



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

ALINE FRUMI CAMARGO

**VIABILIDADE DA PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS A PARTIR
DO FUNGO *Trichoderma koningiopsis* POR PROCESSO FERMENTATIVO
SUBMERSO EM BIORREATOR**

ERECHIM - RS

2018

ALINE FRUMI CAMARGO

**VIABILIDADE DA PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS A PARTIR
DO FUNGO *Trichoderma koningiopsis* POR PROCESSO FERMENTATIVO
SUBMERSO EM BIORREATOR**

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

Orientadora: Prof. Dra. Helen Treichel

ERECHIM - RS
2018

ALINE FRUMI CAMARGO

**VIABILIDADE DA PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS A PARTIR
DO FUNGO *Trichoderma koningiopsis* POR PROCESSO FERMENTATIVO
SUBMERSO EM BIORREATOR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS –
Campus Erechim, como parte das exigências para
obtenção do título de Bacharel em Engenharia
Ambiental e Sanitária, defendido em banca
examinadora em 28/06/2018.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Helen Treichel (Orientadora)
UFFS – Erechim

Prof. Dr. Paulo Afonso Hartmann – UFFS
UFFS – Erechim

Prof. Dra. Cristiane Funghetto Fuzinatto
UFFS – Erechim

Erechim/RS, junho de 2018.

Dedico este trabalho aos que compartilharam comigo esta caminhada acadêmica e a todos que buscam através da pesquisa e da empatia um universo mais sensato e amável, especialmente as mulheres pesquisadoras.

AGRADECIMENTOS

Aos motivos de minha encarnação nesse planeta, meus impulsionares ao despertar toda manhã, minha Mãe Clenir e meu Pai José, gratidão infinita, por me mostrarem o que é fundamental nessa caminhada: o respeito, amor, ética, equilíbrio e a empatia. Obrigada por seus valores, por estabelecerem limites e por me incentivarem a continuar, sempre, sempre e sempre. Mãe, obrigada por ser uma mulher tão forte e me inspirar. Pai, obrigada por fazer o impossível para que aproveitasse ao máximo minha graduação, pelos boletos pagos (risos) para que eu pudesse participar de congressos relevantes para a área que pretendo dar seguimento em minha vida, a pesquisa. Obrigada por me tirarem da zona de conforto, e quero que saibam, essa graduação também é de vocês.

Agradeço também ao meu amigo e namorado Felipe, pela compreensão, respeito, apoio e incentivo. Obrigada pelas incontáveis caronas, incluindo aquelas de caminhão (carregado com muitos botijões de gás) antes do trabalho, principalmente em feriados. Espero que possamos continuar cultivando a nossa relação.

Com meu coração transbordando gratidão, carinho e admiração quero agradecer de forma especial minha orientadora de vida e também de caminhada acadêmica, a amiga Helen Treichel, obrigada pela oportunidade de conviver e compartilhar experiências com uma alma tão corajosa de coração enorme, com tanto profissionalismo, respeito e com simplicidade em repassar seu conhecimento de uma forma tão leve. Treichel Boss, obrigada por confiar no meu trabalho e dispor do teu tempo para que eu pudesse evoluir como profissional e pessoa, obrigada pela eficiência e rapidez em responder e-mails (risos) e por me proporcionar o incrível mundo da pesquisa, pelas caronas para que eu pudesse trabalhar sábados, domingos e feriados, quando os horários dos ônibus não ajudavam em nada, por passar dias conosco no LAMIBI trabalhando ao nosso lado, tomando um chimas, porque sem ele o dia não começa. Serei eternamente grata por tudo que experimentei com a iniciação científica e vivenciei neste laboratório maravilhoso.

Falando nisso, já aproveito para agradecer ao universo pela chegada da Tia Gis no LAMIBI, por conhecer uma pessoa com uma alma tão fantástica e pura, uma eterna menina. Gis, obrigada por todo o suporte, conversas e desabafos em nossa rotina do laboratório, gratidão por todo teu empenho na realização das nossas pesquisas e resolução de problemas. Espero que eu continue perto da sua luz por tempo indeterminado.

Aos pesquisadores do Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos, gratidão por vocês existirem na minha vida! Obrigada por todo o aprendizado compartilhado durante minha caminhada como bolsista. Em especial, agradeço a quase alma gêmea, Thamarys pelo

companheirismo, sintonia e pela oportunidade de compartilhar tantas coisas boas com você e evoluirmos juntas, por me auxiliar nas quantificações enzimáticas em feriados, com mil tubos de ensaio para lavar no final do dia.

Bruno Venturin que me apresentou as rotinas de Laboratório lá em 2014 e um pouco mais tarde, a Jéssica Mulinari, que até hoje continuam me ensinando, mesmo à distância. Em especial ao Brunildes que apesar de suas rabugentices de manhã cedo se dispôs a me ajudar com os experimentos no biorreator e que graças ao seu porte atlético foi possível realizar as autoclavagens do biorreator com sucesso, obrigada!

As melhores voluntárias deste mundo, Carol, Simo e Nati obrigada por tanta dedicação e cuidado com todos os trabalhos desenvolvimentos no LAMIBI, espero que logo eu possa chamá-las de bolsistas. A todos os pesquisadores que já passaram pelo Laboratório, grata por todo conhecimento compartilhado.

Aos pesquisadores do Laboratório de Agroecologia agradeço pela disponibilidade em fazer parte deste trabalho, organizando todos os experimentos para aplicação dos biocompostos, em especial ao Professor Altemir, que foi um pouquinho orientador também, aceitou esse desafio e disponibilizou diversos recursos para a realização deste trabalho. Agradeço de coração, aos colegas Sabrina, Carine e Cleiton que tenho certeza, deixaram suas pesquisas de lado para ajudar com resultados obtidos neste trabalho, parabéns pela dedicação de vocês!

Aos pesquisadores do Grupo MASSA por também auxiliarem na realização dos experimentos, em especial ao Professor Leandro Galon, obrigada.

A amiga e Professora Cristiane Funghetto Fuzinato, muito obrigada por aceitar fazer parte da banca na avaliação deste trabalho, e por ter contribuído para meu desenvolvimento como pessoa e profissional dentro desta Universidade, grata pelo universo te trazer até nós.

Ao Professor da disciplina Paulo Hartmann, meu agradecimento, por dedicar-se e auxiliar com a redação e apresentação deste trabalho, dando suporte e disponibilizando todas as informações necessárias para facilitar todo esse processo.

A todos professores que contribuíram para minha formação, desde a básica até a graduação, sempre me incentivando a encontrar um propósito para essa busca acadêmica. Vocês sem dúvida são parte fundamental desta formação. Gratidão!

Enfim, a todos que de alguma forma, me impulsionaram e apoiaram durante a minha vida acadêmica, muito obrigada por todas as vibrações de amor, que o universo lhes retribua com muita luz!

“Você pode sobreviver, mas sobrevivência não é vida. Opte pelo que faz o seu coração vibrar. Opte pelo que gostaria de fazer, apesar de todas as consequências.”

(Osho)

RESUMO

A crescente demanda por alimentos é responsável por estimular o setor agrícola. Entretanto, grandes volumes de nutrientes são perdidos na produção, fato este relacionado com a ação de plantas daninhas presentes nestes ambientes. Para o controle destas plantas daninhas, normalmente, utilizam-se compostos químicos, sendo que sua aplicação excessiva, além de poder estimular resistências na planta invasora, afeta a qualidade ambiental e a saúde humana. Devido a isso, buscam-se novas tecnologias de manejo para plantas daninhas, demandando pesquisas a partir de herbicidas biológicos (bioherbicidas), que têm sua produção baseada em plantas e microrganismos fitopatogênicos, principalmente fungos. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade da produção e aplicação de biocompostos a partir do fungo *Trichoderma koningiopsis* por processo fermentativo submerso em biorreator. Para isso, ensaios fermentativos foram realizados em biorreator, sendo que durante o processo coletou-se amostras de 24 em 24 horas para avaliar a produção enzimática (amilase, celulase, lipase e peroxidase) e então ao final da fermentação quantificou-se a biomassa fúngica. Testes de sensibilidade do *T. koningiopsis* na presença de herbicidas químicos (Ácido diclorofenixiacético (2, 4-D), Glifosato e Glufosinato de Amônio) foram realizados com o intuito de avaliar o efeito da combinação e possível sinergismo destes dois agentes frente ao controle de plantas daninhas. Primeiramente avaliou-se a formação do halo inibitório em placas de Petri, avaliando a sensibilidade ou resistência fúngica frente aos herbicidas sintéticos testados. Também se testou tal combinação em processo fermentativo para posterior aplicação nas seguintes plantas daninhas: picão-preto (*Bidens pilosa*), buva (*Conyza bonariensis*) e leiteiro (*Euphorbia heterophylla*). Numa visão global do estudo, os resultados obtidos no processo fermentativo em ampliação de escala mostraram que em 72 horas ocorreram as maiores produções enzimáticas, atingindo-se até 80% de fitotoxicidade nas plantas daninhas. O microrganismo *T. koningiopsis* apresentou resistência à maioria dos herbicidas testados, incluindo altas doses de glifosato, sugerindo que o fungo apresenta capacidade de adaptação ao meio contendo doses extremas de herbicidas químicos. Na aplicação de biocompostos na presença de herbicidas químicos, ocorreu a potencialização da ação fitotóxica (100%) sob as plantas alvo, ressaltando fitotoxicidade à buva, atualmente resistente aos herbicidas disponíveis. Os bioherbicidas estudados possuem características promissoras a serem exploradas no biocontrole de plantas daninhas, abordando aspectos no âmbito da sustentabilidade ambiental.

Palavras-chave: Atividade enzimática. Ampliação de escala. Biocontrole. Interação biológica e química. *Trichoderma koningiopsis*.

ABSTRACT

The growing demand for food is responsible for stimulating the agricultural sector. However, large volumes of nutrients are lost in production, a fact related to the action of weeds present in these environments. For the control of these weeds, chemical compounds are usually used, and their excessive application, besides being able to stimulate resistance in the invasive plant, affects the environmental quality and human health. Due to this, we are looking for new technologies of weed management, demanding researches from biological herbicides (bioherbicides), which have their production based on plants and phytopathogenic microorganisms, mainly fungi. In this sense, the objective of this work was to evaluate the viability of the production and application of biocomposites from the fungus *Trichoderma koningiopsis* by fermentative process submerged in bioreactor. For this, fermentative tests were carried in a bioreactor, and samples were taken every 24 hours to evaluate the enzymatic production (amylase, cellulase, lipase and peroxidase) and then at end of fermentation the fungal biomass was quantified. *T. koningiopsis* sensitivity tests in the presence of synthetic herbicides (Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), Glyphosate and Ammonium Glufosinate) were carried out with the purpose of evaluating the effect of combination and possible synergism of these two agents against the control of weeds. First, inhibitory halo formation was evaluated in Petri dishes, evaluating the sensitivity or fungal resistance against the synthetic herbicides tested. This combination was also tested in a fermentation process for subsequent application to the following weeds: *Bidens pilosa*, *Conyza bonariensis* and *Euphorbia heterophylla*. In an overall view of the study, the results obtained in fermentation process in scale expansion showed that in 72 hours the highest enzymatic production occurred, reaching up to 80% of phytotoxicity in the weeds. The microorganism *T. koningiopsis* showed resistance to most of the chemical herbicides tested, including high dosages of Glyphosate, suggesting that fungus shows ability to adapt the medium containing extreme doses of synthetic herbicides. In the application of biocomposites in the presence of synthetic herbicides, suggests potentiation of the phytotoxic action (100%) under the target plants, emphasizing phytotoxicity to the “buva” (*Conyza bonariensi*), currently resistant to available synthetic herbicides. The bioherbicides studied have promising characteristics to be explored in the biocontrol of weeds, addressing aspects in the ambit of environmental sustainability.

Keywords: Enzymatic activity. Scale-up. Biocontrol. Biological and chemical interaction. *Trichoderma koningiopsis*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 MICRORGANISMO.....	16
3.2 PROCESSO DE AMPLIAÇÃO DE ESCALA.....	17
3.3 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	18
3.3.1 Amilase	18
3.3.2 Celulase	19
3.3.3 Lipase.....	20
3.3.4 Peroxidase	21
3.4 QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA FÚNGICA.....	21
3.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO COMBINADO DE HERBICIDAS SINTÉTICOS COM OS BIOCOMPOSTOS PRODUZIDOS	22
3.5.1 Sensibilidade do <i>T. koningiopsis</i> à herbicidas sintéticos: disco-difuso.....	22
3.5.2 Sensibilidade do <i>T. koningiopsis</i> à herbicidas sintéticos: fermentação em pequena escala.....	23
3.6 AVALIAÇÃO DO BIOHERBICIDA SOBRE AS PLANTAS DANINHAS.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1 AMPLIAÇÃO DA ESCALA DO PROCESSO FERMENTATIVO EM BIORREATOR.....	26
4.2 APLICAÇÃO DOS BIOCOMPOSTOS PRODUZIDOS EM BIORREATOR	30
4.3 AVALIAÇÃO DA COMBINAÇÃO DE HERBICIDAS SINTÉTICOS E DO BIOCOMPOSTO PRODUZIDO EM LABORATÓRIO.....	34
4.4 APLICAÇÃO EM PLANTAS DANINHAS COMBINANDO HERBICIDAS SINTÉTICOS E BIOLÓGICOS.....	36
5. CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DA PESQUISA.....	47
REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda para atender o fornecimento de alimentos impulsiona a produção agrícola e para garantir a geração de estímulos nesta área os compostos químicos são muito utilizados para controle de patógenos, insetos e plantas indesejáveis com intuito de assegurar um maior rendimento agrícola (MAZOYER; ROUDART, 2010; MORILLO; VILLAVARDE, 2017).

Infelizmente ainda se perde muito da produção agrícola e as plantas daninhas são responsáveis por parte deste déficit, por isso, um controle eficiente destas plantas se faz necessário (VAREJÃO et al., 2013). Entretanto, a aplicação excessiva de compostos químicos como forma de manejo destas plantas, sobre os recursos naturais pode afetar negativamente a qualidade ambiental e a saúde humana, de mesma forma que ainda poderá vir a ser causa de poluição no solo, água e ar. Por essa razão, no ano de 1995 constatou-se a existência de 12 poluentes orgânicos persistentes (POPs) e estes compostos foram proibidos por apresentarem efeitos antagônicos ao ambiente (MORILLO; VILLAVARDE, 2017).

São por esses motivos que segundo Varejão et al. (2013), buscam-se novas tecnologias de controle da ação de plantas daninhas, neste contexto surgem então como estratégia de manejo os biocompostos ou bioherbicidas, que são herbicidas naturais elaborados com base em plantas ou microrganismos patogênicos, sendo que há predomínio na literatura da utilização de fungos como uma alternativa eficaz de controle biológico (KLAIC et al., 2015). O biocontrole parte da abordagem de incorporação de um agente patógeno para que o resultado apresente eficiência, devido a ampla biodiversidade de fungos existente, o seu uso principalmente no que se refere a fungos fitopatogênicos tem recebido grande consideração para a formulação de bioherbicidas (CHARUDATTAN; DINOOR, 2000).

Segundo estudos de Moreno et al. (2009) e Qian et al. (2013), o microrganismo *Trichoderma koningiopsis* vem sendo amplamente empregado para processos de controle biológico, pois provoca alterações foliares nas plantas e na resistência às doenças, demonstrando potencial para controlar diversos patógenos, inclusive plantas daninhas, além de apresentar habilidades em induzir a atividade de proteínas nas plantas. Várias espécies de *Trichoderma* apresentaram melhorias nos rendimentos e eficácia no controle de doenças nas plantas (SHAFAWATI; SIDDIQUEE, 2013), além disso, o fungo *Trichoderma* spp. é considerado um bom produtor de enzimas, conforme demonstra o estudo realizado por Verma

et al. (2007). Algumas enzimas são citadas na literatura como sendo a porta de entrada de microrganismos para atingir o tecido foliar de plantas, pois agem degradando a parede celular da mesma, celulase e lipase são algumas destas enzimas (CORDEAU et al., 2016; GALON et al., 2016).

Para Verma et al. (2007) e Wyss et al. (2004), devido à preocupação com o rendimento agrícola para a produção de alimentos, acredita-se que a redução do uso de compostos químicos sintéticos não apresenta viabilidade, entretanto os autores sugerem a utilização combinada de herbicidas químicos e biológicos, esse mecanismo promoveria um ambiente de produção mais saudável, assegurando um bom aproveitamento para as demandas agrícolas, além de reduzir o risco ambiental. Segundo estudos de Wyss et al. (2004), os herbicidas químicos são compatíveis com os naturais e poderiam ser utilizados para potencializar a eficácia de biofertilizantes.

Pesquisas no campo de biofertilizantes recebem menor apoio em comparação com os fertilizantes convencionais, a falta de agências financiadoras, o custo do processo de fermentação e dos estágios iniciais para a produção dos herbicidas naturais são fatores que evitam o interesse de empresas para o desenvolvimento desse tipo de produto (KLAIC et al., 2015).

A ampliação da escala de produção de biofertilizantes se faz necessária quando se considera a otimização dos parâmetros operacionais para satisfazer a certa demanda industrial (YANG, 2010). Segundo Cheng et al. (2003), Huang e McDonald (2009), o aumento de escala é mais viável em processos em estado submerso do que em sólido, sendo que todos os parâmetros devem ser estudados e redimensionados para que esse aumento possa ser aplicado.

Para realizar o escalonamento de processos fermentativos submersos, como a produção de biofertilizantes, geralmente utilizam-se biorreatores. Huang e McDonald (2009) trouxeram em suas pesquisas alguns tipos de biorreatores aplicados a área de bioprocessos, dentre eles, a configuração do tipo tanque agitado, que possui boa aplicabilidade para a fermentação microbiana, pois possuem vantagens como, flexibilidade e facilidade de operação. A escolha do biorreator é extremamente relevante, pois será responsável pela maximização da produção do biofertilizante, reduzindo os custos e originando um processo viável.

Perante o exposto, verifica-se que a busca por tecnologias alternativas à base de produtos naturais que apresentem eficiência, viabilidade econômica, social, ecológica, e que possam reduzir a utilização de compostos químicos, impulsionam a demanda por estratégias de manejo inovadoras, por isso, as pesquisas nesta área desenvolvem-se de maneira promissora.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade da produção e aplicação de biocompostos a partir do fungo *Trichoderma koningiopsis* por processo fermentativo submerso em biorreator. Acredita-se que dessa forma, um maior fortalecimento do agente patógeno será possível, bem como, a redução no uso de herbicidas químicos e o controle sustentável de plantas daninhas que acarrete também, em benefícios potenciais para o ambiente.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a viabilidade da produção e aplicação de biocompostos a partir do fungo *Trichoderma koningiopsis* por processo fermentativo submerso em biorreator.

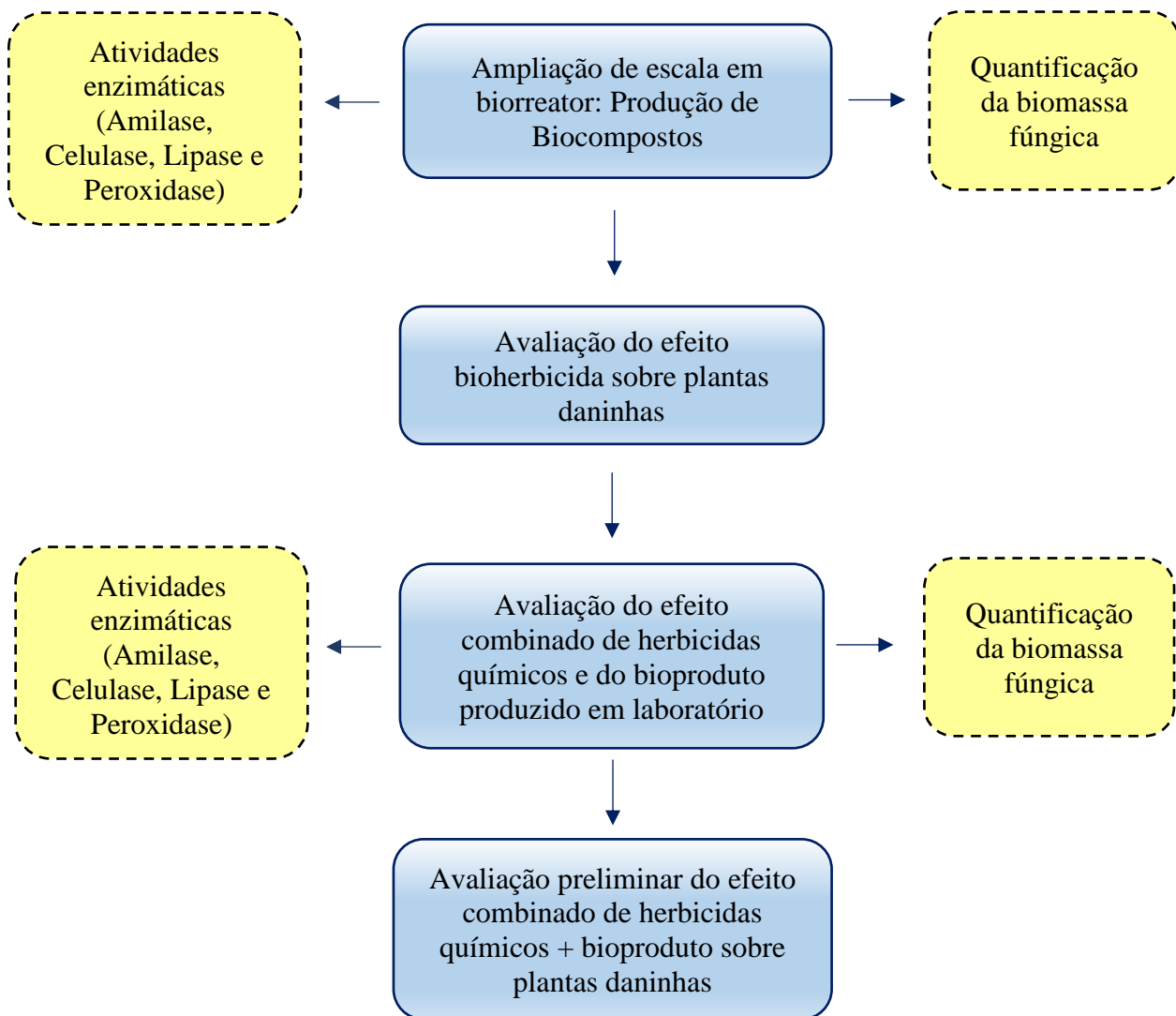
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Ampliar a escala de produção dos biocompostos em biorreator;
- Quantificar as enzimas amilase, celulase, lipase e peroxidase no biocomposto produzido por meio do fungo *Trichoderma koningiopsis*;
- Avaliar a ação combinada de herbicidas químicos e do biocomposto produzido em laboratório;
- Avaliar de forma preliminar, a ação do biocomposto como agente bioherbicida e também seu efeito combinado com herbicidas químicos quando aplicados em plantas daninhas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O fluxograma apresentado na Figura 1 mostra esquematicamente as etapas da metodologia que foi utilizada para o desenvolvimento deste trabalho.

Figura 1 – Fluxograma demonstrando a metodologia em etapas para a realização deste trabalho.

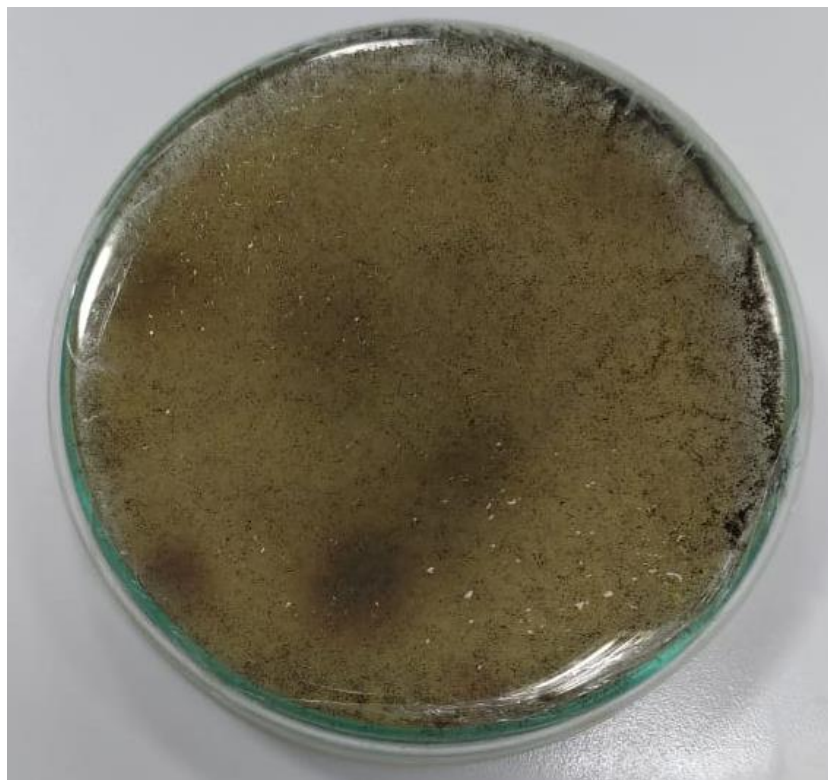


Fonte: Elaborado pela autora.

3.1 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado para a produção do biocomposto foi o fungo *Trichoderma koningiopsis* (Figura 2) que foi obtido no banco de microrganismos do Laboratório de Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul -*Campus* Erechim/RS. Reichert Júnior (2017) isolou o fungo *T. koningiopsis* a partir da planta daninha *Digitaria horizontalis*, no município de Quatro Irmãos no Rio Grande do Sul e este microrganismo foi selecionado por apresentar resultados promissores em testes preliminares relacionados ao controle de plantas daninhas.

Figura 2 – Microrganismo *Trichoderma koningiopsis* após processo de repique em placas de Petri contendo meio de cultivo Ágar Batata Dextrose (BDA) no Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos.



Fonte: Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos (LAMIBI).

Para o desenvolvimento do microrganismo utilizou-se como meio de cultivo Ágar Batata Dextrose (BDA). Após os repiques em câmara de fluxo laminar as placas foram mantidas por 7 dias em uma estufa incubadora B.O.D à uma temperatura de 28°C (REICHERT JÚNIOR, 2017).

3.2 PROCESSO DE AMPLIAÇÃO DE ESCALA

A ampliação de escala para a obtenção de biocompostos com potencial bioherbicida usando o fungo *Trichoderma koningiopsis*, baseou-se em condições previamente estudadas por Bordin et al. (2018) no Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Erechim-RS (Tabela 1), considerando como critério o potencial fitotóxico dos respectivos biocompostos produzidos em diferentes condições (ensaios 1 e 2), os quais apresentaram um potencial fitotóxico de 90 e 60% na planta *Euphorbia heterophylla*, respectivamente (BORDIN et al., 2018).

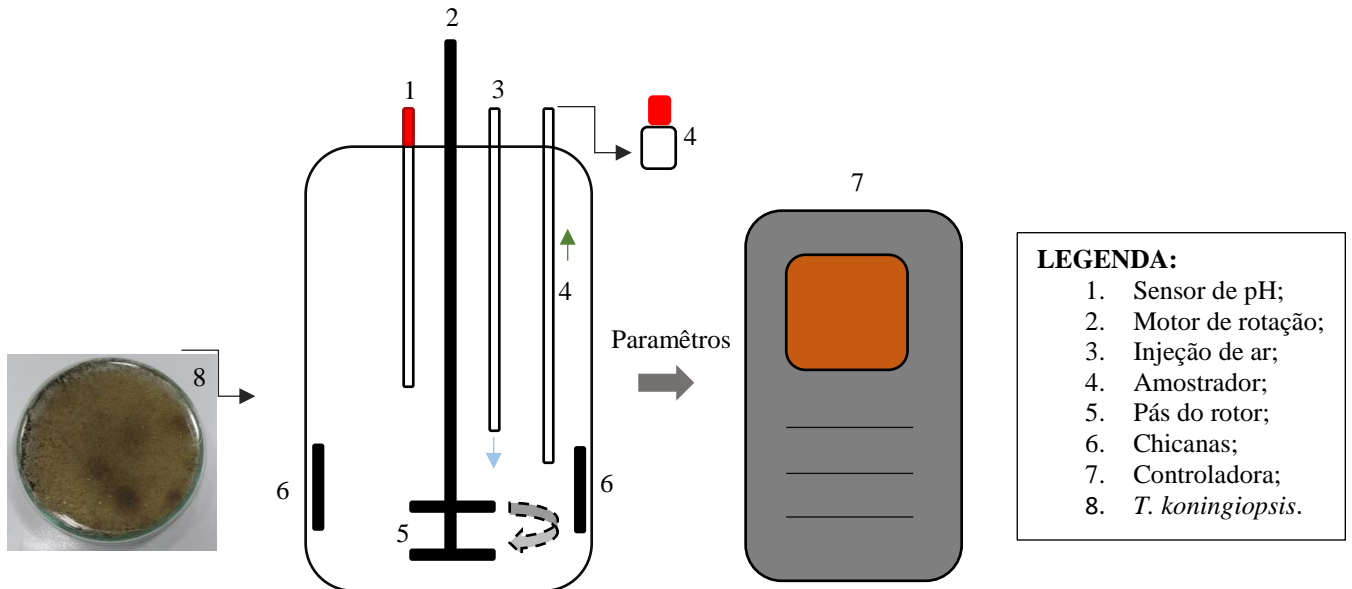
Tabela 1 – Composição do meio de cultivo para a produção dos biocompostos em biorreator usando o fungo *Trichoderma koningiopsis*.

Ensaio	Glicose (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	Peptona (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	FeSO ₄ .7H ₂ O (g/L)
1	20	5	2,5	4	2
2	15	18,4	5	4	2

Considerando as condições nutricionais 1 e 2, foi realizado o processo de produção dos biocompostos em biorreator de tanque agitado (BIOTEC-FLEX, Tecnal, Brasil). Os parâmetros utilizados no biorreator foram escalonados conforme adaptações de Souza et al. (2015), sem controle de pH, com temperatura de 28°C, agitação de 40 rpm e aeração de 1,1 L/min. Os ensaios ocorreram a partir de 3 L de meio de cultivo, sendo avaliado o extrato fermentado em intervalos de 24 h, até que houvesse estabilização da atividade enzimática. Posteriormente a biomassa fúngica foi quantificada.

A Figura 3 demonstra de forma esquemática o biorreator utilizado neste estudo para a ampliação de escala do processo fermentativo dos biocompostos.

Figura 3 – Desenho esquemático do biorreator tipo tanque agitado utilizado nos ensaios de ampliação de escala dos biocompostos.



Fonte: Elaborado pela autora.

Para fins comparativos, ao final do processo em biorreator (ampliação de escala) as atividades enzimáticas e a quantificação de biomassa fúngica foram comparados com os valores obtidos em pequena escala por Bordin et al. (2018), por meio da Equação 1.

$$\frac{\text{Resultado}_{\text{ampliação de escala}} - \text{Resultado}_{\text{pequena escala}}}{\text{Resultado}_{\text{pequena escala}}} \times 100$$

Equação (1)

3.3 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Verificou-se a presença de algumas enzimas no extrato fermentado produzido e dentre uma vasta gama de possíveis enzimas, determinou-se a atividade enzimática de amilase, celulase, lipase e peroxidase.

3.3.1 Amilase

Para quantificar a enzima amilase no extrato fermentado seguiu-se a metodologia adaptada de Fuwa (1954), Pongsawadi e Yagisawa (1987). De forma mais específica, o meio

reacional foi composto pelo substrato, amido diluído em tampão acetato pH 5,0 e 100 mM na proporção m:v de 1:100, sendo que, posteriormente 1 mL desta solução foi pipetada em tubos de ensaio conjuntamente com 1 mL do extrato fermentado referente a cada ensaio (para cada ensaio realizaram-se medidas enzimáticas em triplicata). Como medida de referência utilizou-se 1 mL de água destilada no lugar do extrato fermentado, então os tubos de ensaio permaneceram por 10 minutos em banho termostático a 38°C. Em seguida a quantificação da amilase ocorreu a partir da metodologia descrita por Miller (1959) que é conhecida como DNS, ácido dinitrossalicílico.

Com a finalidade de quantificar os açúcares redutores totais (ART) presentes nas amostras baseou-se no procedimento com ácido dinitrossalicílico, no qual 0,5 mL da amostra mais 0,5 mL de DNS foram adicionados em tubos de ensaio e mantidos em banho termostático por 10 minutos e condicionados a aproximadamente 100°C. Para cessar a reação os tubos de ensaio foram dispostos em um banho de gelo, então adicionou-se 8 mL de tartarato de sódio para a fixação da cor das amostras. Feito isto foi possível realizar a leitura dos ensaios em espectrofotômetro UV-VIS, utilizando um comprimento de onda de 540 nm.

A medida de atividade enzimática utilizando DNS foi obtida a partir da construção de uma curva padrão ($R^2 = 0,99$) com a solução preparada, a Equação 2 representa como relacionou-se as leituras de absorbância (ABS) em espectrofotômetro com a quantificação de açúcares redutores totais (ART) presentes nas amostras.

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

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

Equação (2)

3.3.2 Celulase

Para quantificar a enzima celulase no extrato fermentado seguiu-se a metodologia adaptada de Ghose (1987), então pesou-se em tubos de ensaio 50 mg, que se refere aproximadamente a 7 fragmentos de 1 cm² de papel filtro, o substrato que reporta-se como fonte de celulose.

Adicionou-se aos tubos de ensaio contendo os fragmentos de papel filtro mais 2 mL de tampão acetato 0,2 com pH 5,5 e também acrescentou-se 1 mL do extrato fermentado (para a

medida de referência substituiu-se o extrato por água destilada), desta forma, os tubos permaneceram por 1 hora em banho termostático a 50 °C.

No sentido de quantificar os açúcares redutores totais a partir da liberação da celulose o método utilizado foi o descrito por Miller (1959), conforme Equação 2.

3.3.3 Lipase

Para quantificar a enzima lipase no extrato fermentado seguiu-se a metodologia conforme o proposto por Treichel et al. (2016), em que preparou-se uma emulsão, composta por 5% (v/v) de goma arábica, 10% (v/v) de óleo de oliva e tampão fosfato 100 mM, pH 6,0, foi uniformizada por um mixer, equipamento que possui pequenas hélices, auxiliando na mistura total da emulsão, utilizando 9 mL desta emulsão para cada amostra acrescentou-se 1 mL do extrato fermentado. As amostras permaneceram por 32 minutos sob agitação de 165 rpm e 35°C, com o intuito de cessar a reação adicionou-se 10 mL de acetona/etanol (1:1, v/v). Posteriormente titulou-se as amostras até pH 11, adicionando-se hidróxido de sódio (NaOH) 0,050 M, neste caso a medida controle foi composta por 9 mL de emulsão, 10 mL de acetona etanol (para que não ocorresse a reação, mesmo adicionado o extrato), e 1 mL do extrato enzimático, além da não ocorrência da reação no agitador orbital. Para a determinação da atividade lipásica foi utilizada a Equação 3.

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

Equação (3)

Sendo que:

$\bar{A}a$ = média das amostras;

Vb = valor do controle;

$MNaOH$ = molaridade do Hidróxido de sódio;

t = tempo reacional;

Vc = volume do extrato utilizado.

3.3.4 Peroxidase

Para quantificar a enzima peroxidase no extrato fermentado seguiu-se a metodologia adaptada de Devaiah e Shetty (2009), Khan e Robinson (1994), em tubos de ensaio o meio reacional foi composto por 1,5 mL de tampão fosfato 5 mM, pH 5,0; 2 mL de água destilada; 0,5 mL de guaiacol (1%) e 1 mL de peróxido de hidrogênio (0,08%) e ainda acrescentou-se 1 mL do extrato fermentado, para a medida de referência preparou-se o meio reacional da mesma forma, entretanto substituindo o extrato por água destilada. Os tubos contendo o meio reacional permaneceram em banho termostático a 35°C por 10 minutos.

A transmitância dos compostos oxidados foi obtida em espectrofotômetro a 470 nm e a atividade enzimática foi estimada por meio da reação de oxidação do substrato a tetraguaiacol caracterizado pela coloração laranja, sendo que a unidade de atividade específica da enzima peroxidase é definida como a massa de proteína capaz de causar um aumento da unidade de absorvância em 0,001 por minuto (GARDA-BUFFON; BADIALE-FURLONG, 2010).

Os resultados de quantificação enzimática foram expressos em unidades de atividade enzimática (U/mL, sendo que U representa a unidade internacional de atividade enzimática) e que por definição, refletem a quantia de enzima suficiente para catalisar uma reação com a conversão de 1 μ mol por minuto de produto nas condições reacionais (CAVALCANTI et al., 2005; PEREIRA, 2013).

3.4 QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA FÚNGICA

Finalizadas as fermentações em biorreator, os biocompostos produzidos foram filtrados para que ocorresse a separação entre o meio de cultivo e a biomassa produzida pelo fungo. Para tanto, a biomassa fúngica retida no papel filtro foi posteriormente quantificada pelo método de massa do micélio seco por 3 litros de meio de cultura. A quantificação da biomassa produzida pelo *T. koningiopsis* foi obtida a partir da diferença entre o peso seco e o peso da placa + filtro, sendo os valores finais demonstrados na unidade de g/L, segundo Gern (2005).

3.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO COMBINADO DE HERBICIDAS SINTÉTICOS COM OS BIOCOMPOSTOS PRODUZIDOS

3.5.1 Sensibilidade do *T. koningiopsis* à herbicidas sintéticos: disco-difuso

Para avaliar a sensibilidade do fungo *T. koningiopsis* a presença de herbicidas utilizou-se o método adaptado de Kirby-Bauer, conhecido também como disco-difuso, que fundamenta-se na disposição de um agente antimicrobiano em um disco de papel filtro que é sobreposto ao meio de cultivo presente em placas de Petri, e então a difusão do agente antimicrobiano apresentará a tendência em desenvolver um halo de inibição de crescimento do microrganismo (BAUER et al., 1966).

Neste sentido, avaliou-se o desenvolvimento do *T. koningiopsis* na presença de três herbicidas (Ácido diclorofenixiacético (2, 4-D), Glifosato e Glufosinato de Amônio (Finale)), gentilmente cedidos pelo Laboratório de Manejo Sustentável dos Sistemas Agrícolas, da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Erechim-RS. Três dosagens avaliadas dos respectivos herbicidas estão dispostas na Tabela 2, além destas, também realizou-se testes com os herbicidas sem diluições.

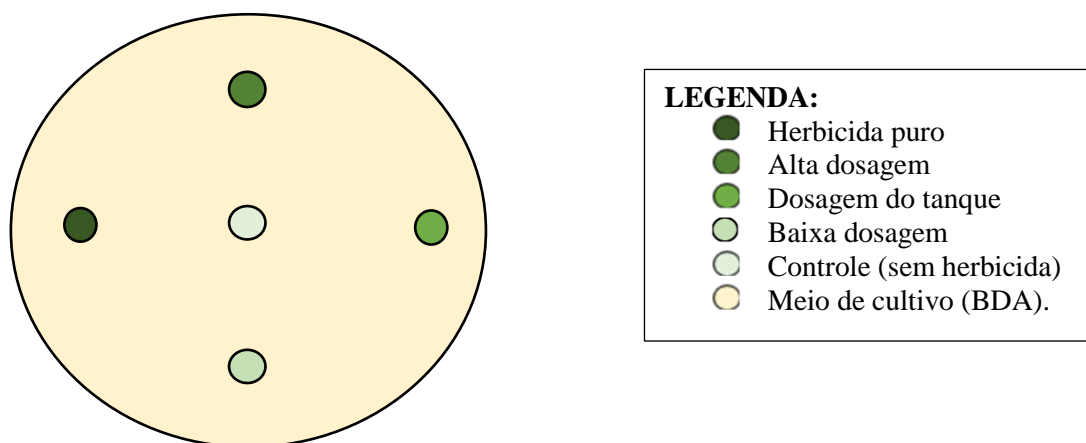
Tabela 2 – Dosagens para avaliação da sensibilidade do *T. koningiopsis* na presença de herbicidas.

Herbicida	½ da Dose recomendada (mL)	Dose recomendada (mL)	2x Dose recomendada (mL)
Ácido diclorofenoxiacético (2,4-D)	0,56	1,12	2,25
Glifosato	0,36	0,72	1,44
Glufosinato de Amônio (Finale)	0,56	1,12	2,25

Cada dosagem de herbicida foi diluída com água destilada em balões de 25 mL e 5 discos de papel foram mergulhados no herbicida diluído para posterior disposição sob o meio de cultivo (Ágar Batata Dextrose) previamente inoculado com o respectivo fungo estudado. Para isso, utilizou-se a câmara de fluxo laminar, que é um ambiente devidamente higienizado para realizar o repique do fungo *T. koningiopsis* nas placas preparadas. As respectivas placas foram incubadas por 7 dias em temperatura 28°C.

A Figura 4 apresenta um esquema da disposição dos discos de papel filtro na placa de Petri para realização do ensaio de sensibilidade do fungo *T. koningiopsis* frente a diferentes herbicidas químicos.

Figura 4 – Esquema da preparação das placas de Petri para análise de sensibilidade do *T. koningiopsis* na presença de diferentes herbicidas



Fonte: Elaborado pela autora.

Para interpretação do teste de sensibilidade o diâmetro do halo de inibição do crescimento fúngico foi medido a cada 24 horas, durante 7 dias, classificando o microrganismo *T. koningiopsis* como sensível, intermediário ou resistente quando exposto aos três diferentes herbicidas testados.

3.5.2 Sensibilidade do *T. koningiopsis* à herbicidas sintéticos: fermentação em pequena escala

Realizou-se uma fermentação em pequena escala com o fungo *T. koningiopsis* na presença dos herbicidas, mantendo a mesma proporcionalidade das doses de herbicidas utilizadas anteriormente, descritos na Tabela 2. Nesse ensaio avaliou-se, além da biomassa fúngica a produção de enzimas (amilase, celulase, lipase e peroxidase) na presença dos respectivos herbicidas químicos.

Para isso, a fermentação foi realizada com volume final de 150 mL e mantida em um agitador orbital a 120 rpm, a uma temperatura de 28°C por 7 dias.

3.6 AVALIAÇÃO DO BIOHERBICIDA SOBRE AS PLANTAS DANINHAS

Para investigar o efeito bioherbicida dos biocompostos/extratos produzidos com e sem a presença de herbicidas sintéticos avaliou-se a sua ação fitotóxica em plantas daninhas. Esses experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, nas dependências da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Erechim/RS em cooperação com os pesquisadores do Laboratório de Agroecologia.

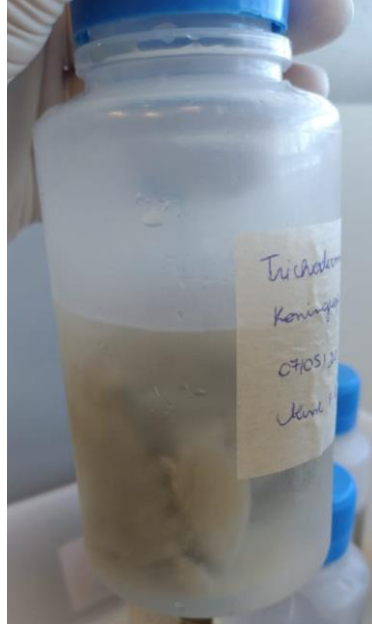
Aproximadamente 2,5 mL dos biocompostos/extratos produzidos com e sem a presença de herbicidas sintéticos foram aplicados na superfície foliar das plantas, com auxílio de pincel ou borrifador (de acordo com a viscosidade do extrato). Igualmente, um grupo controle foi estabelecido, o qual não recebeu nenhum tipo de tratamento. Danos foliares foram avaliados após 7 e 15 dias de tratamento, considerando as injúrias, conforme escala recomendada pela Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas (1995).

Os extratos brutos (contendo fungo e meio fermentado), bem como filtrados (contendo apenas o meio fermentado) foram aplicados em plantas daninhas, onde testou-se a fitotoxicidade frente às plantas: (i) picão-preto (*Bidens pilosa*) e (ii) leiteiro (*Euphorbia heterophylla*).

Extratos obtidos na fermentação utilizando o fungo estudado na presença de herbicidas sintéticos foram igualmente aplicados, entretanto apenas em sua forma bruta, nas seguintes plantas daninhas: (i) picão-preto (*Bidens pilosa*), leiteiro (*Euphorbia heterophylla*) e (iii) buva (*Conyza bonariensis*).

Para fins de controle, utilizou-se um extrato contendo apenas o meio de cultivo e o fungo *T. koningiopsis*, com a finalidade de avaliar a ação isolada do fungo sob as plantas daninhas, sem a interferência de metabólitos secundários produzidos pelo microrganismo e dos componentes do meio de cultivo. Após a fermentação o controle foi filtrado com água destilada esterilizada em autoclave, com o intuito de reter no filtro de papel apenas o fungo que se desenvolveu durante a fermentação. A biomassa que permaneceu no filtro foi mantida em tampão fosfato pH neutro até a sua aplicação (Figura 5).

Figura 5 – Microrganismo *Trichoderma koningiopsis* armazenado em uma solução com tampão fosfato pH 7,0 para avaliar sua ação fúngica isolada.



Fonte: Elaborado pela autora.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

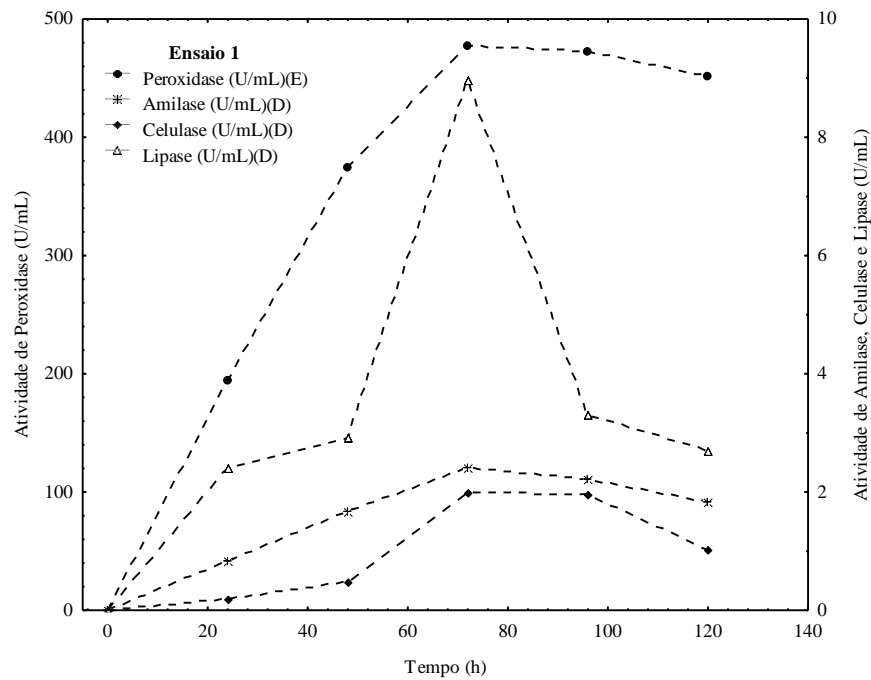
4.1 AMPLIAÇÃO DA ESCALA DO PROCESSO FERMENTATIVO EM BIORREATOR

Com base nos resultados promissores dos testes de aplicação dos biocompostos produzidos em pequena escala estudou-se a ampliação de escala do processo fermentativo, visando sua maximização e viabilidade econômica e ambiental.

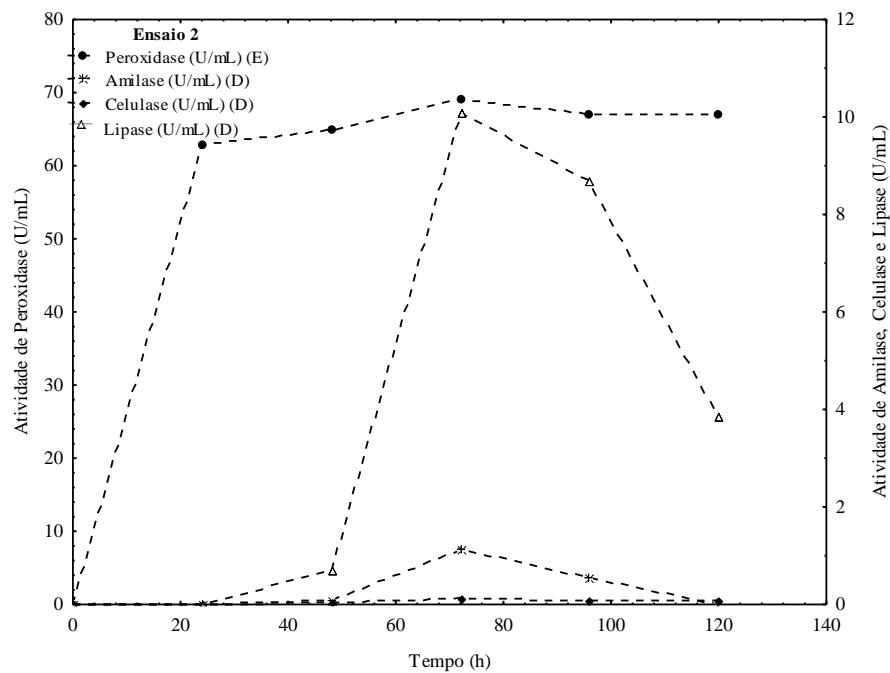
Para isso, avaliou-se o processo fermentativo em escala piloto dos ensaios 1 e 2, quantificando biomassa (ao término do processo) e a quantificação enzimática (amilase, celulase, peroxidase e lipase) coletando amostras de 24 em 24 horas até que observou-se a invariabilidade nas atividades enzimáticas investigadas. A escolha destas enzimas está correlacionada com outros estudos na esfera de bioprocessos, principalmente os realizados por Bordin et al. (2018) e Reichert Júnior (2017), pois acredita-se que estas enzimas possuem relação com a potencialização do efeito bioherbicida. Além disso, as enzimas escolhidas são de fácil quantificação, podendo adaptar-se os equipamentos disponíveis no Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos para a determinação de suas atividades enzimáticas.

Os gráficos da Figura 6 apresentam respectivamente as quantificações enzimáticas durante os ensaios de fermentação 1 e 2, nas quais é possível perceber que o pico de atividades enzimáticas se deu em 72 horas, posteriormente as atividades mantiveram-se constantes, sendo que avaliou-se o processo até 120 horas de fermentação.

Figura 6 – Representação das atividades enzimáticas dos ensaios 1 (a) e 2 (b) no decorrer do tempo de fermentação em biorreator (as linhas tracejadas foram dispostas para melhor visualização do processo e os pontos representam as amostragens realizadas).



a)



b)

Fonte: Elaborado pela autora.

As biomassas fúngicas obtidas para os ensaios 1 e 2 no biorreator foram de 2,85 e 4,0 g/L respectivamente. No que diz respeito às quantificações enzimáticas obtiveram-se maiores produções no ensaio 1, especificamente em 72 horas de fermentação, conforme apresentado no gráfico (a) da Figura 6.

Na Tabela 3 estão compilados os dados obtidos a partir da fermentação em biorreator dos ensaios 1 e 2 quando comparados com aqueles apresentados por Bordin et al. (2018) em pequena escala. No ensaio 1 de ampliação de escala as respostas obtidas de biomassa, peroxidase e lipase apresentaram valores percentuais superiores, respectivamente de 54,05, 1063,41 e 178,26 % ao ensaio realizado em pequena escala, entretanto apresentou redução nas atividades de amilase e celulase, ou seja, houve decaimento da produção destas enzimas quando ampliou-se o processo, mas do ponto de vista econômico, a produção deste biocomposto é vantajosa, pois mesmo com o decréscimo, algumas enzimas mantiveram sua atividade, mesmo com uma menor produção de biomassa fúngica, indicando o seu potencial como bioproduto.

Tabela 3 - Comparação entre os processos de pequena e grande escala a partir dos valores obtidos para atividades enzimáticas (U/mL) em 72 horas e quantificação de biomassa (g/L) ao final do processo, demonstrando a porcentagem de rendimento com base nas respostas apresentadas.

Ensaio	Amilase (U/mL)	Celulase (U/mL)	Lipase (U/mL)	Peroxidase (U/mL)	Biomassa (g/L)
Pequena escala					
1	17,25	10,62	3,22	41,00	1,85
2	0,79	0,34	0,41	127,00	9,25
Grande escala					
1	2,42	2,01	8,96	477	2,85
2	1,12	0,14	10,10	69	4,00
Incremento ou Redução (%)					
1	-85,97	-81,07	178,26	1063,41	54,05
2	41,77	-58,82	2363,41	-45,67	-56,76

Nos resultados do ensaio 2 apresentados no gráfico da Figura 6 (b), obteve-se maior valor de biomassa comparado ao valor do ensaio 1, o que pode estar atrelado a baixa produção enzimática do ensaio 2, entretanto para amilase e lipase obteve-se resultados de 1,12 e 10,10 U/mL, respectivamente, o que representa um aumento de 41,77 e 2363,41% (valores apresentados na Tabela 3) quando comparados com os ensaios em pequena escala.

Apesar do microrganismo *T. koningiopsis* ter demonstrado características promissoras durante o processo de ampliação de escala, nem todas as variáveis analisadas alcançaram valores superiores aos obtidos em pequena escala. Algumas enzimas apresentaram redução, bem como a produção de biomassa para o ensaio 2. O decréscimo de algumas enzimas após as 72 horas de fermentação ou a não produção das mesmas pode estar correlacionado com a produção de metabólitos inibidores.

Segundo Stoppacher et al. (2010), López-Bucio, Pelagio-Flores e Herrera-Estrella (2015), espécies de *Trichoderma* spp. podem produzir diversos metabólitos secundários, dentre eles álcoois, cetonas, alcanos, furanos, ácidos entre outros, que estão vinculados as condições ambientais de crescimento do fungo, por exemplo a composição do meio de cultivo e podem inibir a produção de algumas enzimas.

Cabe salientar que quando se pensa em escalonamento de fermentações, a obtenção do produto desejado pode estar atrelada aos diferentes reatores em que ocorrem tais fermentações. Em pequena escala, o processo foi realizado em Erlenmeyeres, e a agitação foi realizada mecanicamente. No biorreator de tanque agitado o sistema de mistura resulta em um fluxo radial que por consequência facilita a dispersão completa de todos os componentes presentes no meio, contudo, as pás do rotor causam uma alta turbulência em sua proximidade o que ocasiona a possibilidade de dano celular e até o rompimento de hifas de fungos filamentosos, que é o caso do microrganismo utilizado neste estudo (DORAN, 1999; HO; HENDERSON; RORRER, 1995; KIERAN, 2001; LECKIE; SCRAGGS; CLIFFE, 1991; MCDONALD; HUANG, 2009).

No ensaio 2, em que ocorreu uma produção de biomassa fúngica superior (4 g/L) ao ensaio 1 (2,85 g/L) o fungo *T. koningiopsis* por ser filamentosos acabou desenvolvendo-se e expandindo suas hifas em torno das pás do rotor do biorreator o que possivelmente pode ter prejudicado o metabolismo fúngico e comprometendo a produção de algumas enzimas estudadas, devido ao rompimento de hifas fúngicas. A turbulência provocada pelas pás do biorreator possui elevado efeito sob o desenvolvimento fúngico, pois afeta a distribuição de nutrientes no meio, transferência de oxigênio, e ainda pode desordenar a síntese de produtos e biomassa fúngica, devido a alterações morfológicas ou fisiológicas (SOUZA et al., 2015; TINOCO-VALENCIA et al., 2014).

Na Figura 7 é possível observar o desenvolvimento do fungo entrelaçado nas pás no rotor.

Figura 7 – Desenvolvimento do fungo *T. koningiopsis* entrelaçado nas pás do rotor do biorreator após fermentação de 120 horas.



Fonte: Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos.

4.2 APLICAÇÃO DOS BIOCOMPOSTOS PRODUZIDOS EM BIORREATOR

Com base nos resultados satisfatórios de ampliação de escala em biorreator os extratos fermentados dos ensaios 1 e 2 foram aplicados conforme a metodologia descrita anteriormente, em plantas daninhas (*Euphorbia heterophylla* e *Bidens pilosa*), visando avaliar o seu potencial de biocontrole, os resultados podem ser verificados na Tabela 4.

Tabela 4 – Avaliação do efeito da ação dos biocompostos obtidos em biorreator a partir dos ensaios 1 e 2 em suas porções filtrada e bruta com porcentagens de dano causado conforme recomendação da Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas (1995).

Ensaio	Extrato do biocomposto	Planta daninha em que ocorreu a aplicação	Avaliação de fitotoxicidade (%)	
			7º dia	15º dia
1	Filtrado	<i>Euphorbia heterophylla</i>	50	15
1	Bruto	<i>Euphorbia heterophylla</i>	80	50
1	Filtrado	<i>Bidens pilosa</i>	0	0
1	Bruto	<i>Bidens pilosa</i>	1	0
2	Filtrado	<i>Euphorbia heterophylla</i>	30	20
2	Bruto	<i>Euphorbia heterophylla</i>	50	40
2	Filtrado	<i>Bidens pilosa</i>	1	0
2	Bruto	<i>Bidens pilosa</i>	2	1

Analisando os resultados apresentados na Tabela 4 verificam-se efeitos fitotóxicos de até 80% sob a planta *E. heterophylla* (leiteiro) com três repetições de aplicação dos biocompostos, demonstrando-se muito próximo as aplicações em pequena escala, conforme Bordin et al. (2018), além disso, os extratos brutos evidenciaram-se em comparação com os extratos filtrados.

O ensaio 1 apresentou maiores produções enzimáticas e por consequência atingiu valores superiores de fitotoxicidade nas plantas avaliadas, isto demonstra que a interação do microrganismo *T. koningiopsis* e das enzimas produzidas por ele potencializa a sua atuação como herbicida natural.

Estudos salientam que *Trichoderma* spp. utilizam enzimas hidrolíticas (tais como celulase, lipase, amilase) para auxiliar na degradação da parede celular da planta alvo, possibilitando assim, que o microrganismo possa atuar mais fortemente como biocontrolador (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2018; VELÁZQUEZ-ROBLEDO et al., 2011). Além do mais, o ensaio 1 apresentou altos valores da produção de peroxidases, esta enzima induz o acúmulo de peróxido de hidrogênio nas folhas da planta, que conseqüentemente causa dano

celular (LOPES et al., 2012; MOEDER et al., 2002), pois as peroxidases são consideradas oxidorreductases, ou seja, enzimas que degradam compostos na presença de peróxido de hidrogênio, por isso podem ser as responsáveis pela degradação da lignina, que também faz parte da estrutura celular de plantas (AGUIAR FILHO, 2008; BORDIN et al., 2018; MEDINA et al., 2017).

Outros estudos também descrevem a relação positiva entre a peroxidase e a planta alvo, em que se observou a ação de enzimas com potencial antioxidante, tais como peroxidase, superóxido dismutase e catalase quando aplicadas em plantas e o resultado foi positivo para dano foliar (MORRA; POPOVA; BOYDSTON, 2018; YU; ZHANG, 2013).

Lopes et al. (2012), também tratam da combinação de enzimas com diferentes espécies do fungo *Trichoderma* spp., neste estudo segundo os autores o mecanismo de interação entre estes dois elementos sinalizam um sinergismo, no qual, as enzimas hidrolíticas produzidas pelo microrganismo atuam degradando a parede celular da planta alvo para que o fungo possa acessar mais facilmente o desenvolvimento da planta (MEDINA et al., 2017; MONTEIRO et al., 2010; SEIDL et al., 2009; SILVA et al., 2009). Além disso, considera-se o *Trichoderma* um excelente agente de controle biológico, pois similarmente ele atua na competição nutricional da planta (ALMEIDA et al., 2007; LOPES et al., 2012).

Na Figura 8 é possível observar os efeitos fitotóxicos dos extratos produzidos em biorreator quando aplicados nas plantas, tais como, manchas foliares mais escuras, semelhantes a pequenas necroses.

Figura 8 – Efeitos da fitotoxicidade observados nas folhas da planta *Euphorbia heterophylla* (leiteiro) após 7 dias da aplicação do biocomposto produzido em biorreator, referente ao ensaio 1 (círculos em destaque demonstram os danos foliares causados, semelhantes a manchas de escurecimento).



Fonte: Laboratório de Agroecologia.

Outro fato interessante sobre a aplicação destes extratos é que conforme apresentado na Tabela 4 os dois extratos produzidos em biorreator, ensaio 1 e 2 em suas formas brutas apresentaram diminuição nos danos foliares quando observadas as aplicações de 7 e 15 dias. Este mesmo fato ocorreu nos estudos de Reichert Júnior (2017), segundo o autor o decréscimo de danos foliares pode estar atrelado a forma de defesa da planta, além disso, indicam que a ocorrência do dano é pontual, apresentando um rompimento das células que formam o tecido vegetal das plantas, o que poderia acabar dificultando a progressão da ação dos biocompostos aplicados sob a área foliar (AGRIOS, 2004; CHARUDATAN, 1988). Apesar do biocomposto provocar diferentes danos foliares nas plantas aplicadas, não houve a morte de nenhuma das plantas teste.

4.3 AVALIAÇÃO DA COMBINAÇÃO DE HERBICIDAS SINTÉTICOS E DO BIOCOMPOSTO PRODUZIDO EM LABORATÓRIO

A avaliação do comportamento do microrganismo *T. koningiopsis* na presença de herbicidas químicos se deu primeiramente em placas de Petri, a partir do acompanhamento de seu crescimento em 7 dias. Os diâmetros da formação do halo de inibição dos testes estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Avaliação da sensibilidade do *T. koningiopsis* na presença de herbicidas, a partir do diâmetro (em mm) dos halos de inibição formados em 7 dias.

Herbicidas	Controle (mm)	½ Dose recomendada (mm)	Dose recomendada (mm)	2x Dose recomendada (mm)	Herbicida (mm)	Avaliação*
2,4-D	0	0	0	1	7,06	Sensível
Glifosato	0	0	0	0	0	Resistente
Glufosinato de Amônio (Finale)	0	0	0	0	2,34	Intermediário

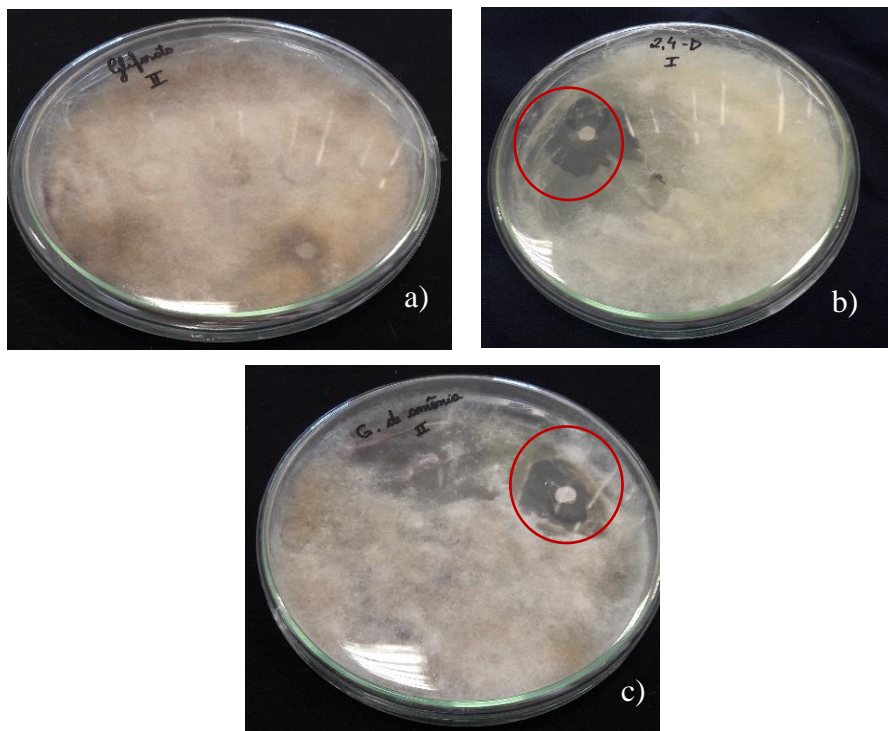
* Avaliação do halo de inibição do crescimento: (a) Sensível ≥ 5 mm; (b) Intermediário: ≤ 5 mm; (c) Resistente: sem formação de halo.

É importante salientar que a escolha dos herbicidas se refere a sua ampla recomendação para o controle de plantas infestantes, sendo que algumas espécies já apresentam resistência a certos herbicidas comercializados (BAJWA; MAHAJAN; CHAUHAN, 2015; DUKE; POWLES, 2009; GEALY; MITTEN; RUTGER, 2003; GIVENS et al., 2009) para as doses utilizadas adaptou-se os valores disponíveis nas respectivas bulas contendo as instruções do uso de cada herbicida. As doses recomendadas para os herbicidas testados, foram as seguintes: 2,4-D e Glufosinato de amônio 0,750 mL e Glifosato 3,50 mL, sendo que as doses referem-se a diluição em 100 mL de água (BAYER, 2017; MONSANTO, 2011; NORTOX, 2017).

Após os 7 dias de acompanhamento e com o auxílio da Tabela 5 observou-se que o fungo apresentou baixa inibição aos herbicidas químicos, manifestando inibição apenas em altas concentrações de dois (2,4-D e Finale) dos três herbicidas químicos testados. Com o resultado destes testes foi possível constatar que o fungo *T. koningiopsis* demonstrou resistência e viabilidade de aplicação simultânea com os herbicidas químicos testados, com isso, verifica-se a possibilidade de redução do uso de herbicidas, investindo na ação conjunta do potencial biocontrole atribuído ao *T. koningiopsis*.

Ainda observando as medidas dos halos de inibição (diâmetro do halo) percebe-se que o *T. koningiopsis* apresenta resistência relevante aos herbicidas testados, sendo que demonstrou sensibilidade apenas em doses altas de herbicida, na Figura 9 é possível visualizar as placas de Petri utilizadas para os testes da formação do halo de inibição, houve placas em que não se observou inibição, foram completamente cobertas pelos micélios do fungo, ou seja, o mesmo apresentou desenvolvimento expressivo mesmo na presença de compostos químicos.

Figura 9 – As fotografias ilustram a formação do halo de inibição nas maiores doses dos diferentes herbicidas utilizados neste estudo, Glifosato (a), Ácido diclorofenoxiacético (b) e Glufosinato de amônio (c), após 7 dias de incubação (círculos vermelhos destacam o halo inibitório), sendo que apenas na presença de altas doses de glifosato (a) não houve a formação do halo.



Fonte: Elaborado pela autora.

Segundo Charudatan (1988), o processo de obtenção de um herbicida natural é complexo, pois quando comparado com o químico necessita ter um potencial de ação notável, já que serão poucos os microrganismos que apresentarão tal potencial. É importante salientar que estudos visando a produção de um bioproduto combinado com herbicida químico são escassos, ainda não se sabe qual é o mecanismo específico de atuação desta combinação, por isto a relevância deste trabalho.

No entanto, a partir dos resultados de resistência do *T. koningiopsis* a algumas doses de herbicidas químicos pode-se sugerir que o fungo, a partir da indução ao contato com estes herbicidas seja estimulado a degradar mais ativamente os tecidos foliares da planta alvo (MORENO et al., 2009; SOTO-SUÁREZ et al., 2006). Apesar de algumas espécies de *Trichoderma* spp. relacionarem-se com estímulo de crescimento de diversas plantas, a combinação de dois agentes de controle (herbicida natural mais o sintético) demonstrou uma interação sinérgica, já que o fungo manifestou um bom desenvolvimento quando em contato com herbicidas químicos, o que pode relacionar-se com sua vantajosa capacidade de autodefesa e biocontrole (ALIZADEH et al., 2013; NGUYEN et al., 2017).

Os resultados de resistência deste estudo indicam que as cepas de *T. koningiopsis* apresentam uma boa capacidade de adaptação ao meio, além de demonstrarem um feedback positivo ao uso combinado de herbicidas naturais e sintéticos. Segundo Pickett e Weston (2018) existem raros herbicidas em comercialização que utilizem combinação com produtos naturais, entretanto é uma esfera de análise em expansão.

Sarrocco e Vannacci (2017) tratam em seu estudo sobre a aplicação de fungos benéficos como prevenção de contaminação em colheitas, entre eles *Trichoderma* spp. representa um componente predominante em alguns herbicidas comercializados (WHIPPS; LUMSDEN, 2001), para Verma et al. (2007) e You et al. (2016) cerca de 60% de biofungidas já registrados utilizam espécies de *Trichoderma* spp., caracterizando este fungo como adequado para o biocontrole, já que são resistentes a herbicidas sintéticos (DOVERI et al., 2010, 2012).

4.4 APLICAÇÃO EM PLANTAS DANINHAS COMBINANDO HERBICIDAS SINTÉTICOS E BIOLÓGICOS

Com os resultados promissores e baixa inibição do *T. koningiopsis* aos herbicidas testados realizou-se uma fermentação em pequena escala nas mesmas condições já utilizadas anteriormente, porém adicionando ao meio de cultivo as distintas dosagens de herbicida visando avaliar o desenvolvimento do microrganismo na presença destes químicos quando em processo de fermentação.

Realizou-se a aplicação destes novos produtos em plantas daninhas, com o intuito de avaliar a ação conjunta dos herbicidas, biológico e sintético, investigando a possibilidade de redução do uso de herbicidas químicos. Realizou-se também a aplicação de um extrato controle, contendo apenas o microrganismo em tampão fosfato pH neutro, com a finalidade de retirar os sais do meio de cultivo e metabólitos produzidos pelo fungo para que seja possível avaliar a sua ação isolada de prováveis interferentes. Estes resultados de aplicação estão dispostos na Tabela 6, sendo que além das plantas daninhas *E. heterophylla* e *B. pilosa* também ocorreu a aplicação na *Conyza bonariensis*, popularmente conhecida como buva, planta daninha de difícil controle, devido a sua resistência a alguns herbicidas químicos (SCOTT; YEOH; MICHAEL, 2016).

Tabela 6 – Avaliação do efeito da ação dos biocompostos combinados com diferentes concentrações de herbicidas químicos em suas porções brutas e um extrato controle com porcentagens de dano foliar causado conforme recomendação da Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas (1995).

Biocomposto + Herbicida	Dose do herbicida	Avaliação de fitotoxicidade (%)					
		<i>Bidens pilosa</i>		<i>Conyza bonariensis</i>		<i>Euphorbia heterophylla</i>	
		7º dia	15º dia	7º dia	15º dia	7º dia	15º dia
Controle	S*	50	90	5	0	100	100
2,4-D	2x	100	100	100	100	100	100
2,4-D	Recomendada	100	100	100	100	100	100
2,4-D	½	100	100	100	100	100	100
Glifosato	2x	50	100	60	100	95	100
Glifosato	Recomendada	100	100	100	100	100	100
Glifosato	½	90	100	100	100	100	100
Finale	2x	100	100	100	100	100	100
Finale	Recomendada	100	100	100	100	100	100
Finale	½	100	100	100	100	100	100

S* = Sem adição de herbicidas químicos, 2x = 2 vezes a dose recomendada e ½ = Metade da dose recomendada.

Na Tabela 6 percebe-se com clareza que a interação entre os herbicidas sintéticos e o fungo *Trichoderma koningiopsis* foi positiva, potencializando a ação do biocomposto, já que causou a morte das plantas alvo em que ocorreram os testes de aplicação.

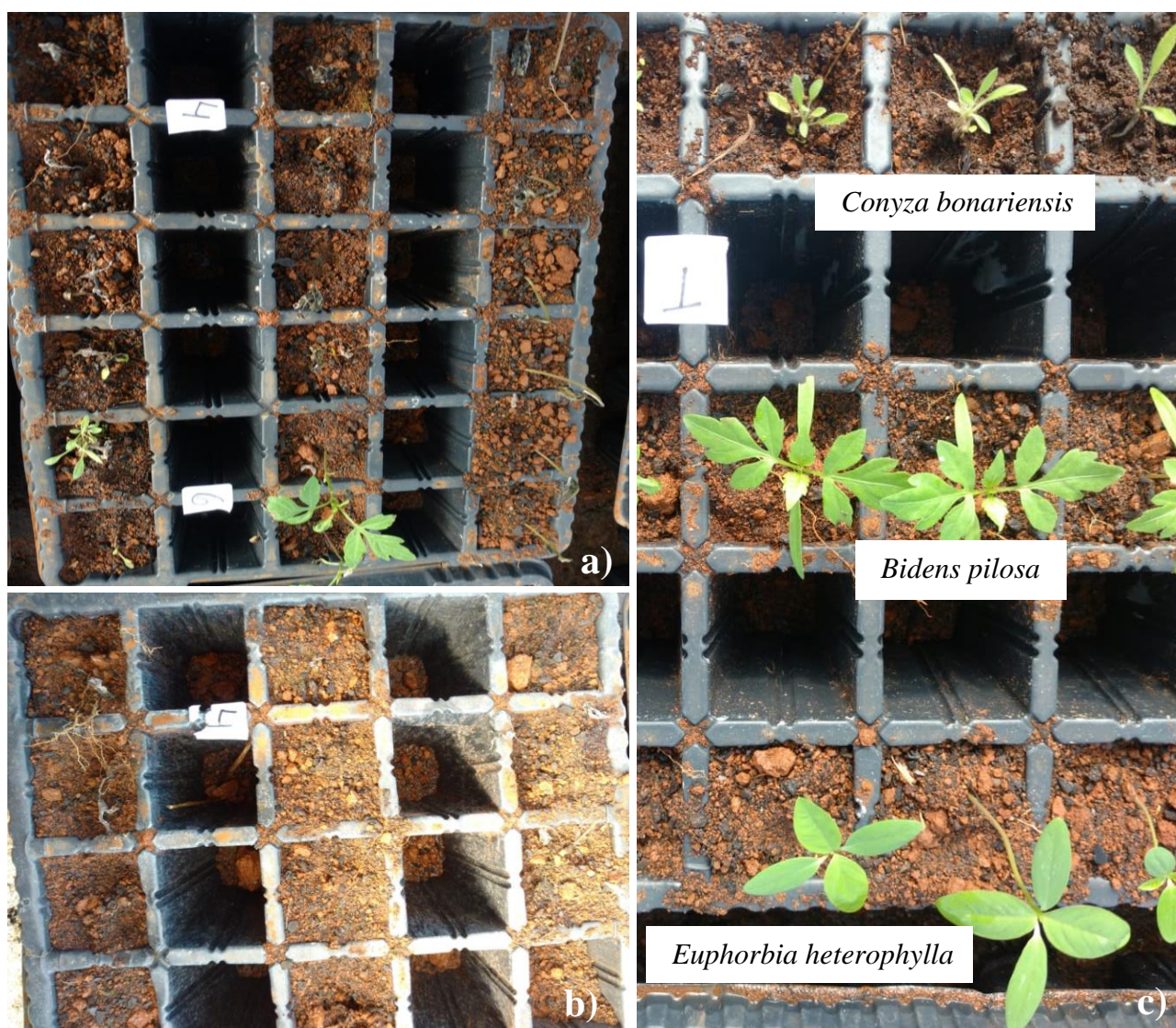
O tratamento controle, contendo apenas a biomassa fúngica demonstrou-se efetivo quando aplicado nas plantas *Bidens pilosa* e *Euphorbia heterophylla*, entretanto a planta *Conyza bonariensis* demonstrou resistência ao efeito isolado do microrganismo testado. Um fato interessante sobre a aplicação combinada de herbicidas químicos e do bioherbicida produzido em laboratório é que diferentemente dos outros ensaios de aplicação, neste combinado as repetições de aplicação puderam ser reduzidas, sendo que com apenas uma repetição obteve-se um resultado significativo, isto pode indicar que houve fortalecimento da ação do biocomposto.

Nos testes com a planta daninha *Conyza bonariensis* quando aplicou-se o extrato controle, ou seja, contendo apenas o fungo *Trichoderma koningiopsis* a fitotoxicidade avaliada em 15 dias reduziu quando comparada com a de 7 dias, além desta planta apresentar uma forte resistência ao biocontrole, como relatado em estudos conduzidos por Scott, Yeoh e Michael (2016). Este fato pode estar atrelado também a habilidade de algumas espécies deste fungo estimular o desenvolvimento de plantas (BAE et al., 2016; HERMOSA et al., 2000; SCHUBERT; FINK; SCHWARZE, 2008). Bae et al. (2016) relaciona este acontecimento a predisposição de espécies de *Trichoderma* a competir por substrato com diversos patógenos, além disto, demonstra que a morfologia e fisiologia das plantas alvo interferem no efeito dos biocompostos aplicados, que também podem sofrer influência do ambiente a que estão submetidos (BRUCE, 2014; BRUCE et al., 2017).

Outro fato que pode ser observado na Tabela 6 é que o extrato contendo baixa dose de glifosato foi mais eficiente do que o extrato contendo alta dose, pois verifica-se que na avaliação de fitotoxicidade dos 7 dias posteriores a aplicação, que o dano causado pelo extrato com menor dose de glifosato foi superior nas três plantas testadas quando comparado com a maior dose. Esta ocorrência pode estar associada a interação do fungo conjuntamente com herbicida químico (sinergismo). Dependendo da dose de produto químico utilizada pode resultar na difusão livre do químico através da célula microbiana, devido à pressão realizada no meio, acarretando em inibição (BODDY, 2000; BRUNO, SPARAPANO, 2006).

Na Figura 10 pode-se verificar os danos causados pela aplicação dos bio compostos fermentados na presença dos herbicidas testados.

Figura 10 – Efeitos da fitotoxicidade observado nas plantas daninhas (*Bidens pilosa*, *Conyza bonariensis* e *Euphorbia heterophylla*) em 7 (a) e 15 (b) dias após a aplicação do bio composto produzido conjuntamente com o herbicida glifosato em baixa dose, bem como as amostras controle (c).



Fonte: Laboratório de Agroecologia.

Na Figura 10 escolheu-se os resultados de $\frac{1}{2}$ da dose do herbicida glifosato como forma de ilustração, sendo a linha tracejada indica o local onde ocorreu a aplicação deste ensaio. É possível visualizar que a aplicação causou a morte das três plantas daninhas testadas, já em 7

dias após a aplicação do composto, apontando que para a finalidade de controle destas plantas uma aplicação apenas seria necessária, acelerando assim o período de ação deste composto.

Uma consideração interessante diz respeito a produção de enzimas como um mecanismo de proteção a essa situação de estresse devido a presença de herbicidas sintéticos no meio. Neste caso, segundo Bruno e Sparapano (2006), os metabólitos secundários desenvolvidos por fungos apresentam relação com sua resistência quando expostos a condições extremas de cultivo, além disso, esses metabólitos interferem também no crescimento micelial do fungo. Após a fermentação quantificou-se as mesmas enzimas (amilase, celulase, lipase e peroxidase) que foram estudadas para a formulação dos biocompostos em biorreator, bem como a biomassa fúngica obtida em cada ensaio. Os resultados da fermentação na presença dos herbicidas testados em suas diferentes doses estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Quantificação enzimática e de biomassa fúngica após a produção de biocompostos na presença dos herbicidas Glifosato, Ácido diclorofenoxiacético e Glufosinato de amônio em distintas doses (recomendada, 2x a dose recomendada e ½ da dose recomendada).

Ensaio	Dose do herbicida	Amilase (U/mL)	Celulase (U/mL)	Lipase (U/mL)	Peroxidase (U/mL)	Biomassa (g/L)
2,4 -D	2x	0,84	3,10	2,08	0	4,24
2,4-D	Recomendada	2,47	2,89	1,56	38	4,87
2,4-D	½	0,51	2,83	1,56	84	3,29
Glifosato	2x	3,47	3,05	6,77	27	2,89
Glifosato	Recomendada	0,17	0,04	0	32	6,07
Glifosato	½	0,86	3,45	0	38	3,53
Finale	2x	3,09	2,83	3,64	37	3,39
Finale	Recomendada	2,88	2,98	0,62	69	3,38
Finale	½	1,78	3,30	1,04	97	3,29

Convém salientar que se descontou as absorbâncias de cada herbicida para obter o valor real de atividades enzimáticas, pois os herbicidas apresentam colorações, assim como foi realizado com a quantificação de biomassa, também descontou-se o peso de cada dosagem utilizada. Observando a Tabela 7 percebe-se que no ensaio contendo a dose recomendada de glifosato obteve-se a maior biomassa dentre todos os ensaios realizados, além disso para este mesmo herbicida, na dose mais baixa obteve-se uma biomassa superior a observada no ensaio com o dobro da dose do glifosato, o que possivelmente está relacionado com o dano foliar do ensaio de aplicação do extrato contendo a metade da dose de glifosato ter sido mais eficiente do que o contendo o dobro da dose. Essas diferenças de biomassa podem ser observadas na Figura 11, na qual demonstra o desenvolvimento do fungo *Trichoderma koningiopsis* na presença das diferentes doses de Glifosato, bem como a influência dos distintos ambientes

(doses dos herbicidas testados) de cultivo na sua esporulação (MEDINA et al., 2017) e ainda considerando que o *T. koningiopsis* é um fungo filamentosos suas hifas durante o crescimento podem interagir de inúmeras formas com o substrato disponível (RANGEL et al., 2018).

Segundo Chandramohan et al. (2002) é muito improvável encontrar um microrganismo no ambiente para a produção de bioherbicidas que controle diversas plantas daninhas conjuntamente, o que se faz necessário nestes casos é a combinação de mais de um método de controle, que pode ser mais eficaz quando tem-se um microrganismo de atuação específica, essa estratégia é vantajosa quando presume-se que no sinergismo entre dois compostos um deles poderá falhar, principalmente em condições ambientais adversas, neste caso o outro assume a gestão da planta alvo.

Estudos demonstram igualmente a gestão combinando mais de um método de controle, encontram-se alguns estudos na literatura sobre a combinação de herbicidas sintéticos e biológicos (ALTMAN; NEATE; ROVIRA, 1990; CHRISTY et al., 1993; GREAVES; SARGENT, 1986; HALLETT, 2005; HOAGLANG, 1996; LÉVESQUE; RAHE, 1992), pesquisas que buscaram entender o mecanismo de ação desta interação, apresentam a hipótese de que a atuação do herbicida sintético predispõe a parede celular da planta alvo para que o microrganismo possa acessar facilmente o seu interior e causar danos mais intensos a planta (HALLETT, 2005; LÉGER; HALLETT; WATSON, 2001; SHARON; AMSELLEM; GRESSEL, 1992; SMITH; HALLETT, 2003; WYMORE; WATSON; GOTLIEB, 1987). Entretanto segundo Hallett (2005), Lévesquere, Rahe (1992), Sharon, Amsellem e Gressel (1992) certas doses de glifosato podem agir negativamente, impedindo o desenvolvimento do microrganismo teste.

Figura 11 – As fotografias ilustram o desenvolvimento do *Trichoderma koningiopsis* após a fermentação na presença das diferentes doses de glifosato testadas neste estudo, Glifosato na dose recomendada (a), Glifosato com metade da dose recomendada (b) e Glifosato com 2x a dose recomendada (c).



Fonte: Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos.

Além disso, existem algumas enzimas envolvidas no processo de biossíntese das plantas, que podem ser responsáveis por transportes de nutrientes importantes para a célula, o que pode-se relacionar a esse fato são as observações de Sun et al. (2018), em que a combinação

de herbicidas sintéticos com fungos inibiram o crescimento fúngico alterando de forma expressiva as enzimas que tratam do equilíbrio osmótico dentro das células da planta alvo.

Neste trabalho foram avaliadas apenas algumas enzimas, mas estudos recentes trazem dados de uma vasta gama de enzimas produzidas por espécies de *Trichoderma* spp. que estão relacionadas com seus mecanismos de micoparasitismo por auxiliarem em processos de degradação celular, dentre elas estão: endochitinases, β -1,3-glucanases, proteases, chitinases, entre outras (HARMAN et al., 2004; GERALDINE et al., 2013; LOPES et al., 2012; VOS et al., 2015; YOU et al., 2016). Segundo Green et al. (2008) e Tao et al. (2017) o glifosato pode ser convertido a moléculas menos tóxicas por meio de uma enzima, a glifosato oxidoreductase que outros autores utilizaram para clonar genes resistentes, com o objetivo de induzir uma resistência adicional a estes microrganismos, para que pudessem ser aplicados seletivamente em culturas que apresentavam resistência ao glifosato (BARRY et al., 1992). Além disto, existe a perspectiva de formular produtos com a finalidade de biocontrole adicionando a eles cepas com potencial herbicida, na condição de suplementar todo o processo (ABBAS; BOYETTE; HOAGLAND, 1995; DUKE et al., 2001; GRONWALD et al., 2002; HALLETT, 2005; VEY et al., 2001).

Schnick e Boland (2004) realizaram estudos integrando o herbicida 2,4-D com um fungo e também obtiveram resultados positivos, sendo que houve o aumento de área foliar danificada, ou seja, a combinação dos dois elementos causou um melhoramento na eficácia do produto aplicado. Além do fungo *Trichoderma koningiopsis* apresentar potencial como herbicida natural, o seu metabolismo pode atuar associadamente à sua capacidade de biorremediar solos contaminados (ADAMS; DE-LIJ, 2007; JALALI; ZAFARI; SALARI, 2017; SHORESH; HARMAN; MASTOURI, 2010), esse fato demonstra o quão relevante é a aplicação deste fungo na área ambiental.

Nishida et al. (2011), Radhakrishnan, Alqarawi e Abd_Allah (2018) constataram que a ação bioherbicida causa transformações anatômicas nas folhas da planta, além de possivelmente destruir as mitocôndrias presentes nas células foliares, dessa forma, a divisão celular é afetada negativamente, podendo resultar na morte da planta (BESSIRE et al., 2007; YOSHIMURA et al., 2011).

Bordin et al. (2018) em seu estudo realizou testes de toxicidade aguda com dois extratos de biocompostos produzidos a partir do fungo *Trichoderma koningiopsis*, os resultados obtidos

demonstraram que toxicidade aguda dos biocompostos foi inferior quando comparada com alguns herbicidas encontrados no mercado, dentre eles glifosato e atrazina.

Embora a produção de bioherbicidas para controle de plantas daninhas seja um ramo que apresenta inúmeras vantagens e potenciais principalmente se adaptado para sistemas considerados agro sustentáveis, ainda existem algumas restrições no que diz respeito a concretizar o uso destes bioprodutos. Dentre essas limitações podem-se citar efeitos da temperatura, umidade, especificidade, resistência, período e técnicas de aplicação e o processo de isolamento de cepas de microrganismo com potencial para ação bioherbicida. Além disso, a indústria de herbicidas sintéticos ainda domina o setor, devido ao insuficiente incentivo de financiamentos para pesquisas nesta área (BAJWA; MAHAJAN; CHAUHAN, 2015; CHARUDATAN; DINOOR, 2000; GHOSHEH, 2005; HALLETT, 2005).

5. CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DA PESQUISA

O estudo de ampliação de escala é importante quando se tem a intenção de comercializar qualquer tipo de produto, neste estudo encontrou-se um método adequado de viabilizar a sua produção em grande escala.

O fungo *Trichoderma koningiopsis* demonstrou-se como um agente promissor de biocontrole devido a sua capacidade de produzir enzimas que conjuntamente com o agente biocontrolador incrementaram a sua ação fitotóxica sob as plantas alvo. Além de apresentar resistência ao uso combinado com herbicidas em doses moderadas, o que manifesta o seu potencial como agente microbiano e traz um interessante estímulo para investir no desenvolvimento de abordagens alternativas e ambientalmente adequadas para uma produção sustentável de alimentos, visando a redução do uso de herbicidas sintéticos que causam sérios problemas ambientais e empregar gradativamente a aplicação combinada destes bioprodutos.

Os biocompostos produzidos neste estudo apresentaram uma ação específica, em que plantas mais suscetíveis ao ataque do agente biocontrolador acabaram desenvolvendo danos mais intensos, desta forma, pode-se considerar o uso de bioherbicidas para o manejo de plantas daninhas como uma estratégia complementar e não isolada.

Assim sendo, a técnica combinada de herbicida biológico + enzimas + herbicidas sintéticos mostra-se viável, potencializando o produto final, porém em estágio inicial, ou seja, ainda são necessários estudos mais aprofundados de como ocorrem estas interações.

Para o cenário futuro da produção de bioherbicidas, a biotecnologia apresenta a função de integrar o manejo de plantas daninhas a partir da formulação, aumento de escala e aplicação destes bioprodutos, assim recomenda-se como trabalhos futuros:

- Testar a produção de biocompostos em outros tipos de biorreator, tais como, o air lift, no qual a agitação é realizada pela injeção de bolhas de ar, assim as hifas de fungos filamentosos não iriam romper e o fungo poderá se desenvolver mais livremente no biorreator;
- Otimizar a produção de biocompostos em biorreator, investigando por meio de uma série de análises estatísticas, parâmetros como agitação e quantidade de ar disponibilizada para o desenvolvimento do microrganismo;

- Melhoramento a partir de engenharia genética ou molecular das cepas de microrganismos isolados, para que possam suportar as condições ambientais adversas de aplicação a campo;
- Avaliação bioquímica da interação entre herbicida biológico e o químico, com as enzimas e metabólitos secundários produzidos durante o processo;
- Quantificação da produção de outras possíveis enzimas que atuam no processo de fortalecimento do bioproduto seria uma busca interessante, partindo do pressuposto que o microrganismo utilizado apresenta potencial para tal;
- Investigação da utilização de consórcios microbianos como forma de biocontrole, que poderão ser adaptáveis para o tipo de aplicação necessária, bem como para sua conservação por um maior tempo, mantendo suas características bioherbicidas;
- Avaliação genotóxica e citotóxica dos bioherbicidas aqui produzidos frente a células vegetais e humanas, com o intuito de estudar o potencial negativo à saúde ambiental.

Por fim, a combinação de herbicidas biológicos e sintéticos demonstrou-se uma abordagem promissora e potencial para ser explorada no âmbito ambiental, agrônomo, bem como de segurança alimentar, visando aprimoramento da sustentabilidade ambiental. As enzimas envolvidas no processo demonstraram ter efeito para degradar substratos presentes na planta alvo proporcionando assim um maior contato do fungo com a planta e conseqüentemente uma potencialização deste biocomposto.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, H. K.; BOYETTE, C.D.; HOAGLAND, R.E. Phytotoxicity of *Fusarium*, other fungal isolates, and of the phytotoxins fumonisin. **Phytoprotection**, v.76, p.17-25, 1995.
- ADAMS, P.; DE-LIJ, A.A.M. *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 mediates growth promotion of crack willow (*Salix fragilis*) saplings in both clean and metal-contaminated soil. **Microbial Ecology**, v.54, p.306-313, 2007.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**, 5. ed. Califórnia: Elsevier Academic Press, 2004.
- AGUIAR FILHO, J. M. M. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar**. 2008. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Área de concentração: Microbiologia Agrícola, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.
- ALIZADEH, H.; BEHBOUDI, K.; AHMADZADEH, M.; JAVAN-NIKKHAH, M.; ZAMIOUDIS, C.; PIETERSE, C.M.J.; BAKKER, P.A.H.M. Induced systemic resistance in cucumber and *Arabidopsis thaliana* by the combination of *Trichoderma harzianum* Tr6 and *Pseudomonas* sp. Ps14. **Biological Control**, v.65, p.14-23, 2013.
- ALMEIDA, F.B.; CERQUEIRA, F.M.; SILVA, R.N.; ULHOA, C.J. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology Letters**, v.29, p.1189-1193, 2007.
- ALTMAN, J.; NEATE, S.; ROVIRA, A.D. Herbicide-pathogen interactions and mycoherbicides as alternative strategies for weed control. In: HOAGLAND, R. E. (Ed). **Microbes and Microbial Products as Herbicides**. Washington, DC: ACS, 1990.
- BAE, S.; MOHANTA, T.K.; CHUNG, J.Y.; RYU, M.; PARK, G.; SHIM, S.; HONG, S.; SEO, H.; BAE, D.; BAE, I.; KIM, J.; BAE, H. *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens. **Biological Control**, v.92, p.128-138, 2016.
- BAJWA, A.A.; MAHAJAN, G.; CHAUHAN, B.S. Nonconventional weed management strategies for modern agriculture. **Weed Science Society of America**, v.63, p.723-747, 2015.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TUCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p. 493-496, 1966.
- BARRY, G.; KISHORE, G.; PADGETTE, S.; TAYLOR, M.; KLOACZ, K.; WELDON, M.; EICHHOLTZ, D.; FINCHER, K.; HALLAS, L. Inhibitors of amino acid biosynthesis: strategies for imparting glyphosate tolerance to crop plants. **Plant Physiology**, v.7, p.139-145, 1992.

- BAYER. Ficha de informações sobre o de uso do produto. **Finale**. 2017. Disponível em: <<https://www.agro.bayer.com.br/produtos/finale#tab-1>>. Acesso em: 23 maio. 2018.
- BESSIRE, M.; CHASSOT, C.; JACQUAT, A.C.; HUMPHRY, M.; BOREL, S.; PETETOT, J.M.C.; METRAUX, J.P.; NAWRATH, C. A permeable cuticle in *Arabidopsis* leads to a strong resistance to *Botrytis cinerea*. **EMBO Journal**, v.26, p.2158-2168, 2007.
- BODDY, L. Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. **FEMS Microbiology Ecology**, v.31, p.85-94, 2000.
- BORDIN, E.R.; CAMARGO, A.F.; ROSSETTO, V.; SCAPINI, T.; MODKOVSKI, T.A.; WEIRICH, S.; CAREZIA, C.; FRANCESCHETTI, M.B.; BALEM, A.; GOLUNSKI, S.M.; GALON, L.; FUZINATTO, C.F.; REICHERT JÚNIOR, R.W.; FONGARO, G.; MOSSI, A.J.; TREICHEL, H. Non-toxic bioherbicides obtained from *Trichoderma koningiopsis* can be applied to the control of weeds in agriculture crops. **Industrial Biotechnology**, v.14, p.157-163, 2018.
- BRUCE, T.J.A. Variation in plant responsiveness to defense elicitors caused by genotype and environment. **Frontiers in Plant Science**, v.5, p.1-4, 2014.
- BRUCE, T.J.A.; SMART, L.E.; BIRCH, A.N.E.; BLOK, V.C.; MACKENZIE, K.; GUERRIERI, E.; CASCONI, P.; LUNA, E.; TON, J. Prospects for plant defence activators and biocontrol in IPM-Concepts and lessons learnt so far. **Crop Protection**, v.97, p.128-134, 2017.
- BRUNO, G.; SPARAPANO, L. Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera*: III. Enzymes produced by the pathogens and their role in fungus-to-plant or in fungus-to-fungus interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.69, p.182-194, 2006.
- CAVALCANTI, E. A. C.; GUTARRA, M. L. E.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R.; SANT'ANNA, G.L. Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, p.79-84, 2005.
- CHANDRAMOHAN, S.; CHARUDATTAN, R.; SONODA, R.M.; SINGH, M. Field evaluation of a fungal pathogen mixture for the control of seven weedy grasses. **Weed Science Society of America**, v.50, p.204-213, 2002.
- CHARUDATTAN, R. Assessment of efficacy of mycoherbicide candidates. In: DELFOSSE, E.S (ed). **Proceedings of the VII International Symposium of Biological Control of Weeds**, 1.ed. Itália: MAF, p.455-464, 1988.
- CHARUDATTAN, R.; DINOOR, A. Biological control of weeds using plant pathogens: accomplishments and limitations. **Crop Protection**, v.19, p.691-695, 2000.
- CHENG, J.; JIANG, D.; YI, X.; FU, Y.; LI, G.; WHIPPS, J.M. Production, survival and efficacy of *Coniothyrium minitans* produced in shaken liquid culture. **FEMS Microbiology Letters**, v.227, p.127-131, 2003.

- CHRISTY, A.L.; HERBST, K.A.; KOSTKA, S.J.; MULLEN, J.P.; CARLSON, P. Synergizing weed biocontrol agents with chemical herbicides. **ACS Symposium Series**, v.524, p.87-100, 1993.
- COENTRERAS-CORNEJO, H.A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; DEL-VAL, E.; LARSEN, J. The root endophytic fungus *Trichoderma atroviride* induces foliar herbivory resistance in maize plants. **Applied Soil Ecology**, v.124, p. 45-53, 2018.
- CORDEAU, S.; TRIOLET, M.; WAYMAN, S.; STEINBERG, C.; GUILLEMIN, J.P. Bioherbicides: dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. **Crop Protection**, v.87, p.44-49, 2016.
- DEVAIAH, S.P.; SHETTY, H.S. Purification of an infection-related acidic peroxidase from pearl millet seedlings. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.94, p.119-126, 2009.
- DORAN, P.M. Design of mixing systems for plant cell suspensions in stirred reactors. **Biotechnology Progress**, v.15, p.319-335, 1999.
- DOVERI, F.; PECCHIA, S.; SARROCCO, S.; MINNOCCI, F.; VANNACCI, G. *Rodentomyces*, a new hypocrealean genus from Italy. **Fungal Diversity**, v.42, p.57-69, 2010.
- DOVERI, F.; PECCHIA, S.; VERGARA, M.; SARROCCO, S.; VANNACCI, G. A comparative study of *Neogymnomyces virgineus*, a new keratinolytic species from dung, and its relationships with the Onygenales. **Fungal Diversity**, v.52, p.13-34, 2012.
- DUKE, S.O.; BAERSON, S.R.; DAYAN, F.E.; KAGAN, I.A.; MIGUEL, A.; SCHEFFLER, B. Biocontrol of weeds with the biocontrol agents. In: VURRO, M.; GRESSEL, J.; BUTT, T.; HARMAN, G.; LEGER, R.S., NUSS, D.; PILGERAM, A (eds). **Enhancing Biocontrol Agents and Handling Risks**. Amsterdam, Netherlands: IOS Press, 2001.
- DUKE, S.O.; POWLES, S.B. Glyphosate-resistant crops and weeds: now and in the future. **AgBioForum**, v.12, p.346-357, 2009.
- FUWA, H. A. New method for microdetermination of amylase activity by the use of amylase as the substrate. **Journal of Biochemistry**, v.41, p.583-603, 1954.
- GALON, L.; MOSSI, A.J.; REICHERT JUNIOR, F.W.; REIK, G.G.; TREICHEL, H.; FORTE, C.T. Manejo biológico de plantas daninhas – Breve revisão. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.15, p.116-125, 2016.
- GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Kinetics of deoxynivalenol degradation by *Aspergillus oryzae* and *Rhizopusoryzae* in submerged fermentation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.2, p.710-714, 2010.

- GEALY, D.R.; MITTEN, D.H.; RUTGER, J.N. Gene flow between red rice (*Oryza sativa*) and herbicide-resistant rice (*O. sativa*): implications for weed management. **Weed Technology**, v.17, p.627-645, 2003.
- GERALDINE, A.M.; LOPES, F.A.C.; CARVALHO, D.D.C.; BARBOSA, E.T.; RODRIGUES, A.R.; BRANDÃO, R.S.; ULHOA, C.J.; LOBO JUNIOR, M. C. Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. **Biological Control**, v.67, p.308-316, 2013.
- GERN, R. M. M. **Estudo de Meios de Cultivo para Produção de Biomassa e Polissacarídeos por *Pleurotostreatus* DSM 1833 em cultivo submerso**. 2005. 156 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v.59, p.257-268, 1987.
- GHOSHEH, H.Z. Constraints in implementing biological weed control: a review. **Weed Biology Management**, v.5, p.83-92, 2005.
- GIVENS, W.A.; SHAW, D.R.; KRUGER, G.R.; JOHNSON, W.G.; WELLER, S.C.; YOUNG, B.G.; WILSON, R.G.; OWEN, M.D.K.; JORDAN, D. Survey of tillage trends following the adoption of glyphosate resistant crops. **Weed Technology**, v.23, p.150-155, 2009.
- GREAVES, M. P.; SARGENT, J.A. Herbicide induced microbial invasion of plant roots. **Weed Science Society of America**, v.34, p.50-53, 1989.
- GREEN, J.M.; HAZEL, C.B.; FORNEY, D.R.; PUGH, L.M. New multiple-herbicide crop resistance and formulation technology to augment the utility of glyphosate. **Pest Management Science**, v.64, p.332-339, 2008.
- GRONWALD, J.W.; PLAISANCE, K.L.; IDE, D.A.; WYSE, D.L Assessment of *Pseudomonas syringae* pv. *tagetes* as a biocontrol agent for Canada thistle. **Weed Science Society of America**, v.50, p.397-404, 2002.
- HALLETT, S.G. Where are the bioherbicides? **Weed Science Society of America**, v.53, p.404-415, 2005.
- HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p.43-56, 2004.
- HERMOSA, M.; GRONDONA, I.; ITURRIAGA, E.A.; DIAZ- MINGUEZ, J.M.; CASTRO, C.E.; MOMTE, A.; GARCIA-ACHA, I. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.1890-1898, 2000.

- HO, C.H.; HENDERSON, K.A.; RORRER, G.L. Cell-damage and oxygen mass-transfer during cultivation of *Nicotiana-Tabacum* in a stirred-tank bioreactor. **Biotechnology Progress**, v.11, p.140-145, 1995.
- HOAGLAND, R. E. Chemical interactions with bioherbicides to improve efficacy. **Weed Technology**, v.10, p.651-674, 1996.
- HUANG, T.K.; MCDONALD, K.A. Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v.45, p.168-184, 2009.
- JALALI, F.; ZAFARI, D.; SALARI, H. Volatile organic compounds of some *Trichoderma* spp. increase growth and induce salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Fungal Ecology**, v.29, p.67-75, 2017.
- KHAN, A.A.; ROBINSON, D. S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. **Food Chemistry**, v.49, p.407-410, 1994.
- KIERAN, P.M. Bioreactor design for plant cell suspension cultures. In: Tramper (ed.), **Multiphase Bioreactor Design**, Taylor & Francis Ltda. Routledge: USA, p. 391-426, 2001.
- KLAIC, R.; KUHN, R. C.; FOLETTO, E. L.; DAL PRÁ, V.; JACQUES, R. J. S.; GUEDES, J. V. C.; TREICHEL, H.; MOSSI, A. J.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; JAHN, S. L.; MAZUTTI, M. A. In: An overview regarding bioherbicide and their production methods by fermentation. **Fungal Biomolecules: Sources, Applications and Recent Developments**. 1 ed.: John Wiley & Sons, Ltda, 2015.
- LECKIE, F.; SCRAGGS, A.H.; CLIFFE, K.R. Effect of impeller design and speed on the large-scale cultivation of suspension-cultures of *Catharanthus-Roseus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v,13, p.801-810, 1991.
- LÉGER, C. HALLETT, S.G.; WATSON, A.S. Performance of *Colletotrichum dematium* for the control of fireweed (*Epilobium angustifolium*) Mimproved with formulation. **Weed Technology**, v.15, p.437-446, 2001.
- LÉVESQUERE, C.A.; RAHE, J.E. Herbicide interactions with fungal root pathogens, with special reference to glyphosate. **Annual Review of Phytopathology**, v.30, p.579-602, 1992.
- LOPES, F.A C.; STEINDORFF, A.S.; GERALDINE, A.M.; BRANDÃO, R.S.; MONTEIRO, V.N.; JÚNIOR, M.L.; COELHO, A.S.G.; ULHOA, C.J.; SILVA, R.N. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Biology**, v.116, p.815-824, 2012.

- LOPÉZ-BUCIO, J.; PELAGIO-FLORES, R.; HERRERA-ESTRELLA, A. Trichoderma as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. **Scientia Horticulturae**, v.196, p.109-123, 2015.
- MAZOYER, M.; ROUDART, L. **História das agriculturas no mundo: do neolítico à crise contemporânea**. Tradução de: Cláudia F. Falluh Baldino Ferreira. Brasília, DF: NEAD, 2010.
- MEDINA, A.; MOHALE, S.; SAMSUDIN, N.I, P.; RODRIGUEZ-SIXTOS, A.; RODRIGUEZ, A.; MAGAN, N. Biocontrol of micotoxins: dynamics and mechanisms of action. **Current Opinion in Food Science**, v.17, p.41-48, 2017.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426, 1959.
- MOEDER, W.; BARRY, C.S.; TAURIAINEN, A.A.; BETZ, C.; TUOMAINEN, J.; UTRIAINEN, M.; GRIERSON, D.; SANDERMANN, H.; LANGEBARTELS, C.; KANGASJARVI, J. Ethylene synthesis regulated by biphasic induction of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic acid synthase and 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic acid oxidase genes is required for hydrogen peroxide accumulation and cell death in ozone-exposed tomato. **Plant Physiology**, v.130, p.1918-1926, 2002.
- MONSANTO. Ficha de informações sobre o uso de produto. **Roundup Original**, 2011. Disponível em: < <http://www.roundup.com.br/roundup-original.php>>. Acesso em: 23, maio. 2018.
- MONTEIRO, V.; NASCIMENTO, S.R.; STEINDORFF, A.; COSTA, F.; NORONHA, E.; RICART, C.; DE SOUSA, M.; VAINSTEIN, M.; ULHOA, C. New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. **Current Microbiology**, v.61, p.298-305, 2010.
- MORENO, C.A.; CASTILLO, F.; GONZÁLEZ, A.; BERNAL, D.; JAIMES, Y.; CHAPARRO, M.; GONZÁLEZ, C., RODRIGUEZ, F.; RESTREPO, S.; COTES, A.M. Biological and molecular characterization of the response of tomato plants treated with *Trichoderma koningiopsis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.74, p.111-120, 2009.
- MORILLO, E.; VILLAVERDE, J. Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils. **Science of the Total Environment**, v.586, p.576-597, 2017.
- MORRA, M.J.; POPOVA, I.E.; BOYDSTON, R.A. Bioherbicidal activity of *Sinapis alba* seed meal extracts. **Industrial Crops & Products**, v.115, p.174-181, 2018.
- NGUYEN, P.A.; STRUB, C.; FONTANA, A.; SCHORR-GALINDO, S. Crop molds and mycotoxins: Alternative management using biocontrol. **Biological Control**, v.104, p.10-27, 2017.

NISHIDA, N.; TAMOTSU, S.; NAGATA, N.; SAITO, C.; SAKAI, A. Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. **Journal Chemical Ecology**, v.31, p.1187-1203, 2005.

NORTOX. Ficha de informações sobre o uso de produtos. **2,4-D**, 2017. Disponível em: <<http://www.nortox.com.br/produtos/24-d/>>. Acesso em: 23, maio. 2018.

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

PICKETT, J.A.; WESTON, L.A. Possibilities for rationally exploiting co-evolution in addressing resistance to insecticides, and beyond. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2017. doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.03.007.

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

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

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

RANGEL, D.E.N.; FINLAY, R.D.; HALLSWORTH, J.E.; DADACHOVA, E.; GADD, G.M. Fungal strategies for dealing with environment-and agriculture-induced stresses. **Fungal Biology**, 2018. doi.org/10.1016/j.funbio.2018.02.002.

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

SCOTT, J.K.; YEOH, P.B.; MICHAEL, P.J. Methods to select areas to survey for biological control agents: An example based on growth in relation to temperature and distribution of the weed *Conyza bonariensis*. **Biological Control**, v.97, p.21-30, 2016.

SHAFAWATI, S.N.; SIDDIQUEE, S. Composting of oil palm fibres and *Trichoderma* spp. as the biological control agent: A review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.85, p.243-253, 2013.

SHARON, A.; Z. AMSELLEM, Z.; GRESSEL, J. Glyphosate suppression of an elicited defense response. **Plant Physiology**, v.98, p.654-659, 1992.

SHORESH, M.; HARMAN, G.E.; MASTOURI, F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. **Annual Review Phytopathology**, v.48, p.21-43.2010.

SARROCCO, S.; VANNACCI, G. Preharvest application of beneficial fungi as a strategy to prevent postharvest mycotoxin contamination: A review. **Crop Protection**, 2017. doi.org/10.1016/j.cropro.2017.11.013.

SCHUBERT, M.; FINK,.; SCHWARZE, F.W.M.R. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against wood decay fungi in urban trees. **Biological Control**, v.45, p.111-123, 2008.

SEIDL, V.; SONG, L.; LINDQUIST, E.; GRUBER, S.; KOPTCHINSKIY, A.; ZEILINGER, S.; SCHMOLL, M.; MARTINEZ, P.; SUN, J.; GRIGORIEV, I.; HERRERA-ESTRELLA, A.; BAKER, S.E.; KUBICEK, C.P. Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the presence of a fungal prey. **BMC Genomics**, v.10, p.567, 2009.

SILVA, R.N.; STEINDORFF, A.S.; ULHOA, C.J.; FELIX, C.R. Involvement of Galphaprotein GNA3 in production of cell wall-degrading enzymes by *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) during mycoparasitism against *Pythium ultimum*. **Biotechnology Letters**, v.34, p.531-536, 2009.

SMITH, D.A.; HALLETT, S.G. Compatibility of the candidate bioherbicide *Microsphaeropsis amaranthi* with herbicides and adjuvants in tank mixture. In: **Proceedings of the BCPC International Congress: Crop Science and Technology**, Glasgow, U.K, p. 615-617, 2003.

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

SOTO-SUÁREZ, M.; RESTREPO, S.; MOSQUERA, G.; VERDIER, V.; TOHME, J. Análisis de expresión génica durante la respuesta de defensa de la yuca a la bacteriosis vascular (añublo bacteriano). **Revista Colombiana de Biotecnología**, v.8, p.16-28, 2006.

SOUZA, A.R.C.; BALDONI, D.B.; LIMA, J.; PORTO, V.; MARCUZ, C.; FERRAZ, R.C.; KUHN, R.C.; JAQUES, R.J.S.; GUEDES, J.V.C.; MAZUTTI, M.A. Bioherbicide production by *Diaporthe* sp. isolated from the Brazilian Pampa biome. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.4, p.575-578, 2015.

STOPPACHER, N.; KLUGER, B.; ZEILINGER, S.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. **Journal of Microbiological Methods**, v.81, p.187-193, 2010.

SUN, G.; YANG, Q.; ZHANG, A.; GUI, J.; LIU, X.; WANG, Y.; MA, Q. Synergistic effect of the combined bio-fungicides ϵ -poly-L-lysine and chitooligosaccharide in controlling grey mould (*Botrytis cinerea*) in tomatoes. **International Journal of Food Microbiology**, v.276, p.46-53, 2018.

TAO, B.; SHAO, B.; QIAO, Y.; WANG, X.; CHANG, S.; QIU, L. 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.

TINOCO-VALENCIA, R.; GÓMEZ-CRUZ, C.; GALINDO, E.; SERRANO-CARRÓN, L. Toward an understanding of the effects of agitation and aeration growth and laccases production by *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Biotechnology**, v.177, p.67-73, 2014.

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

VAREJÃO, E.; DEMUNER, A.J.; BARBOSA, L.C.A.; Barreto, R.W. The search for new natural herbicides – Strategic approaches for discovering fungal phytotoxins. **Crop Protection**, v.48, p.41-50, 2013.

VELÁZQUEZ-ROBLEDO, R.; CONTRERAS-CORNEJO, H.A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; HERNÁNDEZ-MORALES, A.; AGUIRRE, J.; CASA-FLORES, S.; LÓPEZ-BUCIO, J.; HERRERA-ESTRELLA, A. Role of the 4-phosphopantetheinyl transferase of *Trichoderma virens* in secondary metabolism, and induction of plant defense responses. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, v.24, p.1459-1471, 2011.

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

VEY, A.; HOAGLAND, R.E.; BUTT, T.M. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. **Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential**. Wallingford, U.K.: CABI, 2001.

VOS, C.M.; DE CREMER, K.; CAMMUE, B.P.; DE CONINCK, B. The toolbox of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of *Botrytis cinerea* disease. **Molecular Plant Pathology**, v.16, p.400-412, 2015.

WHIPPS, J.M.; LUMSDEN, R.D. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. In: BUTT, T.M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (eds). **Fungi as Biocontrol Agents. Progress, Problems and Potential**. CABI Publishing: Wallingford, p. 9-22, 2001.

WYMORE, L.A.; WATSON, A.K.; GOTLIEB, A.R. Interaction between *Colletotrichum coccodes* and thiazuron for control of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). **Weed Science Society of America**, v.35, p.377-383, 1987.

WYSS, G.S.; CHARUDATTAN, R.; ROSSKOPF, E.N.; LITTELL, R.C. Effects of selected pesticides and adjuvants on germination and vegetative growth of *Phomopsis amaranthicola*, a biocontrol agent for *Amaranthus* spp. **Weed Research**, v.44, p.469-482, 2004.

YANG, X. Scale-up of microbial fermentation process. In: **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 3 ed. ASM Press: Washington, DC, p.669-675, 2010.

YOSHIMURA, H.; SAWA, Y.; TAMOTSU, S.; SAKAI, A. 1,8-cineole inhibits both proliferation and elongation of by-2 cultured tobacco cells. **Journal of Chemical Ecology**, v.37, p.320-328, 2011.

YOU, J.; ZHANG, J.; WU, M.; YANG, L.; CHEN, W.; LI, G. Multiple criteria-based screening of *Trichoderma* isolates for biological control of *Botrytis cinerea* on tomato. **Biological Control**, v.101, p.31-38, 2016.

YU, X.Z.; ZHANG, F.Z. Effects of exogenous thiocyanate on mineral nutrients, antioxidative responses and free amino acids in rice seedlings. **Ecotoxicology**, v.22, p.752-760, 2013.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS
para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária

Aline Frumi Camargo
(Graduanda)

Prof. Dra. Helen Treichel
(Orientadora)

Erechim, julho de 2018