

UFRRJ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

DISSERTAÇÃO

**SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *Trichoderma spp.* E POTENCIAL
PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS INDUSTRIAIS**

MICHELE RODRIGUES FRANCISCO

2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *Trichoderma spp.* E POTENCIAL
PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS INDUSTRIAIS**

MICHELE RODRIGUES FRANCISCO

Sob a Orientação do Professor
Marcelo Elias Fraga

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

Seropédica, RJ
Maio de 2016

579.5

F819s

Francisco, Michele Rodrigues, 1981-

T

Seleção e identificação de *Trichoderma* spp. e potencial para produção de enzimas industriais / Michele Rodrigues Francisco. - 2016.

53 f.: il.

Orientador: Marcelo Elias Fraga.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2016.

Bibliografia: f. 38-51.

1. Fungos - Biotecnologia - Teses. 2. *Trichoderma* - Identificação - Teses. 3. *Trichoderma* - Morfologia - Teses. 4. Enzimas de fungos - Aplicações industriais - Teses. 5. Tecnologia de alimentos - Teses. I. Fraga, Marcelo Elias, 1967- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

MICHELE RODRIGUES FRANCISCO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia em Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 20/05/2016

Marcelo Elias Fraga. Título (Dr.) UFRRJ
(Orientador)

Rômulo Cardoso Valadão. (Dr.) UFRRJ

Otniel Freitas Silva. (Dr.) EMBRAPA - CTAA

DEDICATÓRIA

Às pessoas mais importantes, razão da minha existência,

Aos meus pais Sônia Regina Rodrigues Francisco e José Wilson Francisco (In memoriam), por toda doação, amor e ensinamentos.

*Ao meu esposo, Clemente Francisco Souza Neto pela paciência,
companheirismo.*

Às minhas irmãs Daniele Rodrigues Francisco e Fernanda da Silva Novaes, pelo apoio e carinho em todos os momentos.

*À minha afilhada Elís da Silva Nascimento, por ser a minha alegria
sempre, principalmente nos momentos difíceis.*

*Ao milagre de Deus que cresce em meu ventre, e que me fortalece a
continuar.*

*Vocês estiveram a todo instante ao meu lado, sempre com muito amor,
me incentivando, fortalecendo e confortando.*

Dedico.

“Por mais importante que seja o equipamento em pesquisas avançadas, não é o equipamento mais primoroso e tão pouco os computadores mais complexos que em si conduzem as pesquisas, mas sim o espírito e o gênio humanos”.

Prof. Leopold Hartman

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo seu amor sem limites, por ser minha Fortaleza e por toda bênção sobre minha vida.

À minha mãe, irmãs, esposo, afilhada, por estar em todos os momentos ao meu lado me fortalecendo com palavras de amor, conforto, sempre com muita paciência e compreensão.

Ao meu pai que mesmo estando em outro plano espiritual esteve ao meu lado me abençoando.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e o Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos por tornar possível a realização de mais uma etapa profissional importante em minha vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro à pesquisa, através da concessão da bolsa.

Ao meu orientador Professor Marcelo Elias Fraga, pela orientação, paciência e sugestões no decorrer desde projeto.

À Professora Glória Maria Direito, pelo carinho, atenção e ensinamentos.

À Professora Tatiana Saldanha, pela contribuição, atenção.

Ao técnico do Laboratório de Micologia/ UFRRJ, Luiz Jorge pelo auxílio e apoio.

Ao Professor Ricardo Harakava, do Laboratório de Fitopatologia e Biologia Molecular do Instituto Biológico, São Paulo. Pela ajuda com a realização das análises moleculares.

Às colegas Alejandra Esparza e Julie G. Chacon, pela amizade e apoio nas análises moleculares.

Ao colega Felipe Trombete, pelo incentivo, apoio, carinho e amizade.

Aos funcionários e professores do Programa de Pós - Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, por todo apoio, dedicação e disponibilidade.

Aos meus familiares e amigos que mesmo à distância compreenderam os momentos difíceis, e a todos que colaboraram para a realização deste projeto de forma direta ou indireta.

RESUMO

FRANCISCO, Michele Rodrigues. **Seleção e Identificação de *Trichoderma spp.* E Potencial para Produção de Enzimas Industriais.** 2016. 53p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Os *Trichoderma spp.* não são fungos patogênicos e se desenvolvem em diversificados substratos e condições ambientais. Sua identificação baseada apenas em características morfológicas é considerada complexa, por conta da diversidade genética das espécies. Portanto, a taxonomia do gênero *Trichoderma* é realizada com o auxílio de outras análises, tais como bioquímicas e moleculares. Algumas espécies são capazes de produzir elevadas quantidades de enzimas extracelulares envolvidas na hidrólise de polissacarídeos, sendo assim considerados fungos com alto potencial na produção de enzimas hidrolíticas. O objetivo deste estudo foi selecionar e identificar as espécies do gênero *Trichoderma spp.* e avaliar a produção de enzimas industriais destes isolados. Foram identificados 58 isolados de fungos *Trichoderma spp.* de solo e plantas por análise morfológica, molecular e também foi avaliado a capacidade de produção enzimática. A Tecnologia enzimática é uma área promissora dentro das novas tecnologias para síntese de compostos que possuem alto valor agregado, onde os processos industriais biocatalisados apresentam menor impacto ambiental, menor custo de energia, pois as enzimas são substâncias biodegradáveis e possuem especificidade que minimizam os efeitos indesejáveis. Neste trabalho, foi utilizado meio de cultura BDA para desenvolvimento dos fungos. A identificação morfológica foi realizada com auxílio da chave de identificação de acordo com Samuels et al. (2015) e molecular, realizada através da extração de DNA do micélio dos fungos, de acordo com protocolo CTAB. Para as análises enzimáticas, foram realizados ensaios qualitativos, utilizando meio de cultura sólido específico para avaliar a produção de enzimas hidrolíticas: Onde os meios de cultura continham como substrato para desenvolvimento e produção enzimática dos isolados de *Trichoderma spp.* leite desnatado para produção de peptidase; amido solúvel para produção de amilase, carboximetilcelulose para produção de celulase, pectina cítrica para produção de pectinases e extrato de levedura, dextrose, sulfato ferroso, amônio, magnésio, manganês e cloreto potássio para produção de fitase. De acordo com os resultados, a análise morfológica identificou 4 espécies, tais como: *T. atroviride*, *T. asperelloide*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, estas espécies foram confirmadas por análise molecular. Já com relação ao potencial enzimático, o resultado foi negativo para a atividade das enzimas peptidase, celulase e pectinase e positivo para amilase, e para a atividade da enzima fitase, somente um isolado apresentou resultado positivo, este foi identificado de acordo com análise morfológica como sendo da espécie *T. longibrachiatum*.

Palavras-chave: Fungos filamentosos, Biotecnologia, Identificação morfológica, Identificação molecular, Produção de enzimas.

ABSTRACT

FRANCISCO, Michele Rodrigues. **Selection and identification of *Trichoderma* spp. And Potential for Industrial Enzymes production.** 2016. 53p. Dissertation (Master in Food Science and Technology) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Trichoderma spp. They are not pathogenic fungi and develop in substrates and diverse environmental conditions. Identification based only on morphological characteristics is considered complex, due to the genetic diversity of the species. Therefore, the taxonomy of the genus Trichoderma is performed with the aid of other analyzes such as biochemical and molecular changes. Some species are capable of producing high amounts of extracellular enzymes involved in the hydrolysis of polysaccharides are thus considered fungi with high potential in the production of hydrolytic enzymes. The aim of this study was to select and identify the species of the genus *Trichoderma* spp. And evaluate the production of industrial enzymes these isolates. They identified 58 isolates of *Trichoderma* spp. fungi. soil and plants by morphological and molecular analysis and was also evaluated the enzymatic production capacity. Enzyme technology is a promising area in new technologies for synthesis of compounds with high added value, where biocatalisados industrial processes have a lower environmental impact, lower energy cost, because the enzymes are biodegradable substances and have specificity to minimize the undesirable effects. In this work, we used PDA culture medium for development of fungi. Morphological identification is achieved using the identification key according to Samuels et al. (2015) Molecular and held by DNA extraction from the mycelium of fungi in accordance with CTAB protocol. For enzyme analysis, qualitative assays were performed, used specific means of solid culture to evaluate the production of hydrolytic enzymes: Where the culture media containing as a substrate for development and enzyme production of *Trichoderma* spp. skimmed milk production peptidase; soluble starch for the production of amylase, cellulase production carboxymethylcellulose, citrus pectin for the production of pectinase and yeast extract, dextrose, ferrous sulfate, ammonium, magnesium, manganese and potassium chloride for the production of phytase. According to the results, the morphological analysis identified 4 species such as *T. atroviride*, *T. asperelloide*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, these species were verified by molecular analysis. In relation to the enzyme potential, the result was negative for the activity of peptidase enzymes, cellulase and pectinase and positive for amylase, and the activity of the enzyme phytase, only an isolated was positive, this was identified according to morphological analysis as It is the species *T. longibrachiatum*.

Keywords: filamentous fungi, Biotechnology, morphological identification, molecular identification, enzyme production.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo de vida assexuada do fungo *Trichoderma*. 6
- Figura 2.** Características macroscópicas das colônias dos isolados de *Trichoderma*, verso e reverso em BDA, após 7 dias de crescimento à 25 °C: Grupo I (A-B); Grupo II (C-D); Grupo III (E-F); Grupo IV (G-H); Grupo V (I-J); Grupo VI (K-L); Grupo VII (M-N); Grupo VIII (O-P); Grupo IX (Q-R); Grupo X (S-T); Grupo XI (U-V); Grupo XII (X-Z). 24 e 25
- Figura 3.** Produtos da amplificação de DNA dos isolados de *Trichoderma* com iniciadores ITS1 e ITS4. M = Marcador de peso molecular 1KbPlus DNA Ladder (Invitrogen). 1,2= isolados de *T. atroviride*; 3= *T. asperelloide*; 4= *T. longibrachiatum*; 5,6= *T. harzianum*. C = Controle Negativo. pb (Pares de base). 29
- Figura 4.** Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança, mostrando a relação entre os onze isolados de *Trichoderma spp.* obtidos de solo e plantas, com espécies de *Trichoderma spp.* depositadas no GenBank-NCBI. As sequências utilizadas são do gene alfa elongase (TEF). Número de acesso das sequências no GenbanK consta entre parêntese e ao lado do nome dos isolados. Os valores para 1.000 repetições estão indicados junto aos ramos da árvore. Barra de escala = 0,02 substituições por posição. 30
- Figura 5.** Teste qualitativo de produção da enzima peptidase. Sem formação do halo de degradação pelos isolados T. 2 (A- verso e reverso) e T. 5 (B- verso e reverso). 31
- Figura 6.** Teste qualitativo de produção da enzima amilase. Com formação do halo de degradação pelos isolados T. 37 (A- reverso) e T.30 (B-reverso). 32
- Figura 7.** Teste qualitativo de produção da enzima celulase. Sem a formação do halo de degradação pelo isolado T. 5 (A- verso e reverso); e o pouco desenvolvimento no meio de cultura dos isolados T. 14 (B) e T. 3 (C). 33
- Figura 8.** Teste qualitativo de produção da enzima pectinase e pouco desenvolvimento no meio de cultura. Sem a formação do halo de degradação pelo isolado T. 5 (A- verso e reverso); T. 10 (B- verso e reverso). 34
- Figura 9.** Teste qualitativo de produção da enzima fitase. Com a formação do halo de degradação pelo isolado T. 34 (A- verso e reverso); Sem a formação do halo de degradação pelo isolado T. 19 (B- verso e reverso). 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Enzimas comerciais obtidas a partir de fungos.	12
Tabela 2.	Organização dos 58 isolados de fungos <i>Trichoderma spp.</i> onde, T. representa <i>Trichoderma</i> .	21
Tabela 3.	Características macroscópicas dos isolados de <i>Trichoderma</i> .	23
Tabela 4.	Características microscópicas dos isolados de <i>Trichoderma spp.</i> e médias das dimensões das estruturas em µm.	25
Tabela 5.	Comparação das dimensões das estruturas encontradas segundo autores estudados.	27
Tabela 6.	Representantes dos isolados de <i>Trichoderma spp.</i> para análise molecular.	28
Tabela 7.	Fungos representantes de cada grupo e seus correspondentes na análise molecular.	30

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	2
2.1	Objetivo Geral	2
2.2	Objetivos Específicos	2
3	REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1	Fungos	3
3.1.1	Características gerais	3
3.1.2	Biologia dos fungos filamentosos	3
3.1.3	Biomassa fúngica	4
3.1.4	Aplicações dos produtos de biomassas fúngicas	5
3.1.5	Gênero <i>Trichoderma spp.</i>	5
3.2	Identificação dos Fungos	8
3.2.1	Critérios morfológicos	8
3.2.2	Critérios moleculares	8
3.3	Enzimas	9
3.3.1	Enzimas produzidas por fungos	11
3.3.2	Enzimas de importância industrial	13
3.3.2.1	Amilase	13
3.3.2.2	Celulase	13
3.3.2.3	Peptidase (protease)	14
3.3.2.4	Pectinase	15
3.3.2.5	Fitase	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1	Isolados, Reativação e Manutenção das Espécies	18
4.2	Análise Morfológica	18
4.2.1	Análise molecular	18
4.2.1.1	Extração de DNA	19
4.2.1.2	Reação em cadeia de polimerase (PCR)	19
4.2.1.3	Sequenciamento dos fragmentos amplificados	19
4.2.1.4	Análise filogenética (árvore)	20

4.3	Avaliação do Perfil Enzimático	20
4.3.1	Detecção qualitativa das enzimas produzidas: peptidase, amilase, celulase, pectinase e fitase	20
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1	Identificação Morfológica	21
5.1.1	Caracterização morfológica (macro e micromorfológica)	21
5.2	Identificação Molecular	28
5.2.1	Extração do DNA de <i>Trichoderma spp.</i> e amplificação da região ITS do DNA através de PCR	28
5.2.2	Sequenciamento dos fragmentos amplificados	29
5.3	Análise: Peptidase (Protease).	30
5.4	Análise: Amilase	32
5.5	Análise: Celulase	33
5.6	Análise: Pectinase.....	34
5.7	Análise: Fitase	35
6	CONCLUSÃO	37
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
	ANEXOS	52

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui a mais rica biota continental do planeta, com cerca de 15 a 20% da biota mundial, abrange os seis importantes biomas (IBGE, 2015). Contudo, os micro-organismos, apresentam sua importância tanto para o equilíbrio destes ecossistemas, como para os diversos processos industriais, pois são capazes de produzir metabólitos interessantes que são muito utilizados nestes processos.

Atualmente, com o desenvolvimento tecnológico mundial, os processos biotecnológicos têm despertado interesse de pesquisadores e indústrias por conta das questões econômicas e operacionais envolvidas neste processo que lhes conferem vantagens em relação aos processos químicos convencionais utilizados. Esses processos possibilitam a variedade de produção de metabólitos de alto valor agregado.

Graças à evolução da biotecnologia, hoje os fungos e outros micro-organismos são de grande importância para as indústrias, pois são de fácil manipulação e controle a nível laboratorial, além de ser uma alternativa viável e interessante para produção de enzimas.

Sendo assim, a tecnologia enzimática oferece grandes vantagens na execução de processos tecnologicamente limpo, onde as enzimas hidrolíticas produzidas por diversos micro-organismos potencializam sua aplicação em distintos setores industriais, como por exemplo, nas indústrias alimentícias que utilizam os fungos na produção de produtos fermentados, como pães e vinhos, produção de bebidas alcoólicas, etc. As amilases, celulases, peptidases, pectinases e fitases são exemplo de enzimas muito utilizadas por diversos setores indústrias. Já nas indústrias farmacêuticas, as enzimas extraídas dos fungos contribuem na produção de antibióticos e na têxtil são usadas na produção de detergentes com função de degradar compostos proteináceos, dentre outras (PASHA et al., 2013).

Alguns fungos produtores de enzimas são reconhecidos pela FDA (United States Food and Drug Administration) e seus produtos podem ser consumidos com segurança, sem riscos à saúde humana, pois geralmente são considerados como seguros, ou seja, GRAS (Generally Recognized as Safe), por apresentarem baixa toxicidade.

Neste contexto, o gênero *Trichoderma* que foi descrito há mais de 200 anos por Person (1794) (SAMUELS, 2006a), são classificados como fungos filamentosos e cosmopolitas colonizadores do solo, onde possui diversas aplicações biotecnológicas por serem capazes de sintetizar enzimas hidrolíticas utilizadas em segmentos industriais, como por exemplo, as amilases nas indústrias de alimentos, têxtil, farmacêutica, as celulases utilizadas em indústrias de papel, gestão de resíduos, bebidas e alimentos, as peptidases utilizadas em amaciamento de carnes, clarificação de cervejas, as pectinases utilizadas em clarificação de sucos de frutas e alimentos processados e fitases utilizadas em rações de animais para melhorar a digestão de fósforo, cálcio, sódio, cobre, aminoácidos e proteínas (SOARES, 2010; PASHA et al., 2013).

A identificação das espécies de *Trichoderma* é baseada na morfologia, como o aspecto, cor, diâmetro e crescimento da colônia, diâmetro e forma dos conídios e conidióforos.

Devido à homoplasia encontrada nas espécies de *Trichoderma spp.* a identificação baseada somente nas características morfológicas não é suficiente, por isto estudos apontam a importância de se combinar diferentes instrumentos de identificação, como por exemplo, associá-las com a identificação bioquímica e molecular (PCR, sequenciamento de DNA).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar e selecionar espécies do gênero *Trichoderma* com capacidade de produção enzimática para fins industriais.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Identificar espécies de *Trichoderma* por morfologia clássica (macromorfológica, micromorfológica);
- b) Identificar espécies de *Trichoderma* por técnica molecular;
- c) Selecionar espécies de *Trichoderma* de interesse biotecnológico potencialmente produtoras de enzimas hidrolíticas: amilase, celulase, peptidase, pectinase e fitase.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Fungos

3.1.1 Características gerais

O estudo dos fungos é uma área da ciência, denominada de micologia (do grego *mykes*: 'Cogumelo-fungo'; *logos*: 'estudo'), estes vêm sendo estudado também pelos seus benefícios, tendo sua importância na decomposição da matéria vegetal morta fazendo a reciclagem de elementos vitais para a cadeia alimentar. Tais micro-organismos participam de interações com outros organismos, são utilizados pelos seres humanos para alimentação, na produção de medicamentos. São quimioheterotróficos, utilizam substâncias orgânicas como fontes de energia e carbono, aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, sendo alguns anaeróbicos. Os fungos possuem um sistema enzimático que é utilizado para decompor substâncias orgânicas fazendo com que ataquem uma variedade extensa de material (papel, madeira, tecidos, alimentos), algumas espécies são capazes de produzir toxinas (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

Economicamente os fungos estão relacionados comercialmente pela produção de antibióticos nas indústrias farmacêuticas, na produção de alimentos, como queijos, pães, vinhos, etc. pelas indústrias alimentícias e atualmente vêm conquistando espaço nas indústrias de biotecnologia em processos fermentativos (como produção de queijos, iogurtes, e outros) e pela produção de enzimas, com destaque para as celulases (ABREU; ROVIDA; PAPHILE, 2015).

3.1.2 Biologia dos fungos filamentosos

Os fungos filamentosos são multicelulares eucariotos típicos, aclorofilados que produzem esporos, secretam enzimas digestivas no substrato onde estão se desenvolvendo para hidrolisar as moléculas grandes em moléculas menores que possam ser absorvidas por suas células fúngicas, de forma que a nutrição acontece por absorção. As enzimas secretadas na maioria das vezes são responsáveis pela decomposição de restos animais e de plantas, sendo assim é possível à reciclagem de elementos químicos (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996), além de participarem dos ciclos naturais como, na reciclagem do carbono e outros elementos (MENDONZA, 2009).

A maioria das espécies dos fungos filamentosos possui reprodução assexuada por meio de fissão binária, fragmentação ou pela formação de conídios que são formados pelas células conidiogênicas que estão no ápice das hifas modificadas, denominadas de conidióforos que produzem os esporos (conídios) externamente. É conhecida como anamorfos uma mesma espécie de fungo que são capazes de produzir um ou mais tipos de esporos na fase assexuada (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996).

A parede celular dos fungos é composta por um polissacarídeo chamado de quitina. Produzem esporos que são dispersos pelo vento ou água ou ainda podem ser transportados por insetos, artrópodes durante seus ciclos de vida. O principal polissacarídeo de reserva é o glicogênio, mas em alguns grupos a substância de reserva também pode ser os lipídeos (RAVEN; EVERET; EICHHORN, 2007).

Essencialmente os fungos são de solo e de plantas, sendo a maioria, filamentosos. Microscopicamente, observam-se nos fungos filamentosos, estruturas conhecidas como hifas que são tubulares, ramificadas, de crescimento apical, hialinas e que podem ser cenocíticas (não possuem septos), onde os tubos são contínuos sem divisões transversais que contém massa citoplasmática com centenas de núcleos ou septadas que apresentam

paredes transversais que são os septos delimitando compartimentos celulares com um ou mais núcleos (RAVEN; EVERET; EICHHORN, 2007).

O crescimento das hifas ocorre pelo alongamento das extremidades. Quando um fragmento da hifa é rompido, pode ocorrer deste se alongar e dá origem a uma nova hifa, a partir disto haverá o desenvolvimento do fungo. É chamada de hifa vegetativa a parte que absorve nutriente e de hifa reprodutiva ou aérea a porção envolvida com a reprodução. Se as condições são favoráveis, as hifas se desenvolvem, formando uma massa filamentosa que é visível a olho nu que são os micélios dos fungos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Portanto, os fungos filamentosos vêm despertando atenção de pesquisadores por serem capazes de produzir compostos bioativos de interesse biotecnológico e por apresentarem crescimento rápido e baixo custo de cultivo, viabilizando cultivos em condições conhecidas e controladas em laboratórios (SIMÕES; TAUK-TORNISIELO, 2005). No entanto, buscas por enzimas eficientes que atuassem na degradação da biomassa e também de micro-organismos que são capazes de produzir estas enzimas levaram ao isolamento de fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* (YODER et al., 2008).

O gênero *Trichoderma* são fungos filamentosos, habitantes do solo juntamente com outros fungos, como *Neurospora*, *Penicillium* e *Aspergillus*, mesofílicos (30 °C), considerado um dos gêneros de fungos filamentosos mais estudados por apresentarem um elevado potencial de aplicação industrial e biotecnológico (SAMUELS, 1996).

Fungos deste gênero são capazes de produzir enzimas extracelulares (MELO; COSTA, 2005) e são muito estudados também pela produção potencial de celulases (PERES; MELO 1995) e outras enzimas hidrolíticas (KUBICEK, 1992).

As espécies de fungos deste gênero são encontradas em diferentes tipos de solos e raízes de plantas, participando da decomposição de matéria orgânica e atuando na degradação de resíduos tóxicos. É um fungo não patogênico para indivíduos saudáveis e possui diversas aplicações no setor industrial e na biotecnologia agrícola (HARMAN et al., 2012).

3.1.3 Biomassa fúngica

Alguns fatores como as fontes de carbono e nitrogênio, temperatura, pH, dentre outros, influenciam na síntese de compostos, que quando controlados podem favorecer maior quantidade de um determinado produto na biomassa do fungo (RUEGGER, 2001).

Os fungos desempenham importantes funções nos ciclos biogeoquímicos do carbono, fósforo e nitrogênio em ambiente terrestre (BOSWELL et al., 2003).

Existem diversidades de fungos e para realizar a quantificação de seu crescimento existem diversos métodos que dependerá do objetivo da medição e da utilização da técnica disponível, onde um único procedimento não é aplicável para todas as situações. Os métodos mais utilizados são contagem do número de células, contagem de células totais, contagem de células viáveis, contador coulter, medida da biomassa (método direto e indireto) e a medida do crescimento hifal e colonial (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

Aplicação de processos biotecnológicos que utilizam as enzimas é uma alternativa interessante e mais promissora para substituir as metodologias convencionais. Todavia, as enzimas já são utilizadas atualmente em diversos segmentos industriais em vários processos de produção como, por exemplo, produção de tecidos, detergentes, papel, couro, cosméticos, alimentos, biocombustível e outros. (JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013).

As enzimas, portanto têm sido consideradas as principais representantes de processos biotecnológicos, sendo produzidas comercialmente na maioria dos processos

por micro-organismos, por apresentarem diversidade, facilidade, controle operacional e maior rendimento quando comparados aos processos extractivos que utilizam tecidos animais e vegetais (CHANDRA et al., 2010).

3.1.4 Aplicações dos produtos de biomassas fúngicas

Atualmente, pesquisas têm sido desenvolvidas no sentido de isolar e identificar quimicamente os produtos produzidos por micro-organismos. Os fungos em especial despertaram grande interesse em diversos setores industriais, devido à produção de substâncias de alto valor agregado que são utilizadas em indústrias farmacêuticas, química e alimentícias na produção de cervejas, vinhos, queijos, vitaminas, entre outros (TAI; STEPHANOPOULOS, 2013).

As Indústrias de alimentos vêm utilizando-se também dos biomateriais no revestimento de alimentos visando à retenção de sabores, melhoria da aparência, em preparação de filmes e fibras, como agentes emulsificantes, espessantes e outros.

A biomassa residual resultante de processos fermentativos vem sendo pesquisada para isolar seus constituintes, como por exemplo, os lipídeos, entre outros, uma vez que estes compostos contêm propriedades específicas e de alto valor agregado, podendo ser usados em suplementação alimentar (BORGES; COSTA; DRUZIAN, 2014).

A busca por novas técnicas e metodologias que reduzam à utilização de agrotóxicos também são importantes e essenciais para que tenhamos um ambiente mais equilibrado e menos prejudicial à vida de forma geral, sendo assim estudos com enzimas fúngicas que tenham um potencial para aplicações ambientais, apresentam ser uma alternativa bastante promissora, por serem de origem natural, não-tóxica, pela facilidade no cultivo dos fungos e a extração das enzimas por eles produzidas tem despertado o interesse de pesquisadores sobre a sua aplicabilidade (WIDSTEN; KANDELBAUER, 2008).

Gradativamente a biotecnologia está evoluindo em vários segmentos da atividade industrial, apresentando ser uma forma de produção econômica e segura. Atualmente vêm se tornando uma alternativa atraente e com elevado potencial na solução de problemas de alimentação, saúde, energia e contaminações ambientais, que ao longo de anos se tornam mais complexas. Portanto, processos que envolvam métodos biotecnológicos que apresentem o menor impacto e danos ao meio ambiente, assim como a redução de subprodutos indesejáveis despertam o interesse para novas pesquisas. Mundialmente as enzimas são utilizadas para a produção de bebidas, como a cerveja, vinho e produtos como o pão, queijo, produtos cárneos e também na produção do couro, papel e detergentes biodegradável. Neste contexto, as enzimas possuem infinitas aplicabilidades nas áreas petroquímicas, químicas, alimentícias, farmacêuticas, entre outras (SAID; PIETRO, 2004).

3.1.5 Gênero *Trichoderma spp.*

O gênero *Trichoderma spp.* é classificado como um fungo mitospórico, pertencendo ao filo Ascomycota e ordem Hypocreales. São de vida livre e a reprodução ocorre de forma assexuada, encontrado em solos de regiões tropicais e temperado (HARMAN et al., 2004).

A partir de 1969 um maior número de espécies foi agregado a este gênero, chegando a cerca de 83 taxons (espécies, formas e variedades), onde está incluído o *Trichoderma spp.* e *Hypocrea* (teleomórfica). As espécies pertencentes ao gênero *Trichoderma* possuem micélio que apresentam hifas hialinas com muitas ramificações e com parede lisa, onde no meio de cultura, inicialmente as colônias formadas apresentam

superfície lisa e quase translúcida, que no decorrer do tempo tornam-se flocosas e compactas (ETHUR, 2006; MARTINS, 2010).

A Figura 1 mostra de forma exemplificada o ciclo de vida assexuada do fungo *Trichoderma*.

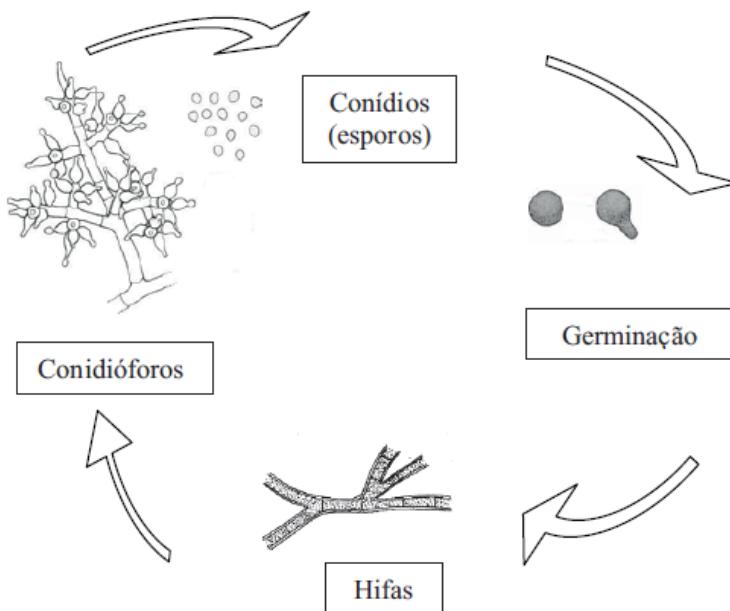


Figura 1. Ciclo de vida assexuada do fungo *Trichoderma*.

Fonte: MACHADO et al., 2012.

Este é um gênero de fungo filamentoso, cosmopolita que possui aplicações biotecnológicas, por conta das suas características em colonizar variados tipos de substratos em condições ambientais adversas e também por possuir capacidade em secretar uma extensa variedade de enzimas hidrolíticas como por exemplo as celulases, quinases, glucanases, proteases e outras e ainda por produzir metabólitos secundários como pironas e terpenos (MUKHERJEE et al., 2013). São fungos fáceis de serem isolados e mantidos em meios de culturas, onde rapidamente produzem grande quantidade de conídios verdes ou brancos a partir de células conidiogênicas que se localizam nas extremidades dos conidióforos (SIDDIQUEE et al., 2011).

Os conidióforos apresentam formato cônico ou piramidal, ramificados e geralmente formados em anéis sazonais, produzindo zonas concêntricas. Já os conídios, possuem formatos ovóide, elipsóide, subgloboso ou elíptico-cilíndrico, com parede lisa, estriada ou rugosa, variando de acordo com a espécie (GAMS; BISSET, 1998). Tais conídios são produzidos em série e acumulados na extremidade das fiáldes. Dependendo das espécies de *Trichoderma spp.* os conídios podem medir de 3 a 5 µm de diâmetro (WEEDEN; SHELTON; HOFFMAN, 2008).

A fiáldes possui formato que pode variar de ampuliforme a lageniforme, geralmente com centro dilatado e ápice afunilado, dispostas em verticilos terminais nas ramificações do conidióforo (GAMS; BISSET, 1998).

Os clámidósporos são os esporos assexuais que estão presentes na maioria das espécies, em posição terminal ou entremeados nas hifas (MELO, 1991; HOWELL, 2003).

Trichoderma spp. podem produzir variados pigmentos de coloração amarelo-esverdeado a avermelhado e são grandes produtores de metabólitos secundários, alguns dos quais têm significante importância clínica e biotecnológica (SCHUSTER; SCHMOLL, 2010; MUKHERJEE et al., 2013). São produtores de enzimas importantes

na degradação e lise da parede celular de fungos patogênicos, tais como exoglucanases e endoglucanases, celobiase e quitinase (BOMFIM et al., 2010).

Já foi observado o crescimento de várias espécies em resíduos de culturas entre 5 e 25 °C. A maioria das linhagens de *Trichoderma* não tolera o estresse hídrico, sendo assim há o interesse na obtenção de isolados resistentes as condições secas (KREDICS et al., 2003).

As enzimas produzidas por estes fungos que degradam polissacarídeos como a celulase é de grande interesse e importância também nas indústrias de biocombustíveis, pois estas enzimas têm um alto potencial de decompor a celulose que estão presentes em bagaço de cana-de-açúcar e na madeira em moléculas de carboidratos menos complexas (BASSO; GALLO; BASSO, 2010). Neste contexto, enzimas que degradam a celulose também são importantes para o meio ambiente já que realizam a decomposição de restos de culturas atuando no ciclo da matéria orgânica do solo (LO; HSIE; PENG, 2011).

Existem algumas espécies de *Trichoderma spp.* que estão sendo utilizadas como controle biológico eficaz e diversas cepas estão sendo registradas comercialmente na proteção de plantas, dentre estas espécies as mais utilizadas são *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. virens*, *T. hamatum*, *T. asperellum*, *T. asperelloides* e *T. gamsii* (LORITO et al., 2010). A espécie *T. reesei* sintetizam enzimas utilizadas em biotecnologias (KUBICEK, 2013).

Já se sabe que estes fungos desempenham muito bem a função de antagonistas contra patógenos de plantas e são muito utilizados para esta função (HARMAN et al., 2004).

Cerca de 90% dos fungos utilizados como antagonista para biocontrole de fungos fitopatogênicos é pertencente aos diferentes tipos de isolados do gênero *Trichoderma* (KUNIEDA-ALONSO; ALFENAS; MAFFIA, 2005).

Estirpes de *Trichoderma spp.* são estudadas por terem interação com plantas, tendo como respostas estimulação da defesa das plantas, indução da germinação de sementes, aumento da atividade fotossintética, por conta do aumento da produção de clorofila (HERMOSA et al., 2012).

Estimulações do mecanismo de defesa da planta acontecem quando fungos *Trichoderma* colonizam as raízes induzindo mudanças no metabolismo, fazendo com que a planta acumule substâncias antimicrobianas, promovendo resistência a uma grande variedade de micro-organismos patogênicos (BROTMAN; GUPTA; VITERBO, 2010).

Sendo assim, pesquisas recentes demonstram que *Trichoderma spp.* ao interagirem diretamente com as raízes de plantas, estabelecem uma comunicação que aumenta o potencial de crescimento da planta, a resistência a doenças e a tolerância a estresses abióticos (HARMAN et al., 2012). Por essas razões, podem ajudar a melhorar a segurança alimentar, devido à menor necessidade de utilização de agrotóxicos, proporcionando ainda uma vantagem econômica para os agricultores (HARMAN et al., 2012).

Estudos do genoma de espécies do gênero *Trichoderma spp.* já vêm sendo realizado para se identificar as espécies, assim como também são feitos estudos para se conhecer as interações que estes fungos fazem com as plantas e seus patógenos a fim de se identificar quais fungos são benéficos para as plantas (HERMOSA et al., 2013). Assim, os genomas têm corroborado para o entendimento e compreensão da evolução e ecologia deste gênero (DRUZHININA et al., 2011).

Os fungos pertencentes a este gênero *Trichoderma*, portanto são, oportunistas, competidores do solo, simbiontes de plantas, produtores de enzimas degradadoras de parede celular de outros fungos, realizam funções importantes como produtores de antibióticos e também são parasitas de fungos fitopatogênicos (KUMAR et al., 2012).

Estando este gênero entre os micro-organismos mais pesquisados por conta do elevado potencial antagônico a vários patógenos (ETHUR, 2006). Muitas espécies são de importância econômica por serem capazes de produzir enzimas de interesse industrial (DRUZHININA; KUBICEK, 2005).

3.2 Identificação dos Fungos

3.2.1 Critérios morfológicos

Os fungos no geral estão agrupados em 4 distintos filos - Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota. Para a identificação morfológica de fungos filamentosos é necessário se basear em características macroscópica e microscópica, porém esta última é a que tem maior relevância para uma identificação mais precisa (SAMSON et al., 2010).

Uma das características de grande relevância e importância para a identificação é o tipo de reprodução, no caso da reprodução assexuada, a produção de esporos (conídios) (CROUS et al., 2009). O tipo, processo de formação, e a estrutura dos conídios são características microscópicas importantes no processo de identificação de fungos filamentosos, tanto ao nível de gênero como da espécie (CROUS et al., 2009). Entretanto, é necessário que se faça a inoculação em meios de cultivos adequados, para que os fungos possam se desenvolver e produzir substâncias, como as enzimas (DORGE; CARSTENSEN; FRISVAD, 2000).

Embora as características microscópicas sejam de suma importância, para uma primeira identificação de fungos filamentosos é necessário se avaliar as características macroscópicas como diâmetro, cor e textura da colônia, rugosidade, presença ou ausência de rebordo, etc. Podemos citar como exemplo, o gênero *Trichoderma* que possui rápido crescimento, onde as colônias são brancas com formação tufo verde ou amarelados geralmente ao longo de 7 dias de crescimento (SAMSON et al., 2010).

Entretanto, a identificação do gênero *Trichoderma* baseada apenas nas características morfológicas têm se mostrado insatisfatória (DRUZHININA; KOPCHINSKIY; KUBICEK, 2006), pois acredita-se não ser suficiente para elucidar as divergências genéticas entre as espécies (CHAVERRI; SAMUELS, 2003). Portanto, não há uma identificação satisfatória e segura baseada apenas em características morfológicas. Desta forma, para a pesquisa de identificação outros tipos de métodos, tais como molecular, bioquímica e fisiológica, constituem-se ferramentas essenciais para uma identificação mais coerente (SIMÕES; SANTOS; LIMA, 2013).

3.2.2 Critérios moleculares

É crescente a utilização em pesquisas micológicas e filogenéticas a análise do DNA ribossômico (DNAr), que confere resultados com elevado índice de confiabilidade, conferindo uma vantagem com relação às técnicas morfológicas, bioquímicas (BRUNS et al., 1991). Estudos apontam o sucesso do uso da sequência do DNAr na análise da correlação entre anamorfo-teleomorfo ao nível de gênero em Hypocreales (DODD et al., 2003; CHAVERRI et al., 2003b).

Nos estudos de taxonomia aplica-se a análise molecular como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD), sequenciamento genético, entre outros (VARGA et al., 2011).

A técnica PCR é baseada na amplificação de uma específica região do DNA delimitada pela sequência dos oligonucleotídeos iniciadores. Esta reação ocorre em três etapas importantes: Desnaturação da dupla fita de DNA em alta temperatura, em torno de

94 a 96 °C; anelamento, quando os pares de oligonucleotídeos iniciadores se unem à sequência complementar da fita de DNA; e por último a etapa de extensão da fita de DNA (CHEN; JANES, 2002). Uma das vantagens desta técnica com relação aos outras técnicas é o tempo de detecção que é reduzido de dias para horas. Na prática, o iniciador é utilizado para alongar uma fita de DNA e são utilizados além dos desoxirribonucleotídeos, os didesoxirribonucleotídeos que são denominados de análogos que não possuem a hidroxila - 3' marcados radioativamente com corantes fluorescentes, para interromper o alongamento da cadeia de nucleotídeos, produzindo diversos fragmentos de distintos tamanhos. O sequenciamento que é utilizado atualmente é automático, onde um sistema a laser detecta a fluorescência para a separação dos fragmentos (TRALAMAZZA, 2011). Ao nível de identificação de gêneros os alvos para a detecção são os genes que codifica para RNA ribossomal 18S, DNA mitocondrial, região do espaço intergênico e regiões espaçadoras internas do DNA ribossomal (ITS). Existem duas regiões que são responsáveis por flanquear os genes de DNaR, que são o ITS 1 e ITS 2, denominadas de Espaçadores Internos Transcritos (*Internal Transcribed Spacer*) (LARENA et al., 1999).

Regiões como ITS1, ITS2 e 5.8S são bem específicas e muito utilizadas em diversos estudos de taxonomia e filogenia, e por serem regiões muito conservadas, em alguns casos não se consegue uma diferenciação entre as espécies quando comparada com espécies muito próximas. Sendo assim, genes codificados de proteínas como o fator EF1 (translation-elongation), calmodulina, actina, e a subunidade II da RNA polimerase podem ser utilizadas de forma isolada ou em conjunto, na reconstrução filogenética (SAMUELS et al., 2015).

Estudos moleculares são ferramentas auxiliares da sistemática filogenética bastante útil, porém é necessário que haja mais integração entre os pesquisadores morfologistas, e os biólogos moleculares, para que se alcancem identificações e descrições fúngicas mais precisas.

3.3 Enzimas

O homem começou a explorar empiricamente a utilização de enzimas para produção de alimentos e bebidas no início da civilização. Pelo processo da fermentação de grãos de cereais, os povos sumérios e babilônicos antes de 6.000 a.C. já produziam bebidas alcoólicas e por volta do ano 2.000 a.C. foi a vez dos egípcios fazerem a utilização das enzimas para a produção de pães. A utilização destas enzimas acontecia sem nenhum tipo de conhecimento das reações enzimáticas, tudo acontecia na base da prática e observação. Porém, com a evolução da civilização veio junto à necessidade de se ter um maior aperfeiçoamento dos conhecimentos para entender os mecanismos e as reações químicas envolvidas na produção de um alimento e/ou bebida. Neste contexto, a evolução deste tipo de conhecimento culminou nas distintas formas de atuação das enzimas para as civilizações até hoje (WANDERLEY; NEVES; ANDRADE, 2011).

As enzimas são moléculas de proteínas globulares solúveis sintetizadas por organismos vivos que catalisam reações bioquímicas específicas. São essenciais para a manutenção do sistema metabólico de todos os organismos vivos, tendo atuação importante também na degradação da matéria orgânica e em deterioração dos alimentos. (LEHNINGER; NELSON; COX, 2014). Por sua especificidade, característica por determinado substrato as enzimas, são largamente utilizadas na elaboração de alimentos sem que ocorram alterações indesejáveis por serem ativadas em faixas moderadas de pH e temperaturas, a velocidade das reações podem ser facilmente controladas de acordo com que se deseja (PEREDA et al., 2005).

De acordo com as reações que catalisam, podem ser diferenciadas em seis classes, que são as oxidorredutases (catalizadores das reações de oxi-redução); transferases (catalizadores de reações de transferência de grupamento de uma molécula para outra); hidrolases (catalizadores de reações de hidrólise); isomerase (catalizadores de reações de mudanças intramolecular, formando isômeros); liases (catalizadores que rompem ligações); ligases (catalizadores de ligações covalentes de moléculas) (SANT'ANNA JUNIOR et al., 2001).

As enzimas podem ser obtidas de origens distintas, como a de origem animal, vegetal e microbiana, sendo as de origem microbiana as mais utilizadas em processos biotecnológicos, por apresentarem algumas características que as coloca em vantagens com relação às outras duas origens, como: produção em larga escala, permite a obtenção de linhagens melhoradas geneticamente com relação à produção e a qualidade da enzima, e por ser um recurso renovável (BON et al., 2008). Assim, a utilização das enzimas é interessante e atrativa por serem altamente sensível à temperatura, pH e possuir alto potencial de transformações de forma seletiva e rápida em condições apropriadas para as reações, fazendo com que a sua aplicação como catalisadores seja desejável. Portanto, os processos industriais que utilizam as enzimas, geralmente são simples, fácil de controlar, energeticamente eficiente e com baixo custo de investimentos (COLEN, 2006).

Industrialmente as enzimas de origem microbianas podem ser obtidas por cultivos em substratos sólidos, conhecida como fermentação estado sólido (FES), neste caso podem ser adicionados alguns substratos como milhos, trigo, madeira, palha, etc. e podem também ser obtidas por fermentação submersa (FS), onde o meio de cultura possui elevado teor de água (FERNANDES, 2007).

Nos países ocidentais a fermentação submersa (FS) é predominantemente utilizada para a produção de enzimas, pelo fácil desenvolvimento dos micro-organismos, podendo ser controlado as condições como pH e temperatura e pela facilidade de se recuperar as enzimas extracelulares (ORLANDELLI et al., 2012).

Mundialmente as aplicações das enzimas no setor industrial estão relacionadas à Biotecnologia que envolve outras áreas de conhecimento como a Microbiologia, Genética, Bioquímica e Engenharias. Aplicação enzimática utiliza novas matérias-primas, que envolve a melhoria de processos e das características físico-químicas tanto da matéria-prima como do produto, sendo assim, para as indústrias, uma enzima que é viável e utilizável comercialmente, será a que proporcionará um produto final de qualidade superior ao produto convencional; com o melhor custo benefício (ABRAHÃO NETO, 2001). A diversidade das enzimas é elevada, pois a cada momento surgem descobertas de novas enzimas e suas aplicações (BON et al., 2008).

Os processos enzimáticos compõem uma área promissora dentro das novas tecnologias que produzem compostos de alto valor agregado (FERNANDES et al., 2004). A liberação de compostos químicos no ambiente é restrita pelas agências de proteção ambiental, desde então, as enzimas são usadas em substituição de produtos químicos tóxicos que agredem o meio ambiente ou que provocam danos de materiais (MITIDIERI et al., 2002). Portanto, as indústrias que utilizam processos biocatalisados geram menos impacto ambiental e menor consumo de energia (SANTANA, 2012).

O Brasil possui um elevado potencial de produção de enzimas, mas a maior parte das enzimas ainda é importada. Isto é evidente por conta da vasta variedade biológica que ainda é pouco estudada, que contribui como fonte para obtenção de novas origens para produção de enzimas de interesse industrial (BON et al., 2008).

No ano de 2010 o mercado global de enzimas em aplicações industriais lucrou aproximadamente US\$ 3,6 bilhões e a perspectiva até 2016, segundo a Bcc Research – Market Forecasting pode chegar a US\$ 6 bilhões, apresentando uma taxa de crescimento

anual de 9,1% e para 2018 é esperado que este mercado atinja mais de US\$ 7 bilhões (BCC RESEARCH, 2014).

Os setores industriais como o de bebidas e alimentos compõem junto o maior seguimento industrial de enzimas, chegando ao faturamento de 1,2 bilhões no ano de 2010 (MUKESH, 2012; KUMAR et al., 2012).

3.3.1 Enzimas produzidas por fungos

Os fungos são capazes de sintetizar enzimas naturalmente quando infectam as plantas, ocasionando as doenças. São conhecidos como fungos fitopatogênicos, aqueles causadores de doenças em plantas, onde produzem enzimas extracelulares como indicativo da patogenicidade (BATEMAN; BASHAM, 2001; SILVA et al., 2006).

Existem outros fungos denominados de endofíticos que também sintetizam enzimas, porém estes colonizam o interior das plantas saúvas, como tecidos vegetais, folhas e ramos. Neste caso, estes fungos promovem benefícios às plantas, atuando como controladores de outros tipos de micro-organismos causadores de doenças (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

Com o desenvolvimento de pesquisas sobre enzimas, despertou em diversos segmentos industriais e comerciais a utilização de fungos filamentosos para produção de enzimas geralmente extracelulares (UENOJO; PASTORE, 2007).

No entanto é necessário para que se obtenha sucesso na exploração do potencial de variedades de enzimas fúngicas industriais, conhecimento minucioso das características fisiológicas, bioquímicas e genéticas dos fungos filamentosos que estão sendo avaliados (BORTOLAZZO, 2011).

Quando as enzimas são obtidas por produção microbiana é importante que primeiramente seja feita a identificação correta das cepas produtoras, que podem ser de linhagem selvagem ou ainda modificada geneticamente (BON et al., 2008).

O gênero *Trichoderma* já é conhecido como produtores de enzimas comerciais, e dentre as espécies mais conhecidas podemos citar: *T. reesei*, *T. viride*, *T. longibrachiatum* e *T. harzianum* (EUROPEAN COMMISSION, 2002). A Tabela 1 apresenta enzimas produzidas por fungos selvagens e que já são comercializadas.

Tabela 1. Enzimas comerciais obtidas a partir de fungos.

Fungo produtor	Enzimas comerciais
<i>Aspergillus aculeatus</i>	β -glucanase, pectinas
<i>Aspergillus melleus</i>	Protease
<i>Aspergillus niger</i>	Aminopeptidase, α -amilase, α -galactosidase, catalase, celulase, fitase, β -glucanase, glucoamilase, hemicelulase, inulase, lipase, pectinase, protease, xilanase
<i>Aspergillus oryzae</i>	Aminopeptidase, α -amilase, lactase, protease
<i>Aspergillus pulverulentus</i>	Pectinase
<i>Chaetomium erraticum</i>	Dextranase
<i>Chryphonectria parasitica</i>	Protease aspártica
<i>Humicola insolens</i>	Celulase, β -glucanase, xilanase
<i>Penicillium camembertii</i>	Lipase
<i>Penicillium citrinum</i>	Protease
<i>Penicillium funiculosum</i>	Pectinase, xilanase
<i>Penicillium lilacinum</i>	Dextranase
<i>Penicillium roqueforti</i>	Lipase
<i>Rhizopus delemar</i>	Glucoamilase
<i>Rhizopus niveus</i>	Glucoamilase, protease
<i>Rhizopus oryzae</i>	aminopeptidase, glucoamilase, lipase
<i>Talaromyces emersonii</i>	β -glucanase
<i>Trichoderma reesei</i>	Celulase, xilanase, β -glucanase
<i>Trichoderma viride</i>	Celulase
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	β -glucanase
<i>Trichoderma harzianum</i>	Glucosidase (exo-1 .3- β)

Fonte: European Commission (2002); ORLANDELLI et al. (2012); Adaptado de Bon et al. (2008).

Para avaliação quantitativa de fungos eficientes para a produção de enzimas, utiliza-se a técnica de triagem de produção, onde o fungo é inoculado em placas de Petri em meio sólido contendo amido, pectina, leite desnatado, fosfato de cálcio e carboximetilcelulose como fonte indutora da atividade enzimática (GOPINATH et al., 2005).

Desta forma, estudos indicam um redirecionamento com relação à aptidão de fungos para produção de novas enzimas, explorando desta forma o potencial biotecnológico da biodiversidade fúngica mundial (MACIEL, 2013).

3.3.2 Enzimas de importância industrial

3.3.2.1 Amilase

No início do século passado as enzimas amilolíticas, assim denominadas por degradarem o amido, tiveram sua produção iniciada por conta do interesse das indústrias em produzir glicose a partir de materiais amiláceos (SOCCOL et al., 2005).

A primeira vez que essas enzimas foram descritas foi em 1811 em extratos de trigo, e nos anos seguintes, em 1831 na saliva; em 1833 no malte; em 1846 no sangue; e em 1881 produzidas por fungos como o *Aspergillus oryzae*. (HARGER et al., 1982).

A Amilase então é uma enzima capaz de hidrolisar ligações glicosídicas do tipo α -1,4 e α -1,6 do amido, dando origem diversos produtos, como a dextrina e consecutivamente pequenos polímeros que possuem unidades de glicose (PANDEY et al., 2005). É muito utilizada em processos industriais, tais como nas indústrias de alimentos, têxteis, papel e celulose, detergente e farmacêutica (MAGALHÃES, 2010).

Essas enzimas são divididas em duas categorias, as endoamilases que catalisam reações de hidrólises aleatoriamente no interior da molécula de amido e as exoamilases que hidrolisam as ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora da molécula (GUPTA et al., 2003).

Pertencem à classe de enzimas hidrolases, onde são consideradas as mais antigas enzimas utilizadas industrialmente. Podem ser de origem animal, de plantas e de micro-organismos, onde esta última, devido sua produção em larga escala é a mais utilizada (GUIMARÃES et al., 2006).

As enzimas α -amilases, são as mais importantes entre as enzimas amilolíticas, pois desempenham importante função na conversão do amido em produtos com baixa massa molecular, podendo ser utilizado por outras enzimas do mesmo grupo, sendo aplicadas em vários processos biotecnológicos (PANDEY et al.; 2005).

Stroparo et al.(2012), selecionaram alguns fungos filamentosos produtores de enzimas hidrolíticas, tais como *Penicillium glabrum* J3, *P. glabrum* J11, *P. verruculosum*, *P. herquei*, *P. miczynskii*, *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger* J4 e *A. niger* J26. Estes autores demonstraram que todos esses fungos tiveram atividade enzimática para a amilase detectada, exceto para o fungo *P. verruculosum*.

3.3.2.2 Celulase

Durante a Segunda Guerra Mundial chamou atenção à deterioração dos uniformes dos soldados e outros objetos dos acampamentos, tais como bolsas, barracas, e todo material que eram fabricados com algodão. Por conta da deterioração desses materiais os soldados montaram um laboratório para buscar explicações para o que estava acontecendo. Foi assim que estas enzimas começaram a ser estudadas. Tais investigações identificaram um micro-organismo que foi chamado de QM6a, onde mais tarde foi descoberto que se tratava de um fungo filamentoso identificado como, *Trichoderma viride*. Esta espécie de fungo foi isolada, e a esta foi atribuída à capacidade de excretar enzimas que degradam a celulose. Vários pesquisadores estavam envolvidos nessa descoberta, com destaque para Dra. Mary Mandels e Dr. Reese que juntos publicaram vários estudos sobre a influência dos fatores que afetavam a produção das celulases e o melhor meio de cultivo para o desenvolvimento do *T. viride*. Com a evolução das pesquisas, estes pesquisadores conseguiram selecionar mutantes deste fungo com elevado nível de produtividade (CASTRO; PEREIRA JR., 2010).

A celulose é um biopolímero renovável e abundante na terra, formado por unidades de glicose ligadas entre si por ligações β - 1,4, sendo mundialmente utilizada

como matéria-prima industrial e como fonte de energia renovável (JOSHI; MANSFIELD, 2007).

Os micro-organismos degradam a celulose pela atuação de um complexo enzimático, denominadas celulases. Este complexo enzimático é dividido de acordo com o seu local de atuação no substrato celulósico, que são: β -glicosidases (EC 3.2.1.21): enzimas que hidrolisam celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose; endoglucanases (EC 3.2.1.4): são as enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise da molécula de celulose (PARIS, 2008) e as exoglucanases: participam da hidrólise primária da fibra e são divididas em celobiohidrolases (CBHs) e glucanohidrolases (GHs) (AGUIAR, 2010).

No início da década de 80 as celulases começaram a ser utilizada intensamente, por conta da sua ampla aplicabilidade (BHAT, 2000). São utilizadas nas indústrias de papel, gestão de resíduos, indústrias farmacêuticas, no processamento de alimentação animal e principalmente nas indústrias de alimentos e bebidas (cervejarias, polpas, sucos) (BHAT; BHAT, 1997). Podem ser utilizadas para tratamento da silagem, melhorando a qualidade nutricional e favorecendo a digestão de ruminantes e monogástricos, aumentando assim a sua digestibilidade (BHAT, 2000).

Nas indústrias têxteis o uso das celulases vem aumentando e atualmente já é considerado o terceiro grupo de enzimas mais utilizadas (FRANCO, 2009). Na fabricação dos detergentes são usadas para alterar a estrutura da fibra celulósica para facilitar a remoção das sujidades (BHAT, 2000). E também as celulases ao hidrolisarem o material celulósico, liberam glicose que são de grande interesse industrial, pois podem ser convertidas em etanol. (CASTRO; PEREIRA JR., 2010).

3.3.2.3 Peptidase (protease)

Estas enzimas são conhecidas como proteolíticas, proteases, proteinases ou ainda peptidases. A denominação peptidase será a adotada neste trabalho, pois de acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB, 1992) é a mais recomendada. As peptidases são enzimas que catalisam reações que rompem as ligações peptídicas das proteínas. Estas enzimas são amplamente distribuídas em diversas fontes biológicas, tais como, as plantas com 43,8%; bactérias com 18%; micro-organismos como os fungos com 15%; animais com 11,1%; algas com 7,4%; e vírus com 4,4% de proteases. As proteases isoladas de fontes biológicas, independente da origem, animal, planta ou de micro-organismos estão entre 27 a 67%, onde o restante ainda precisa de mais pesquisas para um melhor conhecimento (BADGUJAR, 2010).

As peptidase, segundo o Comitê de Nomenclatura Enzimática (EC), pertencem ao grupo 3- hidrolases e subgrupo 4- peptídeo-hidrolases ou peptidases (RAWLING et al., 2004). Estas enzimas ainda podem ser classificadas de acordo com a faixa de pH, como peptidases ácidas que possuem atividade entre pH 2 a 5; peptidases neutras que possuem atividade entre pH 6 a 9 ou ainda as peptidases alcalinas que possuem atividade entre pH 9 a 11 (GUERRA, 1991). E são também classificadas de acordo com o tipo de reação que catalisam, tais como: exopeptidases: (EC 3.4.11-19), quando clivam aminoácidos terminais, e endopeptidases: (EC 3.4.21-99), quando hidrolisam ligações peptídicas no interior da cadeia polipeptídica (BON; VERMELHO, 2004).

Espécies de *Trichoderma* produzem e excretam enzimas proteolíticas que vêm despertando atenção de pesquisadores por apresentarem um elevado potencial no biocontrole de fitopatógenos, mas ainda é necessário mais estudos para melhor conhecimento deste mecanismo (VITERBO et al., 2002).

As peptidases excretadas por fungos *Trichoderma spp.* podem participar da degradação de proteínas celulares estruturais, ocasionando a desestabilização à integridade celular dos fitopatógenos, facilitando desta forma a penetração e colonização

dos fungos *Trichoderma*. Peptidases produzidas por *Trichoderma virens* são similares à serino peptidases que são responsáveis por aumentar a resposta de defesa das plantas contra fitopatógenos (SUÁREZ et al., 2007).

De acordo com Howell (2003), peptidases excretadas por espécies de *Trichoderma* já estão sendo associadas no biocontrole de nematóides como *Meloidogyne javanica* em tomates. Já as peptidases excretadas por fungos *Trichoderma viride* não está associada apenas a uma resposta em geral como consequências de exigências nutricionais, mas inclui também um processo de reconhecimento molecular ainda desconhecido, que ocasiona uma secreção específica de proteínas de acordo com o reconhecimento realizado (ŠIMKOVIČ et al., 2008).

Outros fungos como *Mucor circinelloides* (ANDRADE; MARTINS, 2002); *Aspergillus sp.* (SUMANTHA et al., 2005); *Penicillium sp.* (GERMANO et al., 2003); *Fusarium sp.* (PEKKARINEN et al., 2000), também são conhecidos pela produção de enzimas proteolíticas.

As peptidases já possuem ampla aplicabilidade em diversos processos de vários setores industriais, entre estas estão às indústrias de alimentos, que utilizam essas enzimas no amaciamento de carnes (GERMANO et al., 2003), para clarificação de cervejas, no melhoramento do sabor do queijo, em alimentação animal, na panificação, e outras indústrias como as de detergentes, farmacêutica, química, de couro, etc. (ORLANDELLI et al., 2012).

3.3.2.4 Pectinase

As células vegetais possuem parede celular rígida composta principalmente por polímeros de celulose, hemicelulose e pectina, que são responsáveis pela proteção e estrutura das células. (ALBERTS et al., 1997). A pectina é um polissacarídeo formado por monômeros de ácido galacturônico unidos por ligação glicosídica, podendo ter resíduos de ramnose e ainda outros açúcares, como galactose, arabinose e xilose formando cadeias laterais (KASHYAP et al., 2001).

As pectinases são enzimas que degradam a pectina, hidrolisando ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica (UENOJO; PASTORE, 2007).

De acordo com o modo de ação, estas enzimas pectinolíticas ou pectinases (E.C. 3.2.1.15) podem ser classificadas em: enzimas desesterificantes, denominadas de pectinametilesterase (PME – E.C. 3.1.1.11) atuando na remoção de grupos metoxílicos presentes em algumas substâncias pécticas, hidrolisando apenas grupamentos adjacentes e carboxílicos livres (CELESTINO et al., 2006). Já as enzimas despolimerases promovem o rompimento da cadeia de pectina por hidrólise ou por clivagem transeliminativa (liase). Ou estas enzimas podem ainda ser classificadas, pela especificidade pelo seu substrato; posição da clivagem na cadeia péctica, sendo o caso das endo-enzima ou a partir da extremidade redutora ou não redutora, denominada de exo-enzimas e pelo mecanismo de reação de despolimerização (BAILEY; PESSA, 1990).

A intensificação da produção de sucos de frutas ocorreu na década de 30, porém o rendimento do processamento era baixo e muitas eram as dificuldades para filtrar e atingir a clarificação estável dos sucos. A partir deste momento, houve a necessidade de buscar mais conhecimento através de pesquisas sobre as pectinases, celulases e hemicelulases produzidas por micro-organismos que juntamente com outros estudos desta época sobre os componentes vegetais das frutas, auxiliaram a superar as dificuldades (BHAT, 2000).

As pectinases são amplamente utilizadas principalmente pelas indústrias de bebidas, tais como sucos, vinhos e alimentos processados como, por exemplo, alimentos infantis e purês. Durante o processamento dos sucos, as frutas são prensadas, ocasionando

o aumento da viscosidade e de partículas em suspensão, que dificultam a extração e a filtração. Neste momento do processamento que as pectinases são adicionadas, para que diminuam a viscosidade, a turbidez, facilitando assim o processo de extração, pigmentação e clarificação dos sucos (KHAN et al., 2013).

Outras aplicabilidades destas enzimas nas indústrias alimentícias incluem extração da polpa de tomate, fermentação de chá e chocolates, tratamento de resíduos vegetais, degomagem das fibras nas indústrias têxtils e de papel, entre outras (UENOJO; PASTORE, 2007).

As pectinases representam aproximadamente 25% da produção mundial de enzimas utilizadas em processos industriais na área de alimentos (YADAV et al., 2009).

Estas enzimas são produzidas pelas plantas, fungos filamentosos, leveduras, bactérias, protozoários, insetos e nematoides (UENOJO; PASTORE, 2007). No entanto, os fungos filamentosos são mais empregados para a produção das pectinases em escala industrial, pela diversidade de enzimas produzidas e facilidade de produção. E principalmente pelo fato das pectinases fúngicas apresentarem um pH bem próximo do valor de pH dos sucos de frutas que é em torno da faixa 3 a 5,5 (UEDA et al., 1982).

Estudos apontam que os fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Fusarium* são os principais produtores de enzimas pectinolíticas (MALLER, 2008).

3.3.2.5 Fitase

O fósforo (P) não é bem assimilado pelos animais, porém a principal fonte deste mineral na alimentação animal é o fitato (ou ácido fítico) que é uma molécula rica em fósforo (ALVES, 2014).

A fitase faz parte de um grupo de enzimas definida quimicamente como mioinositol (1,2,3,4,5,6) hexafosfato fosfohidrolases, que hidrolisam o fitato para que sejam absorvidos na forma de fósforo inorgânico livre (Pi) (DEBNATH et al., 2005), sendo classificadas como fosfatases, por possuir a capacidade “*in vitro*” de liberar ao menos um grupo fosfato a partir da hidrólise do fitato, ocasionando a diminuição da concentração de inositol fosfato (BOHN et al., 2008).

Esta enzima foi empregada na produção animal na década de 90, sendo extraída a partir de fungos *Aspergillus niger*, tornando-se assim economicamente viável, por conta da legislação que foi introduzida nos Países Baixos que ampliou tanto o seu desenvolvimento como a sua aceitação no controle da poluição de fosfatos em criação de aves e suínos. No entanto, foi descoberta bem antes em 1907 por Suzuki (KUMAR et al., 2010).

Estudos já comprovam que esta enzima melhora a digestibilidade dos minerais tais como fósforo (P), cálcio (Ca), sódio (Na) e cobre (Cu), e também de aminoácidos e proteínas (CHUNG et al., 2013).

As fitases podem ser de origem vegetal, de micro-organismos como leveduras, fungos filamentosos e bactérias, também de origem animal, produzida na mucosa do intestino delgado e ainda fitase microbiana visceral-associada, produzida no intestino grosso. No entanto, as de origem animal e vegetal possui aplicabilidade limitada, já as de origem microbiana são mais requisitadas por apresentarem elevado rendimento em ampla escala de produção, fazendo com que sejam mais utilizadas por indústrias de alimentação animal (KUMAR et al., 2010), principalmente de aves e suínos, com a finalidade de melhorar a absorção do fósforo que se encontram naturalmente nos grãos das rações, proporcionando uma considerável economia, já que a falta desta enzima de forma endógena nestes animais obriga aos produtores que adicionem o fósforo inorgânico às rações, visto que, o fósforo é um mineral de suma importância para a formação dos ossos

e dentes e ainda participam de várias reações metabólicas. Além também, desta enzima ocasionar menor impacto no ambiente, uma vez que o fósforo não aproveitado pelos animais é excretado pelas fezes, provocando eutrofização de rios e lagos (SELLE; RAVINDRAN, 2007).

Sendo assim, a produção da fitase fúngica desperta interesse das indústrias pela facilidade de extração, característica que lhe confere vantagem com relação às outras fontes de síntese, pois os fungos secretam extracelularmente as enzimas em um substrato externo, dispensando a etapa do rompimento das células das enzimas intracelulares, portanto, a produção em escala comercial é facilmente alcançada. Ainda do ponto de vista industrial, estas enzimas podem ser produzidas por fermentação submersa associada à tecnologia do DNA recombinante de micro-organismos geneticamente modificados (SALMON, 2011).

Os principais fungos capazes de sintetizar fitases pertencem aos gêneros: *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Pseudeurotium* e *Trichoderma* (LIU et al., 1998).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho de pesquisa foi desenvolvido no Laboratório de Biologia de Fungos do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, na cidade de Seropédica/RJ, em conjunto com o Laboratório do Instituto Biológico, São Paulo/SP, onde foi realizada a identificação de algumas espécies por técnica molecular.

4.1 Isolados, Reativação e Manutenção das Espécies

Foram estudados 64 isolados de *Trichoderma spp.* obtidos de diferentes substratos como solo e plantas e depositados na coleção científica do Laboratório de Biologia da UFRRJ. Os fungos encontravam-se conservados em tubos de ensaio contendo BDA (Batata Dextrose Ágar), solo e água (Método Castellani) armazenados em geladeira com temperatura de 4 °C. Os isolados de *Trichoderma spp.* foram repicados em placas de Petri contendo aproximadamente 15 mL de BDA e colocados em câmaras de crescimento (BOD) à temperatura de 25 °C por 7 dias. Após crescimento, verificou-se que ainda estavam ativos 58 isolados que foram repicados em tubos de ensaio contendo 5 mL de BDA e novamente colocados em BOD à temperatura de 25 °C por 7 dias, estes foram colocados em geladeira à 4 °C até o procedimento das análises.

Com relação à manutenção das espécies, os isolados foram armazenados tanto em tubos de ensaio contendo aproximadamente 5 mL de BDA à 4 °C, como também foi utilizados outros dois métodos para a preservação das espécies identificadas: Método conhecido como Castellani, que consiste em conservação por suspensão em água destilada em tubos eppendorfs descrito por Castellani em 1939 (JONG; ATKINS, 1985). Este método é muito utilizado para conservação e manutenção das espécies, possui sucesso na viabilidade de fungos ascomicetos e fungos mitosporicos (SMITH; ONIONS, 1994). Onde as células presentes no meio de cultura como conídios, foram suspendidas em 1 mL de água destilada estéril. Os conídios também foram inoculados em tubos de vidro contendo 5g de solo estéril, onde este solo foi submetido à autoclavagem por três vezes com intervalos de 24h (MURO; LUCHI, 1989). Depois os fungos foram armazenados em refrigeração a 4 °C.

4.2 Análise Morfológica

Esses isolados de *Trichoderma spp.* foram identificados por características macroscópicas: cor da superfície e reverso da colônia no meio BDA, presença ou ausência de pigmentação e pela presença ou ausência de odor de forma subjetiva.

Em sequência, após o preparo de lâminas foi realizado estudo microscópico para observação das características como: diâmetro e forma dos conídios, diâmetro dos clamidosporos quando presentes, comprimento e largura das fiálide, incubados em BOD a 25 °C por 7 dias. As espécies foram identificadas por estas características morfológicas (macro e microscópica) conforme a chave interativa de Samuels et al. (2015). Para a observação das estruturas microscópicas das espécies foi utilizado o microscópio óptico modelo OLYMPUS (CH30 PM-PBK-3).

4.2.1 Análise molecular

A Identificação molecular dos isolados de *Trichoderma spp.* foi realizada no Laboratório de Fitopatologia e Biologia Molecular no Instituto Biológico, São Paulo.

4.2.1.1 Extração de DNA

Após o cultivo dos isolados em BDA, por 5 dias, a 25 °C, extraiu-se o DNA, seguindo-se o método CTAB. O micélio foi macerado sob nitrogênio líquido (100-200 mg), foram adicionados 600 µL do tampão de extração CTAB (Anexo A) e incubados sob agitação a 65 °C durante 20min. Foi adicionada a solução aquosa 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) (Anexo A) e agitado em vórtex por alguns segundos. Centrifugou-se a 4 °C por 10min. a 12000 rpm 500 µL da fase aquosa foram transferidos para um microtubo tipo *eppendorf* de 1,5 mL e foi adicionado 0,6 volumes de isopropanol (300 µL) e misturou-se por inversão (DOYLE, DOYLE, 1987).

Centrifugou-se a 4 °C por 10min. a 12000 rpm. Em seguida o sobrenadante foi descartado cuidadosamente. Os ácidos nucléicos foram lavados com 500 µL de etanol 70%, centrifugou-se a 4 °C por 5min. a 12000 rpm. Descartou-se o sobrenadante cuidadosamente para não perder o pellet. O pellet foi secado a temperatura ambiente e depois em centrifuga à vácuo. Posteriormente ressuspêndido em 50 µL de água Milli-Q autoclavada. A presença do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio sob luz ultravioleta (DOYLE, DOYLE, 1987).

4.2.1.2 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

A caracterização molecular dos isolados de *Trichoderma spp.* foi feita utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores da região *Internal Transcribed Spacers* (ITS), ITS1 (5' – CAAAATGGGTAAAGGAGGASAAGAC – 3') e ITS4 (5' – CAGTACCGGCRGCRATRATSAG – 3'), gerando produtos de tamanho aproximado de 930pb (WHITE et al., 1990; SHOUKOUHI; BISSETT, 2008).

Para a reação de amplificação (PCR) foram utilizados 2 µl de DNA (entre 100 e 200 ng); 10 µl tampão Taq para PCR (5X); 6 µl de MgCl₂ (25mM); 1 µl de dNTP (10mM); 5 µ/µl GoTaq DNA Polimerase; 1,2 µl de DMSO; 1,5 µl de cada iniciador: ITS1 f(direto) e ITS4 (reverso) (100 pmol/µl) para um volume final de 50 µl. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador PTC100 (MJ Research). As condições de amplificação foram uma etapa de pré-desnaturação a 94 °C por 2min. 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15seg. anelamento 56 °C por 30seg. e extensão a 72 °C por 4min. Um controle negativo sem DNA foi incluído nas amplificações do PCR, ao final das reações, o produto foi mantido a 20 °C. A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1% submetidos a uma voltagem de 80 volts por 30min. Em seguida, o gel foi visualizado em transiluminador e as bandas foram comparadas com um padrão de peso molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen) (WHITE et al., 1990; SHOUKOUHI; BISSETT, 2008).

4.2.1.3 Sequenciamento dos fragmentos amplificados

Para o processo de sequenciamento foi feito primeiramente uma nova amplificação em placas de PCR, utilizando 6,68 µl do produto de PCR purificado, 0,32 µl do iniciador ITS1, 2 µl do reagente BigDye 3.1 (Applied Biosystems) e 1 µl de tampão 5X para um volume final de 10 µl. As condições de amplificação foram uma etapa de pré-desnaturação a 94 °C por 2min., 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15seg., anelamento 56 °C por 30seg. e extensão a 72 °C por 4min. (SCHMITZ; RIESNER, 2006).

Após a reação as placas de PCR foram retiradas do termociclador e as amostras foram precipitadas adicionando 40 µl de isopropanol 75%. O DNA foi precipitado por centrifugação a 4.000 rpm por 30min. O sobrenadante foi então descartado e o

precipitado foi lavado com 100 µl de isopropanol 75% e depois descartado o sobrenadante. O precipitado foi seco através de incubação em estufa a 37°C por 30min. Após foi ressuspêndido em 2 µl de formamida, desnaturado a 95 °C e submetido a sequenciamento. As reações de sequenciamento foram realizadas em sequenciador automático ABI3500 (Applied Biosystems) utilizando os mesmos iniciadores (ITS1 e ITS4) (SCHMITZ; RIESNER, 2006).

4.2.1.4 Análise filogenética (árvore)

Construiu-se árvore filogenética com sequências similares das regiões ITS1 e ITS4 dos isolados e sequências de diferentes espécies de fungos obtidas no GENBANK/NCBI, através do método de Maximum Likelihood (ML), para avaliar a robustez da topologia, a árvore foi avaliada pelo método de Jukes-Cantor com 1000 repetições, e a análise filogenética foi conduzido no software Molecular Análise Genética Evolutiva-MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2011).

4.3 Avaliação do Perfil Enzimático

O procedimento adotado foi a utilização de meios de cultura sólidos específicos (Anexo B) para detecção da ação de enzimas hidrolíticas: peptidase, amilase, celulase, pectinases e fitase realizando ensaios qualitativos, indicando possível potencialidade dos micro-organismos para essas enzimas.

4.3.1 Detecção qualitativa das enzimas produzidas: peptidase, amilase, celulase, pectinase e fitase

Todos os isolados foram inoculados em placas de Petri e incubados em BOD a 25 °C por um período de 5 dias, em meio de cultura específico (Anexo B), em duplicata. Foram considerados fungos produtores de enzimas, aqueles que apresentassem a formação de halo de degradação ao redor da colônia como proposto por Stamford et al. (1998).

O halo indicativo da produção das enzimas peptidase (GOPINATH et al., 2005) e fitase (PIKOVSAYA, 1948) podem ser vistos sem solução reveladora, com a detecção de uma zona clara ao redor das colônias após 7 dias desenvolvimento a 25 °C em BOD .

A atividade amilolítica foi detectada após a adição de 5 mL de uma solução de iodo sobre cada colônia. A formação de uma zona amarelada ao redor da colônia fúngica e o desenvolvimento de coloração azul na superfície restante da placa de Petri indica a ocorrência da hidrólise do amido (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

A revelação do halo de hidrólise para celulase foi realizada adicionando-se 10 mL de solução corante de vermelho congo ($2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de vermelho congo em tampão Tris HCL 0,1 M, pH 8,0), sobre cada colônia e incubação das placas em temperatura ambiente por 30min. Em seguida, a solução de corante foi descartada e as placas de Petri foram descoradas com 5 mL de solução de NaCl 0,5 M neste mesmo tampão, por 15min. A degradação da carboximetilcelulose ao redor da colônia fúngica é detectada através da formação de um halo amarelo ao redor da colônia (NOGUEIRA; CAVALCANTI, 1996; POINTING, 1999).

A atividade pectinolítica foi verificada após a adição de uma solução de ácido clorídrico (HCL) 5 N, durante 5 min., o que permitiu visualizar a formação de uma zona clara ao redor da colônia (HANKIN; AGNOSTAKIS, 1975).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação Morfológica

Os fungos *Trichoderma spp.* foram identificados por suas características morfológicas (macroscópica- cor e textura das colônias, presença ou ausência de odor e pigmentação; microscópica- estrutura dos conídios, fiálide e clamidospore quando presente) em 12 grupos, onde o Grupo I: representado por 18 isolados (31%); Grupo II: 6 isolados (10%); Grupo III: 14 isolados (24%); Grupo IV: 4 isolados (7%); Grupo V: 2 isolados (3%); Grupo VI: 1 isolado (2%); Grupo VII: 1 isolado (2%); Grupo VIII: 2 isolados (3%); Grupo IX: 1 isolado (2%); Grupo X: 3 isolados (5%); Grupo XI: 4 isolados (7%); Grupo XII: 2 isolados (3%), em um total de 58 isolados de fungos e organizados conforme Tabela 2.

Tabela 2. Organização dos 58 isolados de fungos *Trichoderma spp.* onde, T. representa *Trichoderma*.

Isolados	Representantes
Grupo I	T. 1; T. 2; T. 5; T. 6; T. 7; T. 8; T. 9; T. 23; T. 24; T. 25; T. 26; T. 27; T. 28; T. 29; T. 53; T. 54; T. 55; T. 56.
Grupo II	T. 10; T. 11; T. 12; T. 13 ; T. 44; T. 45.
Grupo III	T. 14; T. 15; T. 16; T. 17; T. 18; T. 30; T. 31; T. 37; T. 38; T. 39; T. 40; T. 46; T. 47; T. 48.
Grupo IV	T. 19; T. 20; T. 21; T. 22.
Grupo V	T. 3; T. 4.
Grupo VI	T. 32.
Grupo VII	T. 33.
Grupo VIII	T. 34; T. 35.
Grupo IX	T. 36.
Grupo X	T. 41; T. 42; T. 43.
Grupo XI	T. 49; T. 50; T. 51; T. 52.
Grupo XII	T. 57; T. 58.

5.1.1 Caracterização morfológica (macro e micromorfológica)

As espécies de fungos representadas pelo **Grupo I** apresentaram conídios de forma globosa a subglobosa, lisos, geralmente verde-claros, com média 3.5– 4.0 x 3.2-3.5 μm (comprimento/largura). Conidióforo geralmente com ramos laterais com ramificações pareadas, na maioria das vezes com fiálides espalhadas, lageniforme, medindo 2.6-8.0

μm (largura/comprimento). Foi verificada a presença de clamidosporos com diâmetro médio de 7.0 μm . Foi constatado um leve odor doce, semelhante ao cheiro de côco. O verso da colônia é de coloração verde-claro à levemente amarelado e reverso sem alteração de cor (Figura 2, A-B).

Fungos do **Grupo II** apresentaram: Conídios de forma subglobosa a ovóide, verdes, lisos, com média 3.5-4.1 x 2.9-3.3 μm (comprimento/largura). Conidióforo apresentando fiálides pareadas e ampuliforme, medindo 2.3-8.5 μm (largura/comprimento). Não foi observada a presença de clamidosporos. O verso da colônia é de coloração amarelo-claro no centro e nas bordas verde-escuro e reverso sem alteração de cor (Figura 2, C-D).

O **Grupo III** apresentou: Conídios de forma globosa a elipsóide, verde-claros, lisos, com média 2.38-3.5 x 3.0-3.7 μm (comprimento/largura). Conidióforo em formato de pirâmide, possuindo ramificações nas extremidades. As fiálides eram ampuliforme, medindo 2.3-7.5 μm (largura/comprimento). Os clamidosporos eram subglobosos e isolados com diâmetro médio de 7.2 μm . A colônia possui o verso de coloração branca no centro e verde-claro a mais escura nas bordas e reverso sem alteração de cor (Figura 2, E-F).

O **Grupo IV** apresentou: Conídios curtos de forma cilíndrica a elipsóides, lisos, frequentemente verdes, com média de 4.3-4.6 x 2.1-2.4 μm (comprimento/largura). Conidióforo com poucas ramificações laterais e fiálides lageniforme a ampuliforme surgindo individualmente ligados à base, medindo 6.0-8.5 μm (largura/comprimento). Não foi observada a presença de clamidospore. A colônia possui verso verde-claro/amarelo-claro com reverso sem alteração de cor (Figura 2, G-H).

Espécies de fungos representados pelo **Grupo V** apresentaram: Conídios de forma subglobosa a globosas, verde-claro, lisos, com média 2.2-3.5 x 2.0-2.7 μm (comprimento/largura). Conidióforo geralmente em formato de pirâmide. As fiálides eram ampuliforme, medindo 1.9-6.7 μm (largura/comprimento). O clamidospore não foi observado. O verso da colônia era branco no centro e verde-claro a mais escura nas bordas e reverso sem alteração de cor (Figura 2, I-J).

Fungos representados pelo **Grupo VI** possuem: Conídios de forma globosa, verde-claro, lisos, com média de 3.1-4.0 x 2.7-3.0 μm (comprimento/largura). Conidióforo com ramificações nas extremidades. As fiálides ampuliforme, medindo 2.0-6.5 μm (largura/comprimento). Não foi observado o clamidospore. A colônia apresentou o verso verde-claro e levemente amarelado nas bordas e reverso sem alteração de cor (figura 2, K-L).

O **Grupo VII** apresentou: Conídios oblongos, lisos, verde, com média de 3.7-5.0 x 2.2-2.9 μm (comprimento/largura). Conidióforo pouco ramificado com fiálides individuais ampuliforme, medindo 5.7-7.3 μm (largura/comprimento). Não foi encontrado clamidosporos. A colônia apresentou verso amarelo-claro e levemente verde-claro nas bordas e reverso sem alteração de cor (Figura 2, M-N).

Representantes do **Grupo VIII** apresentaram: Conídios de forma oblongos, lisos, verdes, com média de 4.0-4.8 x 2.0-2.5 μm (comprimento/largura). Conidióforo com algumas ramificações e fiálides individuais lageniforme, medindo 6.5-10.2 μm (largura/comprimento). Ausência de clamidosporos. O verso da colônia era branco e levemente verde-claro a amarelo-claro nas bordas e reverso sem alteração de cor (Figura 2, O-P).

Fungos representados pelo **Grupo IX** apresentaram: Conídios de forma oblongas, lisos, verdes, com média de 3.6-5.8 x 2.3-3.0 μm (comprimento/largura). Conidióforo pouco ramificado e com fiálides isoladas ampuliforme, medindo 8.5-10.0 μm (largura/comprimento). Não foi observada a presença de clamidosporos. A colônia

apresentou reverso amarelo-claro e levemente verde-claro nas bordas e reverso sem alteração de cor (Figura 2, Q-R).

O **Grupo X** é representado por fungos que apresentam: Conídios ovóides, verdes, lisos, com média 3.4-3.9 x 3.1-3.5 µm (comprimento/largura). Conidióforo com fiálides ampuliforme, medindo 1.8-8.7 µm (largura/comprimento). Sem presença de clamidosporos. O verso da colônia era verde-claro a verde mais escuro nas bordas e reverso sem alteração de cor (Figura 2, S-T).

Fungos representados pelo **Grupo XI** apresentam: Conídios subglobosos, verdes, lisos, com média 3.7-4.3 x 3.2-3.7 µm (comprimento/largura). Conidióforo com fiálides pareadas, ampuliforme, medindo 2.4-9.7 µm (largura/comprimento). Presença de clamidosporos com diâmetro médio de 9.0 µm. A colônia possui verso verde-claro a mais escura nas bordas e reverso esbranquiçado (Figura 2, U-V).

Representantes do **Grupo XII** possuem: Conídios de forma subglobosa, verde-claros, lisos, com média 3.0-4.0 x 2.0-3.2 µm (comprimento/largura). Conidióforo geralmente em formato de pirâmide. As fiálides eram ampuliforme, medindo 2.8-7.3 µm (largura/comprimento). Ausência de clamidosporos. O verso da colônia é levemente amarelado no centro e verde-claro a mais escura nas bordas e reverso avermelhado (Figura 2, Z-X).

As características macroscópicas e microscópicas (microcultivo) das espécies isoladas de *Trichoderma* do Grupo I ao XII estão descritas na Tabela 3 e Figura 2 e Tabela 4, respectivamente.

Tabela 3. Características macroscópicas dos isolados de *Trichoderma*.

Isolados	Cor da colônia - BDA Verso/ Reverso a 25°C	Crescimento da colônia (cm)
Grupo I	Verde-claro à levemente amarelado/Sem alteração de cor	8,5
Grupo II	Amarelo-claro no centro e nas bordas verde-escuro/Sem alteração de cor	8,5
Grupo III	Branco no centro e verde-claro a mais escura nas bordas/Sem alteração de cor	9,5
Grupo IV	Verde-claro e amarelo-claro/Sem alteração de cor	8,0
Grupo V	Branco no centro e verde-claro a mais escura nas bordas/Sem alteração de cor	8,5
Grupo VI	Verde-claro e levemente amarelado nas bordas/Sem alteração de cor	10,0
Grupo VII	Amarelo-claro e levemente verde-claro nas bordas/Sem alteração de cor	9,5
Grupo VIII	Branco e levemente verde-claro a amarelo-claro nas bordas/Sem alteração de cor	10,0
Grupo IX	Amarelo-claro e levemente verde-claro nas bordas/Sem alteração de cor	6,0
Grupo X	Verde-claro a verde mais escura nas bordas /Sem alteração de cor	9,5
Grupo XI	Verde-claro a verde mais escura nas bordas /Esbranquiçado	10,0
Grupo XII	Levemente amarelado no centro e verde-claro a mais escura nas bordas/Avermelhado	10,0

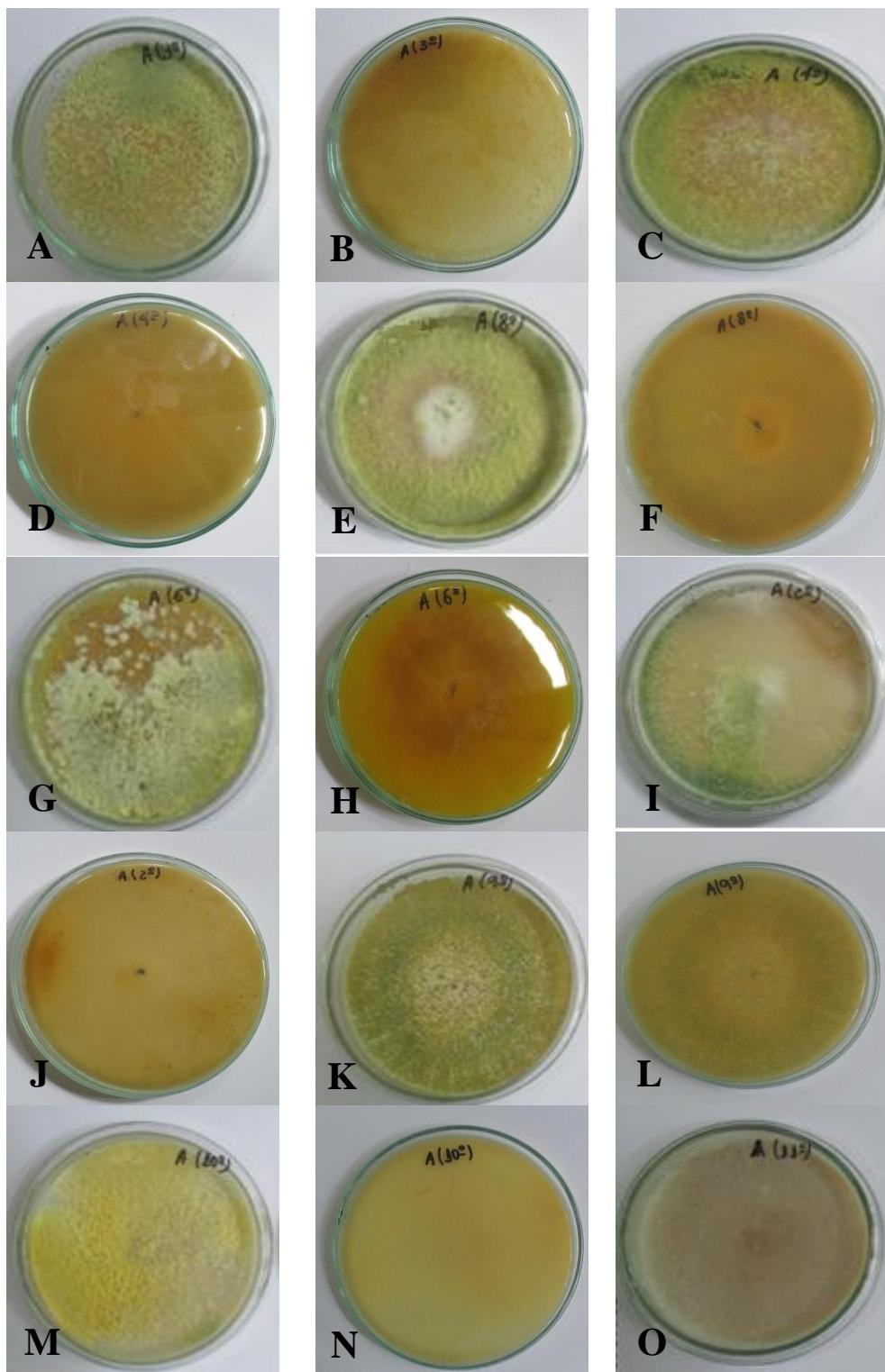


Figura 2. Características macroscópicas das colônias dos isolados de *Trichoderma*, verso e reverso em BDA, após 7 dias de crescimento à 25 °C: Grupo I (A-B); Grupo II (C-D); Grupo III (E-F); Grupo IV (G-H); Grupo V (I-J); Grupo VI (K-L); Grupo VII (M-N); Grupo VIII (O-P); Grupo IX (Q-R); Grupo X (S-T); Grupo XI (U-V); Grupo XII (X-Z). (Continua).

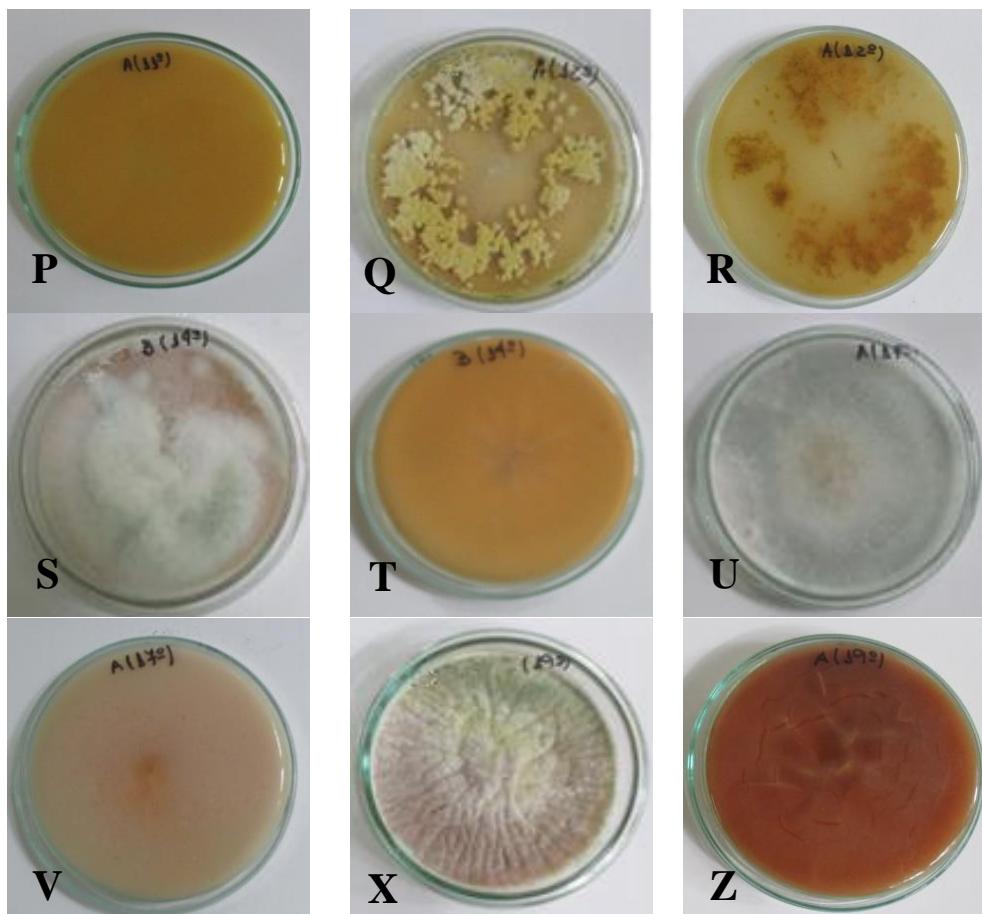


Figura 2. Continuação. Características macroscópicas das colônias dos isolados de *Trichoderma*, verso e reverso em BDA, após 7 dias de crescimento à 25 °C: Grupo I (A-B); Grupo II (C-D); Grupo III (E-F); Grupo IV (G-H); Grupo V (I-J); Grupo VI (K-L); Grupo VII (M-N); Grupo VIII (O-P); Grupo IX (Q-R); Grupo X (S-T); Grupo XI (U-V); Grupo XII (X-Z).

Tabela 4. Características microscópicas dos isolados de *Trichoderma spp.* e médias das dimensões das estruturas em μm .

Agrupamento	Médias			
	Fiálide (μm)	Conídio (μm)	Clamidospore	Comprimento x Largura (μm)
Largura	Comprimento	Diâmetro (μm)		
Grupo I	2.6	8.0	7.0	3.5-4.0 x 3.2-3.5
Grupo II	2.3	8.5	Ausente	3.5-4.1 x 2.9-3.3
Grupo III	2.3	7.5	7.2	2.38-3.5 x 3.0-3.7
Grupo IV	6.0	8.5	Ausente	4.3-4.6 x 2.1-2.4
Grupo V	1.9	6.7	Ausente	2.2-3.5 x 2.0-2.7
Grupo VI	2.0	6.5	Ausente	3.1-4.0 x 2.7-3.0
Grupo VII	5.7	7.3	Ausente	3.7-5.0 x 2.2-2.9
Grupo VIII	6.5	10.2	Ausente	4.0-4.8 x 2.0-2.5
Grupo IX	8.5	10.0	Ausente	3.6-5.8 x 2.3-3.0
Grupo X	1.8	8.7	Ausente	3.4-3.9 x 3.1-3.5
Grupo XI	2.4	9.7	9.0	3.7-4.3 x 3.2-3.7
Grupo XII	2.8	7.3	Ausente	3.0-4.0 x 2.0-3.2

Portanto, com base nas características morfológicas observadas em lâminas, os fungos representados pelos Grupos I a XII foram caracterizados como: Grupo I = *Trichoderma atroviride*, Grupo II, X e XI = *Trichoderma asperelloide*, Grupo III, V, VI e XII = *Trichoderma harzianum*, Grupo IV, VII, VIII e IX = *Trichoderma longibrachiatum* conforme a chave interativa de Samuels et al. (2015).

De acordo com Dodd et al. (2003), espécies de *T. atroviride* se desenvolvem em temperatura ideal entre 25-30 °C em BDA. Apresentam conídios subglobosos para ovóides, medindo (2.7-) 3.0-3.8 (-5.0) x (2.3-) 2.8-3.5 (-4.0) µm. Possuem ramificação de conidióforos que normalmente são unilaterais com ramos pareados. As fiálides medem (4.2-) 7.7- 8.0 (-15.0) µm comprimento e (1.2-) 2.0-2.1 (-3.5) µm largura. Clamidosporo com diâmetro de (5.2-) 10.0-10.5 (-16.5) µm. Santos (2010) também descrevem que *T. atroviride* possui características bem semelhantes, onde encontrou o conídio subgloboso e alguns elipsoide a ovóide, medindo 3.7 ± 0.1 x 3.1 ± 0.1 µm (comprimento/largura). Fiálides lageniforme com dimensões 8.4 ± 0.3 - 2.6 ± 0.1 x 1.9 ± 0.0 µm (comprimento/largura) e clamidosporos com diâmetro médio de 7.4 ± 0.1 µm. e as colônias crescidas em meio BDA apresentam um cheiro doce de côco, característica importante na taxonomia desta espécie, o mesmo cheiro observado neste estudo.

Segundo Samuels et al. (2010), as espécies de *T. asperelloide*, possuem conídios subgloboso a elipsóide, medindo (2.7-) 3.5-4.2 (-5.0) x (2.2-) 3.0-3.5 (-4.0) µm (comprimento/largura), fiálides medindo (4.7-) 6.5-10.5 (-27.5) x (1.0-) 1.7-2.5 (-3.5) µm (comprimento/largura).

Samuels et al. (1999), encontraram valores semelhantes, onde citam que os conídios globosos a subglobosos e alguns ovóides medindo 3.7-6.0 x 3.0-5.0 µm e fiálides ampuliforme de 7.0-11.5 x 2.0-3.5 µm (comprimento/largura). No presente trabalho não foi observado os clamidosporos, porém neste estudo os autores observaram a presença de clamidosporos, com diâmetro de 6.2-11.5 µm.

A espécie *T. asperelloide* também é conhecida como sendo *T. asperellum* (SAMUELS et al., 2010).

Santos (2010) cita que a espécie *Trichoderma harzianum* apresentam conídios subgloboso a elipsóide, medindo 3.1-2.7 (comprimento/largura) e também 3.5-3.0 µm (comprimento/largura), fiálides ampuliforme medindo 6.7-7.5 x 1.9-2.0 µm (comprimento/largura) e clamidosporos globosos e subglobosos com diâmetro médio de 7.7-8.4 µm. Estes valores estão muito próximos de valores encontrados por Braúna (2011). Alguns outros estudos citam também a presença de clamidosporos (BISSETT, 1991; HOOG, 2000). De acordo com Chaverri e Samuels (2003), o clamidosporo possui dimensões de 6.0-9.7 µm, estando também de acordo com as dimensões encontradas neste trabalho, assim como as dimensões encontradas das outras estruturas.

Trichoderma longibrachiatum de acordo com Samuels et al. (2012), possui conídios medindo (2.5) 3.0-4.0 (-4.5) x (1.7-) 2.0-2.5 (-3.0) µm (comprimento/largura) e fiálides lageniforme medindo (3.0-) 5.7-9.5 (-12.7) x (1.5-) 1.7-2.5 (-3.7) µm (comprimento/largura). Valores semelhantes também são descritos por Rifai (1969), onde encontraram conídios medindo 3,6-6,5 x 2,2-3,0 µm.

Bisset (1984) relata em seus estudos que espécies de *T. longibrachiatum* podem em alguns casos produzir um pigmento amarelo-esverdeado no reverso das culturas, no entanto no presente trabalho não foi observado esta pigmentação.

Portanto, as características morfológicas encontradas utilizando a chave interativa de Samuels et al. (2015), para cada grupo neste trabalho, evidencia estar de acordo com a literatura pesquisada. O resumo da comparação das dimensões das estruturas encontradas pelos autores estudados pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5. Comparação das dimensões das estruturas encontradas segundo autores estudados.

Autores	Diâmetro (μm) Clamidosporo	Conídio (μm)	Forma	Fiálide (μm)	Forma
<i>T. atroviride</i>		(2.7-) 3.0-3.8 (-5.0) x		(4.2-) 7.7- 8.0 (-15.0) x	
Dodd et al. (2003)	(5.2-) 10.0-10.5 (-16.5)	(2.3-) 2.8-3.5 (-4.0)	Subglobosos a ovóides	(1.2-) 2.0-2.1 (-3.5)	-----
<i>T. atroviride</i>			Subgloboso, elipsóide a ovóide	8.40 \pm 0.3 - 2.60 \pm 0.1 x	
Santos (2010)	7.4 \pm 0.1	3.70 \pm 0.1 x 3.10 \pm 0.1		1.9 \pm 0.0	Lageniforme
<i>T. asperelloide</i>		(2.7-) 3.5-4.2 (-5.0) x		(4.7-) 6.5-10.5 (-27.5)	
Samuels et al. (2010)	(4.5-)7.2-11.2(-15.0)	(2.2-) 3.0-3.5 (-4.0)	Subgloboso a elipsóide	x (1.0-) 1.70-2.5 (-3.5)	-----
<i>T. asperellum</i>			Globoso, subgloboso ou ovóide		
Samuels (1999)	6.2-11.5	3.7-6.0 x 3.0-5.0		7.0-11.5 x 2.0-3.5	Ampuliforme
<i>T. harzianum</i>		3.1 \pm 0.1 x 2.7 e 3.5 \pm 0.1		6.70 \pm 0.2 - 7.5 \pm 0.1 x	
Santos (2010)	7.70 \pm 0.2 a 8.4 \pm 0.2	x 3.0 \pm 0.1	Subgloboso a elipsóide	1.9 \pm 0.0 - 2.0 \pm 0.0	Ampuliforme
<i>T. harzianum</i>					
Braúna (2011)	4.5 – 6.0 x 11.0 – 13.0	2.2 – 3.5 x 2.0 – 3.0	Subgloboso a ovóide	5.0-6.5 x 2.5-3.5	Ampuliforme
<i>T. harzianum</i>					
Bissett (1991); Hoog (2000)	12.5-10.0	3.8-40 x 3.1-3.7	Subgloboso	6.3-15.6 x 2.7-3.4	-----
<i>T. harzianum</i>					
Chaverri e Samuels (2003)	(4.0-) 6.0-9.7 (-15.0)	(2.0-) 2.7-3.5 (-5.0) x (1.8-) 2.5-3.0 (-4.0)	Subgloboso a ovóide	(3.0-) 4.8-8.5 (-15.0) x (1.0-) 1.5-2.5 (-3.5)	-----
<i>T. longibrachiatum</i>		(2.5-) 3.0-4.0 (-4.5) x		(3.0-) 5.7-9.5 (-12.7) x	
Samuels et al (2012)	-----	(1.7-) 2.0-2.5 (-3.0)	-----	(1.5-) 1.7-2.5 (-3.7)	Lageniforme
<i>T. longibrachiatum</i>					
Rifai (1969)	-----	3.6-6.5 x 2.2-3.0	-----	-----	-----

5.2 Identificação Molecular

5.2.1 Extração do DNA de *Trichoderma spp.* e amplificação da região ITS do DNA através de PCR

Foi escolhido representante (s) de cada grupo para que fossem feitas as análises moleculares, conforme a Tabela 6, após a caracterização morfológica. Os fungos foram repicados em tubos de ensaio contendo aproximadamente 5 mL de BDA e colocados em estufas de crescimento (BOD) a 25 °C por 7 dias, totalizando 11 tubos que foram enviados para São Paulo para realização da identificação a partir do DNA.

Dentre os 58 isolados, foram escolhidos 11 isolados de *Trichoderma spp.* para análise molecular, onde 4 isolados foram identificados com *T. atroviride*, 2 isolados como *T. asperelloide*, 4 isolados como *T. harzianum* e 1 isolado como *T. longibrachiatum* (Tabela 6).

Para a extração do DNA foram utilizados os micélios dos isolados de *Trichoderma spp.* cultivados por 7 dias a 25 °C em BDA. O método CTAB (item 4.2.2.1), caracteriza-se por extrair o DNA gênomico de cada isolado com base no protocolo (DOYLE; DOYLE, 1987). Este protocolo é considerado eficiente, pois é obtido quantidades de DNAs suficiente para o desenvolvimento de toda a análise.

As regiões de amplificação ITS das espécies de *T. atroviride*; *T. asperelloide*; *T. harzianum* e *T. longibrachiatum*, geraram o mesmo perfil de banda de aproximadamente 930 pb (pares de base), como mostra a Figura 3.

Hermosa et al. (2000), obtiveram bandas entre 560-600 pb quando amplificou as regiões do ITS para identificação de 17 isolados de *Trichoderma spp.*, dentre estes estão *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. longibrachiatum*, utilizados como biocontrole. Menezes et al. (2010), utilizaram a região do ITS para identificar três isolados de *Trichoderma spp.* utilizados no biocontrole de *Fusarium*. A extração do DNA foi a partir do micélio produzido em meio líquido BDA, onde o DNA foi submetido à PCR. Os isolados identificados como *Trichoderma koningiopsis*, *Hypocreavirens*, *Hypocrealelixirii* apresentaram uma banda simples de aproximadamente 600 (pb), semelhante a banda utilizada neste trabalho. Colonia e Chagas Junior (2014), identificaram por meio do sequenciamento da região ITS cepas de *Trichoderma spp.* isoladas do fertilizante Trichoplus JCO. Os autores utilizaram a extração do DNA de acordo com a metodologia de CTAB e a amplificação gerou bandas exatamente igual à encontrada também neste trabalho que foi de cerca de 930 pb, onde obtiveram a identificação dos fungos *T. asperelloide*, *T. longibrachiatum* e *T. harziaunum*.

Tabela 6. Representantes dos isolados de *Trichoderma spp.* para análise molecular.

Grupo I <i>T. atroviride</i>	Grupo II <i>T. asperelloide</i>	Grupo III <i>T. harzianum</i>	Grupo IV <i>T. longibrachiatum</i>
T. 1	T. 10	T.14	T. 19
T. 5	T. 44	T. 30	
T. 23		T. 37	
T. 53		T. 46	

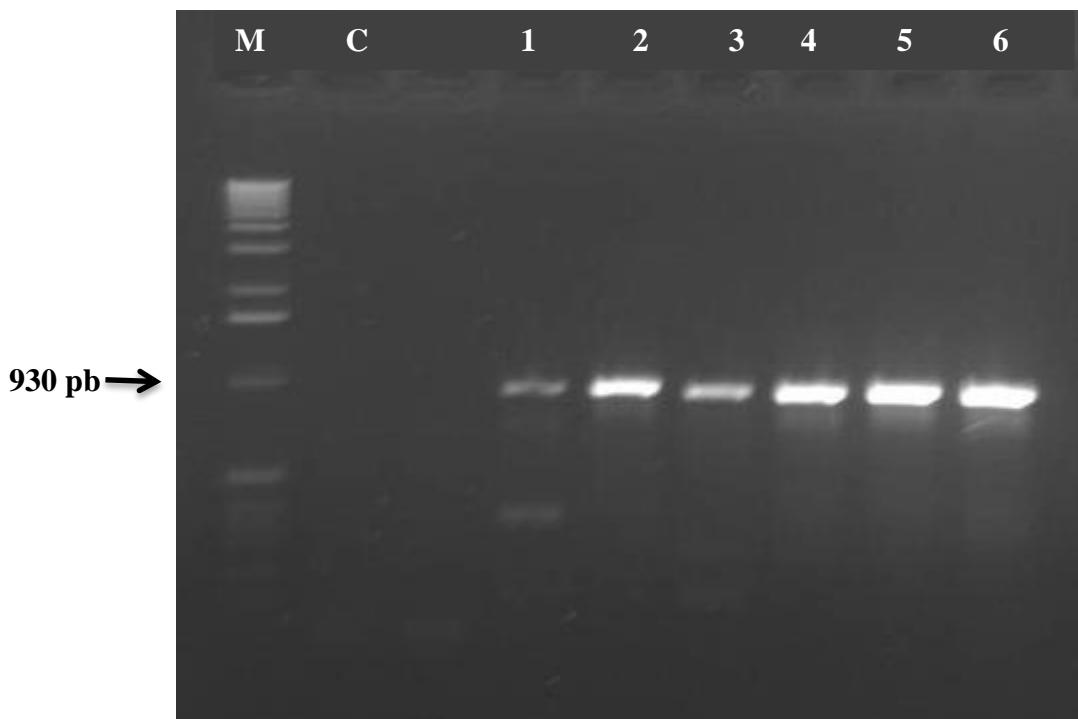


Figura 3. Produtos da amplificação de DNA dos isolados de *Trichoderma* com iniciadores ITS1 e ITS4. M = Marcador de peso molecular 1KbPlus DNA Ladder (Invitrogen). 1,2= isolados de *T. atroviride*; 3= *T. asperelloide*; 4= *T. longibrachiatum*; 5,6= *T. harzianum*. C = Controle Negativo. pb (Pares de base).

5.2.2 Sequenciamento dos fragmentos amplificados

Para a identificação das espécies de *Trichoderma*, foi utilizado as sequências ITS1-5.8 e ITS4 do DNAr que foram comparadas com as sequências de *Trichoderma atroviride* (n. AB558914.1) e (n. KJ871092.1); *Trichoderma asperelloides* (n. KP262478.1); *Trichoderma longibrachiatum* (n. EU280034.1) e *Trichoderma harzianum* (n. KP696461.1) e (n. AY605783.1), depositadas na base de dados do GenBank. O alinhamento e análise filogenética destas sequências utilizadas mostraram agrupamentos que corroboram a identificação taxonômica das espécies estudadas neste trabalho (Figura 4).

As linhagens *Trichoderma atroviride* Tr1-TE F; Tr3-TE F; Tr7-TE F; Tr18-TE F agruparam com a sequência de uma linhagem da mesma espécie apresentada no banco de dados, apresentando entre 99-100% de similaridade. Já com relação às linhagens *Trichoderma asperelloides* Tr4-TE F; Tr15-TE F com 100% de similaridade; *Trichoderma longibrachiatum* Tr6-TE F, com 100% de similaridade e *Trichoderma harzianum* Tr5-TE F; Tr8- TE F, com similaridade entre 80-100% e Tr13-TE F; Tr16-TE F, apresentando entre 61-100% de similaridade. A Tabela 7 mostra uma árvore filogenética dos fungos analisados molecularmente e seus correspondentes fungos representantes de cada grupo. Desta forma os isolados de *Trichoderma* deste estudo foram caracterizados com elevado grau de identidade.

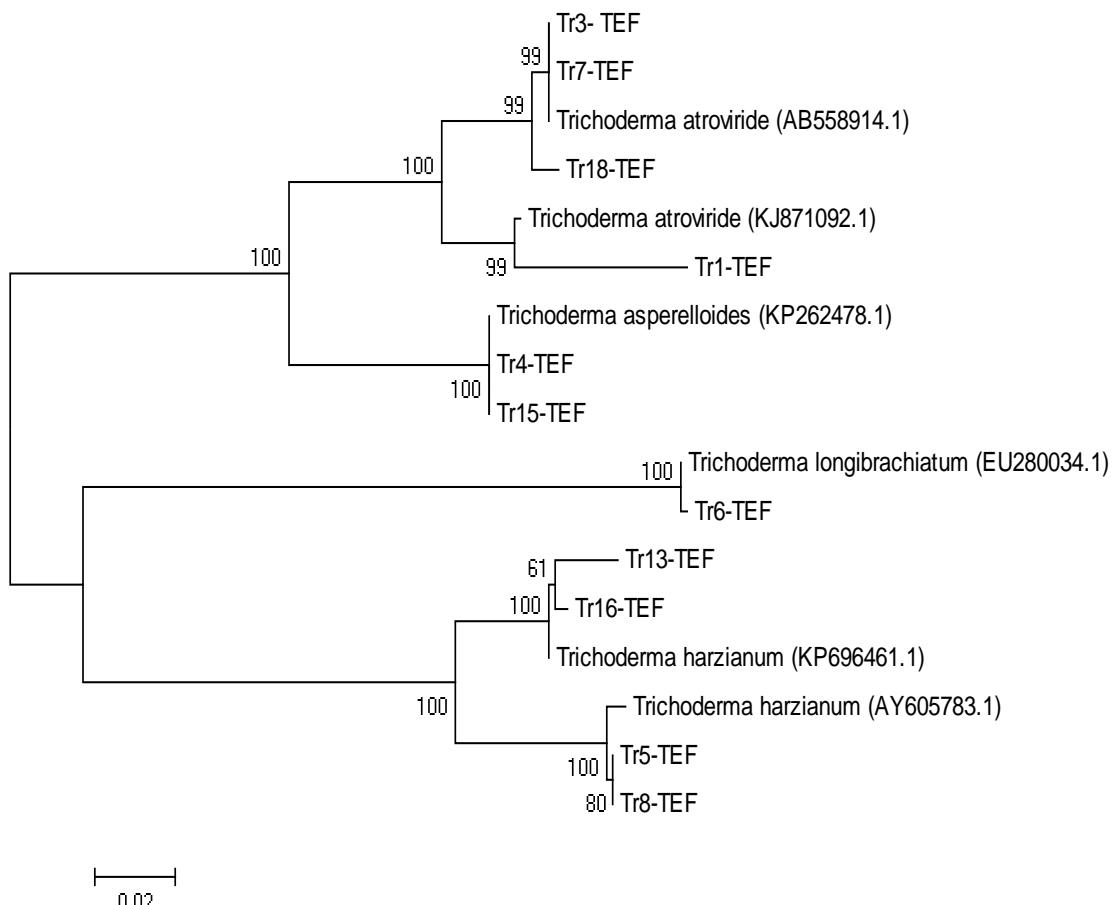


Figura 4. Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança, mostrando a relação entre os onze isolados de *Trichoderma spp.* obtidos de solo e plantas, com espécies de *Trichoderma spp.* depositadas no GenBank-NCBI. As sequências utilizadas são do gene alfa elongase (TEF). Número de acesso das sequências no GenbanK consta entre parêntese e ao lado do nome dos isolados. Os valores para 1.000 repetições estão indicados junto aos ramos da árvore. Barra de escala = 0,02 substituições por posição.

Tabela 7. Fungos representantes de cada grupo e seus correspondentes na análise molecular.

Grupo I	Análise Molecular <i>T. atroviride</i>	Grupo II	Análise Molecular <i>T. asperelloides</i>	Grupo III	Análise Molecular <i>T. harzianum</i>	Análise	
						IV	Molecular <i>T. longibrachiatum</i>
T. 1	Tr1- TE F	T. 10	Tr4- TE F	T. 14	Tr5- TE F	T. 19	Tr6- TE F
T. 5	Tr3- TE F	T. 44	Tr15- TE F	T. 30	Tr8- TE F		
T. 23	Tr7- TE F			T. 37	Tr13- TE F		
T. 53	Tr18- TE F			T. 46	Tr16- TE F		

5.3 Análise: Peptidase (Protease)

Não foi observado em nenhum dos isolados de fungos do gênero *Trichoderma spp.* o halo de degradação, portanto todos os isolados apresentaram resultado negativo para a produção da enzima peptidase. Por outro lado, os isolados obtiveram um bom desenvolvimento no meio de cultura, conforme pode ser observado na Figura 5.

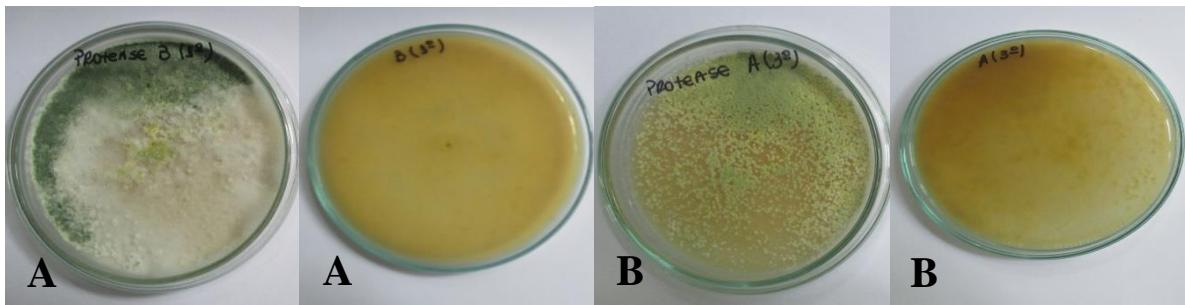


Figura 5. Teste qualitativo de produção da enzima peptidase. Sem formação do halo de degradação pelos isolados T. 2 (A- verso e reverso) e T. 5 (B- verso e reverso).

Utilizando uma metodologia diferente da adotada neste trabalho, Geremia et al. (1993) e Pozo et al. (2004) identificaram proteases (PRB1) e (TVSP1) produzidas por fungos *T. harzianum* e *T. virens* respectivamente, no qual utilizaram meios de cultura contendo parede celular de fitopatógenos como fonte de carbono para induzir a produção de enzimas. A metodologia utilizada pode ter influenciado para o resultado positivo apresentado por estes autores.

Outros autores também citam que as proteases são produzidas por fungos *Trichoderma*, quando estes são cultivados em meios que contenham células fúngicas ou micélios autoclavados como fonte de carbono (BENÍTEZ et al., 1998; DE LA CRUZ ; LLOBELL, 1999).

Savitha et al. (2011), observaram a produção da enzima peptidase (proteases) pelos fungos *Trichoderma harzianum* e *Graphium putredinis*, utilizando em sua metodologia o acréscimos de (0,5% p/v) farelo de soja ao meio de cultura. Mesmo o resultado sendo pouco satisfatórios com relação à produção da protease, os autores observou a produção enzimática do fungo, diferente do que foi observado neste trabalho. Os autores atribuem a baixa produtividade da enzima apenas pela presença de compostos tóxicos encontrados no local de coleta destes fungos.

Qualhato (2013) avaliou em seu estudo, o perfil enzimático, de cinco espécies de *Trichoderma* (*T. harzianum*; *T. tomentosum*; *T. asperellum*; *Trichoderma sp.*; *T. ghanense*), porém foi utilizado na metodologia o substrato azocaseína e micélio macerado dos fitopatógenos *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* ao meio de cultura como fonte de carbono para desenvolvimento e produção da protease ácida do fungo *Trichoderma*. Os resultados obtidos foram relativamente baixos em todos os tratamentos, onde a maior atividade específica da protease foi observada utilizando o isolado *T. tomentosum* na presença de micélio macerado de *Fusarium solani*. Ou seja, mesmo utilizando uma metodologia diferenciada da usada neste trabalho, os fungos *Trichoderma* também não obtiveram um potencial elevado da atividade da protease. O autor ainda cita que a diferença de valores da atividade da protease pode estar relacionada com a composição da fonte indutora presente no meio de cultura.

Souza (2015) utilizou em seu estudo o meio de cultura Ágar-leite, o mesmo utilizado também neste trabalho, para avaliar a produção de proteases extracelular de 17 fungos filamentosos, entre estes fungos do gênero *Trichoderma*. Dentre as espécies analisadas, 8 espécies, incluindo os *Trichoderma*, também não apresentaram formação de halo ao redor das colônias, embora também tenha se observado o crescimento dos fungos. Estes resultados corroboram com o nosso estudo.

A disponibilidade de carbono e fontes de nitrogênio no meio de cultura é importante para que sejam produzidas as proteases, onde esses dois parâmetros exercem efeito regulatório sobre a síntese da enzima. Vários estudos utilizam como fonte indutora

para produção das proteases glicose, nitrogênio, extrato de leveduras, caseína ou peptona (HADDAR et al., 2010). No entanto, Laxman et al. (2005), observaram que as melhores fontes de nitrogênio orgânico para produção das peptidases são, extrato de levedura, peptona e caseína.

5.4 Análise: Amilase

Foi observado nos 58 isolados o halo de degradação, onde todos os isolados apresentaram resultado positivo para a produção da amilase. Os isolados obtiveram um bom desenvolvimento no meio de cultura e a produção da enzima foi detectada pela degradação do amido no meio de cultura, onde a região amarela mais escura ao redor da colônia indica o halo de degradação desta enzima, conforme a Figura 6.

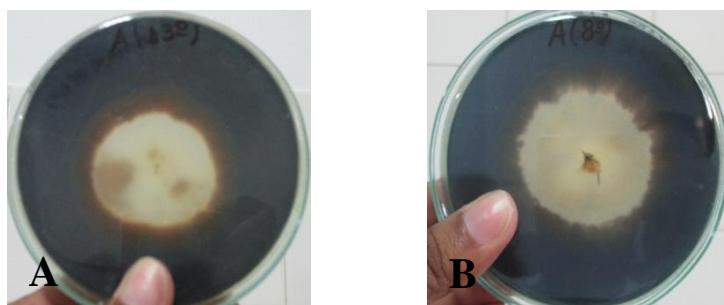


Figura 6. Teste qualitativo de produção da enzima amilase. Com formação do halo de degradação pelos isolados T. 37 (A- reverso) e T.30 (B- reverso).

Vários trabalhos utilizando metodologias distintas ao adotado no presente estudo confirmam que várias espécies são capazes de produzir enzima amilase.

Azevedo et al. (2000), utilizaram meio cultivo contendo peptona bacteriológica; Fosfato monopotássico - KH_2PO_4 ; Sulfato de Magnésio Heptahidratado- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Sulfato de amónio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Cloreto de cálcio - CaCl_2 ; glucose; ureia; traços dos elementos (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+}) e mesmo utilizando uma metodologia diferente deste trabalho, constataram em seus estudos que o fungo *Trichoderma harzianum* também apresentou maior atividade amilolítica em relação à outros fungos isolados do solo ou do ambiente. E que a amilase produzida por *Trichoderma* pode ser importante para a sua sobrevivência no campo, pois são responsáveis pela hidrólise do amido. Os autores também utilizaram meio de cultura sólidos contendo amido solúvel, onde era observado o halo de degradação ao redor da colônia. A excreção de amilase parece não estar associada com fitopatógenos, pois foi detectada em todas as espécies de *Trichoderma* estudadas (BARBOSA et al., 2001).

Marques (2007) avaliou um complexo multienzimático produzido por fungos *Trichoderma harzianum*. A atividade amilolítica foi determinada utilizando uma mistura que também continha o amido solúvel como substrato, porém a leitura foi realizada utilizando espectrofotômetro. A análise constatou que este fungo é um potencial produtor de amilase, assim como xinalase e celulase, o tornando um importante fungo para produção de enzimas com potencial para aplicação em formulações em rações para aves de corte.

Os autores Atmaja e Khairul (2013), avaliaram quantitativamente a atividade da enzima amilase, utilizando espectrofotômetro UV-visível (faixa 400-600 nm) envolvendo a maltose com reagentes DNS (ácido dinitrosalicílico). Foi observado que a alfa-amilase

pode ser produzida por *Trichoderma viride* FNCC 6013 utilizando meios de fermentação com a presença de amilose como uma fonte de carbono.

5.5 Análise: Celulase

Não foi observado nos 58 isolados o halo de degradação, onde todos os isolados apresentaram resultado negativo para a produção da enzima celulase. Os isolados não obtiveram um bom crescimento no meio de cultura, conforme a Figura 7.

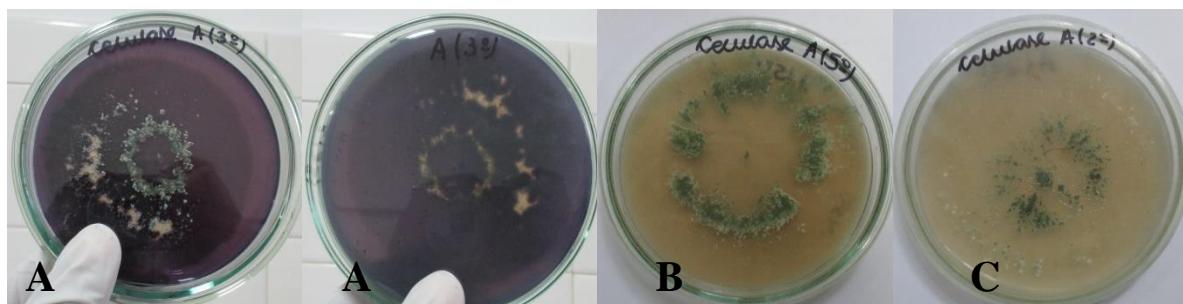


Figura 7. Teste qualitativo de produção da enzima celulase. Sem a formação do halo de degradação pelo isolado T. 5 (A- verso e reverso); e o pouco desenvolvimento no meio de cultura dos isolados T. 14 (B) e T. 3 (C).

Embora no presente trabalho não tenha encontrado resultado satisfatório para a atividade da celulase, atualmente alguns autores descrevem fungos do gênero *Trichoderma* como bons produtores de enzimas do complexo celulolítico utilizando distintas metodologias (CASTRO; PEREIRA JR, 2010; BASSO et al. 2010; MAEDA et al., 2011; GERHARDT et al. 2015).

Oitenta linhagens de fungos foram caracterizadas de acordo com atividade da celulase utilizando o papel de filtro (FPase) e CMC como fonte de carbono utilizado para crescimento e produção da enzima, sendo esta última a mesma utilizada neste trabalho. Entre os fungos estudados pelos autores estão algumas espécies de *Trichoderma*, tais como: (*T. harzianum*, *T. inhamatum*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum*, *T. pseudokoningii* e *T. viride*), onde algumas destas colônias mesmo com pouco crescimento puderam apresentar maiores índices enzimáticos. Pôde-se então concluir que o índice enzimático não foi um bom parâmetro para avaliar a atividade enzimática das linhagens (RUEGGER; TAUK-TORNISIELO, 2004). O pouco desenvolvimento dos isolados foi observado e algumas espécies de *Trichoderma* também não produziram o halo de degradação, como os resultados aqui encontrados.

Segundo, Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004), assim como neste trabalho, também não foi possível observar o halo indicador de degradação da CMC em algumas linhagens do gênero *Trichoderma*, considerados como bons produtores de celulases. Isto ocorre porque a visualização do halo de degradação é dependente de vários fatores, além da composição do meio de cultura. Sendo assim, algumas substâncias químicas do meio de cultura podem acabar interferindo no corante utilizado e proporcionar resultados de falsos-positivos, ou também provocar a sua precipitação ou ainda acabar inibindo a ligação destes com polissacarídeos (NEIROTTI; AZEVEDO 1988).

Estudos realizados por Nogueira e Cavalcanti (1996) citam que após o período de incubação as placas de Petri com os isolados foram submetidas a choque térmico por 16 h a 50 °C e pH entorno de 7,8. Já neste estudo não foi utilizado este choque térmico e o pH estava entorno de 5, isto pode ter interferido no padrão de cor do corante.

Portanto, a produção de celulases é dependente do tipo de substrato e a utilização de alguns métodos torna difícil a comparação com outros autores. É importante ressaltar que os fungos que produzem celulase na natureza, não ocupam o mesmo nicho ecológico em meios de cultura pura, onde a competição é inexistente, pois quando há a associação com outros micro-organismos ocorre à completa mineralização dos substratos celulósicos nos ecossistemas onde estão inseridos (GARLIPP, 1995).

5.6 Análise: Pectinase

Não foi observado nos 58 isolados o halo de degradação, onde todos os isolados apresentaram resultado negativo para a produção da enzima pectinase. Os isolados não obtiveram um bom crescimento no meio de cultura, conforme a Figura 8.

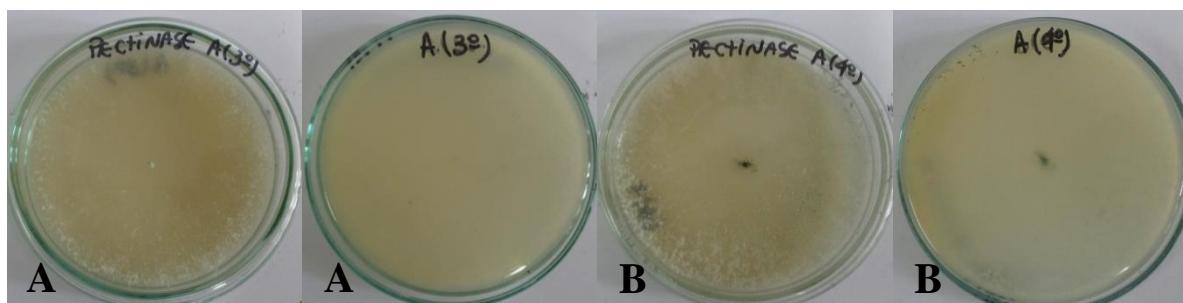


Figura 8. Teste qualitativo de produção da enzima pectinase e pouco desenvolvimento no meio de cultura. Sem a formação do halo de degradação pelo isolado T. 5 (A- verso e reverso); T. 10 (B- verso e reverso).

Nabi et al. (2003), obtiveram resultados positivos para produção de pectinase, diferente dos resultados encontrados neste presente trabalho, porém os autores utilizaram ao meio de cultura cascas de frutas cítricas como substrato para o desenvolvimento do fungo *Trichoderma harzianum*, em condições de pH 5,5 a 28 °C durante 72 h e obtiveram como resultado a máxima produção da enzima pectinase em fermentação em estado sólido de (16.2 U/mL/min). O estudo apresentado por estes autores em que fazem uma investigação da fisiologia, características bioquímicas, assim como o meio de nutrientes utilizado por cada fungo analisado e as condições de crescimento, mostrou que o fungo *Trichoderma viride* apresentou a atividade da pectinase elevada em meio de cultura líquida que possuía também como fonte de carbono soro de leite. Sendo que a atividade da enzima se elevava ainda mais quando a pectina de beterraba era adicionada ao meio de cultivo como fonte de carbono, em condições de pH 7,5 a 30 °C. Já neste presente estudo o meio de cultura continha apenas pectina cítrica, o que pode ter influenciado nos resultados observados.

Kutateladze et al., 2009 verificaram que outros compostos como a peptona, a caseína e o sulfato amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ são adicionados ao meio de cultura servindo como fonte de nitrogênio, já que estes são produtos bem utilizados por quase todas as cepas selecionadas para produção de pectinase.

Em outro estudo utilizando a casca de laranja, que é um co-produto de baixo custo para fermentação em estado sólido, onde também foi adicionada ao meio de cultura, além da glucose; sulfato de magnésio heptahidratado- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; cloreto de cálcio hidratado- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; cloreto de amônio- NH_4Cl e tiamina para o crescimento do fungo *Trichoderma viride*. A determinação da pectinase foi através da redução do açúcar produzido, como resultado da hidrólise enzimática da pectina pelo reagente

ácido dinitrossalicílico (DNS). Nestas condições, que é um pouco diferente das condições utilizadas neste trabalho, o fungo estudado apresentou produção de pectinase elevada, sendo o rendimento máximo da enzima de (325 U / mL) a 30 °C e pH 5,5 com uma concentração de substrato de 4% no quarto dia de fermentação (IRSHAD et al., 2014).

Anisa e Girish (2014) isolaram o fungo *Trichoderma viride* a partir de resíduos agrícolas e estrume em meio de cultura Ágar-pectina, igual ao adotado neste trabalho, para a avaliação da sua capacidade de produzir enzimas pectinolíticas. Porém a forma de determinação da enzima foi diferente, onde os autores utilizaram uma solução de iodeto de potássio sobre as culturas, e observaram a presença de zonas claras que indicava a capacidade pectinolítica dos fungos. Este estudo foi bem sucedido em isolar e identificar este fungo como um bom produtor de enzimas pectinolíticas e novos estudos pode ajudar na produção desta enzima em larga escala.

5.7 Análise: Fitase

Dos 58 isolados observados, 57 não apresentaram o halo de degradação, os quais apresentaram resultado negativo para a produção da enzima fitase, porém um isolado (T. 34) apresentou o halo de degradação, sendo para este, o resultado positivo para a produção da enzima. O isolado T. 34 obteve resultado positivo para esta enzima e de acordo com a análise morfológica foi identificado como sendo da espécie *Trichoderma longibrachiatum* (Figura 9).

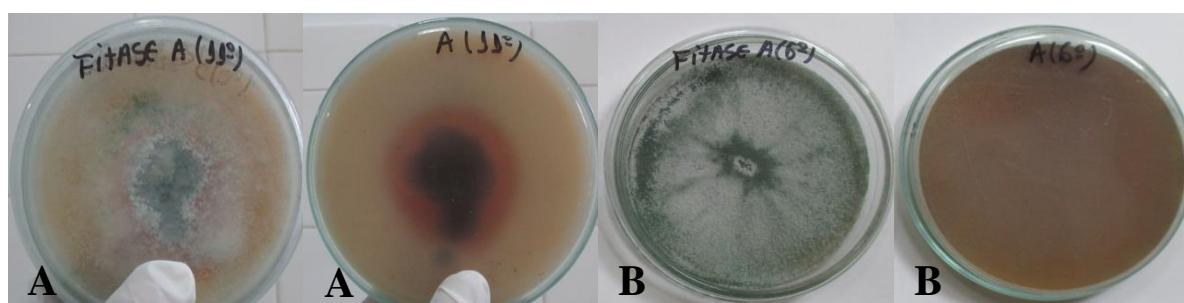


Figura 9. Teste qualitativo de produção da enzima fitase. Com a formação do halo de degradação pelo isolado T. 34 (A- verso e reverso); Sem a formação do halo de degradação pelo isolado T. 19 (B- verso e reverso).

É conhecido que as fitases são enzimas pertencentes à família da fosfatasas ácidas que podem ser produzidas por micro-organismos e plantas (LEI; PORRES, 2003). Estas enzimas são capazes de liberar o fósforo da molécula de ácido fítico (BALI; SATYANARAYANA, 2001).

Sendo assim, Lima (2006), também observou o desenvolvimento do *Trichoderma harzianum* e verificou que o fungo foi capaz de produzir fosfatase ácida, fosfatase alcalina, e outras enzimas, sendo que neste caso as enzimas estavam presentes no sobrenadante de cultura líquida contendo farelo de soja e de milho.

Leitão et al. (2010), pela primeira vez purificaram a fosfatase ácida secretada pelo fungo *Trichoderma harzianum* utilizando como substrato o 4-metilumbeliferil fosfato para induzir ao fungo produzir fosfatase ácida, onde foi observado que esta enzima foi capaz de hidrolisar o ácido fítico, comprovando desta forma a atividade da fitase. Portanto esta enzima apresentou características quanto à especificidade pelo substrato e inibição de íons, sendo de grande interesse em processos biotecnológicos, pois é possível disponibilizar fósforo inorgânico de diversos fosforilados, incluindo o ácido fítico.

Castro e Pereira Jr (2010), no estudo dos isolados fúngicos também não observaram à visualização do halo de degradação, no entanto, os autores citam que a dificuldade na visualização no halo de degradação pode ter ocorrido pelo crescimento expansivo da colônia, visto que após o período de incubação a colônia estava ocupando toda a placa de Petri. No presente trabalho também foi observado que os fungos tiveram um crescimento expansivo, ocupando desta forma toda a placa. Portanto, a não visualização do halo de degradação pode estar relacionada a este crescimento expansivo dos fungos.

Cunha et al. (2015), avaliaram a produção de fitase por fungos isolados na região do Alto Paranaíba, no estado de Minas Gerais. Sendo utilizados para estudo, os isolados de *Rhizopus sp.*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma sp.*, *Xylaria sp.*, e *Fusarium sp.*. A metodologia utilizada foi diferente da adotada neste trabalho, onde os autores utilizaram meio de cultura líquido composto por infusão de batata; sacarose; peptona; Tween 20 e CaCl₂, com pH ajustado para 5,5. A atividade enzimática foi determinada no sobrenadante das culturas, medindo o fosfato inorgânico liberado. Porém, dentre estes isolados, os fungos *Trichoderma sp.* também não apresentaram atividade enzimática significativa para fitase.

6 CONCLUSÃO

- 18 isolados foram identificados como sendo *Trichoderma atroviride* (Grupo I), 6 isolados como *Trichoderma asperelloide* (Grupo II), 14 isolados como *Trichoderma harzianum* (Grupo III) e 4 isolados como *Trichoderma longibrachiatum* (Grupo IV), através da identificação morfológica e molecular. De acordo com a identificação morfológica os Grupos X e XI são da espécie *Trichoderma asperelloide*, os Grupos V, VI e XII são da espécie *Trichoderma harzianum* e os Grupos VII, VIII e IX como sendo da espécie *Trichoderma longibrachiatum*.
- Todos os isolados obtiveram resultado negativo para produção de peptidase, celulase, pectinase e resultado positivo para produção de amilase. Apenas uma cepa T. 34 apresentou resultado positivo para produção de fitase.
- As espécies identificadas como: *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma asperelloide*, *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma longibrachiatum*, de acordo com as análises testadas podem ser utilizados em processos biotecnológicos que envolvam apenas atividade enzimática amilolítica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHÃO NETO, J. Algumas aplicações de enzimas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). **Biotecnologia industrial – processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001. 405-412 p.
- ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: Aplicações biotecnológicas. **Revista UNINGÁ Review**, v. 21, n. 1, p. 55-59, 2015.
- AGUIAR, C. M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger***. 2010. 118 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Paraná, 2010.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artes Médicas. 1997. 1396p.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. In: (Ed.). 4. New York: John Wiley Sons, Inc., 1996.
- ALVES, N. M. **Produção de fitase por fungo endofítico**. 2014. 60 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais/MG, 2014.
- ANDRADE, R. L. P.; MARTINS, J. F. P. Influência da adição da fécula de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 249-253, 2002.
- ANISA, S. K.; GIRISH, K. Pectinolytic Activity of *Rhizopus* sp., and *Trichoderma viride*. **International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 28-31, 2014.
- ATMAJA, D. S.; KHAIRUL, W. Isolasi, purifikasi dan karakterisasi α – amilase dari *Trichoderma viride* FNCC 6013. **Chemical Information**, v. 1, n. 1, p. 85-93, 2013.
- AZEVEDO, A. M. C.; De MARCO, J. L.; FELIX, C. R. Characterization of amylase produced by a *Trichoderma harzianum* isolate with antagonistic activity against *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches broom of cocoa. **Microbiology Letters**, v. 188, p. 171-175, 2000.
- BAILEY, M. J.; PESSA, E. Strain and process for production of polygalacturonase. **Enzyme Microbial Technology**, v. 12, n. 4, p. 266-271, 1990.
- BALI, A.; SATYNARAYNA, T. Microbiol phytases in nutrition and combating phosphorus pollution. **Everyman's Science**, v. 4, p. 207-209, 2001.
- BARBOSA, M. A. G.; REHN, K. G.; MENEZES, M.; R. L. R. MARIANO. Antagonism of *Trichoderma* species on *cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 98-104, 2001.

BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C. Atividade celulolítica de fungos filamentosos isolados de bagaço de cana de açúcar e madeira em decomposição. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 11, p. 1282-1289, 2010.

BATEMAN, D. F.; BASHAM, H. G. Degradation of plant-cell walls and membranes by microbial enzymes. In: HEITEFUSS R.; WILLIAMS, P. H. (Eds.). **Encyclopedia of Plant Physiology. New Series: Physiological Plant Pathology**. New York: Springer-Verlag, 2001. 316-355 p.

BCC RESEARCH – MARKET FORECASTING. 2014. **Enzymes in Industrial Applications: Global Markets**. Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-bio030h.html>>. Acesso: 18 ago. 2015.

BENÍTEZ, T. L. C.; DELGADO-JARANA, J.; REY, M. Glucanolytic and other enzymes and their genes. In: Harman G E, Kubicek C, editors; Harman G E, Kubicek C, editors. *Trichoderma and Gliocladium: enzymes, biological control and commercial applications*. London, United Kingdom: Taylor and Francis, v. 2, p. 101-127, 1998.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v.18, n. 5, p. 355-383, 2000.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 15, n. (3/4), p. 583-620, 1997.

BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. Nov. **Canadian Journal of Botany**, v. 62, p. 924-31, 1984.

BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma spp.*, Infrageneric classification **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 2357-2372, 1991.

BOHN, L.; MEYER, A.; RASMUSSEN, S. Phytase: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 9, p. 165-191, 2008.

BOMFIM, M. P.; SÃO JOSÉ, A. R.; REBOUÇAS, T. N. H.; ALMEIDA, S. S.; SOUZA, I. V. B; DIAS, N. O. Avaliação antagônica in vitro e in vivo de *Trichoderma spp.* a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathol**, v. 36, n. 1, p. 61-67, 2010.

BON, E. P. S.; PEREIRA J. R., N.; GOTTSCHALK, L. M. F.; SÁ-PEREIRA, P.; ROSEIRO, J. C.; FERRARA, M. A. Bioprocessos para a produção de enzimas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. A.; CORVO, M. L. (Eds.). **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. 95-122 p.

BON, E. P.; VERMELHO, A. B. **Queratinases. Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. 1. ed. Rio de Janeiro, Legis Summa, 2004.

BORGES, J. G; COSTA, L. A. S; DRUZIAN, J. I. Produção e caracterização de biomassa extracelular obtida por fermentação submersa usando *Lasidioplodia theobromae* isolado do cacau. **Polímeros**, v. 24, n. 1, p. 52-57, 2014.

BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- ESALQ/USP, Piracicaba, 2011.

BOSWELL, G. P.; JACOBS, H.; DAVIDSON, F. A.; GADD, G. M.; RITZ, K. Growth and Function of Fungal Mycelia in Heterogeneous Environments. **Bulletin of Mathematical Biology**, Elmsford, v. 65, n. 3, p. 447-477, 2003.

BRAÚNA, L. M. **Controle Biológico do Mofo Branco por Isolados de *Trichoderma* nas Culturas de Soja e Feijão Comum**. 2011. 94 f. (Dissertação em Fitopatologia) – Universidade de Brasília - DF, 2011.

BROTMAN, Y.; GUPTA, J. K.; VITERBO, A. *Trichoderma*. **Current Biology**, v. 20, p. 390-391, 2010.

BRUNS, T. D.; WHITE, T. J.; TAYLOR, J. W. Fungal molecular systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 22, p. 525-64, 1991.

CASTRO, A. M; PEREIRA, N. J. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CELESTINO, S. M. C. et al. Purification and characterization of a novel pectinase from Acrophialophora nainiana with emphasis on its physicochemical properties. **Journal of Biotechnology**, v. 123, n. 1, p. 33-42, 2006.

CHANDRA, M.; KALRA, A.; SHARMA, P.K.; KUMAR, H.; SANGWAN, R.S. Optimization of cellulases production by *Trichoderma citrinoviride* on mark of *Artemisia annua* and its application for bioconversion process. **Biomass and Bioenergy**. v. 34, n. 5, p. 805-811, 2010.

CHAVERRI, P.; CASTLEBURY, L. A.; SAMUELS, G. J.; GEISER, D. M. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. **Mol Phylogenet Evol**, v. 27, n. 2, p. 302-313, 2003b.

CHAVERRI, P.; SAMUELS, G. J. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): Species with green ascospores. **Studies in Mycology**, v. 48, p. 101-119, 2003.

CHEN, B. Y.; JANES, H. W. **PCR Cloning Protocols**. Second edition. New Brunswick, NJ: Humana Press, 2002.

CHUNG, T. K.; RUTHERFURD S. M.; THOMAS D. V.; MOUGHAN, P. J. Effect of two microbial phytases on mineral availability and retention and bone mineral density in low-phosphorus diets for broilers. **British Poultry Science**, v. 54, p. 362-373, 2013.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. 2006. 206 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

COLONIA, B. S. O.; CHAGAS JUNIOR, A. F. Screening and detection of extra cellular celulases (Endo – and Exo- glucanases) seecreted by filamentous fungi isolated from

soils using rapid tests with chromogenic dyes. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 52, p. 4694-4701, 2014.

CROUS, P. W.; VERKLEY, G. J. M.; GROENEWALD, J. Z.; SAMSON, R. A. 2009, **Fungal Biodiversity**. Vol. 1, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Netherlands.

CUNHA, M. C.; MONTEIRO, P. S.; MENDES, F. Q. Caracterização bioquímica de fitases produzidas por fungos isolados na região do Alto Paranaíba em Minas Gerais. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 13, p. 61-69, 2015.

DE LA CRUZ, J.; A. LLOBELL. Purification and properties of a basic endo- β - 1, 6-glycanase (BGN16.1) from the antagonistic fungus *Trichoderma harzianum*. **Eur. Journal of Biochemistry**. v. 265, p. 145–151, 1999.

DEBNATH, D.; PAL, A. K.; SAHU, N. P.; JAIN, K. K.; YENGKOKPAM, S.; MUKHERJEE, S. C. Effect of dietary microbial phytase supplementation on growth and nutrient digestibility of *Pangasius pangasius* (Hamilton) fingerlings. **Aquaculture Research**, v. 36, p. 180-187, 2005.

DODD, S. L.; LIECKFELDT, E.; SAMUELS, G. J. *Hypocrea atroviridi* ssp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. **Mycologia**, v. 95, n. 1, p. 27- 40, 2003.

DORGE, T.; CARSTENSEN, J. M.; FRISVAD, J. C. Direct identification of pure *Penicillium* species using image analysis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 41, p. 121-133, 2000.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

DRUZHININA, I. S.; KOPCHINSKIY, A. G.; KUBICEK, C. P. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. **Mycoscience**, v. 47, p. 55-64, 2006.

DRUZHININA, I. S.; KUBICEK, C. P. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 6, n. 2, p. 100-112, 2005.

DRUZHININA, I. S.; SEIDL-SEIBOTH, V.; HERRERA-ESTRELLA, A.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C. M.; MONTE, E.; MUKHERJEE, P. K.; ZEILINGER, S.; GRIGORIEV, I. V.; KUBICEK, C. P. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success, **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 749–759, 2011.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos – Uma Introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. editora: Educs, 2010. 10-44 p.

ETHUR, L. Z. **Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro**. 2006. 155 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Santa Maria - Santa Maria, RS, 2006.

EUROPEAN COMMISSION. **Collection of information on enzymes – final report.** Contractno.B4-3040/2000/278245/MAR/E2, 2002. Disponível em: <<http://ec.europa.eu/environment/archives/dansub/pdfs/enzymerepcomplete.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2015.

FERNANDES, M. L. M. et al. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in AOT/Isooctane reversed micellar system. **Journal of Molecular Catalysis: Enzymatic**, v. 30, p. 43-49, 2004.

FERNANDES, M. L. M. **Produção de Lípases por Fermentação no estado sólido e sua utilização em Biocatálise.** Universidade Federal do Paraná, 2007. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/1884/10745/1/maria%20luiza.PDF>>. Acesso em: 19 ago. 2015.

FRANCO, M. N. **Produção de Celulases por Actinomicetos em Resíduos Agro Industriais, visando a Obtenção de Bioetanol.** 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

GAMS, W.; BISSET, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: HARMAN, G.; KUBICET, C. P. (Eds.). **Trichoderma and Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy and Genetics.** London: Taylor e Francis, 1998. 3-34 p.

GARLIPP, A. B. **Isolamento e identificação de fungos filamentosos do solo do Banhado Grande, na Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP.** 1995. 92 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1995.

GEREMIA, R., GOLDMAN, G. H., JACOBS, D., ARDILES, W., VILA, S. B., VAN-MONTAGU, M.; HERRERA-ESTRELLA, A. Molecular characterization of the proteinase encoding gene prb1, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*, v. 8, p. 603-613, 1993.

GERHARDT, J. A.; CARVALHO, I. F.; SILVA, M. L.; POLIZELI, M. L. T. M.; ALNOCH, R. C. Avaliação da atividade celulolítica de fungos filamentosos isolados de amostras de solo da região norte do estado de mato grosso. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer** - Goiânia, v. 11 n. 21; p. 1971-1981, 2015.

GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; SOCCOL, C. R. Caracterization and stability of proteases from *Penicillium sp.* produced by solid-state fermentation, **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, n. 2, p. 246-251, 2003.

GOPINATH, S. C. B.; ANBU, P.; HILDA, A. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. **Mycoscience**, v. 46, n. 2, p. 119-126, 2005.

GUERRA, J. B. **Melhoramento de *Bacillus* produtores de alfa-amilases, por fusão de protoplastos.** 1991. 68 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG, 1991.

GUIMARÃES, L. H. S. et al. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 474-480, 2006.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, London, v. 38, n. 11, p. 1-18, 2003.

HADDAR, A. et al. Low-cost fermentation medium for alkaline protease production by *Bacillus mojavensis* A21 using hulled grain of wheat and sardinella peptone, v. 110, n. 3, p. 288-294, 2010.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, New York, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. Amilase Fúngica. In: **Bioquímica das Fermentações**. [S.l.]: [s.n.], 1982. 56 p.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I. E.; LORITO, M. *Trichoderma* species – Opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43-56, 2004.

HARMAN, G.E.; HERRERA-ESTRELLA, A.H.; HORWITZ, B.A; LORITO, M. Special issue: *Trichoderma*-from basic Biology to Biotechnology. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 1-2, 2012.

HERMOSA, M. R.; GRONDONA, I.; ITURRIAGA , E. A.; DIAZ-MINGUEZ, J. M.; CASTRO, C.; MONTE, E.; GARCIA-ACHA. Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of *Trichoderma spp*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 1890-1898, 2000.

HERMOSA, R.; RUBIO, M. B.; CARDOZA, R. E.; NICOLÁS, C.; MONTE, E.; GUTIÉRREZ, S. The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. **International Microbiology**, v. 16, p. 69-80, 2013.

HERMOSA, R.; VITERBO, A.; CHET, I.; MONTE, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **International Microbiology**, v. 158, p. 17-25, 2012.

HOOG, G. S; GUARRO, J.; GENE, J.; FIGUERAS, M. J. **Atlas de hongosclínicos**, 2^a ed, Ed CBS Utrece y the Netherlands, v. 2, p.1-1126, 2000.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v. 87, n. 1, p. 4-10, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), 2015. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 27 maio 2015.

IRSHAD, M.; ANWAR, Z.; MAHMOOD, Z.; AQIL, T.; MEHMMOD, S.; NAWAZ, H. Bio-processing of agro-industrial waste orange peel for induced production of pectinase by *Trichoderma viridi*; its purification and characterization. **Turkish Journal of Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 9-18, 2014.

JEGANNATHAN, K. R.; NIELSEN, P. H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production - a literature review. **Journal of Cleaner Production**, v. 42, p. 228-240, 2013.

JONG S. C.; ATKINS W. B. **Conservation, collection and distribution of cultures**. In: Fungi Pathogenic for Humans and Animals. Pt B: Pathogenicity and Detection II (HDH Howard, ed), Marcel Dekker, Inc, New York, NY, USA, 1985. 153-194 p.

JOSHI, C. P.; MANSFIELD, S. D. The cellulose paradox - simple molecule, complex biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, p. 220-226, 2007.

KASHYAP, D.R. et al. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.

KHAN, M.; NAKKEERAN, E.; UMESH-KUMAR, S. Potential application of pectinase in developing functional foods. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 4, p. 21-34, 2013.

KREDICS, L.; ANTAL, Z.; MANCZINGER, L.; SZEKERES, A.; KEVEI, F.; NAGY, E. Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, n. 1, p. 37-42, 2003.

KUBICEK C. P. The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*: structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation. **Advances in biochemical engineering, biotechnology**, v. 45, p. 1-27, 1992.

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

KUMAR, K.; AMARESAN, N.; BHAGAT, S.; MADHURI, K.; SRIVASTAVA, R. C. Isolation and characterization of *Trichoderma spp.* for antagonistic activity against root rot and foliar pathogens. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 137-144, 2012.

KUMAR, V.; SINHA, A. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. **Food and Chemistry**, v. 120, p. 945-959, 2010.

KUNIEDA-ALONSO, S.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A. Sobrevivência de micélio e escleródios de *Rhizoctonia solani* tratados com *Trichoderma spp.* em restos de cultura de *Eucalyptus sp.* **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 164-168, 2005.

KUTATELADZE, L.; ZAKARIASHVILI, N.; JOBAVA, M.; URUSHADZE, T.; KHVEDELIDZE, R.; KHOKHASHVILI, I. Selection of Microscopic Fungi - Pectinase Producers. **Bulletin of The Georgian National Academy of Sciences**, v. 3, n. 1, 2009.

LARENA, I.; SALAZAR, O.; GONZALEZ, V.; JULIAN, M. C.; RUBIO, V. Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. **Journal of Biotechnology**, v. 75, p. 187-194, 1999.

LAXMAN, R. S. et al. Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3152-3158, 2005.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 6. ed. São Paulo: Artmed, 2014. 1336 p.

LEI, G. X.; PORRES, M. J. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1787-1794, 2003.

LEITÃO, V. O.; LIMA, R. C. M.; VAINSTEIN, M. H.; ULHOA, C. J. Purification and characterization of an acid phosphatase from *Trichoderma harzianum*. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 8, p. 1083-1088, 2010.

LIMA, M. C. R. **Caracterização Bioquímica de uma fosfatase ácida produzida por Trichoderma harzianum**. 2006. 54 f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Goiânia, 2006.

LIU, B. L., RAFIQ, A., TZENG, Y. M. AND ROB, A. The induction and characterization of phytase and beyond. **Enzyme and Microbial Technology**, v.22, p. 415–424, 1998.

LO, C.; HSIE, J.; PENG, K. Screening strains of *Trichoderma spp.* For decomposition of agriculture wastes. **Phytopathology**, v. 101, n. 6, p. 101-109, 2011.

LORITO, M.; WOO, S.L.; HARMAN, G.E.; MONTE, E. Translational research on *Trichoderma*: from ‘Omics to the field. **Annual Review of Phytopathol**, v. 48, p. 395-417, 2010.

MACHADO, M. F. D.; PARZIANELLO, R. F.; SILVA, F. C. A.; ANTONIOLLI, I. Z. *Trichoderma* no Brasil: O Fungo e O Bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.

MACIEL, M. H. C. **Abordagem polifásica para identificação de linhagens de Aspergillus seção Nigri preservadas na micoteca URM e caracterização quanto a produção e purificação de poligalacturonases**. 2013. 151 f. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

MAEDA, R. N.; SERPA, V. I.; ROCHA, V. A. L.; MESQUITA, R. A. A.; SANTA ANNA, L. M. M.; CASTRO, A. M. de; DRIEMEIER, C. E.; PEREIRA Jr, N.; POLIKARPOV, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1196-1201, 2011.

MAHAJAN, R. T.; BADGUJAR, S. B. Biological aspects of proteolytic enzymes: a review, **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, n. 9, p. 2048-2068, 2010.

MALLER, A. **Produção, purificação e caracterização do complexo pectinolítico do fungo Aspergillus niveus**. 2008. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP, 2008.

MARQUES, S. F. F. **Biotecnologia enzimática: produção de complexo multienzimático de Trichoderma harzianum e sua aplicação na alimentação de frangos de corte**. 2007. 92 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

MARTINS, C. Y. S. **Promoção de Crescimento e Colonização Radicular por *Trichoderma spp.* em Pinhão Manso (*Jatropha curcas L.*) e Mamoneira (*Ricinus communis L.*).** 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2010.

MELO, I. S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma spp.* no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL. W. (Org) **Controle biológico de doenças de plantas.** Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, p. 135-156, 1991.

MELO, I. S.; COSTA, F. G. Desenvolvimento de uma formulação granulada a base de *Trichoderma harzianum* para controle de fitopatógenos. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, Comunicado Técnico 31, 2005.

MENDONZA, D. P. G. **Variações do secretoma de *Trichoderma harzianum* em resposta a diferentes fontes de carbono.** 2009. 80 f. (Mestrado) - Biologia Celular, Universidade de Brasília, 2009.

MENEZES, J. P.; LUPATINI, M.; ANTONIOLLI, Z. I.; BLUME, E.; JUNGES, E.; MANZONI, C. G. Variabilidade Genética na Região ITS do rDNA DE ISOLADOS DE *Trichoderma spp.* (Biocontrolador) e *Fusarium Oryxporum f. sp. Chrysanthemi*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 132-139, 2010.

MITIDIERI, S., et al. Detergentes biológicos biodegradáveis: avaliação das formulações do mercado. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 26, p. 56-60, 2002.

MUKESH KUMAR, D. J. et al. Production and Optimization of Pectinase from *Bacillus* sp. MFW7 using Cassava Waste. **Asian Journal of Plant Science and Research**, v. 2, n. 3, p. 369-375, 2012.

MUKHERJEE, P. K.; HORWITZ, B. A; HERRERA-ESTRELLA, A.; SCHMOLL, M.; KENERLEY, C. M. *Trichoderma* Research in the genome era. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, p. 105-129, 2013.

MURO, M. A.; LUCHI, M. R. **Preservação de Micro-organismos.** Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”. Campinas, 1989. 92 p.

NABI, N. G.; ASGHER, M.; SHAH, A. H.; SHEIKH, M. A.; ASAD, M. J. Production of pectinase by *Trichoderma harzianum* in solid state fermentation of citrus peel, v. 40, p. 3-4, 2003.

NC-IUBMB, Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. **Enzyme nomenclature.** San Diego: Academic Press, 1992. 862 p.

NEIROTTI, E.; AZEVEDO, J. L. Técnica semiquantitativa de avaliação da produção de celulases em *Humicola sp.* **Revista de Microbiologia**, v. 19, p. 78-81, 1988.

NOGUEIRA, E. B. S; CAVALCANTI, M. A. Q. Cellulolytic fungi isolated from process edoats. **Revista de Microbiologia**, v. 27, n. 1, p. 7-9, 1996.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações. **Revista de Saúde e Biologia**, v.7, n.3, p. 97-109, 2012.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Enzyme Technology**. New Delhi: Asiatech Publishers, 2005. 760 p.

PARIS, L. D. **Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólido das sojas orgânica, transgênica e convencional**. 2008. 115 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2008.

PASHA, K. M.; ANURADHA, P.; RAO, D. S. Screening of a pectinolytic fungal strain; *Aspergillus foetidus* MTCC 10367 for the production of multiple enzymes of industrial importance. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, n. 2, p. 1205-1209, 2013.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Micro-organismos endofíticos: interação com as plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 29, p. 62-76, 2002.

PEKKARINEN, A., et al. Production of proteases by *Fusarium* species grown on barley grains and in media containing cereal proteins. **Journal of Cereal Science**, London, v. 31, n. 3, p. 253-261, 2000.

PEREDA, J. A. O.; RODRÍGUES, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnologia de Alimentos- Componentes dos Alimentos e Processos**, v. 1, Porto Alegre: Artmed, 2005.

PERES, E.; MELO, I. S. Variabilidade entre isolados de *Trichoderma harzianum*. I- aspectos citológicos. **Scientia Agrícola**, v. 52, p. 56-59, 1995.

PIKOVSKAYA, R. J. Mobilization of phosphorous in soil in connection with vital activity of some microbial species. **Mikrobiologiya**, New York, v.17, p. 362-370, 1948.

POINTING, S. B. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. **Fungal Diversity**, v. 2, p. 17-33, 1999.

POZO, M. J., BAEK, J. M., GARCIA, J. M.; KENERLEY, C. M. Functional analysis of tvsp1, a serine protease-encoding gene in the biocontrol agent *Trichoderma virens*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, p. 336-348, 2004.

QUALHATO, T. F. **Avaliação do perfil enzimático e expressão gênica de cinco espécies de Trichoderma e potencial antagônico contra Fusarium solani, Rhizoctonia solani e Sclerotinia sclerotiorum**. 2013. 99 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

RAVEN, P. H.; EVERET, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 856 p.

RAWLINGS, N. D.; TOLLE, D. P.; BARRETT A. J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. **Biochemical Journal**, v. 378, p. 705-716, 2004.

RIFAI, M.A. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycological Papers**, Wallingford, v. 116, p.1-56, 1969.

RUEGGER, M. J. S. **Atividade Enzimática e Produção de Ácido Gama- Linolênico por Fungos Filamentosos Isolados de Solo, da Estação Ecológica de Juréia-ITATINS, SP.** 2001. 98 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, 2001.

RUEGGER, M. J. S.; TAUK-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa, v. 1, p. 416, 2004.

SALMON, D. N. X. **Desenvolvimento de um bioprocesso para a produção, caracterização e recuperação da fitase de *Schizophyllum commune* obtida por fermentação em estado sólido.** 2011. 107 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

SAMSON, R. A.; HOUBREAKEN, J.; THRANE, U.; FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B. 2010, **Food and Indoor Fungi**, Vol. 2., CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. Utrecht, Netherlands.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma: A guide to identification and biology*. Beltsville: USDA/ARS, p.54, 2006a.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma: a review of biology and systematics of the genus. Mycology Research*, v. 100, p. 923-935, 1996.

SAMUELS, G. J.; CHAVERRI, P.; FARR, D. F.; MCCRAY, E. B. (n.d.) **Trichoderma Online, Systematic Botany e Mycology Laboratory**, ARS, USDA. Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/taxadescrptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>>. Acesso em: 2 Set. 2015.

SAMUELS, G. J.; ISMAIEL, A.; BOM, M. C.; RESPINIS, S.; PETRINI, O. *Trichoderma asperellum* sensulato consists of two cryptic species. **Mycologia**, v.102, n. 4, p. 944-966, 2010.

SAMUELS, G. J.; ISMAIEL, A.; MULAW, T. B.; SZAKACS, G.; DRUZHININA, I. S.; KUBICEK, C.P.; JAKLITSCH, W. M. The *Longibrachiatum* Clade of Trichoderma: a revision with new species. **Fungal Diversity**, v. 55, p. 77-108, 2012.

SAMUELS, G.J., LIECKFELDT, E., NIREMBERG, H.I. *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *T. viride*. **Sidowia**, v. 51, n. 1 p. 71-88, 1999.

SANT'ANNA JUNIOR, G. L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). **Biotecnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. 351-362 p.

SANTANA, R. S. M. **Produção de enzimas amilolíticas através da fermentação emestado sólido.** 2012. 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga - BA, 2012.

SANTOS M. V. O. ***Phytophthora spp.* em cultivos diversos no sul da Bahia e identificação de agentes de biocontrole a estes patógenos.** 2010. 105 f. (Dissertação em Produção Vegetal) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - BA, 2010.

SAVITHA, S.; SADHASIVAM, S.; SWAMINATHAN, K.; LIN, F. H. Fungal protease: Production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, p. 298-304, 2011.

SCHMITZ A, RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical Biochemistry**, v. 354, n. 2, p. 311-313, 2006.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 787-799, 2010.

SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 135, p. 1-41, 2007.

SHOUKOUHI, P.; BISSETT, J. **Preferred primers for sequencing the 5' end of the translation elongation factor 1-alpha gene (eEF1a1).** 2008, ISTH Available from: <http://www.isth.info/methods>.

SIDDIQUEE, S.; TAN, S. G.; YUSUF, U. K.; FATIHAH, N. H. N.; HASAN, M. M. Characterization of Malaysian *Trichoderma* isolates using random amplified microsatellites (RAMS). **Molecular Biology Reports**, published online, v. 39, p. 715-722, 2011.

SILVA, R. L. O.; LUZ, J. S. L.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M. T. Fungos endofíticos em *Annona spp.*: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona quamosa L.*). **Acta Botanica Brasilica**, Feira de Santana, v. 20, n. 3, p. 649-655, 2006.

ŠIMKOVIČ, M.; KURUCOVÁ, A.; HUNOVÁ, M.; VAREČKA, L. Induction of secretion of extracellular proteases from *Trichoderma viride*. **Acta Chimica Slovaca**, v.1, n. 1, p. 250-264, 2008.

SIMÕES, M. F.; SANTOS, C.; LIMA, N. Structural Diversity of *Aspergillus* Section *Nigri* Spores. **Microscopy Microanalysis**, v. 19, p. 1-8, 2013.

SIMÕES, M. L. G.; TAUK-TORNISIELO, S. M. Comparação da técnica tradicional e do método turbidimétrico automatizado no cultivo em diferentes fontes de carbono de fungos filamentosos isolados de solo de área de caatinga. **Holos Environment**, v. 5, n. 2, p. 94-103, 2005.

SMITH, O.; ONIONS, A.H.S. **Preservation and Maintaintce of Living Fungi**. CAB International, UK, 1994.

SOARES, I. A et al. Identification of the amylolytic potential of mutant strains of the filamentous fungi *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 700-705, 2010.

SOCCOL, C. R.; ROJAN, P. J.; PATEL, A. K.; WOICIE-CHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. S.; PANDEY, A. Glucoamylase. In: **Enzyme Technology**. New Delhi: **Asiatec Publishers Inc.**, p. 221-230, 2005.

SOUZA, P. M. **Produção de proteases por fungos filamentosos isolados do cerrado do centro-oeste brasileiro**. 2015. 133 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. Application of microbial α -amylase in industry – a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 4, p. 850- 861, 2010.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Enzymatic Activity of microorganisms isolated from yam bean legume (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, p. 382-385, 1998.

STROPARO, E. C.; BEITEL, S. M.; RESENDE, J. T. V.; KNOB, A. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 33, n. 6, p. 2267-2278, 2012.

SUÁREZ, M. B. et al. Characterization of genes encoding novel peptidases in biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413 using the TrichoEST functional genomics approach. **Current Genetics**, v. 51.p. 331-342, 2007.

SUMANTHA, A. et al. Production and partial purification of a neutral metaloprotease by fungal mixed substrate fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 43, n. 4, p. 313-319, 2005.

TAI, M.; STEPHANOPOULOS, G. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. **Metabolic Engineering**, v.15, p. 1-9, 2013.

TAMURA, K.; PETERSON D.; PETERSON N.; STECHER G.; NEI M.; KUMAR S MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, 2011.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 10. ed. Artmed, 2012. 330 p.

TRALAMAZZA, S. M. **Validação da técnica de espectroscopia no infravermelho na taxonomia e sistemática do gênero Aspergillus**. 2011. 87 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

UEDA, S.; FUJIO, Y.; LIM, J.Y. Production and some properties of pectic enzymes from *Aspergillus oryzae*A-3. **Journal of Applied Biochemistry**, v. 4, p. 524-532, 1982.

UENOJO, M; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; KOCSUBÉ, S.; BRANKOVICS, B.; TÓTH, B.; SZIGETI, G.; SAMSON, R. A. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 1-17, 2011.

VITERBO, A. et al., Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* ssp. in the biocontrole of fungal plant pathogens. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 549-556, 2002.

WANDERLEY, M. D.; NEVES, E.; ANDRADE, C. J. Revisão: Aspectos da produção industrial de enzimas. **Revista Ciência, Tecnologia, Inovação e Oportunidade**, v. 1, n. 1, p. 44-50, 2011.

WEEDEN, C. R.; SHELTON, A. M.; HOFFMAN, M. P. **Biological Control: A guide to natural enemies in North America**. Geneva: Cornell University, 2008.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: 315–322 p.

WIDSTEN, P.; KANDELBAUER, A.; Laccase applications in the Forest products industry: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 293-307, 2008.

YADAV, S.; YADAV, P. K.; YADAV, D.; YADAV, K. D. S. Pectin Liase: A review. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 1-10, 2009.

YODER, J. A.; GLENN, B. D.; BENOIT, J. B.; ZETTLERL, W. The giant Madagascar hissing cockroach (*Gromphadorhina portentosa*) as a source of antagonistic moulds: concerns arising from its use in a public setting. **Mycoses**, v. 51, n. 2, p. 95–98, 2008.

ANEXOS

ANEXO A

Tampão de extração CTAB - Método CTAB (DOYLE e DOYLE, 1987).

Tampão A:

Sorbilol	6,38 g
Tris-HCL	1,21 g
EDTA	0,19 g
Agua MilliiQ	100 mL
Ajustar pH = 8,0 com HCL	

Tampão B:

NaCl	11,69 g
CTAB	2,0 g
Tris-HCl	2,42 g
EDTA	1,86 g
Agua MilliiQ	100 mL

Preparo do Tampão de extração CTAB:

Tampão A	40 mL
Tampão B	40 mL
SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio)	8 mL
Bissuifito de Sódio 1%	0,96 g
Carvãoativado 0,1%	0,096 g
PVP 2%	1,92 g
β-mercaptoetanol	192 µL

ANEXO B

Peptidase (Protease) (GOPINATH et al., 2005).

Leite desnatado	50 g
Ágar	15 g
Água destilada	1000 mL, pH 5

Amilase (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

Extrato de carne	3 g
Peptona	5 g
Amido solúvel	0,20%
Ágar	15 g
Água destilada	1000 mL, pH 5

Celulase (RUEGGER;TAUK-TORNISIELO, 2004).

NaNO3	3 g
MgSO4	0,5 g
KCL	0,5 g
FeSO4.7H2O	0,01 g
K2HPO4	1 g
CMC	10 g
Ágar,	20 g
Água destilada	1000 mL, pH 5

Pectinase (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

Pectina cítrica (Sigma)	1,25%
Ágar	15 g
Água destilada	1000 mL, pH 7

Fitase (PIKOVSKAYA, 1948).

Extrato de levedura	0,5 g
Dextrose	10 g
Fosfato de Cálcio;	5 g
Sulfato de Amônio;	0,5 g
Cloreto de Potássio;	0,2 g
Sulfato de Magnésio;	0,1 g
Sulfato de Manganês;	0,0001 g
Sulfato Ferroso;	0,0001 g
Ágar	15 g
Água destilada	1000 mL, pH 7