

Potencial Farmacoindustrial de *Trichoderma harzianum* para fins Farmacoterapêuticos

Luís Fernando Albarello Gellen¹, Diego Pereira da Silva², Sylvania Rosa Souza³, Aloísio Chagas Freitas⁴, Gessiel Newton Scheidt⁵, Ildon Rodrigues do Nascimento⁶

1. Graduação em Biomedicina, Centro Universitário Luterano de Palmas. Mestrando em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, Brasil. E-mail: gellenbiomedico@hotmail.com

2. Graduação em Tecnologia Agroindustrial, Universidade do Estado do Pará. Mestre em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, Brasil. E-mail: diegouft@outlook.com

3. Graduação em Biomedicina, Faculdade de Ensino Superior da Amazônia Reunida. Mestranda em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, Brasil. E-mail: biomedica@uft.edu.br

4. Graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia. Doutor em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas. Professor Adjunto e Coordenador do Curso de Agronomia, Universidade Federal do Tocantins, Brasil. E-mail: chagasjraf@mail.uft.edu.br

5. Graduação em Biologia, Universidade Católica Dom Bosco. Pós-doutor em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná. Professor, Universidade Federal do Tocantins, Brasil. E-mail: gessielscheidt@yahoo.com.br

6. Graduado em Agronomia, Universidade do Tocantins. Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Lavras. Professor Adjunto, Universidade Federal do Tocantins. Membro do Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal do Tocantins, Brasil. E-mail: ildon@mail.uft.edu.br

RESUMO: Linhagens de *Trichoderma* estão bem difundidas nos processos de controle de fitopatógenos, além disto, para promoção do desenvolvimento e crescimento das culturas onde são inoculados, estes benefícios dão-se pela gama de processos desempenhados por este organismo, os processos são classificados em parasitismo, antibiose e competição, além de secretarem produtos enzimáticos com ações degradantes, compostos voláteis e antimicrobianos. Por meio de testes de produção enzimática, confronto em placa, metabólitos voláteis e sensibilização do agente, os isolados de *Trichoderma harzianum* mostraram-se como um potente produtor de substâncias antimicrobianas e antifúngicas perante *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. faecalis* e *Rhodotorula sp.*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida lusitanae*.

Palavras-chave: antimicrobianos, antifúngicas, metabólitos, sensibilização.

Farmacoindustrial *Trichoderma harzianum* of potential pharmacotherapeutic for purposes

ABSTRACT: Strains of *Trichoderma* are well diffused in the processes of control pathogens in addition, to promote the development and for crops to grow where are inoculated, this benefit is due to the range of processes performed by this organism, processes are classified into parasitism, antibiosis and competition, and secrete enzyme products with degrading actions, volatile the compounds antimicrobial and. Through tests of enzyme production, confrontation plate, volatile metabolites and awareness of the agent, if the *Trichoderma harzianum* proved to be a potent producer of antimicrobial and antifungal substances for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. faecalis* and *Rhodotorula sp.*, *Candida albicans*, *Candida lusitanae* and *Candida parapsilosis*.

Keywords: antimicrobial, antifungal, metabolites, sensitization.

1. Introdução

A busca por novas substâncias antimicrobianas vem se intensificando ao longo dos anos, tendo em foco microrganismos que acometem o equilíbrio do corpo humano (BARROS; ELVINO, 2008). Fungos e outros microrganismos antes utilizados apenas em áreas específicas da ciência humana comumente utilizado em processos de combate a pragas áreas e cultivos agropecuários como é o caso do *Trichoderma harzianum*, podem ser eficientes em outras áreas de interesse biotecnológico (FONSECA et al. 2012).

Segundo Ganda et al.(2005), microrganismos, como fungos e bactérias, têm sido alvo de estudos devido a sua capacidade de secretar certas enzimas e produtos com fins tecnológicos nas indústrias de alimentos, agrícola, farmacológica.

Viterbo et al. (2007) e Druzhinina et al. (2005) relatam que gênero *Trichoderma* vive livremente no meio ambiente ou parasitando outras espécies de fungos. Pode ser encontrado tanto em rizosfera de plantas como em qualquer tipo de solo, onde há matéria orgânica em abundância como fonte de carbono e nitrogênio. O *Trichoderma* faz parte da classe mitosporica, subclasse hifomiceto, ordem moniliales (HARMAN, 2010).

Os processos que conferem ao *Trichoderma sp.* este potencial antifúngico está dividido em duas ações, estas são o micoparasitismo e o biocontrole (FILHO et al., 2008). Segundo Benítez et al. (2004) o micoparasitismo é um processo envolvendo uma cascata de ações, sendo estas, reconhecimento, contato, adesão, competição e expressão de antifúngicos.

Shoresh et al. (2006) explicam que o biocontrole ocorre por um processo de competição e interação do fungo com o hospedeiro. No processo de competição, as duas populações têm crescimento e sobrevivência sendo prejudicados, assim apresentando uma relação de negatividade. Já na produção de antibióticos, o fungo produz tanto antibióticos voláteis e não voláteis.

Os Processos de ação antifúngica estão fundamentados em processos de produção de várias enzimas extracelulares, tais como as quitinases (LOURENÇO-LEITE E ESPOSITO 2004; LORITO, 2004; BASTOS, 1992), lípases (VITOLLO, 2001), amilases (WANDERLEY, 2000; MORAIS, 2004), proteases (DILLON, 2004; LIMA et al., 2001) e glicanases (BARRA, 2002; McDOUGALL, 2006; HARMAN, 2010; ROCHA, 2007).

O *Trichoderma sp.*, segundo Bastos (1992), produz uma gama de antibióticos (gliotoxina, viridina,

trichodermina, suzucacilina, alameticina e demadina). Sendo alguns destes produtos voláteis.

Portanto, objetivou-se com o presente trabalho evidenciar a ação do *T. harzianum* como antimicrobiano e antifúngico. Além de analisar a produção de enzimas extracelulares por apresentação de antígenos para firmar ainda a hipótese de se utilizar produtos enzimáticos do *T. harzianum* para fins farmacêuticos.

2. Metodologia

Microorganismos e Meios de Cultura

Foram utilizados os isolados bacterianos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *E. coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *E. faecalis* ATCC 29212. E os fungos *Rhodotorula* sp., *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida lusitanae*, todos estes microorganismos conferem algum tipo de patologia em humanos, entre eles problemas na derme. As cepas utilizadas foram cedidas de isolados obtidos anteriormente do banco de cepas do Laboratório de Microbiologia da Incubadora de Empresas da Universidade Federal do Tocantins, campus de Gurupi-To.

O meio de cultura utilizado para conservação e nutrição das cepas bacterianas foi o ágar bacteriológico da Himedialabs, composto de 0,15% de nitrogênio, 2,3% de cinza 0,16% de cinza ácida insolúvel, 0,12% magnésio, 0,34% de cálcio, 0,08% ferro, pH 7,0 e uma temperatura gelificante entre 36-38 °C.

Para a nutrição e conservação das estirpes fúngicas o meio utilizado foi o ágar Sabouraud (agarose, pectina e D-glucose), para o desenvolvimento posterior do teste de antifungigrama. Este teste foi adaptado e modificado para análise das enzimas extracelulares do *T. harzianum* em comparação com as concentrações do controle positivo.

Foi utilizado meio BDA (Batata Dextrose e Agar) para nutrição e conservação das colônias de *T. harzianum*.

Para o antibiograma foi utilizado o ágar Müller Hinton, composto de infusão de carne e coração 2g/L⁻¹, caseína ácida hidrolisada 17,50g/L⁻¹, amido 1,5g/L⁻¹ e agar 17g/L⁻¹.

Efeito de Metabólitos Voláteis

A procedimento realizado foi adaptado a partir do método descrito por Bharat et al. (1980), caracterizando-se em posicionar as tampas de placas de petri sobrepostas contendo extrato de malte em cada uma delas. Na extremidade inferior da placa semeou-se o antagonista e na parte superior o patógeno, ambos em discos de ágar (1 cm) contendo micélio e conídios. Logo em seguida as placas foram vedadas com membrana plástica e em seguida, incubadas em temperatura de 28°C e 36°C ambos por 7 (sete) dias.

Teste de Confronto em Placa

O método utilizado foi adaptado a partir do descrito por Badalyan (2002), tendo como objetivo avaliar a

interação competitiva entre o *T. harzianum* e os microrganismos alvo.

Utilizando placas de petri (90 mm de diâmetro) contendo 50% de meio nutriente para desenvolvimento do *T. harzianum* (BDA) e 50% de meio nutriente para crescimento de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. lusitanae* e *Rhodotorulas* sp. (Agar Sabouraud), este mix acrescido de antibiótico.

Para o teste com as estirpes *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis* foi utilizado o meio nutritivo universal (peptona e extrato de carne). Sem adição de inibidor antimicrobiano.

Em cada placa foram adicionados dois discos com 2 mm de diâmetro micelial, um contendo colônias de *T. harzianum* e o outro disco com colônias de organismo alvo. A distância dos fungos foi de 4 cm entre si. Após a inoculação as placas foram seladas e incubadas em temperaturas distintas, havendo um teste a 28°C e outro a 36°C por 10(dez) dias.

O crescimento das colônias e as interações foram avaliados diariamente por uso de microscópio estereoscópico. As escalas de classificação foram o crescimento mútuo sem contato, crescimento com contato, inibição de ambos, crescimento com contato e crescimento por sobreposição.

A presença de zonas densas de micélio, estruturas agregadas tais como cabos de micélio, hifas pigmentadas e gotas de exsudado também foram observados.

Escala de Marc Farland

Preparou-se 0,5 ml de BaCl₂ 0,048mol/L⁻¹ para 99,5 mL de H₂SO₄ 0,18 mol/L⁻¹. A absorvância foi medida em um espectrofotômetro a 625 nm. A absorvância desta solução deve ser de 0,008 a 0,010nm (LENNETE; EDWIN, 1987).

No decorrer desta avaliação, placas de petri contendo os Microorganismos foram semeados e incubados nas mesmas temperaturas para avaliar o crescimento natural destas cepas, agindo desta forma com controle positivo do teste.

Sensibilização para produção de Enzimas Extracelulares por Apresentação de Antígenos

As cepas utilizadas como patógeno neste experimento foram cultivadas em camadas, meio de cultura, bactérias e em papel filtro.

Após 24 horas de incubação em ambiente controlado, temperatura de 37°C e umidade 30%, as cepas fixadas no papel filtro foram desidratadas em estufa em temperatura de 70°C graus Celsius, sendo posteriormente trituradas e armazenadas para a próxima etapa.

O *T. harzianum* cultivado em meio BDA durante 5 (cinco) dias, teve em meio adicionado o papel filtro triturado com as bactérias, para que assim haja a apresentação destes antígenos ao *T. harzianum* para produção enzimática extracelular perante estes antígenos.

Após 24 horas, havendo a presença de líquido sobre as colônias e no meio, foram retirados uma alíquota para o teste de antimicrobiano e antifúngico por micro-poços.

Ação Antimicrobiana e Antifúngica de Enzimas Extracelulares por Micro Poços

O líquido sobrenadante retirado do teste de estimulação de enzimas extracelulares foi introduzido em micro poços no meio Müller Hinton para os ensaios de ação antimicrobiana.

Como controle positivo foram utilizados antimicrobianos determinados como medicamentos de primeira escolha para estas estirpes microbianas, abordados no manual da *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

A semeadura foi em esgotamento de alça e incubados em suas respectivas temperaturas (37°C e 28°C) para processos enzimáticos e crescimento exponencial. O mesmo processo acima se aplica aos fungos, somente o tempo para leitura será aumentado, pois o processo e as fases de crescimento fúngico são mais prolongados pelo arcabouço genético e funções fisiológicas.

O líquido coletado foi depositado em poços de 5,0 mm de diâmetro de acordo com a metodologia descrita no documento do CLSI de 2013, contudo esta metodologia foi adaptada para o teste.

3. Resultados e Discussão

Teste de Avaliação do Efeito de Metabólitos Voláteis

Na primeira leitura o crescimento bacteriano foi exponencial e cerca de 100% do tamanho da colônia foi expandida, enquanto a colônia de *T. harzianum* não cresceu em quantidades demonstrativas, isto em ambas as temperaturas 28°C e 36°C.

Houve inibição significativa das seguintes cepas microrganismos; *S. pyogenes* (36°C) apresentou formação de halos, nos testes com presença de líquido, semelhantes aos de testes de sensibilidade por meio de discos, estes halos formados onde a concentração de fungos estava mais intensa (Figura 1). Nos ensaios com *S. aureus* apresentou um odor inespecífico, contudo sem formação de líquido.



Figura 1. Cepas de *S. pyogenes*, submetidos ao teste de metabólitos voláteis produzidos por *T. harzianum*, este teste encubado a 36°C, leitura após 24 horas de teste.

Os ensaios com cepas de *E. faecalis* e *E. coli* (28°C) o crescimento de ambas as cepas ocorreu normalmente, ou seja, sem formação de halos, regressão das colônias e nem formação de líquido, o mesmo com os testes a 36°C. Entretanto, com o decorrer do teste as cepas bacterianas

foram se desestabilizando quanto a estabilidade morfológica das colônias.

Ensaio com *P. aeruginosa* em ambas as temperaturas renderam resultados positivos, ou seja, a produção de metabolitos voláteis por *T. harzianum* interferiram no desenvolvimento da cepa, houve formação de líquido e formação de halos como ocorrido nas cepas de *S. pyogenes*.

Com o decorrer das leituras a progressão e crescimento do *T. harzianum* foi exponencial em ambas as temperaturas, elevando os processos de inibição das cepas bacterianas, pela produção de metabólitos voláteis.

Após 168 horas de teste, o resultado final foi o seguinte; *S. aureus* (Figura 2) a 28°C, as bactérias estavam praticamente erradicadas, formação de uma superfície porosa sobre o meio de cultura, mudança de coloração do meio para uma coloração verde clara e presença de líquido, o mesmo potencial inibitório ocorreu com a cepa de *S. pyogenes* (Figura 2).

Com a cepa de *E. coli* (Figura 2) houve uma persistência bacteriana, ou seja, uma resistência aos produtos voláteis agressores, houve formação de líquido sobre o meio, a diferença para a cepa de *P. aeruginosa* (Figura 2) que houve resistência, mas iniciando o processo de liquefação dos micélios, formação de líquido sobrenadante acentuada. As cepas de *E. faecalis* resistiram no início do teste, mas com o processo de formação de líquido sobrenadante no meio resultante do processo de liquefação das colônias.

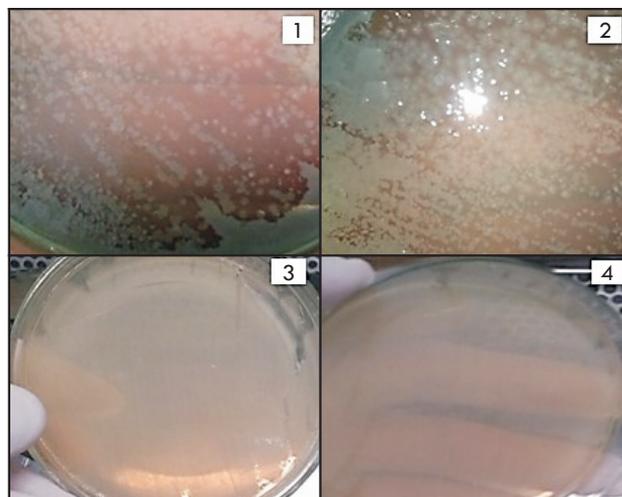


Figura 2. Testes incubados a 28° graus, sendo realizada a última leitura (168 horas), sendo o quadro (1) *S. aureus*, (2) *S. pyogenes*, (3) *E. coli* e (4) *P. aeruginosa*.

Com cepa de *S. aureus* (Figura 3) a 36° graus celsius na sua última leitura ocorreu uma mudança de coloração conforme as leituras que se iniciou em um vermelho progredindo para um verde, formação de muito líquido extracelular e inibição expressiva das bactérias. As cepas de *P. aeruginosa*, houve uma resistência da cepa em locais, mas inibição parcial da com produção de líquido. O *S. pyogenes* ocorreu formação de poros sobre as colônias e formação de líquido extracelular, mas uma certa resistência. A *E. coli* teve regressão mas resistiu

durante todo o teste, formação de líquido elevada e as colônias com instabilidade, aspecto líquido. Com *E. faecalis* houve uma discreta resistência, mas houve uma inibição das cepas bacterianas, e produção de líquido.

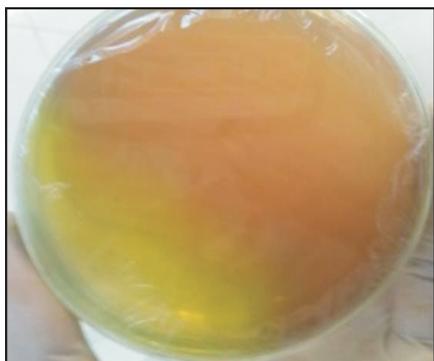


Figura 3. Teste de metabólitos voláteis com cepas de *S. aureus*, evidenciando a alteração de coloração do meio, esta que progrediu do amarelo específico do meio, para alaranjado e por fim para verde escuro.

O mesmo procedimento foi realizado com os seguintes fungos: *Rhodotorulas sp.*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida lusitanae*. Todas estas causadoras de patologias em humanos, entre elas problemas na derme.

Em ambas as temperaturas (28 e 36°C) houve ação antifúngica e antimicrobiana causada pela produção dos metabólitos voláteis produzidos pelo *T. harzianum*, todos os testes em ambas as temperaturas apresentaram liquefação e desestruturação da colônia alvo. Alguns testes ocasionaram o desprendimento das colônias de fungos do meio nutritivo sólido, como ocorreu com *C. albicans* e *Rhodotorulas sp.* A cepa de *C. parapsilosis* resistiu à agressão dos metabólitos produzidos pelo *T. harzianum*, mas houve início de liquefação das culturas nas últimas 48 horas. Abaixo seguem as imagens da leitura final do experimento (Figura 4).

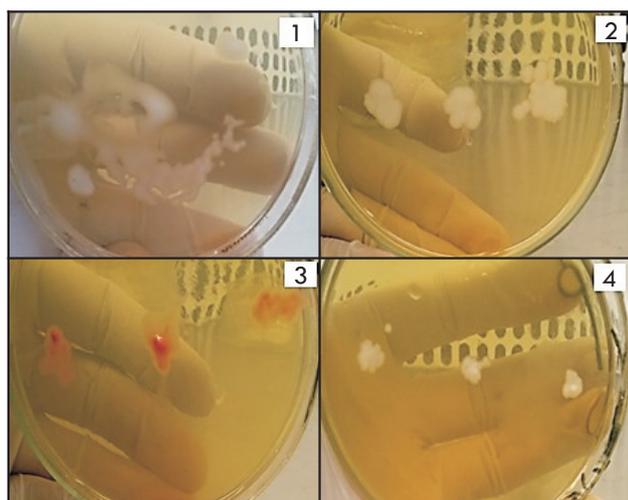


Figura 4. Placas contendo colônias de *C. albicans* (1), *C. lusitanae* (2), *Rhodotorulas sp.* (4) e *C. parapsilosis*. Estas submetidas ao teste de metabólitos voláteis. As imagens demonstram a instabilidade das colônias, isto causado pela ação agressora dos metabólitos voláteis produzidos pelo *T. harzianum*.

Deste modo o teste de produção de metabólitos voláteis comprova a ação bactericida sobre, *S. pyogenes*,

S. aureus, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Além de uma ação antifúngica perante *C. albicans*, *C. lusitanae*, *Rhodotorulas sp.* e *C. parapsilosis*.

Teste de Confronto em Placa

Observe a Tabela 1 abaixo com os dados mediante ao teste de antagonismo direto realizado em 10 (dez) dias (240hrs).

Tabela 1. As escalas de classificação serão as seguintes: crescimento mútuo sem contato (A), crescimento com contato e inibição de ambos (B), crescimento com contato e sobreposição (C), crescimento excessivo (D), bloqueio a distância (E) e regressão do *T. harzianum*(F).

Microorganismo	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h	192h	216h	240h
<i>S. aureus</i>	A	E	C	C	C	C	C	C	C	C
<i>S. pyogenes</i>	B	E	C	C	B	C	C	D	D	D
<i>E. coli</i>	A	E	C	C	D	D	D	D	F	F
<i>P. aeruginosa</i>	E	C	D	D	D	F	F	F	F	F
<i>E. faecalis</i>	B	C	C	C	C	C	D	D	D	D
<i>C. albicans</i>	E	E	C	C	C	C	C	C	C	C
<i>C. parapsilosis</i>	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C
<i>C. lusitanae</i>	A	D	C	B	B	C	C	C	D	D
<i>Rhodotorulas sp.</i>	A	C	C	D	D	D	D	D	D	D

Com os dados acima do teste de antagonismo direto podemos fortalecer ainda mais o potencial do *T. harzianum* para fins farmacoterapêuticos.

Houve duas cepas testadas que regrediram perante a ação invasiva do *T. harzianum*, contudo nos últimos dias de leitura retomaram sua vitalidade e avançaram em direção ao *T. harzianum* estes foram as cepas de *E. coli* (Figura 5, quadro 2) e *P. aeruginosa* (Figura 5, quadro 1), este ocorrido pode se dar ao tempo de produção e a concentração da ação de produtos liberados pelo *T. harzianum* para inibir o desenvolvimento destas cepas de bactérias, com o passar do teste a oferta de nutrientes no meio se reduz, isto podendo interferir na produção destes agentes, gerando uma resistência ao *T. harzianum*.



Figura 5. Placas com teste de antagonismo direto (confronto em placa) de cepas de *P. aeruginosa* (1) e *E. coli* (2), apresentando resistência a ação do *T. harzianum*.

Teste de Ação Antimicrobiana e Antifúngica de Enzimas Extracelulares por Micro Poços

O líquido contido na superfície das placas onde o *T. harzianum* estava sendo cultivado, este sensibilizado pelos patógenos inativados (Figura 6) foi coletado e transferido para poços onde a quantidade de 50 microlitros do líquido coletado foi depositada. O meio utilizado foi o Muller Hinton.

A análise foi realizada em temperaturas distintas pelo modo comportamental de desenvolvimento do *T. harzianum*, contudo no decorrer dos experimentos este microrganismo apresenta crescimento a temperaturas mais elevadas (37°C).

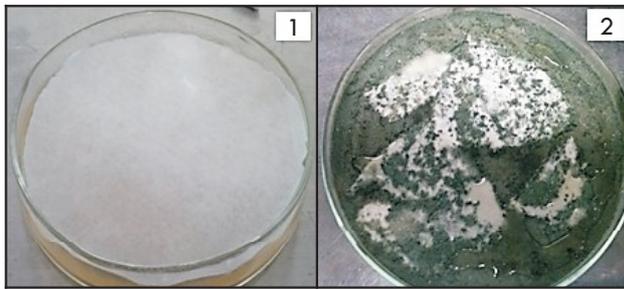


Figura 6. Imagens do teste de sensibilização do *T. harzianum* com cepas de *S. aureus*, para assim coleta do líquido produzido para o teste de sensibilidade antimicrobiana e antifúngica. Quadro (1) temos a produção do papel filtro com os microrganismos, no quadro (2) temos o teste sendo realizado, onde o papel filtro e utilizado para sensibilizar o *T. harzianum* para a produção de enzimas e produtos extracelulares.

Observando a Tabela 2, podemos determinar que as enzimas produzidas para cada patógeno alvo têm sua ação igualitária a temperaturas distintas como o caso das estirpes de *C. lusitaniae* e de *Rhodotorulas sp.*, no entanto para as estirpes de *C. albicans* e *C. parapsilosis* tanto os testes como a média destes foi relativamente elevada a 37°C em relação ao teste em 28°C.

Tabela 2. Média obtida por análise de dez repetições para cada microrganismo.

Microrganismos	Teste a 28 °C	Teste a 37 °C
<i>C. albicans</i>	1,3mm	1,7mm
<i>C.lusitaniae</i>	1,5mm	1,5mm
<i>C. parapsilosis</i>	1,0mm	1,1 mm
<i>Rhodotorulas sp</i>	2,1 mm	2,1 mm

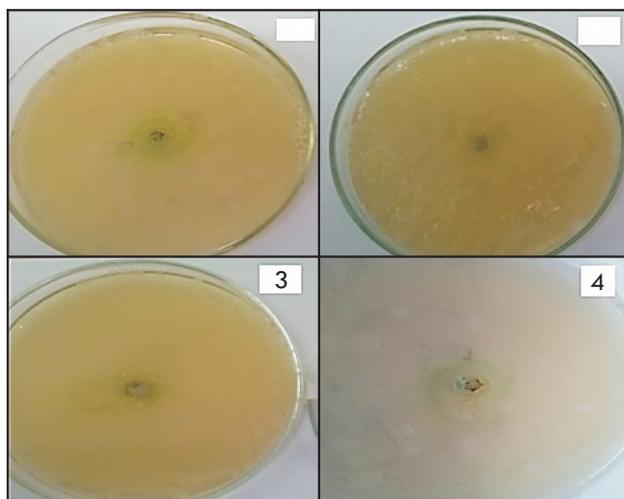


Figura 7. Imagens do teste de atividade antimicrobiana e antifúngica, sendo que no quadro (1) *Rhodotorulas sp.*, (2) *C. parapsilosis*, (3) *C. albicans* e (4) *C. lusitaniae*. Em todos os testes houveram pontos de resistência, não gerando um halo perfeito quanto sua circunferência.

Com as cepas bacterianas em algumas situações ocorreu o mesmo que acima descrito com os fungos, com exceção da cepa de *E. coli* cujo em ambos os testes foi negativo, com as cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa* cujo a média foi de 1,2 mm a 28° C e 1,3 mm a 37° C e 0,9 mm a 28° C e 1,2 mm a 37° C. Assim firma-se que a 37° C houve uma discreta elevação nos testes e na média na qual fora calculada a partir destes. Com as cepas de *S.*

pyogenes ocorreu o inverso com os testes, sendo que a elevação nos testes e na média foram na temperatura de 28°C e não a 37°C como nos demais testes citados, sendo respectivamente as médias de 1,8 mm a 28 graus e 1,7 mm a 37 graus. A cepa de *E. faecalis* não apresentou alteração na sua média em ambas as temperaturas e incubação, mas houve uma mudança de coloração no meio onde o halo de inibição ocorreu (Figura 07). Segue abaixo os dados representados na Tabela 3.

Tabela 3. Média obtida a partir de ensaios com dez testes com cada bactéria alvo.

Microrganismo	Teste a 28 graus	Teste a 37 graus
<i>E. coli</i>	0 mm	0 mm
<i>S. aureus</i>	1,2 mm	1,3mm
<i>S. pyogenes</i>	1,8 mm	1,7 mm
<i>E. faecalis</i>	1,1 mm	1,1 mm
<i>P. aeruginosa</i>	0,9 mm	1,2 mm

4. Conclusão

O *T. harzianum* além de ter potencial na indústria agroindustrial, ele pode ser utilizado na indústria farmacêutica, tanto no combate a bactérias como fungos de interesse médico. O potencial de suas enzimas é de grande valor não somente para indústria farmacêutica no que diz respeito a produtos antimicrobianos ou antifúngicos, mas também no meio estético.

5. Referências Bibliográficas

- BADALYAN, S.M; INNOCENTU, G; GARIBYAN, N.G. Antagonistic activity of xylophilic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. *Phytopathol. Mediterr.* (2002) 41, 200–225.
- BARA, M.T.F. **Purificação e caracterização de uma exo- α -1,3-glucanase produzida por *Trichoderma asperellum***. 2002. 89 f. Tese (Doutorado) Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Brasília, 2002.
- BARROS E ELVINO. **Antimicrobianos – Consulta Rápida**. 4ª Edição, Ano 2008.
- BASTOS, C. N. **Possibilidade do controle biológico da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*) do cacauzeiro**. In: BETTIOL, W. (Org) Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna. EMBRAPA-CNPDA, 1992. P.333-344.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN M.C.E.; CODÓN A.C., Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International microbiology*, 2004. Dec. 7(4):249-60.
- BHARAT, R.; SINGH, V.N.; SINGH, D.B. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. *Plant and Soil*, v.57, p.131-135, 1980.
- DILLON, A. J. P. Cellulase. In: SAID, S. & PIETROR. C. R. L. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.
- DRUZHININA, I. S.; KOPCHINSKIY, A. G.; KOMON, M.; BISSETT, J.; SZAKACS, G.; KUBICEK, C. P. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics Biology*, v.42, p.813–828, 2005.
- FILHO, M.R.C.; MELLO, S.C.M.; SANTOS, R.P.; MENÉZES, J.E. **Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético in vitro e colonização endofítica de mudas de eucalipto**. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia). Brasília, 2008.

- FONSECA, T.R.B.; TAVARES, A.C.D.; CRUZ, M.R.O.; TEIXEIRA, M.F.S., Avaliação da Atividade Proteolítica e Coagulante de Fungos Filamentosos. In: **ENZITEC 2012 – Brazilian Seminar on Enzyme Technology**. Blumenau, SC
- GANDA, I.S.; MORAIS, A.A.; ALVAREZ, R.C.; Guedes, C.E.C; COSTA, M.G.C; BARBOSA, L.V; PAULILLO, L.C.M.S. **Avaliação da produção de enzimas hidrolíticas do tipo celulolíticas por diferentes isolados de *Trichoderma stromaticum***. In: 51º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia – SP. 2005
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The Use of Solid Media for Detection of Enzymes Production by Fungi. **Mycologia** Vol. 67, No. 3, pp. 597-607, 1975.
- HARMAN, G.E. **Trichoderma and Gliocladium**. Vol. 2, 2010.
- WAYNE, P. A. **CLSI: Clinical and Laboratory Institute**. M100-S23. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, ed.23, informational supplement, 2013.
- KOUKER, G; JAEGER, K.E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipase. **Applied Experimental Microbiology**, V. 53, p. 211 - 213, 1987.
- LENNETE, EDWIN H. et al. Manual de Microbiologia Clínica. Editora Panamericana, Buenos Aires, 4ª edição, 1987.**
- LIMA, A.L, **Caracterização morfológica, molecular e bioquímica de *Trichoderma sp.* isolados do solo do cerrado brasileiro**. 2002
- LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo, 2001.
- LORITO, M.; HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R; VITERBO, A.; CHET, I. **Trichoderma species – opportunistic, virulent plant symbiots**. Microbiology vol. 2, 2004.
- LOURENÇO-LEITE; ESPOSITO, E. Fungos: estrutura e ultra-estrutura. In: **fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, p. 12-44, 2004.
- MARCELLO, C.M. **Avaliação da expressão e caracterização de uma EXO-B-1,2-Glucanase envolvida no mecanismo de micoparasitismo de *Trichoderma asperellum***. Tese (Doutorado) Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Brasília, 2008.
- MCDUGALL, B.M.; MARTIN, K.L.; UNKLES, S.E.; SERVIOUR, R.J. The three b-1,3-glucanases from the fungus *Acremonium blochii* strain C59 appear to be encoded by separate genes. **Mycol Res**. P.110, 2006.
- MORAIS, L. M. P. LIPASE. In: SAID, S.; PIETROR. C. R. L. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.
- NASCIMENTO, A.E.; CAMPOS TAKAKI, G.M. Effects of sodium dodecyl sulfate on lipase of *Candida lipolytica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. V. 49, p. 93-99, 1993.
- NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobiana por diluição para bactéria de crescimento aeróbio**. Norma aprovada. Brasília: ANVISA; 2003.
- RIOS, F.A.; MALLOZI, M.C.; SOLÉ, D. Sepse por *S. aureus* em paciente com dermatite atópica e eczema herpético: relato de caso. **Revista Brasileira de alergia e imunopatologia**. Vol. 32(1): 35-38. 2009.
- ROCHA, S.F. **Aspectos da coloração, ciclo de vida, parasitismo por *Pasteuria penetrans* e suas relações com a reserva energética de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne spp.*** Tese (Doutorado) Agronomia, área de concentração em fitopatologia. Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2007.
- SHORESH M.; GAL-ON A.; LEIBMAN, D.; E CHET, I., **Characterization of a mitogen-activated protein kinase gene from cucumber required of *Trichoderma***. 2006. Disponível em <http://www.ufrgs.br/agrofitossan/fit35/carolineGram.pdf> (Acessado em 26/05/2013)
- VITERBO, A.; INBAR, J.; HADAR, Y.; CHET, I. **Plant disease biocontrol and induced resistance via fungal mycoparasites**. In: Environmental and Microbial Relationships, 2 ed., The Mycota IV, Springer-Verlag, Berlin, pag. 127-146, 2007
- VITOLO, M. **Aplicação de Enzimas na Tecnologia de Alimentos. In: Biotecnologia Industrial: Biotecnologia na Produção de Alimentos**. Ed1. Vol. 4, 2001.
- WANDERLEY, K. J. **Purificação e caracterização de uma α -amilase produzida pelo isolado de levedura KLF11.1**. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, ano 2000.