



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

VANUSA ROSSETTO

Produção e aplicação de bioherbicida obtido a partir de *Trichoderma koningiopsis*

ERECHIM – RS

2018

VANUSA ROSSETTO

Produção e aplicação de bioherbicida obtido a partir de *Trichoderma koningiopsis*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientador. Prof. Dr^a. Helen Treichel

**ERECHIM
2018**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL – CAMPUS ERECHIM

ERS 135 – Km 72, nº200

CEP:99700-970

CAIXA Postal 764

Zona Rural

Erechim – RS

Brasil

VANUSA ROSSETTO

Produção e aplicação de bioherbicida obtido a partir de *Trichoderma koningiopsis*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS. Para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental defendido em banca examinadora em ___/___/20__

Orientador (a): Prof. Dr.^a Helen Treichel

Aprovado em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.^a Helen Treichel - UFFS

Prof. Dr. Altemir José Mossi - UFFS

Prof. Dr.^a Rosilene Rodrigues Kaizer Perin - IFRS

Prof. Dr.^a Daniela dos Santos de Oliveira - URI

Erechim/RS, agosto de 2018

Dedico a minha mãe Dilce Rossetto.

AGRADECIMENTOS

Minha eterna gratidão a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho. A família LAMIBI, em especial a Aline Frumi Camargo e Eduarda Roberta Bordin, pela ajuda, apoio e incentivo, ao Laboratório de Agroecologia, em especial a Sabrina Weirich e Carine Carezia. A minha família por me apoiar em todas as minhas escolhas. Aos meus amigos que tornam minha caminhada mais feliz, em especial a Renata Baldessarini, a qual a ajuda mútua vem desde a graduação e prevalece no mestrado. Aos meus professores (Tais Bernanrdi, Rosilene Kaiser Perin e Raquel Breitenbach) que ao longo da minha formação profissional me incentivaram a buscar sempre o melhor de mim. Ao meu co-orientador Altemir José Mossi e minha querida Gislaine Fongaro pelas contribuições fundamentais ao trabalho. Enfim, meu carinho e gratidão, em especial, a minha orientadora Helen Treichel, pelo apoio, compreensão e conhecimentos transmitidos, me inspirando.

RESUMO

O uso de herbicidas químicos para o controle de plantas daninhas tem gerado diversos problemas ao longo dos anos, como a contaminação dos ecossistemas, contaminação alimentar, a possível contaminação dos aplicadores, e ao surgimento de biótipos de plantas resistentes a diversos mecanismos de ação. Neste trabalho, buscou-se a otimização do biocomposto a base de *Trichoderma koningiopsis*, utilizando a estratégia sequencial de planejamento de experimentos (Plackett & Burmman e Delineamento experimental composto rotacional DCCR 2³). Assim, foram estudadas diversas variáveis (pH, glicose, extrato de levedura, peptona, sulfato de amônio, sulfato de magnésio, sulfato ferroso e sulfato de manganês) buscando condições estatisticamente significativas na produção da biomassa fúngica e nas atividades enzimáticas de amilases, peroxidases, lipases e celulases. Sendo que o extrato de levedura apresentou significância negativa para celulases e amilases, porém o mesmo apresentou significância positiva na atividade de peroxidases e biomassa. Considerando os resultados obtidos no planejamento experimental, selecionou-se os ensaios 2 (maior atividade de amilase e celulase) e 12 (maior atividade de peroxidases e rendimento de biomassa fúngica) que apresentaram melhores características para serem utilizados como bioherbicida, para serem aplicados em plantas daninhas previamente selecionadas: leiteiro (*Euphorbia heterofila*), picão preto (*Bidens pilosa*) e papuã (*Urochloa plantaginea*). As aplicações ocorreram quando, as plantas apresentavam duas a três folhas e as avaliações da fitotoxicidade nas plantas, visivelmente, atribuindo notas de injúrias apresentadas sobre as folhas das plantas. Dentre estas plantas, o leiteiro (*Euphorbia heterophylla*), foi o que apresentou maior susceptibilidade, aos biocompostos, sendo que a aplicação do ensaio 2 implicou em maior efeito fitotóxico, causando danos de até 90% na área foliar quando utilizado na sua forma não filtrada. Já a aplicação do ensaio 12 implicou até 60% de danos na área foliar do leiteiro. Um estudo para a seleção de linhagens de *T. koningiopsis* resistentes ou tolerantes a herbicidas químicos (glifosato, glufosinato de amônio, 2,4-D e atrazina) foi realizado, utilizando esporos fúngicos, cultivados em meio BDA e discos de papel filtro embebidos em diferentes concentrações destes herbicidas já citados. O crescimento de *T. koningiopsis* apresentou-se resistente na maioria das concentrações, não sendo perturbado pela presença do glifosato, demonstrando-se tal fungo resistente a este herbicida químico. Em seguida *T. koningiopsis* tolerantes ou resistentes igualmente foram avaliados nas condições do ensaio 2, contendo agora glifosato, atrazina, 2,4-D e glufosinato de amônio. Assim pode-se perceber, que quando exposto a atrazina houve maior produção de amilases (20,65 U/mL), já na exposição com glufosinato de amônio houve maior atividade de peroxidases (69 U/mL), enquanto a atividade de lipases e celulases foram reduzidas. No que se referiu a biomassa fúngica, todos os tratamentos na presença de herbicidas químicos, apresentaram aumento micelial em relação ao controle negativo (sem herbicida). Os testes demonstram o potencial uso de *T. koningiopsis* como um controlador de plantas daninhas, possuindo ainda, potencial efeito sinérgico com herbicidas químicos, o que sugere sua aplicação como bioherbicida.

Palavras-chave: Planejamento de experimentos; Bioherbicidas; Atividades enzimáticas; Biomassa.

ABSTRACT

The use of chemical herbicides to control weeds has generated several problems over the years, such as the contamination of ecosystems, food contamination, possible contamination of the applicators, and the emergence of plant biotypes resistant to several mechanisms of action. In this work, the optimization of the biocomposite based on *Trichoderma koningiopsis* was done using the sequential strategy of experiment planning (Plackett & Burmman and Composite Experimental Rotational Design CERD 2³). Thus, several variables (pH, glucose, yeast extract, peptone, ammonium sulfate, magnesium sulfate, ferrous sulfate and manganese sulphate) were studied for statistically significant conditions in the production of fungal biomass and in the enzymatic activities of amylases, peroxidases, lipases and cellulases. As the yeast extract presented negative significance for cellulases and amylases, however, it showed a positive significance in the activity of peroxidases and biomass. Considering the results obtained in the experimental design, the trials 2 (higher amylase and cellulase activity) and 12 (higher peroxidase activity and fungal biomass yield) were selected, which presented better characteristics to be used as bioherbicide, to be applied in plants previously selected weeds: *Euphorbia heterofila*, *Bidens pilosa* and *Urochloa plantaginea*. The applications occurred when the plants had two to three leaves and the evaluations of plant phytotoxicity, visibly assigning notes of injuries presented on the leaves of the plants. Among these plants, *Euphorbia heteropylla* was the one that presented the highest susceptibility to the biocomposites, being that the application of the test 2 implied a greater phytotoxic effect, causing damages of up to 90% in the leaf area when used in its unfiltered form. However, the application of test 12 implied up to 60% of damages in the leaf area of the milkman. A study for the selection of resistant or tolerant chemical herbicide tolerant strains of *T. koningiopsis* (glyphosate, ammonium glufosinate, 2,4-D and atrazine) was carried out using fungal spores grown in BDA medium and filter paper disks embedded in different concentrations of these herbicides. The growth of *T. koningiopsis* was resistant in most concentrations, not being disturbed by the presence of glyphosate, demonstrating such fungus resistant to this chemical herbicide. Then tolerant or resistant *T. koningiopsis* were also evaluated under assay 2 conditions, now containing glyphosate, atrazine, 2,4-D and ammonium glufosinate. Thus, when exposed to atrazine, there was a higher amylase production (20.65 U / mL), whereas in the exposure with glufosinate ammonium there was a higher activity of peroxidases (69 U / mL), while the activity of lipases and cellulases were reduced. In terms of fungal biomass, all treatments in the presence of chemical herbicides, presented mycelial increase in relation to the negative control (without herbicide). The tests demonstrate the potential use of *T. koningiopsis* as a weed control, with a potential synergistic effect with chemical herbicides, which suggests its application as a bioherbicide.

Keywords: Experiment planning; Bioherbicides; Enzymatic activities; Biomass.

Sumário

1.INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3. JUSTIFICATIVA.....	13
4. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
4.1 PLANTAS DANINHAS.....	14
4.2 PERÍODO CRÍTICO DE COMPETIÇÃO.....	16
4.3 CONTROLE E MANEJO DE PLANTAS DANINHAS.....	17
4.3.1 Controle preventivo.....	18
4.3.2 Controle cultural.....	18
4.3.3 Controle mecânico.....	19
4.3.4 Controle químico.....	19
4.3.5 Controle biológico.....	19
4.4 TRICHODERMA KONINGIOPSIS E ENZIMAS DE INTERESSE AGRONÔMICO.....	20
5. METODOLOGIAS.....	22
5.1 REPIQUE DOS MICRORGANISMOS.....	23
5.2 OBTENÇÃO DO BIOCOMPOSTO.....	24
5.3 QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA FÚNGICA.....	25
5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	26
5.4.1 Atividade de celulases.....	26
5.4.2 Atividade de peroxidases.....	26
5.4.3 Atividade de lipases.....	27
5.4.4 Atividade de amilases.....	27
5.5 APLICAÇÃO DOS BIOCOMPOSTOS OTIMIZADOS.....	28
5.6 TESTE DE RESISTÊNCIA DE <i>T. KONINGIOPSIS</i> FRENTE À HERBICIDAS	28

5.7 ENSAIO PRESUNTIVO DE SINERGISMO ENTRE BIOCOMPOSTO E HERBICIDAS COMERCIAIS	29
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6.1 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO	30
6.2 BIOMASSA	37
6.3 AMILASES.....	40
6.4 CELULASES	41
6.5 PEROXIDASES	44
6.6 LIPASES	45
6.7 APLICAÇÃO DOS BIOCOMPOSTOS OTIMIZADO	48
6.8. RESISTÊNCIA DE <i>TRICHODERMA KONINGIOPSIS</i> À HERBICIDAS COMERCIAIS	51
6.9 MISTURA DOS BIOCOMPOSTOS COM HERBICIDAS SINTÉTICOS.....	52
7. CONCLUSÕES	53
8. PERSPECTIVAS DO ESTUDO	54
9.REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

O aumento da demanda por alimentos impulsionam o crescimento de áreas cultivadas em substituição a vegetação nativa, assim como a busca pela alta produtividade dessas áreas (CORDEIRO et al., 2014). Para tanto, a agricultura moderna, faz-se uso de diferentes produtos químicos, porém, o uso inadequado e intensivo destes, acaba prejudicando o ambiente e pessoas (SILVA et al., 2007).

A utilização de herbicidas sintéticos, no meio agrícola teve início no final da década de 40, mas foi a partir da chamada “Revolução Verde” (década de 60), que o emprego de agrotóxicos passou a ser amplamente utilizado (ACCINELLI et al., 2014). Sendo o Brasil um grande produtor e exportador de produtos agrícolas, o uso de produtos químicos é o método mais utilizado para o controle das plantas daninhas.

Em média 15% da produção mundial de grãos é perdida devido a competição de plantas daninhas com as culturas de interesse (BAYER, 2018), o uso indiscriminado de herbicidas têm acarretado uma série de problemas ambientais, como contaminação das águas (superficiais e subterrâneas), contaminação do solo, animais e pessoas, bem como o surgimento de plantas resistentes a esta tecnologia (HEAP, 1997; CORDEAU et al., 2016).

Atualmente, no mundo, estão registradas 252 espécies de plantas daninhas resistentes a herbicidas, sendo 44 espécies presentes no Brasil, cerca de 20% do total (EMBRAPA/BR, 2018).

A resistência de plantas daninhas a herbicidas é uma preocupação crescente, especialmente porque faltam novos mecanismos de ação (MOSS et al., 2019). Em nível global sabe-se que há 255 espécies de plantas daninhas a serem controladas, afetando assim a eficácia dos 163 diferentes herbicidas, estes com 26 locais conhecidos de ação (HEAP, 2018).

O glifosato é o herbicida mais comercializado mundialmente, devido aos seus efeitos de amplo espectro, eficácia e baixa toxicidade em mamíferos (TAO et al., 2017). Este herbicida atua na inibição da enzima **5-enolpiruvatochiquímato-3-fosfato sintase** (EPSPS), bloqueando assim, a síntese de compostos na via do ácido chiquímico (AMRHEIN et al., 1980), atualmente muitas espécies de plantas daninhas tornaram-se tolerante ou resistente a esta tecnologia.

O herbicida 2,4-D é uma auxina que causa distúrbio no equilíbrio hormonal da planta causando sua morte, usado em pós emergência para controle de plantas de folhas

largas (GROSSMANN, 2009). Já o herbicida pós emergente a base do sal de amônio (glufosinato) atua de forma sistêmica, inibindo irreversivelmente a glutamina sintase (MANDERSCHIED & WILD, 1986). O atrazina é um herbicida seletivo amplamente utilizado na produção agrícola, pois controla plantas daninhas de folha larga e algumas gramíneas, sendo este um produto bastante tóxico ao ambiente e mamíferos (BARBERIS et al., 2018).

A resistência das plantas daninhas a diferentes mecanismos de ação eleva os custos de produção nas lavouras de grãos, segundo dados da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, somente no Rio Grande do Sul, biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) e de buva (*Conyza bonariensis*) resistentes ao glifosato estavam presentes em mais de 85% das lavouras de soja na safra de 2015, ocasionando custos adicionais e perdas no rendimento de grãos que está entre 155 e 610 milhões de reais por ano.

Assim sendo, o controle de plantas daninhas é considerado uma prática essencial no desempenho das culturas agrícolas, e em virtude do aumento da agricultura orgânica, e a pressão ambiental, tem-se a necessidade de desenvolvimento de novos produtos, que sejam mais “amigáveis” ao ambiente, que não causem danos à saúde humana e auxiliem no controle de plantas daninhas resistentes a herbicidas sintéticos (PANNACCI et al., 2014).

Nesse contexto, destaca-se o uso de produtos biológicos, como os bioherbicidas, que são elaborados a partir de substâncias naturais já presentes no meio ambiente, sendo por exemplo, produzidos por fungos fitopatogênicos (ASH, 2010.; CHARUDATTAN, 2001).

Um dos microrganismos bastante utilizados no controle biológico é o fungo do gênero *Trichoderma* spp. Isso se deve tanto pela sua ação fitopatogênica, como pelo seu antagonismo contra outros fitopatógenos do solo, como: fungos, invertebrados e bactérias, pois além de produzir metabólitos secundários fitotóxicos como gliovirina, gliotoxina, viridiana e viridiol, possuem crescimento e fisiologia considerados agressivos para as plantas (VERMA et al., 2007.; JONES et al., 1988).

Estudos realizados por Reichert (2017) mostram que, o fungo *Trichoderma koningiopsis*, possui grandes características bioherbicidas, demonstrando patogenicidade para a planta daninha leiteiro (*Euphorbia heterophylla*). Este fungo foi isolado, de plantas da espécie *Digitaria horizontalis*, popularmente conhecido como milhã,

coletadas no município de Quatro Irmãos-RS, sendo que estas plantas apresentavam injúria visível.

Embora cada vez mais se tenha pesquisado a respeito de bioherbicidas, poucos estudos tentam entender os modos de ação que afetam ou impulsionam as interações entre microrganismos e/ou metabólitos secundários com a plantas alvo (BAJWA et al., 2015; HARDING E RAIZADA, 2015).

Assim, este trabalho teve como objetivo, otimizar a produção do biocomposto elaborado por meio da fermentação submersa do fungo *Trichoderma Koningiopsis*, visando seu uso no controle de plantas daninhas considerando seu efeito e este em sinergismo com herbicidas comerciais.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir e aplicar biocomposto obtido a partir de *Trichoderma koningiopsis* e avaliar seu potencial como bioherbicida.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar o processo fermentativo para obtenção de biocompostos com ação bioherbicida;
- Estimular a produção e quantificar celulases, lipases, amilases e peroxidases produzidas por *Trichoderma koningiopsis*;
- Selecionar e propagar *Trichoderma koningiopsis* resistentes e tolerantes a diferentes princípios ativos de herbicidas químicos; determinando massa fúngica e atividade enzimática a partir do fermentado;
- Avaliar o potencial de ação herbicida de biocompostos de *Trichoderma koningiopsis* frente a plantas daninhas.

3. JUSTIFICATIVA

O uso demasiado de agrotóxicos para o controle de plantas daninhas gera diversos problemas, como a contaminação dos ecossistemas, contaminação alimentar, além da possível contaminação dos aplicadores/manipuladores e o surgimento de biótipos de plantas resistentes a esta tecnologia (GALON et al., 2010). Dados da FAO

(*Food and Agriculture Organization*) and ITPS (*The Intergovernmental Technical Panel on Soils*) (2015), mostram um aumento do consumo de dois milhões de toneladas de agrotóxicos por ano, tendo os herbicidas uma parcela de 47,5% do total utilizado de agroquímicos na lavoura.

Sendo o Brasil, um país com uma vasta biodiversidade ambiental, e um dos países líderes no segmento do agronegócio, a otimização e redução do uso de herbicidas sintéticos torna-se de suma importância. Através da busca por novas tecnologias que fomentem a sustentabilidade da produção agrícola e auxiliem a independência do agricultor familiar e da agricultura orgânica (GAZOLLA & SCHNEIDER, 2013). Atualmente, em nível global existem 13 bioherbicidas derivados de microrganismos ou moléculas naturais, que estão sendo comercializados (CORDEAU et al., 2016; CHARUDATTAN 2001), um número relativamente baixo, devido a grande biodiversidade presente em nosso ambiente, devido a isso, há a necessidade de novos estudos que fomentem a elaboração e utilização de bioprodutos.

Nesse sentido, nota-se a necessidade de buscar novas alternativas para o controle das plantas daninhas, visando à obtenção de um produto que auxilie esse controle, conservando o ambiente e a saúde de pessoas.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 PLANTAS DANINHAS

Um conceito amplo de planta daninha é dado por Shaw (1982), que as define como: “toda e qualquer planta que ocorre onde não é desejada”. Já para Blanco (1972), “as plantas daninhas são todas e quaisquer plantas que germinem espontaneamente em áreas de interesse humano, e que de alguma forma interfiram prejudicialmente nas atividades agrícolas do homem”, sendo este, um conceito mais voltado para as atividades agropecuárias.

A competição por espaço, água e nutrientes com as culturas de interesse são a forma mais conhecida de interferência direta das plantas daninhas, bem como, a alelopatia, parasitismo e a depreciação da qualidade do produto colhido (RAO et al., 2018).

As plantas daninhas podem atuar também como hospedeiras alternativas de pragas, moléstias, nematóides e plantas parasitas, interferindo assim, indiretamente, na produção agrícola (PITELLI, 1985).

A competição por água, nutrientes, luz e espaço é muito importante, principalmente nos estádios iniciais de desenvolvimentos das culturas. Na cultura da soja as perdas na produtividade podem ser superiores a 80%, e em casos extremos, inviabilizar a colheita (VARGAS et al., 2006).

As plantas daninhas apresentam características que lhes conferem elevada agressividade, mesmo em ambientes adversos ao desenvolvimento vegetal (VARGAS et al., 2006). Para tanto, desenvolveram uma série de mecanismos adaptativos, dentre estes são: rápida germinação e crescimento inicial, sistema radicular abundante, grande capacidade de absorver nutrientes e água do solo, elevada eficiência no uso da água, grande produtividade e disseminação de propágulos, tornando-se assim plantas de difícil controle e erradicação (PITELLI E PAVANI, 2004).

É necessário entender as interações das culturas econômicas com as plantas que as infestam, para assim desenvolver práticas de manejo para estas plantas daninhas, de forma ecologicamente correta (SARDANA et al., 2017). Utilizar de várias práticas de manejo, bem como a rotação de princípios ativos de herbicidas sintéticos são formas para controlar a resistência dessas plantas aos herbicidas sintéticos (PITELLI, 1987).

Essa resistência é de ocorrência natural, devido as plantas daninhas evoluírem e se adaptarem as mudanças do ambiente e ao uso das tecnologias agrícolas. Já na prática o surgimento da resistência, ocorre pela seleção de biótipos resistentes já existentes na população presente nas áreas agrícolas, em função de aplicações repetidas e de doses não recomendadas pelo fabricante de herbicidas com mesmo princípio ativo, ou seja, com o mesmo mecanismo de ação, durante determinado período de tempo. (ADEGAS et al., 2018).

Em 1993 foram relatados os primeiros casos de resistência a herbicidas no Brasil, relativos às espécies *Bidens pilosa* (picão-preto) e *Euphorbia heterophylla* (leiteiro), resistentes a herbicidas inibidores da enzima acetolactato-sintase (ALS). Estudos realizados por Agostineto et al. (2014) demonstram que há 44 casos de resistência, abrangendo 22 espécies e oito diferentes mecanismos de ação.

Uma das principais consequências desta resistência além da perda da eficiência dos agroquímicos é o aumento dos custos de controle de plantas infestantes nas produções agrícolas e as perdas de produtividade devido à competição das plantas daninhas remanescentes na lavoura (AGOSTINETO et al., 2014).

Paula et al. (2011) evidenciaram em seus trabalhos que a planta daninha azevém (*Lolium multiflorum*) pode causar diminuição direta na produtividade do trigo de 18 a 56% e quando associado a presença de adubação nitrogenada a produtividade pode diminuir até 62%. Em relação a buva (*Conyza bonariensis*), Gazziero et al. (2010) indicam que densidades de 16 a 18 plantas por m² em lavouras de soja, podem causar perdas de produtividade desta cultura de 1.174 e 1.469 kg/ha¹, respectivamente, podendo diminuir até 48% a produtividade.

4.2 PERÍODO CRÍTICO DE COMPETIÇÃO

O período crítico de competição compreende, o tempo a partir da semeadura ou da emergência das culturas de interesse, em que as plantas daninhas devem ser controladas com eficiência para assim, evitar a perda quantitativa e/ou qualitativa da produção (VARGAS, et al., 2006). Este período varia conforme as diferentes culturas e cultivares.

Os fatores que afetam o grau de competição estão relacionados à composição específica, densidade e distribuição das plantas daninhas; em relação a cultura de interesse como: espaçamento, densidade e cultivar; o ambiente em que ocorre a interação (solo, clima e práticas de manejo adotadas) e pela época e duração do período de convivência entre a cultura e as plantas daninhas (PITELLI, 1985).

Na cultura da soja, o período crítico de competição para Durigan et al. (1983) é de 30 a 50 dias após a emergência. Entretanto, Van Acker et al. (1993), constataram que, em média, esta cultura deve estar livre de competição dos 9 aos 38 dias após a emergência, ou seja, quando a cultura encontra-se entre os estádios V2 e R3.

Estudos de Duarte (2009) mostram que a extensão dos períodos de convivência ou período crítico de convivência das plantas daninhas com a cultura da soja, é na maioria das vezes, o fator mais importante no desenvolvimento e rendimento da cultura. Para Fleck (1995), obteve-se um decréscimo de 9 kg ha⁻¹ no rendimento de grãos de soja, por dia de atraso, na eliminação da concorrência provocada pelas plantas daninhas, a partir do 20º dia após a emergência da soja.

O controle de plantas daninhas deve ser eficiente durante o período crítico, pois os estudos mostram que os maiores prejuízos são observados nesse período, evitando assim, que o nível de dano econômico seja atingido, ou seja, as perdas na produtividade

não podem ultrapassar os custos gastos com o controle destas plantas (SILVA et al.; 1999).

Deve-se ter ainda o devido cuidado, pois algumas espécies de plantas daninhas, podem causar problemas consideráveis na colheita (PITELLI e PITELLI, 2004), como por exemplo desgastes na plataforma de corte da colheitadeira.

Assim, tendo o conhecimento do período crítico de interferência de determinada cultura de interesse, tem-se a possibilidade de adotar um manejo alternativo para plantas daninhas, que não necessariamente cause a morte delas, mas que suprima seu desenvolvimento no período crucial do desenvolvimento da produtividade das culturas econômicas.

Ainda um conceito que está ganhando cada vez mais espaço é o desenvolvimento de cultivares ou sistemas de cultivo que são mais capazes de competir com plantas daninhas (WEINER et al., 2001), isso conferindo características as plantas cultivadas como: altura, cobertura precoce do dossel, alta densidade de perfilhos, alto índice de área foliar, orientação vertical da folhas, rápido acúmulo de biomassa no início do crescimento, raízes grande e volumosas, entre outros (SARDANA et al., 2017.; MANSON et al., 2007).

4.3 CONTROLE E MANEJO DE PLANTAS DANINHAS

O controle das plantas daninhas consiste em suprimir seu crescimento ou reduzir o número de plantas daninhas por áreas, até níveis aceitáveis para convivência entre espécies envolvidas, sem prejuízos para as mesmas (VARGAS et al., 2006). Portanto, o manejo eficaz de plantas daninhas é um elemento chave na produção agrícola, essencial para atingir altas produções e assim atender as crescentes demandas alimentares (SARDANA et al., 2017).

O programa de manejo integrado de plantas daninhas utiliza a combinação de todos os vários métodos de controle em conjunto (preventivo, cultural, químico, mecânico e biológico), objetivando reduzir os custos e proteger o ambiente, sem que com isso leve a perdas de produção (VARGAS, 2006). Para que isso seja possível, deve-se conhecer os métodos e características da propriedade.

4.3.1 Controle preventivo

O controle preventivo consiste em reduzir as possibilidades de introdução e disseminação de plantas daninhas, principalmente em áreas ainda não infestadas. Para tanto o agricultor deve usar sementes certificadas, evitar trânsito de animais, pessoas e maquinários de áreas infestadas para áreas livres de plantas daninhas, limpar os equipamentos após o trabalho em áreas com plantas daninhas indesejáveis e controlar essas espécies em canais, margens de lavoura e caminhos (SILVA et al., 1999).

Deve-se ser também o cuidado no uso de fertilizantes orgânicos, pois quando parcialmente humificados também constituem importantes meios de disseminação de plantas daninhas, porém, quando a cura do esterco é bem realizada o ácido lático e acético produzido nesse processo atuam sobre os propágulos destas plantas, eliminando a maioria destes (PITELLI, 1987).

4.3.2 Controle cultural

O controle cultural consiste em usar qualquer condição ambiental ou procedimento que promova o crescimento da cultura de interesse, diminuindo os danos das plantas daninhas (FLECK, 1992).

A escolha de cultivares, com características que potencializem a supressão de plantas daninhas é um método de controle cultural, como cultivares de rápido crescimento que sobream rapidamente a superfície do solo, sistema radicular intenso, entre outras características (HOLT, 1995.; MASON et al., 2007).

A forma de cultivo, também é outro fator de controle cultural de plantas daninhas, por exemplo: em algumas culturas inundadas, como o arroz, a cobertura com a lâmina de água, constitui em um eficiente processo no controle de plantas daninhas. Porém, pequenas porções dessas plantas que conseguem emergir ou plantas daninhas aquáticas podem determinar o fracasso deste controle (PITELLI, 1985).

A manutenção das populações de plantas desejadas através de espaçamento reduzido, plantio em fileiras mais estreitas, pode aumentar a capacidade de uma cultura competir com as plantas indesejadas (SARDANA, et al. 2017). Para Sardana, et al. (2017), aumentar a taxa de semeadura, ou reduzir o espaçamento entre linhas, pode aumentar a competitividade do trigo em suprimir plantas daninhas.

Técnicas como a rotação cultural e plantio direto também possuem influencia negativa na germinação de plantas daninhas, além de proporcionar proteção ao solo e

umentar a sua fertilidade, através da biomassa acumulada (MASILIONYTE et al., 2017).

4.3.3 Controle mecânico

O controle mecânico de plantas daninhas através do arranquio manual. É a forma mais antiga de controle usada pelo homem, mesmo após a introdução no mercado dos herbicidas, o uso de enxada ainda é comum, principalmente em pequenas propriedades (FOSTER, 1991).

São vários os implementos de cultivo que podem ser utilizados, como: cultivadores de disco, lâminas, grades, etc. Dependendo do ciclo de vida das culturas e das plantas daninhas (anual, bienal ou perene), profundidade e distribuição do sistema radicular, idade e magnitude da infestação, tipo de solo e topografia e condições climáticas (PITELLI, 1985).

4.3.4 Controle químico

Os herbicidas são a principal ferramenta usada para o controle de plantas daninhas. As principais vantagens desse controle são a alta eficiência, permite controlar plantas daninhas em épocas chuvosas, quando o controle mecânico é inviável, não causam danos as raízes da cultura, não revolve o solo, controla as plantas daninhas na linha da cultura alvo e são de rápida operação (CHAUHAN et al., 2012).

Entre as desvantagens do uso deste método de controle, destaca-se é o alto potencial poluidor ambiental, muitas vezes tornando-se tóxicos aos consumidores, além do alto custo e de equipamentos adequados a sua aplicação.

A utilização deste método deve ser de forma adequada e racional, os agricultores devem estar atentos para as interações existentes entre as variedades que está sendo empregada, os herbicidas aplicados, o período de carência, a dose recomendada, bem como, a rotação de diferentes princípios ativos, para assim evitar o surgimento de plantas daninhas resistentes aos herbicidas (EMBRAPA, 2009).

4.3.5 Controle biológico

Este método de controle ainda não é muito utilizado no Brasil em grande escala. Consiste na utilização de inimigos naturais, que podem ser: insetos, fungos, bactérias,

ácaros ou outros que predam ou parasitam as plantas daninhas, inibindo seu desenvolvimento ou ainda causando a sua morte (PITELLI, 1985).

Estes produtos biológicos têm sua eficácia aumentada quando são adotados programas de manejo integrado de gestão das plantas daninhas, como capinas, uso de fertilizantes, adjuvantes, entre outros (BAILEY 2014).

O desenvolvimento de bioherbicidas requer ainda investimento e especialização em fermentação microbiana e formulações, sendo os processos e componentes específicos para cada microrganismo (BAILEY et al., 2010).

A utilização de bioprodutos, geralmente visam plantas daninhas específicas em situações específicas, não causando danos as culturas de interesse econômico, eles podem ter como alvo uma única planta daninha ou várias, mas os efeitos potenciais em hospedeiros não alvo são bem compreendidos (BAILEY 2014).

A taxa de sucesso para o registro e comercialização de biocontroles tem sido muito baixa, Charudattan (2001) relatou oito bioherbicidas registrados ou comercializados, a maioria dos quais baseados em fungos e listou mais de 50 exemplos de combinações de plantas com patógenos que foram relatadas com potencial a bioherbicidas.

A fermentação submersa é o sistema mais utilizado industrialmente para a produção de uma variedade de produtos microbianos (GIBBS et al., 2000) e pode ser uma metodologia empregada no desenvolvimento de biopesticidas, a otimização das condições de crescimento fúngico pode ser alcançada através do uso da metodologia de superfície de resposta (BHASKAR et al., 2008).

4.4 *Trichoderma koningiopsis* e ENZIMAS VEGETAIS.

O gênero *Trichoderma* compreende um grande número de linhagens fúngicas filamentosas, sendo a maioria isolados de solos florestais ou agrícolas em todas as latitudes (BROTMAN et al., 2010). Estes fungos apresentam uma esporulação verde típica e algumas espécies possuem um odor característico doce devido a um composto volátil biologicamente ativo o (6-penil- α -pirona) (BROTMAN et al.2010).

Trichoderma é um gênero de fungos com alto potencial biotecnológico, devido a sua capacidade de colonizar diversos substratos sob diferentes condições ambientais, bem como, sua capacidade de secretar uma variedade de enzimas hidrolíticas e metabólitos secundários (NICOLÁS et al., 2017). É utilizado como um agente de

controle biológico em doenças fúngicas de plantas, devido a sua capacidade de antagonizar outros fungos (HOWEEL, 2003).

Vários *Trichodermas* spp, (*T. virens*, *T. atroviride*, *T. asperellum*, entre outros) foram utilizados como agente de controle biológico, devido ao papel antagonista de patógenos de plantas (LORITO et al., 2010). Cepas de *Trichoderma* spp. são ainda conhecidas por interagirem com plantas, resultando em efeitos benéficos como estimulação nos mecanismos de defesa das plantas, promoção de crescimento e desenvolvimento de raízes e conseqüentemente de plantas, germinação de sementes e aumento na absorção de nutrientes (SHORESH et al., 2010; LORITO et al., 2010).

Esses efeitos benéficos induzidos por *Trichoderma* podem ainda ser transferidos para as plantas através da biotecnologia, ou seja, na interação dos genes fúngicos responsáveis por estes efeitos nos genomas das plantas (NICOLÁS et al., 2017). Lorito et al. (1998) utilizou gene que codifica uma endoquitinase fortemente antifúngica de *Trichoderma harzianum*, expressas em plantas (tabaco e batata) para o controle de moléstias.

Trichoderma reesei, teve seu genoma sequenciado, pois este fungo é considerado grande produtor de enzimas degradadoras de biomassa, oferecendo a oportunidade de estudar este microrganismo na produção de enzimas em larga escala genômica, para posterior utilização na degradação de material lignocelulósico renovável para produção de biocombustível (KUBICEK, 2013).

Percebe-se assim que o fungo do gênero *Trichoderma* é bastante estudado devido as suas diferentes características, dentre elas como agente de biocontrole de patógenos e com características a bioherbicida, assim é de fundamental importância entender como estes agentes de biocontrole exercem seus efeitos nas plantas (MASSART & JIJAKLI, 2007). Este fungo em estudo é considerado um micoparasita forte, é atraído e cresce em direção ao seu hospedeiro (patógeno vegetal), provavelmente pelo quimiotropismo e pela ação de enzimas de degradação da parede celular produzidas pelo *Trichoderma* (BROTMAN et al.2010).

Neste sentido, o uso de enzimas, como as produzidas pela fermentação de *Trichoderma koningiopsis*, podem auxiliar na degradação da cutícula e epiderme da planta, a fim de melhorar a absorção e eficácia dos comerciais ou ainda auxiliar na penetração do fungo patogênico. Isso deve-se à interação de enzimas fúngicas com a interface da folha da planta, uma vez que a folha possui uma camada denominada

cutícula, uma camada hidrofóbica que constitui-se em dois principais componentes: o biopoliéster insolúvel e por lipídios solúveis (BARGEL et al., 2004). Uma das principais funções da cutícula é a limitação da perda de água descontrolada através da evaporação. A cutícula da planta também pode ser vista como a primeira barreira mecânica contra microrganismos e herbívoros (BARGEL et al., 2004).

Destacam-se dentre as enzimas de interesse na prospecção de bioherbicidas as lipases hidrossolúveis, que podem atuar eficientemente sobre um substrato hidrofóbico, sendo responsáveis por catalisar e de hidrolisar triglicerídeos, ceróis e outros (SHARMA et al., 2001).

Já as peroxidases são enzimas oxidoreduzases que catalisam diversas reações na presença de peróxidos, tais como peróxido de hidrogênio. É uma importante enzima das plantas e está envolvida em diversas reações, ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indol-3-acético, ligações de monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos, oxidação de fenóis, defesa de patógenos, regulação da elongação de células e outras (KAO, 2003).

As celulasas atuam sobre a celulose da planta, que é um componente essencial para estruturação da parede celular, decompondo-a. Estas enzimas são produzidas por diversos fungos, protozoários, bactérias e plantas, e elas convertem a celulose que é um polissacarídeo complexo em açúcares simples, como a glicose (CASTRO, 2010). Ainda cabe ressaltar que o amido é o principal polissacarídeo de reserva dos vegetais e são as enzimas amilases as responsáveis pela sua quebra, transformando-o em moléculas menos complexas como carboidratos e glicose (SOARES et al., 2007).

5. METODOLOGIA

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos, no Laboratório de Agroecologia e em casa de vegetação da Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Erechim/RS, e foi dividido em algumas etapas, como descrito na Figura 1.

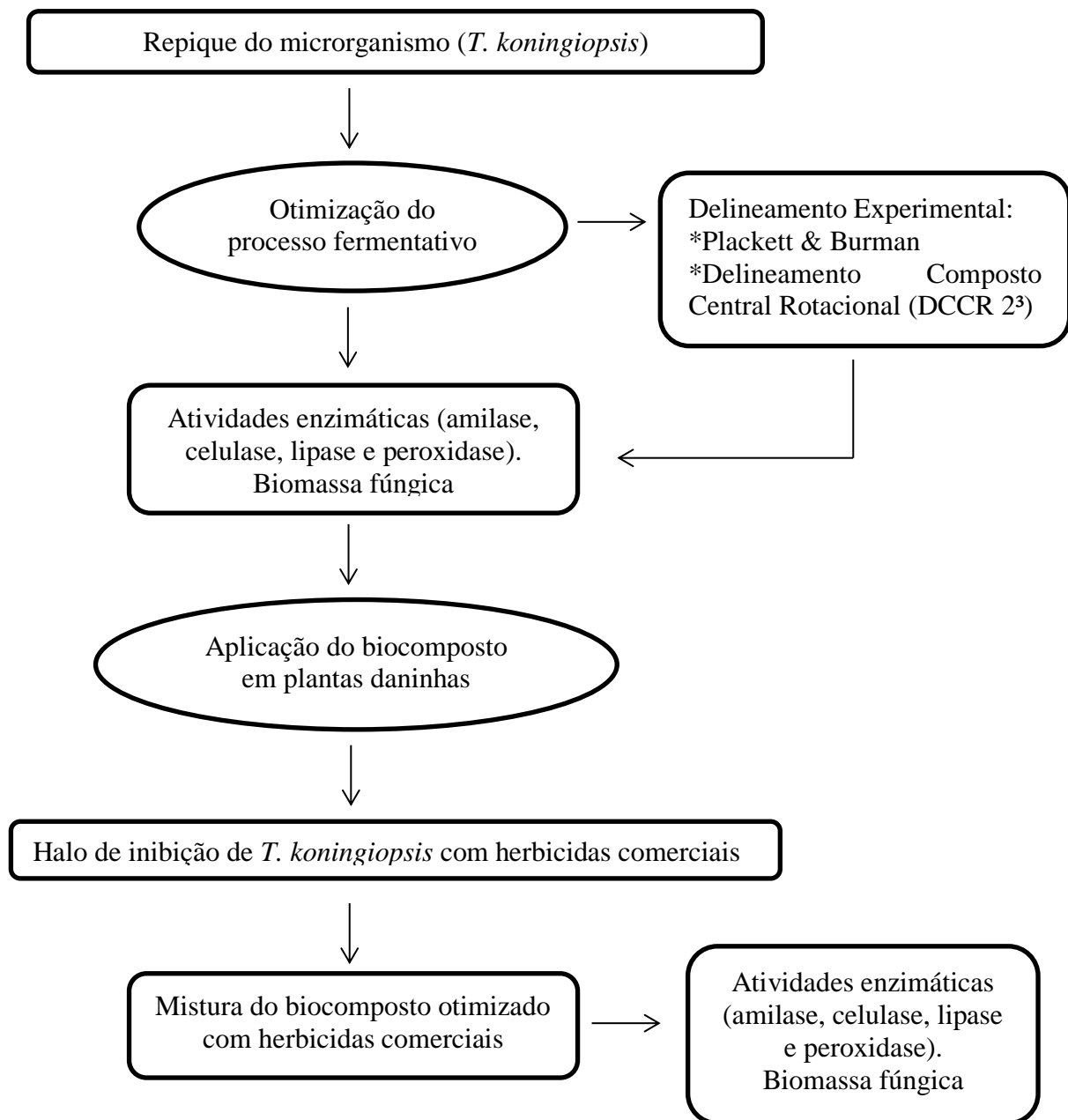


Figura 1. Fluxograma com as atividades desenvolvidas no trabalho.

5.1 PROPAGAÇÃO DE *Trichoderma koningiosis*

O microrganismo em estudo foi obtido do banco de microrganismos do Laboratório de Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Erechim/RS. O *Trichoderma koningiosis*, foi isolado a partir da planta daninha *Digitaria horizontalis*, popularmente conhecida por milhã, em estudos realizados por Reichert (2017).

Os repiques em placas de Petri acontecerem em câmara de fluxo laminar, para a obtenção de uma série de placas necessárias para a realização do trabalho. O meio nutritivo utilizado foi BDA (ágar batata dextrose), onde para cada 1 litro de meio utilizado foram dissolvidos 42g de BDA. Todo o material utilizado foi esterilizado em autoclave (Phoenix Lufarco) a 120°C e 1 atm.

Foi vertido aproximadamente 20 mL de meio em cada placa de Petri e, com auxílio de uma alça de platina foi transferido micélios do fungo para as placas e posteriormente as mesmas foram encubadas em estufa a aproximadamente 28°C por 7 dias.

5.2 OBTENÇÃO DO BIOCOMPOSTO

A obtenção do biocomposto, deu-se pela otimização do processo fermentativo, em fermentação submersa, seguindo a metodologia utilizada por Souza (2015) e Reichert (2017). Os parâmetros analisados variaram de acordo com cada experimento, composto pelo delineamento experimental do tipo Plackett & Burman com 12 ensaios mais 3 pontos centrais (Tabela 01) e Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR 2³ - Tabela 02) com pontos fatoriais, 6 pontos axiais e 3 repetições do ponto central, totalizando 17 ensaios.

Tabela 01. Parâmetros avaliados no delineamento experimental do tipo Plackett & Burman para otimização do processo fermentativo.

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

Tabela 02. Parâmetros avaliados no planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR 2³) para otimização do processo fermentativo.

Variável	Níveis				
	-1,68	-1	0	1	1,68
Glicose (g/L)	1,50	3,00	2,25	0,99	3,51
Extrato de levedura (g/mL)	0,75	2,25	1,50	0,24	2,76
Peptona (g/mL)	0,37	1,12	0,75	0,12	1,3
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/mL)	PF	PF	PF	PF	PF
FeSO ₄ 7H ₂ O (g/mL)	PF	PF	PF	PF	PF
pH	PF	PF	PF	PF	PF

*PF = Parâmetros fixos. Sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) 0,40 g/mL; Sulfato ferroso (FeSO₄ 7H₂O) 0,20 g/mL e o pH 5.

As diferentes proporções apresentadas respectivamente para cada planejamento, foram adicionadas a erlenmeyers de 300 mL, no qual foram completados um volume total de 150 mL de água destilada. A diluição foi realizada com o auxílio de um agitador magnético e o pH ajustado de acordo com o estabelecido nos planejamentos experimentais, com o auxílio de um pHmetro.

Em seguida, os diferentes meios foram esterilizados, em autoclave a 120 °C e 1atm por 30 minutos. Após atingirem a temperatura ambiente, em câmara de fluxo laminar, 10 mL deste meio foi vertido em placas de Petri, contendo o microrganismo *Trichoderma koningiopsis*, onde os esporos foram raspados com o auxílio de uma alça de platina, em seguida foram vertidos novamente para os erlenmeyers.

A fermentação ocorreu em um agitador orbital, a uma temperatura de 28 °C e agitação de 120 rpm por 72 horas. Em seguida, os meios foram filtrados para a obtenção da biomassa fúngica e do extrato enzimático, este armazenado em embalagens de polietileno, mantidos em refrigeração, aproximadamente 5 °C, para posterior determinação das atividades enzimáticas.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA FÚNGICA

A quantificação da biomassa fúngica foi realizada por meio do método gravimétrico. Para isso as placas de Petri, juntamente com os papéis filtro Whatman número 1 respectivos de cada ensaio, foram pesadas. Em seguida a biomassa obtida após a filtração do meio fermentativo, foi pesada para a obtenção do peso úmido. As placas foram colocadas em estufa a 40°C por aproximadamente 48 horas para a secagem. Em seguida foram transferidas para dessecadores e após atingirem a temperatura ambiente, tais placas foram novamente pesadas, para a obtenção da massa

micelial seca. A biomassa fúngica do microrganismo *Trichoderma koningiopsis* foi dada em g/L.

5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

5.4.1 Atividade de celulases

A atividade enzimática da celulase foi de acordo com Ghose (1987), com algumas adaptações. Para isso, pesou-se aproximadamente 50 mg de papel filtro Whatman número 1 (fonte de celulose). Em seguida foram colocados em tubos de ensaio contendo 2 mL de tampão acetato 0,2 M, pH 5,5, adicionando a eles 1 mL da solução enzimática. Os tubos foram mantidos por 1 hora em banho termostático a 50 °C. Para o controle a solução enzimática foi substituída por 1 mL de água destilada.

A atividade foi determinada utilizando o método DNS (ácido dinitrossalicílico), de acordo com Miller (1959), onde 0,5 mL da solução mais 0,5 mL de DNS foram adicionados em tubos de ensaio e mantidos em banho termostático a 100 °C por 10 minutos. Em seguida os tubos de ensaio foram alocados em banho de gelo até atingirem a temperatura ambiente, logo após foram adicionados 8 mL de tartarato de sódio para estabilizar a reação e a medida se deu em espectrofotômetro a 540 nm.

A medida de atividade das enzimas celulases, considerando os valores obtidos previamente para determinação da curva padrão foi realizada utilizando a Equação 1:

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

ART = Açúcar Redutor Total

Equação (1)

5.4.2 Atividade de peroxidases

A determinação das enzimas peroxidases realizou-se de acordo com Khan e Robinson (1994). Em tubo de ensaio foi adicionado 1,5 mL de tampão fosfato 5 mM, pH 5,0; 2 mL de água destilada, 0,5 mL de guaicol 1% e 1 mL de peróxido de hidrogênio 8%. Este meio foi exposto a banho termostático com temperatura de 35°C, por 10 minutos. Após estabilização da temperatura foi adicionado 1mL do biocomposto a ser aferida a atividade de peroxidases, mantendo no banho termostático por mais 2

minutos. A leitura realizou-se em espectrofotômetro 470 nm. O cálculo da medida de atividade foi realizado através da média dos valores da triplicata multiplicado por 1000.

5.4.3 Atividade de lipases

A medida de atividade de lipases foi determinada de acordo com o proposto por Treichel et al (2016). Para isso, 1 mL do biocomposto foi pipetado em 9 mL de emulsão (5% de goma arábica, 10% de óleo de oliva e tampão fosfato 100 mM a pH 6). Em seguida, os béqueres contendo a emulsão foram levados ao agitador orbital a uma temperatura de 35 °C, 165 rpm por 32 minutos. Para cessar a reação, foram adicionados 10 mL de solução acetona/etanol (1:1, v/v). Em seguida realizou-se a titulação com hidróxido de sódio (NaOH) 0,049 M até a solução atingir pH 11. O controle (branco) foi composto por 9 mL da emulsão, 10 mL de acetona/etanol e 1 mL da enzima, porém o mesmo não foi levado ao agitador orbital.

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

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

Equação (2)

Onde:

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

Vb = valor apresentado pelo controle;

MNaOH = molaridade do Hidróxido de sódio;

t = tempo de reação;

Vc = volume enzimático utilizado.

5.4.4 Atividade de amilases

A atividade das amilases foi realizada de acordo com o método descrito por Fuwa (1954) e Pongsawadi e Yagisawa (1987), com algumas alterações. O amido solúvel foi diluído em tampão acetato 100 mM pH 5,0 na proporção 1:100 (p/v). Após, 1mL do amido diluído foi pipetado juntamente com 1 mL do extrato enzimático e em tubos de ensaio. Estes, foram colocados em banho termostático de circulação interna (NOVA Instruments) a 38 °C por 10 minutos. Para o controle (branco) o extrato enzimático foi substituído por 1 mL de água destilada.

A atividade foi determinada utilizando o método DNS, como descrito no item 5.4.1.

5.5 APLICAÇÃO DOS BIOCOMPOSTOS OTIMIZADOS

A aplicação do composto otimizado, ocorreu em casa de vegetação, em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 4 tratamentos e 3 repetições. As plantas daninhas: leiteiro (*Euphorbia heterofila*), picão preto (*Bidens pilosa*) e papuã (*Urochloa plantaginea*), foram semeadas em bandejas plásticas contendo substrato e terra.

A aplicação do biocomposto ocorreu quando as plantas daninhas apresentavam de 2 a 4 folhas, com auxílio de um borrifador de jardim para os tratamentos filtrados e um pincel para os tratamentos não filtrados.

As análises foram feitas visualmente aos 7 e 14 dias após a aplicação, atribuindo notas de danos foliares a partir de uma escala diagramática proposta por Nunes & Alves (2011) com adaptações (Figura 2).

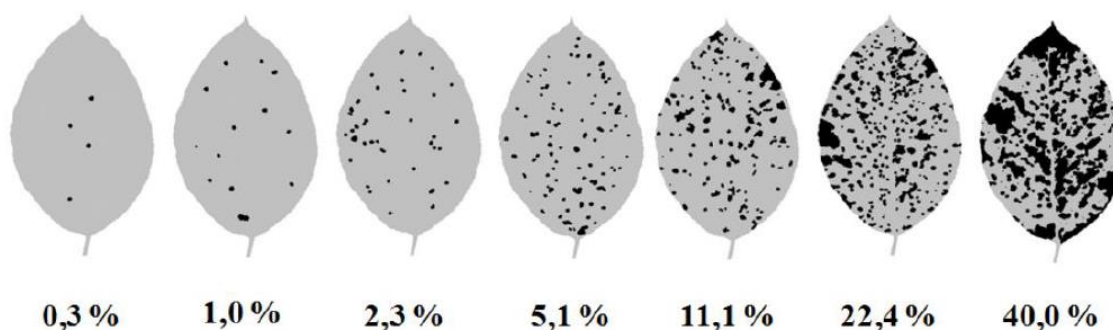


Figura 2. Escala diagramática escolhida para avaliação de injúria nas plantas daninhas escolhidas, onde: 0% foi conferida a nota E; 0,3 a 3,0% nota D; 4,0 a 12,0% nota C; 20,0 a 40,0% nota B e acima de 40,0% nota A

Fonte: Nunes & Alves (2011)

5.6 TESTE DE RESISTÊNCIA DE *T. koningiopsis* FRENTE A HERBICIDAS

Antes de fazer a mistura do biocomposto com herbicidas comerciais, fez-se a seleção de linhagens do microrganismo *T. koningiopsis* tolerantes a estes princípios ativos: Glifosato, nome comercial Zapp QI 620, ingrediente ativo: **sal potássico de N-(phosphonomethyl) glycine**; Glufosinato de amônio, nome comercial Finale, ingrediente ativo: **ammonium 4-[hidroxy (metyl) phosphinoyl] –DL-homoalanin-4-yl(methyl)**; **2,4-D**, nome comercial DMA 806 BR, ingrediente ativo **2,4-D-dimetilamina**; e Atrazina, nome comercial PRIMATOP SC, ingredientes ativos: **2-**

cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina e 2-cloro-4,6-bis (etilamino)-s-triazina.

Para isto, preparou-se meio nutritivo BDA (42 g de BDA, para 1 L de meio), em seguida repicou-se o microrganismo em estudo, transferindo seus esporos para as placas de Petry, contendo o meio nutritivo. Após pedaços de papel filtro Whatman número 1 de aproximadamente 3 mm de diâmetro, devidamente identificados foram mergulhados em 4 diferentes concentrações de herbicidas químicos, sendo uma testemunha, outra concentração sem nenhuma diluição, e as demais conforme descrita na Tabela 03 para 100 mL de água, em seguida, distribuídos nas placas de Petry.

Tabela 03. Diferentes concentrações de herbicidas (glifosato, glufosinato de amônio, 2,4-D e atrazina) utilizados para avaliação do halo de inibição. Dose em mL do produto para cada 100 ml de água.

Herbicidas	Dose	Baixa dose (mL)	Alta dose (mL)
	recomendada (mL)		
Glifosato	3,50	1,75	7,00
Glufosinato de amônio	0,750	0,375	1,50
2,4-D	0,750	0,375	1,50
Atrazina	2,6	1,3	5,2

As placas foram encubadas em estufa a aproximadamente 28 °C, a medição do halo de inibição foi realizada durante 7 dias consecutivos com auxílio de uma régua. Todos os tratamentos foram feitos em triplicata.

Após o crescimento fez-se a repicagem do *T. koningiopsis*, utilizando micélios que mais cresceram e desenvolveram na presença dos herbicidas, para posterior utilização na mistura de uma nova fermentação do biocomposto com herbicidas comerciais.

5.7 ENSAIO PRESUNTIVO DE SINERGISMO ENTRE BIOCOMPOSTO E HERBICIDAS COMERCIAIS

Preparou-se a fermentação do biocomposto otimizado, com a mistura de diferentes doses de herbicidas comerciais, descritos no item 5.6, porém para 150 mL de água e foi seguindo a metodologia descrito no item 5.2. As placas de *T. koningiopsis* utilizadas foram os micélios tolerantes aos herbicidas comerciais, após realizar o estudo do halo de inibição.

A fermentação ocorreu em um agitador orbital, a uma temperatura de 28 °C e agitação de 120 rpm por 72 horas. Em seguida os meios foram filtrados para a obtenção da biomassa fúngica e do extrato enzimático, este armazenado em embalagens de polietileno, mantidos em refrigeração, aproximadamente 5 °C, para posterior determinação das atividades enzimáticas.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO

A otimização do processo fermentativo, deu-se através de uma estratégia sequencial de planejamentos experimentais, com o intuito de obter os melhores resultados para as atividades enzimáticas (amilases, celulasas, peroxidases e lipases), bem como, a maior quantificação de biomassa produzida pelo microrganismo *Trichoderma koningiopsis*.

Esta otimização teve ainda o objetivo de diminuir o custo de produção do biocomposto para *T. koningiopsis*, diminuindo ou excluindo alguns sais utilizados na sua elaboração, avaliando assim quais os parâmetros teriam maior ou menor influência nas atividades enzimáticas e na produção de biomassa.

O delineamento experimental do tipo Plackett & Burman, foi escolhido inicialmente, por ser eficiente na apresentação dos principais efeitos, sendo que há um grande número de variáveis a ser avaliadas, ou seja, este tipo de delineamento serve como um 'screening' reduzindo assim o número de ensaios, para posterior delineamento fatorial completo utilizando a interação de todas as variáveis estudadas (RODRIGUES et al. 2005).

Os resultados obtidos no delineamento Plackett & Burman para as atividades enzimáticas e biomassa fúngica, estão apresentados na Tabela 04, onde pode-se perceber que todos os parâmetros avaliados, apresentam respostas distintas para cada ensaio realizado.

O ensaio 7 foi o que apresentou maior produção de biomassa fúngica de *T. koningiopsis* (10,20 g/L). Já para as atividades enzimáticas, o ensaio 5 apresentou maior atividade para celulasas (0,38 U/mL) e amilases (1,70 U/mL); o ensaio 6 apresentou maior atividade para lipases (15,26 U/mL); e para atividade de peroxidases o melhor ensaio foi o ensaio 11 (131,00 U/mL).

Após o tratamento estatístico dos dados, podemos verificar os efeitos das diferentes variáveis investigadas, ou seja, quais variáveis foram significativas positivas ou negativamente ($p < 0,05$) (Figura 3).

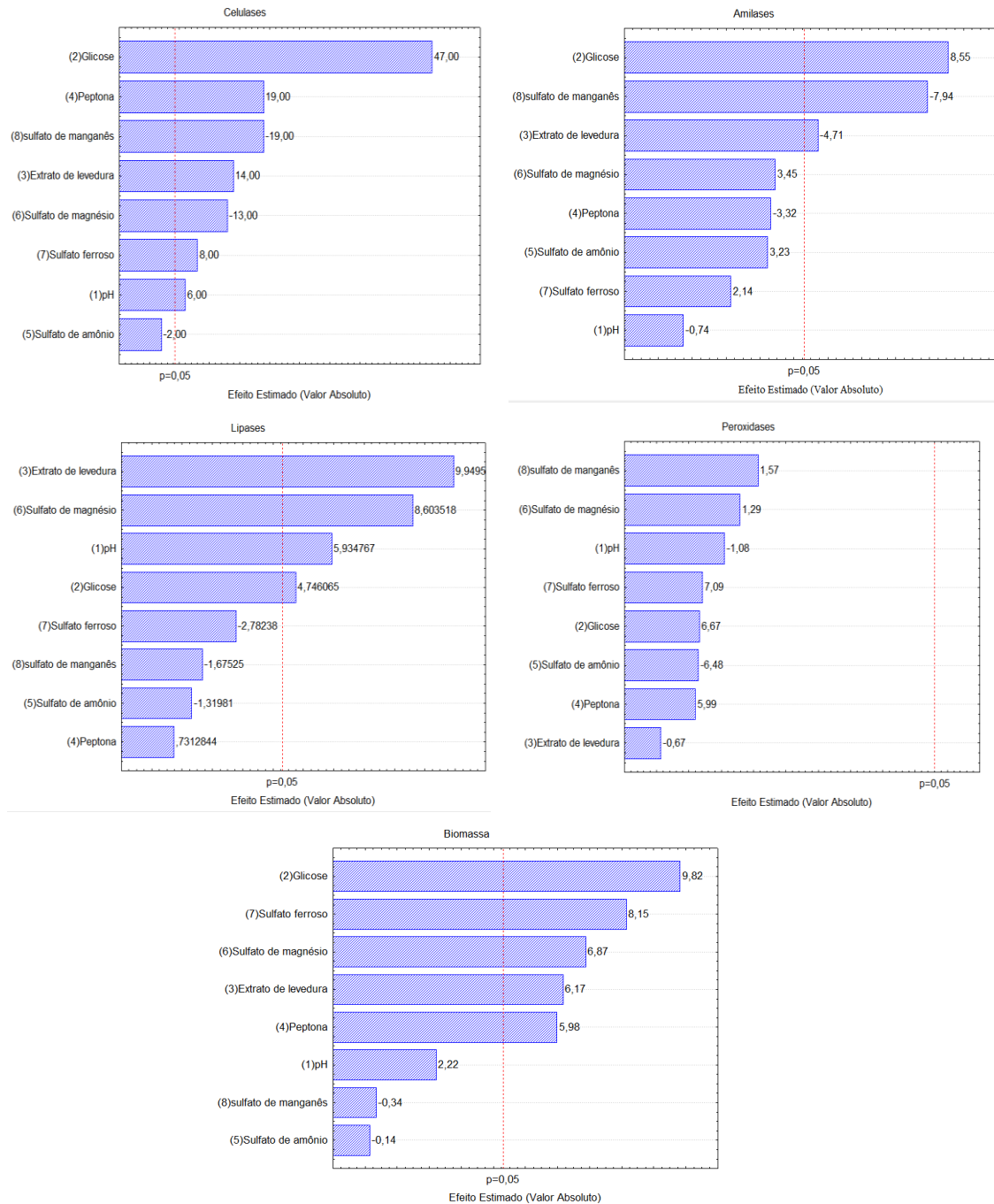


Figura 3. Gráfico de Pareto gerado no Planejamento experimental Plackett & Burman, para indicar os efeitos das diferentes variáveis investigadas na atividade enzimática de amilases, celulases, peroxidases e lipases e a produção de biomassa fúngica.

Assim, podemos verificar que as fontes de carbono e nitrogênio (glicose e extrato de levedura), apresentaram efeito significativo positivo ($p < 0,05$) em todos os

parâmetros analisados, exceto para a atividade de peroxidases. Para os sais estudados, sulfato de manganês ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e o sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foram os que apresentaram significância positiva e negativa ($p < 0,05$), enquanto o sal sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) não apresentou significância ($p < 0,05$) para nenhum dos parâmetros avaliados.

O planejamento de experimentos utilizado nesta análise é fatorial fracionário, ou seja, não são feitas todas as combinações possíveis entre as diferentes variáveis estudadas, logo, não é possível gerar modelos matemáticos estatísticos. Assim, após Planejamento de experimentos Plackett & Burman e análise de seus efeitos, foi realizada uma nova fermentação.

Esta fermentação foi baseada levando em consideração os maiores resultados para a produção de biomassa e atividade enzimática (Ensaio 7 do Planejamento Plackett & Burman), bem como a avaliação de significância das variáveis. Assim, os sais sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e sulfato ferroso ($\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) foram retirados, por não apresentar significância na maioria dos parâmetros e o sulfato de magnésio e sulfato de manganês tiveram seus valores fixados 0,60 g/mL e 0,30 g/mL respectivamente.

A nova fermentação foi realizada em triplicata, onde os valores da média e o erro padrão de atividade enzimática para as enzimas estudadas e para a quantidade de biomassa produzida estão apresentadas na Tabela 05.

Tabela 05. Médias e erro padrão das atividades enzimáticas e biomassa fúngica obtida na fermentação realizada em triplicata com condições fixas.

Medida de Atividade Enzimática (U/mL)				
Celulase	Peroxidases	Amilases	Lipase	Biomassa g/L
0,09±0,01	22,44±1,68	0,72±0,02	4,59±0,79	3,41±0,04

Nesta nova fermentação, verificou-se uma diminuição nos parâmetros avaliados, tanto na atividade enzimática de celulasas, lipases, amilases e peroxidases, como na quantidade de biomassa fúngica. Como os resultados não foram os esperados, uma vez que utilizou-se as condições que obtiveram as melhores respostas do planejamento Plackett & Burman, fez-se uma comparação entre as duas fermentações.

Levou-se em consideração os resultados que obtiveram maior quantidade de massa fúngica e foram equiparados, pois segundo Costa et al. (2010), a quantidade de biomassa fúngica produzida está intimamente relacionada com as exigências nutricionais do microrganismo.

Assim, fez-se a comparação do ensaio 7 do delineamento experimental Plackett & Burman, por este ter apresentado maior quantidade de biomassa do fungo *T. koningiopsis*, com a fermentação em triplicata, levando a realização de um delineamento fatorial completo, Tabela 06, pois a fermentação em triplicata apresentou uma diminuição considerável tanto para as atividades enzimáticas como na quantidade de biomassa fúngica.

No Delineamento experimental composto rotacional (DCCR 2³), teve três parâmetros avaliados: a glicose, o extrato de levedura e a peptona. As variáveis (NH₄)₂SO₄ e FeSO₄ 7H₂O foram fixadas em 0,60 g/mL e 0,30 g/mL, respectivamente. Os demais sais (MnSO₄ H₂O e MgSO₄ 7H₂O), foram retirados após a fermentação em triplicata com valores fixos, uma vez que ocorreu a diminuição de todas as respostas estudadas. O pH também teve seu valor fixado em 5.

Assim, nesse novo experimento buscou-se avaliar os efeitos das fontes de carbono e nitrogênio (glicose, peptona e extrato de levedura) presentes no meio fermentativo, na produção de biomassa fúngica e nas atividades das enzimas: amilases, celulases, lipases e peroxidases. Esses valores estão descritos na Tabela 06.

Assim, a maior produção de biomassa fúngica deu-se no ensaio 8 (9,80 g/L), como é possível observar neste ensaio, foram ofertados as maiores quantidades de glicose (3,51 g/L), peptona (1,30 g/L) e extrato de levedura (2,76 g/L), fornecendo ao microrganismo uma alta quantidade de carbono, aminoácidos e nitrogênio.

O crescimento microbiano é normalmente associado ao aumento exponencial da biomassa, quando as condições são favoráveis a este crescimento, ou seja, quando os nutrientes do meio estão em excesso, a cinética do crescimento da colônia será influenciada pela redução nas concentrações de nutrientes e oxigênio, acúmulo de produtos finais inibitórios, produção de metabólitos secundários e mudanças nos fatores ambientais como pH (PROSSER et al., 1991).

Como todos os fungos, o *T. koningiopsis* necessitam de compostos orgânicos como fonte de carbono e energia, geralmente são as açúcares (glicose) por ser rapidamente absorvidos (PAPAGIANNI, 2004).

Tabela 05. Matriz do delineamento experimental Plackett & Burman (valores reais e codificados) utilizados na otimização do processo fermentativo, e resultados obtidos neste delineamento das medidas de atividade enzimática para amilases, celulases, lipases e peroxidases, e quantificação da biomassa de *T. koningiopsis*.

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

Tabela 06. Matriz do delineamento experimental DCCR 2³ (valores reais e codificados) utilizados na otimização do processo fermentativo, e resultados obtidos neste delineamento das medidas de atividade enzimática para amilases, celulasas, lipases e peroxidases, e quantificação da biomassa de *T. koningiopsis*.

Ensaio	Glicose (g/mL)	Extrato de Levedura (g/mL)	Peptona (g/mL)	Amilases (U/mL)	Celulasas (U/mL)	Lipases (U/mL)	Peroxidases (U/mL)	Biomassa (g/L)
1	-1 (1,5)	-1 (0,75)	-1 (0,375)	3,45	6,51	1,89	36,33	1,44
2	1 (3)	-1 (0,75)	-1 (0,375)	17,25	10,62	3,22	41,00	1,85
3	-1 (1,5)	1 (2,25)	-1 (0,375)	0,36	0,16	0,61	116,33	7,97
4	1 (3)	1 (2,25)	-1 (0,375)	0,82	0,38	8,22	56,00	7,43
5	-1 (1,5)	-1 (0,75)	1 (1,125)	9,06	5,15	3,620	46,33	2,18
6	1 (3)	-1 (0,75)	1 (1,125)	14,43	8,53	0,00	60,00	2,37
7	-1 (1,5)	1 (2,25)	1 (1,125)	0,65	0,21	0,00	125,67	9,71
8	1 (3)	1 (2,25)	1 (1,125)	0,71	0,36	0,00	90,67	9,81
9	-1,68 (0,99)	0 (1,5)	0 (0,75)	5,94	3,08	0,00	54,00	3,43
10	1,68 (3,51)	0 (1,5)	0 (0,75)	12,64	7,59	0,00	73,33	6,80
11	0 (2,25)	-1,68 (0,24)	0 (0,75)	12,11	6,76	0,05	44,00	1,57
12	0 (2,25)	1,68 (2,76)	0 (0,75)	0,79	0,34	0,41	127,00	9,25
13	0 (2,25)	0 (1,5)	-1,68 (0,12)	11,57	7,49	1,89	71,33	2,38
14	0 (2,25)	0 (1,5)	1,68 (1,30)	0,68	0,34	0,00	169,00	6,17
15	0 (2,25)	0 (1,5)	0 (0,75)	9,76	6,37	0,00	78,00	4,60
16	0 (2,25)	0 (1,5)	0 (0,75)	0,53	0,35	0,00	132,33	5,58
17	0 (2,25)	0 (1,5)	0 (0,75)	8,35	4,55	0,00	72,67	3,62

O crescimento micelial de *Trichoderma koningiopsis* em fermentação submersa, formou uma biomassa agrupada (Figura 4). Segundo estudo desenvolvido por PAPAGIANNI, (2004) se estes estivessem em fragmentos poderiam resultar em um maior crescimento, uma vez que estes micélios poderiam funcionar como centros de novos crescimentos, renovando-os. Esta característica foi associada à limitação de nutrientes no meio, como o nitrogênio (BRAUN E VECHT-LIFSGITZ, 1991).



Figura 4. Fermentação dos diferentes ensaios, onde podemos avaliar a biomassa fúngica dos diferentes tratamentos utilizados DCCR 2³. Fonte: Autor

Já para a atividades enzimáticas, o ensaios 2 foi o que apresentou melhor resposta para amilases (17,25 U/mL) e celulases (10,62 U/mL), este era composto pela maior concentrações de glicose (3 g/mL). O ensaio 4 foi o que obteve melhor resposta para a atividade de lipases (8,22 U/mL) em que era composto pelas maiores concentrações de extrato de levedura (2,25 g/mL) e glicose (3 g/mL). A melhor resposta para atividade de peroxidases ocorreu no ensaio 14 (169,00 U/mL), composto pela maior concentração de peptona (1,30 g/mL). Como o ocorrido com o Planejamento Plackett & Burman, nenhum dos ensaios se sobressaiu em todos os parâmetros aos quais foram avaliados.

Nos estudos realizados por Reichert (2017), sobre a produção de um bioherbicida, os valores de amilases, celulases, lipases e peroxidases (1,32; 11,45; 9,84 e 261,33 U/mL respectivamente) foram semelhantes aos maiores resultados encontrados neste presente estudo, para as atividades destas enzimas. Salientando um aumento significativo na atividade de amilases e uma diminuição na atividade de peroxidases. No entanto cabe ressaltar que estes resultados foram promissores uma vez que ocorreu a otimização do meio fermentativo, sendo que os sais sulfato de manganês ($MnSO_4 \cdot H_2O$) e

o sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) foram retirados e os sais sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$) e o sulfato ferroso ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) tiveram seus valores fixos em: 4 g/L e 2g/L respectivamente. A temperatura fixa em 28°C, pH 5, agitação 120 rpm, por 72 horas.

No ponto de vista econômico, a produção otimizada é vantajosa, pois mesmo com a ausência de dois sais, as atividades enzimáticas desenvolvidas pelo microrganismo *T. koningiopsis* se mantiveram similares, além de ocorrer um acréscimo da atividade de amilases.

6.2 BIOMASSA

A produção de biomassa fúngica teve seu modelo validado a uma confiança de 95%. A partir da análise do coeficiente de regressão (Tabela 07), podemos verificar que os parâmetros analisados a levedura linear e a glicose linear obtiveram significância a p valor < 0,05. Sendo assim, pode ser gerado o modelo matemático de primeira ordem, representado na Equação 3.

Tabela 07. Coeficiente de regressão, analisando os fatores estudados e suas interações para o erro global a 95% de confiança.

Fatores	Coeficiente de Regressão	Erro	t (7)	P
*Média	4,573898	0,701622	6,519031	0,000328
Glicose (L)	0,427552	0,329681	1,296869	0,235785
Glicose (Q)	0,269236	0,363202	0,741285	0,482643
*Extrato de Levedura (L)	2,929741	0,329681	8,886606	0,000046
Extrato de Levedura (Q)	0,375528	0,363202	1,033939	0,335557
*Peptona (L)	0,859541	0,329681	2,607194	0,035056
Peptona(Q)	-0,028383	0,363202	-0,078147	0,939898
Glicose (L) x Levedura (L)	-0,130833	0,430558	-0,303869	0,770061
Glicose (L) x Peptona (L)	0,052500	0,430558	0,121935	0,906377
Levedura (L) x Peptona (L)	0,355833	0,430558	0,826446	0,435811

*Fatores significativos positivos com p valor < 0,05.

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

Equação (3)

A partir da análise estatística percebe-se que a quantidade de extrato de levedura e peptona, estão intimamente relacionadas com a produção de biomassa, ou seja, estas duas variáveis demonstram significância ($p < 0,05$) positiva, indicando que quanto maiores forem a quantidade destas, maior será a biomassa produzida pelo *T. koningiopsis*, Figura 5 (c).

A análise de variância (ANOVA) validou o modelo matemático proposto, uma vez que F calculado (9,97) foi maior que o F tabelado (3,68) com um coeficiente de determinação (R^2) de 93%, como é possível verificar na Tabela 08.

Tabela 08. Análise de variância dos dados obtidos, para validação da significância estatística a $p < 0,05$ na produção de biomassa fúngica.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado
Regressão	133,2	9	14,801825	9,9798225
Resíduo	10,3822	7	1,4831751	
Total	143,5986	16		

*F tabelado 95% =3,68

Após a produção de biomassa fúngica ter seu modelo matemático validado, foram geradas as superfícies de respostas para cada uma das variáveis estudadas, apresentadas na Figura 5.

A Figura 5(a) mostra a relação do extrato de levedura e a glicose com a quantificação de biomassa, onde maiores quantidades destes dois produtos aumentam proporcionalmente a produção de biomassa, porém, através da validade do modelo podemos constatar que a glicose não teve influência ($p > 0,05$) significativa positiva. O mesmo pode ser percebido na Figura 5 (b) em que a peptona teve maior influência do que a glicose na produção de biomassa.

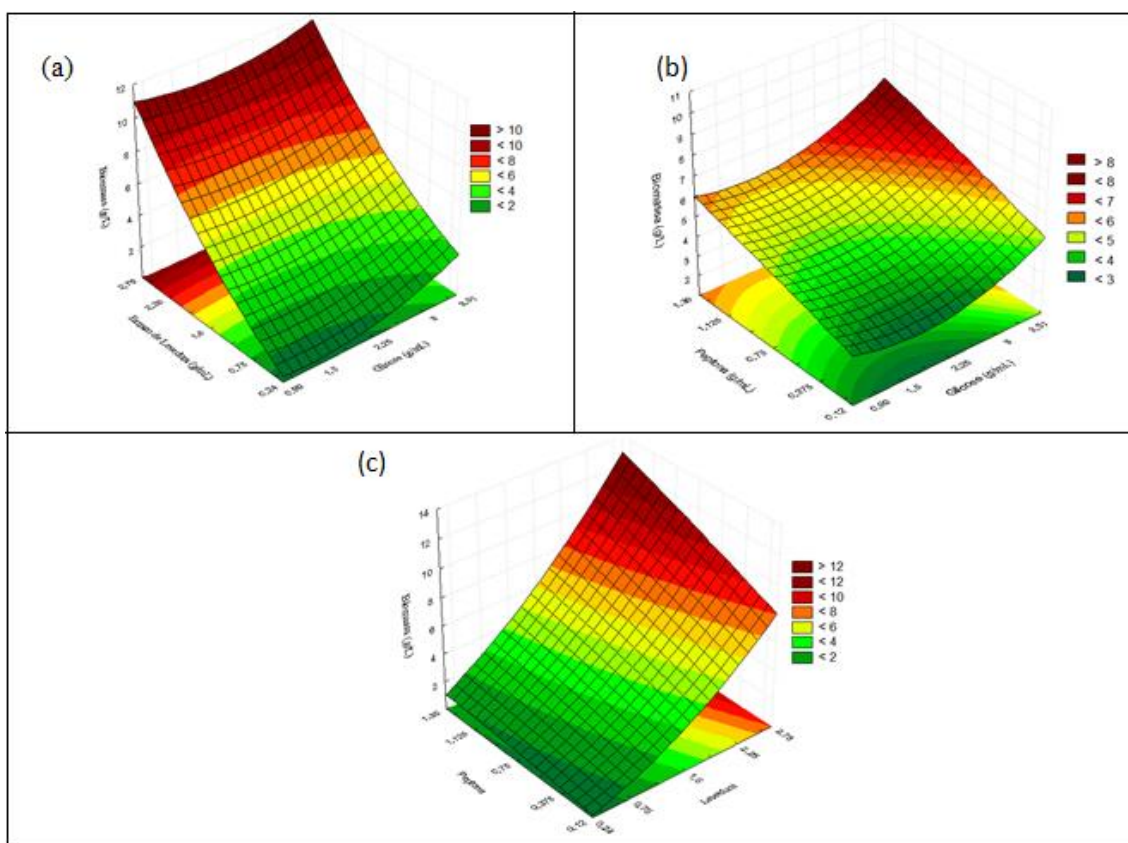


Figura 5. Superfícies de respostas geradas para avaliação da produção de biomassa em função de: (a) Glicose x Extrato de levedura, (b) Peptona x Glicose e (c) Peptona x Extrato de levedura.

Já na Figura 5 (c) a relação peptona e extrato de levedura foi a que apresentou maior resposta para a produção de biomassa, ressaltando que o extrato de levedura foi o mais eficiente em relação a peptona. Assim, ao analisar as três superfícies de respostas geradas podemos concluir que as maiores quantidades de extrato de levedura (2,76 g/mL), peptona (1,30 g/mL) e glicose (3,51 g/mL) foram os que obtiveram as melhores respostas para a produção de biomassa.

Dessa forma, é possível observar um efeito significativo positivo das fontes de nitrogênio (extrato de levedura e peptona) na otimização do processo fermentativo aumentado assim a biomassa fúngica. Em estudos de Souza (2015) demonstram que a variável peptona foi a que se mostrou com maior significância sobre a produção de biomassa a uma confiança de 90%, nesse trabalho utilizou-se 15 g/L de peptona para produzir 16,93 g/L de biomassa fungica, valores maiores do os obtidos neste trabalho.

Esses resultados demonstram que o nitrogênio e fósforo (extrato de levedura) desempenham um papel importante na produção de metabólitos e afetam a morfologia

dos fungos, bem como a relação de C/N, pois afeta a biossíntese de muitos metabólitos e o crescimento micelial (PAPAGIANNI, 2004).

Estudos realizados por Lin & Chen (2007), obtiveram maior crescimento micelial (5,41 g/L) e maior produção de exopolissacarídeos (0,55 g/L) por *Antrodia cinnamomea*, quando utilizaram substratos com maiores valores de carbono e nitrogênio. Bem como os trabalhos desenvolvidos por Shih, et al.(2007), onde o aumento da massa micelial de *Cordyceps militaris* em fermentação submersa foram maiores em meios com maiores quantidades de carbono e nitrogênio, bem como maiores produção de metabólitos bioativos.

6.3 AMILASES

A atividade de amilases não teve seu modelo validado a uma confiança de 95%, uma vez que o F tabelado foi maior que o F calculado. Porém, apresentou um efeito significativo ($p < 0,05$) negativo para o extrato de levedura, ou seja, quanto maior for a quantidade de extrato de levedura menor será a atividade de amilases, como demonstrado no gráfico de Pareto gerado, (Figura 6).

A amilase é uma importante enzima hidrolítica responsável pela quebra da ligação α 1,4-glicosídica em amido solúvel, esta basicamente envolvida na decomposição do amido em glicose e maltose, e como quase todos os organismos vivos precisam de glicose em suas necessidades energéticas, o amido torna-se uma alimento armazenado que auxilia na ativação da maioria dos caminhos energéticos em sistemas vivos (BALASUBRAMANIAN et al., 2018).

Em microrganismos, como por exemplo fungos do gênero *Aspergillus*, a α -amilase é uma das principais enzimas extracelulares secretadas, sendo assim utilizado nas indústrias para extração de amilases (BALASUBRAMANIAN et al., 2018).

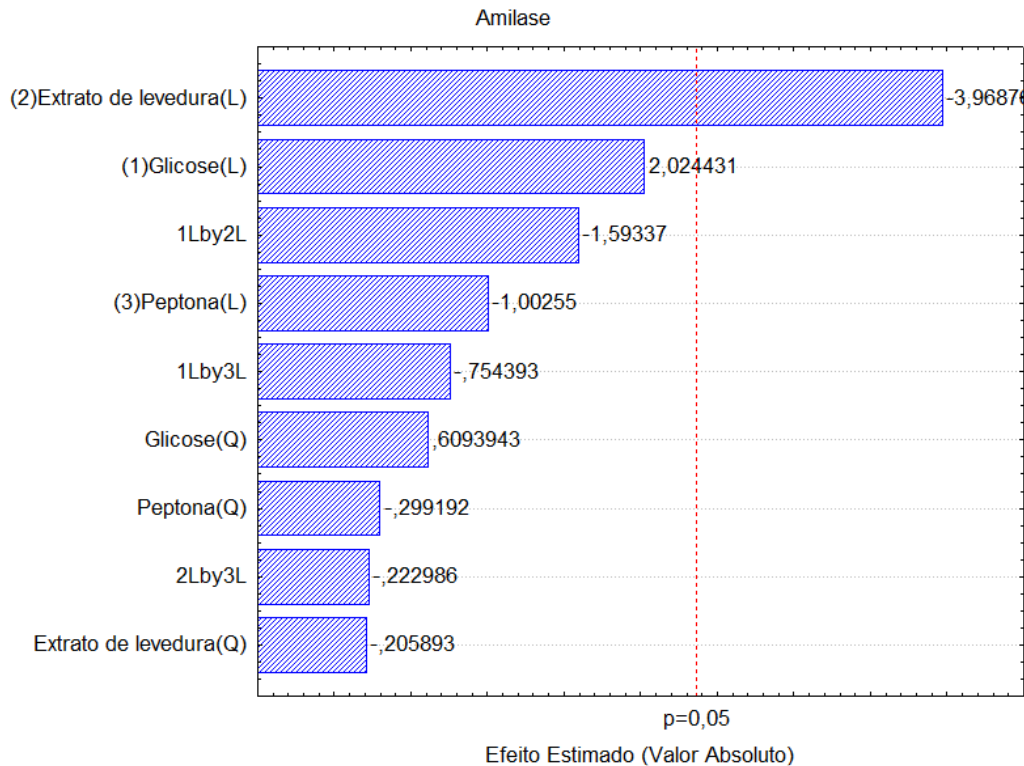


Figura 6. Gráfico de Pareto gerado, indicando os efeitos de todas as variáveis investigadas na atividade enzimática de amilases.

Na germinação de sementes, a água proporciona à ativação do gene da α -amilase, que quebra o amido armazenado para atender a energia necessária a germinação, também pode ser uma das principais causas de perda de culturas comerciais, pois muitos patógenos como fungos podem usarem sua α -amilase para digerir partes das plantas (FRANCO et al., 2002).

Estudos realizados por Takeda, et al. (1989) relataram que a presença de grupos fosfatos mais esterificados contidos dextrina da batata aumentou a atividade da amilase de *R. dominica*, do que os grupos fosfatos presentes na dextrina de milho, ou seja, melhor é a especificidade da enzima com o substrato. Os dados obtidos neste trabalho ressaltam que o extrato de levedura tem influência negativa na atividade de amilases de *T. koningiopsis*.

6.4 CELULASES

A atividade de celulases teve seu modelo validado a uma confiança de 90%, sem a utilização dos pontos axiais, através do coeficiente de regressão (Tabela 09), pode-se gerar o modelo matemático de primeira ordem (Equação 4).

Tabela 09. Coeficiente de regressão, analisando os fatores estudados e suas interações para o erro puro a 90% de confiança.

Fatores	Coefficiente de Regressão	Erro	t (4)	p
*Média	3,92537	0,662038	5,92922	0,004055
Glicose	0,98331	0,776308	1,26665	0,274014
*Extrato de Levedura	-3,71224	0,776308	-4,78191	0,008763
Peptona	-0,42782	0,776308	-0,55110	0,610899
Glicose x Levedura	-0,89106	0,776308	-1,14782	0,315023
Glicose x Peptona	-0,10113	0,776308	-0,13027	0,902642
Levedura x Peptona	0,43607	0,776308	0,56173	0,604284

*Fatores significativos, p valor < 0,1.

$$\text{Atividade enzimática para celulasas} = 3,93 - 3,71 * \text{Extrato de levedura}$$

Equação (4)

Com a análise estatística realizada é possível perceber que a atividade enzimática de celulasas está relacionada com a quantidade de extrato de levedura presente no meio fermentativo, obtendo uma significância ($p < 0,05$) negativa, ou seja, quanto maiores as quantidades desta variável, menor será a atividade para esta enzima.

A análise de variância (ANOVA) validou o modelo matemático proposto, uma vez que F calculado (6,06) foi maior que o F tabelado (5,05) com um coeficiente de determinação (R^2) de 87%, como é possível verificar na Tabela 10.

Tabela 10. Análise de variância dos dados obtidos, para validação da significância estatística a $p < 0,1$ para atividade de celulasas.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado
Regressão	125,86	5	25,17	6,07
Resíduo	20,75	5	4,15	
Falta de ajuste	1,51	1		
Erro puro	19,24	4		
Total	146,61	10		

*F tabelado 90% =5,05

Com o modelo validado, foram geradas as superfícies de respostas para cada uma das variáveis investigadas, como apresentadas na Figura 7.

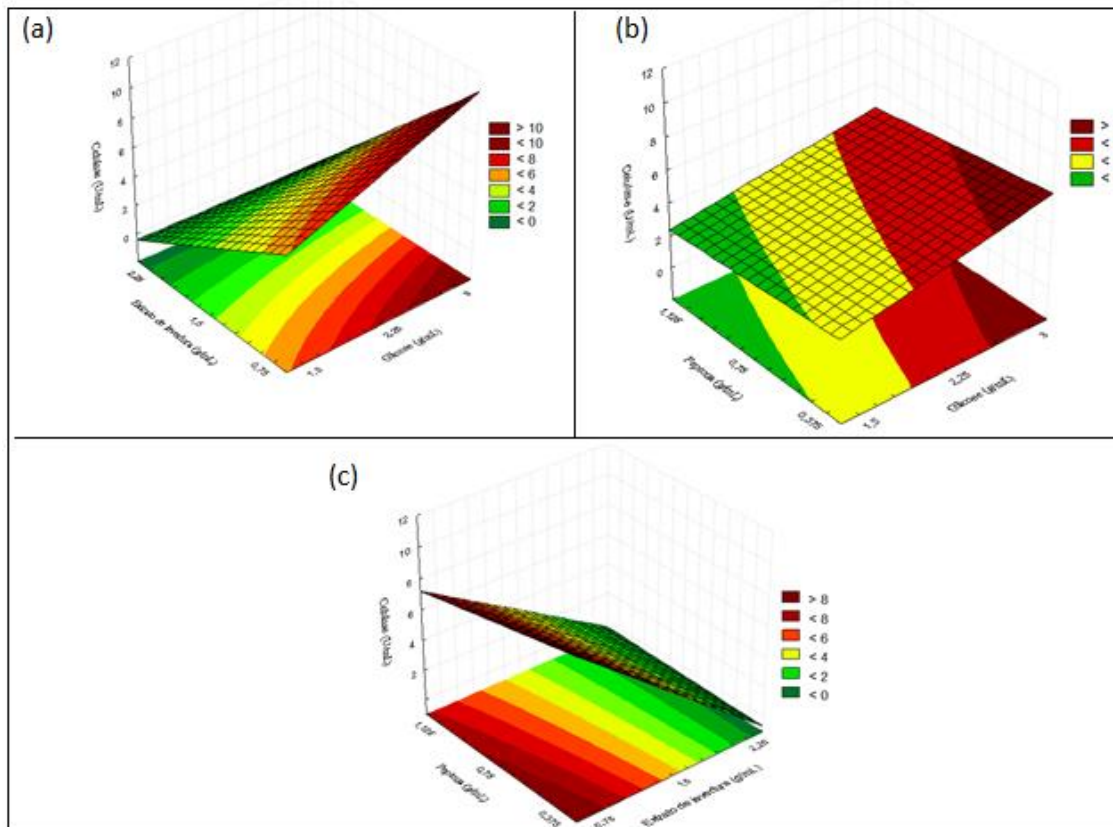


Figura 7. Superfícies de respostas geradas para avaliação da produção de celulases em função de: (a) Extrato de levedura x Glicose (b) Glicose x Peptona e (c) Extrato de levedura x Peptona.

Ao avaliar as superfícies estudadas, observa-se a Figura 7(a) que a relação entre o extrato de levedura, a atividade de celulase é maior quando nas maiores concentrações de glicose e nas menores concentrações de extrato de levedura, afirmando assim, o efeito negativo do extrato de levedura. Bem como na Figura 7(b) que afirma novamente o efeito positivo da glicose sobre a atividade de celulases, enquanto a peptona é importante nas menores quantidades.

Na comparação da relação da peptona e o extrato de levedura (Figura 7c), observa-se novamente o efeito significativo negativo destas duas variáveis, uma vez que a atividade de celulases diminuiu com o aumento destes produtos. Portanto, analisando as superfícies de respostas, verificou-se que a atividade enzimática para celulases é maior quando nas menores concentrações de extrato de levedura (0,24 g/mL) e peptona (0,12 g/mL).

Xue et al (2009) utilizaram componentes naturais na fermentação em estado sólido (8,9% de espiga de milho, 3,5% de palha de arroz, 10,7% de farelo de trigo e

água do mar 2,33 vezes o peso dos substratos secos) na otimização da produção de celulases por *Aspergillus niger*, alcançando 17,80 U/g após 144 horas de incubação.

Florencio et al (2016) investigou a fonte de carbono na produção celulítica e hemicelulítica em fermentação sequencial (estado sólido seguida de submersa) de *Trichoderma reesei*, na qual a utilização do bagaço de cana-de-açúcar mostrou-se o mais promissor na produção destas enzimas fúngicas. Já nos estudos de Goldbeck et al. (2012) na otimização na produção de celulase por *Acremonium strictum*, utilizou o bagaço de cana-de-açúcar suplementado com melaço de cana, obteve uma significância ($p < 0,10$), com efeito negativo devido a alta concentração de açúcares redutores.

As celulases desempenham um papel fundamental na hidrólise enzimática de polímeros celulósicos, nesse sentido, a degradação do principal constituinte das células vegetais (SRIVASTAVA et al., 2018), a entrada de microrganismos ou até mesmo dos metabólitos secundários produzidos por estes microrganismos é facilitada e pode aumentar a fitotoxicidade dos biocompostos (REICHERT JÚNIOR, 2017).

Assim, a atuação do biocomposto (bioherbicida) pode ter atuação conjunta de enzimas presentes no meio, com o microrganismo *T. koningiopsis*, já que a atividade da celulase nesse estudo foi consideravelmente elevada.

6.5 PEROXIDASES

O modelo matemático para a atividade enzimática de peroxidases não foi validado a 95% de confiança, contudo gerou-se o gráfico de Pareto que ilustra conforme a Figura 8, quais os parâmetros avaliados foram significativos.

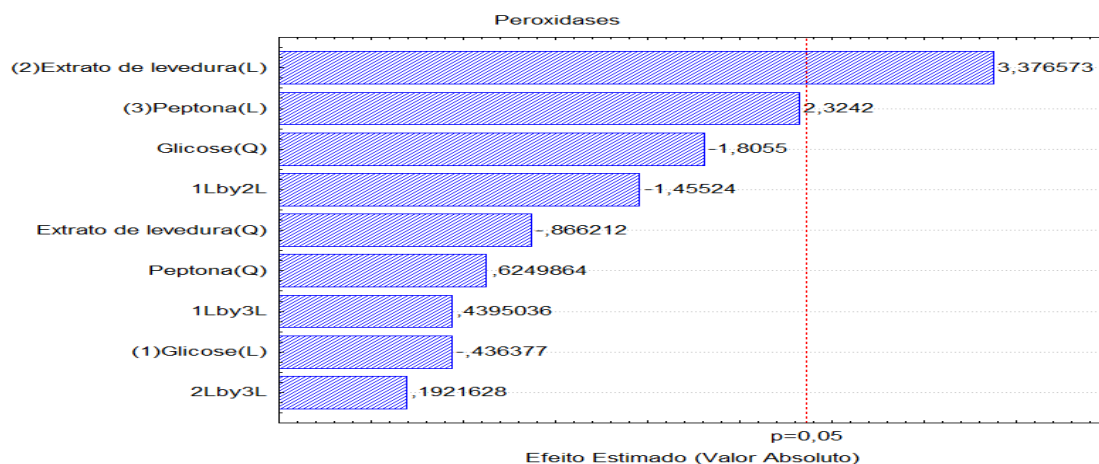


Figura 8. Gráfico de Pareto gerado, indicando os efeitos de todas as variáveis investigadas na atividade enzimática de peroxidases.

.Através deste gráfico podemos verificar que o extrato de levedura, apresentou significância ($p < 0,05$) positiva para a atividade de peroxidases. Além disso, os sais presentes no meio podem ter influenciado a atividade destas enzimas, pois de acordo com Fang & Kao (2000), a atividade de peroxidases é induzida na presença de íons de Fe^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} .

As peroxidases são enzimas oxidativas responsáveis pela oxidação de peróxidos em plantas, influenciadas em estresses bióticos ou abióticos (SOARES et al., 2007), assim mesmo não sendo validado seu modelo, sua atividade é bem importante pensando na aplicação do biocomposto em plantas. As respostas às espécies reativas de oxigênio (ROS) podem reagir causando danos ou como moléculas sinalizadoras que ativam inúmeras respostas de defesa (SOARES et al., 2007).

Além disso, Medina et al. (2017) relata que as peroxidases são responsáveis pela degradação da lignina presente na parede celular de plantas, e possui uma função suporte na parede secundária, bem como confere maior resistência contra agressão microbiana.

6.6 LIPASES

A atividade de lipases teve seu modelo validado a uma confiança de 95%, a partir da análise da regressão (Tabela 11) pode-se gerar o modelo matemático de segunda ordem, apresentado na Equação 5.

Tabela 11. Coeficiente de regressão para as lipases, analisando os fatores estudados e suas interações para o erro global a 95% de confiança.

Fatores	Coeficiente de Regressão	Erro	t (7)	p
Média	-2,53212	1,212841	-2,08776	0,075219
Glicose (L)	-0,79483	0,569894	-1,39470	0,205765
Glicose (Q)	0,73933	0,627839	1,17758	0,277446
Extrato de Levedura (L)	0,87444	0,569894	1,53438	0,168807
Extrato de Levedura (Q)	1,17336	0,627839	1,86888	0,103849
*Peptona (L)	-2,86032	0,569894	-5,01904	0,001532
Peptona(Q)	0,42285	0,627839	0,67350	0,522238
*Glicose (L) x Levedura (L)	2,74349	0,744273	3,68613	0,007796
*Glicose (L) x Peptona (L)	-3,47083	0,744273	-4,66338	0,002305
Levedura (L) x Peptona (L)	0,48490	0,744273	0,65150	0,535518

*Fatores significativos, p valor < 0,05.

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

Equação (5)

Percebe-se que a atividade de lipases está diretamente relacionada com a quantidade de glicose, peptona e extrato de levedura presentes no meio fermentativo, ressaltando, porém, que a variável peptona teve uma significância ($p < 0,05$) negativa, ou seja, quanto maiores forem suas quantidades, menor será a atividade de lipases. Da mesma forma, quando ocorre a relação entre glicose e peptona com significância ($p < 0,05$) negativa. Já para a relação entre glicose e extrato de levedura essa significância ($p < 0,05$) é positiva.

Através da análise da variância (ANOVA), podemos identificar a validade do modelo matemático gerado, uma vez que o F calculado (7,69) foi maior que o F tabelado (3,68), com um coeficiente de determinação (R^2) de 91% (Tabela 12).

Tabela 12. Análise de variância dos dados obtidos, para validação da significância estatística a $p < 0,05$ para atividade de lipases.

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

*F tabelado 95% = 3,68

Com o modelo validado, foram geradas as superfícies de respostas para cada uma das variáveis investigadas, na atividade das enzimas lipases como apresentadas na Figura 9.

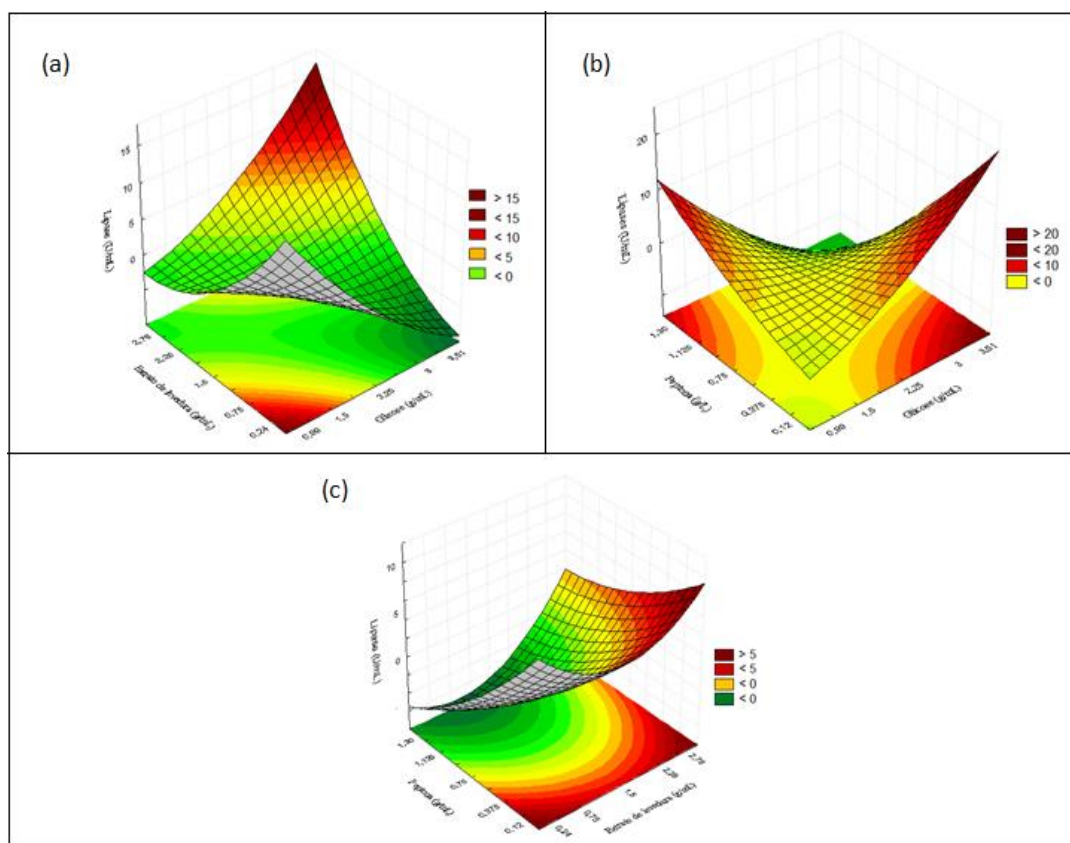


Figura 9. Superfícies de resposta geradas para avaliação da atividade enzimática de lipases em função de: (a) Extrato de levedura x Glicose, (b) Peptona x Glicose e (c) Peptona x Extrato de levedura.

Observando a Figura 9(a) percebe-se que a maior atividade para lipases ocorreu nas maiores concentrações de extrato de levedura e glicose. Analisando a Figura 9(b) a maior atividade para lipases acontece na maior concentração de glicose e menor concentração de peptona. Já na Figura 9(c) a maior atividade de lipases foi nas maiores concentrações de extrato de levedura e peptona, confirmando assim, seu efeito significativo positivo. Portanto, as melhores condições para a atividade de lipases são nas maiores concentrações de extrato de levedura (2,76 g/mL) e glicose (3,51 g/mL) e nas menores concentrações de peptona (0,12 g/mL). Cabe ainda ressaltar, que em todas as figuras ocorre um modelo de segunda ordem devido à superfície parabólica formada.

Inúmeros fatores influenciam a produção de lipases fúngicas (SARIKAYA, 2004) neste trabalho damos ênfase na composição do meio, ou seja, na fonte de carbono e nitrogênio e através da análise dos dados enfatiza-se a interferência negativa da peptona (fonte de nitrogênio). Sbardelotto (2013), da mesma forma, obteve melhor resposta para atividade lipásica na menor concentração da fonte suplementar de

nitrogênio (uréia), por outro lado Rodrigues et al. (2016) encontrou maior atividade desta enzima em cultura de *Rhizopus homothallicus* quando adicionou uréia ao meio.

Os carboidratos sempre fizeram parte da composição do meio para a produção de lipase (GEOFFRY et al., 2018), porém Cihangir & Sarikaya (2004) obteve baixa atividade de lipases de *Aspergillus niger* em meio suplementado com carboidratos em relação aqueles contendo óleo como única fonte de carbono.

As plantas se protegem do meio ambiente através da cutícula lipídica extracelular, presente na parede celular dos vegetais revestindo folhas, frutos, flores e caules não lenhosos (DOMÍNGUEZ et al., 2011; RIEDERER. 2006). Composta principalmente por ácidos graxos poli-insaturados, assim as lipases podem auxiliar na desconstrução das paredes celulares das plantas, permitindo uma degradação inicial das ceras e da cutícula, o que torna essa parede mais sensível, auxiliando a entrada de fungos e/ou outros patógenos (GARCÍA-CALVO et al., 2018)

Alguns fungos ascomicetos, como o *Trichoderma*, são agentes patogênicos de plantas, uma vez que seu mecanismo de ação é a produção e secreção de enzimas lignocelulíticas que penetram nos tecidos do hospedeiro (GLASS et al., 2013; GARCÍA-CALVO et al., 2018).

6.7 APLICAÇÃO DOS BIOCOMPOSTOS OTIMIZADO

Após a avaliação estatística da fermentação do biocomposto de *T. koningiopsis*, pode-se observar similaridades entre as respostas obtidas. O ensaio 2 foi o que apresentou as maiores atividades enzimáticas para amilases e celulase, sendo que o extrato de levedura apresentou significância negativa para estas duas enzimas

As atividades das lipases foram baixas ou nulas, embora tiveram o seu modelo validado, seus efeitos significativos positivos ou negativos não retrataram semelhanças com os demais parâmetros avaliados.

Outro fator que podemos observar são características comuns entre alguns parâmetros avaliados, como o ensaio 12, que obteve a maior produção de biomassa fúngica, este ensaio apresentou efeito significativo positivo do extrato de levedura para a biomassa e para a atividade de peroxidases.

Portanto estes dois biocompostos (ensaio 2 e 12) após a otimização do processo fermentativo foram selecionados visando a aplicação do mesmo em plantas daninhas,

por apresentarem melhores características para serem utilizados com bioherbicidas, devido suas particularidades de composição, avaliando seus efeitos de fitotóxicos em plantas daninhas.

Dentre as plantas utilizadas a que apresentou maior susceptibilidade aos biocompostos, foi o leiteiro (*Euphorbia heterophylla*) com danos de até 90% na área foliar quando utilizado o biocomposto 2 na forma não filtrada (Tabela 13).

Tabela 13. Efeito dos biocompostos 2 sobre as plantas daninhas, apresentados em notas a partir da escala diagramática, aos 7 e 14 dias após a aplicação do tratamento.

Plantas daninhas	Biocomposto 2 F		Biocomposto 2 NF	
	7 Dias	14 Dias	7 Dias	14 Dias
<i>Euphorbia heterophylla</i>	A	A	A	A
<i>Bidens pilosa</i>	C	C	E	E
<i>Ichananthus candiens</i>	E	E	E	E
<i>Testemunha</i>	E	E	E	E

*Biocomposto 2 filtrado (F); Biocomposto não filtrado (NF). Escala diagramática, com porcentagem de fitotoxicidade onde: 0% foi conferida a nota E; 0,3 a 3,0% nota D; 4,0 a 12% nota C; 20,0 a 40,0% nota B e acima de 40% nota A.

O biocomposto 12, o qual apresentava maior quantificação da biomassa fúngica, apresentou uma fitotoxicidade de até 60%, quando utilizado na forma não filtrado (Tabela 14), com exceção do leiteiro, nenhuma outra planta daninha estudada mostrou-se suscetível aos biocompostos utilizados. O efeito tóxico de bioherbicidas devem-se as interações planta-patógeno, conferindo a eles, alta especificidade (HARDING E RAIZADA, 2015).

Tabela 14. Efeito dos biocomposto (Ensaio 12) sobre as plantas daninhas, apresentados em notas a partir da escala diagramática, aos 7 e 14 dias após a aplicação do tratamento.

Plantas daninhas	Biocomposto 12 F		Biocomposto 12 NF	
	7 Dias	14 Dias	7 Dias	14 Dias
<i>Euphorbia heterophylla</i>	B	A	A	A
<i>Bidens pilosa</i>	E	D	D	D
<i>Ichananthus candiens</i>	E	E	E	E
<i>Testemunha</i>	E	E	E	E

*Biocomposto 12 filtrado (F); Biocomposto não filtrado (NF). Escala diagramática, com porcentagem de fitotoxicidade onde: 0% foi conferida a nota E; 0,3 a 3,0% nota D; 4,0 a 12% nota C; 20,0 a 40,0% nota B e acima de 40% nota A.

O biocomposto 2 apresentou o melhor resultado quando utilizado na forma não filtrada (Figura 10), assim como o biocomposto 12, porém ao comparamos estes dois

ensaios, verificamos que o ensaio 2 sobressaiu ao 12 na avaliação da fitotoxicidade, apresentando melhor potencial bioherbicida, ressaltando que o ensaio em questão foi o que continha maiores atividades enzimáticas.



Figura 10. Danos a plantas de leiteiro do biocomposto 2 aos 14 dias após as aplicações preliminares.

Assim, percebe-se que os tratamentos utilizados na forma filtrada não apresentaram danos severos nas plantas daninhas, não retardando o seu desenvolvimento, com isso podemos perceber que o microrganismo em estudo é o patógeno causador de injúrias em plantas de leiteiro, porém as enzimas presentes nos biocompostos podem servir como facilitadores na entrada deste fungo na planta, pois elas podem degradar as paredes das células vegetais, proteínas e membranas lipídicas presentes nas plantas (GHORBANI et al., 2005).

Daguerre et al (2014) relata a antibiose fúngica que esta relacionada com a produção de antibióticos, enzimas e metabólitos secundários por fungos, como por exemplo *Trichoderma* spp. e *Gliocladium* spp. para patógenos do solo, ou ainda, Wagner & Mitschunas (2008), relatam a patogênicidade de fungos presente nos solos, na colonização de sementes de plantas daninhas, reduzindo assim a germinação destas plantas em solos cultivados.

No trabalho de Mutchinson (1999), foi utilizado o fungo *Trichoderma virens*, na produção da fitotoxina viridiol, em mistura com o adubo de cama de aviário, para a inibição na germinação de plantas daninhas, em que os resultados mostraram-se promissores, inibindo a germinação em 68%, quando comparado ao controle.

Estudos realizados por Reichet (2017), mostraram que o fungo *Trichoderma Koningiopsis*, possui grandes características bioherbicidas, tornando-se patogênico para a planta daninha leiteiro (*Euphorbia heterophylla*). Este fungo foi isolado, de plantas da

espécie *Digitaria horizontalis*, coletadas no município de Quatro Irmãos-RS, sendo que estas plantas apresentavam alguma injúria visível, causada por fungos.

Assim, o fungo *Trichoderma koningiosis*, mostra ter alta especificidade com a planta daninha *Euphorbia heterophylla*, acentuando suas características bioherbicidas, uma vez que os maiores danos relatados foram quando utilizados os tratamentos na forma não filtrada.

6.8. RESISTÊNCIA DE *Trichoderma koningiosis* À HERBICIDAS COMERCIAIS

O halo de inibição ou disco difusão é uma técnica bastante empregada para avaliar a sensibilidade e/ou a resistência de bactérias a antibióticos (GALES et al. 2018). Estudos com o uso da combinação herbicida+fungo são necessários para determinar se há efeito sinérgico ou não associados ao agente de controle biológico (HALFELD-VIEIRA et al. 2016).

Ao avaliarmos o crescimento micelial do fungo *Trichoderma koningiosis*, na presença de diferentes herbicidas químicos, notou-se que o halo criado ao redor do tratamento que continha herbicida puro, não mudou de tamanho com o passar dos dias (Figura 11(b)) Porém o tratamento que continha o herbicida glifosato, foi o que aoresentou maior vigor na quantidade de esporos presentes nas placas de Petri, Figura 11(a).

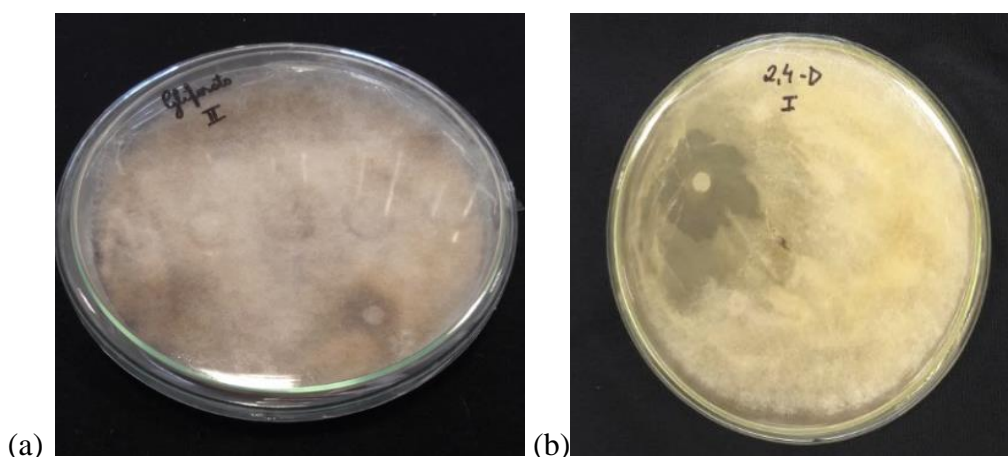


Figura 11. Placa de Petri totalmente colonizada pelo microrganismo T. koningiosis, após 7 dias de incubação.

Tadeusz et al. (1995) em seus trabalhos relataram os efeitos dos herbicidas metolacoloro e cloridazona no crescimento radial e na esporulação dos fungos

entomopatogênicos, onde constatou que *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Verticillium lacani* tiveram seu crescimento totalmente prejudicado por estes herbicidas.

Schmidt-Heydt et al. (2013), testou sete diferentes fungicidas comerciais, na inibição do crescimento micelial das espécies fúngicas *Penicillium nordicum*, *Penicillium verrucosum*, *Verticillum dahliae* e *Cladosporium* sp, mostrando que estes fungicidas inibiram o crescimento dos fungos analisados até certo ponto, sendo o fungicida “Rovral” pertencente a classe dos imidazóis, induziu a diminuição na taxa de crescimento e induziu a biossíntese de micotoxinas na cepa de *P. verrucosum*.

6.9 MISTURA DOS BIOCOMPOSTOS COM HERBICIDAS SINTÉTICOS

Avaliando a mistura do biocomposto otimizado (ensaio 2) com diferentes herbicidas comerciais observamos uma significativa diminuição nas atividades enzimáticas, (Tabela 15).

Tabela 15. Atividades enzimáticas e biomassa do biocomposto 2 conduzido com as misturas de diferentes herbicidas sintéticos e sem mistura.

Ensaio	Biomassa (g/mL)	Atividades enzimáticas (U/mL)			
		Amilase	Celulase	Lipase	Peroxidase
Glifosato	6,07	0,175	0,04	0,00	32,00
Glufosinato de amônio	3,38	2,88	2,98	0,62	69,00
2,4-D	3,05	2,47	2,89	1,56	38,00
Atrazina	8,37	20,65	7,52	0,93	0,00
*Bioensaio 2	1,85	17,25	10,62	3,22	41,00

*Ensaio conduzido sem a adição de herbicidas

Na avaliação da atividade enzimática de amilases observamos um aumento desta quando misturada, com o herbicida atrazina (20,65 U/mL) para 17,25 U/mL do biocomposto sem mistura, assim como o aumento de peroxidases quando a mistura foi feita com glufosinato de amônio (69 U/mL), para 41, 00 U/mL do biocomposto

Para a atividade de celulases e lipases houve um decréscimo de suas atividades em todas as concentrações quando comparado ao biocomposto sem a mistura, que obteve uma atividade de 10,62 e 3,22 U/mL, respectivamente.

Na literatura é escassa a informação de mistura de bioherbicidas com herbicidas sintéticos, para o manejo de plantas daninhas (MITCHELL et al., 2008). Estudos de Morin et al. (1993) demonstram sinergia entre dois microrganismos (*Puccinia Xanthii*

Schw. e *Colletotrichum orbiulare*) no controle da broca Noogoora (*Xanthium occidentale* Bertol.).

Maciel et al. (2013) avaliou o efeito do herbicida picloram na concentração de 0,1 mM sobre fungos *Ganoderma Lucidum* e *Trametes* sp., o que causou um aumento na biomassa assim como encontrado nesse estudo, bem como aumento nos teores de proteína e polissacarídeos. Este herbicida também causou estresse oxidativo em *Trametes* sp, e aumento de catalases, superóxido dismutase e fenólicos.

Brooker et al. (1996) combinaram o herbicida tripeptídeo bialafos (L-fosfinotricil-L-alanina-L-alanina) com uma cepa de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) geneticamente modificado no controle de *Aeschynomene virginica* (L.) e *Aeschynomene indica* (L.), resultando em um efeito sinérgico na severidade da doença para ambas as plantas citadas.

Winder e Van Dyke (1990) usam a mistura de *Bipolaris* spp. com o herbicida metalacloro (**2-cloro-N-(2-etil-6-metilfenil) – N – (2-metoxil-metiletil) acetamida**) no controle de capim Johnson (*Sorghum halepense*) em câmara de vegetação, controlando esta planta daninha com sucesso.

Em estudos desenvolvidos por Smith e Hallett (2006), demonstram a diminuição na dose do herbicida glifosato, quando este foi combinado com *Microsphaeropsis amaranthi* (Ell, And Barth) no controle da planta daninha *Amaranthus rudis* Sauer.

Mitchele et al. (2008) em seus trabalhos demonstraram a interação positiva de *Colletotrichum graminicola* e *Gloeocercospora sorghi* no controle de *Sorghum halepense*, quando o glifosato era aplicado a um nível sub-letal (6,6 µg/mL) 1 a 3 dias antes dos potenciais bioherbicidas.

7. CONCLUSÕES

No presente trabalho foi possível otimizar a produção do biocomposto a partir do microrganismo *Trichoderma koningiopsis*, para ser aplicado como bioherbicida. Destacando a atuação deste biocomposto quando aplicado na planta daninha leiteiro (*Euphorbia heterofila*), o qual apresentou injúrias de até 90% em suas folhas, fato bastante significativo, pela alta especificidade planta/patógeno.

Cabe ressaltar ainda que as aplicações que foram realizadas com os biocompostos não filtrados foram os que apresentaram maior fitotoxicidade, concluindo

que o microrganismo possui ação tóxica na planta, uma vez que as enzimas presentes no meio podem auxiliar o processo de infecção deste fungo.

O cultivo micelial de *T. koningiosis* na presença de diferentes herbicidas comerciais, mostrou a capacidade de resistência e/ou tolerância do mesmo, bem como na fermentação submersa realizada em mistura do biocomposto com herbicidas químicos, pois a quantificação biomassa foram maiores em todos os tratamentos em comparação com a testemunha. As atividades de amilases e peroxidases aumentaram quando em mistura com a atrazina e com o glufosinato de amônio (respectivamente).

O bioherbicida apresenta-se como uma alternativa viável no controle de plantas daninhas, auxiliando a produção agrícola sustentável, uma vez que nem sempre é necessário ou viável causar a morte da planta indesejada, mas sim, suprimir o seu desenvolvimento a fim de não competir com o desenvolvimento e produção da cultura de interesse.

8. PERSPECTIVAS DO ESTUDO

É importante destacar que este trabalho possui caráter inicial, onde foram alcançados avanços na produção e aplicação deste bioherbicida. Porém, deve-se ainda testar este bioproduto em outras plantas daninhas, bem como em culturas agrícolas, para assim, obter uma maior especificidade do microrganismo na planta alvo. Ainda, deve-se atentar para estudos onde visam a interação deste microrganismos junto a herbicidas químicos, avaliando a fitotoxicidade nas plantas infestantes, uma vez que se tem a premissa de plantas daninhas resistentes a diferentes mecanismos de ação, o microrganismo pode atuar como um potencializador do efeito tóxico.

9.REFERÊNCIAS

ACCINELLI, C.; MENCARELLI, M.; BALOGH, A.; ULMER, J.B.; SCREPANTI, C. Evaluation of field application off ungi-inoculated bioplastic granules for reducing herbicide carry over risk. **Crop Protection**. v.67, p.243-250, 2014.

ADEGAS, F.S.; VARGAS, L.; GAZZIERO, D.L.P.; KARAM, D. Impacto econômico da resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/162704/1/CT132-OL.pdf>>. Acesso em 16 de jan. 2018.

AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L. Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil. Pelotas: Editora UFPel, 2014, p.9-32.

AMRHEIN, N.; DEUS, B.; GEHRKE, P.; STEINRUCKEN, H.C. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate II. Interference of glyphosate with chorismate formation in vivo and in vitro. **Plant Physiology**, v.66, p.830-834, 1980.

ASH, J.G. The Science, art and business of successful bioherbicides. **Biological Control**. v.52, p.230-240, 2010.

BAILEY, K. The bioherbicide approach to weed control using plant pathogens. **Integrated Pest Management**, cap.13, p.245-266, 2014.

BAILEY, K.L.; BOYETCHKI, S.M.; LÄNGLE, T. Social and economic drives shaping the future of biological control: A Canadian perspective on the factors affecting the development and use of microbial biopesticides. **Biological Control**, v.52 p.221-229, 2010.

BAJWA, A.A.; MAHAJAN, G.; CHAUHAN, B.S. Nonconventional weed management strategies for modern agriculture. **Weed Science**. v.63, p.723-747, 2015.

BALASUBRAMANIAN, A.; BHATTACHARJEE, M.; SAKTHIVEL, M.; RHIRUMAVALAVAN, M.; MADHAVAN, T.; NAGARAJAN, S.K.; PALANIYANDI, V.; RAMAN, P. Isolation, purification and characterization of proteinaceous fungal α -amylase inhibitor from rhizome of *Cheilocostus speciosus* (J.Koenig) C.D.Specht. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.111, p.39-51, 2018.

BARBERIS, C.L.; CARRANZA, C.S.; MAGNOLI, K.; BENITO, N.; MAGNOLI, C.E. Development and removal ability of no-toxigenic *Aspergillus section Flavi* in presence of atrazine, chlpyrifos and endosulfan. **Revista Argentina de Microbiologia**, 9p. 2008.

BARGEL, H.; WHILHELM, B.; KOCH, K.; SCHREIBER, L.; NEINHUIS, C. Plant cuticles: Multifunctional interfaces between plant and environment. **The Evolution of Plant Physiology**, cap.1-3, p.171-194, 2004.

BAYER BRASIL. Disponível em: <<https://www.bayer.com.br/midia/sala-de-imprensa/crop-science/releases/bayer-e-embrapa-pesquisam-plantas-daninhas-resistentes-a-herbicidas.php>>. Acesso dia 15 de jan, 2018.

BHASKAR, J.T.R.; RAJ, S.K.J.; KANDASAMY, S.K.J.; VIJAYKUMAR, P.; ACHARY, A. Optimization of production of subtilisin in solid substrate fermentation using response surface methodology. **African Journal of Biotechnology**, v.7, p. 2286-2291, 2008.

BLANCO, H.G. - A importância dos estudos ecológicos nos programas de controle das plantas daninhas. **O Biológico**. v.38, p.343-350, 1972.

BROOKER, N.L.; MISCHKE, C.F.; PATTERSON, C.D.; MISCHKE, S.; BRUCKART, W.L.; LYDON, J. Pathogenicity of bar-Transformed *Colletotrichum gloeosporioides* sf. sp. *Aeschynomene*. **Biological Control**, v.7 p.159-166, 1996.

BROTMAN Y.; KAPUGANTI, G.; VITERBO, A. Trichoderma. **Current Biology**, v.20, p.390-391, 2010.

BROUN, D.E.; ZAINUDEEN, M.A. Growth kinetics and celulase biosynthesis in the continuous culture of Trichoderma viridae. **Biotechnology and Bioengineering**. v.19, p.941-958, 1977.

CASTRO, A.M.; PEREIRA, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v.33, p.181-188, 2010.

CHARUDATTAN, R. Biological controlo f weeds by means of plant pathogens: significance for integrated weed management in modern agroecology. **BioControl**. v.46, p.229-260, 2001.

CHAUHAN, B.S. Weed ecology and weed management strategies for dry-seeded rice in Asia. **Weed Technology**, v.26, p.1-13, 2012.

CIHANGIR, N.; SARIKAYA, E. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. **World Journal Microbiology Biotechnonology**, v.22, p.193-197, 2004.
CINZA, G.J. The science, art and business of sucessful bioherbicides. **Biological Control**, v52, p.230-240, 2010.

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

CORDEIRO, F.C.; DIAS, F.de.C.; MERLIM, A.de.O.; CORREIA, M. E. F.; AQUINO, A.M.de.; BROWN, G. Diversidade da macrofauna invertebrada do solo como indicadora da qualidade do solo em manejo orgânico de produção. **Revista Universidade Rural: Série Ciência da Vida**. v.24, p.29-34, 2014.

DAGUERRE, Y.; SIEGE, K.; EDEL-HERMANN, V.; STEINBERG, C. Fungal proteins and genes associated with associated with biocontrol mechanisms of soil-borne pathogens: a review. **Fungal Biology Reviews**, v.28, p.97-125, 2014.

DHITAL, S.; GIDLEY, M.J.; WARREN, F.J. Inhibition of α -amylase activity by celulose: Kinetic analysis and nutrition implications. **Carbohydrate Polymers**, v.123, p.305-312, 2015.

DOMINGUEZ, E.; CUARTERO, J.; HEREDIA, A. An overview on plant cuticle biomechanics. **Plant Science**, v.181, p.77-84, 2011.

DUARTE, D.J. Interferência da comunidade infestante na cultura da soja tolerante ao glyplosate. **Dissertação de Mestrado**. Jaboricabal-SP, UNESP, 2009, 124p.

DURIGAN, J.C.; VICTORIA FILHO, R.; MATUO, T.; PITELLI, R. Períodos de matocompetição na cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill), cultivares santa rosa e IAC-2.I – Efeitos sobre os parâmetros de produção. **Planta Daninha**, v.2, p. 86-100, 1983.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/trigo>>. Acesso dia 15 de jan. 2018.

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

FLECK, N.G. **Princípios do controle de plantas daninhas**. Porto Alegre: UFRGS, 1992, 70 p.

FLECK, N.G.; CANDEMIL, C.R.G. Interferência de plantas daninhas na cultura da soja. **Ciência Rural**, v. 25, p.27-32, 1995.

FLORENCIO, C.; CUNHA, F.M.; BADINO, A.C.; FARINAS, C.S.; XIMENES, E.; LADISCH, M.R. Secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated by submerged and sequential fermentation processes: Enzyme production for sugarcane bagasse hydrolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v.90, p.53-60, 2016.

FOSTER, R. **Controle das plantas invasoras na cultura do milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1991, 46 p.

FRANCO, O.L.; RIGDEN, D.J.; MELO, F.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases. **FEBS**, v.269, p.397-412, 2002.

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

GALES, A.C.; MACHADO, A.M.O. Interpretação de dados microbiológicos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo_2/objetivos.htm>. Acesso dia 08 de abr. 2018.

GALON et. al. Manejo de plantas daninhas em cana crua. **Planta Daninha**, Viçosa, v.28, n.4. p. 915-925, out./dez. 2010.

GARCÍA-CALVO, L.; ULLÁN, R.V.; AGUADO, M.F.; LINO, A.M.G.; FOUCE, R.B.; BARREIRO, C. Secreted protein extract analyses present the plant pathogen *Alternaria alternata* as a suitable industrial enzyme toolbox. **Journal of Proteomics**, v.177, p.48-64, 2018.

GAZOLLA, M.; SCHNEIDER, S. Qual “Fortalecimento” da agricultura familiar? Uma análise do Pronaf crédito de custeio e investimento no Rio Grande do Sul, **RESR**, v.51, p.45-68, 2013.

GAZZIERO, D.L.P.; ADEGAS, F.S.; VOLL., E.; VARGAS, L.; KARAM, D.; MATALLO, M.B.; CERDEIRA, A.L.; FORNAROLI, D.A.; OSIPE, R.; SPENGLER, A.N.; ZOIA, L. Interferência da buva em áreas cultivadas com soja. In: CONGRSSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 27., Ribeirão Preto, 2010. **Anais...**Londrina: SBCPD, p. 1555-1558.

- GEOFFRY, K.; ACHUR, R.N. Screening and production of lipase from fungal organisms. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.14, p.241-253, 2018.
- GHORBANI, R.; R LEIFERT, C.; SEEL, W. B. Biological control of weeds with antagonistic plant pathogens. **Advances Agronomy**. v.86, p.1991-225, 2005.
- GIBBS, P.A.; SEVIOUR, R.J; SCMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.20, p.17-48, 2000.
- GLASS, N.L.; SCHMOLL, M.; CATE, J.H.D.; CORADETTI, S. Plant cell wall deconstruction by Ascomycete fungi. **Review Microbiology**, v.67, p.477-498, 2013.
- GLOSE, T.K. Measurement of cellulase activity. **Pure and Applied Chemistry**, v.59, p.257-268, 1987.
- GOLDBECK, R.; RAMOS, M.M.; PEREIRA, G.A.G.; MAUGERI-FILHO, F. Cellulase production from a new strain *Acremonium strictum* isolated from the Brazilian Biome using different substrates. **Bioresource Technology**, v.128, p.797-803, 2013.
- HALFELD-VIEIRA, de.B.A.; MARINHO-PRADO, J.S.; NECHET, de.K.L.; MORANDI, M.A.B.; BETTIOL, W. Defensivos agrícolas naturais, uso e perspectivas. **EMBRAPA**, Brasília, DF, 2016. 853p.
- HARDING, D. P.; RAIZADA, M.N. Controlling weeds with fungi, bacteria and viruses: a review. **Plant Sci**. v.6, p.659, 2015.
- HEAP, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponível em: <<http://weedsociety.org/>>. Acesso 20 de setembro, 2018.
- HEAP, I.M. The occurrence of herbicide – resistant weeds worldwide. **Pestic. Sci**. v.51, p.235-243, 1997.
- HERTH, A. In: Le bio controle pour la protection des cultures 15 recommandations pour soutenir les Technologies vertes. **Ministère de l'Agriculture de la Ruralité. Pêche**. 156p. 2011.
- HOLT, J.S. Plant responses to light: a potential tool for weed management. **Weed Science**, v.43, p.474-482, 1995.
- HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v.87, p.4-10, 2003.
- JONES, R.W.; LANIN, W.T.; HANCOCK, J.G. Plant growth response to the phytotoxin viridiol produced by the fungus *Gliocladium virens*. **Weed Sci**, v.36, p.683-687, 1988.

KAO, C.H.; HSU, W.H. A gene cluster involved in pyrimidine reductive catabolism from *Brevibacillus agri* NCHU 1002. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.303, p.848-854, 2003.

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

KUBICEK, C.P. Systems biological approaches towards understanding cellulase production by *Trichoderma reesei*. **Journal of Biotechnology**, v.163, p.133-142, 2013.

LIN, S.E.; CHEN, Y.H.; Factors affecting mycelial biomass and exopolysaccharide production in submerged cultivation of *Antrodia cinnamomea* using complex media. **Bioresource Technology**, v.98, p.2511-2517, 2007.

LORITO, M.; WOO, S.L.; FERNANDEZ, I.G.; COLUCCI, G.; HARMAN, G.E.; PINTOR-TORO, J.A.; FILIPPONE, E.; MUCCIFORA, S.; LAWRENCE, C.B.; ZOINA, A.; TUZIN, S.; SCALA, F. Genes from mucoparasitic fungi as for improving plant resistance to fungal pathogens. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.95, p.7860-7868, 1998.

LORITO, M.; WOO, S.L.; HARMAN, G.E.; MONTE, E. Translational research on *Trichoderma*: From 'omics to the field. **Annual Review of Phytopathology**, v.48, p.395-417, 2010).

MACIEL, G.M.; INÁCIO, F.D.; SÁ-NAKANISGI, A.B.; HAMINIUK, C.W.I.; CASTOLDI, R.; COMAR, J.F.; BRACHT, A.; PERALTA, R.M. Responce of *Ganoderma lucidum* and *Trametes* sp. to the herbicide picloram: Tolerance, antioxidants and production of ligninolytic enzymes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.105, p.84-92, 2013.

MANDERSCHIED, R.; WILD, A. Studies on the mechanism of inhibition byphosphinothricin of glutamine synthetase isolated from *Triticum aestivum* L. **Journal of Plant Physiology**, v.123, p.135-142, 1986.

MASILIONYTE, L.; MAIKSTENIENE, S.; KRIAUCIUNIENE, Z.; JABLONSKYTE-RASCE, D.; ZOU, L.; SARAUSKIS, E. Effect of cover crops in smothering weeds and volunteer plants in alternative farming systems. **Crop Protection**, v.91, p.74-81, 2017.

MASON, H.E.; NAVABI, A.; FRICK, B.L.; O'DONOVAN, J.T.; SPANER, D.M. The weed-competitive ability of canada western red spring wheat cultivars grown under organic mangement. **Crop Science**, v.47, p.1167-1176, 2007.

MASSART, S.; JIJAKLI, H.M. Use of molecular techniques to elucidate the mechanisms of action of fungal biocontrol agentes: A review. **Journal of Microbiological Methods**, v.69, p.229-241, 2007.

MEDINA, J.C.D.; WOICIECHOWSKI, A.L.; GUIMARÃES, L.R.C.; KARP, S.G.; SOCCOL, C.R. Peroxidases. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**, cap.10, p.217-232, 2017.

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

MITCHELL, J.K.; YERKES, C.N.; RACINE, S.R.; LEWIA, E.H. The interaction of two potential fungal bioherbicides and a sub-lethal rate of glyphosate for the control of shattercane. **Biological Control**, v.46, p.391-399, 2008.

MORIN, L.; AULD, B.A.; BROWN, J.F. Synergy between *Puccinia xanthi* and *Colletotrichum orbiculare* on *Xanthim occidentale*. **Biological Control**, v.3, p.296-310, 1993.

MOSS, S.; ULBER, L.; HOED, I. Aherbicide resistance risk matrix. **Crop Protection**, v.115, p.13-19, 2019.

MUTCHINSON, C. *Trichoderma virens*-Inoculated composted chicken manure for biological weed control. **Biological Control**, v.16, p.217-222, 1999.

NICOLÁS, C.; HERMOSA, R.; RUBIO, B.; MUKHERJEE, P.K.; MONTE, E. *Trichoderma* genes in plants for stress tolerance-status and prospects. **Plant Science**, v.228, p.71-78, 2017.

NUNES, C.C.; ALVES, S.A.M. Elaboração e validação de escala diagramática para quantificação da severidade de entomosporiose em folhas de pereira. **Tropical Plant Pathology**, v.36, p.585, 2011.

PANNACCI, E.; TEI, F. Effects of mechanical and chemical methods on weed control, weed rain and crop yield in maize, sunflower and soybean. **Crop Protection**, v.64, p.51-59, 2014.

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

PAULA, J.M.; AGOSTINETTO, D.; SCHAEGLER, C.E.; VARGAS, L.; SILVA, D.R.O. Competição de trigo com azevém em função de épocas de aplicação e doses de nitrogênio. **Planta Daninha**, v.29, p.557-563, 2011.

PITELLI, R.A. Competição e controle das plantas daninhas em áreas agrícolas. Série Técnica IPEF, Piracicaba, SP. Disponível em: <http://www.lpv.esalq.usp.br/sites/default/files/8%20-%20Leitura%20interferencia%20das%20plantas%20daninhas%202_0.pdf>. Acesso em 13 de fevereiro de 2018.

PITELLI, R.A. **Efeitos de períodos de convivência e de controle das plantas daninhas no crescimento, nutrição mineral, e na produtividade da cultura da cebola (*Allium cepa* L.)**. 1987. 140f. Tese (Livre-Docência em Ecologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 1987b.

- PITELLI, R.A.; PAVANI, M.C.M.D. Feralidade e transgenese. In: BORÉM A. (Org.). **Biotecnologia e Meio Ambiente**. Viçosa: Folha de Viçosa, p.363-384, 2004.
- PITELLI, R.A.; PITELLI, R.L.C.M. Biologia e Ecofisiologia de Plantas Daninhas. **Manual de Manejo e Controle de Plantas Daninhas**. Bento Gonçalves: EMBRAPA, v. 1, p.29-56, 2004.
- PITELLI, R.A. Interferência de plantas daninhas em culturas agrícolas. **Informe Agropecuário** v.11, p.16-25, 1985.
- PONGSAWASDI, P.; YAGISAWA, M. Screening and identification of a cyclomaltodextrin glucanotransferase-producing bacteria. **Journal Fementation Technology**, v.65, p.463-467, 1987.
- PROSSER, J.I.; TOUGH, A.J. Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganisms. **Biotechnology**, v.10, p.253-254, 1991.
- RAO, A.; SINGH, R.G.; MAHAJAN, G.; WANI, S.P. Weeds research issues, challenges, and opportunities in India. **Crop Protection**, 2018.
- REICHERT, F.W.J.; Controle de plantas daninhas e seletividade a cultura pela aplicação de isolados fúngicos. **Dissertação de Mestrado**. Erechim, UFFS, 2017, 59p.
- RIEDERER, M. Introduction: biology of the plant cuticle. **Biology of the Plant**, v.1, p.1-10, 2006.
- RODRIGUES, C. CASSINI, S.T.; ANTUNES, P.W.; PINOTTI, L.M.; de PINHO KELLER, R.; GONÇALVES, R.F. Lipase-producing fungi for wastewater treatment and bioenergy production. **Journal of Biotechnology**, v.15, p.759-757, 2016.
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. 1ª Ed. Campinas/SP: Casa do Pão Editora, 2005.
- SARDANA, V.; MAHAJAN, G.; JABRAN, K.; CHAUHAB, B.S. Role of competition in managing weeds: Na introduction to the special issue. **Crop Protection**, v.95, p.1-7, 2017.
- SAVASTOS, A.; KALAMPOKIS, I.; PANAGIOTOPOULOU, A.; PELECANOU, M.; ALIFERIS, K.A. IMPLICATION OF *Fusarium graminearum* primary metabolism in its resistance to benzimidazole fungicides as revealed by ¹H NMR metabolomics. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. Available online 3 abril 2018.
- SBARDELOTTO, M.; DALL AGNOL, A.; VENTURIN, B.; MULINARI, J.; TREICHEL, H.; VARGAS, G.D.L.P. Avaliação da produção de lipase microbiana a partir de *Aspergillus* sp., utilizando torta de canola como substrato. **Anais do III Simpósio d Bioquímica e Biotecnologia**, 2013.

SCHMIDT-HEYDT, M.; STOLL, D.; GEISEN, R. Fungicides effectively used for growth inhibition of several fungi could induce mycotoxin biosynthesis in toxigenic species. **International Journal of Food Microbiology**, v.166, p.407-412, 2013.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v.19, p.627-662, 2001.

SHAW, W.C. – Integrated weed management systems technology for pest management. **Weed Science**. v.30, p.2-12, 1982.

SHIH, I.L.; TSAI, L.K.; HSIEH, C. Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*. **Biochemical Engineering Journal**, v.33, p.193-201, 2007.

SHORESH, M.; HARMAN, G.E.; MASTOURI, F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. **Annual Review of Phytopathology**, v.48, p.21-43, 2010.

SILVA, A.A. da.; SILVA, J.F.; FERREIRA, F.A.; FERREIRA, L.R.; SILVA, J.F.; OLIVEIRA JÚNIOR, R.S.; VARGAS, L. **Controle de plantas daninhas**. Brasília, DF. Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior; Viçosa, MG: UFV, 1999, 260 p.

SILVA, A.A.; FERREIRA, F.A.; FERREIRA, L.R.; SANTOS, J.B. **Tópicos de manejo de plantas daninhas**. Viçosa/MG: UFV, 2007, cap.2, p.63-81.

SMITH, D.A.; HALLETT, S.G. Interactions between chemical herbicides and the candidate bioherbicide *Microsphaeropsis amaranthi*. **Weed Science**, v.54, p.532-537, 2006.

SOARES dos. S.A.M.; MACHADO, O.L.T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica**, v.1, p.9, 2007.

SOUZA, A.R.C. Obtenção de isolados fúngicos a partir de recursos biológicos do bioma pampa com potencial no controle de plantas daninhas. **Tese de Doutorado**. Santa Maria, UFSM, 2015.

SRIVASRAVA, N.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, P.K.; GPTA, V.J.; MOLINA, G.; COUTO, R.S.; MANIKANTA, A.; RAMTEKE, P.W. Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.82, p.2379-2386, 2018.

TADEUSZ, J.; MAJCHROWICZ, I. Effects of herbicides on in vitro vegetative growth and sporulation of entomopathogenic fungi. **Crop Protection**, v.14, p.81-87, 1995.

TAKEDA, Y.; MARUTA, N.; HIZUKURI, S.; BIENVENIDO, O.J. Structures of indica rice starches (IR48 and IR64) having intermediate affinities for iodine. **Carbohydrate Research**, v.187, p.287-294, 1989.

TAO, B.; SHAO, B.H.; QIAO, Y.X.; WANG, X.Q.; CHANG, S.J.; QIU, L.Q. Identification and functional analysis of a new glyphosate resistance gene from a fungus cDNA library. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.140, p.65-68, 2017.

TREICHEL, H.; SBARDELOTTO, M.; VENTURIN, B.; DALLAGNOL, A.; MULINARI, J.; GOLUNSKI, S.M.; BALDONI, D.B.; BEVILACQUA, C.B.; JACQUES, R.J.S.; VARGAS, G.D.L.P.; MOSSI, A.J. Lipase production from a new isolated *Aspergillus niger* by solid state fermentation using canola cake as substrate. **Current Biotechnology**, v.5, p.1-7, 2016.

VAN ACKER, R. C.; SWANTON, C.J.; WEISE, S.F. The critical period of weed control in soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.). **Weed Science**, v.41, p.194-200, 1993.

VARGAS, L.; ROMAN, E.S. Manejo e controle de plantas daninhas na cultura de soja (2006). Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/852517/1/pdo62.pdf>>. Acesso em: 13 de fevereiro de 2018.

VERMA, M.; SATINDER, K.BRAR.; TYAGI, R.D.; SURAMPALLI, R. Y.; VALÉRO, J.R. Antagonistic fungi, *Trichodema* spp.: Panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, v.37, p.1-20, 2007.

WAGNER, M.; MITSCHUNAS, N. Fungal effects on seed bank persistence and potential applications in weed biocontrol: A review. **Basic and Applied Ecology**, v.9, p.191-203, 2008.

WEINER, J.; GRIEPENTROG, L.; KRISTENSEN, L. Suppression of weeds by spring wheat *Triticum aestivum* increases with crop density and spatial uniformity. **Journal Applied Ecology**, v.38, p.784-790, 2001.

WINDER, C.G.; VAN DYKE. The pathogenicity, virulence and biocontrol potential of two *Bipolaris* species on johnsongrass (*Sorghum halepense*). **Weed Science**, v.38, p.89-94, 1990.

XUE, D.S.; CHEN, H.Y.; LIN, D.Q.; GUAN, Y.X.; YAO, S.J. Optimization of synergistic parameter for thermostable cellulase activity of *Aspergillus heteromorphus* using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v.48, p.28-35, 2009.