mucor circinelloides* da fermentação submersa em GC-MS.

Nº	RT (Min.)	Compound name	Quality (%)	% of total	Molecular Formula	Mol Wt
1	4.30	Ethylene glycol	86	36.98	C8H22O2Si2	206
2	6.33	Propanoic acid, 2-hydroxy	96	4.49	C9H22O3Si2	234
3	11.38	3-Acetoxybutyric acid	76	1.13	C9H18O4Si	218
4	11.66	Dodecane, 4,6-dimethyl	93	0.49	C14H30	198
5	11.86	Glycerol	94	2.13	C12H32O3Si	308
6	16.66	Tetradecane	91	1.46	C14H30	198
7	17.62	Hexadecane	90	0.61	C16H34	226
8	17.76	1,3-Benzoxazol-2-amine	77	1.72	C13H22N2O	278
9	21.06	Heptadecane	94	1.27	C17H36	240
10	23.88	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	90	1.72	C16H22O4	278
11	24.86	7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione	79	0.86	C17H24O3	276
12	25.00	Eicosane	89	0.96	C20H42	282
13	27.10	Hexadecanoic acid	95	24.60	C19H40O2Si	328
14	30.70	17-Octadecynoic acid	72	2.67	C21H40O2Si	352
15	31.12	Octadecanoic acid	93	12.74	C21H44O2Si	356
16	39.92	Hexadecanoic acid, 2,3-dihydroxy propyl ester	91	2.61	C25H54O4Si	474
17	43.26	Octadecanoic acid, 2,3-dihydroxy propyl ester	92	3.56	C27H58O4Si	502

APÊNDICE E – COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO EXTRATO CONTROLE DA FERMENTAÇÃO SÓLIDA EM GC-MS.

Tabela 14 - Compostos identificados no extrato etanólico derivatizado do controle da fermentação sólida em GC-MS.

Nº	RT (Min.)	Compound name	Quality (%)	% of total	Molecular Formula	Mol Wt
1	3.49	Butanoic acid, 2-methyl	92	0.85	C8H18O2Si	174
2	3.64	Butanoic acid, 3-methyl	94	0.92	C8H18O2Si	174
3	4.30	Ethylene glycol	89	26.96	C8H22O2Si2	206
4	5.85	cis-2-Hexen-1-ol	80	2.05	C9H20OSi	172
5	5.94	Butane, 2,3-dihydroxy	93	0.52	C10H26O2Si	234
6	6.22	1,3 Propanediol	92	0.82	C9H24O2Si2	220
7	6.33	Propanoic acid, 2-hydroxy	95	4.71	C9H22O3Si2	234
8	6.50	Hexanoic acid	93	0.55	C9H20O2Si	188
9	7.38	2-ethyl-1-decanol	82	0.62	C15H34OSi	258
10	10.30	2-phenylethyl	94	1.42	C11H18OSi	194
11	11.38	3-Acetoxybutyric acid	77	1.45	C9H18O4Si	218
12	11.86	Glycerol	94	2.54	C12H32O3Si	308
13	12.74	Nonanoic acid	85	1.77	C12H26O2Si	230
14	13.18	Pyrimidine, 2,4-dihydroxy	94	3.64	C10H20N2O	256
15	14.69	Pyrimidine, 5-methyl-2,4-dihydroxy	91	1.54	C11H22N2O	270
16	16.66	Tetradecane	92	1.37	C14H30	198
17	17.76	1,3-Benzoxazol-2-amine	77	1.35	C13H22N2O	278
18	21.06	Heptadecane	94	1.17	C17H36	240
19	23.88	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	91	1.57	C16H22O4	278

20	24.86	7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione	82	1.07	C17H24O3	276
21	25.00	Eicosane	91	0.80	C20H42	282
22	27.10	Hexadecanoic acid	95	20.22	C19H40O2Si	328
23	30.70	17-Octadecynoic acid	72	3.47	C21H40O2Si	352
24	31.12	Octadecanoic acid	91	12.18	C21H44O2Si	356
25	39.92	Hexadecanoic acid, 2,3-dihydroxy propyl ester	90	3.36	C25H54O4Si	474
26	43.26	Octadecanoic acid, 2,3-dihydroxy propyl ester	91	3.08	C27H58O4Si	502

APÊNDICE F – COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO EXTRATO DE *Trichoderma koningiopsis* DA FERMENTAÇÃO SÓLIDA EM GC-MS.

Tabela 15 - Compostos identificados no extrato etanólico derivatizado do *Trichoderma koningiopsis* da fermentação sólida em GC-MS.

Nº	RT (Min.)	Compound name	Quality (%)	% of total	Molecular Formula	Mol Wt
1	4.10	Heptane, 2,2,4-trimethyl	88	0.43	C10H22	142
2	4.30	Ethylene glycol	90	11.24	C8H22O2Si2	206
3	6.22	1,3 Propanediol	92	0.53	C9H24O2Si2	220
4	6.33	Propanoic acid, 2-hydroxy	95	4.71	C9H22O3Si2	234
5	11.38	3-Acetoxybutyric acid	77	1.57	C9H18O4Si	218
6	11.86	Glycerol	94	1.90	C12H32O3Si	308
7	13.18	Pyrimidine, 2,4-dihydroxy	93	1.09	C10H20N2O	256
8	16.66	Tetradecane	93	1.25	C14H30	198
9	17.62	Hexadecane	89	0.49	C16H34	226
10	17.76	1,3-Benzoxazol-2-amine	77	1.69	C13H22N2O	278
11	21.06	Heptadecane	93	1.00	C17H36	240
12	23.88	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	91	1.27	C16H22O4	278
13	24.86	7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione	85	1.45	C17H24O3	276
14	25.00	Eicosane	91	0.69	C20H42	282
15	26.63	Alpha-linolenic acid	89	14.81	C21H38O2Si	350
16	27.10	Hexadecanoic acid	93	40.46	C19H40O2Si	328
17	30.58	9,12-octadecadienoic acid (Z,Z)	85	6.08	C21H40O2Si	352
18	30.70	17-Octadecynoic acid	72	2.08	C21H40O2Si	352
19	31.12	Octadecanoic acid	91	2.58	C21H44O2Si	356

20	39.92	Hexadecanoic acid, 2,3-dihydroxy propyl ester	90	2.27	C ₂₅ H ₅₄ O ₄ Si	474
21	43.26	Octadecanoic acid, 2,3-dihydroxy propyl ester	92	2.41	C ₂₇ H ₅₈ O ₄ Si	502

**APÊNDICE G – COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO EXTRATO DE *Fusarium* sp.
DA FERMENTAÇÃO SÓLIDA EM GC-MS.**

Tabela 16 - Compostos identificados no extrato etanólico derivatizado do *Fusarium* sp. da fermentação sólida em GC-MS.

Nº	RT (Min.)	Compound name	Quality (%)	% of total	Molecular Formula	Mol Wt
1	4.30	Ethylene glycol	90	09.16	C8H22O2Si2	206
2	6.33	Propanoic acid, 2-hydroxy	95	2.27	C9H22O3Si2	234
3	11.38	3-Acetoxybutyric acid	77	0.93	C9H18O4Si	218
4	11.86	Glycerol	94	1.84	C12H32O3Si	308
5	13.18	Pyrimidine, 2,4-dihydroxy	94	1.74	C10H20N2O	256
6	14.69	Pyrimidine, 5-methyl-2,4-dihydroxy	93	1.24	C11H22N2O	270
7	16.66	Tetradecane	94	1.02	C14H30	198
8	17.76	1,3-Benzoxazol-2-amine	77	1.28	C13H22N2O	278
9	21.06	Heptadecane	93	0.75	C17H36	240
10	23.88	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	90	1.38	C16H22O4	278
11	24.86	7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione	88	1.47	C17H24O3	276
12	25.00	Eicosane	91	0.67	C20H42	282
13	26.63	Alpha-linolenic acid	90	16.54	C21H38O2Si	350
14	27.10	Hexadecanoic acid	92	29.38	C19H40O2Si	328
15	30.58	9,12-octadecadienoic acid (Z,Z)	92	12.90	C21H40O2Si	352
16	30.70	17-Octadecynoic acid	72	3.57	C21H40O2Si	352
17	31.12	Octadecanoic acid	91	8.28	C21H44O2Si	356
18	39.92	Hexadecanoic acid, 2,3-dihydroxy propyl ester	91	2.58	C25H54O4Si	474

19	43.26	Octadecanoic acid, 2,3-dihydroxy propyl ester	92	3.00	C ₂₇ H ₅₈ O ₄ Si	502
----	-------	---	----	------	---	-----

APÊNDICE H – COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO EXTRATO DE *Fusarium denticulatum* EM CONSÓRCIO COM *Mucor circinelloides* DA FERMENTAÇÃO SÓLIDA EM GC-MS.

Tabela 17 - Compostos identificados no extrato etanólico derivatizado do *Fusarium denticulatum* em consórcio com *Mucor circinelloides* da fermentação sólida em GC-MS.

Nº	RT (Min.)	Compound name	Quality (%)	% of total	Molecular Formula	Mol Wt
1	4.30	Ethylene glycol	90	13.03	C8H22O2Si2	206
2	6.22	1,3 Propanediol	95	1.32	C9H24O2Si2	220
3	6.33	Propanoic acid, 2-hydroxy	96	5.56	C9H22O3Si2	234
4	10.91	Diethylene glycol	92	0.61	C10H26O3Si2	250
5	11.38	3-Acetoxybutyric acid	77	1.41	C9H18O4Si	218
6	11.66	Undecane,3,8-dimethyl	92	0.41	C13H28	184
7	11.86	Glycerol	93	2.03	C12H32O3Si	308
8	13.18	Pyrimidine, 2,4-dihydroxy	94	2.59	C10H20N2O	256
9	14.69	Pyrimidine, 5-methyl-2,4-dihydroxy	93	1.88	C11H22N2O	270
10	16.66	Tetradecane	92	1.58	C14H30	198
11	17.76	1,3-Benzoxazol-2-amine	77	2.10	C13H22N2O	278
12	21.06	Heptadecane	93	1.32	C17H36	240
13	23.88	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	91	2.53	C16H22O4	278
14	24.86	7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione	80	1.10	C17H24O3	276
15	25.00	Eicosane	91	0.86	C20H42	282
16	26.63	Alpha-linolenic acid	89	8.25	C21H38O2Si	350
17	27.10	Hexadecanoic acid	93	29.24	C19H40O2Si	328
18	30.70	17-Octadecynoic acid	72	3.92	C21H40O2Si	352
19	31.12	Octadecanoic acid	91	10.78	C21H44O2Si	356

20	39.92	Hexadecanoic acid, 2,3-dihydroxy propyl ester	91	4.25	C ₂₅ H ₅₄ O ₄ Si	474
21	43.26	Octadecanoic acid, 2,3-dihydroxy propyl ester	93	5.23	C ₂₇ H ₅₈ O ₄ Si	502

APÊNDICE I – COMPOSTOS IDENTIFICADOS NA MISTURA 6 (FERMENTAÇÃO SUBMERSA DO *Fusarium* sp. E FERMENTAÇÃO SÓLIDA DO *Fusarium denticulatum* EM CONSÓRCIO COM *Mucor circinelloides*) EM GC-MS.

Tabela 18 - Compostos identificados no extrato etanólico derivatizado da mistura 6 da fermentação submersa do *Fusarium* sp. e da fermentação sólida do *Fusarium denticulatum* em consórcio com *Mucor circinelloides* em GC-MS.

Nº	RT (Min.)	Compound name	Quality (%)	% of total	Molecular Formula	Mol Wt
1	4.30	Ethylene glycol	91	21.23	C8H22O2Si2	206
2	6.22	1,3 Propanediol	94	1.07	C9H24O2Si2	220
3	6.33	Propanoic acid, 2-hydroxy	96	4.49	C9H22O3Si2	234
4	11.38	3-Acetoxybutyric acid	77	1.57	C9H18O4Si	218
5	11.86	Glycerol	94	2.54	C12H32O3Si	308
6	13.18	Pyrimidine, 2,4-dihydroxy	92	1.69	C10H20N2O	256
7	14.69	Pyrimidine, 5-methyl-2,4-dihydroxy	92	1.06	C11H22N2O	270
8	16.66	Tetradecane	93	1.70	C14H30	198
9	17.76	1,3-Benzoxazol-2-amine	77	2.62	C13H22N2O	278
10	21.06	Heptadecane	93	1.52	C17H36	240
11	23.88	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	89	1.51	C16H22O4	278
12	24.86	7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione	85	1.76	C17H24O3	276
13	25.00	Eicosane	91	1.02	C20H42	282
14	27.10	Hexadecanoic acid	94	28.06	C19H40O2Si	328
15	30.70	17-Octadecynoic acid	72	4.17	C21H40O2Si	352
16	31.12	Octadecanoic acid	91	15.53	C21H44O2Si	356
17	39.92	Hexadecanoic acid, 2,3-dihydroxy propyl ester	90	4.00	C25H54O4Si	474
18	43.26	Octadecanoic acid, 2,3-	91	4.46	C27H58O4Si	502

		dihydroxy propyl ester				
--	--	------------------------	--	--	--	--

ANEXO A – PRODUÇÕES REFERENTES AO PERÍODO DE MESTRADO VÍNCULADAS AO TEMA DA DISSERTAÇÃO (2019-2021)

Publicação de capítulo de livro com corpo editorial

CAMARGO, A. F.; Forte, C. T.; Bordin, E. R.; Weirich, S.; Carezia, C.; Ulkovski, C.; Franceschetti, M. B.; Bianchessi, F.; Reichert Junior, F. W.; Mulinari, J.; Fongaro, G.; Galon, L.; Mossi, A. J.; Treichel, H. *Advances in Weed Management*. In: Prathamesh Gorawala; Srushti Mandhatri. (Org.). *Agricultural Research Updates*. 2ed. Hauppauge, Nova York: Nova Science, 2019, v. 26, p. 49-97.

In: *Agricultural Research Updates*. Volume 26 ISBN: 978-1-53614-930-2
Editors: Prathamesh Gorawala et al. © 2019 Nova Science Publishers, Inc.

Chapter 2

ADVANCES IN WEED MANAGEMENT

Aline Frumi Camargo^{1,}, César Tiago Forte^{1,2},
Eduarda Roberta Bordin¹, Sabrina Weirich¹,
Carine Carezia¹, Cleiton Ulkovski¹,
Mílina Barretta Franceschetti¹, Felipe Bianchessi¹,
Francisco Wilson Reichert Júnior³,
Jéssica Mulinari³, Gislaine Fongaro^{1,3}, Leandro Galon¹,
Altemir José Mossi¹ and Helen Treichel^{1,†}*

¹Federal University of Fronteira Sul, Erechim, RS, Brazil

²Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

³Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

ABSTRACT

Among the factors that hinder the development of species of agronomic interest, weeds are responsible for causing high losses in agricultural production. This scenario has worsened in recent years with the emergence of weed species resistant to the main herbicides used

* Corresponding Author Email: alinefrumi@gmail.com.

† Corresponding Author Email: helenreichel@gmail.com.

Complimentary Contributor Copy

ANEXO B – PRODUÇÕES REFERENTES AO PERÍODO DE MESTRADO VÍNCULADAS AO TEMA DA DISSERTAÇÃO (2019-2021)

Publicação de capítulo de livro com corpo editorial

CAMARGO, A. F.; Scapini, T.; Preczeski, K. P.; Czapela, F. F.; Bonatto, C.; Ulrich, A.; Castamann, A.; Fongaro, G.; Mossi, A. J.; Treichel, H. *Agroecological Efficient Microorganisms*. In: Altemir José Mossi, Claudia Petry, Francisco Wilson Reichert Junior. (Org.). *Agroecology: Insights, Experiences and Perspectives*. 1ed. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2020, v.1, p. 209-229.

In: *Agroecology* ISBN: 978-1-53617-518-9
Editors: Altemir José Mossi et al. © 2020 Nova Science Publishers, Inc.

Chapter 7

AGROECOLOGICAL EFFICIENT MICROORGANISMS

Aline Frumi Camargo^{1,}, Thamarys Scapini¹,
Karina Paula Preczeski¹, Fabiane Czapela¹,
Charline Bonatto^{1,2}, Alessandro Ulrich³,
Alfredo Castamann³, Gislaine Fongaro⁴,
Altemir José Mossi³ and Helen Treichel¹*

¹Laboratory of Microbiology and Bioprocess,
Federal University of Fronteira Sul, Erechim, RS, Brazil

²Department of Chemical and Food Engineering,
Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

³Laboratory of Agroecology, Federal University of Fronteira Sul,
Erechim, RS, Brazil

⁴Laboratory of Virology, Department of Microbiology,
Immunology and Parasitology, Federal University of Santa Catarina,
Florianópolis, SC, Brazil

* Corresponding Author's Email: alinefrumi@gmail.com.

ANEXO C – PRODUÇÕES REFERENTES AO PERÍODO DE MESTRADO VÍNCULADAS AO TEMA DA DISSERTAÇÃO (2019-2021)

Publicação de capítulo de livro com corpo editorial

Silva, D.; Ody, L. C.; Mohr, M. F.; **CAMARGO, A. F.**; Mohr, N. E. R. *Agroecology and Education: Dialogues and Possibilities*. In: Altemir José Mossi, Claudia Petri, Francisco Wilson Reichert Junior. (Org.). *Agroecology: Insights, Experiences and Perspectives*. 1ed. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2020, v.1, p. 289-314.

In: *Agroecology* ISBN: 978-1-53617-518-9
Editors: Altemir José Mossi et al. © 2020 Nova Science Publishers, Inc.

Chapter 10

AGROECOLOGY AND EDUCATION: DIALOGUES AND POSSIBILITIES

Denilson da Silva¹, Leandro Carlos Ody^{1,},
Matheus Fernando Mohr¹, Aline Frumi Camargo²
and Naira Estela Roesler Mohr¹*

¹ Federal University of Fronteira Sul, Erechim,
Rio Grande do Sul, Brazil.

² Laboratory of Microbiology and Bioprocess,
Federal University of Fronteira Sul, Erechim, RS, Brazil

ABSTRACT

The aim of this chapter is to point out the connections between agroecology and education, reflecting on aspects related to the approximation between knowledge, interdisciplinarity and the experience of field education, because of the possibility of dialogue between these areas of knowledge. It is possible to educate from the principles of agroecology, with a view toward building a more sustainable and fairer world based on a vision that comprises knowledge, training processes and

* Corresponding Author's Email: leandro.ody@uffs.edu.br

ANEXO D – PRODUÇÕES REFERENTES AO PERÍODO DE MESTRADO VÍNCULADAS AO TEMA DA DISSERTAÇÃO (2019-2021)

Publicação de artigo científico

CAMARGO, A. F.; Stefanski, F. S.; Scapini, T.; Weirich, S.; Ulkovski, C.; Carezia, C.; Bordin, E. R.; Rossetto, V.; Reichert Junior, F. W.; Galon, L.; Fongaro, G.; Mossi, A. J.; Treichel, H. *Resistant weeds were controlled by the combined use of herbicides and bioherbicides*. ENVIRONMENTAL QUALITY MANAGEMENT (PRINT), v. 29, p. 37-42, 2019.

DOI: 10.1002/eqem.21643

RESEARCH ARTICLE

WILEY

Resistant weeds were controlled by the combined use of herbicides and bioherbicides

Aline Frumi Camargo¹ | Fábio Spitz Stefanski¹ | Thamarys Scapini¹ |
Sabrina Natalia Weirich² | Cleiton Ulkovski² | Carine Carezia² |
Eduarda Roberta Bordin¹ | Vanusa Rossetto³ | Francisco Reichert Júnior³ |
Leandro Galon⁴ | Gislaïne Fongaro^{5,5} | Altemir José Mossi² | Helen Treichel¹

¹Laboratory of Microbiology and Bioprocess, Environmental Science and Technology Department, Federal University of Fronteira Sul, Campus Erechim, Erechim, Rio Grande do Sul, Brazil

²Laboratory of Agroecology, Federal University of Fronteira Sul, Campus Erechim, Erechim, Rio Grande do Sul, Brazil

³Laboratory of Agrobiodiversity, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

⁴Laboratory of Sustainable Management of Agricultural Systems, Federal University of Roraima Sul - Campus Erechim, Erechim, Rio Grande do Sul, Brazil

⁵Laboratory of Virology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

Correspondence

Helen Treichel, Laboratory of Microbiology and Bioprocess, Environmental Science and Technology Department, Federal University of Roraima Sul, Campus Erechim, RS 125, Km 72, 97000-970, Erechim, RS, Brazil.
Email: helenreichel@gmail.com

Abstract

The intensive and abundant use of synthetic herbicides has been questioned in recent decades due to the strong dependence and also the resistance effects that are identified in weeds. Several grain crops suffer from the weed control system because many of the weeds are already resistant to the main herbicides that are used. In recent years, there has been a large gap in the market without the addition of new synthetic herbicides with mechanisms of action that differ from those already existing. The objective of this short piece is to address and overcome this challenge and bring an innovative and alternative solution that proposes a synergistic action system between bioherbicides produced by the fungus *Trichoderma koningii* and synthetic herbicides (2,4-dichlorophenoxyacetic acid, glyphosate, and ammonium glufosinate). The plants included in this study were *Bidens pilosa* (amar seco, or in the United States, beggar ticks or Spanish needle), *Euphorbia heterophylla* (adeno-brasil), and *Corypha bonariensis* (mangalrinha-do-campo, or, in the United States, hairy fleabane or asthma weed). It was verified that, in the application of the bio-compounds in the presence of chemical herbicides, potentiation of the phytotoxic action (100%) occurred under the target plant, emphasizing phytotoxicity to the weed, *C. bonariensis*, which is currently resistant to available herbicides. The bioherbicides studied have promising characteristics to be explored in the biocontrol of weeds.

KEYWORDS

bioherbicides, synergistic in the biocontrol, synthetic herbicides, *Trichoderma koningii*

1 | INTRODUCTION

Weeds are considered undesirable plants in agricultural fields because they are one of the main causes of reduced crop yields. Some control measures are practiced to reduce weed populations—such as crop rotation and herbicide application—but these practices may not often provide the expected result (Koocheki, Nasiri, Almoradi, & Ghorban, 2009; Marshall et al., 2003).

Currently, the use of chemical herbicides for weed management is being questioned seriously by farmers due to technical problems related to the resistance of weed populations to one or more herbicides (Mazi, Morlon, Munier-Jolain, & Quiné, 2007). Since 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) became commercially avail-

able the mid-1940s, the use of large-scale and random synthesis using synthetic compounds to screen for plant phytotoxicity has been adopted by the agrochemical industry to search for new herbicides (Kudsk & Strebbig, 2003; Wood & Olson, 1946).

In recent years, increased regulatory requirements have also increased the size of the investments needed to develop new herbicides. This has discouraged existing maintenance programs and new product discovery (Duque, 2012; Ridge, Quadrant, & Zochlor, 2007). As a consequence, no records of new herbicides using different modes of action than those already discovered can be found that were developed over the past 20 years (Duke, 2012). Thus, chemical herbicides using the same active principle have been applied successively, indiscriminately, and repetitively over the same areas, imposing adverse

ANEXO E– PRODUÇÕES REFERENTES AO PERÍODO DE MESTRADO VÍNCULADAS AO TEMA DA DISSERTAÇÃO (2019-2021)

Publicação de artigo científico

CAMARGO, A. F.; Venturin, B.; Bordin, E. R.; Scapini, T.; Stefanski, F. S.; Klanovicz, N.; Dalastra, C.; Kubeneck, S.; Preczeski, K. P.; Rossetto, V.; Weirich, S.; Carezia, C.; Ulkovski, C.; Reichert Junior, F. W.; Muller, C.; Fongaro, G.; Mossi, A. J.; Treichel, H. A *low-genotoxicity bioherbicide obtained from Trichoderma koningiopsis fermentation in a stirred-tank bioreactor*. INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY, v. 16, p. 176-181, 2020.

A Low-Genotoxicity Bioherbicide Obtained from *Trichoderma koningiopsis* Fermentation in a Stirred-Tank Bioreactor

Alire F. Camargo,¹ Bruno Venturin,¹ Eduardo Roberto Bordin,² Thomays Scapini,¹ Fábio Spitzer Stefanski,¹ Natalia Klanovicz,² Caroline Dalastra,¹ Simone Kubeneck,¹ Karina Paula Preczeski,¹ Vinícius Rossetto,¹ Sábina Weirich,² Carine Carezia,² Cláudio Ulkovski,² Francisco Wilson Reichert Júnior,² Caroline Müller,¹ Giseline Fongaro,^{1,4} Altamir José Mossi,² and Heles Treichel¹

¹Laboratory of Microbiology and Bioprocess and ²Laboratory of Agroecology, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil
³Nucleus of Studies in Agrobiology, Center of Agrarian Sciences, and ⁴Laboratory of Applied Virology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

Abstract

The present study was designed to evaluate the scaling process used to obtain fungi and enzymes from *Trichoderma koningiopsis* to produce bioherbicides with low levels of genotoxicity using a stirred-tank bioreactor. We measured fungal biomass and activities of enzymes (amylase, cellulase, lipase and peroxidase). Fermentation products were applied to weeds (*Bidens pilosa* and *Euphorbia heterophylla*), and the bioherbicide effect was evaluated. We found greater elevations of peroxidase and lipase activity in the scale-up models than in those at small scale (0.15 L), even with less biomass, suggesting that the scaling was cost-beneficial in terms of enzymatic yield. Bioherbicide activity tests showed up to 100–80% phytotoxic effects on weeds that were resistant to synthetic herbicide. A genotoxicity study of the fermented extract performed in *Allium cepa* metistom cells showed low genotoxicity and no DNA damage. Our findings point to new perspectives regarding bioherbicides derived from fungal fermentation and enzyme yield technology, aimed at sustainable and ecofriendly agriculture.

Keywords: scaling process, enzyme yield, weeds control, safety agriculture, environmental protection

Introduction

Global demand for food continues to increase along with significant population growth. It is estimated that more than 320 million tons of cereals will be produced by 2026.¹ Nevertheless, the expansion of agricultural land is limited by the borders of protected areas

extremely important for controlling greenhouse gas emissions, water demand, the maintenance of biodiversity and better quality of life.²

Agricultural production depends on adequate conditions, mainly light, water and nutrients. Nutrient availability may be reduced by competition with weeds coexisting with crops, giving rise to concerns regarding the potential of weeds to affect the development of economically important crops.

In conventional agriculture, weed management is usually carried out using chemicals. Excessive and/or long-term use of chemical herbicides has resulted in changes in oxidation capacity³ and in the soil microbial community structure.^{4,5} Furthermore, herbicides negatively affect the quality of the environment and the health of exposed populations.^{6,7} Genotoxicity studies have demonstrated that the persistence of agrochemicals in soil, water, and even in food has toxic effects, altering the formation of micronuclei in plant cells, as well as inducing the development of cancer in several animal species. These compounds cause cumulative changes in the DNA of eukaryotic and prokaryotic organisms, representing potential environmental risks.^{8,9} The indiscriminate use of chemical herbicides for weed control has gradually given rise to increased populations of herbicide-resistant weed species, which increased from 25 in 1979 to 499 in 2019 worldwide.¹⁰ Such resistance is numerous and frequent in staple crops such as wheat, maize, and rice.

New alternative technologies for weed control that are not as harmful to the environment are currently being sought. Among these, bioherbicides—herbicides based on plants or phytopathogenic microorganisms—are potential substitutes for sustainable weed management,¹¹ as these present low risks and are suitable for organic food production, in addition to not affecting non-target plants.¹² Fungus-based biocontrol involves introduction of pathogenic agents to inhibit germination and/or affect weed development within a managed area.^{13,14} Because of the existing large degree of fungal biodiversity, phytopathogenic fungi in bioherbicides formulation have received considerable attention. The benefits of bioherbicides include short half-lives, low toxicity, and multiple modes of action reducing the risk of herbicide resistance.¹⁵ This strategy can be easily used in agriculture, because the application of the inoculum occurs as liquid sprays or solid granules similar to conventional herbicides.

The development of a biological herbicide to meet the demands of the agricultural sector requires consideration of its potential for scale up. The use of bioreactors in a laboratory is important for maximizing bioherbicide production. These

ANEXO F – PRODUÇÕES REFERENTES AO PERÍODO DE MESTRADO VÍNCULADAS AO TEMA DA DISSERTAÇÃO (2019-2021)

Publicação de artigo científico

Stefanski, F. S.; **CAMARGO, A. F.**; Scapini, T.; Bonatto, C.; Venturin, B.; Weirich, S.; Ulkovski, C.; Carezia, C.; Ulrich, A.; Michelon, W.; Soares, H. M.; Mathiensen, A.; Fongaro, G.; Mossi, A. J.; Treichel, H. *Potential Use of Biological Herbicides in a Circular Economy Context: A Sustainable Approach*. FRONTIERS IN SUSTAINABLE FOOD SYSTEMS, v. 4, p. 1-14, 2020.



ORIGINAL RESEARCH
published: 22 October 2020
doi: 10.3389/fsufs.2020.521102



Potential Use of Biological Herbicides in a Circular Economy Context: A Sustainable Approach

Fábio Spilza Stefanski¹, **Alino Frum Camargo**¹, Thamaris Scapini¹, Charline Bonatto^{1,2}, Bruno Venturin¹, Sabrina Natália Weirich³, Cleiton Ulkovski², Carine Carezia², Alessandro Ulrich², William Michelon⁴, Hugo Moreira Soares⁴, Alexandre Mathiensen⁵, Gláucio Fongaro⁶, Altamir José Mossi² and Helen Treichel^{1*}

¹Laboratory of Microbiology and Bioprocess, Federal University of Fronteira Sul, Graciosa, Brazil; ²Department of Chemical and Food Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil; ³Laboratory of Agroecology, Federal University of Fronteira Sul, Graciosa, Brazil; ⁴Department of Chemical Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil; ⁵Division of Science and Poultry, Concórdia, Brazil; ⁶Laboratory of Applied Virology, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Ute Falck,
University of Bam, Switzerland

Reviewed by:

Simone Louise Durso,
Australian National University, Australia
Hemendra Pal Singh,
Pangaj University, India

*Correspondence:

Helen Treichel
helenreichel@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Agroecology and Ecosystem Services,
a section of the journal
Frontiers in Sustainable Food Systems

Received: 17 December 2019

Accepted: 21 September 2020

Published: 22 October 2020

Citation:

Stefanski FS, Camargo AF, Scapini T, Bonatto C, Venturin B, Weirich SN, Ulkovski C, Carezia C, Ulrich A, Michelon W, Soares HM, Mathiensen A, Fongaro G, Mossi AJ and Treichel H (2020) Potential Use of Biological Herbicides in a Circular Economy Context: A Sustainable Approach. *Front. Sustain. Food Syst.* 4:521102. doi: 10.3389/fsufs.2020.521102

In recent years, synthetic herbicides' intense and disordered use has triggered severe contamination of soils and water bodies, causing damage to living organisms, including vegetal herbicide-resistance. In-part, biological herbicides, offer promise in addressing these problems, especially for sustainable wood management in both agricultural and natural resource management contexts. The search for culture media to serve as alternatives to the existing conventional synthetic media has focused on microalgae biomass. The natural properties of these organisms make them ideal raw materials for fermentative processes. Therefore, this study aimed to integrate bioprocesses producing bioherbicidal extract using a submerged fermentation process. For this, a substrate of microalgae recycled biomass to replace commercially used media for fungal growth for relatively cheap biomass obtained from wastewater phytoremediation after anaerobic treatment (UASE). We also verified its potential for weed control. Preliminary tests of microalgae fermentation were conducted in the raw and lyophilized form, using the fungus *Trichoderma koningiopsis*. To evaluate their phytotoxic potential, the biocompounds were applied to *Bidens pilosa*, *Coryza bonariensis*, *Urochloa plantaginea*, and *Euphorbia heterophylla* weeds. A central composite rotatable design (CCRD) was used to evaluate the influence of temperature (20–45°C), agitation (0–200 RPM), and pH (3–14) on the improvement of enzyme activities, fungal growth and the effects on *Cucumis sativus* germination tests. We found that microalgae could be used as a substrate for obtaining bioherbicides. The biocompounds produced in this study were relevant for pre- and post-emergence control of model plants (*Cucumis sativus*), with vigor indexes of up to 8.06% and herbicide-resistant plants (*Coryza bonariensis*) with phytotoxic damage of up to 100% after 15 days. From the experiments' design, we found that agitation was the variable that had the most significant effect on enzyme and biomass production, followed by pH and temperature. The enzymes also showed synergistic action when acting together with microalgae and fungi, potentiating the control effect

ANEXO G – PRODUÇÕES REFERENTES AO PERÍODO DE MESTRADO VÍNCULADAS AO TEMA DA DISSERTAÇÃO (2019-2021)

Publicação de artigo científico

Bordin, E. R.; **CAMARGO, A. F.**; Stefanski, F. S.; Scapini, T.; Bonatto, C.; Zanivan, J.; Preczeski, K. P.; Modkovski, T. A.; Reichert Junior, F. W.; Mossi, A. J.; Fongaro, G.; Ramsdorf, W. A.; Treichel, H. *Current production of bioherbicides: mechanisms of action and technical and scientific challenges to improve food and environmental security*. BIOCATALYSIS AND BIOTRANSFORMATION, v. 38, p. 1-14, 2020.

BIOCATALYSIS AND BIOTRANSFORMATION
https://doi.org/10.1080/10240322.2020.1813864



RESEARCH ARTICLE



Current production of bioherbicides: mechanisms of action and technical and scientific challenges to improve food and environmental security

Eduardo Roberto Bordin^a, Aline Frumi Camargo^b, Fábio Spitz Stefanski^b, Thamarys Scapini^c, Charline Bonatto^{d,e}, Jessica Zanivan^b, Karina Preczeski^b, Tatiani Andressa Modkovski^f, Francisco Reichert Júnior^g, Altemir José Mossi^f, Gislaine Fongaro^g, Wanessa Algaete Ramsdorf^h and Helen Treichel^b

^aLaboratory of Ecotoxicology, Federal Technological University of Paraná, Curitiba, Brazil; ^bLaboratory of Microbiology and Bioprocess, Federal University of Fronteira Sul, Chapeco, Brazil; ^cDepartment of Chemical and Food Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil; ^dLaboratory of Biotechnology, Federal Technological University of Paraná, Chapeco, Brazil; ^eLaboratory of Agrobiotechnology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil; ^fLaboratory of Agronomy, Federal University of Fronteira Sul, Chapeco, Brazil; ^gLaboratory of Applied Microbiology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

ABSTRACT

Modern agriculture is threatened by the possibility of nutrient losses, largely attributable to the presence of competing weeds in these spaces. The challenge is to manage these weeds efficiently without harming the environment and the population. The inadequate use of a series of management techniques ends up causing resistance in weeds; therefore, we seek new forms of control. Among these are bioherbicides that are characterized by broad diversity with potential for use, in addition to presenting a strong bias of food and environmental security. In this context, this review aims to present an overview of the current production matrices of bioherbicides and the technical and scientific challenges still faced in order for these products to be placed on the market. Bioherbicide production should be encouraged so as to preserve environmental quality and human health. Faced with biotechnological issues, many paradigms need to be broken, especially with regard to scaling up, toxicity and implementation of these products on the world market so that farmers have access to and can provide quality and healthy food. This review discusses ways to facilitate this progress by encouraging research in the field of biotechnology.

ARTICLE HISTORY

Received 18 January 2020
Revised 19 August 2020
Accepted 3 October 2020

KEYWORDS

Mechanism of action;
biocontrol; eco-friendly;
biomimetic; biotechnology;
enzymatic activity

1. Introduction

Agricultural production is strongly influenced by the presence of weeds that reduce crop yields (Adetunji et al. 2019; Iqbal et al. 2020). To control weeds, various mechanical, chemical and biological techniques are employed (Todero et al. 2018; Wang et al. 2019). Nevertheless, chemical weed killers have generated critical environmental effects, including their constant presence in food, water and soil as well as their effects on ecosystems in nearby fields and damage to non-target organisms (Prosser et al. 2016; Algandaby and El-Darier 2018; Daniel et al. 2018; Kennedy 2018; Lawrence et al. 2019). Many studies point to effects on human health caused by exposure and indirect but constant contact with chemical herbicides (Adetunji et al. 2018; Adetunji et al. 2019).

These effects can still reach larger proportions considering the resistance factors that a number of weeds

have already acquired in the context of long-term pesticide application (Koodkaew et al. 2018; Todero et al. 2018; Perotti et al. 2020). Overuse and persistent use of certain active ingredients have given rise to several cases of resistance (Soltys et al. 2013; Lee et al. 2015; Daniel et al. 2018). To mitigate the impact of pesticide resistance, mixtures of various herbicides with varying mechanisms of action have been tested, but without success. This is because the idea of combining formulations is intended to make the action of these products more effective, complementing their individual action mechanisms. However, this practice of mixing herbicides has not been successful, as it alters the toxicity and genotoxicity of these products, thus making basic actions much more dangerous for the environment (Ilgue et al. 2015; Bordin et al. 2018; Araute et al. 2020).

The ability of these bioherbicides to act on seed germination or to inhibit or retard the growth of

CONTACT Helen Treichel helentreichel@gmail.com ^bLaboratory of Microbiology and Bioprocess, Federal University of Fronteira Sul, Erechim 99700-170, Brazil
© 2020 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

ANEXO H – PRODUÇÕES REFERENTES AO PERÍODO DE MESTRADO VÍNCULADAS AO TEMA DA DISSERTAÇÃO (2019-2021)

Publicação de artigo científico

Cavalcante, B. D. M.; Scapini, T.; **CAMARGO, A. F.**; Ulrich, A.; Bonatto, C.; Fongaro, G.; Dalastra, C.; Mossi, A. J.; Piero, R. M.; Treichel, H. *Orange peels and shrimp shell used in a fermentation process to produce an aqueous extract with bioherbicide potential to weed control*. *BIOCATALYSIS AND AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY*, v. 32, p. 101947, 2021.

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 32 (2021) 101947

Contents lists available at ScienceDirect

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology

Journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/bab>

Orange peels and shrimp shell used in a fermentation process to produce an aqueous extract with bioherbicide potential to weed control

Bianca D'arcangelo Melo Cavalcante^a, Thamarys Scapini^b, **Aline Prumi Camargo^b**, Alessandro Ulrich^c, Charline Bonatto^{b,d}, Caroline Dalastra^b, Altemir José Mossi^e, Gislaíne Fongaro^a, Robson Marcelo Di Piero^a, Helen Treichel^{b,*}

^a Laboratory of Plant Pathology, Crop Science Department, Federal University of Santa Catarina, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil
^b Laboratory of Microbiology and Bioprocess, Federal University of Paraná, CEP 90700-000, Curitiba, RS, Brazil
^c Laboratory of Agronomy, Federal University of Paraná, CEP 90700-000, Curitiba, RS, Brazil
^d Department of Chemical and Food Engineering, Federal University of Santa Catarina, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil
^e Department of Microbiology, Immunology, and Parasitology, Federal University of Santa Catarina, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Agro-industrial waste
Bioprocesses
Biomass production
Bioherbicide

ABSTRACT

Alternative sources for weed control are necessary to reduce the use of synthetic herbicides. Bioherbicides obtained from agro-industrial waste have the potential to integrate sustainable management of existing agricultural systems. Because of the need for new compounds with potential herbicide, this study's objective was to evaluate the bioherbicide effect and the enzymatic activity of the extracts produced using agro-industrial waste as a substrate. A submerged fermentation was carried out with orange peel and shrimp shell; *Trichoderma koningii* and *Aspergillus niger* were used separately to produce enzymatic extracts. Through submerged fermentation with these agro-industrial residues, extracts were obtained, which were characterized concerning the activities of pectinase, cellulase, amylase, lipase, and protease. The extracts were also evaluated for their bioherbicide potential for weed control, and this is the first study conducted with these residues for this purpose. No significant difference was observed in the enzymatic activities of the extracts produced by the different microorganisms used. Accelerated leaf damage was observed in *C. setosus* seven days after applying both extracts, ranging from 66.57 to 77.00% for extracts of *T. koningii* and *A. niger*, respectively. Therefore, the extracts appear to be promising alternatives in weed control just seven days after application, demonstrating a rapid effect with low environmental risk.

1. Introduction

Agrochemicals increased food production, but their intensive use has caused environmental and human health problems (Fernandes et al., 2020). Brazil goes against international trends in reducing the use of pesticides. It is considered the largest consumer of synthetic agrochemicals worldwide, and herbicides represent 69% of Brazil's total agrochemicals consumption (Alves et al., 2019; Fernandes et al., 2020).

Weed management is performed by crop rotation techniques, soil preparation, and mainly by applying synthetic herbicides to reduce the weed population (Radhakrishnan et al., 2018). However, with the evolution of weeds, the development of resistance to chemical herbicides due to the indiscriminate and continuous use of known herbicides, cur-

rent crop management systems are at risk (Green and Owen, 2011; Vazirani et al., 2021).

The excessive use of synthetic herbicides results in severe environmental impacts, like water and land contamination, increasing the global interest in alternative methods that do not use chemicals for weed control (Radhakrishnan et al., 2018). Considering this scenario, resources about biological agents for integrated weed management expand and demonstrate the potential for sustainable agricultural systems management (Cordeiro et al., 2016).

Bioherbicides are bioproducts that originate from phytopathogenic microorganisms or microbial compounds useful for weed control. Through complex interactions between plants and biocomposites, there is a reduction in the weed population, providing more significant condi-

* Corresponding author.

E-mail addresses: biancawanderck@gmail.com (B.D.M. Cavalcante), scapini.thamarys@gmail.com (T. Scapini), alineprumi@gmail.com (A.F. Camargo), biancawanderck@hotmail.com (A. Ulrich), charli_bonatto@outlook.com (C. Bonatto), carolinedalastra@gmail.com (C. Dalastra), altemir.mossi@ufsc.br (A.J. Mossi), gislaïnefongaro@gmail.com (G. Fongaro), robson.piero@ufsc.br (R.M. Di Piero), helenreichel@gmail.com (H. Treichel).

<https://doi.org/10.1016/j.bab.2021.101947>

Received 21 November 2020; Received in revised form 5 February 2021; Accepted 9 February 2021

Available online 11 February 2021

1876-8181/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

ANEXO I – PRODUÇÕES REFERENTES AO PERÍODO DE MESTRADO VÍNCULADAS AO TEMA DA DISSERTAÇÃO (2019-2021)

Resumos publicados em anais de congressos

Ulrich, A.; Lerin, L.; **CAMARGO, A. F.**; Scapini, T.; Stefanski, F. S.; Gasparetto, I. G.; Sansonovicz, P. F.; Fabian, R. L.; Diering, N. L.; Devenz Junior, E.; Teles, L. O.; Achilles, K. A. R.; Treichel, H.; Muller, C.; Mossi, A. J. *Bioherbicida alternativo a base de Trichoderma koningiopsis: caracterização enzimática e efeito sobre plantas de pepino*. In: VII Simpósio em Ciência e Tecnologia Ambiental e III Encontro Multidisciplinar em Ciências Ambientais da Fronteira Sul, 2020, Erechim-RS. Anais do VII Simpósio em Ciência e Tecnologia Ambiental e III Encontro Multidisciplinar em Ciências Ambientais da Fronteira Sul, 2020.



BIOHERBICIDA ALTERNATIVO A BASE DE *Trichoderma koningiopsis*: CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E EFEITO SOBRE PLANTAS DE PEPINO

Alessandro Ulrich*, Lindomar Alberto Lerin, **Aline Frumi Camargo**, Thamarys Scapini, Fabio Bonfatti, Ilana Giachini Gasparetto, Patrícia Fátima Sansonovicz, Roberto Luis Fabian, Naudio Ladir Diering, Edson Devenz Júnior, Leon Oliveira Teles, Karen Aline da Rosa Achilles, Helen Treichel, Caroline Müller, Altemir José Mossi

*Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, RS.

*Email para correspondência: alessandro.estac@hotmail.com

Estudos ligados a técnicas alternativas na agricultura são importantes e demandados pela sociedade para a produção de alimentos livres de resíduos de agrotóxicos. Dentre os métodos alternativos, destaca-se a utilização de bioprodutos, os quais diminuem a geração de contaminantes ambientais. Assim, o trabalho objetivou produzir um bioherbicida a base de *Trichoderma koningiopsis* e avaliar a atividade fitotóxica deste composto em plantas bioindicadoras de pepino (*Cucumis sativus* L.). Os experimentos foram conduzidos em laboratório e casa de vegetação, vinculados ao Laboratório de Agroecologia e Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim/RS. O fungo *T. koningiopsis* foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata dextrose agar, 39 g L⁻¹) e, após o crescimento, os esporos foram transferidos para um meio de cultivo YPD (3 mg L⁻¹ glicose, 0,75 mg L⁻¹ peptona e 0,37 mg L⁻¹ extrato de levedura) e mantidos em agitador orbital (120 rpm), a 28 °C por 72 horas. O extrato bruto (EBt) foi filtrado com papel filtro (FilP) e com gaze (FilG) para as análises subsequentes. A biomassa fúngica (base seca) foi obtida a partir do material retido no papel filtro, a qual teve um rendimento de 3,6 g L⁻¹. Com a solução FilP foram determinadas as atividades das enzimas amilase (0,11 U mL⁻¹), celulase (0,07 U mL⁻¹), lipase (1,7 U mL⁻¹) e peroxidases totais (44 U mL⁻¹). Os preparados de bioherbicida EBt, FilP e FilG foram então aplicados em plantas de pepino em condições controladas de casa de vegetação, com delineamento inteiramente casualizado e 10 repetições. O EBt foi pincelado sobre as folhas e, 15 dias após a aplicação do tratamento (DAT) observou-se mortalidade de aproximadamente 80% das plantas de pepino. Os tratamentos FilP e FilG foram aplicados utilizando um borrifador manual, e ocasionaram mortalidade em torno de 40% e 80%, respectivamente, aos 15 DAT. A necrose observada nos tecidos foliares foi atribuída a maior presença de micélio e, consequentemente, maior mortalidade da planta. Assim, a maior eficiência do bioherbicida foi obtida pelos tratamentos com EBt e FilG. Os resultados obtidos demonstram que a utilização do extrato de *T. koningiopsis* é eficiente como bioherbicida em planta modelo, auxiliando no desenvolvimento de tecnologias que permitirão uma agricultura com menores impactos ambientais tornando-a mais sustentável.

Palavras-chave: atividade enzimática; biomassa fúngica; biocontrole; *Cucumis sativus*; fitotoxicidade.

Anais do VII Simpósio em Ciência e Tecnologia Ambiental e III Encontro Multidisciplinar em Ciências Ambientais da Fronteira Sul – ISSN: 2594-4061

ANEXO J – PRODUÇÕES REFERENTES AO PERÍODO DE MESTRADO VÍNCULADAS AO TEMA DA DISSERTAÇÃO (2019-2021)

Resumos publicados em anais de congressos

CAMARGO, A.F.; Stefanski, F. S.; Dalastra, C.; Scapini, T.; Bonatto, C.; Ulrich, A.; Mossi, A. J.; Alves Junior, S.; Michelon, W.; Fongaro, G.; Treichel, H. *Potencial bioherbicida de fungos selvagens cultivados em biomassa algal*. In: VII Simpósio em Ciência e Tecnologia Ambiental e III Encontro Multidisciplinar em Ciências Ambientais da Fronteira Sul, 2020, Erechim-RS. Anais do VII Simpósio em Ciência e Tecnologia Ambiental e III Encontro Multidisciplinar em Ciências Ambientais da Fronteira Sul, 2020.



POTENCIAL BIOHERBICIDA DE FUNGOS SELVAGENS CULTIVADOS EM BIOMASSA ALGAL

Aline Frumi Camargo¹, Fabio Spitzka Stefanski, Caroline Dalastra, Thamary Scapini, Charline Bonatto, Alessandro Ulrich, Altemir José Mossi, Sérgio Luiz Alves Junior, William Michelon, Gislaíne Fongaro, Helen Treichel

¹Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, RS;
²Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC;
³Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó, SC.
⁴E-mail para correspondência: alinefrumi@gmail.com

O setor agrícola é impulsionado por demandas populacionais em crescimento. Nesse cenário, herbicidas são utilizados como estratégias de controle para o aumento no rendimento e na produção de alimentos. Uma alternativa para redução no uso de herbicidas são os bioherbicidas que são baseados em compostos biologicamente ativos. Neste contexto, este estudo avaliou o potencial da biomassa de microalgas, cultivadas em digestato da produção de biogás, como substrato em processos fermentativos visando a obtenção de bioherbicidas fungicos. Para isso, a biomassa microalgal foi separada após tratamento terciário de efluente da suinocultura e uma massa de 10 gramas foi utilizada como substrato para as fermentações que ocorreram de forma submersa e sólida, contendo 10^6 esporos/mL de cada microrganismo. Os extratos provenientes de fermentações distintas (sólida e submersa) foram misturados na proporção de 1:1 v/v, a fim de avaliar a eficiência de um extrato misto. Foram utilizados quatro isolados fungicos: *Trichoderma koningiopsis*, isolado da planta daninha *Digitaria ciliata*; *Fusarium* sp. e dois fungos com crescimento associado, *Fusarium denticulatum* e *Mucor circinelloides*, isolados do intestino de lagartas militares *Spodoptera frugiperda*. Os extratos foram avaliados quanto a atividade das enzimas amilase, celulase, peroxidase, lipase e lacase. A atividade bioherbicida foi avaliada por meio da aplicação dos extratos em *Cucumis sativus* e o dano foliar foi visualmente estimado conforme a escala recomendada pela Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas. Os microrganismos demonstraram potencial como agentes fermentadores e produtores de um pool enzimático pelos dois métodos fermentativos. Dentre os extratos produzidos por fermentação em estado sólido, o extrato obtido pelos fungos *F. denticulatum* em consórcio com *M. circinelloides* e *Fusarium* sp. demonstrou maior nível de danos foliares (80-100 = 3,00%). Já na fermentação submersa com os fungos *T. koningiopsis* e *Fusarium* sp. obteve-se danos foliares irreversíveis nas culturas testadas. Os extratos combinados provenientes da fermentação submersa do fungo *Fusarium* sp. e pela fermentação sólida do consórcio de fungos *F. denticulatum* e *M. circinelloides*, apresentou um efeito fitotóxico severo (98,00 = 3,00%), o que demonstra a atuação sinérgica na planta alvo, provavelmente pelo pool enzimático presente neste extrato ser composto por amilases, celulases, lipases e peroxidases. Por meio dos testes realizados em *C. sativus* pode-se inferir que as cepas microbianas são potenciais agentes de controle biológico de plantas invasoras e que os fungos em conjunto com a biomassa de microalgas ofereceram condições adequadas para a obtenção de um pool enzimático de relevância biotecnológica.

Palavras-chave: controle biológico; enzimas; cepas microbianas; biotecnologia; fermentação.

Anais do VII Simpósio em Ciência e Tecnologia Ambiental e III Encontro Multidisciplinar em Ciências Ambientais da Fronteira Sul – ISSN: 2594-4061

ANEXO K – PRODUÇÕES REFERENTES AO PERÍODO DE MESTRADO VÍNCULADAS AO TEMA DA DISSERTAÇÃO (2019-2021)

Resumos publicados em anais de congressos

Weirich, S.; Ulkovski, C.; **CAMARGO, A. F.**; Devenz Junior, E.; Borghelot, F.; Barro, G. M.; Bonafin, F.; Teles, L. O.; Stefanski, F. S.; Brandler, D.; Treichel, H.; Mossi, A. J. *Controle de plantas daninhas utilizando fungos com potencial bioherbicida seletivo*. In: VI Simpósio de Ciência e Tecnologia Ambiental e II Encontro Multidisciplinar em Ciências Ambientais da Fronteira Sul, 2019, Erechim-RS. Anais do VI Simpósio de Ciência e Tecnologia Ambiental e II Encontro Multidisciplinar em Ciências Ambientais da Fronteira Sul, 2019. p. 112-113.



CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS UTILIZANDO FUNGOS COM POTENCIAL BIOHERBICIDA SELETIVO

Sabrina Natalia Weirich¹, Cleiton Ulkovski², **Aline Frumi Camargo**³, Edson Devenz Junior⁴, Franciele Borghelot⁵, Gabriel Majeski Barro⁶, Fabio Bonafin⁷, Leon Oliveira Teles⁸, Fabio Spitzza Stefanski⁹, Daiani Brandler⁹, Helen Treichel⁹, Altemir José Mossi⁹

¹Universidade Federal da Fronteira Sul, Graduação em Agronomia, campus Erechim, RS;

²Universidade Federal da Fronteira Sul, Graduação em Engenharia Ambiental, campus Erechim, RS;

³Universidade Federal da Fronteira Sul, Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental campus Erechim, RS;

⁴Universidade Federal da Fronteira Sul, Professor Adjunto, campus Erechim, RS.

* Autor para correspondência: Sabrina Natalia Weirich (weirichsabrina@hotmail.com).

As plantas daninhas são conceituadas de diferentes formas ao longo dos anos, de forma geral, uma planta é considerada daninha se estiver, direta ou indiretamente, prejudicando determinada atividade humana, ou seja, que crescem onde não são desejadas e causam prejuízos. As plantas daninhas são um grande empecilho para a produção agrícola pois estas podem competir com a cultura por nutrientes, água, luz e espaço, causando grandes perdas de produtividade e redução na qualidade dos produtos, além de aumentar os custos da produção. A adoção do controle químico representou um avanço geral nas formas de manejo de plantas daninhas, porém o uso incorreto desses produtos permitiu o surgimento de biótipos resistentes a diversos mecanismos de ação. Atualmente existem diversas espécies de plantas resistentes a herbicidas no mundo. Este fato é uma preocupação para a agricultura pois nenhum mecanismo de ação novo é descoberto há mais de 30 anos. Tendo em vista a necessidade de controle de plantas daninhas e a crescente demanda por novos produtos devido as formas de resistência, a busca de novas alternativas de controle de daninhas vem se tornando fundamental. Dentre elas destaca-se o controle biológico, que refere-se a introdução de organismos num ecossistema, com a intenção de controlar uma ou mais espécies indesejáveis. Deste modo, bioherbicidas são produtos que se originam naturalmente de organismos vivos ou de seus metabólitos naturais que são usados para controlar populações de plantas daninhas sem degradar o ambiente. Destaca-se que os bioherbicidas possuem especificidade de alvo e rápida degradação ambiental. Diante dos problemas ambientais causados pelo uso excessivo de herbicidas sintéticos e a crescente ocorrência de resistência das plantas aos mecanismos de ação existentes, torna-se fundamental a busca por novas alternativas para o controle de plantas daninhas. Desta forma, objetivou-se com este trabalho, obter isolados fúngicos de plantas infectadas, com potencial bioherbicida, para o manejo de plantas daninhas em cultivos agrícolas de verão. O experimento foi conduzido no Laboratório de Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul sendo que foram realizadas coletas sistemáticas de plantas daninhas infectadas, exibindo sintomas típicos de enfermidades, em áreas de cultivo de culturas de verão na região do Alto Uruguai Gaúcho. As amostras foram levadas ao laboratório onde foi realizado o isolamento dos microrganismos. Após a obtenção de culturas puras, foi realizada a fermentação submersa, sendo que o preparo do meio de cultura contou com adição de Glicose, Extrato de levedura, Peptona, Sulfato de Amônio, Sulfato de Magnésio, Sulfato Ferroso, Sulfato de Manganês. Os microrganismos foram inoculados neste meio e posteriormente colocados em agitador orbital, a 120 rpm e 28 °C por 72 horas. O extrato foi filtrado e adicionou-se adjuvante, óleo vegetal Auro® Concentrado Emulsionável (EC), na dose recomendada de 0,1% (100 mL/100 litros de água). A aplicação do biocomposto foi realizado em casa de vegetação sobre as plantas daninhas buva

Página 112

ANEXO L – PRODUÇÕES REFERENTES AO PERÍODO DE MESTRADO VÍNCULADAS AO TEMA DA DISSERTAÇÃO (2019-2021)

Resumos publicados em anais de congressos

Ulkovski, C.; Weirich, S.; **CAMARGO, A. F.**; Stefanski, F. S.; Devenz Junior, E.; Borghelot, F.; Teles, L. O.; Barro, G. M.; Bonafin, F.; Brandler, D.; Treichel, H.; Mossi, A. J. *Uso de microrganismo com potencial bioherbicida no controle de macrófitas aquáticas*. In: VI Simpósio de Ciência e Tecnologia Ambiental e II Encontro Multidisciplinar em Ciências Ambientais da Fronteira Sul, 2019, Erechim-RS. Anais do VI Simpósio de Ciência e Tecnologia Ambiental e II Encontro Multidisciplinar em Ciências Ambientais da Fronteira Sul, 2019. p. 34-35.



USO DE MICRORGANISMO COM POTENCIAL BIOHERBICIDA NO CONTROLE DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS

Cleiton Ulkovski¹, Sabrina Natália Weirich¹, **Aline Frumi Camargo²**, Fabio Spitz Stefanski³, Edson Devenz Junior³, Franciele Borghelot⁴, Leon Oliveira Teles¹, Gabriel Majeski Barro⁵, Fabio Bonafin⁴, Daiani Brandler⁴, Helen Treichel⁴, Altemir José Mossi⁴

¹Universidade Federal da Fronteira Sul, Graduação em Agronomia, campus Erechim, RS;

²Universidade Federal da Fronteira Sul, Graduação em Engenharia Ambiental, campus Erechim, RS;

³Universidade Federal da Fronteira Sul, Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, campus Erechim, RS;

⁴Universidade Federal da Fronteira Sul, Professor Adjunto, campus Erechim, RS;

*Autor para correspondência: Cleiton Ulkovski (cleiton-ulk@hotmail.com).

O crescimento excessivo e acelerado das macrófitas aquáticas somado aos prejuízos causados pelas mesmas nos reservatórios tem instigado diversos pesquisadores a buscar formas de controle destas plantas. Atualmente os métodos tradicionais de controle são o químico, mecânico e biológico. Dentre estes, a principal forma de controle utilizada é a mecânica, tendo em vista os problemas ambientais causados pelo controle químico e o baixo desenvolvimento da técnica de controle biológico. O controle biológico, basicamente, faz uso de organismos vivos para controlar ou reduzir populações de espécies de plantas indesejáveis, sendo o uso de micro-organismos como bioherbicidas uma das mais promissoras. A produção de herbicida por microrganismos apresenta algumas vantagens sobre o herbicida sintético, pois são normalmente biodegradáveis, deixando menos resíduos tóxicos no meio ambiente. Diante da necessidade de pesquisas sobre as técnicas de controle biológico em macrófitas aquáticas, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um bioherbicida para controle de macrófitas aquáticas infestantes, a partir de um microrganismo do banco de microrganismos do Laboratório de Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul -campus Erechim denominado GaO. As macrófitas aquáticas são vegetais visíveis a olho nu, cujas partes fotossinteticamente ativas estão permanentemente, ou por diversos meses, ou parcialmente submersas em água doce ou salobra, ou ainda flutuantes na mesma abrangendo as chamadas restritas e as de senso amplo, como o caso das anfibias, encontradas na interface água-terra. Para execução foram utilizadas as macrófitas aquáticas *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Salvinia herzogii* multiplicadas em reservatórios na Universidade Federal da Fronteira Sul - Erechim. O bioherbicida foi produzido a partir de fermentação submersa através do uso de frascos agitados, contendo 150 mL de meio de cultura contendo Glicose, Extrato de Levedura, Peptona, Sulfato de Amônio, Sulfato Ferroso, Sulfato de Magnésio e Sulfato de Manganês, a fermentação foi realizada a temperatura de 28°C em agitador orbital a 120 rpm, permanecendo por 72 horas nestas condições. A aplicação do bioherbicida se deu na superfície das macrófitas com o auxílio de borrifadores pois o extrato foi utilizado na forma filtrada, sendo a aplicação realizada em casa de vegetação. A avaliação de fitointoxicação das plantas foi puramente visual aos 7, 15 e 21 dias após a aplicação, dando-se notas de injúrias de acordo com a Sociedade Brasileira de Ciência das Plantas Daninhas. Além disso foram avaliadas as atividades enzimáticas do extrato, sendo elas Peroxidase, Amilase, Lipase e Celulase. Diante dos testes o fungo utilizado para produção do bioherbicida ocasionou uma porcentagem satisfatória de danos na macrófita *Pistia stratiotes* aos 15 dias após aplicação, reduzindo assim seu crescimento e consequentemente sua capacidade de ocasionar danos no ambiente que estão inseridas. Em relação as atividades enzimáticas presentes no extrato, sendo a que mais se

ANEXO M – OUTRAS PRODUÇÕES REFERENTES AO PERÍODO DE MESTRADO (2019-2021)

Outras publicações e atividades podem ser visualizadas no Currículo Lattes:
<http://lattes.cnpq.br/9135334742696046>

Publicação de livro com corpo editorial

Treichel, H.; Fongaro, G.; Scapini, T.; **CAMARGO, A. F.**; Stefanski, F.S.; Venturin, B (Org.) *Utilising Biomass in Biotechnology: A Circular Approach discussing the Pretreatment of Biomass, its Applications and Economic Considerations*. Green Energy and Technology. 1. ed. Springer International Publishing, 2020. doi.org/10.1007/978-3-030-22853-8

Publicação de capítulo de livro com corpo editorial

Bonato, C.; Venturin, B.; Mayer, D. A.; Bazoti, S.; Mulinari, J.; **CAMARGO, A. F.**; Scapini, T.; Muller, C.; Fongaro, G.; Treichel, H. *Introduction on Bioethanol*. In: Helen Treichel; Sérgio Luiz Alves Júnior; Gislaïne Fongaro; Caroline Muller. (Org.). *Ethanol as a Green Alternative Fuel: Insight and Perspectives*. 1ed. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2019, v.1, p.1-20.

Scapini, T.; Favaretto, D.C.; **CAMARGO, A. F.**; Czapela, F. F.; Bonatto, C.; Zanivan, J.; Dalastra, C.; Klanovicz, N.; Souza, T.; Muller, C.; Fongaro, G.; Treichel, H. *Bioethanol from Fruit Residues*. In: Helen Treichel; Sérgio Luiz Alves Júnior; Gislaïne Fongaro; Caroline Müller. (Org.). *Ethanol as a Green Alternative Fuel: Insight and Perspectives*. 1ed. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2019, v.1, p. 139-176.

Alves Junior, S.; Muller, C.; **CAMARGO, A. F.**; Bonatto, C.; Scapini, T.; Fongaro, G.; Treichel, H. *Bioprospecting Enzymes for 2G Ethanol through Metagenomics*. In: Helen Treichel; Sérgio Luiz Alves Júnior; Gislaïne Fongaro; Caroline Müller. (Org.). *Ethanol as a Green Alternative Fuel: Insight and Perspectives*. 1ed. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2019, v.1, p. 177-198.

CAMARGO, A. F.; Scapini, T.; Stefanski, F. S.; Kubeneck, S.; Preczeski, K. P.; Bonatto, C.; Bordin, E. R.; Muller, C.; Fongaro, G.; Treichel, H. *Reducing the Water Footprint of Bioethanol*. In: Helen Treichel; Sérgio Luiz Alves Júnior; Gislaïne Fongaro; Caroline Müller. (Org.). *Ethanol as a Green Alternative Fuel: Insight and Perspectives*. 1ed. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2019, v.1, p. 199-220.

Stefanski, F. S.; Scapini, T.; **CAMARGO, A. F.**; Dalastra, C.; Klanovicz, N.; Preczeski, K. P.; Czapela, F. F.; Kubeneck, S.; Fongaro, G.; Treichel, H. *Treatment and Uses of Biogas and Bioethanol Wastewater*. In: Adriana Magdalena (Org.). *Wastewater Treatment: Processes, Uses and Importance*. 1ed. Nova York: Nova Science Publishers, 2019, v. 1, p. 95-144.

Knoblauch, P. M.; Dalastra, C.; Stefanski, F. S.; Zanivan, J.; Klanovicz, N.; Kubeneck, S.; Rosa, G. A.; Reis, P.; **CAMARGO, A. F.**; Scapini, T.; Bonatto, C.; Lanna, M. C. S.; Rogovski, P.; Cadamuro, R. D.; Michelon, W.; Viancelli, A.; Treichel, H.; Fongaro, G. *Potencialidades brasileiras na integração de reuso de água e produção bioenergética na visão de economia circular*. In: Jaqueline Fonseca Rodrigues. (Org.). *Inovação, gestão e sustentabilidade 2*. 1ed. Ponta Grossa, Paraná: Atena, 2019, v. 2, p. 188-203.

Scapini, T.; **CAMARGO, A. F.**; Stefanski, F. S.; Klanovicz, N.; Pollon, R.; Zanivan, J.; Fongaro, G.; Treichel, H. *Enzyme-Mediated Enhanced Biogas Yield*. In: Helen Treichel; Gislaïne Fongaro. (Org.). *Improving Biogas Production*. 1ed. Suíça: Springer International Publishing, 2019, v. 9, p. 45-68.

Rodriguez-Lazaro, D.; **CAMARGO, A.F.**; Scapini, T.; Bonatto, C.; Spilki, F.R.; Lanna, M. C. S.; Hernandez, M.; Fongaro, G. *Digester Slurry Management: The “One Health” Perspective*. In: Helen Treichel; Gislaïne Fongaro. (Org.). *Improving Biogas Production*. 1ed. Suíça: Springer International Publishing, 2019, v. 9, p. 243-256.

Scapini, T.; **CAMARGO, A. F.**; Bonatto, C.; Stefanski, F. S.; Dalastra, C.; Zanivan, J.; Viancelli, A.; Michelon, W.; Fongaro, G.; Treichel, H. *Sustainability of Biorefineries: Challenges Associated with Hydrolysis Methods for Biomass Valorization*. Clean Energy Production Technologies. 1ed.: Springer Singapore, 2020, v. 1, p. 255-272.

Bonatto, C.; **CAMARGO, A. F.**; Scapini, T.; Stefanski, F. S.; Alves Junior, S.; Muller, C.; Fongaro, G.; Treichel, H. *Biomass to bioenergy research: current and future trends for biofuels*. In: Vijai Kumar Gupta; Helen Treichel; Ramesh Chander Kuhad; Susana Rodriguez-Cout. (Org.). *Recent Developments in Bioenergy Research*. 1ed. United State: Elsevier B. V, 2020, v. 1, p. 1-18.

Colla, L. M.; Kreling, N. E.; Nazari, M. T.; Manfredini, P.; Machado, T. S.; Costa, J. A. V.; Scapini, T.; **CAMARGO, A. F.**; Preczeski, K. P.; Stefanski, F. S.; Calvacante, B. D. M.; Fongaro, G.; Treichel, H. *Use and Applications of Aspergillus niger for the Development of Enzymes and Products of Biotechnological Interest*. In: Eva Baughan. (Org.). *Aspergillus niger: Pathogenicity, Cultivation and Uses*. 1ed. Nova York: Nova Science Publishers, 2020, v.1, p. 123- 160.

Treichel, H.; Golunski, S.; **CAMARGO, A. F.**; Scapini, T.; Modlovski, T. A.; Venturin, B.; Bordin, E. R.; Rossetto, V.; Mossi, A. J. *Research and Production of Microbial Functional Sugars and Their Potential for Industry*. In: Gustavo Molina, Vijai Kumar Gupta, Brahma N. Singh, Nicholas Gathergood. (Org.). *Bioprocessing for Biomolecules Production*. 1ed.: Wiley, 2020, v.1, p. 239-254.

Tápparo, D. C.; Rodríguez-Lázaro, D.; Hernández, M.; **CAMARGO, A. F.**; Bonatto, C.; Maia, G.; Rogoviski, P.; Dadamuro, R. D.; Soratto, T. A. T.; Scapini, T.; Stoco, P. H.; Wagner, G.; Kunz, A.; Michelon, W.; Viancelli, A.; Treichel, H.; Fongaro, G. *Wastewater Treatment for Bioenergy Purposes Using a Metaproteomic Approach*. In: Maulin P. Shah; Angana Sarkar; Sukhendu Mandal. (Org.). *Wastewater Treatment*. 1ed.: Elsevier, 2021, v. 1, p. 253-278.

Publicação de artigo científico

Astolfi, V.; Astolfi, A. L.; Mazutti, M. A.; Rigo, E.; Luccio, M.; **CAMARGO, A. F.**; Dalastra, C.; Kubeneck, S.; Fongaro, G.; Treichel, H. *Cellulolytic enzymes production from agricultural residues for biofuels purpose on circular economy approach*. BIOPROCESS AND BIOSYSTEMS ENGINEERING, v. 42, p. 677-685, 2019.

Stefanski, F. S.; Scapini, T.; **CAMARGO, A. F.**; Zanivan, J.; Preczeski, K. P.; Fongaro, G.; Treichel, H. *Low power and short time under ultrasonic effect increase the inulinase activity*. BRAZILIAN JOURNAL OF DEVELOPMENT, v. 5, p. 2914-2927, 2019.

Paris Junior, O.; Scapini, T.; **CAMARGO, A. F.**; Venturin, B.; Dalastra, C.; Kubeneck, S.; Czapela, F. F.; Preczeski, K. P.; Stefanski, F. S.; Korf, E. P.; Valerio, A.; Luccio, M.; Mossi, A. J.; Fongaro, G.; Treichel, H. *Removal of chromium from wastewater by swine hair residues applied as a putative biofilter*. ENVIRONMENTAL SCIENCE AND POLLUTION RESEARCH, v. 26, p. 33014-33022, 2019.

Alves Junior, S.; Muller, C.; Bonatto, C.; Scapini, T.; **CAMARGO, A. F.**; Fongaro, G.; Treichel, H. *Bioprospection of Enzymes and Microorganisms in Insects to Improve Second-Generation Ethanol Production*. INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY, v. 15, p. 336-349, 2019.

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.; Buffon, J. G.; 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, 2019.

Preczeski, K. P.; Dalastra, C.; Czapela, F. F.; Kubeneck, S.; Scapini, T.; **CAMARGO, A. F.**; Zanivan, J.; Bonatto, C.; Stefanski, F. S.; Venturin, B.; Fongaro, G.; Treichel, H. *Fusarium oxysporum and Aspergillus sp. as keratinase producers using swine hair from agroindustrial residues*. FRONTIERS IN BIOENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY, v. 8, p. 1-8, 2020.

Modkovski, T. A.; Scapini, T.; Dalastra, C.; Kubeneck, S.; **CAMARGO, A. F.**; Bordin, E. R.; Venturin, B.; Jacques, R. J. S.; Andrade, N.; Belle, C.; Haminiuk, C. W. I.; Fongaro, G.; Treichel, H. *Hexavalent chromium*

removal based on biological treatment using filamentous fungi: sustainable biotechnology and environmentally friendly. *INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY*, v. 16, p. 125-132, 2020.

Tapparo, D. C.; Rogovski, P.; Cadamuro, R. D.; Souza, D. S. M.; Bonatto, C.; **CAMARGO, A. F.**; Scapini, T.; Stefanski, F. S.; AmaraL, A.; Kunz, A.; Hernandez, M.; Treichel, H.; Rodriguez-Lazaro, D.; Fongaro, G. *Nutritional, energy and sanitary aspects of swine manure and carcass co-digestion*. *FRONTIERS IN BIOENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY*, v. 8, p. 1-13, 2020.

Soares, C. A.; Viancelli, A.; Michelon, W.; Sbardelotto, M.; **CAMARGO, A. F.**; Vargas, G. D. L. P.; Fongaro, G.; Treichel, H. *Biogas yield prospection from swine manure and placenta in real-scale systems on circular economy approach*. *BIOCATALYSIS AND AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY*, v. 25, p. 101598, 2020.

Gaspareto, T. C.; Scapini, T.; Venturin, B.; Tapparo, D. C.; **CAMARGO, A. F.**; Luccio, M. D.; Valerio, A.; Favretto, R.; Antes, F. G.; Steinmetz, R. L. R.; Treichel, H.; Kunz, A. *Pre-treatment strategies for value addition in poultry litter*. *FRONTIERS IN BIOENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY*, v. 8, p. 1-11, 2020.

Fongaro, G.; Maia, G. A.; Rogovski, P.; Cadamuro, R. D.; Lopes, J. C.; Moreira, R. S.; **CAMARGO, A. F.**; Scapini, T.; Stefanski, F. S.; Bonatto, C.; Souza, D. S. M.; Stoco, P. H.; Duarte, R. T. D.; Da Cruz, A. C. C.; Wagner, G.; Treichel, H. *Extremophile Microbial Communities and Enzymes for Bioenergetic Application Based on Multi-Omics Tools*. *CURRENT GENOMICS*, v. 21, p. 1, 2020.

Viancelli, A.; Michelon, W.; Rogovski, P.; Cadamuro, R. D.; Souza, E. B.; Fongaro, G.; **CAMARGO, A. F.**; Stefanski, F. S.; Venturin, B.; Scapini, T.; Bonatto, C.; Preczeski, K. P.; Klanovicz, N.; Oliveira, D.; Treichel, H. *A review on alternative bioprocesses for removal of emerging contaminants*. *BIOPROCESS AND BIOSYSTEMS ENGINEERING*, v. 43, p. 2117-2129, 2020.

Czapela, F. F.; Kubeneck, S.; Preczeski, K. P.; Dalastra, C.; Scapini, T.; Bonatto, C.; Stefanski, F. S.; **CAMARGO, A. F.**; Zanivan, J.; Mossi, A. J.; Fongaro, G.; Treichel, H. *Reactional Ultrasonic Systems and Microwave Irradiation for Pretreatment of Agro-Industrial Waste to Increase Enzymatic Activity*. *BIORESOURCE AND BIOPROCESSING*, v. 7, p. 1-13, 2020.

Klanovicz, N.; Warken, A.; Paliga, L.; **CAMARGO, A. F.**; Scapini, T.; Buffon, J. G.; Fongaro, G.; Teixeira, A. C. S. C.; Treichel, H. *One-step procedure for peroxidase concentration, dye separation, and color removal by aqueous two-phase system*. *ENVIRONMENTAL SCIENCE AND POLLUTION RESEARCH*, v. 1, p. 1, 2020.

Resumos publicados em anais de congressos

Bonatto, C.; Zanivan, J.; Dalastra, C.; Scapini, T.; **CAMARGO, A.F.**; Stefanski, F. S.; Bazoti, S.; Fongaro, G.; Oliveira, D.; Treichel, H. *Reducing the water footprint in ethanol production using wastewater from shrimp production*. In: I Congresso Internacional de Ambiente e Desenvolvimento, 2020, Lajeado. Anais do I Congresso Internacional de Ambiente e Desenvolvimento, 2020.

Pomagerski, J. F.; Scapini, T.; **CAMARGO, A. F.**; Bonatto, C.; Dalastra, C.; Kubeneck, S.; Treichel, H.; Silveira, S. M. *Potencial de resíduos de frutas como substrato na produção de amilase pelo fungo *Aspergillus niger**. In: VII Simpósio em Ciência e Tecnologia Ambiental e III Encontro Multidisciplinar em Ciências Ambientais da Fronteira Sul, 2020, Erechim-RS. Anais do VII Simpósio em Ciência e Tecnologia Ambiental e III Encontro Multidisciplinar em Ciências Ambientais da Fronteira Sul, 2020.

Scapini, T.; Bonatto, C.; Dalastra, C.; Zanivan, J.; Bazoti, S.; **CAMARGO, A.F.**; Alves Junior, S.; Fongaro, G.; Treichel, H. *Produção de etanol de segunda geração utilizando resíduos de melancia como substrato*. In: VII Simpósio em Ciência e Tecnologia Ambiental e III Encontro Multidisciplinar em Ciências Ambientais da Fronteira Sul, 2020, Erechim-RS. Anais do VII Simpósio em Ciência e Tecnologia Ambiental e III Encontro Multidisciplinar em Ciências Ambientais da Fronteira Sul, 2020.

Scapini, T.; Bragagnolo, L.; **CAMARGO, A.F.**; Ulrich, A.; Zonin, V. J. *Abordagem teórico-prática de modelos de gestão ambiental: uma comparação entre empresas pública e privada*. In: VII Simpósio em Ciência e Tecnologia Ambiental e III Encontro Multidisciplinar em Ciências Ambientais da Fronteira Sul, 2020, Erechim-RS. Anais do VII Simpósio em Ciência e Tecnologia Ambiental e III Encontro Multidisciplinar em Ciências Ambientais da Fronteira Sul, 2020.

Ulrich, A.; Muller, C.; Lerin, L.; **CAMARGO, A.F.**; Diering, N. L.; Teles, L. O.; Devenz Junior, E.; Borghelot, F.; Weirich, S.; Mossi, A. J. *Avaliação da resistência de Trichoderma koningiopsis expostos a herbicidas sintéticos comerciais*. In: VI Simpósio de Ciência e Tecnologia Ambiental e II Encontro Multidisciplinar em Ciências Ambientais da Fronteira Sul, 2019, Erechim-RS. Anais do VI Simpósio de Ciência e Tecnologia Ambiental e II Encontro Multidisciplinar em Ciências Ambientais da Fronteira Sul, 2019. p. 13-14.

Calvacante, B. D. M.; Scapini, T.; Bonatto, C.; Zanivan, J.; **CAMARGO, A. F.**; Dalastra, C.; Souza, T.; Fongaro, G.; Treichel, H.; Piero, R. M. *Potencial de fungos isolados de frutas para produção de pectinase*. In: VI Simpósio de Ciência e Tecnologia Ambiental e II Encontro Multidisciplinar em Ciências Ambientais da Fronteira Sul, 2019, Erechim-RS. Anais do VI Simpósio de Ciência e Tecnologia Ambiental e II Encontro Multidisciplinar em Ciências Ambientais da Fronteira Sul, 2019. p. 26-26.

Stefanski, F. S.; **CAMARGO, A. F.**; Scapini, T.; Michelin, W.; Giacomel, D.; Doninelli, J. W.; Fongaro, G.; Mossi, A. J.; Treichel, H. *Análise da produção enzimática de Trichoderma koningiopsis em escala piloto usando biomassa de microalgas como substrato*. In: VI Simpósio de Ciência e Tecnologia Ambiental e II Encontro Multidisciplinar em Ciências Ambientais da Fronteira Sul, 2019, Erechim-RS. Anais do VI Simpósio de Ciência e Tecnologia Ambiental e II Encontro Multidisciplinar em Ciências Ambientais da Fronteira Sul, 2019. p. 55-55.

Klanovicz, N.; Warken, A.; Paliga, L.; **CAMARGO, A. F.**; Scapini, T.; Buffon, J. G.; Fongaro, G.; Treichel, H. *Avaliação da estabilidade de enzimas oxirredutoras com potencial aplicação em reações de interesse ambiental*. In: VI Simpósio de Ciência e Tecnologia Ambiental e II Encontro Multidisciplinar em Ciências Ambientais da Fronteira Sul, 2019, Erechim-RS. VI Simpósio de Ciência e Tecnologia Ambiental e II Encontro Multidisciplinar em Ciências Ambientais da Fronteira Sul, 2019. p. 103-103.

Klanovicz, N.; **CAMARGO, A.F.**; Warken, A.; Paliga, L.; Scapini, T.; Stefanski, F. S.; Zanivan, J.; Buffon, J. G.; Fongaro, G.; Treichel, H. *Valuation of non-commercial peroxidases by enzymatic concentration aiming application in environmental interest reactions*. In: Biopartitioning & Purification Conference 2019, 2019, Guarujá, SP. Abstract Book - Biopartitioning & Purification Conference 2019, 2019.