



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS COM ÊNFASE EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS

RAFAELA DOURADO CORAGEM

PRODUÇÃO DE QUITINASE POR FUNGOS DO GÊNERO *Trichoderma*

Recife
2023

RAFAELA DOURADO CORAGEM

PRODUÇÃO DE QUITINASE POR FUNGOS DO GÊNERO *Trichoderma*

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Ciências Ambientais, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel.

Orientadora: Profa. Dra. Laura Mesquita Paiva

Recife
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Coragem, Rafaela Dourado.

Produção de quitinase por fungos do gênero *Trichoderma* / Rafaela Dourado
Coragem. - Recife, 2023.
44 : il., tab.

Orientador(a): Laura Mesquita Paiva

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas /Ciências
Ambientais - Bacharelado, 2023.

1. Biotecnologia. 2. Micologia. 3. Atividade Enzimática. 4. Controle
Biológico. 5. Fungos Fitopatogênicos. I. Paiva, Laura Mesquita. (Orientação). II.
Título.

570 CDD (22.ed.)

RAFAELA DOURADO CORAGEM

PRODUÇÃO DE QUITINASE POR FUNGOS DO GÊNERO *Trichoderma*

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Ciências Ambientais, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel.

Aprovada em: 25/04/2023

COMISSÃO EXAMINADORA



Documento assinado digitalmente

LAURA MESQUITA PAIVA

Data: 08/05/2023 11:22:02-0300

Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Laura Mesquita Paiva

Msc. Layanne de Oliveira Ferro

Msc. Maria Tamara de Caldas Felipe

Recife

2023

Dedico este trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a minha avó que, apesar de não estar mais aqui, foi fundamental para a realização deste trabalho.

Aos demais familiares, por todo o suporte e incentivo, sempre me guiando, com sabedoria, para o caminho certo.

Aos amigos que fiz durante essa caminhada, que me proporcionaram momentos únicos e especiais e, também, aos de longa data, que sempre estiveram presentes, mesmo que distantes.

A minha querida orientadora, professora Laura, que me acolheu como monitora da disciplina 'Biologia de Fungos e Líquens' durante três semestres e, depois, como orientanda. Sempre atenciosa e disposta a ajudar; de fato, uma das melhores pessoas que conheci.

A minha coorientadora de consideração, Jenifer, que me confiou parte de seu projeto, me orientando desde o estágio e me ajudando sempre que precisei.

“Um objetivo sem um plano é apenas um desejo”.

Antoine de Saint Exupéry, 1900-1944.

RESUMO

O gênero *Trichoderma* possui mais de 250 espécies aceitas, e é composto por fungos com alta capacidade de promover o crescimento vegetal, controlar fitopatógenos e auxiliar a resistência das plantas diante de estresses. Esses organismos atuam de forma direta, parasitando o hospedeiro, ou indireta, inibindo o crescimento de fungos fitopatogênicos através da produção de metabólitos secundários e enzimas hidrolíticas. As quitinases, conjunto de enzimas que degradam a quitina, polissacarídeo que está presente na parede celular dos fungos, estão relacionadas aos mecanismos de defesa das plantas, sendo importantes para o controle de fitopatógenos. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de produção de quitinase por espécies do gênero *Trichoderma*, por meio da quantificação de atividade enzimática durante processo fermentativo. As espécies utilizadas neste estudo foram *Trichoderma aureoviride* (URM 5158), *Trichoderma harzianum* (URM 6508) e *Trichoderma longibrachiatum* (URM 6068). Essas cepas foram gentilmente cedidas pela Micoteca URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. O potencial de produção de quitinases por esses fungos foi avaliado por meio da atividade enzimática em ensaio com fermentação submersa, usando quitina coloidal como fonte de carbono, nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas. As quantificações enzimáticas foram feitas em espectrofotômetro a 540 nm, sendo uma unidade de atividade quitinolítica a quantidade necessária para formar 1 μ mol de N-acetilglicosamina por minuto. O *T. longibrachiatum* (URM 6068) exibiu a maior atividade enzimática (0,55 U/mL) no tempo de 48 horas de fermentação. O *T. harzianum* (URM 6508) produziu a sua maior taxa em 72 horas (0,50 U/mL), enquanto o *T. aureoviride* (URM 5158) atingiu o seu pico em 48 horas (0,44 U/mL). Apesar da variação das atividades enzimáticas entre as espécies, as estirpes de *Trichoderma* utilizadas nesta pesquisa apresentaram boa produção de quitinase, sendo a utilização dessas espécies no controle biológico uma alternativa potencial para reduzir o uso de produtos químicos no manejo de doenças de plantas.

Palavras-chave: atividade enzimática, fungos fitopatogênicos, controle biológico.

ABSTRACT

The genus *Trichoderma* has more than 250 accepted species, and is composed of fungi with a high capacity to promote plant growth, control plant pathogens and assist plant resistance to stress. These organisms act directly, parasitizing the host, or indirectly, inhibiting the growth of phytopathogenic fungi through the production of secondary metabolites and hydrolytic enzymes. Chitinases, a set of enzymes that degrade chitin, a polysaccharide that is present in the cell wall of fungi, are related to the defense mechanisms of plants, being important for the control of plant pathogens. Therefore, the present study aimed to evaluate the potential for chitinase production by species of the genus *Trichoderma*, through the quantification of enzymatic activity during the fermentation process. The species used in this study were *Trichoderma aureoviride* (URM 5158), *Trichoderma harzianum* (URM 6508) and *Trichoderma longibrachiatum* (URM 6068). These strains were kindly provided by the URM Mycotheque of the Department of Mycology of the Federal University of Pernambuco. The potential for production of chitinases by these fungi was evaluated by means of enzymatic activity in a test with submerged fermentation, using colloidal chitin as a carbon source, at times 24, 48, 72 and 96 hours. Enzymatic quantifications were made in a spectrophotometer at 540 nm, with one unit of chitinolytic activity being the amount needed to form 1 μmol of N-acetylglucosamine per minute. *T. longibrachiatum* (URM 6068) exhibited the highest enzymatic activity (0.55 U/mL) in the time of 48 hours of fermentation. *T. harzianum* (URM 6508) produced its highest rate in 72 hours (0.50 U/mL), while *T. aureoviride* (URM 5158) reached its peak in 48 hours (0.44 U/mL). Despite the variation in enzymatic activities among the species, the strains of *Trichoderma* used in this research showed good production of chitinase, and the use of these species in biological control is a potential alternative to reduce the use of chemicals in the management of plant diseases.

Keywords: enzymatic activity, phytopathogenic fungi, biological control.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1 – Morfologia típica de *Trichoderma*. Colônias de *Trichoderma* em meio de cultura (A e B). *Trichoderma* em substrato natural (C).....15

Figura 2 – Interação de *Trichoderma* spp. (verde) e fitopatógenos (cinza). Encontro das hifas dos fungos (A). Metabólitos (triângulos verdes) produzidos por *Trichoderma* spp. (B). Resposta do fitopatógeno (vermelho) devido a ação do *Trichoderma* spp. (C). Contrarresposta do *Trichoderma* spp.: secreção de enzimas hidrolíticas (azul) (D). Setas indicam a direção das respostas.....16

Figura 3 – Reprodução assexuada do *Trichoderma*.....19

Figura 4 – Etapas do micoparasitismo entre o *Trichoderma* (T) e um hospedeiro (R). Identificação (A); Fixação (B); Enovelamento (C); Destruição da hifa do hospedeiro (D).....20

Figura 5 – Produção de sideróforos por *Trichoderma*. Na rizosfera, os sideróforos gerados pelo *Trichoderma* quelam a forma insolúvel do ferro (Fe^{3+}) e o converte em sua forma solúvel (Fe^{2+}). Assim, torna o Fe indisponível para os fungos fitopatogênicos.....21

Figura 6 – Promoção do crescimento vegetal por produto a base de *Trichoderma* spp.....23

GRÁFICO

Gráfico 1 – Curva de N-acetil-D-glicosamina.....29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Cepas das espécies de <i>Trichoderma</i> utilizadas.....	27
Tabela 2 – Concentrações das amostras de N-acetil-D-glicosamina.....	29
Tabela 3 – Atividade quitinolítica de espécies de <i>Trichoderma</i>	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNSA	Ácido Dinitrosalicílico
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato Ferroso Hepta-Hidratado
KCl	Cloreto de Potássio
K_2HPO_4	Fosfato Dipotássico
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de Magnésio Hepta-Hidratado
NAG	N-acetil-D-glicosamina ou N-acetilglicosamina
NaNO_3	Nitrato de Sódio

LISTA DE SÍMBOLOS

G/L	Gramas por Litro
NM	Nanômetro
P/V	Peso por Volume
RPM	Rotação por Minuto
μL	Microlitro
μmol	Micromole

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1 O GÊNERO <i>Trichoderma</i>	18
2.1.1 MECANISMOS DE AÇÃO DO GÊNERO <i>Trichoderma</i> PARA O CONTROLE DE FITOPATÓGENOS.....	19
2.1.1.1 INTERAÇÕES DO GÊNERO <i>Trichoderma</i> COM AS PLANTAS.....	21
2.1.1.2 <i>Trichoderma</i> spp. E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	23
2.2 QUITINASES E SUAS APLICAÇÕES.....	24
2.2.1 PRODUÇÃO DE QUITINASES POR <i>Trichoderma</i> spp.....	25
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 OBJETIVO GERAL.....	26
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1 OBTENÇÃO DAS ESPÉCIES DE <i>Trichoderma</i>	27
4.2 PRODUÇÃO DA QUITINA COLOIDAL.....	27
4.3 PRODUÇÃO DE MEIO SELETIVO.....	28
4.4 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO.....	28
4.5 PREPARO DA FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	28
4.6 CURVA DE N-ACETIL-D-GLICOSAMINA.....	28
4.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE QUITINOLÍTICA.....	31
6. CONCLUSÕES.....	34
REFERÊNCIAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

Agrotóxicos, defensivos agrícolas, pesticidas entre outros, são diversas as denominações dadas a o grupo de substâncias químicas utilizadas no controle de pragas e doenças de plantas (Peres, Moreira e Dubois, 2003). Com o desenvolvimento da agricultura no século XVIII, e o consequente aumento da produtividade devido as novas técnicas de cultivo, houve um aumento da incidência de pragas e doenças nas lavouras, em razão da degradação de habitats para a criação de plantações e áreas de pastagens. Dessa forma, na metade do século XIX, surgiram os primeiros estudos científicos acerca do uso de compostos químicos, com o intuito de combater as pragas agrícolas (Braibante e Zappe, 2012).

Para Jobim et al. (2010), essas novas tecnologias, apesar de fortalecer o mercado econômico, causam danos potenciais ao meio ambiente e à saúde humana. Uma vez introduzidos no ambiente, o risco de contaminação do sistema hidrológico é eminente (Ribeiro e Vieira, 2010). Além disso, alguns de seus resíduos podem ser liberados para a atmosfera, aquíferos ou serem consumidos por seres vivos, por meio de sua fixação no solo (Ribeiro e Vieira, 2010).

Estudos revelam que o contato de trabalhadores rurais com defensivos agrícolas aumenta as chances do surgimento de vários tipos de câncer, distúrbios hormonais e malformações gestacionais (Vasconcelos, 2018). Doll e Peto (apud Caldas e Souza, 2000) avaliaram que 35% dos casos de câncer na população dos Estados Unidos tem - como base - a dieta, sendo os pesticidas encontrados nos alimentos um dos responsáveis.

A busca por alimentos orgânicos cresce diariamente, fazendo do controle biológico uma alternativa importante. Os fungicidas biológicos, além de possuírem maior potencial em comparação com o controle químico (Machado et al., 2012), são fundamentais para a evolução da agricultura sustentável, diminuindo o uso de agrotóxicos (Morandi e Bettiol, 2009).

O gênero *Trichoderma* spp. pertence ao filo Ascomycota, são fungos encontrados em regiões temperadas ou de clima tropical, habitando desde madeiras em decomposição a fungos formadores de corpos de frutificação macroscópicos, como cogumelos. Suas colônias apresentam crescimento rápido, micélio predominantemente branco revestidas por massas de conídios de coloração verde (Figura 1), permitindo fácil identificação morfológica a nível de gênero (Abreu e

Pfenning, 2019). Com mais de 250 espécies aceitas, o maior número dessas são compostas por parasitas de fungos macroscópicos e decompositores de madeira (Druzhinina et al., 2011). Assim, sugere-se que o parasitismo e o fato de se alimentarem de biomassa morta de fungos consista de uma característica ancestral, associada a maior parte das espécies (Kubicek et al., 2011).

Figura 1 – Morfologia típica de *Trichoderma*. Colônias de *Trichoderma* em meio de cultura (A e B). *Trichoderma* em substrato natural (C).



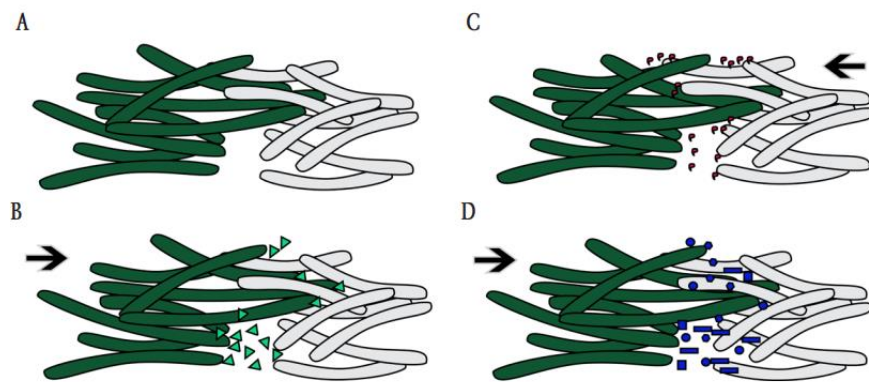
Fonte: Abreu e Medeiros (2019, p. 164).

Algumas linhagens do gênero que estimulam o crescimento vegetal, são usadas no controle de fitopatógenos e no aumento da resistência de plantas a estresses, em virtude de sua flexibilidade, através do parasitismo, amensalismo e competição (Altomare et al., 1999; Harman et al., 2004; Resende et al., 2004; Delgado et al., 2007; Filho et al., 2008; Louzada et al., 2009; Hoyos-Carvajal, Orduz e Bissett, 2009 apud Machado et al., 2012).

O motivo dessa versatilidade é sua disputa por nutrientes, produção de metabólitos secundários e enzimas hidrolíticas (Sivan e Chet, 1989 apud Ramada, Lopes e Ulhoa, 2019), como mostra a Figura 2. A alta capacidade de colonização da

rizosfera de plantas e de muitos outros substratos com diferentes aspectos deve-se a sua ampla variedade de metabólitos secundários (Mukherjee, Horwitz e Kenerley, 2012; O'Brien e Wright, 2011). Além disso, são capazes de gerar estruturas de resistência, como clamidósporos e microescleródios, permitindo sua sobrevivência em condições adversas (Monte, Bettioli e Hermosa, 2019).

Figura 2 – Interação de *Trichoderma* spp. (verde) e fitopatógenos (cinza). Encontro das hifas dos fungos (A). Metabólitos (triângulos verdes) produzidos por *Trichoderma* spp. (B). Resposta do fitopatógeno (vermelho) devido a ação do *Trichoderma* spp. (C). Contrarresposta do *Trichoderma* spp.: secreção de enzimas hidrolíticas (azul) (D). Setas indicam a direção das respostas.



Fonte: Ramada, Lopes e Ulhoa (2019, p. 204).

Os fungos alimentam-se através das hifas, as quais penetram a parede celular e absorvem os nutrientes dos substratos (Monte, Bettioli e Hermosa, 2019). Para que substâncias com alto peso molecular sejam absorvidas pelos fungos, essas precisam ser quebradas em moléculas menores. Para isso, os fungos liberam enzimas extracelulares, como as glucanases, proteases e quitinases (Monte, Bettioli e Hermosa, 2019).

As quitinases, conjunto de enzimas que degradam a quitina por meio do rompimento das ligações C1 e C4 de N-acetilglicosaminas, estão relacionadas ao mecanismo de defesa de plantas, atuando no controle de fitopatógenos (Ribeiro, 2000). Segundo Monte, Bettioli e Hermosa (2019), o gênero *Trichoderma* estimula - de forma sistêmica - o mecanismo de defesa diante de ataques de patógenos, fatores edáficos e condições ambientais adversas, sem a necessidade de contato direto com o invasor ou estar sujeita a algum tipo de estresse preexistente, através da produção de quitinases.

Segundo Marra et al. (2019), a atuação dos metabólitos de *Trichoderma*, isoladamente ou não, colaborará para o desenvolvimento de uma nova era de bioestimulantes e bioprotetores mais adequados e ecologicamente corretos do que os atuais. Com isso, estudos quanto ao controle biológico são altamente relevantes para uma mudança no sistema agrícola vigente.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

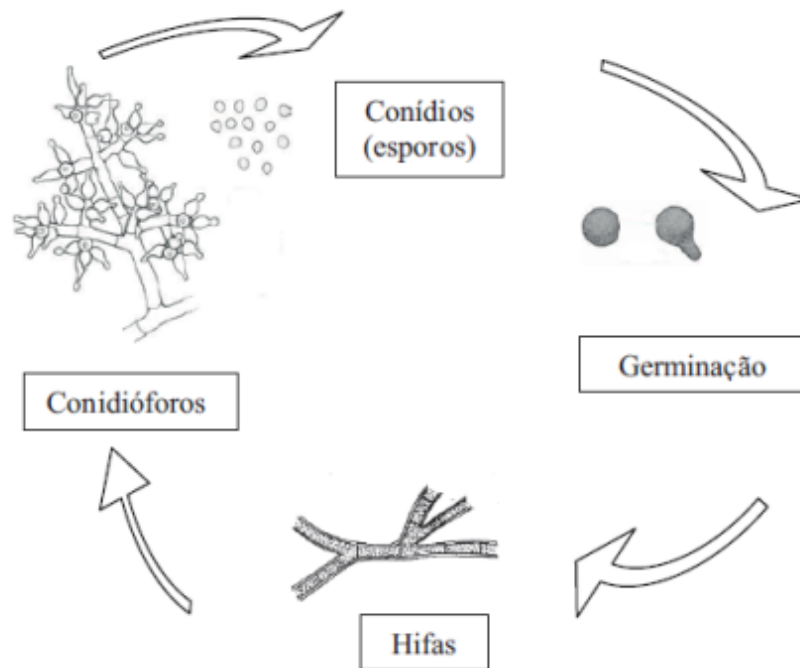
2.1 O GÊNERO *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma* foi citado pela primeira vez em 1794, por Persoon, apresentando apenas uma espécie, *Trichoderma viride* (Schuster e Schmoll, 2010). No entanto, em 1969, após o avanço nos mecanismos de identificação de espécies, Rifai realizou a primeira revisão do gênero e sugeriu oito novas espécies para o grupo, baseando-se em aspectos morfológicos (Guimarães e Paz, 2022). Em 2006, existiam mais de 100 espécies filogeneticamente definidas (Druzhinina et al., 2006) e, atualmente, acredita-se que o gênero abrange cerca de 300 espécies (Guimarães e Paz, 2022).

Alguns fungos do gênero são colonizadores universais, encontrados em variados ecossistemas de diferentes zonas climáticas (Kubicek, Komon-Zelazowska e Druzhinina, 2008). A ocorrência das espécies de *Trichoderma* depende das características ambientais, como solo, clima, disponibilidade de substratos e das interações ecológicas (Holyos-Carvajal e Bissett, 2011). O êxito em colonizar seus habitats reflete na capacidade de secretar metabólitos secundários e enzimas hidrolíticas (Schuster e Schmoll, 2010).

Esse grupo de fungos pertence à ordem Hypocreales e família Hypocreaceae dentro do filo Ascomycota (Francisco, 2016). As espécies que apresentam fase sexuada (teleomórfica) são caracterizadas pela formação de ascomas em formato de pêra, com himênio exposto somente por uma abertura chamada de ostíolo, conhecidos como peritécio (Abreu e Pfenning, 2019). Nos peritécios são produzidos ascos contendo ascósporos bicelulares, que se dividem e quando maduros são liberados (Jaklitsch, 2009). Na fase assexuada (anamórfica), o micélio vegetativo dispõe de estruturas com um eixo central e ramificações laterais, chamadas de conidióforos (Abreu e Pfenning, 2019), que terminam em uma zona concêntrica de células conidiogênicas, as fiálides (Francisco, 2016). Nas extremidades das fiálides são gerados os conídios unicelulares (Figura 3), de aparência oval, esférica ou alongada, com a cor verde na maioria das espécies (Abreu e Pfenning, 2019).

Figura 3 – Reprodução assexuada do *Trichoderma*.



Fonte: Machado et al. (2012, p. 275).

A relação entre *Hypocrea* e *Trichoderma*, de teleomorfo e anamorfo, não foi aceita por um longo período, apesar da estreita ligação de *H. rufa* com *T. viride* (Jaklitsch, 2009). Apenas no final da década de 1990, com a utilização do sequenciamento de genes e análises filogenéticas (Abreu e Pfenning, 2019), Samuels et al. (1998) comprovou que várias espécies de *Hypocrea* compartilham a mesma forma teleomórfica, entretanto, possuem fases anamórficas distintas (Jaklitsch, 2009). Assim, foi possível a identificação dos gêneros independentemente do estágio do ciclo de vida e a confirmação que esses pertenciam a mesma espécie (Abreu e Pfenning, 2019).

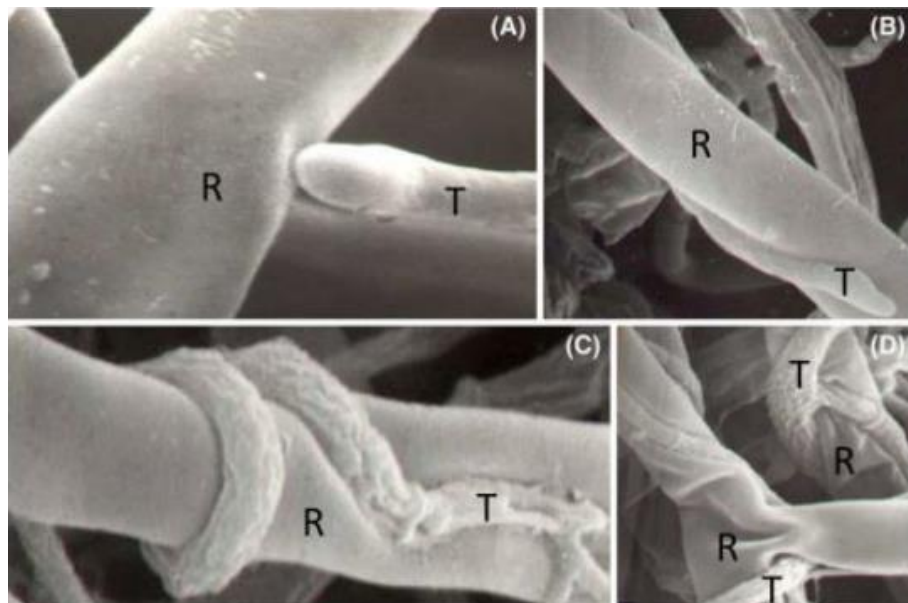
2.1.1 MECANISMOS DE AÇÃO DO GÊNERO *Trichoderma* PARA O CONTROLE DE FITOPATÓGENOS

A dominação de um habitat por qualquer organismo depende de sua capacidade de defesa e potencial para competir (Schuster e Schmoll, 2010). *Trichoderma* é um gênero de fungos altamente oportunistas, encontrados em quase todos os solos e em diversos ambientes com alta concentração de matéria orgânica,

além de ser um ávido colonizador da rizosfera de plantas, o tornando um especialista em competição (Monte, Bettiol e Hermosa, 2019).

Como um importante agente de biocontrole, o gênero utiliza estratégias incluindo micoparasitismo, concorrência e antibiose (Sood et al., 2020). O micoparasitismo é um dos principais mecanismos antagônicos utilizados por *Trichoderma* (Sood et al., 2020), e corresponde a interação direta entre o parasita e o hospedeiro (Naher et al., 2014). A princípio, *Trichoderma* libera enzimas constitutivas que, ao entrar em contato com as hifas do fitopatógeno, formam estruturas (peptídeos, por exemplo) que são identificadas pelo agente de biocontrole (Druzhinina et al., 2011). Após esse reconhecimento, as hifas do parasita crescem em direção as hifas do hospedeiro e fixam-se em torno dele, o enroscando e formando apressórios (Benítez et al., 2004), estruturas que auxiliam as hifas durante a penetração no hospedeiro (Santos, 1996). Em seguida, produzem enzimas hidrolíticas que danificam a parede celular do patógeno, permitindo o acesso ao conteúdo citosólico, solução de água, proteínas, enzimas e outras moléculas, do qual irá se alimentar (Benítez et al., 2004; Mendes, 2019) (Figura 4).

Figura 4 – Etapas do micoparasitismo entre o *Trichoderma* (T) e um hospedeiro (R). Identificação (A); Fixação (B); Enovelamento (C); Destruição da hifa do hospedeiro (D).



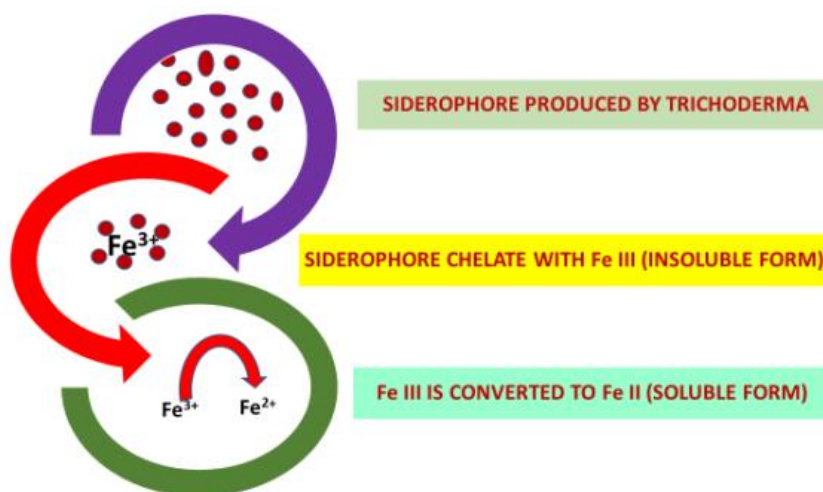
Fonte: Mukherjee et al. (2012).

A concorrência com outros fungos por espaço e alimento está vinculada ao controle biológico (Vinale et al., 2008). A escassez de nutrientes é a causa mais

comum de morte de microrganismos (Naher et al., 2014). Uma característica importante do gênero *Trichoderma* é a sua capacidade de produzir sideróforos em ambientes com baixas concentrações de ferro. Essas substâncias são quelantes específicos de ferro férrico e altamente eficientes, colaborando para a sobrevivência e melhorando o desempenho do fungo na rizosfera (Figura 5) (Mukherjee et al., 2012).

Figura 5 – Produção de sideróforos por *Trichoderma*. Na rizosfera, os sideróforos gerados pelo *Trichoderma*, quelam a forma insolúvel do ferro (Fe^{3+}) e o converte em sua forma solúvel (Fe^{2+}).

Assim, torna o Fe indisponível para os fungos fitopatogênicos.



Fonte: Sood et al. (2020, p. 07).

A habilidade de antibiose dos *Trichoderma* é uma das mais diversas e eficientes do Reino Fungi (Hermosa et al., 2014 apud Monte, Bettiol e Hermosa, 2019) e está comumente associada a ações de biocontrole (Naher et al., 2014). Esse mecanismo consiste na produção de antibióticos ou compostos orgânicos, voláteis ou não, de baixo peso molecular, que agem sob os fitopatógenos, impedindo o seu crescimento e reprodução (Manzar et al., 2022). Essa interação é conhecida por atuar em diferentes espécies de patógenos, como *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Botrytis*, *Stachybotrys*, *Sclerotinia*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Gaeumannomyces*, *Colletotrichum*, entre outros (Hermosa et al., 2014 apud Monte, Bettiol e Hermosa, 2019).

2.1.1.1 INTERAÇÕES DO GÊNERO *Trichoderma* COM AS PLANTAS

A colonização de plantas por parte do *Trichoderma* abrange diferentes etapas, desde o reconhecimento e fixação nas raízes até a penetração no vegetal (Chen et

al., 2011). Essa fixação acontece por meio de pequenas hidrofobinas da parte externa da parede celular dos vegetais e por expansinas com a capacidade de identificar a celulose e alterar a morfologia da raiz (Mendoza-Mendoza et al., 2018). A sua instalação no sistema radicular pode ser beneficiada pela ação das hemiceluloses e poligalacturonases (Morán-Díez et al., 2009).

Em virtude de sua flexibilidade ao estresse oxidativo, que é uma consequência do mecanismo de defesa das plantas frente a ameaças por patógenos (Monte, Bettiol e Hermosa, 2019). O gênero *Trichoderma* consegue estabelecer com as plantas uma relação harmônica, liberando antioxidantes nas raízes e na parte aérea do vegetal, estimulando a diminuição dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), quando danoso, e incentivando uma maior resistência a outros estresses abióticos (Mastouri, Björkman e Harman, 2012).

Diversas espécies de *Trichoderma* estabelecem uma relação benéfica com as plantas, não apenas sem causar danos, mas as protegendo de fitopatógenos e estresses ambientais, potencializando o rendimento nas plantações de diferentes sistemas de produção (Druzhinina et al., 2011; Carrero-Carrón et al., 2018). A sua habilidade ainda se estende no controle de plantas daninhas parasitas, impedindo a germinação de suas sementes, inibindo a ação das estrigolactonas (Boari et al., 2016).

Além disso, isolados de *Trichoderma* spp. são utilizados na promoção do crescimento vegetal (Figura 6) que, a princípio, foi relacionado ao controle de microrganismos patogênicos existentes no solo e/ou na rizosfera. Entretanto, atualmente é considerado que acontece por meio da produção de hormônios e solubilizadores de nutrientes, disponibilizados para o uso das plantas (Lucon, 2009).

Figura 6 – Promoção do crescimento vegetal por produto a base de *Trichoderma* spp.



Fonte: Laura Bononi (2020).

2.1.1.2 *Trichoderma* spp. E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

A palavra “metabólito” é referente ao produto do metabolismo, um aglomerado de transformações de compostos orgânicos que fornecem energia ao organismo, através da ação de enzimas (Marzzoco e Torres, 2007). Devido a especificidade dessas enzimas, que criam rotas metabólicas, essas alterações ocorrem em local adequado, tendo em vista o aproveitamento de nutrientes para suprir as necessidades da célula (Pereira e Cardoso, 2012). Os metabólitos primários, como os carboidratos, aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos, originados do metabolismo primário, são indispensáveis para o metabolismo secundário, pois vão sintetizar os metabólitos secundários (Delbone e Lando, 2010).

Os metabólitos secundários são compostos incluídos em vias de sinalização, relações simbióticas entre organismos e atividades antibióticas (Ramada, Lopes e Ulhoa, 2019; Melo, 2021). Essas moléculas do metabolismo secundário, apesar de não serem essenciais no crescimento e desenvolvimento dos fungos, são relevantes na ocupação de habitats, tornando vantajosa a colonização do ambiente (Ramada, Lopes e Ulhoa, 2019). A ampla variedade de hospedeiros que as espécies do gênero *Trichoderma* consegue parasitar deve-se a sua extensa lista de metabólitos secundários (Mukherjee, Horwitz e Kenerley, 2012; O'Brien e Wright, 2011), que

impedem o crescimento e/ou são tóxicos ao fungo alvo (Ramada, Lopes e Ulhoa, 2019).

A liberação de metabólitos secundários por espécies de *Trichoderma* é primordial para o processo de micoparasitismo, uma vez que esse primeiro contato com o fitopatógeno será o impulso necessário para obter essa resposta (Schirmböck et al., 1994; Zeilinger e Omann, 2007 apud Ramada, Lopes e Ulhoa, 2019). Além do micoparasitismo, algumas substâncias produzidas por *Trichoderma* spp. conseguem potencializar o funcionamento de plantas hospedeiras (Patil et al., 2016 apud Ramada, Lopes e Ulhoa, 2019), promovendo o crescimento vegetal e induzindo resistência em plantas (Woo et al., 2006; Woo e Lorito, 2007 apud Ramada, Lopes e Ulhoa, 2019).

As enzimas são um conjunto de proteínas fundamentais para o funcionamento do organismo, que agem como catalisadoras de reações metabólicas, decompondo a matéria orgânica e deteriorando alimentos (Lehninger, Nelson e Cox, 1995). Existem diferentes tipos de enzimas (tais como hidrolases, isomerases, ligases), cada uma com suas funções específicas. As hidrolases são enzimas que catalisam reações de hidrólise, ou seja, quebra de ligações químicas pela adição de uma molécula de água (Sant'anna, 2001 apud Giovanini, 2014). São altamente relevantes para os fungos do gênero *Trichoderma* (como, por exemplo, as quitinases), que possui numerosos genes que codificam essas enzimas (Monte, Bettiol e Hermosa, 2019).

2.2 QUITINASES E SUAS APLICAÇÕES

As quitinases são enzimas hidrolíticas responsáveis pela degradação das quitinas, um polímero de N-acetilglicosamina (Moura et al., 2006). São produzidas por diversos organismos, incluindo fungos, bactérias, vírus, insetos, mamíferos e plantas (Karthik et al., 2014). Aqueles que apresentam a quitina em sua composição são capazes de sintetizar as quitinases, assim como organismos que a utilizam como fonte de carbono e nitrogênio em seus processos metabólicos (Baldoni, 2016). Além disso, também são geradas durante a infecção de um hospedeiro (Baldoni, 2016), como por fungos endofíticos (Zampieri e Ribeiro, 2005).

Nos fungos, elas possuem funções distintas, seja na germinação e diferenciação de esporos (Baldoni, 2016), crescimento e ramificação das hifas ou autólise (Karthik et al., 2014). Também são utilizadas como mecanismo de defesa contra agentes patogênicos, como no micoparasitismo, principalmente na penetração

das hifas na parede celular do hospedeiro (Duo-Chuan, 2006 apud Baldoni, 2016), nos artrópodes, durante a infecção do exoesqueleto (Barros et al., 2010 apud Baldoni, 2016) e nematoides, interrompendo a sua reprodução (Al-Hazmi e Tariqjaveed, 2016).

2.2.1 PRODUÇÃO DE QUITINASES POR *Trichoderma* spp.

As pesquisas envolvendo a produção e atividade das quitinases por espécies de *Trichoderma* acontecem há bastante tempo, como por Lima et al. (1997). Em seu trabalho, a capacidade de seis isolados de *Trichoderma* sp. em produzirem quitinases foi avaliada e posteriormente comparada a habilidade de produção por *Trichoderma harzianum*. Após mais de três décadas, esses estudos continuam sendo aperfeiçoados. Outra análise feita com *T. harzianum* contra larvas de *Helicoverpa armigera* (Hübner) resultou na mortalidade de mais de 70% dessas larvas e nenhuma aparição de adultos (Binod et al., 2007).

A atividade antagonista das quitinases produzidas por *Trichoderma* foi aplicada no controle biológico do *Botrytis cinerea* (Pers), conhecido como mofo cinzento (Aoki, Haga e Suzuki, 2020), patógeno que causa grandes perdas anuais na agricultura (Boddy, 2016). A atuação das quitinases em folhas de pepino infectadas por *B. cinerea* diminuiu a intensidade da doença (Aoki, Haga e Suzuki, 2020). Já a utilização do *Trichoderma longibrachiatum* contra o nematoide *Heterodera avenae* (Wollenweber) foi realizada em experimentos *in vitro* e em casa de vegetação (Zhang et al., 2014). *In vitro*, mais de 90% dos indivíduos foram parasitados, enquanto em casa de vegetação o *T. longibrachiatum* diminuiu significativamente a infecção do *H. avenae* em mudas de trigo (Zhang et al., 2014).

As aplicações feitas usando quitinases produzidas por *Trichoderma* spp. frente ao ataque de patógenos demonstram seu papel promissor como agente no controle biológico.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de produção de quitinase por fungos do gênero *Trichoderma*.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Quantificar a atividade enzimática da quitinase em meio fermentativo, com a utilização da quitina coloidal como fonte de carbono.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DAS ESPÉCIES DE *Trichoderma*

Os isolados de *Trichoderma aureoviride*, *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma longibrachiatum* foram gentilmente cedidas pela Micoteca URM do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (Tabela 1). Os fungos foram repicados para tubos de ensaio contendo meio de cultura batata-dextrose-água (BDA) acrescido cloranfenicol (50 mg/L). Os tubos foram incubados a 25°C, em B.O.D, por sete dias, para o desenvolvimento pleno das culturas.

Tabela 1 – Cepas das espécies de *Trichoderma* utilizadas.

Cepa	Substrato de Isolamento
<i>Trichoderma aureoviride</i> (URM 5158)	Argamassa
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (URM 6068)	Sedimento de Manguezal
<i>Trichoderma harzianum</i> (URM 6508)	Solo de Sistema Agroflorestal

Fonte: Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco.

4.2 PRODUÇÃO DA QUITINA COLOIDAL

Para a produção da quitina coloidal procedeu-se, primeiramente, o preparo da solução estoque, para qual dissolveu-se 5 gramas de quitina em pó, de carapaça de camarão, em 50 mL de ácido ortofosfórico 85%, à 25°C, sob agitação constante durante 2 horas. Após a redução da temperatura da solução para temperatura ambiente, foram adicionados 500 mL de etanol 95% sob agitação durante trinta minutos (adaptado de Hsu e Lockwood, 1975).

Após os passos anteriores foi realizada a centrifugação de 15 mL da solução estoque, a 5.000 rpm, durante quinze minutos. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 50 mL da solução tampão fosfato de sódio 100mM de pH 7,0, sendo novamente submetido à centrifugação a 5.000 rpm, durante quinze minutos e descarte do sobrenadante. Esse processo se repetiu por 3 vezes até a obtenção da solução com pH 7,0. Após essa etapa, acrescentou-se 90 mL do mesmo

tampão, finalizando o preparo da quitina coloidal (adaptado de Hsu e Lockwood, 1975).

4.3 PRODUÇÃO DE MEIO SELETIVO

O meio seletivo preparado continha 3 g/L⁻¹ de NaNO₃, 1 g/L⁻¹ de K₂HPO₄, 0,5 g/L⁻¹ de KCl, 0,5 g/L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0,01 g/L⁻¹ de FeSO₄, 20 mL de quitina coloidal e 5 g/L⁻¹ de sacarose dissolvidos em 1L de água destilada e pH 7,0 (adaptado de Waghmare e Ghosh, 2010).

4.4 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

Para a padronização do inóculo foram adicionados 10 mL de Tween 80 (0,02%) aos tubos e, posteriormente, foi realizada contagem dos esporos em câmara de Neubauer, com a concentração ajustada para 10⁷ esporos por mL.

4.5 PREPARO DA FERMENTAÇÃO SUBMERSA

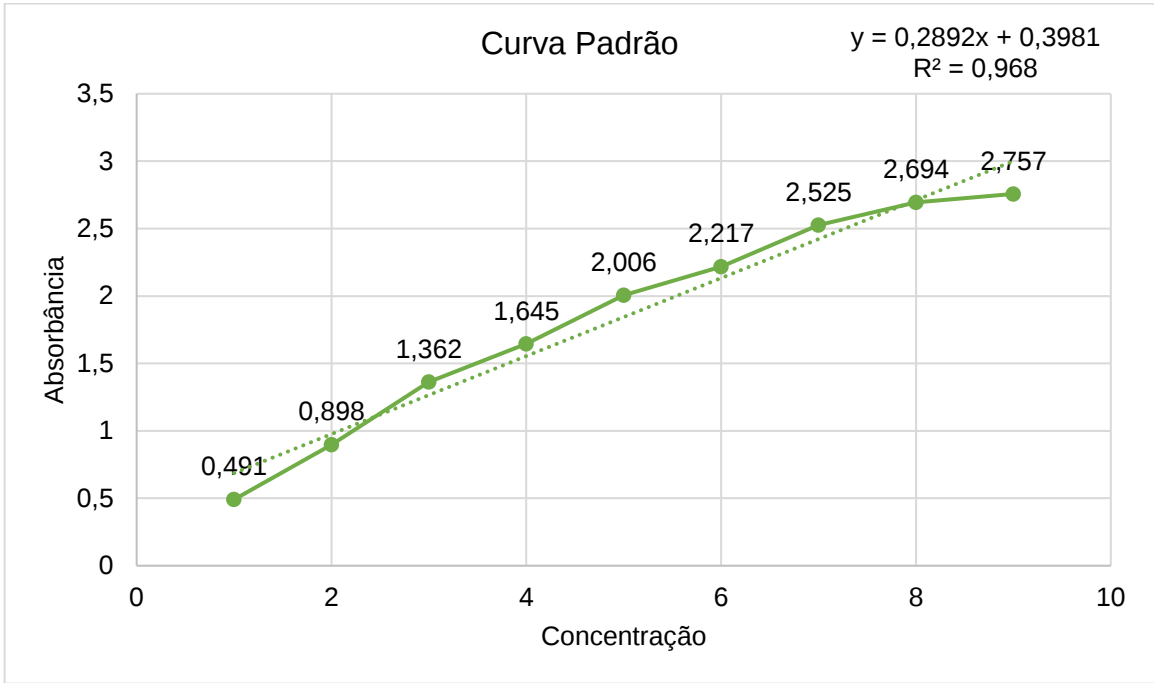
Da suspensão de esporos ajustada, foi feita a transferência de 2 mL para um Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio seletivo e incubados a 150 rpm, à 37°C, por 96 horas. A cada 24 horas, um frasco de cada espécie de fungo foi retirado, o conteúdo nele contido filtrado com auxílio de bomba a vácuo e centrifugado a 12.300 x g por trinta minutos, à 4°C, sendo o sobrenadante coletado o extrato enzimático bruto (adaptado de Waghmare e Ghosh, 2010).

4.6 CURVA DE N-ACETIL-D-GLICOSAMINA

Para gerar a curva de N-acetil-D-glicosamina (NAG) (Gráfico 1), necessária para calcular as atividades enzimáticas. Foram utilizados nove tubos de ensaio contendo 1 mL de diferentes concentrações das amostras de NAG (Tabela 2), completados com 2 mL de água destilada e 3 mL da solução de ácido dinitrosalicílico (DNSA). Posteriormente, foram fervidos por 10 minutos, submetidos a banho de gelo e levados para leitura em espectrofotômetro a 570 nm (adaptado de Miller, 1959). O

resultado da análise mostra uma relação exponencial entre as concentrações das amostras de NAG e a absorbância, como expressa a Lei de Lambert-Beer (1870).

Gráfico 1 – Curva de N-acetil-D-glicosamina.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Tabela 2 – Concentrações das amostras de N-acetil-D-glicosamina.

Concentração (mg/mL)	Solução de NAG (µL)	H2O (µL)
0,10	20	980
0,25	50	950
0,50	100	900
0,75	150	850
1,0	200	800
1,5	250	750
2,0	400	600
3,0	600	400
4,0	800	200
5,0	1000	0

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

4.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A quantificação da atividade quitinolítica foi determinada através da mistura reacional constituída de 1 mL de quitina coloidal 1% (P/V), 500 µL de tampão fosfato de sódio 25mM de pH 7,4 e 500 µL de extrato enzimático bruto (Waghmare e Ghosh, 2010). Após incubar a amostra à 37°C, por trinta minutos, retirou-se 100 µL e acrescentou-o em 1 mL da solução de ácido dinitrosalicílico, preparada com 0,1 gramas de DNSA, 30 g de tartarato de sódio e potássio, 1,6 g de hidróxido de sódio e 100 mL de água destilada. O conteúdo foi levado para banho fervente, à 100°C, por 10 minutos e, seguidamente, colocado em banho de gelo, para interromper a reação. Por fim, o experimento foi realizado em triplicata e as determinações feitas em espectrofotômetro a 540 nm, sendo uma unidade de atividade quitinolítica a quantidade necessária para formar 1 µmol de N-acetilglicosamina por minuto (Waghmare e Ghosh, 2010).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE QUITINOLÍTICA

Foi realizada a quantificação da atividade enzimática dos isolados *Trichoderma aureoviride* (URM 5158), *Trichoderma harzianum* (URM 6508) e *Trichoderma longibrachiatum* (URM 6068), no qual todas apresentaram produção de quitinase, variando de 0,41 a 0,55 U/mL durante 96 horas do processo fermentativo (Tabela 3). *Trichoderma longibrachiatum* (URM 6068) exibiu a maior atividade enzimática (0,55 U/mL) em 48 horas, enquanto *Trichoderma aureoviride* (URM 5158) a menor (0,41 U/mL) em 96 horas. O fator tempo foi significativo na produção das enzimas por todas as espécies de fungo testadas. As culturas fúngicas submetidas a 48 e 72 horas de fermentação apresentaram a maior atividade enzimática. Observa-se que houve uma diferença significativa no que diz respeito à variação do tempo de fermentação, especialmente em relação a amostra URM 6068, que teve uma variação de 0,08 U/mL entre 24 e 48 horas. *Trichoderma harzianum* (URM 6508) produziu sua maior atividade em 72 horas de incubação (0,50 U/mL), enquanto que a amostra URM 5158 atingiu o seu pico em 48 horas (0,44 U/mL), com todas as espécies apresentando queda contínua nas suas atividades depois do seu máximo.

Tabela 3 – Atividade quitinolítica das espécies de *Trichoderma*.

Cepa	Atividade enzimática por tempo de fermentação (U/mL)			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
<i>Trichoderma aureoviride</i> (URM 5158)	0,43	0,44	0,42	0,41
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (URM 6068)	0,47	0,55	0,53	0,46
<i>Trichoderma harzianum</i> (URM 6508)	0,47	0,44	0,50	0,47

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A avaliação do potencial de produção de quitinase por cepas de *Trichoderma* é altamente relevante, uma vez que essas enzimas possuem inúmeros papéis para o gênero, incluindo defesa, quebra e absorção de nutrientes, destruição e

transformação da parede celular e patogênese (Rathore e Gupta, 2015). A utilização da quitina na produção de quitinase aumenta em grande proporção o seu rendimento (Karthik et al., 2014). Em Sandhya et al. (2004) e Sharaf (2005), a concentração de quitina entre 1 e 1,5% aumentou consideravelmente a produção de quitinase, é possível que a concentração de quitina tenha influenciado o presente estudo. O tempo de fermentação também interfere na produção enzimática, de modo que ela aumenta até determinado nível, em um certo período de tempo, e diminui logo após, o que justifica o decréscimo das atividades das linhagens selecionadas. O esgotamento de nutrientes no meio fermentativo pode ser o principal motivo para a queda na produção (Karthik et al., 2014).

Em pesquisas semelhantes, o gênero *Trichoderma* também apresentou produção de quitinase. Bomfim et al. (2021) observaram uma média de atividade enzimática do *Trichoderma longibrachiatum*, em 96 horas, de 1,99 U/mL. Silva (2015) registrou diferentes valores de atividades de cepas de *Trichoderma aureoviride*, variando de 1,95 a 6,70 U/mL⁻¹. No mesmo estudo, isolados de *Trichoderma harzianum* exibiram médias de 2,70, 4,40 e 4,53 U/mL⁻¹. Uma única estirpe de *Trichoderma longibrachiatum*, que foi avaliada no mesmo trabalho, exibiu resultado de 5,55 U/mL⁻¹. Os isolados utilizados nessas análises também foram cedidos pela Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco.

A espécie *Trichoderma aureoviride* tem sido cada vez mais utilizada em estudos envolvendo a podridão radicular da mandioca, causada por *Fusarium solani* (Bandyopadhyay et al., 2006; Silva, 2015; Silva et al., 2021). Silva (2015), ao comparar dez estirpes de *Trichoderma*, observou que *T. aureoviride* foi o mais eficiente produtor de quitinase. Em pesquisa similar, foi avaliado o efeito do biocarvão e do *T. aureoviride* no combate à podridão radicular da mandioca, onde expôs que o uso do *T. aureoviride* aumentou a atividade de enzimas do solo, dando maior resistência a mandioca contra o *F. solani* (Silva et al., 2021).

Trichoderma longibrachiatum demonstrou, em estudo recente, aumentar a tolerância de mudas de trigo diante estresse salino, além de serem resistentes ao *Fusarium pseudograminearum* (Boamah et al., 2021).

Isolados de *Trichoderma harzianum* interromperam a reprodução do nematoide *Meloidogyne javanica* e estimularam o desenvolvimento de tomateiros (Al-Hazmi e Tariqjaveed, 2016), planta de grande importância econômica e social no Brasil (Silva, 2020).

Essas espécies de *Trichoderma* também são usadas na composição de inúmeros produtos comerciais, como o agroderma, biofungicida que tem o *Trichoderma harzianum* como ingrediente ativo e é utilizado contra diversos patógenos em variadas culturas (Bettiol et al., 2019). O *Trichoderma longibrachiatum*, acompanhado pelo *T. harzianum* e pelo *Trichoderma viride*, no fungicida biológico 3 TAC, atuam contra tombamento, podridões radiculares, manchas foliares, entre outros em culturas de alface, uva, tomate, morango, maçã etc. (Bettiol et al., 2019).

Assim, o presente trabalho ressalta a importância de se estudar novas alternativas frente ao ataque de patógenos em diversos cultivos e da necessidade de conservação e criação de coleções de culturas para o avanço da ciência no Brasil e no mundo.

6 CONCLUSÕES

Neste estudo observamos produção de quitinase pelos isolados estudados, o que pode sugerir que essas três espécies *Trichoderma aureoviride*, *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma longibrachiatum* são boas produtoras de quitinase e podem servir como base para mais estudos de produção quitinolítica e contribuir com usos alternativos para a agricultura. Além disso, é notório que a conservação de fungos em coleções de culturas é de extrema importância para o desenvolvimento de estudos científicos.

REFERÊNCIAS

- ABREU, L. M.; PFENNING, L. H. O gênero *Trichoderma*. In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. **Trichoderma: uso na agricultura**. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2019. p. 163-179. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1117296/trichoderma-uso-na-agricultura>. Acesso em: 06 jan. 2023.
- AL-HAZMI, A. S.; TARIQJAVEED, M. Effects of diferente inoculum densities of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Meloidogyne javanica* on tomato. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Riyadh, v. 23, n. 02, p. 288-292, 2016. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/275366105_Effects_of_different_inoculum_densities_of_Trichoderma_harzianum_and_Trichoderma_viride_against_Meloidogyn_e_javanica_on_tomato. Acesso em: 27 mar. 2023.
- AOKI, Y.; HAGA, S.; SUZUKI, S. Direct antagonistic activity of chitinase produced by *Trichoderma* sp. SANA20 as biological control agent for grey mould caused by *Botrytis cinerea*. **Cogent Biology**, London, v. 06, n. 01, p. 01-11, 2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/23312025.2020.1747903?needAccess=true&role=button>. Acesso em: 30 mar. 2023.
- BALDONI, D. B. **Prospecção de fungos para produção de quitinases por fermentação em estado sólido**. 2016. 84 f. Tese (Pós-Graduação em Ciência do Solo) - Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/3378/BALDONI%2C%20DAIANA%20BORTOLUZZI.pdf>. Acesso em: 26 mar. 2023.
- BANDYOPADHYAY, R. et al. *Fusarium* species from the cassava root rot complex in West Africa. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, n. 06, p. 673-676, 2006. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-96-0673#:~:text=Fusarium%20species%20in%20the%20cassava%20rot%20complex.%20Fusarium,been%20reported%20as%20pathogens%20of%20cassava%20in%20Colombia>. Acesso em: 04 abr. 2023.
- BENÍTEZ, T. et al. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Berlin, v. 07, n. 04, p. 249-260, 2004. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/8065870_Biocontrol_mechanism_of_Trichoderma_strains. Acesso em: 19 mar. 2023.
- BETTIOL, W. et al. Produtos comerciais à base de *Trichoderma*. In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. **Trichoderma: uso na agricultura**. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2019. p. 163-179. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1117296/trichoderma-uso-na-agricultura>. Acesso em: 05 abr. 2023.

BINOD, P. et al. Evaluation of fungal culture filtrate containing chitinase as a biocontrol agent against *Helicoverpa armigera*. **Journal of Applied Microbiology**, Hoboken, v. 103, n. 05, p. 1845-1852, 2007. Disponível em: <https://academic.oup.com/jambio/article/103/5/1845/6719523?login=false>. Acesso em: 31 mar. 2023.

BOAMAH, S. et al. *Trichoderma longibrachiatum* (TG1) enhances wheat seedlings tolerance to salt stress and resistance to *Fusarium pseudograminearum*. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 12, p. 01-17, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.741231/full>. Acesso em: 27 mar. 2023.

BOARI, A. et al. Parasitic weed management by using strigolactones-degrading fungi. **Pest Management Science**, Hoboken, v. 72, n. 11, p. 2043-2047, 2016. Disponível em: [https://www.academia.edu/81445191/Parasitic weed management by using strigolactones degrading fungi](https://www.academia.edu/81445191/Parasitic_weed_management_by_using_strigolactones_degrading_fungi). Acesso em: 23 mar. 2023.

BODDY, L. Pathogens of autotrophs. In: Watkinson, S. C.; Money, N.; Boddy, L. (Eds.). **The Fungi**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 2015. p. 245-292. Disponível em: <https://sci-hub.se/10.1016/b978-0-12-382034-1.00008-6>. Acesso em: 30 mar. 2023.

BOMFIM, A. et al. Antagonistic activity and chitinolytic potential of endophytic fungi recovered from cacti growing in the Brazilian tropical dry forest. **Sydowia**, Vienna, v. 73, p. 197-208, 2021. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/348968529_Antagonistic_activity_and_chitinolytic_potential_of_endophytic_fungi_recovered_from_cacti_growing_in_the_Brazilian_tropical_dry_forest. Acesso em: 07 maio 2023.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A química dos agrotóxicos. **Química Nova na Escola**, São Paulo, v. 34, n. 01, p. 10-15, 2012. Disponível em: http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc34_1/03-QS-02-11.pdf. Acesso em: 20 jan. 2023.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. K. R. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 05, p. 529-537, 2000. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsp/a/bXXqRPG9W6nvSM4GXvwYWJG/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 23 jan. 2023.

CARRERO-CARRÓN, I. et al. Interactions between *Trichoderma harzianum* and defoliating *Verticillium dahliae* in resistant and susceptible wild olive clones. **Plant Pathology**, Hoboken, v. 67, n. 08, p. 1758-1767, 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/325577085_Interactions_between_Trichoderma_harzianum_and_defoliating_Verticillium_dahliae_in_resistant_and_susceptible_wild_olive_clones. Acesso em: 23 mar. 2023.

CHEN, L. et al. *Trichoderma harzianum* SQR-T037 rapidly degrades allelochemicals in rhizospheres of continuously cropped cucumbers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 89, n. 05, p. 1653-1663, 2011. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/47535552_Trichoderma_harzianum_SQR-

T037 rapidly degrades allelochemicals in rhizospheres of continuously cropped cucumbers. Acesso em: 23 mar. 2023.

DELBONE, C. A. C.; LANDO, R. L. Importância ecológica e evolutiva dos principais grupos de metabólitos secundários nas espécies vegetais. *In*: CONGRESSO DE EDUCAÇÃO DO NORTE PIONEIRO, 2010, Jacarezinho. **Anais [...]**. Jacarezinho, Paraná: UENP, CCHE e CLCA - Campus Jacarezinho, 2010. Disponível em: <https://pt.scribd.com/document/258925660/Importancia-Ecologica-e-Evolutiva-Dos-Metabolitos-Secundarios>. Acesso em: 29 mar. 2023.

DRUZHININA, I. S. et al. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. **Mycoscience**, Japan, v. 47, n. 02, p. 55-64, 2006. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/225545327_The_first_100_Trichoderma_species_characterized_by_molecular_data. Acesso em: 12 mar. 2023.

DRUZHININA, I. S. et al. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 09, n. 10, p. 749-759, 2011. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/51646644_Trichoderma_The_genomics_of_opportunistic_success. Acesso em: 17 mar. 2023.

FRANCISCO, M. R. **Seleção e identificação de *Trichoderma* spp. e potencial para produção de enzimas industriais**. 2016. 65 f. Dissertação (Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <https://tede.ufrrj.br/jspui/bitstream/jspui/1631/2/2016%20-%20Michele%20Rodrigues%20Francisco.pdf#:~:text=O%20objetivo%20deste%20estudo%20foi%20selecionar%20e%20identificar,tamb%C3%A9m%20foi%20avaliado%20a%20capacidade%20de%20produ%C3%A7%C3%A3o%20enzim%C3%A1tica.> Acesso em: 24 jan. 2023.

GIOVANINI, G. T. **Produção, liofilização, purificação e determinação de especificidade da peptidase isolada do fungo *Scopulariopsis koningii***. 2014. 26 f. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2014. Disponível em: https://teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde-30102014-144336/publico/Dissertacao_corrigida_Simplificada.pdf. Acesso em: 30 mar. 2023.

GUIMARÃES, A. M.; PAZ, I. C. P. **Elevagro**, 2022. *Trichoderma* e sua crise de identidade. Disponível em: <https://elevagro.com/conteudos/materiais-tecnicos/trichoderma-e-sua-crise-de-identidade#:~:text=Com%20o%20advento%20das%20an%C3%A1lises%20em%20n%C3%ADvel%20molecular,gerando%20uma%20%E2%80%9Ccrise%20de%20identidade%20do%20Trichoderma%E2%80%9D>. Acesso em: 12 mar. 2023.

HOYOS-CARVAJAL, L.; BISSETT, J. Biodiversity of *Trichoderma* in Neotropics. *In*: GRILLO, O. **The Dynamical Processes of Biodiversity – Case Studies of Evolution and Spatial Distribution**. 1. ed. London: IntechOpen, 2011. p. 303-320. Disponível em:

[https://www.researchgate.net/publication/221920569 Biodiversity of Trichoderma in Neotropics](https://www.researchgate.net/publication/221920569_Biodiversity_of_Trichoderma_in_Neotropics). Acesso em: 12 mar. 2023.

HSU, S. C.; LOCKWOOD, J. L. Powdered chitin agar as a selective médium for enumeration of actinomycetes in water and soil. **Applied Microbiology**, Basel, v. 29, n. 03, p. 422-426, 1975. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC186990/pdf/applmicro00021-0138.pdf>. Acesso em: 05 abr. 2023.

JAKLITSCH, W. M. European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. **Studies in Mycology**, Amsterdam, v. 63, p. 01-91, 2009. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0166061614600907?token=699DA7CE7A662E5AF3EBE86C12D6C1234D8C6F6868DF8C6401CC89172CA7A94888B22D4ED4A8A508E80DC67A1C592BE8&originRegion=us-east-1&originCreation=20230314130453>. Acesso em: 13 mar. 2023.

JOBIM, P. F. C. et al. Existe uma associação entre mortalidade por câncer e uso de agrotóxicos? Uma contribuição ao debate. **Ciência & Saúde Coletiva**, São Paulo, v. 15, n. 01, p. 277-288, 2010. Disponível em: <https://scielosp.org/pdf/csc/2010.v15n1/277-288/pt>. Acesso em: 22 jan. 2023.

KARTHIK, N. et al. Production, purification and properties of fungal chitinases – A review. **Indian Journal of Experimental Biology**, India, v. 52, n. 11, p. 1025-1035, 2014. Disponível em: [https://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/29743/1/IJEB%2052\(11\)%201025-1035.pdf](https://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/29743/1/IJEB%2052(11)%201025-1035.pdf). Acesso em: 27 mar. 2023.

KUBICEK, C. P. et al. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. **Genome Biology**, London, v. 12, n. 04, R40, 2011. Disponível em: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2011-12-4-r40>. Acesso em: 20 mar. 2023.

KUBICEK, C. P.; KOMON-ZELAZOWSKA, M.; DRUZHININA, I. S. Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B - Biomedicine & Biotechnology**, Zhejiang, v. 09, n. 10, p. 753-763, 2008. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/23301598 Fungal genus HypocreaTrichoderma From barcodes to biodiversity](https://www.researchgate.net/publication/23301598_Fungal_genus_HypocreaTrichoderma_From_barcodes_to_biodiversity). Acesso em: 11 mar. 2023.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995. Disponível em: <https://vdoc.pub/download/principios-de-bioquimica-de-lehninger-2bgf3mgbiglg>. Acesso em: 30 mar. 2023.

LIMA, L. H. C. et al. Purification of a chitinase from *Trichoderma* sp. and its action on *Sclerotium rolfii* and *Rhizoctonia solani* cell walls. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 43, p. 31-37, 1997. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jgam1955/43/1/43_1_31/pdf/-char/en. Acesso em: 31 mar. 2023.

LUCON, C. M. M. **Promoção de crescimento de plantas com o uso de *Trichoderma* spp.** 2009. Artigo em Hipertexto. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2009_1/Trichoderma/Index.htm. Acesso em: 29 mar. 2023.

MACHADO, D. F. M. et al. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 35, n. 01, p. 274-288, 2012. Disponível em: <https://revistas.rcaap.pt/rca/article/view/16182/13127>. Acesso em: 13 mar. 2023.

MANZAR, N. et al. *Trichoderma*: advent of versatile biocontrol agent, its secrets and insights into mechanism of biocontrol potential. **Sustainability**, Basel, v. 14, n. 19, p. 01-32, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2071-1050/14/19/12786/html>. Acesso em: 20 mar. 2023.

MARRA, R. et al. Application of *Trichoderma* strains and metabolites enhances soybean productivity and nutrient content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, D.C., v. 67, n. 07, p. 1814-1822, 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/330495362_Application_of_Trichoderma_S_trains_and_Metabolites_Enhances_Soybean_Productivity_and_Nutrient_Content. Acesso em: 06 fev. 2023.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. Introdução ao metabolismo. **Bioquímica básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 109-114. Disponível em: <https://pt.scribd.com/document/351860284/Bioquimica-Basica-Marzzoco-e-Torres-3-edicao-1-pdf>. Acesso em: 29 mar. 2023.

MASTOURI, F.; BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G. E. *Trichoderma harzianum* enhances antioxidant defense of tomato seedlings and resistance to water deficit. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 25, n. 09, p. 1264-1271, 2012. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/MPMI-09-11-0240>. Acesso em: 16 mar. 2023.

MELO, I. S. **Embrapa**, 2021. Metabólitos secundários. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/agricultura-e-meio-ambiente/manejo/recursos-geneticos/metabolitos-secundarios>. Acesso em: 29 mar. 2023.

MENDES, M. **Educa Mais Brasil**, 2019. Citoplasma. Disponível em: <https://www.educamaisbrasil.com.br/enem/biologia/citoplasma>. Acesso em: 06 abr. 2023.

MENDOZA-MENDOZA, A. et al. Molecular dialogue between *Trichoderma* and roots. Role of the fungal secreto-me. **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v. 32, n. 02, p. 62-85, 2018. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1749461317300738?token=CE00CDD521295EB87AEDDB06918C5D91E0811E28D76635A7A716C14EBB1660DFF778D2749BCF5849FC6476249992A9A3&originRegion=us-east-1&originCreation=20230403135705>. Acesso em: 23 mar. 2023.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, D.C., v. 31, n. 03, p. 426-429, 1959.

Disponível em:

<https://www.bing.com/search?q=Use+of+Dinitrosalicylic+Acid+Reagent+for+Determination+of+Reducing+Sugars&qsn&form=QBRE&sp=-1&lq=1&pq=use+of+dinitrosalicylic+acid+reagent+for+determination+of+reducing+sugars&sc=0-73&sk=&cvid=8B867B439087484BA28DC04E5ECE911D&ghsh=0&ghacc=0&ghpl=>

Acesso em: 05 abr. 2023.

MONTE, E.; BETTIOL, W.; HERMOSA, R. *Trichoderma* e seus mecanismos de ação para o controle de doenças de plantas. In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. **Trichoderma: uso na agricultura**. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2019. p. 181-199.

Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1117296/trichoderma-uso-na-agricultura>

Acesso em: 13 mar. 2023.

MORÁN-DIEZ, E. et al. The ThPG1 endopolygalacturonase is required for the *Trichoderma harzianum*-plant beneficial interaction. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 22, n. 08, p. 1021-1031, 2009. Disponível em:

<https://apsjournals.apsnet.org/doi/epdf/10.1094/MPMI-22-8-1021>. Acesso em: 23 mar. 2023.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: _____. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. 1. ed. São Paulo: Embrapa, 2009. p. 07-14. Disponível em:

https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/17182/1/livro_biocontrole.pdf.

Acesso em: 31 mar. 2023.

MOURA, C. et al. Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: avaliação do processo em escala piloto. **Vetor (FURG)**, v. 16, p. 37-45, 2006.

Disponível em: [https://repositorio.furg.br/bitstream/handle/1/4604/68-](https://repositorio.furg.br/bitstream/handle/1/4604/68-QUITINA%20E%20QUITOSANA%20PRODUZIDAS%20A%20PARTIR%20DE%20RES%20c3%8dDUOS%20DE%20CAMAR%20c3%83O%20E%20SIRI.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

[QUITINA%20E%20QUITOSANA%20PRODUZIDAS%20A%20PARTIR%20DE%20RES%20c3%8dDUOS%20DE%20CAMAR%20c3%83O%20E%20SIRI.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.furg.br/bitstream/handle/1/4604/68-QUITINA%20E%20QUITOSANA%20PRODUZIDAS%20A%20PARTIR%20DE%20RES%20c3%8dDUOS%20DE%20CAMAR%20c3%83O%20E%20SIRI.pdf?sequence=1&isAllowed=y). Acesso em: 23 mar. 2023.

MUKHERJEE, P. K.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C. M. Secondary metabolism in *Trichoderma* – a genomic perspective. **Microbiology**, London, v. 158, n. 01, p. 35-45, 2012. Disponível em:

https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/158/1/35_mic053629.pdf?expires=1679490157&id=id&accname=quest&checksum=2C6F43D44AF5FD5310023D309C6BBFC2. Acesso em: 06 fev. 2023.

NAHER, L. et al. *Trichoderma* spp.: a biocontrol agent for sustainable management of plant diseases. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 46, n. 04, p. 1489-1493, 2014. Disponível em: [https://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/46\(4\)/44.pdf](https://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/46(4)/44.pdf). Acesso em: 14 mar. 2023.

O'BRIEN, J.; WRIGHT, G. D. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, Amsterdam, v. 22, n. 04, p. 552-558, 2011. Disponível em:

<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0958166911000620?token=25246E23398B6A8E4F60C7688BE23E97A1AEC725D6446E0FB5A01E5A08CFCA11651828456D28C6DAC9F82BB262284098&originRegion=us-east-1&originCreation=20230401022710>. Acesso em: 29 mar. 2023.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 03, n. 04, p. 146-152, 2012. Disponível em: <https://todafruta.com.br/wp-content/uploads/2016/09/Metab%C3%B3litos-secund%C3%A1rios-ARTIGO.pdf>. Acesso em: 29 mar. 2023.

PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G. S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: PERES, F.; MOREIRA, J. C. (orgs.). **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 21-41. Disponível em: <https://static.scielo.org/scielobooks/sq3mt/pdf/peres-9788575413173.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2023.

RAMADA, M. H. S.; LOPES, F. A. C.; ULHOA, C. J. *Trichoderma*: metabólitos secundários. In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. **Trichoderma: uso na agricultura**. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2019. p. 201-218. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1117296/trichoderma-uso-na-agricultura>. Acesso em: 29 mar. 2023.

RATHORE, A. S.; GUPTA, R. D. Chitinases from bacteria to human: properties, applications, and future perspectives. **Enzyme Research**, London, v. 2015, n. 02, p. 01-08, 2015. Disponível em: <https://downloads.hindawi.com/archive/2015/791907.pdf>. Acesso em: 27 mar. 2023.

RIBEIRO, A. P. S. **Produção de quitinases por fermentação por *Trichoderma* sp.** 2000. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2000. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/Acervo/Detalhe/201167>. Acesso em: 23 jan. 2023.

RIBEIRO, D. H. B.; VIEIRA, E. **Avaliação do potencial de impacto dos agrotóxicos no meio ambiente**. 2010. Artigo em Hipertexto. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2010_2/agrotoxicos/. Acesso em: 22 jan. 2023.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, n. 02, p. 195-206, 2006. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/epdf/10.1094/PHYTO-96-0195>. Acesso em: 05 abr. 2023.

SANDHYA, C. et al. Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 44, n. 01, p. 49-58, 2004. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/8881852_Extracellular_chitinase_production_by_Trichoderma_harzianum_in_submerged_fermentation. Acesso em: 05 abr. 2023.

SANTOS, M. M. F. B. **Efeito de extratos de duas formas de *Lippia alba* sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.), isolado de *Citrus* sp.** 1996. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 1996. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11144/tde-20181127-160935/publico/SantosMarildaMariaFerrazBorgesDos.pdf>. Acesso em: 30 mar. 2023.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 87, n. 03, p. 787-799, 2010. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s00253-010-2632-1.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2023.

SHARAF, E. F. A potent chitinolytic activity of *Alternaria alternata* isolated from egyptian black sand. **Polish Journal of Microbiology**, Warsaw, v. 54, n. 02, p. 145-151, 2005. Disponível em: <http://www.pjmonline.org/wp-content/uploads/archive/vol5422005145.pdf>. Acesso em: 05 abr. 2023.

SILVA, J. A. T. **Produção de quitinase e antagonismo de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium solani* e *Scytilidium lignicola* e atividades enzimáticas antioxidantes em mandioca.** 2015. 67 f. Dissertação (Pós-Graduação em Produção Agrícola) - Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2015. Disponível em: <http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede2/bitstream/tede2/6572/2/Jose%20Aldo%20Teixeira%20da%20Silva.pdf>. Acesso em: 05 abr. 2023.

SILVA, J. S. A. et al. Biochar and *Trichoderma aureoviride* URM 5158 as alternatives for the management of cassava root rot. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 172, p. 01-05, 2022. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0929139321004765?token=E4D77CFAE2846C0B178D199CB08982E0C5D9481B57B6782029ABB08CEF9FFF2EA1CA9F0775D4C82151C79D3543D4862E&originRegion=us-east-1&originCreation=20230406192451>. Acesso em: 05 abr. 2023.

SILVA, M. L. **Análise cienciométrica da cultura do tomateiro no Brasil.** 2020. 27 f. Monografia (Bacharelado em Agronomia) - Centro Universitário de Anápolis, Universidade Evangélica de Goiás, 2020. Disponível em: <http://45.4.96.19/bitstream/aee/9514/1/Mayra%20Lobo%20da%20Silva.pdf>. Acesso em: 27 mar. 2023.

SOOD, M. *Trichoderma*: the "secrets" of a multitaled biocontrol agent. **Plants**, Basel, v. 09, n. 06, p. 01-25 (762), 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/746364>. Acesso em: 14 mar. 2023.

VASCONCELOS, Y. Agrotóxicos na berlinda. **Pesquisa FAPESP**, São Paulo, ano 19, n. 271, p. 20-27, 2018. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4983997/mod_resource/content/1/Vasconcelos_2018_Agrot%C3%B3xicos%20na%20berlinda.pdf. Acesso em: 20 jan. 2023.

VINALE, F. et al. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam v. 40, n. 01, p. 01-10, 2008. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0038071707002908?via%3Diuhub>. Acesso em: 20 mar. 2023.

WAGHMARE, S. R.; GHOSH, J. S. Chitobiose production by using a novel thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* strain JS isolated from a mushroom bed. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 345, n. 18, p. 2630-2635, 2010. Disponível em:

<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S000862151000409X?token=E83850BBABE7DB66A930D8F6C1EB10B3717D1710075517827ADFFF56946A9EF62AE5A4271A1A93576B5C1D9E6331FA0E&originRegion=us-east-1&originCreation=20230406181900>. Acesso em: 05 abr. 2023.

WOO, S. L. et al. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, n. 02, p. 181-185, 2006. Disponível em:

<https://apsjournals.apsnet.org/doi/epdf/10.1094/PHYTO-96-0181>. Acesso em: 27 mar. 2023.

ZAMPIERI, D.; RIBEIRO, R. T. S. Avaliação qualitativa da secreção de enzimas hidrolíticas por fungos endofíticos isolados do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) e o controle biológico de *Crinipellis pernicioso*. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2005, Porto Alegre. **Anais [...]**. Porto Alegre, Rio Grande do Sul: UFRGS, 2005. Disponível em:

https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/59737/Resumo_200501378.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 27 mar. 2023.

ZHANG, S. et al. The parasitic and lethal effects of *Trichoderma longibrachiatum* against *Heterodera avenae*. **Biological Control**, Amsterdam, v. 72, p. 01-08, 2014. Disponível em:

<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S104996441400022X?token=582AD070CB89CF98402131D67D4E4C20CD1239F422035AC993450FF70FF4AF6DF1AE43AE1E7255CA3588189595324EA8&originRegion=us-east-1&originCreation=20230403172235>. Acesso em: 31 mar. 2023.