



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRO-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ITANA DA PURIFICAÇÃO COSTA

ISOLAMENTO, SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS
PRODUTORES DE ENZIMAS DE INTERESSE PARA INDÚSTRIA DE
ALIMENTOS A PARTIR DE *Moringa oleifera* Lam., MORINGACEAE

SÃO CRISTOVÃO - SE

2012

ITANA DA PURIFICAÇÃO COSTA

ISOLAMENTO, SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS
PRODUTORES DE ENZIMAS DE INTERESSE PARA INDÚSTRIA DE
ALIMENTOS A PARTIR DE *Moringa oleifera* Lam., MORINGACEAE

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Ciência
e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Profº Dr. Álvaro Alberto de Araujo

SÃO CRISTOVÃO - SE

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Costa, Itana da Purificação
C837i Isolamento, seleção e identificação de fungos filamentosos
produtores de enzimas de interesse para indústria de alimentos a
partir de *Moringa oleifera* Lam., moringaceae / Itana da
Purificação Costa ; Álvaro Alberto de Araujo. – São Cristóvão,
2012.
86f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)
– Universidade Federal de Sergipe, 2012.

Orientador Prof. Dr. Álvaro Alberto de Araujo.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Moringaceae. 3. Fungos -
Análise. 4. Enzimas de fungos. I. Araujo, Álvaro Alberto, org.
II. Título.

CDU 664:582.683.4

ITANA DA PURIFICAÇÃO COSTA

ISOLAMENTO, SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS
PRODUTORES DE ENZIMAS DE INTERESSE PARA INDÚSTRIA DE
ALIMENTOS A PARTIR DE *Moringa oleifera* Lam., MORINGACEAE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profº Dr. Álvaro Alberto de Araujo (Orientador).
Universidade Federal de Sergipe - UFS

Gabriel Francisco da Silva
Membro Interno (PROCTA/UFS)

Drª Rita de Cássia Mendonça de Miranda
Membro Externo (Bolsista PNPd – LAF/UFS)

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos com quem compartilhei estes dois anos, este momento do texto é só uma desculpa para declarar meu carinho a vocês.

Primeiramente, quero dizer a minha mãezinha, que a amo muito, e que a admiro profundamente, e que é muito responsável pela pessoa que sou hoje. Mes chères sœurs, Carolzinha e Tininha, amo muito vocês, e gostaria que soubessem que formamos uma família linda.

Pai e tio/ padrinho, obrigada pela carona pra Aracaju. Guardarei o segredo de vocês!

Todas as pessoas que conheci em Aracaju, obrigada por fazer meus dias mais tranquilos, mais alegres e mais fáceis. Paty, Thaci, Ju, nos divertimos e choramos muito né? Leina, mãeee!! Amo você! Obrigada por sempre ouvir tudo que tenho pra dizer, por colocar água pra esquentar quando eu ainda estou no bus, pelo frutilli dos dias quentes, pela amizade e companhia nos yakissobas, bolos, acarajés, caranguejos, etc., e um obrigada bem grande por me adicionar no Orkut e ter a loucura de me chamar pra morar com você.

Professora Tati, adorei te conhecer, um dia quero ser uma pró como você, humilde, esforçada, sempre disposta a ajudar.

Obrigada Professor Álvaro! Você bem sabe, que só comecei tudo, pois me deu uma oportunidade, agradeço de verdade.

Um obrigada bem grandão pra Rita, Eliane e a MICOTECA URM da universidade federal de Pernambuco pelas identificações.

Aos meus amigos, que ficaram em Feira, obrigada pela paciência (sei que muitos a perderam algumas vezes), compreensão, e carinho. Lua, Ló, Rui, Luyd, Tchu, Mileninha, Pri, todos vocês por mais que haja distância têm um lugar no meu coração.

Obrigada tia Nayara pela preocupação e carinho sempre!

E por fim, gostaria de dizer a Diego, meu benzinho, querido marido, amo você! Pois dizer “obrigada”, não consegue refletir de forma clara tudo o que passamos juntos neste período. Atenção, cuidado, carinho e compreensão na distância, ou não, tudo foi e é importante. Te amo.

Resumo

A moringa, *Moringa oleifera* L., é uma planta tropical com inúmeros usos. Diversos trabalhos já comprovaram o efeito antimicrobiano do extrato de semente e flores de moringa, no entanto a literatura carece de trabalhos sobre associação da moringa com microrganismos, como os fungos endofíticos, capazes de viver no interior de órgãos e tecidos vegetais como caules, folhas e raízes de várias plantas sem causar efeito negativo ao hospedeiro. As amostras foram coletadas de forma asséptica e desinfetadas com álcool 70% e hipoclorito de sódio a 3%. Após a desinfecção procedeu-se o isolamento dispondo 4 fragmentos de ± 5 mm do caulículo da vagem, de folhas e da raiz em placas de petri contendo meios de cultura PDA (Potato Dextrose Agar) e Sabouraud (AS). Calculou-se então, após o período de incubação, a taxa de colonização para cada amostra (TC%) que consiste no número total de segmentos com um ou mais isolados dividido pelo número total de segmentos utilizados. O presente trabalho isolou 24 fungos filamentosos endofíticos da moringa, obtendo TC de: 0% para raiz (independente do meio), 20,83% para PDA_F, 66,67% para PDA_C, 33,33% para AS_F e 87,5% para AS_C. A TC pode variar de acordo com a composição do meio, a espécie vegetal, a distribuição geográfica, a idade da planta, a precipitação anual, a parte da planta utilizada, dentre outros fatores. Este trabalho observou diferença significativa de TC entre as partes da planta e não em relação ao meio de cultura. Os fungos isolados são representados pelos gêneros: *Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Geotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Glomerella* sp., e a bactéria *Burkholderia gladioli*. Estes microrganismos foram testados para produção das enzimas, amilase, protease, pectinase e lipase, sendo que todos os isolados (100%) apresentaram atividade para pelo menos um dos substratos testados, 23 (88,46%) apresentaram atividade pectinolítica e 19 (76,17%) produziram proteases. Não foi detectada a produção de amilases e lipases pelo método utilizado. Este estudo obteve 24 dos fungos endofíticos da *Moringa oleifera* Lam, com capacidade enzimática, sendo necessário ampliar o estudo a fim de entender melhor a distribuição, colonização e interações da moringa com microrganismos endófitos, assim como verificar sua viabilidade biotecnológica (produção de enzimas de outras enzimas, pigmentos, aromas, controle de pragas em plantas, etc.).

Palavras chave: moringa, endofíticos, atividade enzimática.

Abstract

The moringa tree, *Moringa oleifera* L., is a tropical plant with many uses. Several studies have demonstrated the antimicrobial effect of the extract of moringa seed and flowers, but the literature lacks studies about the association of moringa with microorganisms such as endophytic fungi, able to live inside plant tissues and organs such as stems, leaves and roots of various plants without causing adverse effects to the host. The samples were aseptically collected, washed with sterile distilled water, followed by treatment with 70% alcohol for 1 min, sodium hypochlorite and 3% (v / v) for four minutes, 70% alcohol for 30 seconds, and three rinses in sterile distilled water. After disinfection proceeded isolation featuring four fragments ($\pm$ 5mm) from the pod stems, leaf and root in petri plate containing culture medium PDA (Potato Dextrose Agar) and Sabouraud (AS). Was calculated, after the incubation period, the colonization rate for each sample (CR%) consisting of the total number of segments with one or more strains divided by the total number of threads used. The present study isolated 24 endophytic fungi of moringa, obtaining CR: 0% for root (regardless of medium), 20.83% for PDA_L, ADP, 66.67% for PDA_S, 33.33% for AS_L and 87.5% for AS_S. CR may vary with the composition of the medium, the plant species, geographical distribution, plant age, annual rainfall, the plant part used, among other factors. In this work, it was observed significant difference in CR between parts of the plant and not in relation to the culture medium. The isolates are represented by the genera: *Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Geotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Glomerella* sp., and the bacterium *Burkholderia gladioli*. These microorganisms were tested for production of enzymes, amylase, protease, pectinase, lipase, and all isolates (100%) were active for at least one of the substrates tested, 23 (88.46%) showed pectinolytic activity and 19 (76, 17%) produced proteases. There were no detectable production of lipases and amylases by the method used. This study found 24 of the endophytes of *Moringa oleifera* Lam, with enzymatic capacity, being necessary to expand the study to better understand the distribution, colonization and interactions of microorganisms with moringa endophytes as well as verify their viability biotechnology (production of enzymes from other enzymes, pigments, flavorings, control pests on plants, etc.).

Key words: moringa, endofíticos, atividade enzimática.

Sumário

Introdução Geral	1
Capítulo I: Isolamento de fungos filamentosos endofíticos a partir de <i>Moringa oleifera</i> Lam., Moringaceae.	4
Resumo	5
1. Introdução	5
2. Revisão bibliográfica	7
2. 1. Moringa.....	7
2. 1.1. Origem	7
2. 1. 2. Relação Filotaxonômica da <i>Moringa oleifera</i> L.	9
2. 1. 3. Características da <i>Moringa oleifera</i> Lam.	9
2. 1. 4. Utilizações da <i>Moringa oleifera</i> L.	11
2. 2. Fungos filamentosos	14
2. 2. 1. Definição e morfologia	14
2. 2. 2. Fungos endofíticos	16
2. 2. 3. Isolamento.....	18
2. 2. 4. Isolamento de fungos endofíticos	20
2. 2. 5. Identificação.....	23
2. 2. 6. Preservação	25
3. Material e método	27
3. 1. Coleta das amostras	27
3. 2. Preparo das amostras	31
3. 3. Isolamento.....	31
3. 4. Identificação.....	33
3. 5. Preservação	33
4. Resultados e Discussão	33
5. Conclusão.....	45

6. Sugestões para pesquisas futuras	45
Capítulo II: Seleção de fungos endofíticos para produção de enzimas de interesse para a indústria de alimentos.....	46
Resumo	47
1. Introdução	47
2. Revisão bibliográfica	48
2. 1. Produção de enzimas por fungos	48
2. 2. Enzimas de interesse para a indústria de alimentos	52
2.2.1. Carboidrases.....	52
2. 2. 2. Pectinases.....	54
2. 2. 3. Proteases	54
2. 2. 4. Lipases	55
3. Material e métodos.....	55
3. 1 Condições de cultivo para produção de enzimas (Fermentação submersa).....	56
3. 2. Detecção de atividade enzimática pelo método “cup-plate”	56
4. Resultados e discussão.....	57
5. Conclusão.....	64
6. Sugestões para pesquisas futuras	64
Conclusão geral	66
Referências bibliográficas	67
ANEXO I.....	80

Índice de tabelas

Tabela I.1. Taxa de colonização (%) das 3 coletas para os meios PDA e Ágar Sabouraud, e seus respectivos fragmentos de folha e caulículos	35
Tabela I. 2. Identificação dos fungos isolados de <i>Moringa oleifera</i> Lam.	40
Tabela II. 3. Resultados da atividade enzimática dos isolados de <i>Moringa oleifera</i> Lam.	58

Índice de figuras

Figura I. 1. Região nativa da Moringa (fonte: ROLOFF et al., 2009).....	8
Figura I. 2. Árvore de Moringa (A); detalhe das folhas (B); sementes com casca (C); e detalhe frontal da flor (D) (Fonte: RANGEL, 2010; ROLOFF et al., 2009; www.natureasmedicine.wordpress.com).	10
Figura I. 3. Esquema para técnica de cultura em lâmina (ANVISA, 2004).	25
Figura I. 4. Árvores de moringa no campus de São Cristovão da UFS.....	29
Figura I. 5. Amostras de folha (detalhes A e B), do caulículo da vagem (C), da raiz (D) e da raiz da árvore exposta (E).	30
Figura I. 6. Isolamento segundo Petrini et al. (1993).	31
Figura I. 7. Unidade experimental de fragmentos foliares (A) e detalhe da unidade experimental de fragmentos da raiz (B), ambas com meio ágar Sabouraud.	32
Figura I. 8. Unidade experimental de fragmentos de raiz colonizada com colônias leitosas.	34
Figura I. 9. Unidades experimentais de caulículos (A) e de folhas (B) colonizadas por fungos filamentosos.....	36
Figura II. 11. Comparação entre o controle e teste “cup-plate” para os três diferentes meios utilizados meio 2 (A), meio 3 (B) e meio 1 (C e D).	60
Figura II. 12. Degradação da pectina pelo fungo ENIISC2 (<i>Colletotrichum graminicola</i>).	61
Figura II. 13. Comparação entre o controle e a atividade amilásica dos fungos ENIIPC7 (<i>Curvularia lunata</i>) e ENIISC5 (<i>Fusarium sp.</i>).	62
Figura II. 14. Degradação proteolítica dos fungos ENIISF1 (<i>Glomerella sp.</i>) e ENIISC5 (<i>Fusarium sp.</i>).	64

Lista de abreviaturas

LAM – Lamarck.

ONG – Organização não governamental.

ESPLAR – não há tradução para a sigla, trata-se do próprio nome da ONG.

PDA – Potato dextrose agar.

AS – Ágar Sabouraud.

TC – Taxa de colonização.

AS_F – Ágar Sabouraud utilizado no isolamento das folhas.

AS_C - Ágar Sabouraud utilizado no isolamento dos caulículos.

PDA_F – Potato dextrose agar utilizado no isolamento das folhas.

PDA_C – Potato dextrose agar utilizado no isolamento dos caulículos.

TSA – Trypic soy agar.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

UFS – Universidade Federal de Sergipe.

LMA – Laboratório de microbiologia de alimentos.

DTA – Departamento de tecnologia de alimentos.

DP – Despolimerizante.

DE – Desesterificante.

M1 – Meio de cultura para lipase nº1.

M2 - Meio de cultura para lipase nº2.

M3 - Meio de cultura para lipase nº3.

Introdução Geral

A moringa, *Moringa oleifera* L., é uma planta tropical nativa da Índia que foi introduzida no Brasil por volta de 1950, sendo encontrada na região Nordeste, principalmente nos Estados do Maranhão, Piauí e Ceará. No Ceará, em alguns municípios interioranos, tem seu cultivo estimulado pela ESPLAR, uma ONG que oferece cartilha para a população com instruções para aplicação de uma técnica de purificação de água que envolve a *Moringa oleifera* como o agente purificador (LORENZI & MATOS, 2008)

Trata-se de um arbusto ou árvore de pequeno porte, de crescimento rápido, que alcança de 10 a 12m de altura. Possui uma copa aberta e rala, em forma de sombrinha e usualmente um único tronco. Uma planta que cresce rapidamente com pouca demanda ou nenhuma atenção horticultural e possui uma resistência que permite a sua sobrevivência em períodos de seca prolongados. Podendo ser considerada uma das plantas mais úteis para as regiões semi-áridas. No Brasil, é cultivada como planta ornamental e medicinal, atingindo porte bem menor (LORENZI & MATOS, 2008; RANGEL, 2010; ROLOFF et al., 2009; SUTHERLAND et al., 1994).

A literatura descreve inúmeros usos para a moringa. Rica em nutrientes (proteínas, vitamina A e C, cálcio, ferro, fósforo, ácidos palmítico, esteárico e oléico) constitui uma fonte alimentar das mais relevantes (RANGEL, 2010; ROLOFF, 2009). Dentre outros usos de interesse tecnológico que se pode ressaltar, destacam-se: fonte de óleo para produção de biodiesel, cosméticos, propriedades farmacológicas no combate a inúmeras doenças, adubo, forragem e o tratamento de água (RANGEL, 2010; RASHID et al. 2008; ROLOFF, 2009).

O uso das sementes trituradas de *M. oleifera* na purificação de água é muito estudado, pois a utilização destas representa o custo de apenas uma fração do tratamento químico convencional, constituindo uma alternativa da mais alta importância. Além do poder floculante, o extrato possui ainda uma taxa de remoção de bactérias na ordem de 90-99% (RANGEL, 2010).

Os extratos das sementes e das flores têm sido aplicados *in vitro*, para estudos de efeito bactericida (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* e *Escherichia coli*), fungicida e larvicida (*Aedes aegypti*) (FERREIRA et al., 2009; MOURA et al., 2010; NETO et al., 2010; PEREIRA NETO et al., 2008; PONTUAL et al., 2010a; PONTUAL et al., 2010b; VIEIRA et al., 2010).

No entanto, na literatura não foram encontradas informações sobre ação antimicrobiana/fungicida no que diz respeito às folhas e outras partes da planta. Sabe-se que a associação de fungos micorrízicos com a raiz da *Moringa oleifera* é possível (FARIAS et al., 2008). Sendo a relação entre esta planta e fungos filamentosos um campo a ser investigado.

Fungos filamentosos são microrganismos naturalmente produtores de enzimas, sendo explorados comercialmente como “fábricas” de enzimas (PAIVA; SÁ-PEREIRA, 2008). O grupo de enzimas mais explorado comercialmente são o das enzimas hidrolíticas, ou hidrolases, que catalisam a clivagem hidrolítica de ligações –C-O, -C-N, -C-C, possuindo um grande potencial biotecnológico. São responsáveis pela catálise de reações de hidrólise de diversos substratos, tais como: proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, lipídeos, etc. (ÂNGELO, 2010). Proteases, lipases, amilases, pectinases são alguns dos grupos de maior importância, estando envolvidos em diversos processos na indústria de alimentos, como produção de queijo, sucos, vinhos, produtos de panificação e etc.

Deve-se considerar sempre que a síntese de enzimas deve estar de acordo com a origem do microrganismo e que as interações metabólicas com seu ambiente de origem devem melhorar a síntese dos metabólitos secundários. Os microrganismos endofíticos se aplicam a ambos critérios, eles crescem na planta sem causar danos e crescem neste habitat implicando interação metabólica contínua entre o fungo e a planta hospedeira, além de produzirem mais metabólitos secundários (51%) que aqueles isolados do solo (38%) (SCHULZ et al., 2002).

Microrganismos endofíticos podem ser capazes de colonizar, em alguma fase da vida, tecidos vegetais internos sem causar danos à planta hospedeira ou estruturas visíveis (AZEVEDO et al., 2000; PETRINI, 1991). Estes microrganismos são associados à síntese de exoenzimas tanto para penetração e colonização do vegetal hospedeiro quanto para controle biológico, atacando invasores com a produção de enzimas que inibem o crescimento destes, dentre estas enzimas podem-se citar: proteases, amilases, lipases, celulasas, xilanasas, pectina liase, quitinase, protease, e β -glucanase (SCHULZ et al., 2002; SESSISTSCH; REITER; BERG, 2004). Em consonância, Azevedo (1998) associa alguns endófitos isolados de folhas e pecíolos com uma alta produção de enzimas como celulasas e ligninases, e Silva et al. (2008) isolou bactérias de cafeeiro testadas para produção de enzimas relacionadas a resistência

a pragas, lipoxigenase, fenilalanina amônio liase e peroxidase. Havendo aumento de 100% na produção de peroxidases em plantas tratadas com endófitos, esta enzima está diretamente ligada a processos de formação de barreiras físicas que limitam o crescimento de patógenos.

Com base no interesse por microrganismos produtores de enzimas e da ausência de estudos da associação de fungos endófitos com a *Moringa oleifera*, uma planta de grande utilidade para o homem, o presente trabalho objetivou isolar fungos filamentosos endofíticos produtores de proteases, amilases, lípases e pectinases a partir da mesma.

Capítulo I: Isolamento de fungos filamentosos endofíticos a partir de *Moringa oleifera* Lam., Moringaceae.

Resumo

A moringa, *Moringa oleifera* L., é uma planta nativa do norte da Índia, amplamente distribuída nos países tropicais, possuindo grande importância econômica na indústria e medicina. A literatura carece de trabalhos sobre associação da moringa com microrganismos, carecendo de uma visão sobre a microbiota deste vegetal de ampla utilização. Os fungos endofíticos são capazes de viver no interior de órgãos e tecidos vegetais como caules, folhas e raízes de várias plantas sem causar efeito negativo ao hospedeiro. As amostras foram coletadas de forma asséptica, lavadas com água destilada esterilizada, seguida de tratamento com álcool a 70% por 1 min, e hipoclorito de sódio a 3% (v/v) por quatro minutos, álcool a 70% por 30s, e 3 lavagens em água destilada esterilizada. Após a desinfecção procedeu-se o isolamento dispondo 4 fragmentos de ± 5 mm do caulículo da vagem, de folhas e da raiz em placas de petri contendo meios de cultura PDA (Potato Dextrose Agar) e Sabouraud (AS). Calculou-se então, após o período de incubação, a taxa de colonização para cada amostra (TC%) que consiste no nº total de segmentos com um ou mais isolados dividido pelo nº total de segmentos utilizados. O presente trabalho isolou 24 fungos filamentosos endofíticos da moringa, obtendo TC de: 0% para raiz (independente do meio), 20,83% para PDA_F, 66,67% para PDA_C, 33,33% para AS_F e 87,5% para AS_C. A TC pode variar de acordo com a composição do meio, a espécie vegetal, a distribuição geográfica, a idade da planta, a precipitação anual, a parte da planta utilizada, dentre outros fatores. Os fungos isolados são representados pelos gêneros: *Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Geotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Glomerella* sp., e a bactéria *Burkholderia gladioli*. Estes microrganismos são descritos na literatura como endófitos e patógenos de vegetais fungos endofíticos, possuindo interesse comercial e científico conhecidos pela produção de antimicrobianos, importantes no controle biológico e etiológico, produção de enzimas, emulsificantes, etc.

1. Introdução

A espécie *Moringa oleifera*, nativa do Nordeste da Índia, é uma planta de porte arbóreo pertencente à família Moringaceae e amplamente cultivada nos trópicos de todo o mundo; flores, folhas e sementes tem aplicação industrial, medicinal e nutricional.

No Brasil, especialmente na região nordeste tem seu cultivo estimulado pela ESPLAR (LORENZI & MATOS, 2008), já que é uma planta que pode ser facilmente propagada por sementes ou por estacas, sem a necessidade de nenhum tratamento prévio. A planta requer poucos tratos culturais e cresce rapidamente até uma altura de 4 m no primeiro ano. A produção de vagens começa já em 6-8 meses após o plantio (RANGEL, 2010; ROLOFF et al., 2009).

Em adição, Sutherland et al. (1994) indica que a moringa cresce rapidamente com pouca demanda ou nenhuma atenção horticultural e possui uma resistência que permite a sua sobrevivência em períodos de seca prolongados. Podendo ser considerada uma das plantas mais úteis para as regiões semi-áridas. Regiões pobres podem ser favorecidas com o plantio desta planta, já que esta constitui uma fonte rica de nutrientes, e suas sementes trituradas podem ser utilizadas no tratamento de água.

Em estudos que dizem respeito ao isolamento de microrganismos a partir desta planta somente Barros, Mesquita e Passos (2009) relata a presença dos fungos *Aspergillus sp.*, *Alternaria sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.* e *Rhizoctonia sp.*, nas sementes de moringa, concluindo que estes podem ser associados à baixa qualidade destas semente para cultivo. No entanto estudos para fungos endofíticos, ou que envolvem outros focos microbiológicos não foram encontrados, sendo este um campo a ser estudado e investigado

Os fungos são seres eucarióticos altamente eficientes na degradação de diversos substratos, constituem-se como um grupo muito grande e heterogêneo, sendo organismos que podem ser encontrados distribuídos em diversos ambientes. São importantes agentes primários do ciclo do carbono, do nitrogênio e de outros nutrientes na biosfera (GRIFFIN, 1994). Dentre os nichos ecológicos dos fungos, pode-se destacar os vegetais, alguns fungos são capazes de colonizar, em alguma fase da vida, tecidos vegetais internos sem causar danos à planta hospedeira ou estruturas visíveis (AZEVEDO et al., 2000; PETRINI, 1991), sendo chamados de Endofíticos.

A origem e transmissão dos microrganismos endofíticos são muito discutidas. Atualmente, associa-se a diversas causas, podendo ser provenientes das sementes, da rizosfera, do filoplano e de material propagado vegetativamente, ou ainda evoluir de uma fitopatogênese até uma simbiose mutualística. Sendo, portanto, microrganismos amplamente dispersos, encontrados em vegetais, como: algas marinhas, gramíneas,

coníferas, angiospermas, etc (ARNOLD, et al., 2000; HALLMANN et al., 1997; SUZUKI, 2006; TAN & ZOU, 2001).

A colonização endofítica ocorre no tecido interno da planta usualmente com o objetivo de adquirir nutrientes e proteção do hospedeiro, em troca contribui para a melhoria da saúde da planta fornecendo metabólitos funcionais, como os fito hormônios que aceleram o seu crescimento, ou fazem com que o hospedeiro se adapte mais facilmente a estresses ambientais, ou ainda promovendo a resistência da planta ao ataque de insetos e herbívoros, e a infecções de patógenos (AZEVEDO et al., 2000; REDMAN et al., 2002; TAN & ZOU, 2001).

Com tantas habilidades interessantes que os fazem capazes de serem utilizados em processos biotecnológicos, este trabalho objetivou isolar fungos endofíticos de caráter filamentoso, a partir de uma fonte natural: fragmentos de caulículos da vagem, folhas e raiz da *Moringa oleifera* Lam. assim como identificar os fungos produtores segundo o gênero, contribuindo assim para a formação de um banco de culturas fúngicas, disponível para pesquisas posteriores, na Universidade Federal de Sergipe.

2. Revisão bibliográfica

2. 1. Moringa

2. 1.1. Origem

A moringa é originária da Cordilheira do Himalaia, no Sul da Ásia , a partir do nordeste do Paquistão, passando pelo norte da Índia até o noroeste de Bangladesh (Figura 1), onde ela é comumente encontrada desde o nível do mar até altitude de 1.400 m em terras de aluvião recente ou leitos de rios e próximo de riachos. É cultivada em outras partes do Paquistão, Índia e Nepal, assim como no Afeganistão, Bangladesh, Sri-Lanka, sudeste da Ásia, Ásia Ocidental, a Península Arábica, África Oriental e Ocidental, ao longo das Antilhas e sul da Flórida, na América Central e na América do Sul, do México ao Peru, assim como no Brasil e Paraguai (ROLOFF et al., 2009).

A planta é conhecida por vários nomes comuns, de acordo com os diferentes usos. Na Índia e parte da África, é conhecida como 'baqueta' em razão da forma dos seus frutos que representam um alimento básico. Ainda na África, também é conhecida como "a melhor amiga da mãe" (RANGEL, 2010). Ou então recebe denominações tais

como jasmim francês, jacinto, acácia branca, bem oleífera, cedro e quiabo-de-quina (CORRÊA, 1984; LORENZI & MATOS, 2008).

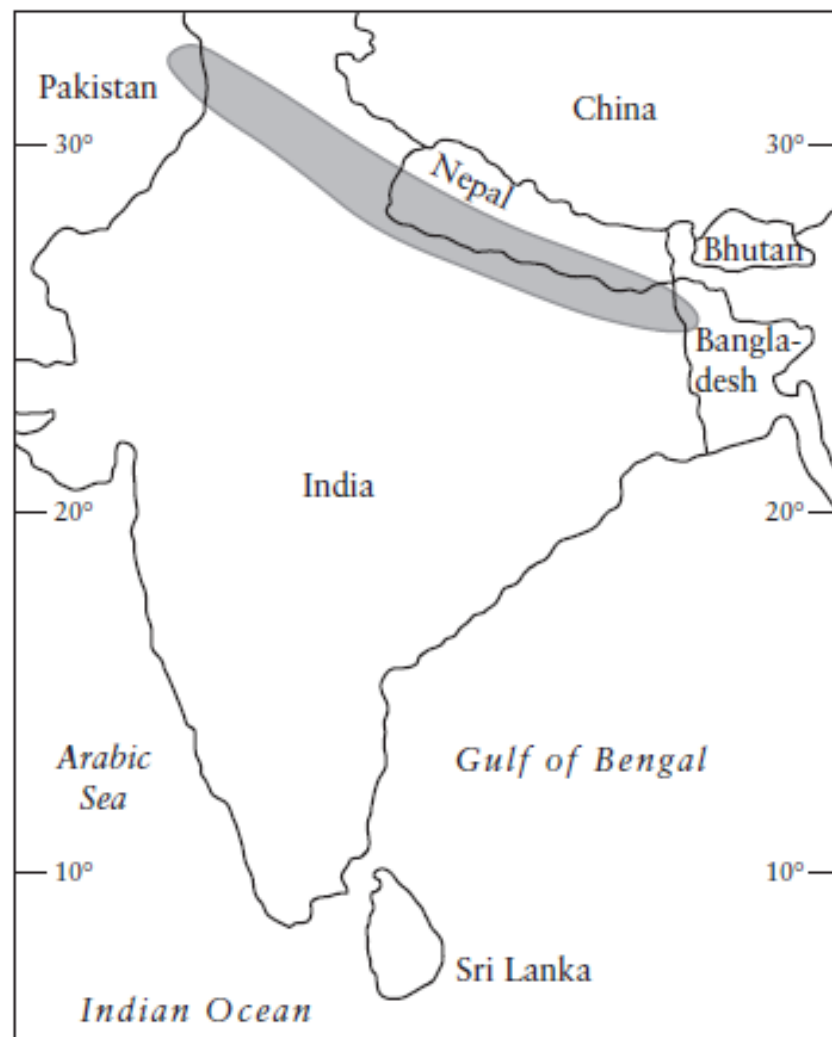


Figura I. 1. Região nativa da Moringa (fonte: ROLOFF et al., 2009).

No Brasil, especialmente na região nordeste (Ceará mais precisamente) em alguns municípios interioranos, tem seu cultivo estimulado pela ESPLAR (LORENZI & MATOS, 2008). O ESPLAR é uma organização não governamental, sem fins lucrativos, fundada em 1974, com sede em Fortaleza (CE). Atuante em municípios do semi-árido cearense, desenvolvendo atividades voltadas para a agroecologia, a serviço da agricultura familiar (ESPLAR, 2010).

2. 1. 2. Relação Filotaxonômica da *Moringa oleifera* L.

Cysne (2006) descreve a classificação taxonômica da *Moringa oleifera* da seguinte maneira:

Divisão: *Magnoliophyta*

Classe: *Magnoliopsida*

Subclasse: *Dilleniidae*

Ordem: *Capparidales*

Família: *Moringaceae*

Gênero: *Moringa*

Espécie: *Moringa oleifera* L.

2. 1. 3. Características da *Moringa oleifera* Lam.

A *Moringa oleifera* pertence à família Moringaceae, que é composta apenas de um gênero (*Moringa*) e quatorze espécies conhecidas, é nativa do Norte da Índia e cresce atualmente em vários países dos trópicos. É um arbusto ou árvore de pequeno porte, de crescimento rápido, que alcança de 10 a 12 m de altura. Possui uma copa aberta e rala, em forma de sombrinha e usualmente um único tronco (Figura 2). No Brasil, é cultivada como planta ornamental e medicinal e atinge porte bem menor (LORENZI & MATOS, 2008; RANGEL, 2010; ROLOFF et al., 2009).

As folhas são bipinadas, de folíolos obovais, pequenos e glabros. As flores que emergem em panículas, são de cor creme e perfumadas. Os ramos são frágeis, as folhagens espessas, os galhos finos e peludos variando entre verde e marrom. Os frutos estão sob a forma de vagens, com nove sulcos longitudinais, geralmente 20 a 50 cm de comprimento, mas, ocasionalmente, até 1 m ou mais, e 2,0-2,5 cm de largura. As vagens, cada uma contendo geralmente até 26 sementes, são de cor verde escuro durante o seu desenvolvimento, e podem levar cerca de três meses para amadurecer após o florescimento. As sementes são triangulares e medem cerca de 1 cm de diâmetro, são recobertas por uma película esbranquiçada, e têm uma relação de peso de cerca de 3000 a 9000 sementes por quilograma (Figura 2). A casca do caule é cinza-esbranquiçada, espessa, macia, fissurada e enrugada. Quando ferida, a casca exsuda uma goma que inicialmente é de cor branca, mas pode sofrer alterações para marrom avermelhado ou marrom preto quando exposta ao ambiente. A madeira é macia e leve, com uma

densidade de 0,5 a 0,7 g/cm³ (LORENZI & MATOS, 2008; RANGEL, 2010; ROLOFF et al., 2009).



Figura I. 2. Árvore de Moringa (A); detalhe das folhas (B); sementes com casca (C); e detalhe frontal da flor (D) (Fonte: RANGEL, 2010; ROLOFF et al., 2009; www.natureasmedicine.wordpress.com).

É uma planta que pode ser facilmente propagada por sementes ou por estacas. As sementes podem ser plantadas diretamente no local definitivo ou em sementeiras. Não há necessidade de nenhum tratamento prévio. A planta requer poucos tratamentos culturais e cresce rapidamente até uma altura de 4 m no primeiro ano. A produção de vagens começa já em 6-8 meses após o plantio, sendo geralmente baixa durante os primeiros dois anos, mas a partir do terceiro ano uma única árvore pode produzir entre 600 e 1600 frutos por ano, ou 50 a 70 kg de frutos/ano (RANGEL, 2010; ROLOFF et al., 2009).

Em adição, Sutherland et al. (1994) indica que a moringa cresce rapidamente com pouca demanda ou nenhuma atenção horticultural e possui uma resistência que permite a sua sobrevivência em períodos de seca prolongados. Podendo ser considerada uma das plantas mais úteis para as regiões semi-áridas.

Há também uma relação direta com o tipo de sementes utilizadas para o plantio da moringa e o desenvolvimento de suas plântulas. Sementes mais pesadas germinam mais rápido e geram plantas mais vigorosas. O armazenamento destas sementes também

influencia no cultivo, já que após 12 meses de armazenamento em embalagem plástica sob ambiente natural, as sementes perdem a sua viabilidade, enquanto estufa (10 °C/ 55% de Umidade Relativa) aos 24 meses, as sementes apresentam redução na qualidade fisiológica (BEZERRA; MOMENTÉ; MEDEIROS FILHO, 2004; BEZERRA et al., 2004).

2. 1. 4. Utilizações da *Moringa oleifera* L.

Os frutos verdes, folhas, flores e sementes torradas são altamente nutritivos e consumidos em muitas partes do mundo. O óleo obtido das sementes da moringa pode ser usado no preparo de alimentos, na fabricação de sabonetes, cosméticos (perfumes principalmente, pelo seu poder de absorção e retenção de odores), lubrificante para relógios e como combustível para lamparinas. A pasta resultante da extração do óleo das sementes pode ser usada como um condicionador do solo, fertilizante ou ainda na alimentação animal. O bagaço é usado como adubo. Na Índia, todas as partes da planta são usadas na medicina natural, porém, a química e a farmacologia das diferentes partes da planta são ainda pouco conhecidas (RANGEL, 2010; ROLOFF et al., 2009).

As folhas, nos países de origem da planta, são colhidas diariamente para uso em sopas, molhos e saladas. Possuindo um alto conteúdo de proteína (27%), e sendo ricas em vitamina A e C, cálcio, ferro e fósforo (RANGEL, 2010).

Em adição Silva et al. (2010) apresentam a seguinte composição química para as folhas de *Moringa oleifera* L.: 80,26% de água, 14,75% de cinzas, 7,48% de fibras, 7,19% de lipídeos, 33,77% de proteínas, 36,81% de carboidratos. Moura et al. (2011) compara a composição centesimal das folhas com as de flores e vagens, tendo estas últimas maior teor de água e por isso a quantidade de todos os outros componentes citados acima é ligeiramente menor.

Em consonância, Roloff et al. (2009) afirmam que a árvore é valorizada como fonte de alimento, já que suas vagens comestíveis, folhas e flores juntas são ricas em proteínas, minerais, beta-caroteno, tiamina, riboflavina, e outras vitaminas, particularmente as vitaminas A e C. O teor de ácido ascórbico (vitamina C) nas vagens verdes é de 92-126 mg por 100 g de polpa. Os frutos jovens, flores e folhas chegam a conter 5-10 por cento de proteína.

Considerando as folhas, flores e vagens desta planta como boas fontes de proteína, e outras substâncias de valor nutritivo essencial à alimentação humana, a

moringa pode-se apresentar como uma alternativa de suplemento em preparações alimentícias a serem utilizadas pela população. Como já vem ocorrendo no nordeste do Brasil, com sua aplicação na merenda escolar (LORENZI & MATOS, 2008).

Apesar da moringa não estar inserida no cardápio ocidental, estudos de aceitabilidade de pão francês e de sorvete enriquecidos com farinha de moringa foram realizados, com o objetivo de fortificar estes alimentos garantindo produtos nutritivos e de baixo custo para a população de baixa renda. Em sorvetes, o produto teve boa aceitação dos provadores desde que em combinação com algum sabor (menta ou kiwi) e para o popular pão francês a aceitabilidade foi satisfatória para a formulação que detinha menor conteúdo do pó das folhas de moringa (BRITO & TEIXEIRA, 2011; OLIVEIRA et al., 2011).

As folhas e os galhos ainda podem ser usados como forragem para animais e as flores são uma boa fonte de pólen para as abelhas. Já a madeira de *M. oleifera* é pouco usada fora do seu ambiente nativo, exceto como lenha e, ocasionalmente, para construção. Na Índia, é usado na indústria têxtil, na produção de celulose para papel de jornal e celofane. As fibras são utilizadas na confecção de esteiras, papel e cordéis. O tronco exsuda uma goma mucilaginosa que é usada no curtimento de couro (ROLOFF et al., 2009).

As sementes possuem de 19-47 % de óleo, semelhante ao azeite, sendo rico em ácidos palmítico, esteárico e oléico (ROLOFF et al., 2009). No entanto, vale ressaltar que as sementes apresentam outras propriedades de interesse tecnológico, além da função nutricional. O óleo das sementes de moringa tem sido considerado como fonte alternativa para a produção de biodiesel, devido a sua constituição (RASHID et al. 2008). Pereira et al. (2011) conseguiram obter um biodiesel dentro dos limites estipulados pela legislação brasileira, em adição Souza et al. (2011) obtiveram um biodiesel com boa estabilidade térmica.

A forma mais abrangente e estudada da *M. oleifera*, atualmente, é o uso das suas sementes trituradas na purificação de água, que representa o custo de apenas uma fração do tratamento químico convencional, constituindo uma alternativa da mais alta importância (RANGEL, 2010).

Paterniani, Mantovani e Sant'Anna (2009) comprovaram a eficácia do extrato das sementes no tratamento de água. No entanto, Cardoso et al. (2008) salientaram que os parâmetros de tempo de decantação, assim como a concentração do extrato das

sementes de *Moringa oleifera* Lam influenciam a remoção de cor e turbidez, durante o processo de coagulação/floculação, e que seu uso no tratamento de água não deve dispensar uma etapa de desinfecção da mesma.

Santana (2009), em ensaios com água sintética e água fornecida pela Petrobrás, determinou como concentração ótima de moringa de 2,5 g/L para as amostras de água sintética e de 1,5 g/L para as amostras de água da Petrobrás, num processo denominado floculação por ar dissolvido.

Estudos vêm sendo feitos para extrair e avaliar a atividade dos compostos coagulantes presentes em sementes de *Moringa oleifera* Lam (NDABIGENGESERE; NARASIAH; TALBOT, 1995; OKUDA et al., 1999). Paiva & Coelho (2011) detectaram atividade hemaglutinante proveniente da presença de lecitina na constituição dos extratos de sementes de moringa, lecitinas são proteínas ou glicoproteínas que se ligam aos carboidratos e às moléculas hidrofóbicas promovendo a aglutinação destes.

No Brasil, a ESPLAR, cuja sede em Fortaleza, oferece cartilha para a população com instruções para aplicação de uma técnica de purificação de água que envolve a *Moringa oleifera* como o agente purificador (LORENZI & MATOS, 2008).

Em relação à remoção de bactérias, reduções na ordem de 90-99% têm sido relatadas na literatura (RANGEL, 2010). As sementes e flores da moringa possuem agentes inibidores de proteases, mas especificamente de tripsina. Estas substâncias têm sido descritas na literatura como potenciais agentes antimicrobianos (MOURA et al., 2010). Pereira Neto et al. (2008) citam a 4(α -L-Rhamnosyloxy) isoticianato de benzila (glucosinalato) como o agente antibactericida encontrado nos extratos da sementes de moringa.

O extrato das sementes aplicado *in vitro* demonstrou efeito bactericida para *S. aureus*, *V. cholerae*, *E. coli*, *B. subtilis* e *P. aeruginosa* assim como, ação larvicida sobre *Aedes aegypti*, e ainda eficiência de até 62,5% na remoção de cianobactérias (*Microcystis protocystis*) em água artificialmente contaminada (FERREIRA et al., 2009; NETO et al., 2010; NISHI et al., 2011; SOUZA et al., 2009; VIEIRA et al., 2010).

Pereira Neto et al. (2008) investigaram ainda a utilização do extrato das sementes, na diminuição de microrganismos presentes em leite bovino, sendo este eficiente na remoção de bolores e leveduras (98,18%) e de *Staphylococcus aureus* (55,17%). E não considerado tóxico nas quantidades utilizadas podendo ser utilizado como purificador de alimentos.

Extrato aquoso de flores de *M. oleifera*, também possui atividade larvicida contra *Aedes aegypti*, vetor da dengue. Sendo que cerca de 200 µg do extrato é capaz de inibir em 86% a atividade de tripsina do vetor, sendo a redução proporcional ao tempo de incubação com o extrato. O extrato possui, ainda, a propriedade de repelir fêmeas de *A. aegypti* para oviposição, sendo uma medida a ser explorada para evitar a proliferação do vetor, afastando os mosquitos de potenciais sítios de oviposição (PONTUAL et al., 2010a; PONTUAL et al., 2010b).

No que se refere ainda, ao extrato de flores da moringa, a literatura indica uma ação bacteriana do mesmo (PONTUAL et al., 2011). Moura et al. (2010) demonstraram a atividade antimicrobiana contra as bactérias *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, considerando-a eficaz.

Apesar da vasta utilização da moringa, suas propriedades farmacológicas, tecnológicas e antimicrobianas, não foram encontradas na literatura informações sobre ação antimicrobiana no que diz respeito às folhas e outras partes da *Moringa oleifera* Lam.

Em estudos que dizem respeito ao isolamento de microrganismos a partir desta planta somente Barros, Mesquita e Passos (2009) relata a presença dos fungos *Aspergillus sp.*, *Alternaria sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.* e *Rhizoctonia sp.*, nas sementes de moringa, concluindo que estes podem ser associados à baixa qualidade destas semente para cultivo. No entanto estudos para fungos endofíticos, ou que envolvem outros focos microbiológicos não foram encontrados, sendo este um campo a ser estudado e investigado.

2. 2. Fungos filamentosos

2. 2. 1. Definição e morfologia

Os fungos são seres eucarióticos altamente eficientes na degradação de diversos substratos, constituem-se como um grupo muito grande e heterogêneo, sendo organismos que podem ser encontrados distribuídos em diversos ambientes. São importantes agentes primários do ciclo do carbono, do nitrogênio e de outros nutrientes na biosfera (GRIFFIN, 1994). Esposito e Azevedo (2010) estimam que existam cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos, sendo que destas foram descritas cerca de 90 mil espécies.

Os fungos possuem forma vegetativa de dois tipos: levuriforme e hifal. A primeira consiste na forma conhecida como leveduras (unicelular) e, a segunda, como fungos filamentosos, ou ainda bolores e mofos. No entanto, Leite e Esposito (2010), assim como Griffin (1994), partilham que alguns fungos podem mudar de uma forma para outra, dependendo das condições do meio (temperatura, presença de oxigênio e gás carbônico, fatores nutricionais etc.). Em adição, Galvagno e Forchhiassin (2010a) explicam este fenômeno, denominado dimorfismo, como resultado da reprodução de leveduras que ao se duplicarem não conseguem se separar da célula-mãe formando longas cadeias ramificadas de células, que aparentam ser um micélio (pseudomicélio ou micélio invasivo).

Fungos hifais ou filamentosos são aqueles que sua estrutura forma hifas (ramificadas ou não), cujo conjunto denomina-se micélio, que pode ser visualizado a olho nu como um emaranhado de fios delgados que pode variar do hialino (incolor) ao colorido, dependendo da espécie (LEITE & ESPOSITO, 2010).

A hifa de muitos fungos é segmentada por septos que dividem o micélio em unidades similares as células conferindo um caráter “pluricelular” ao fungo filamentoso. No entanto, a presença de poros entre os septos permite o transporte de massa do citoplasma e organelas, assim como a migração de núcleos entre partes distantes do micélio, isto faz com que o número de núcleos por septos possa ser variável. As hifas dos fungos filamentosos são normalmente indiferenciadas, a diferenciação só é possível durante a reprodução quando alguns fungos produzem estruturas somáticas diferenciadas e específicas para esta atividade, são as estruturas reprodutivas (GRIFFIN, 1994).

Os fungos filamentosos conseguem manter a variabilidade genética com apenas um único talo hifal, demonstrando um extraordinário grau de flexibilidade reprodutiva que não é encontrado em nenhum outro ser vivo (GRIFFIN, 1994).

Por exemplo, os fungos filamentosos, que apresentam micélio verdadeiro, crescem por combinação do aumento de volume e de divisão celular que não representam um processo reprodutivo, em outras palavras o que ocorre é um crescimento em extensão e não a geração de novos fungos, este é o resultado que é percebido quando medem-se os diâmetros dos micélios em placas de Petri (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2010a). Esta informação é importante no que diz

respeito à conservação destas culturas, já que a não diferenciação celular pode gerar mutações na cultura, e consequentes mudanças em suas características.

Nesta fase de extensão, ou fase assimilativa do micélio, pode ocorrer reprodução assexuada, com o amadurecimento das estruturas reprodutivas, e a produção de esporos por mitose, servindo como meio de dispersão individual do fungo filamentoso (GRIFFIN, 1994). Esporos são estruturas uni ou multicelulares, sem crescimento ativo e que têm diversas funções, tais como: sobrevivência em meio adverso, dispersão no ambiente e reprodução (esporos sexuais), tendo estruturas variadas de acordo com a sua função (LEITE & ESPOSITO, 2010).

2. 2. 2. Fungos endofíticos

A comunidade microbiana de um vegetal é composta de microrganismos epifíticos, aqueles presentes na sua superfície, e de endofíticos, presentes nos tecidos internos. Tipicamente, os microrganismos endofíticos podem ser: (1) patógenos, que quando presentes numa relação endofítica não possuem caráter patogênico; (2) não-patogênicos; e (3) patógenos que podem ser considerados como não-patogênicos, pois apesar de utilizarem métodos de seleção e alteração genética inerentes da colonização fitopatogênica, não causam doenças para o vegetal (BACKMAN & SIKORA, 2008).

Os endófitos são microrganismos capazes de colonizar, em alguma fase da vida, tecidos vegetais internos sem causar danos à planta hospedeira ou estruturas visíveis (AZEVEDO et al., 2000; PETRINI, 1991). Ou ainda, microrganismos isolados de tecidos vegetais desinfestados superficialmente ou isolados de partes internas das plantas e que não causam danos ao seu hospedeiro (HALLMANN et al., 1997).

Para Sikora et al. (2007), a definição atual para microrganismos endofíticos pode incluir qualquer microrganismo que vive no tecido da planta seja ele neutro, benéfico ou maléfico, ampliando ainda mais a diversidade do objeto de estudo.

A origem e transmissão dos microrganismos endofíticos são muito discutidas. Atualmente, associa-se a diversas causas, podendo ser provenientes das sementes, da rizosfera, do filoplano e de material propagado vegetativamente (HALLMANN et al., 1997; SUZUKI, 2006). Em adição, Tan e Zou (2001) indicam que a relação endófito-planta hospedeira pode evoluir de uma fitopatogênese até uma simbiose mutualística. Esta flexibilidade faz com que estes microrganismos estejam amplamente dispersos e

colonizem uma variedade de vegetais, como algas marinhas, gramíneas, coníferas, angiospermas, etc (ARNOLD, et al., 2000).

A penetração e colonização endofítica ocorrem através dos estômatos da planta, ao contrário de fungos patogênicos que atacam diretamente a parede celular, geralmente através de enzimas hidrolíticas como amilases, celulasas, quitinases, proteases, β -glucanase, lipase, xilanase, etc (SCHULZ et al., 2002; SESSISTSCH; REITER; BERG, 2004).

Em adição Carrol (1988), afirma que microrganismos endofíticos podem ser passados de uma geração pra outra (através das sementes, por exemplo) e sua infecção pode sofrer influência de fatores ambientais como chuva, temperatura etc.

A interação planta/ endófito ainda não é bem compreendida, mas podem ser simbiótica, neutra ou antagonica (SUZUKI, 2006).

Schulz et al. (2002) descrevem esta relação como um afinado equilíbrio entre a virulência do fungo e a defesa da planta, se há distúrbio neste equilíbrio através da diminuição da defesa da planta ou do aumento da virulência do fungo, a doença se desenvolve, resumindo a natureza da interação fungo endofítico- planta hospedeira em:

- 1- Fungos endofíticos produzem as enzimas necessárias para penetração e colonização dos seus hospedeiros, colonizando organismos acima do solo localmente e intercelularmente, e as raízes, em contraste, extensivamente, sistematicamente e inter- e intracelularmente;
- 2- A associação entre o fungo endofítico e a planta pode ser mutualística;
- 3- Fungos endófitos crescem bem usando unicamente fluidos vegetais como meio de crescimento;
- 4- Infecção patogênica resulta da baixa concentração de metabólitos de defesa fenólicos que a colonização endofítica produz.

Carrol (1988) divide em dois os padrões para descrever as estratégias de simbiose mutualística dos microrganismos endofíticos. O primeiro, mutualismo constitutivo, é representado, por exemplo, pelos cereais (trigo, centeio, etc.) e seus endófitos. Neste, o endófito está presente nas sementes, desenvolvendo uma infecção sistêmica por todas as partes aéreas da planta envolvendo uma substancial biomassa fúngica, e está sempre presente nas linhagens que a carregam. As micotoxinas podem deter herbívoros, os quais apresentam uma preferência por plantas não infectadas, dando de forma imediata e direta benefícios para a planta hospedeira. Os custos para a planta

podem ser altos, envolvendo energia para o metabolismo do fungo e, às vezes, baixa função de reprodutividade. Já o mutualismo induzido envolve uma associação perdedora entre endofítico e hospedeiro. Abundância de um endófito pode variar com distribuição geográfica e idade do hospedeiro. O fungo normalmente vive inerte ou em tecidos metabolicamente inativos como casacas e epiderme, colonizando tecidos vitais unicamente quando o hospedeiro se encontra sobre ataque de insetos ou patógenos

A colonização endofítica ocorre no tecido interno da planta usualmente com o objetivo de adquirir nutrientes e proteção do hospedeiro, em troca contribui para a melhoria da saúde da planta fornecendo metabólitos funcionais, como os fito hormônios que aceleram o seu crescimento, ou fazem com que o hospedeiro se adapte mais facilmente a estresses ambientais, ou ainda promovendo a resistência da planta ao ataque de insetos e herbívoros, e a infecções de patógenos (AZEVEDO et al., 2000; REDMAN et al., 2002; TAN & ZOU, 2001).

Endofíticos não têm sido extensivamente estudados significando que os seus metabólitos isolados são menos conhecidos ainda. Por outro lado, a produção de metabólitos primários e secundários está diretamente ligada às vantagens já descritas, seja na produção de diversos alcalóides, ou substâncias antimicrobianas e antifúngicas, enzimas, etc. De acordo com Schulz et al. (2002) os fungos endofíticos produzem mais metabólitos secundários (51%) que aqueles isolados do solo (38%), demonstrando que estes microrganismos são uma fonte promissora de substâncias de valor biotecnológico.

2. 2. 3. Isolamento

Os fungos têm existência difusa em toda a superfície terrestre, no entanto, para estudos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos destes microrganismos é necessário isolá-los. Para um processo economicamente viável é desejável isolar linhagens, que demandem curtos tempos de fermentação, ou seja, tenham elevada velocidade específica de crescimento, não produzam pigmentos indejáveis, sejam capazes de metabolizar substratos de baixo custo, dentre outros (MORAES, 2005).

Os microrganismos possuindo os atributos fundamentais para que possam ser usados em processos biotecnológicos, podem ser isolados, purificados, selecionados e testados como culturas puras, a partir de uma fonte natural. Os estudos de isolamento, normalmente, são realizados junto aos substratos (ar, solo, águas, resíduos) que lhes são

afetos, descobrindo-se assim, novas e até mesmo, melhores e mais adaptadas linhagens (MORAES, 2005; NAKAYAMA, 1981 apud Colen, 2006).

As fontes para o isolamento são diversas podendo ser o solo (terra), água, vegetais, plantas e animais vivos, águas residuais, alimentos frescos, resíduos industriais, para exemplificar segue trabalhos que objetivaram o isolamento de fungos filamentosos.

Souza et al. (2005) isolaram fungos degradadores de derivados de petróleo a partir de amostras poluídas com derivados de petróleo coletadas às margens da Lagoa da Barra, situada na região Portuária de Suape - PE, onde se foi detectado poluição ambiental por estes derivados. Em consonância, Pinto (1989) isolou fungos filamentosos do solo e da água da praia de Boa Viagem, Recife – PE, e Pereira et al. (2009) observou a presença de fungos filamentosos em fontes de água mineral.

Já Uenojo e Pastore (2006) isolaram microrganismos pecnolíticos a partir de resíduos de agroindústrias como grãos de café, água de lavagem de café, folhas de pé de café, terra de cafezal e de frutas (banana, mexerica, laranja, melão, mamão, goiaba, uva e damasco). Nesta linha, Baglione (1998) isolou fungos filamentosos termoresistentes em polpa de tomate envasada. E Darini; Soares e Cazenave (2003) isolaram fungos filamentosos (*Aspergillus sp*, *Fusarium sp*, *Penicillium sp*) em cannabis (conhecida popularmente como maconha).

Guimarães et al. (2006) isolaram 23 cepas fúngicas com potencial para produção de enzimas de interesse biotecnológico (xilanase, glucose-oxidase, fosfatase alcalina, fosfatase ácida, fitase, pectinase e amilase) a partir de diversas fontes: bagaço de cana de açúcar, soja, húmus (matéria orgânica em decomposição) e plantas coletadas em São Paulo.

Devido a estas inúmeras possibilidades de nichos ecológicos como fonte de fungos, é raro que um fungo que se desenvolve em condições naturais se encontre completamente livre de outros microrganismos e sempre existe o perigo da sementeira direta dê lugar a uma contaminação. Em todo caso, poucas vezes podem-se fazer cultivos diretos sem introduzir uma contaminação grosseira. A melhor maneira de analisar um microrganismo consiste em fazer uma série de cultivos a fim de isolá-lo (SMITH, 1963).

A purificação de um cultivo impuro compreende uma série de cultivos efetuando a transferência de fungos isolados para novos meios de cultura. Inoculando no centro de

uma placa de Petri com meio em que o fungo se desenvolva bem (repique). Quando o micélio tem aproximadamente um centímetro se retira uma pequena porção do micélio e se inocula em tubo com ágar inclinado (SMITH, 1963).

Não é estranho, também, que as placas com meio de cultivo sejam contaminadas profusamente por bactérias que muitas vezes inibem o crescimento dos fungos (SMITH, 1963). Para evitar este tipo de interferência pode-se escolher um meio que garanta seletividade, usar antibióticos (tetraciclina, cloranfenicol etc) e ainda reduzir o pH até 3,5-4 com o uso de ácidos.

O tempo necessário para que o crescimento se faça visível varia entre algumas horas e vários dias e depende de muitos fatores, sendo os mais importantes a espécie do fungo, a capacidade nutritiva do substrato e a umidade relativa do ar (SMITH, 1963).

Quando o meio dispõe de uma quantidade adequada de nutrientes e as condições ambientais são favoráveis, se observa um crescimento gradual e a presença de uma rede de filamentos delgados, denominados de hifas, que juntas formam o micélio. Contudo, o repique de um micélio resulta em crescimento irregular e não homogêneo, devendo ser usado por curtos períodos de tempo, após o isolamento é viável fazer suspensão de esporos para cultivo dos fungos filamentosos (GRIFFIN, 1994).

Os meios de cultura a serem utilizados dependem do material a estudar, geralmente, usam-se a gelose glucosada de Saubouraud e meios enriquecidos com extrato de levedura, sangue ou infusão de órgãos (ESTEVES; CABRITA; NOBRE, 1990). Os meios sólidos, sob forma de ágar são os melhores, já que os fungos hifais quando crescem em ágar possuem micélio visível, geralmente, circular, enquanto no meio líquido sob agitação formam “pellets”, enovelados miceliais, que depois de um certo período de crescimento, começam a se autolizar na região interna devido à ausência de oxigênio (LEITE & ESPOSITO, 2010).

Às vezes é necessário promover o enriquecimento prévio antes do isolamento. Se houver condições ambientais adversas, o fungo pode se estressar e não se desenvolver nos meios de isolamento convencionais. Normalmente, utilizam-se meios de infusão de órgãos (infusão coração e cérebro), ou ricos em açúcares (lactose) para induzir o enriquecimento das amostras e prosseguir o isolamento. Putzke e Putzke (2004a) indicam os meios naturais como os melhores para o isolamento.

2. 2. 4. Isolamento de fungos endofíticos

Fungos endofíticos, como já foram citados anteriormente, têm sido isolados de diversas plantas: gramíneas, cereais como trigo e centeio, algas marinhas, coníferas, angiospermas, etc (ARNOLD, et al., 2000; PETRINI, STONE, CARROL, 1982; POWELL & PETROSKI, 1992).

Isto é reflexo de inúmeras pesquisas que se intensificaram nos últimos 30 anos, tendo estes microrganismos como objeto de estudo, possuindo meta primordial de entender o comportamento dos mesmos a partir de variados prismas como: avaliar a similaridade entre diferentes espécies de um mesmo vegetal e a sua diversidade de endófitos (PETRINI; STONE; CARROL, 1982); estudar produção e importância de seus metabólitos secundários (SCHULZ et al., 2002; POWELL & PETROSKI, 1992); observar os efeitos da temperatura, latitude e zona climática na biodiversidade da microbiota endofítica (ARNOLD, et al., 2000; ARNOLD & LUTZONI, 2007); entender como se estabelece a relação endófito-planta hospedeira (CARROL, 1988) e quais os benefícios associados, sejam eles resistência as condições ambientais (REDMAN et al., 2002) ou a pragas (AZEVEDO et al., 2000); dentre outros.

No Brasil, o isolamento de endofíticos tem fomentado poucas pesquisas, parte delas com plantas da região amazônica que é conhecida pela elevada biodiversidade (SANTOS, et al., 2008; SOUZA et al., 2004); outras com plantas de diferentes estados como leguminosas em Pernambuco (STAMFORD et al., 1998), citrus em São Paulo (LACAVA et al., 2006), milho em Roraima (GOMES, 2009), “ervas” como barbatimão, no cerrado paulista (FAVORETTO, 2010), etc.

O isolamento de microrganismos endofíticos pode ser realizado utilizando diferentes técnicas, o que possibilita o isolamento de grupos distintos com diferentes necessidades nutricionais e taxas de crescimento. A escolha da melhor metodologia está associada, em parte, à escolha do tecido da planta (folha, ramos, flores, raízes, caule, etc) e a acessibilidade a microbiota intracelular associada. Contudo, não importa qual método seja escolhido, a coleta e desinfecção superficial são tarefas iniciais de delicada importância para o isolamento de microrganismos endofíticos (ARAÚJO et al., 2002) .

Segundo Araújo et al. (2002), a coleta deve partir de plantas saudáveis, sem lesões de cunho microbiano ou por danos físicos, e em geral, com partes aéreas das plantas (folhas, ramos, caule) o mais distantes do solo. O transporte deve proceder rapidamente, com acondicionamento, que evite aquecimento das amostras, de modo que estas mantenham ao máximo suas características. Este autor, assim como Petrini, Stone e

Carrol (1982), relata que as amostras que chegam ao laboratório ainda podem ser armazenadas a baixas temperaturas 4-6°C por um período que pode variar entre 24 e 72h até procedimento de isolamento.

A desinfecção pode ser descrita como a etapa mais importante no isolamento de endófitos. Sabe-se que a microbiota vegetal é dividida em endofíticos e epifíticos, a eliminação destes últimos da superfície, é necessária para que haja diferenciação entre os grupos e apenas os endofíticos sejam isolados no processo. Araújo et al. (2002) define a desinfecção como processo de “completa eliminação da comunidade externa, mantendo viável a população interna da amostra vegetal”.

Existem diversos agentes desinfestantes reportados na literatura. Petrini, Stone e Carrol (1982), utilizaram etanol 96%, juntamente com solução comercial de Chlorox a 65% (Concentração final de 3,25% de NaOCl), como desinfestantes; Arnold et al. (2000), Schulz et al. (2002), Sessitsch, Reiter e Berg (2004) e Petrini et al. (1993) fizeram uso de álcool a 70% e hipoclorito de sódio em diferentes concentrações; e Araújo et al. (2002) indicam diversos autores, que utilizaram diferentes componentes químicos, como formaldeído, cloreto de mercúrio, peróxido de hidrogênio, cloramina T, etc.

Após a desinfecção procede-se o isolamento. Esta etapa tem como princípio a ruptura ou fragmentação do tecido vegetal de modo a expor o conteúdo interno deste, o qual entrará em contato com meios de cultura específicos. As técnicas mais utilizadas são a fragmentação, a centrifugação e a maceração. Na primeira, ocorre a disposição de fragmentos (0,5 cm) da planta desinfestados em placas de Petri, constando de partes variadas da amostra, por exemplo, as folhas; devem-se utilizar discos da região do nervo central, assim como discos ao lado dos nervos. Os outros dois métodos se baseiam na extração da seiva da planta desinfestada em solução, seja por força centrífuga, ou por força mecânica, a suspensão final é diluída e semeada em placa de Petri (ARAÚJO et al., 2002).

O isolamento por fragmentação permite que se calcule a taxa de colonização (TC) dos endofíticos, ou seja a “capacidade” deste microrganismo de colonizar o tecido, se a distribuição é uniforme ou não. Esta taxa é obtida através da divisão do número de fragmentos infectados pelo número total de fragmentos incubados, e é expressa em porcentagem (PETRINI, STONE, CARROL, 1982).

Os meios de cultura nos quais são feito os cultivos podem ser seletivos e enriquecidos com antibióticos e antifúngicos, de acordo com o grupo que se deseja isolar. Muitos autores utilizam meios de cultura como extrato de malte (geralmente 2%), TSA (Tryptic Soy Agar) 5%, ágar nutriente, meio ágar-ágar (para culturas de crescimento rápido), meio Potato dextrose ágar (PDA), ou ainda meio de cultura elaborado com tecidos da planta hospedeira (meio folha), etc (ARAÚJO et al., 2002; LACAVA et al., 2006; PETRINI; STONE; CARROL, 1982; SESSISTSCH; REITER; BERG, 2004).

As temperaturas de incubação geralmente variam de 20°C a 37°C. Sendo importante considerar a temperatura do hábitat natural da planta e a finalidade e o tipo de microrganismo que se quer isolar. Isto é válido também para o tempo de incubação, pois períodos muito curtos favorecem o isolamento de culturas de crescem rapidamente, em detrimento aos microrganismos de crescimento lento (ARAÚJO et al., 2002; AZEVEDO, 1998; PETRINI; STONE; CARROL, 1982).

2. 2. 5. Identificação

A identificação dos fungos filamentosos se baseia na observação das características macroscópicas e microscópicas dos mesmos. A importância destas características diferentes é variável segundo as espécies e é comparada com as descritas nas chaves de identificação de fungos disponíveis na literatura especializada.

Na descrição macroscópica, se considera a macromorfologia dos fungos em meios: Czapek, PDA (Potato Dextrose Ágar), Extrato de malte, Sabouraud, usados de acordo com as exigências nutricionais de cada grupo de fungos (RIDDELL, 1950; ARAGÃO, 1989). Em outras palavras, a análise do micélio visa observar a cor (se é uniforme, em zonas, ou em mosaico, de cor parda, verde, negro etc.), forma, textura (algodoadado, penugento, granuloso, gelatinosa), superfície (gotículas de líquido transpirado), pigmento difusível no meio de cultura e reverso dos micélios desenvolvidos (SMITH, 1963).

A análise macroscópica é feita com observação direta da cultura fúngica disposta na placa de Petri com auxílio de uma lupa. Já a análise microscópica utiliza o método de cultura em lâmina.

A observação microscópica é realizada pela descrição micromorfológica das estruturas, utilizando quando necessário, a técnica de cultura em lâmina. Microscopicamente, avalia-se cor, diâmetro, características do micélio (hifa hialina ou

demácia), formação dos esporos e suas características, presença ou ausência de septos e as características (cor, tamanho e forma) e disposição dos órgãos de reprodução (ESTEVES; CABRITA; NOBRE, 1990; RIDDELL, 1950; ARAGÃO, 1989; SMITH, 1963).

Estas diferentes características podem ser associadas também a ‘idade’ do micélio ou o seu tempo e cultivo, por isso é importante que os cultivos sejam analisados a intervalos frequentes. Smith (1963) enfatiza esta importância quando descreve o crescimento do micélio filamentosos; à medida que esta se desenvolve, uma mudança de cor na parte central e mais velha do micélio se instala, o exame microscópico nesta fase demonstrará a presença de estruturas reprodutoras, as quais se distinguem facilmente das demais hifas, Griffin (1994) completa que o desenvolvimento de esporos é um processo de diferenciação de células reprodutivas e de suas estruturas de suporte no corpo fúngico envolve além de mudanças na aparência (morfologia), modificações na fisiologia e composição química.

Respeitar o período de desenvolvimento reprodutivo também é importante, pois apesar das diferentes características gerais de um micélio, nem sempre estas são suficientes para reconhecê-lo e classificá-lo, sendo os esporos, de maior diversidade de modo de esporulação, tamanho, forma e cor, mais constantes e mais confiáveis como base para classificação dos fungos filamentosos.

Vale salientar ainda, que a produção de esporos pode ocorrer em dois padrões básicos: (1) “open-ended”, no qual os esporos e estruturas de suporte crescem no corpo somático preexistente, utilizando as reservas e nutrientes viáveis neste corpo; e (2) “closed-ended”, no qual a estrutura somática inteira está voltada para esporulação e não ocorre crescimento (GRIFFIN, 1994).

A cultura em lâmina (figura 3) utiliza um conjunto esterilizado de placa de Petri contendo no fundo papel filtro e bastão de vidro dobrado em V ou U, sobre a qual se coloca uma lâmina. É necessário manter o ambiente úmido adicionando água a placa e após o tempo de incubação inativar a produção de esporos utilizando formol. O vapor de formol, além de inativar o fungo, irá auxiliar na fixação das estruturas microscópicas. A lâmina é revelada com corante azul de lactofenol-algodão. A observação em microscópio ótico requer um aumento de 40 vezes para identificação do tipo e cor da hifa, forma disposição e formação de esporos e todas as características já indicadas

como importantes no processo de identificação (ANVISA, 2004; ESTEVES; CABRITA; NOBRE, 1990).

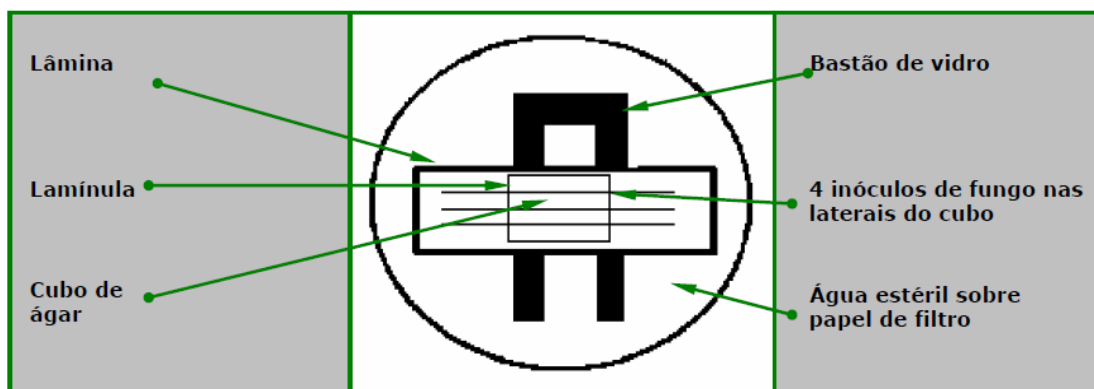


Figura I. 3. Esquema para técnica de cultura em lâmina (ANVISA, 2004).

2. 2. 6. Preservação

Os que se dedicam a estudar as atividades bioquímicas dos fungos a fim de isolar ou fabricar determinados produtos metabólicos, se vêem obrigados a testar muitas cepas da mesma espécie ou de espécies afins e a cultivá-las em meios distintos e em condições diversas, sendo essencial dispor de uma coleção. A possibilidade de dispor de um microrganismo a qualquer momento gera outras vantagens, tais como viabilizar estudos sobre a morfologia, fisiologia, taxonomia e comparação entre as espécies e etc (PUTZKE, J. & PUTZKE, M. T. L., 2004b; SMITH, 1963).

Segundo Smith (1963), para se manter com êxito uma cultura:

- 1- O cultivo deve se conservar vivo;
- 2- Todas as cepas devem manter-se em estado de pureza;
- 3- E o quanto for possível, cada espécie ou cepa deve manter todas as características que tinha quando isolado (patogenicidade, esporulação, fisiologia, morfologia).

Há, entretanto, aspectos que podem inviabilizar a manutenção de tais características, e que devem ser evitados tais como (ESTEVES; CABRITA; NOBRE, 1990; PUTZKE, J. & PUTZKE, M. T. L., 2004b; SMITH, 1963):

- a contaminação por outros organismos (bactérias, ácaros, insetos);
- o dessecamento do meio por alterações da temperatura;
- o esgotamento do meio em função da taxa metabólica de cada espécie;

- pleomorfismo (infertilidade do micélio);
- a ocorrência de mutações espontâneas (perda das características bioquímicas);
- a ocorrência de autointoxicações.

As diferentes espécies, algumas do mesmo gênero, possuem longevidade muito variável, de modo que os esporos de alguns fungos comuns permanecem viável, durante anos, outros perdem seu poder germinativo ao fim de poucos meses. Algumas cepas suportam secagem, outras devem ser conservadas em meios úmidos (SMITH, 1963). Toda esta diversidade define a escolha do tipo de conservação da cultura, e do tipo de meio a ser utilizado.

É fundamental que o meio de cultivo permita o crescimento vigoroso do fungo, ou seja, característico, mas não exuberante. São inúmeros os meios de cultura que podem ser utilizados, cada um de acordo com o microrganismo, o ágar Czapek é ideal para várias espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, já o ágar farinha de aveia para quase todos *HypHomyctos*, o de ágar gelatina para espécies que crescem rapidamente, outros meios utilizados são o de farinha de milho, arroz, batata, extrato de malte etc (ESTEVES; CABRITA; NOBRE, 1990; SMITH, 1963).

Com base na literatura, os métodos de conservação mais utilizados são:

Sub-cultura: consiste na inoculação do microrganismo em meio adequado, na incubação para obtenção de crescimento na estocagem sob determinadas condições, com repetição desse processo para meio fresco em determinados intervalos de tempos. Esse irá variar com o microrganismo. Deve-se considerar: preferência ao meio mínimo (baixo teor de carboidratos) porque proporciona baixo metabolismo; armazenamento em temperatura ambiente requer cuidados para evitar desidratação do meio, podendo-se incubar em temperaturas de refrigeração (PUTZKE, J. & PUTZKE, M. T. L., 2004b).

Manutenção em óleo mineral: utiliza-se óleo mineral (nujol ou amerol) esterilizado para cobrir toda a cultura que se deseja preservar, contida em tubo de ensaio com ágar inclinado. Desta forma as culturas submersas em óleo mineral têm consumo de oxigênio reduzido em cerca de 80%, e, conseqüentemente, a taxa metabólica é reduzida. É necessário que o óleo cubra toda a superfície, mesmo que se deixe apenas uma pequena região de contato com ar, esta já será suficiente para promover a desidratação do cultivo (ESTEVES; CABRITA; NOBRE, 1990; PUTZKE, J. & PUTZKE, M. T. L., 2004b).

Manutenção em água destilada: transfere-se uma porção da cultura para o tubo de ensaio contendo água destilada esterilizada. Os tubos são mantidos a temperatura ambiente, por longos períodos (1 a vários anos), sem perda da viabilidade (PUTZKE, J. & PUTZKE, M. T. L., 2004b).

Congelamento: depois da esporulação das culturas, estas são colocadas por alguns dias a 5-10°C e a seguir conservadas na temperatura final, normalmente numa faixa de -20 a -196°C, sendo a estocagem em -70°C satisfatória e aquelas acima de -30°C empregada com cautela, para evitar que a célula seja exposta a altas concentrações de sais. Este método previne o fenômeno de pleomorfismo e pode durar de 1 a 3 anos sem renovação do meio (em meio sem peptona e açúcar) (ESTEVES; CABRITA; NOBRE, 1990; PUTZKE, J. & PUTZKE, M. T. L., 2004b).

Liofilização: esse processo é aplicável a maior parte dos fungos, mais precisamente para aqueles formadores de esporos, no entanto não para os produtores de esporos muito grandes, ou que esporulam escassamente. O método consiste na desidratação à vácuo de células previamente congeladas em meio de suspensão esterilizado que pode ser o leite desnatado, sacarose ou lactose a 10%, dentre outros. A desidratação sob alto vácuo e o pré-congelamento (com gelo seco) não permitem que as proteínas se desnaturem e previnem contrações celulares. A conservação do material deve ser realizada a baixas temperaturas, e na ausência de luz para evitar o desequilíbrio do líofilo. O fluido e as condições de reconstituição/reidratação são decisivos na recuperação do material (PUTZKE, J. & PUTZKE, M. T. L., 2004b).

3. Material e método

3. 1. Coleta das amostras

As amostras foram coletadas da planta *Moringa oleifera* Lam. de forma asséptica, com material esterilizado, no campus de São Cristovão da Universidade Federal de Sergipe (UFS) (figura 4).





Figura I. 4. Árvores de moringa no campus de São Cristovão da UFS.

O acondicionamento para transporte das amostras foi feito em embalagens esterilizadas e hermeticamente fechadas até o laboratório de microbiologia de alimentos (LMA), no departamento de tecnologia de alimentos (DTA) da UFS, e as análises foram realizadas o mais rápido possível após a coleta, para que não houvesse perda de material e interferência nos resultados.

O material vegetal foi composto por folhas, caulículos da vagem e fragmentos de raiz (figura 5) de 5 plantas diferentes, em três coletas distintas com períodos de 20 dias entre elas, nos meses de abril a julho.

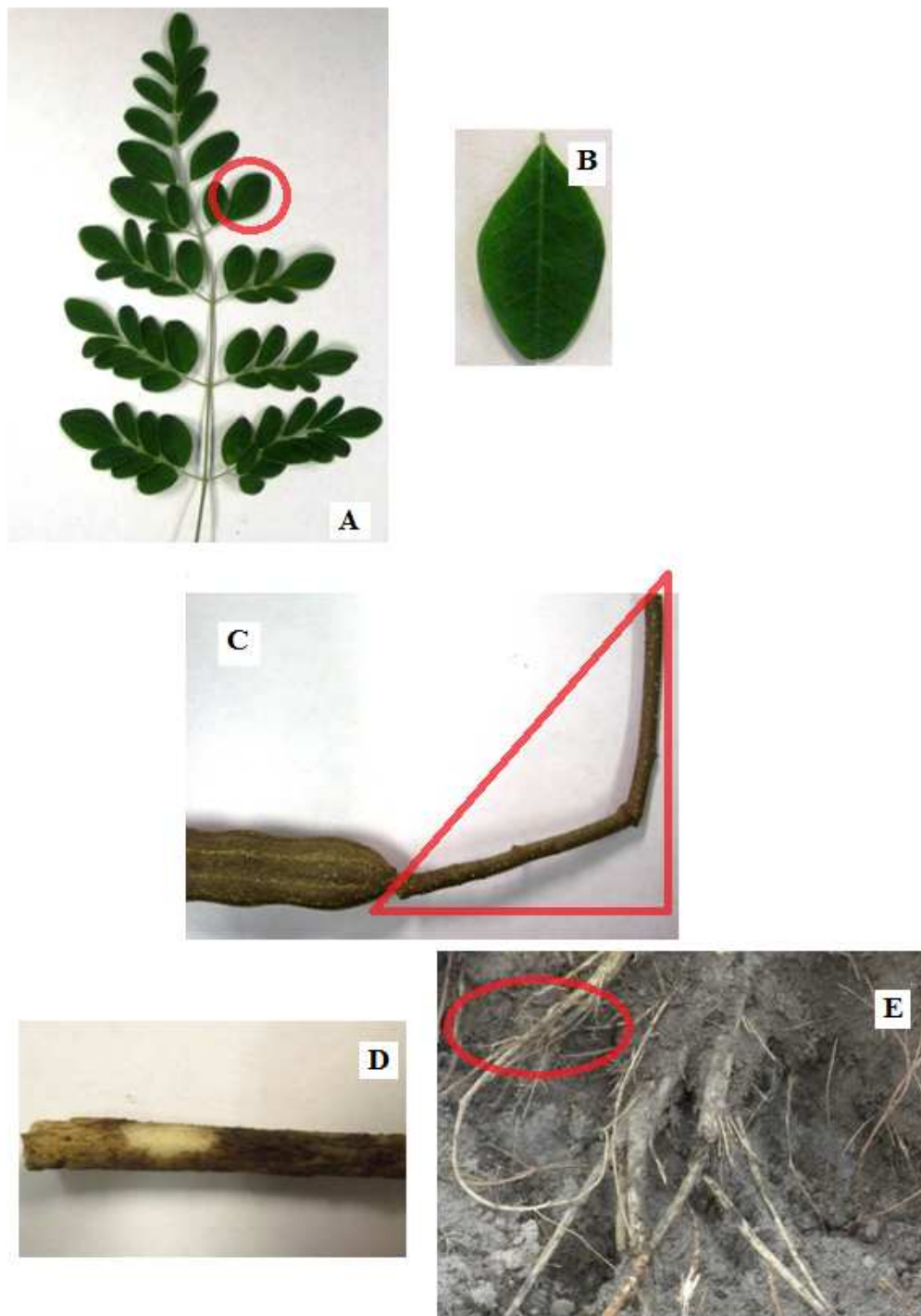


Figura I. 5. Amostras de folha (detalhes A e B), do caulículo da vagem (C), da raiz (D) e da raiz da árvore exposta (E).

3. 2. Preparo das amostras

As amostras foram preparadas logo após a chegada no LMA. Passando por um processo de desinfecção, que consistiu em: lavagem com água corrente, seguida de tratamento com álcool a 70% por 1 min, e hipoclorito de sódio a 3% (v/v) por quatro minutos, álcool a 70% por 30s. Para finalizar foi realizada a lavagem em água destilada esterilizada para remoção das soluções anteriores, este processo foi repetido 3 vezes.

As amostras foram colocadas para secar em papel filtro esterilizado e em seguida as bordas do material foram retiradas, para evitar nesta área o acúmulo dos agentes desinfectantes (ARAÚJO et al., 2001; PETRINI et al., 1993).

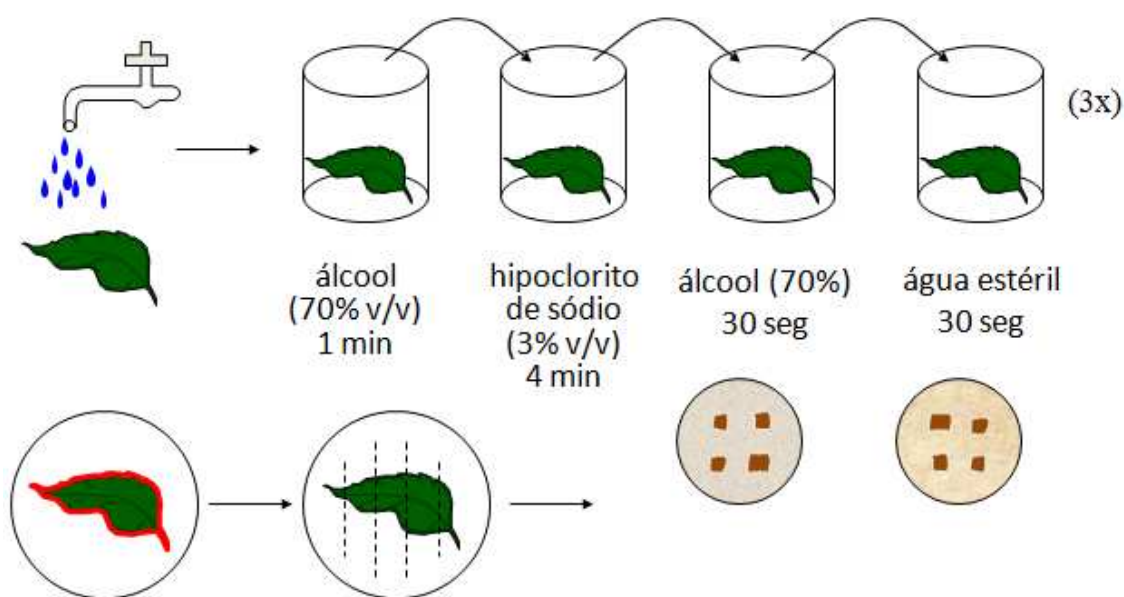


Figura I. 6. Isolamento segundo Petrini et al. (1993).

A última água de lavagem foi utilizada como parâmetro de eficiência da desinfecção, inoculando-se 0,1 ml da mesma em placa através de técnica por superfície, utilizando a alça de driglaski, no meio de cultura por 7 dias/ 28°C.

3. 3. Isolamento

Para o isolamento foram utilizados fragmentos de cerca 5 a 8 mm de tamanho, dispostos em placas de Petri contendo os meios para isolamento. Cada placa conteve 4 fragmentos de folha, formando assim uma unidade experimental (figura 7), para cada coleta foram feitas duas unidades experimentais, totalizando 8 fragmentos.

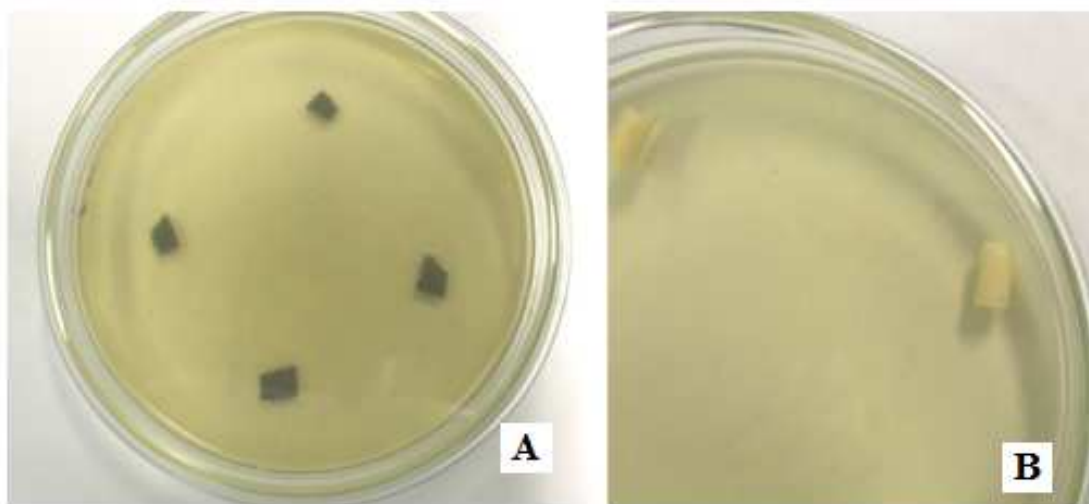


Figura I. 7. Unidade experimental de fragmentos foliares (A) e detalhe da unidade experimental de fragmentos da raiz (B), ambas com meio ágar Sabouraud.

Como podem ser observadas na figura 7, as amostras de raiz tiveram sua casca retirada de modo a evitar o crescimento de microrganismos resistentes ao processo de desinfecção.

Os meios utilizados foram o PDA (potato dextrose ágar), preparado de acordo com Bernadi, Caldeira e Nascimento (2005), e o meio ágar Sabouraud (AS) preparado segundo composição determinada por Araújo & Lemos (2002).

O meio PDA foi preparado, utilizando-se 140 g de batatas descascadas e cortadas em cubos, cozidas em 1.000 mL de água destilada por aproximadamente 15min. No decoto filtrado adicionou-se 10 g de dextrose e 15 g de ágar e o volume foi completado para 1.000 mL. Já o meio sabouraud era composto por peptona (10g/L), glicose (40g/L) e ágar (15g/L).

Todos os meios tiveram o pH ajustado em 5,0 e autoclavados a 121°C por 15 minutos. Para estudos dos micélios fúngicos, cada placa de Petri continha cerca de 20 mL do meio.

As placas foram lacradas e incubadas a 28 ± 2 °C por sete dias, e a análise acompanhada diariamente a fim de verificar visualmente a velocidade de crescimento nos meios utilizados (SILVA et al., 2006).

Após o período de incubação foi calculado a taxa de colonização para cada amostra (TC) que segundo Petrini, Stone e Carroll (1982) consiste no nº total de segmentos com um ou mais isolados dividido pelo nº total de segmentos utilizados (expressa em porcentagem).

A prioridade para escolha dos micélios teve como base a cor. Os isolados deveriam possuir os micélios nas cores verde, amarelo, branco e preto este critério se baseia na literatura que indica *Aspergillus*, *Trichoderma*, e *Penicillium* como alguns dos gêneros mais explorados na produção de enzimas, em adição cepas de *Rhizopus* e *Mucor* também são citadas (KOBLITZ, 2008; PASTORE & MACEDO, 2010; TORRES et al., 2008;).

Ao surgirem os primeiros fragmentos de hifas nos meios de cultura, estes foram repicados para placas de Petri contendo o meio da unidade experimental, respectivo ao qual foi isolado, para as individualizações das culturas. Para diferenciar os isolados foi utilizado o seguinte código: primeiro EN, indicando que o fungo é endofítico; seguida do nº indicando a coleta; seguida da letra referente ao tipo de meio no qual foi isolado Sabouraud (S) e PDA (P); logo depois a letra referente a parte da planta ao qual é correspondente, (C) para caulículo, (F) para folha e (R) para raiz; e por último o nº do isolado. Por exemplo: ENIIIPF1, primeiro endofítico isolado na terceira coleta, em meio PDA, a partir de folha.

3. 4. Identificação

As culturas foram identificadas na MICOTECA URM, da Universidade Federal de Pernambuco, por método clássico de identificação no nível de gênero, para alguns isolados foi possível a identificação das espécies.

3. 5. Preservação

Após a purificação, os micélios foram armazenados, a temperatura ambiente, em tubos contendo ágar Sabouraud ou PDA inclinados (cerca 5 ml, em tubos esterilizados), e completados com óleo mineral esterilizado e resfriado em dessecador para retirar água de condensação, reduzindo o consumo de oxigênio dos fungos em cerca de 80% (PUTZKE, J. & PUTZKE, M. T. L., 2004b).

4. Resultados e Discussão

Os valores para taxa de colonização, gerados por este trabalho, podem ser observados na tabela 1. A qual faz referência somente a dois tecidos vegetais diferentes, o de folha e o de caulículo da vagem.

A supressão dos valores relacionados à raiz da moringa deve-se ao fato de que não foi possível isolar nenhum fungo filamentoso a partir deste tecido, o único

crescimento observado foi o de colônias leitosas (figura 8), que podem estar relacionadas a leveduras, e, também, a bactérias já que não houve utilização de antibióticos no preparo do meio de cultura.



Figura I. 8. Unidade experimental de fragmentos de raiz colonizada com colônias leitosas.

Fröhlich, Hyde e Petrini (2000) aplicam dois conceitos interessantes que podem contribuir para explicar o não isolamento de filamentosos na raiz da moringa, são eles: colonização vertical e colonização horizontal. A colonização vertical, como o nome sugere, acontece de baixo para cima, ou seja, a distribuição dos microrganismos endofíticos no vegetal hospedeiro começa na raiz da planta, seja pelo “ataque” desta, ou ainda por meio das sementes. Já a colonização horizontal acontece via propágulos aéreos, nas folhas, ramos, caulículos. Relacionando estes conceitos e os resultados da

TC neste trabalho, pode-se sugerir que a colonização de fungos endofíticos na moringa é de caráter horizontal.

No entanto Barros, Mesquita e Passos (2009) isolaram fungos de diferentes gêneros nas sementes de moringa, o que levanta a pergunta se realmente não há influência desta microbiota na distribuição endófitas destes fungos na moringa. Podemos relacionar esta questão com a afirmação de Azevedo (1998), de que um tempo de incubação excessivo pode permitir um crescimento de microrganismos mais agressivos que mascaram o aparecimento dos microrganismos de crescimento vagaroso. Ou seja, a ausência de fungos filamentosos na raiz, não está associada ao tipo de colonização, mas sim a uma dificuldade operacional durante o isolamento.

Tabela I.1. Taxa de colonização (%) das 3 coletas para os meios PDA e Ágar Sabouraud, e seus respectivos fragmentos de folha e caulículos

Tratamentos	TC I	TC II	TC III	TC média (%)
PDA_F	25	0	37,5	20,83 ^a
PDA_C	25	75	100	66,67 ^{b, c}
AS_F	12,5	87,5	0	33,33 ^{a, b}
AS_C	62,5	100	100	87,5 ^c

*A variância da TC média, foi calculada com nível de confiança de 95%, utilizando o método de Fischer de mínima diferença significativa. Médias que apresentaram índices iguais não possuem diferença significativa.

No que diz respeito às demais partes da planta estudadas (figura 9), os resultados podem ser discutidos de duas formas diferentes, primeiramente a partir das diferentes coletas para cada tratamento, e em seguida a partir dos valores médios de TC.

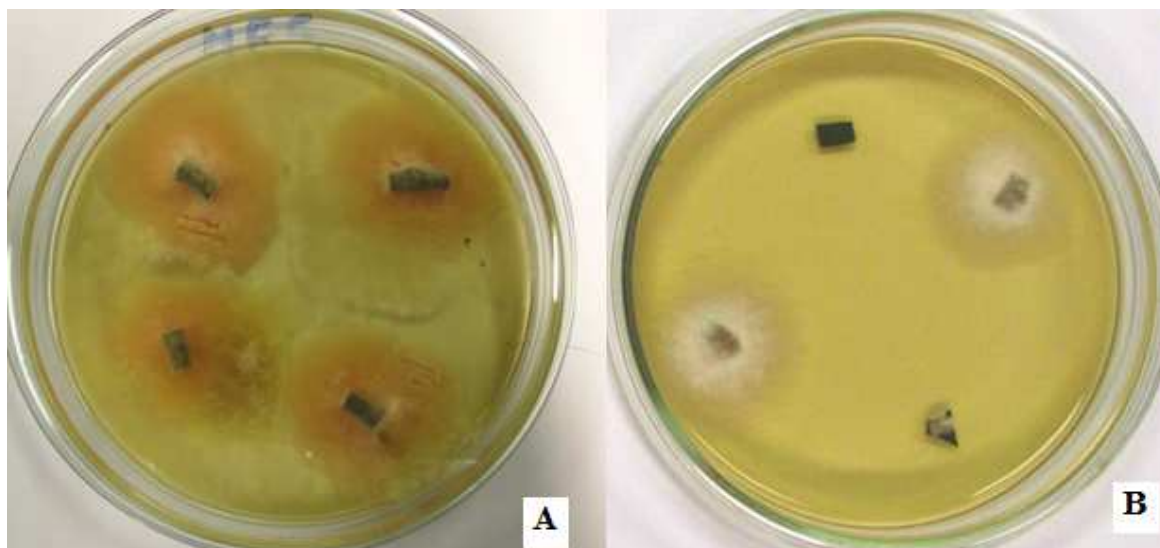


Figura I. 9. Unidades experimentais de caulículos (A) e de folhas (B) colonizadas por fungos filamentosos.

As taxas relativamente altas de infecção e as baixas taxas de colonização dos fragmentos observadas neste estudo em um único tratamento, por exemplo, os valores discrepantes para PDAc, (25%, 75%, 100%), podem ser atribuídas à separação física dos endófitos dentro da planta hospedeira, ou seja, os endofíticos nem sempre estão distribuídos de forma homogênea nos tecidos vegetais, mesmo naqueles de mesma natureza. Esta observação foi exposta por Petrini, Stone e Carrol (1982) em estudo de diversidade de fungos em plantas de pequeno porte, no qual os autores acrescentam o fato de que o uso de apenas um meio de isolamento, pode resultar na incapacidade de isolar alguns fungos que ocupam a mesma porção da folha com um fungo de crescimento mais rápido. Logo, o período de incubação de sete dias e os meios PDA e AS, podem ter sido ineficientes para a visualização de micélios de crescimento lento gerando um valor de TC= 0% falso.

É importante salientar que esta pesquisa teve como objetivo isolar fungos filamentosos, de modo a contribuir com um panorama geral da microbiota endófito da *Moringa oleifera*, o que não havia sido feito antes. Logo a utilização aleatória de 5 plantas, presentes na mesma localidade e de idades aparentemente distintas, contribuem para a alta variabilidade de TC nas coletas. Em consonância, Carrol (1988) afirma que taxa de colonização para fungos filamentosos leva em conta a espécie vegetal, a distribuição geográfica, a idade da planta, a parte da planta utilizada, temperatura,

dentre outros fatores inclusive a precipitação de chuva anual. O período das coletas abril a julho é suscetível a chuvas em Aracaju

Quando observamos os resultados de TC média para os diferentes tratamentos, verificamos que não há diferença significativa entre os fragmentos de vegetal de mesma origem, quando se muda apenas o meio de cultura. A diferença pertinente nos resultados é vinculada somente as diferentes partes da planta utilizadas (folhas e caulículos). Sendo estes últimos a fonte de maior Taxa de colonização (66,67% e 87,5%), isso pode ser devido ao fato de o caulículo da vagem ser mais rico em nutrientes (presença maior de seiva).

Fröhlich, Hyde e Petrini (2000) isolaram fungos endófitos associados com palmas (*Licuala sp.*) na Austrália obtendo taxas de colonização variando entre 81 e 89%. Foram encontradas diferenças entre os tipos de tecidos e a idade dos mesmos. Corroborando com esta informação, Ganley & Newcombe (2006) obtiveram diferentes valores TC variando entre os diferentes tecidos de pinheiro (*Pinus monticola*), nas “agulhas” a TC variou de 12 a 98%, para a plântula (embrião vegetal desenvolvido e ainda cerrado na semente) a TC foi de 32-67%, enquanto que para as sementes a TC foi bem mais baixa, 0-10%.

Comprovando ainda as diferenças de TC entre os tecidos, Gazis & Chaverri (2010), isolando fungos endofíticos das folhas e caules de seringueiras selvagens no Peru, constataram que apesar do caule possuir maior diversidade de isolados, a taxa de colonização foi maior nos tecidos foliares (cerca de 90%), enquanto que no alburno (parte mais externa do caule) a TC foi de 60%.

Silva et al. (2006) isolaram fungos endofíticos de graviola e pinha obtendo TC superiores a 50% e, em geral, sem diferenças significativas entre as partes da planta utilizada (folha, caule, raiz). Estes frutos são obtidos de árvores tropicais, cuja zona climática oferece uma importante, rica e quantificável fonte de biodiversidade fúngica (ARNOLD et al., 2000).

Ao contrário, Luz et al. (2006) procederam a coleta de endofíticos no maracujazeiro-amarelo, utilizando amostras de raízes, caules e folhas, obtendo nestas últimas, de maneira geral, as maiores taxa de colonização (até 92,4%). Outros autores também verificaram diferenças nas TC em diferentes tecidos: Santos Magalhães et al. (2008), obtiveram maiores taxas de colonização nos fragmentos caulinares de candeia, e

Costa Neto (2002) obtiveram uma TC média de 23,9% em pupunheira, sendo 47,7% no mesocarpo, 29,2% no endocarpo e 14,8% na amêndoa.

A presença de microrganismos endofíticos na *Moringa oleifera* abre um leque de questões interessantes para pesquisa científica, por exemplo: Como estes microrganismos se relacionam com a “moringa-hospedeira”? Esta relação acontece de forma benéfica, neutra ou negativa?

A *Moringa oleifera* é descrita como uma planta que cresce rapidamente com pouca demanda ou nenhuma atenção horticultural e possui uma resistência que permite a sua sobrevivência em períodos de seca prolongados. Podendo ser considerada uma das plantas mais úteis para as regiões semi-áridas (SUTHERLAND et al., 1994). Será que esta resistência a ambientes estressantes pode estar associada a sua microbiota endofítica? Já que os microrganismos endofíticos são amplamente conhecidos por melhorar a saúde das plantas hospedeiras fornecendo metabólitos funcionais, como os fito-hormônios que aceleram o crescimento da planta; ou fazem com que o hospedeiro se adapte mais facilmente a condições ambientais adversas, conferindo termotolerância ou tolerância a salinidade, por exemplo, aos vegetais hospedeiros (REDMAN et al., 2002; TAN & ZOU, 2001).

Neste mesmo pensamento, substâncias de potencial antimicrobiano e larvicida têm sido relacionadas à moringa (MOURA et al., 2010; PONTUAL et al., 2010a; PONTUAL et al., 2010b; RANGEL, 2010), sendo que esta mesma capacidade é atribuída a microrganismos endofíticos presentes em diversas plantas, no controle biológico de pragas e insetos a partir da produção de alcalóides específicos (TAN & ZOU, 2001). É possível que haja ligação entre estes dois objetos de pesquisa?

Para responder estas e outras perguntas, estudos mais abrangentes devem ser realizados com finalidade de esmiuçar a colonização endofítica, sua biodiversidade, e a produção de seus metabólitos associadas à moringa.

Sabe-se que as condições ambientais, as quais o hospedeiro está submetido, influenciam na população endofítica, e o perfil endofítico pode ser mais diversificado em áreas tropicais. A diversidade endofítica, inicialmente, dependerá das espécies de hospedeiros e de sua localização, e em seguida, da idade e da propagação sobre os descendentes, os endofíticos podem representar 100% da população microbiana de uma planta hospedeira, ou apenas uma fração e podem ser passados de uma geração pra

outra (através das sementes, por exemplo) e sua infecção pode sofrer influência de fatores ambientais como chuva, temperatura, etc (CARROL, 1988).

A biodiversidade endofítica ainda é desconhecida, comparando comunidades endofíticas Arnold & Lutzoni (2007) caracterizaram a microbiota endofita em altas latitudes como de poucas espécies a partir de diferentes classes de Ascomycota, enquanto as comunidades microbianas de sítios tropicais são dominadas por poucas classes e um largo número de espécies, o que conclui que cada bioma estudado tem única e diversa comunidade endofítica. Em outras palavras cada objeto de estudo, cada planta, cada tecido vegetal são fontes únicas no isolamento de endofítico.

Este trabalho isolou 22 fungos filamentosos (ANEXO I) e duas bactérias este número reduzido é resultado do uso do parâmetro de cor citado na metodologia e de um fenômeno conhecido como dimorfismo. Durante o processo de purificação, os fungos isolados mudaram de forma micelial para levuriforme, este fenômeno, ocorre dependendo das condições do meio (temperatura, presença de oxigênio e gás carbônico, fatores nutricionais etc.). Como o meio intracelular pode ser descrito como um ambiente “estressante” é possível que a leveduras presentes na moringa-hospedeira apresentassem o pseudomicélio (GALVAGNO & FORCHHIASSIN, 2010a).

Destes 24 fungos, 11 foram isolados em meio PDA e 13 em meio Ágar Sabouraud, sendo 9 de origem foliar e os demais 15 dos caulículos da vagem. Na tabela 2, estão dispostos os gêneros dos isolados, e em alguns casos as espécies correspondentes.

Tabela I. 2. Identificação dos fungos isolados de *Moringa oleifera* Lam.

Isolado	Identificação
ENIPC1	<i>Aspergillus sp.</i>
ENIPF1	<i>Aspergillus sp.</i>
ENIPF2	<i>Fusarium oxysporum</i>
ENIPF3	<i>Aspergillus sp.</i>
ENIIPC1	<i>Aspergillus sp.</i>
ENIIPC2	<i>Trichoderma harzianum</i>
ENIIPC4	<i>Geotrichum candidum</i>
ENIIPC5	<i>Trichoderma harzianum</i>
ENIIPC6	<i>Curvularia lunata</i>
ENIIPC7	<i>Curvularia lunata</i>
ENIIPF3	<i>Fusarium oxysporum</i>
ENIISC1	<i>Penicillium sp.</i>
ENIISC2	<i>Colletotrichum graminicola</i>
ENIISC3	<i>Colletotrichum graminicola</i>
ENIISC4	<i>Fusarium oxysporum</i>
ENIISC5	<i>Fusarium sp.</i>
ENIISF1	<i>Glomerella sp.</i>
ENIISF2	<i>Penicillium chrisogenum</i>
ENIISF4	<i>Fusarium sp.</i>
ENIISF5	<i>Trichoderma sp.</i>
ENIISF6	<i>Penicillium chrisogenum</i>
ENIISC1	<i>Burkholderia gladioli</i>
ENIISC3	<i>Burkholderia gladioli</i>
ENIISC4	<i>Fusarium sp.</i>

Barros, Mesquita e Passos (2009) isolaram fungos do gênero *Aspergillus sp.*, *Alternaria sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.* e *Rhizoctonia sp.*, nas sementes de moringa, concluindo que estes podem estar associados à baixa qualidade destas semente para cultivo. Em consonância com estes autores, este trabalho isolou *Aspergillus sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Fusarium sp.*, e *Penicillium sp.* nas folhas e caulículos o que sugere que a colonização dos tecidos da moringa por estes grupos não ficam restringida as sementes.

Estes grupos estão amplamente disseminados como endófitos em outras plantas, por exemplo, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Curvularia* e *Aspergillus* em maracujazeiro (LUZ et al., 2006); *Fusarium*, *Colletotrichum* e *Curvularia* em bananeiras (PHOTITA et al., 2001); *Fusarium* e *Aspergillus* em candeia (SANTOS MAGALHÃES et al., 2008); *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Glomerella* e *Penicillium* em graviola, e em pinha *Fusarium* e *Colletotrichum* (SILVA et al., 2006); *Fusarium*, *Aspergillus* e *Trichoderma* em tubérculos de jacatupé (STAMFORD et al., 1998); *Fusarium*, *Colletotrichum*,

Penicillium e *Trichoderma* em seringueiras (GAZIS & CHAVERRI, 2010); *Fusarium* e *Penicillium* em pupunheira (COSTA NETO, 2002); *Fusarium*, *Colletotrichum*, e *Penicillium* em cafeeiro (VEGA et al., 2010).

Os Gêneros predominantes na moringa são o *Aspergillus* e o *Fusarium*, que juntamente com o *Penicillium* e o *Trichoderma*, estão associados à produção de metabólitos tóxicos como aflotoxinas, ochratoxina, maltorizina, citrinina, rugolossina, gliotoxinas, etc (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; LACAZ, MINAMI, PURCHIO, 1970). Estes dados se tornam interessantes quando somamos Carrol (1988) que afirma que animais herbívoros e, em alguns casos, microrganismos patogênicos são “envenenados” com as micotoxinas produzidas por fungos endofíticos; e Roloff et al. (2009) que indica que uma das utilizações da moringa é o uso de suas folhas e galhos como forragem para animais.

Carrol (1988) cita o gênero *Fusarium* como responsável por infecções assintomáticas enquanto imunizam o vegetal hospedeiro contra fungos patogênicos. Em análise semelhante, Powell & Petroski (1992) descrevem *Clavicipitaceous*, fungo endofítico difundido em gramíneas e trigo, e *Acremonium*, em centeio, como produtores de alcalóides tóxicos para herbívoros. Estas substâncias estão associadas ao aumento ou redução de pressão sanguínea, vasoconstricção, ataques ao sistema nervoso e endócrino, dentre outros sintomas, que influenciam na produtividade de rebanhos alimentados com pastos infectados por este endofítico. Em outras palavras, apesar dos microrganismos endofíticos estarem associados ao benéfico aumento da resistência da planta a pragas, sua infecção infere em toxicidade a animais, isto motiva estudos com o objetivo de determinar se os alcalóides são, de fato, agentes causadores da toxicidade animal.

Powell & Petroski (1992) apresentam outro dado interessante, estes alcalóides, produzidos pelo fungo ou pela planta como resposta à infecção fúngica, ou ataque de herbívoros, podem ser detectados em baixos níveis em farinha de trigo comercial, pães e outros produtos de panificação, logo conhecer a natureza dos metabólitos excretados por endófitos na moringa se faz essencial, pois conhecendo sua natureza podem-se prever os seus impactos na alimentação animal, assim como na do homem, já que este também pode utilizar a moringa como fonte alimentar de alto teor nutritivo.

Schulz et al. (2002) descreveram a relação entre um endófito e a planta hospedeira como um afinado equilíbrio, se há distúrbio neste equilíbrio através da

diminuição da defesa da planta ou do aumento da virulência do fungo, uma doença se desenvolve, esta informação corrobora com o fato de muitos dos endofíticos isolados estarem associados a doenças de plantas.

É o caso de alguns dos fungos isolados na moringa, por exemplo, o fungo *Colletotrichum graminicola* é causador da antracnose, a mais importante doença da cultura do sorgo (*Sorghum bicolor*) e do milho no Brasil. Este fungo pode atacar qualquer parte da planta e em todos os estágios de crescimento da cultura, causando o escurecimento e apodrecimento dos tecidos, o que resulta em perdas significativas na produção (COSTA et al., 2003; COSTA et al., 2010). Outros gêneros de *Colletotrichum* estão associados a doenças em outras culturas, como antracnose em maracujá amarelo, ou, juntamente, com o gênero *Glomerella* infeccionam macieiras causando desfolhamento e diminuindo a produção das plantas (ALMEIDA & COELHO, 2007; ARAÚJO; VALDEBENITO-SANHUEZA; STADNIK, 2010). É interessante que estes dois gêneros sejam isolados juntos, já que muitas vezes o gênero *Colletotrichum* corresponde à forma teleomórfica do gênero *Glomerella*, é exatamente o caso dos fungos *C. graminicola* e *Glomerella graminicola* (COSTA et al., 2003). A forma teleomórfica está associada à fase sexuada do ciclo de reprodutivo, enquanto o anamorfo corresponde à fase assexuada do ciclo (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; MOORE-LANDECKER, 1990), é possível então que as condições que o caulículo predispõe para o fungo sejam mais satisfatórias para um ciclo sexuada, já que neste foram encontrados o *Colletotrichum*, enquanto na folha isolou-se a forma assexuada de reprodução (*Glomerella*).

Contudo este caráter patogênico destes fungos os confere características biotecnológicas de interesse, como a produção de enzimas de interesse industrial, tais quais pectinases, amilases, proteases e lipases, enzimas envolvidas no ataque destes microrganismos a planta (MACCHERONI JR; ARAÚJO; AZEVEDO, 2004). Ou a atividade antifúngica de *Glomerella cingulata* contra *Rhizopus oryzae*, *Chrysosporium tropicum* e *Beauveria bassiana* e antimicrobiana de *Colletotrichum* sp. contra *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp. e *Staphylococcus aureus* (KISHORE et al., 2007; SOUZA et al., 2004).

Fungos do gênero *Trichoderma* também podem apresentar atividade antimicrobiana (contra *Escherichia coli* e *Aspergillus flavus*), contudo Souza et al. (2004) afirma que não são todas as linhagens de *Trichoderma* que apresentam esta

característica, pois esta capacidade pode variar de indivíduo para indivíduo ou mesmo estar ausente.

Trichoderma harzianum é fungo bastante difundido no solo, e que por vezes é isolado como endofítico, produtor de enzimas como xilanase e β -1,3- glucanases utilizadas na indústria de alimentos, sendo também caracterizado como agente biológico no controle de doenças em plantas causadas por fungos, graças a sua capacidade de produzir quitinases, que degradam a parede celular de uma ampla gama de fungos, como *Fusarium oxysporum* causador da doença wilt em tomateiros (ELAD; CHET; HENIS, 1982; LORITO et al, 1993; MARCO & FELIX, 2007; MOHAMED & HAGGAG, 2006; REZENDE et al, 2002; SOUZA et al., 2004).

Fusarium oxysporum é uma espécie fúngica de grande importância para a agricultura, pois produz metabólitos de alta toxicidade, capazes de atacar e destruir muitas culturas (feijão, tomates, pepinos, bananas, batata doce, etc) e intoxicar peixes e camarão (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; MELO & PICCININ, 1999; MOHAMED & HAGGAG, 2006). É necessário expor que o *F. oxysporum* apesar de ser um vilão para lavouras é um produtor de lipases alcalinas resistentes a vários surfactantes e detergentes comerciais, o que fazem desta enzima um coadjuvante potencial na produção de detergentes (PRAZERES et al., 2006).

Assim como os fungos do gênero *Fusarium*, o grupo *Aspergillus* são produtores de diversos metabólitos tóxicos, suas aflotoxinas possuem elevada toxicidade, e caráter carcinogênico (Aflatoxina B1). A contaminação destes fungos é muito comum em grãos (amendoim, trigo, milho, etc), possuindo maior produção de toxinas durante o armazenamento destes, no qual as condições de temperatura e umidade são altamente favoráveis para o desenvolvimento do *Aspergillus*. São conhecidos como uma das principais espécies de microrganismos produtores de enzimas de interesse alimentício (proteases, xilanases, celulasas, pectinases) (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; COELHO et al., 2001; MOORE-LANDECKER, 1990).

Endófitos de *Aspergillus niger* isolados por Souza et al. (2004) apresentaram atividade antibiótica para linhagens-teste de *Bacillus sp.*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, enquanto que uma linhagem controle de *Aspergillus niger*, isolada da atmosfera, não apresentou esta atividade. Os autores acreditam que este resultado ratifica a importância da escolha do hospedeiro, pois durante a co-evolução do

endófito e de seu hospedeiro pode ocorrer a transferência de gens, que conferem novas características para planta e para o microrganismo.

O gênero *Penicillium* é um dos mais freqüentes na atmosfera brasileira de ampla importância econômica está associado à produção de queijos, antibióticos, toxinas, fitopatogenicidade de plantas, produção de enzimas e ácidos orgânicos de interesse comercial, etc (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; LACAZ, MINAMI, PURCHIO, 1970; MINUSSI et al., 1998). A espécie *P. chrisogenum* é uma superior e importante produtora de penicilina (DAYALAN; DARWIN; PARKASH, 2011; HARRIS et al., 2009).

Meng et al. (2011) indicam a cepa endofítica de *P. chrisogenum* como uma nova fonte de hipocrelina, uma substância com propriedades farmacológicas que atuam inclusive no tratamento do câncer (TOFFOLI et al., 2006), além de possuir uma boa atividade antifúngica contra *Microbotryum violaceum*, e moderada atividade microbiana e algicidal.

Outro dos endofíticos isolados da moringa que apresentam importância científica é a espécie *Curvularia lunata*, este fungo está associado ao controle etiológico de plantas invasoras como a jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) que possui rápida dispersão competindo com as culturas da lavoura de modo a retardar/ impedir o desenvolvimento destas (ASSUNÇÃO et al., 2006). Além disso, *C. lunata* pode ser utilizada na produção de emulsificantes solúveis em água a partir de óleos vegetais e minerais, e na produção de substâncias farmacológicas importantes como corticoesteróides (MAHATO & GARAI, 1997; PARASZKIEWIC; KANWAL; DLUGONKI, 2002; PARASZKIEWICZ et al., 2009).

Dos outros microrganismos isolados da moringa, pode-se dar destaque ao *Geotrichum candidum*. Muito utilizado em produção de queijo, suas enzimas proteolíticas e lipolíticas contribuem significativamente para o aroma e textura característicos deste produto. É utilizado também na produção de ésteres de aroma frutal através de fermentação (GINALSKA; BANCRESZ; KORNILLOWICZ-KOWALSKA, 2004; MOORE-LANDECKER, 1990; PINOTTI et al., 2006).

Neste trabalho isolamos o microrganismo *Burkholderia gladioli*, que na verdade se trata de uma bactéria diazotrófica. O gênero *Burkholderia* coloniza diversos nichos ecológicos, desde plantas, solos e animais, e muitas das suas espécies não são patogênicas, podendo promover o crescimento de vegetais pela fixação biológica do

nitrogênio e produção de fitohormônios. Contudo a espécie *B. gladioli* está associada a infecção de plantas, causando lesões foliares escuras que podem levar à destruição do limbo foliar. Outro fato interessante é que este gênero pode ser encontrado em associação com fungos, o que sugere uma relação simbiótica entre bactéria e fungo, e justificaria a identificação desta bactéria neste trabalho (CORRÊA et al., 2007; PERIN; SIMÕES-ARAÚJO; REIS, 2006).

5. Conclusão

Este trabalho isolou 22 fungos endofíticos dos gêneros *Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Curvularia lunata*, *Trichoderma* sp., *Colletotrichum* sp. e *Glomerella* sp. e duas bactérias da espécie *Burkholderia gladioli*. Concluindo que a *Moringa oleifera* Lam é uma fonte de fungos endofíticos de interesse comercial e científico conhecidos pela produção de antimicrobianos, importantes no controle biológico e etiológico, produção de enzimas, emulsificantes, etc. Sendo o caulículo da vagem o tecido de maior taxa de colonização (66,67% e 87,5%), seguido pelas folhas (20,83% e 33,33%), e a raiz não apresentou colonização por fungos filamentosos. Os dois meios de cultura utilizados PDA e ágar sabouraud não apresentaram diferenças significativas entre si na etapa de isolamento, podendo se utilizar apenas um deles no isolamento de endofíticos da moringa.

6. Sugestões para pesquisas futuras

Proceder isolamento criterioso considerando idade e outros sítios de coleta para avaliação mais clara de diversidade dos fungos filamentosos, assim como isolar bactérias e leveduras da Moringa.

Estudar a relação dos endófitos e a moringa-hospedeira. De modo a elucidar as questões abordadas no texto.

Estudar o potencial biotecnológico para cada gênero isolado de acordo com o reportado pela literatura.

Capítulo II: Seleção de fungos endofíticos para produção de enzimas de interesse para a indústria de alimentos.

Resumo

Os microrganismos são as principais fontes de enzimas industriais devido a possibilidade de produção por processos fermentativos em grande escala e a simplicidade das condições nutricionais. O fato de secretar enzimas extracelulares e a particular forma de crescimento dos fungos filamentosos tornam estes os organismos melhor adaptados ao aproveitamento de diversos substratos. 24 fungos endofíticos isolados da *Moringa oleifera* L foram testados para a produção de amilase, protease, lipase e pectinase, enzimas envolvidas em diversos processos na indústria de alimentos, através de fermentação submersa em meio mineral (*Solução Manachini*) associada à técnica de “cup-plate”. Os isolados pertenciam aos gêneros *Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Geotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Glomerella* sp., e a bactéria *Burkholderia gladioli*, e todos (100%) apresentaram atividade para pelo menos um dos substratos testados, 23 (88,46%) apresentaram atividade pectinolítica e 19 (76,17%) produziram proteases. Proteases são enzimas que estão associadas ao controle biológico de pragas e pectinases estão envolvidas em processos de colonização e penetração. Não foi detectada a produção de amilases e lipases pelo método utilizado. As enzimas produzidas por microrganismos endofíticos variam de isolado para isolado, cepas de um mesmo fungo isoladas de diferentes fontes diferem em sua capacidade de digerir um mesmo substrato.

1. Introdução

Os microrganismos são as principais fontes de enzimas devido à grande variedade de atividades catalíticas, a possibilidade de produção em escala industrial e a simplicidade dos requerimentos nutricionais. Os fungos secretam enzimas extracelulares como resultado das suas funções de biodegradadores naturais, (BON et al., 2008; GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2010b).

Os fungos filamentosos têm sido usados há séculos como fontes de produção de muitos metabólitos e enzimas, ou ainda como fonte direta de alimentos. Eles estão envolvidos no processamento de diversos alimentos, como pães, bebidas, sucos, molhos, carnes amaciadas, queijos, pré-bióticos, etc.

O grupo de enzimas mais explorado comercialmente são o das enzimas hidrolíticas, ou hidrolases, que catalisam a clivagem hidrolítica de ligações –C-O, -C-N,

-C-C, possuindo um grande potencial biotecnológico. As hidrolases comerciais podem ser obtidas de microrganismos, tecidos vegetais e animal, entretanto as preparações enzimáticas utilizadas são, em quase sua totalidade, provenientes de um processo industrial denominado fermentação utilizando muitas vezes fungos (ÂNGELO, 2010).

Fungos endofíticos são associados à síntese de exoenzimas tanto para penetração e colonização do vegetal hospedeiro quanto para controle biológico, atacando invasores com a produção de enzimas que inibem o crescimento destes, dentre estas enzimas podem-se citar: proteases, amilases, lipases, celulasas, xilanases, pectina liase, quitinase, protease, e β -glucanase (SCHULZ et al., 2002; SESSISTSCH; REITER; BERG, 2004). Em consonância, Azevedo (1998) associa alguns endófitos isolados de folhas e pecíolos com uma alta produção de enzimas como celulasas e ligninases, e Silva et al. (2008) isolou bactérias de cafeeiro testadas para produção de enzimas relacionadas a resistência a pragas, lipoxigenase, fenilalanina amônio liase e peroxidase.

Portanto, este trabalho testou os 24 isolados endófitos de *Moringa oleífera* Lam, para a atividade enzimática de amilase, protease, pectinase e lipase, a fim de conhecer um pouco as possibilidades biotecnológicas destes microrganismos para a indústria de alimentos.

2. Revisão bibliográfica

2. 1. Produção de enzimas por fungos

Como biodegradadores naturais, os fungos encontram as substâncias necessárias para o seu desenvolvimento na natureza, eles absorvem nutrientes através da membrana plasmática, como compostos de baixo peso molecular dissolvidos em água, num processo de nutrição denominado absorptivo, ou seja, estes microrganismos são capazes de incorporar moléculas pequenas que utilizam como fonte de matéria e energia para seu crescimento e manutenção (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2010b; PUTZKE, J. & PUTZKE, M. T. L., 2004a).

No entanto, os nutrientes necessários para o desenvolvimento dos fungos estão presentes no ambiente como macromoléculas insolúveis, as quais precisam ser degradadas primeiramente em unidades monoméricas solúveis antes de serem incorporadas, tais como: polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lignina, lipídios e outros compostos de grande peso molecular, ou insolúveis, por exemplo. Para realizar

tal feito, estes organismos secretam enzimas especiais para o meio exterior, conseguindo reduzir o tamanho das moléculas e fazendo-as atingir a solubilidade. Essas substâncias passam, então pela membrana, a qual não tem grande poder seletivo para moléculas pequenas (PUTZKE, J. & PUTZKE, M. T. L., 2004a).

É de importância ressaltar que estas enzimas não são produzidas de modo constante, constitutivo, sem que sua síntese seja induzida pelo substrato adequado. Sua produção é reprimida pela presença de nutrientes facilmente utilizáveis ou disponíveis, como a glicose (repressão catabólica). Em outras palavras, moléculas simples terão preferência na utilização, sendo, então reprimidas as formações de enzimas para moléculas mais complexas (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2010b; PUTZKE, J. & PUTZKE, M. T. L., 2004a).

Outro detalhe pertinente, que se observa é que em alguns casos as enzimas necessárias para permitir o crescimento de um fungo estão sempre presentes e são enzimas constitutivas; em outros casos, é necessária a presença do substrato para induzir a síntese ou atividade da enzima para degradação, são as enzimas induzíveis. Sendo assim, o indutor mais eficiente é o polímero-substrato das enzimas que serão sintetizadas, por exemplo, desejando-se obter lipases o meio indutor deverá ser rico em lipídios (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2010b).

O fato de secretar enzimas extracelulares e a particular forma de crescimento dos fungos filamentosos, com células alargadas de crescimento apical, faz com que estes sejam os organismos melhor adaptados ao aproveitamento de uma ampla gama de substratos, já que, além de degradar os substratos, são capazes de penetrá-los (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2010b).

Os fungos filamentosos têm sido usados há séculos como fontes de produção de muitos metabólitos e enzimas, ou ainda como fonte direta de alimentos. Eles estão envolvidos no processamento de diversos alimentos, sendo explorados comercialmente como “fábricas” de enzimas (PAIVA & SÁ-PEREIRA, 2008). *Aspergillus*, *Trichoderma*, e *Penicillium* são alguns dos gêneros mais explorados nesta cadeia de produção (TORRES et al., 2008).

Isto acontece por dois motivos, estes fungos são organismos com processos fermentativos amplamente dominados, o que permite a produção de enzimas em nível comercial. Assim como são facilmente manipulados geneticamente, permitindo a

introdução de várias cópias de genes heterólogos de forma estável, potencializando ainda mais sua aplicação (TORRES et al., 2008).

O grupo de enzimas mais explorado comercialmente são o das enzimas hidrolíticas, ou hidrolases, que catalisam a clivagem hidrolítica de ligações -C-O, -C-N, -C-C, possuindo um grande potencial biotecnológico. São responsáveis pela catálise de reações de hidrólise de diversos substratos, tais como: proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, lipídeos etc. (ÂNGELO, 2010).

As hidrolases comerciais podem ser obtidas de microrganismos, tecidos vegetais e animal, entretanto as preparações enzimáticas utilizadas são, em quase sua totalidade, provenientes de um processo industrial denominado fermentação utilizando muitas vezes fungos, já que estes produzem diversas destas enzimas tão necessárias para seu crescimento e manutenção, produzindo ainda enzimas específicas de acordo com a manipulação das condições ambientais de crescimento do microrganismo (ÂNGELO, 2010).

Pastore e Macedo (2010) afirmam que o custo da produção de enzimas está associado não só ao tipo de excreção celular, mas também ao grau de pureza requerido para o processo na qual serão aplicadas. E como a base competitiva para produzir e vender enzimas a um custo aceitável com produtos finais com a qualidade desejada é que se direciona a busca por microrganismos para a produção de enzimas industriais.

Esta busca por novos metabólitos fúngicos tem incentivado o isolamento de novas cepas, contudo deve-se considerar que a síntese de enzimas deve estar de acordo com a origem do microrganismo e as interações metabólicas devem melhorar a síntese dos metabólitos secundários. Os microrganismos endofíticos se aplicam a ambos critérios, eles crescem na planta sem causar danos e crescem neste hábitat implicando interação metabólica contínua entre o fungo e a planta hospedeira, além de produzirem mais metabólitos secundários (51%) que aqueles isolados do solo (38%) (SCHULZ et al., 2002).

Além do que é vastamente conhecido que certos endófitos melhoram a adaptabilidade ecológica dos seus hospedeiros, melhorando a sua tolerância a estresses ambientais e resistência a fitopatógenos e/ou herbívoros, incluindo alguns insetos e mamíferos. Beneficiando seus hospedeiros através de efeitos alopatícos sobre outras espécies concorrentes, sendo que esta poderia ser a razão pela qual algumas plantas com endófitos especiais geralmente são competitivas o suficiente para tornar-se a espécie

dominante de determinada área. Estas vantagens citadas estão associadas à produção de metabólitos secundários durante a interação endófito-planta, substâncias estas pertencentes a uma gama de classes diferentes: terpenóides, esteróides, quinonas, alcalóides (aminas e amidas, pirrolizidinas, etc), peptídios, fenol e ácidos fenólicos, flavonóides, enzimas, etc (TAN & ZOU, 2001).

Em adição, Schulz et al. (2002) afirmam que fungos endofíticos não têm sido extensivamente estudados significando que os metabólitos isolados são menos conhecidos ainda. Isto fomenta a necessidade de estudos para melhor compreensão da interação dos endofíticos com seus hospedeiros, assim como a produção de metabólitos como seu reflexo, e a viabilidade de produção biotecnológica destas substâncias.

Dentre estes metabólitos de interesse biotecnológico podem-se destacar as enzimas, compostos responsáveis pela catálise de diversas reações, envolvidas em diversos processos na indústria de alimentos, como produção de queijo, sucos, vinhos, produtos de panificação e etc (KOBELITZ, 2008).

Microrganismos endofíticos são associados à síntese de exoenzimas tanto para penetração e colonização do vegetal hospedeiro quanto para controle biológico, atacando invasores com a produção de enzimas que inibem o crescimento destes, dentre estas enzimas podem-se citar: proteases, amilases, lipases, celulasas, xilanases, pectina liase, quitinase, protease, e β -glucanase (SCHULZ et al., 2002; SESSISTSCH; REITER; BERG, 2004). Em consonância, Azevedo (1998) associa alguns endófitos isolados de folhas e pecíolos com uma alta produção de enzimas como celulasas e ligninases, e Silva et al. (2008) isolou bactérias de cafeeiro testadas para produção de enzimas relacionadas a resistência a pragas, lipoxigenase, fenilalanina amônio liase e peroxidase. Havendo aumento de 100% na produção de peroxidases em plantas tratadas com endófitos, esta enzima está diretamente ligada a processos de formação de barreiras físicas que limitam o crescimento de patógenos

Em adição, Hallmman et al., (1997) afirmam que endófitos podem utilizar enzimas hidrolíticas, como celulasas e pectinases, na penetração dos tecidos vegetais. Entretanto, uma vez que estas enzimas são também produzidas por agentes patogênicos, mais conhecimento sobre a sua regulação e expressão é necessária para distinguir a microbiota endofítica da patogênica de plantas. Em geral, endofíticos ocorrem em densidades populacionais mais baixas do que patógenos, e pelo menos alguns deles não induzem uma resposta hipersensível na planta, indicando que eles não são reconhecidos

pelo vegetal hospedeiro como patógeno. Além do que, a degradação enzimática da parede celular vegetal por endófitos foi unicamente observada quando estes microrganismos colonizaram as epidermes da raiz, mas nunca após a colonização dos espaços intercelulares do córtex da raiz. Estes resultados sugerem que o endófito induz a produção de celulase e pectinase unicamente para penetração da planta hospedeira.

Neste sentido Reinhol-Hurek et al. (2006) apud Costa (2010) isolaram uma linhagem endofítica de *Azoarcus* sp. isolada de arroz que produz uma endogluconase que permite a entrada deste microrganismo na planta hospedeira, no entanto esta cepa é incapaz de utilizar os produtos da degradação enzimática para seu crescimento, este fato acaba por ratificar que a produção de determinadas enzimas é unicamente uma ferramenta de colonização, sendo que diferencia endofíticos de patógenos.

Sendo os fungos potenciais fontes de produção de diversas destas enzimas (proteases, lipases, celulasas, pectinases, amilases, etc.) e os endofíticos associados a alta atividade metabólica e síntese de enzimas é interessante que se promovam estudos, nos quais os fungos endofíticos sejam o foco de potencial biotecnológico.

2. 2. Enzimas de interesse para a indústria de alimentos

Enzimas são utilizadas na indústria de alimentos por diversas razões. Elas ocorrem naturalmente em material biológico, são atóxicas, e tem atividade específica. O controle das reações enzimáticas pode ser facilmente ajustado a partir da temperatura, do pH ou da determinação da atividade da enzima (ESKIN, 1990).

A maioria das enzimas utilizadas na indústria de alimentos são hidrolases, as quais indicam a importância que mudanças hidrolíticas têm para os alimentos (ESKIN, 1990).

Segundo julgamento de Pastore e Macedo (2010), foram selecionadas algumas enzimas para serem detalhadas em função de serem produzidas principalmente por cepas fúngicas e por estarem associadas a importantes processos na indústria de alimentos.

2.2.1. Carboidrases

Carboidrases são enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas entre monossacrídeos (glicose, galactose, frutose, etc.), sendo responsáveis pela hidrólise de polissacarídeos e oligossacarídeos. Neste grupo se encontram: amilases, enzimas pécticas, celulasas, lactases, invertases e hemicelulasas (ESKIN, 1990; KOBLITZ, 2008).

Klobitz (2008a) identifica dois padrões de atividade para as carboidrases o de exoenzimas e o de endoenzimas. O primeiro consiste no ataque a molécula de forma ordenada, a partir da extremidade (em geral a não redutora). Já o padrão endo- reflete uma hidrólise aleatória, clivando as ligações no interior do polímero.

Amilases

O substrato para as amilases é o amido, um polissacarídeo constituído de duas frações, amilose e amilopectina, onde a amilose é uma cadeia linear de moléculas de glicose ligadas entre si por uma ligação α -1,4, enquanto a amilopectina é uma cadeia ramificada, formada por glicose semelhante à amilose, que são unidas entre si por ligações α -1,6 (ESKIN, 1990; KOBLITZ, 2008).

A seguir descreve-se brevemente três amilases principais: α -amilase, β -amilase e glicoamilases.

α -amilases são endo-amilases que hidrolisam as ligações α -1,4 em qualquer ponto da cadeia, sendo inviável na clivagem das ligações α -1,6 da amilopectina, resultando na produção de dextrinas de baixo peso molecular (ESKIN, 1990).

β -amilases são exo-amilases que hidrolisam exclusivamente as ligações α -1,4 liberando unidades de maltose na molécula de amilose. Na amilopectina, no entanto, sua atividade é interrompida pela presença das ligações α -1,6. O resíduo remanescente é a dextrina de alto peso molecular contendo todas as ligações α -1,6 (ESKIN, 1990; KOBLITZ, 2008).

Glicoamilases são exo-enzimas que hidrolisam ambas as ligações α -1,6 e α -1,4, sendo teoricamente capazes de converter completamente amido em glicose. *Aspergillus* (*A. niger*) e *Rhizopus* são produtores desta isoenzima, eficaz na degradação da amilopectina (ESKIN, 1990; KOBLITZ, 2008; PASTORE & MACEDO, 2010).

A maior fonte fungal de amilases é *Aspergillus oryzae*, no entanto estas enzimas são menos estáveis que as de origem cereal e bacteriana (ESKIN, 1990). Em adição, Pastore e Macedo (2010) consideram que as amilases fúngicas são menos resistentes que as bacterianas e, portanto, inativas antes da temperatura da gelatinização do amido e que essa característica é muito importante na fabricação de pães e biscoitos. Em adição, Eskin (1990) e Klobitz (2008) indicam que as carboidrases são utilizadas no processamento de cerveja e outras bebidas alcoólicas, amido hidrolisado, xarope de maltose etc., além da panificação.

2. 2. 2. Pectinases

São enzimas que hidrolisam as cadeias de ácido poligalacturônico ligados entre si por uma ligação α -1,4, podendo estar ramificadas com metil-ésteres (ácido pectínico) ou não (ácido péctico). São muito utilizadas na clarificação de sucos, produtos de tomate, liberação dos precursores de aroma em vinhos, reduzem a viscosidade, melhoram a coloração e aumentam o rendimento de diversos produtos de origem vegetal. Podendo ser depolimerizantes (DP) e desesterificantes (DE) (ESKIN, 1990; KLOBITZ, 2008; PASTORE & MACEDO, 2010).

Pectinases comerciais são preparados que contêm uma variedade de enzimas fúngicas obtidas a partir de *Aspergillus sp.*, *A. niger*, e *A. sojae* e que apresentam atividade de pectinaesterase, poligalacturonase e pectina liase (KOBLOITZ, 2008; PASTORE & MACEDO, 2010).

Koblitz (2008) define pectina esterase (DE) como hidrolases que atacam a ligação éster, desmetoxilando ácidos galacturônicos esterificados com metanol, resultando em um polissacarídeo suscetível ao ataque das DPs e aprecipitação na presença de Ca^{++} . Já a poligalacturonase e a pectina liase (DP) são enzimas que despolimerizam pectinas com baixo teor de metoxilação, hidrolisando as ligações entre os ácidos galacturônicos.

2. 2. 3. Proteases

São hidrolases que degradam proteínas através da clivagem das ligações peptídicas. São muitas as enzimas proteolíticas cada uma com seu grau de especificidade, sendo que nenhuma protease é capaz de hidrolisar todas as ligações peptídicas de uma molécula de proteína (ESKIN, 1990).

Santos e Koblitz (2008) classificam as proteases em dois grupos: endopeptidases que agem nas ligações no interior da cadeia e exopeptidases, que atuam nas extremidades da cadeia, ou na extremidade N-terminal (aminopeptidases) ou na extremidade C-terminal (carboxipeptidases).

Utilizadas na clarificação de cerveja, amaciamento da carne, coagulação do leite. maturação acelerada de queijos e panificação, representam cerca de 50% do mercado de enzimas voltado para a indústria de alimentos. Dos gêneros utilizados *Aspergillus oryzae* e *Mucor miehei*, podem ser citados, vale ressaltar que as proteases fúngicas são classificadas como ácidas, neutras ou alcalinas com base no pH da atividade da enzima,

ou seja um grupo de enzimas capazes de trabalhar numa ampla faixa de pH (PASTORE & MACEDO, 2010; SANTOS & KOBLITZ, 2008).

2. 2. 4. Lipases

Lipases ou glicerol éster hidrolase são enzimas responsáveis pela hidrólise de gorduras insolúveis e óleo. A reação é complexa, e acontece de forma única em substratos insolúveis em água na interface óleo-água ou água-óleo de soluções emulsionadas, liberando ácidos graxos diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (ESKIN, 1990; KOBLITZ, 2008; PASTORE & MACEDO, 2010).

Os gêneros utilizados são o *Aspergillus niger* e o *A. oryzae*, cada um produzindo enzimas com especificidade por ácidos graxos distintos, *Rhizomucor* (*R. miehei*, o de maior aplicação industrial), *Penicillium* e o *Rhizopus* (*R. arrhizus*, *R. javanicus*, *R. niveus* e *R. delimar*) (KOBLITZ, 2008; PASTORE & MACEDO, 2010).

Este grupo de enzimas possuem atuação específica de acordo com o substrato (tamanho da cadeia do ácido graxo, posição do mesmo no glicerol, grau de insaturação), com a regiosseletividade (capacidade de reconhecer a mesma ligação química em regiões diferentes do substrato) e com a enantioseletividade (seleção de isômeros do substrato) (KOBLITZ, 2008; PASTORE & MACEDO, 2010).

As características das lipases geram um alto custo de produção, heterogeneidade nas preparações enzimáticas e falta de lipases com características exatamente iguais as requeridas por alguns processos, que resulta numa tendência clara de busca por novos microrganismos produtores de enzimas com características específicas como estabilidade térmica e pH ótimo (PASTORE & MACEDO, 2010).

As lipases são utilizadas em processos de panificação, maturação acelerada do queijo, produção de óleos e gorduras estruturados, produção de surfactantes, síntese de aromas, etc (KOBLITZ, 2008).

3. Material e métodos

A partir da cultura estoque, em meio sólido (ágar), parte do micélio do fungo foi transferido por via asséptica, usando-se uma alça de platina flambada e resfriada, para o centro de uma placa contendo PDA ou ágar sabouraud. Após incubação de 7-10 dias a 28±2 °C, quando no ágar se apresentou o micélio fúngico com tamanho considerável e o qual já tenha ocorrido as mudanças de cores finais, procedeu-se os ensaios para verificação de produção das seguintes enzimas: proteases, lipases, pectinases e amilases.

3. 1 Condições de cultivo para produção de enzimas (Fermentação submersa)

Os ensaios foram realizados em triplicata, consistindo em três discos de micélio dos isolados, repicados em meios Sabouraud e PDA num período de 7-10 dias, cultivados em meio líquido *Solução de Manachini* (KH_2PO_4 , 2 g.L⁻¹; $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 1 g.L⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g.L⁻¹; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,9 g.L⁻¹; extrato de levedura, 1 g.L⁻¹; água destilada, 1000 mL), adicionado de substrato indutor (0,5%), e pH ajustado para cada enzima: amilase (amido, pH 6,0); pectinase (pectina cítrica Vetec, pH 2,5); protease (gelatina, pH 6,9); lipase (azeite de oliva homogeneizado com liquidificador ao meio mineral, pH 6,0). A fermentação foi conduzida a 28 °C, sob agitação a 140 rpm, durante 96 (proteases) ou 120 horas (demais enzimas) (COLEN, 2006; MACIEL et al., 2010; SOUZA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2008). Estas características gerais foram utilizadas pois as identificações dos isolados ainda eram desconhecidas.

A solução de *Manachini* foi escolhida como meio de cultivo, pois fornece substâncias essenciais ao desenvolvimento e crescimento de microrganismos: nitrogênio, elemento envolvido na síntese de RNA e DNA e na estrutura; enxofre, essencial na síntese de aminoácidos e vitaminas; fósforo, importante na produção de ácidos nucleicos e fosfolipídios; potássio e magnésio, atuantes como co-fatores enzimáticos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

3. 2. Detecção de atividade enzimática pelo método “cup-plate”

Após o período de fermentação em meio líquido, as amostras foram filtradas com papel de filtro qualitativo esterelizado, para separação da massa micelial. Quantidades de 100 µL do filtrado foram inoculadas em “cup-plates” de 7 mm de diâmetros perfurados na superfície de meios de cultura sólidos adequados para a detecção de cada enzima em placa de Petri.

Para amilase foi utilizado ágar amido (ágar, 18 g.L⁻¹; amido, 10 g. L⁻¹, pH 5,0) e para pectinase, ágar pectina (ágar, 18 g. L⁻¹, pectina, 10 g. L⁻¹, pH 5,0). Para detecção de protease, ágar gelatina leite (ágar, 18 g. L⁻¹, solução de gelatina 10%, solução de leite desnatado 10%, pH 5,0). A solução de leite desnatado foi esterilizada por filtração (membrana poro 0,45µm) e adicionada ao restante do meio após esterilização em autoclave em capela de fluxo laminar (SOUZA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2008).

Para detecção de atividade enzimática de natureza lipolítica utilizou-se três meios de cultura diferentes, esta escolha deve-se ao fato das dificuldades para se detectar a produção de lipases difundidas em gel de ágar (por exemplo, interação de

metabólitos secundários com corantes, ou ainda utilização de surfactantes como substrato) (COLEN, 2006).

Este trabalho optou por utilizar um meio (M1) composto de ágar 18 g.L⁻¹, azeite de oliva 10 g.L⁻¹, emulsificante tween 80 1 g.L⁻¹, pH 5,0, e solução de corante rodamina B para concentração final de 0,001 g.L⁻¹. A solução deve ser esterilizada por filtração (membrana poro 0,45µm) e acrescentada de forma asséptica em capela de fluxo laminar ao restante do meio autoclavado a 121°C/15min. A rodamina auxilia na detecção de lipases devido a formação de um halo alaranjado-fluorescente, quando as placas são expostas a luz UV, esta coloração é adquirida através da formação de complexos entre os ácidos graxos produzidos pela ação da lipase e a rodamina (FRANGE & GARCIA, 2009; LOCK, 2007; MACIEL; PACHECO; GONÇALVES, 2010).

O segundo meio (M2) continha de ágar 18 g.L⁻¹ e azeite de oliva 10 g.L⁻¹ emulsificados em liquidificador por um minuto, pH 5,0. E o meio M3 foi constituído por ágar 18 g.L⁻¹ e emulsão de azeite de oliva e goma arábica (5%) de modo que a concentração final de azeite fosse de 10 g.L⁻¹, pH 5,0 (COLEN, 2006).

As placas foram incubadas à temperatura de 28 °C por 24 horas. Após este período, foram reveladas com solução lugol (5 g de KI, 1 g de iodo em 100 mL de H₂O) (amilase) e ácido clorídrico 5 N (pectinase). A produção de protease, lipase em M2 e em M3 consistiam em halo transparente no ágar, sem a necessidade de reveladores (COLEN, 2006; SOUZA.; OLIVEIRA; ANDRADE, 2008).

4. Resultados e discussão

Dos 24 microrganismos isolados da *Moringa oleifera* Lam, todos os isolados (100%) apresentaram atividade para pelo menos um dos substratos testados, 23 (88,46%) apresentaram atividade pectinolítica e 19 (76,17%) produziram proteases. Não foi detectada a produção de amilases e lipases pelo método utilizado (Tabela 1).

É importante ressaltar que os parâmetros de fermentação e de detecção enzimática são gerais e podem não ter sido suficientes para avaliar a produção de lipase e amilase. Por exemplo, Koblitz (2008) descreve que α -amilases de algumas fontes são ativadas na presença de halogênios, e outras possuem atividade em altas temperaturas em torno de 40°C a 70°C, citando ainda que as α -amilases produzidas por *Aspergillus* possuem temperatura de atividade de 50°C. Já as β -amilases são descritas como enzimas termoestáveis com atividade ótima em torno de 30°C, contudo são enzimas sulfidrílicas,

sendo inativadas por oxidação. Logo se pode supor que as condições para detecção da atividade amilásica neste trabalho podem não ter sido ideais, pois não houve utilização de halogênios ou temperaturas em acordo com o descrito acima.

A produção de enzimas lipolíticas por alguns endofíticos pode indicar um mecanismo de resistência para superar as defesas do hospedeiro contra invasão ou para obter nutrientes do hospedeiro no processo de colonização, ou ainda, ser uma enzima relacionada à patogenicidade do endofítico ao hospedeiro (BATEMAN & BASHAM, 1976 apud LUZ et al., 2006). No entanto neste trabalho não foi possível detectar a atividade lipolítica.

Tabela II. 3. Resultados da atividade enzimática dos isolados de *Moringa oleifera* Lam.

Isolado	Identificação	Pectinase	Amilase	Protease	Lipase
ENIPC1	<i>Aspergillus</i> sp	+	-	+	-
ENIPF1	<i>Aspergillus</i> sp	+	-	+	-
ENIPF2	<i>Fusarium oxysporum</i>	-	-	+	-
ENIPF3	<i>Aspergillus</i> sp	+	-	+	-
ENIIPC1	<i>Aspergillus</i> sp	+	-	+	-
ENIIPC2	<i>Trichoderma harzianum</i>	+	-	+	-
ENIIPC4	<i>Geotrichum candidum</i>	+	-	+	-
ENIIPC5	<i>Trichoderma harzianum</i>	+	-	+	-
ENIIPC6	<i>Curvularia lunata</i>	+	-	-	-
ENIIPC7	<i>Curvularia lunata</i>	+	-	-	-
ENIIPF3	<i>Fusarium oxysporum</i>	-	-	+	-
ENIISC1	<i>Penicillium</i> sp.	+	-	+	-
ENIISC2	<i>Colletotrichum graminicola</i>	+	-	-	-
ENIISC3	<i>Colletotrichum graminicola</i>	+	-	-	-
ENIISC4	<i>Fusarium oxysporum</i>	-	-	+	-
ENIISC5	<i>Fusarium</i> sp.	+	-	+	-
ENIISF1	<i>Glomerella</i> sp.	+	-	+	-
ENIISF2	<i>Penicillium chrisogenum</i>	+	-	+	-
ENIISF4	<i>Fusarium</i> sp.	+	-	+	-
ENIISF5	<i>Trichoderma</i> sp.	+	-	-	-
ENIISF6	<i>Penicillium chrisogenum</i>	+	-	+	-
ENIISC1	<i>Burkholderia gladioli</i>	+	-	-	-
ENIISC3	<i>Burkholderia gladioli</i>	+	-	+	-
ENIISC4	<i>Fusarium</i> sp.	+	-	+	-

Geotrichum candidum é fungo amplamente utilizado para produção de lipases, porém esta pesquisa não conseguiu observá-la. Boutrou e Guéguen (2005) obtiveram produção desta enzima com este microrganismo com fermentação a 30°C/7dias, tendo as enzimas produzidas pH de atividade por volta de 6-7 e temperatura de atividade de 30-45°C. Isto reafirma a especificidade que cada microrganismo tem para as condições de fermentação na produção de alguma enzima, e também a especificidade das enzimas produzidas pela temperatura e pH de atividades.

As enzimas produzidas por microrganismos endofíticos variam de isolado para isolado. Cepas do mesmo fungo isoladas de diferentes partes do mesmo hospedeiro diferem em sua capacidade de digerir diferentes substratos (SCHULZ et al., 2002; PETRINI, STONE, CARROL, 1982).

Por exemplo, Marchi, Borges e Mizubuti (2006) testaram 45 isolados endófitos de *Alternaria solani*, provenientes de diferentes hospedeiros, quanto a atividade amilolítica e pectinolítica, tendo como resultado, 45 isolados produtores de protease e apenas 17 capazes produzir amilase, sendo que destes nove eram provenientes de batateira, sugerindo que estes fungos possuam maior habilidade de hidrólise do amido devido a um possível envolvimento das amilases na interação *A. solani* com a batateira-hospedeira. Segundo Tan & Zou (2001), a atividade enzimática é variável, estando relacionada à especificidade entre o hospedeiro e o endofítico.

Percebe-se, então, que diferentes fungos de uma mesma cepa quando isolados de fontes diferentes (seja local de coleta, hospedeiro ou tecido vegetal) possuem o comportamento metabólico como um reflexo de sua origem, sendo, portanto delicado avaliar os isolados da moringa de forma comparativa com outros trabalhos reportados na literatura. É necessário manter a análise dos resultados flexível e pronta tanto para as similaridades, quanto para as controvérsias.

Neste trabalho, nenhum dos 24 isolados da moringa apresentaram atividade lipásica (figura 1), em controvérsia com Luz et al. (2006) que isolou oito fungos do marucujazeiro, a maioria oriundos de folhas e pertencentes ao gênero *Colletotrichum*, *Fusarium* e *Glomerella*, apresentando atividade lipolítica. Estes mesmos autores não obtiveram resultados positivos na produção de enzimas proteolíticas, celulolíticas e amilolíticas para nenhum dos 29 isolados. Enquanto neste trabalho, o gênero *Colletotrichum* produziu pectinases e os fungos *Fusarium* e *Glomerella* produziram tanto pectinases quanto proteases.

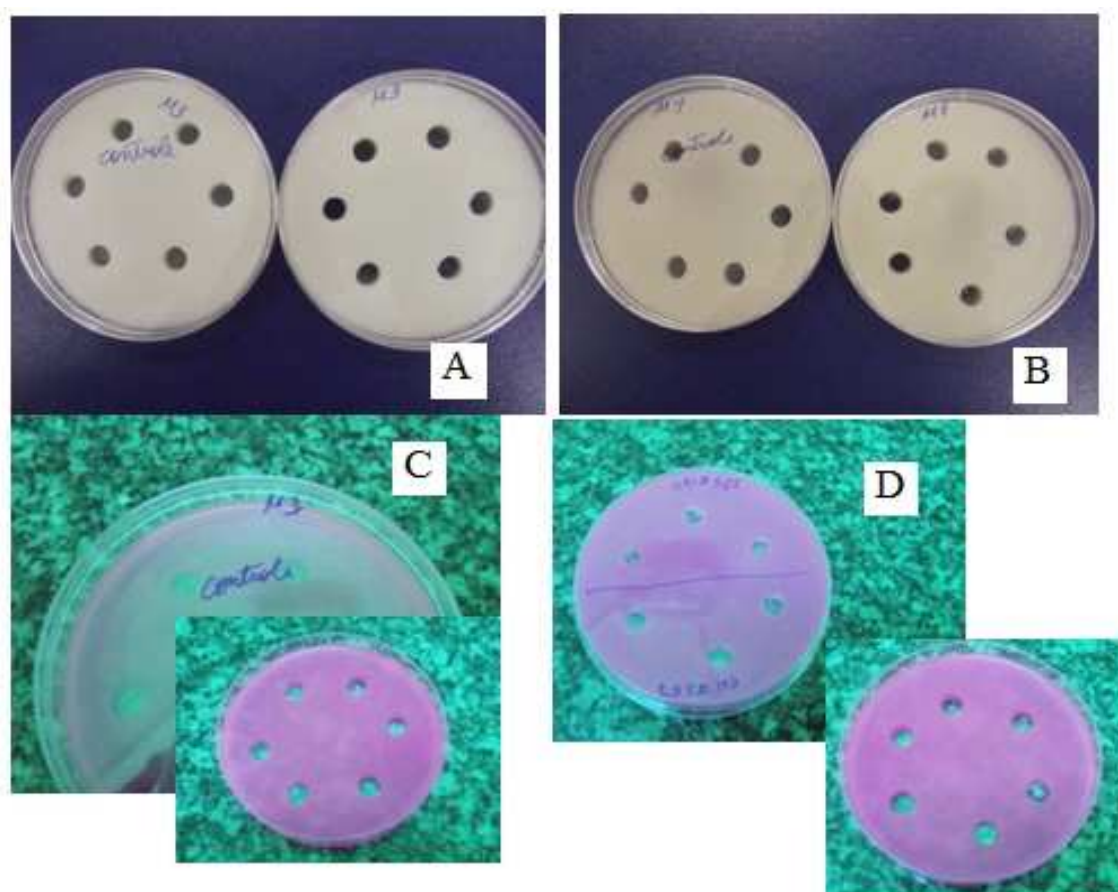


Figura II. 100. Comparação entre o controle e teste “cup-plate” para os três diferentes meios utilizados meio 2 (A), meio 3 (B) e meio 1 (C e D).

A utilização de tween 80 como emulsificante no meio de cultura M1 pode ter afetado a atividade da lipase, alguns autores aconselham o não uso de emulsificadores deste gênero, sendo a utilização de gomas mais vantajosa neste sentido (THOMSON et al., 1999 apud COLEN, 2006). No entanto o meio M3 que continha goma arábica também não apresentou halos de degradação lipolítica, alguns autores suplementam os meios com sais de cálcio, como o cloreto, obtendo ao invés de halos transparentes, halos opacos reflexos da formação de sabões de cálcio (IONITA ET AL., 1997).

No que diz respeito ao gênero *Colletotrichum*, Marchi et al. (2009) comparou 40 isolados, de diferentes fontes, para produção de pectinases, obtendo resultado positivo para todos os endófitos. Acrescentando resultados de Macheroni Jr et al. (2004), cepas endofitas de *Colletotrichum* foram capazes de produzir lipase, pectinase, amilase e protease em pelo menos uma faixa de pH. Os isolados de *Moringa oleifera* apenas produziram pectinases (figura 2), o que sugere que a produção desta enzima pode estar associada apenas ao caráter fitopatogênico deste fungo, já que *Colletotrichum*

graminicola é causador da antracnose, a mais importante doença da cultura do sorgo (*Sorghum bicolor*) e do milho no Brasil (COSTA et al., 2003), ou ainda ao método de colonização do hospedeiro. As enzimas pectinolíticas estão envolvidas na penetração dos tecidos vegetais, podendo ser suprimida após a penetração dos endófitos no espaço intracelular vegetal, sem causar danos ao hospedeiro (HALLMMAN et al., 1997).

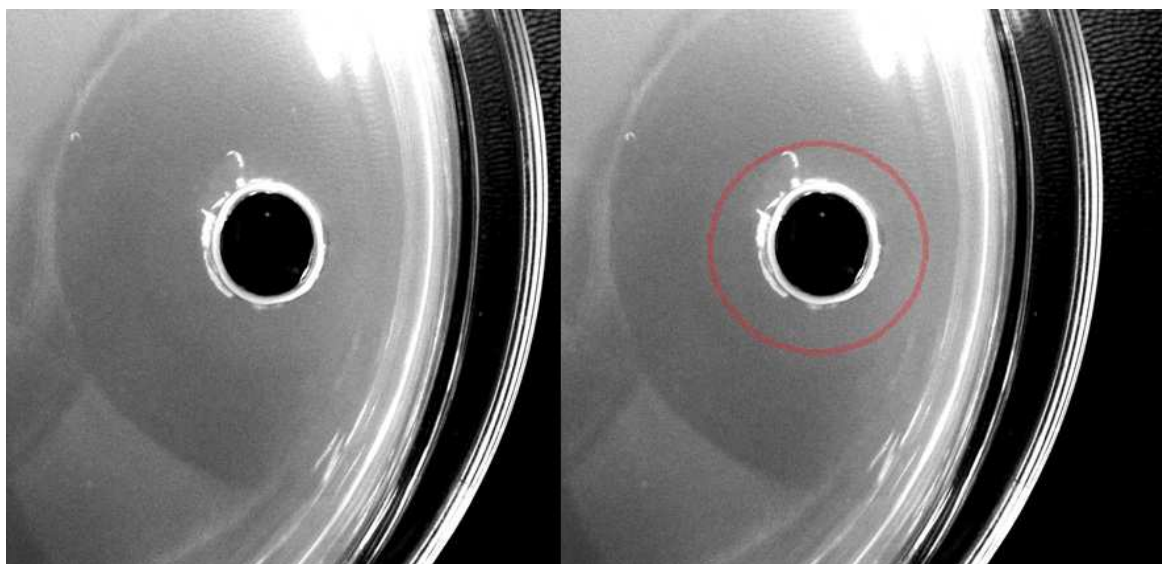


Figura II. 111. Degradação da pectina pelo fungo ENIISC2 (*Colletotrichum graminicola*).

Em relação a pectinases, a literatura reporta que o *Penicillium chrysogenum* é um bom produtor de pectina liase e poligalacturonase, mesmo em meio de cultura de baixo custo como o caldo de cana (MINUSSI et al., 1998).

Trichoderma sp. isolado de coníferas (sequoia), por Petrini & Carrol (1983), não apresentou a capacidade de degradar a pectina, ao contrário dos endófitos deste mesmo gênero da moringa.

Silva et al. (2006) isolaram fungos endofíticos de pinha e graviola de 5 sítios diferentes, caracterizando sua ação enzimática de acordo com 4 enzimas, celulase, protease, lipase e amilase. Os gêneros *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. (isolados da graviola) possuíam atividade proteolítica apenas em alguns sítios, e em outros não. Este mesmo comportamento foi observado para a produção de lipases, sugerindo que não há um padrão na produção de enzimas por gêneros, e sim com a associação com a planta e o habitat em que esta está inserida. Nenhum dos 29 isolados possuía atividades amilolítica (figura 3), coincidindo com os isolados da moringa, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Glomerella* sp., *Colletotrichum* sp. e *Aspegillus* sp.

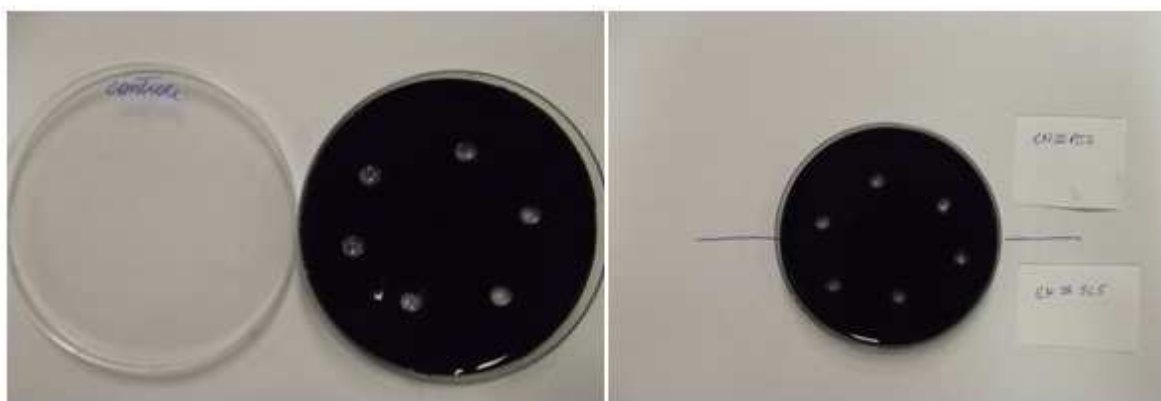


Figura II. 122. Comparação entre o controle e a atividade amilásica dos fungos ENIIIPC7 (*Curvularia lunata*) e ENIISC5 (*Fusarium sp.*).

Para Silva et al. (2006) a amilase, juntamente com a celulase, está associada à patogenicidade dos fungos, sendo assim, é possível que os fungos apesar de serem relatados como patógenos, não o sejam para a *Moringa oleifera*, pelo menos no que diz respeito a produção amilásica.

Fungos isolados de *Baccharis dracunculifolia*, arbustos de pequeno porte como a carqueja, vassoura ou vassourinha sintetizaram pelo menos uma das enzimas extracelulares: proteases, amilases e lipases. Dentre eles, o gênero *Colletotrichum* apresentou maior capacidade de secretar amilases. *Fusarium* demonstrou eficiência na produção de lipases e amilases, enquanto as cepas de *Penicillium sp.* se destacaram na produção de amilases e proteases. Sendo os gêneros *Aspergillus* e *Glomerella* produtores das três enzimas (CUZZI et al., 2011).

As diferenças na atividade enzimática não se limitam apenas entre os endófitos, mas também entre estes e cepas epifíticas. Por exemplo, fungos epifíticos de *Aspergillus*, *Fusarium* e *Trichoderma* testados para produção de enzimas, demonstrou o gênero *Aspergillus sp.* produzindo amilase, em contrapartida aos *Aspergillus* isolados da moringa. Da mesma maneira, estes três fungos não apresentaram atividade proteolítica, coincidindo somente na não produção de lipases (STAMFORD et al., 1998).

Similaridades entre os endófitos da moringa e micélios isolados do solo também podem ser encontradas. Fungos isolados de sistemas agrofloretais do Município de Bom Jardim (PE) tiveram atividade enzimática avaliada (celulase, protease, amilase), dentre eles os gêneros *Aspergillus*, *Curvularia*, *Fusarium* e *Penicillium* não apresentaram atividade amilolítica satisfatória. No entanto a cepa de *Penicillium*

chrysogenum apresentou o maior índice de relação enzimática para protease e celulase, o fungo *Fusarium oxysporum* também produziu estas enzimas (SILVA et al., 2011).

As adversidades entre os resultados não se restringem apenas aos gêneros, por exemplo, fungos isolados de sementes de cártamo (açafraão) caracterizados como produtores de lipase foram submetidos à fermentação induzida para produção desta enzima. Dentre os gêneros, os de interesse pra este trabalho têm-se *Aspergillus*, *Fusarium* (*F. oxysporum*), *Penicillium* (*P. chrysogenum*), *Curvularia lunata* e *Trichoderma harzianum*. Utilizando um meio mineral básico contendo óleo de cártamo, e diferentes fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre, antibióticos e vitaminas, os autores Kakde & Chavan (2011) observaram a influência destas substâncias na produção de lipases. Os autores observaram que *C. lunata*, *F. oxysporum* e *P. chrysogenum* produziram o máximo de lipase, na presença dos vários componentes, exceto lactose, carboximetilcelulose e fosfato de sódio dibásico, sendo este último, componente do meio mineral utilizado para seleção de enzimas com os isolados da moringa. Este fato abre duas suposições, estas cepas não produziram lipases devido ao efeito inibitório do fosfato, ou simplesmente porque a produção de lipase não é característica dos isolados da *Moringa oleifera* Lam.

As proteases produzidas por endófitos atuam como supressores de doenças de plantas, atacando microrganismos fitopatogênicos e insetos (SESSISTSCH; REITER; BERG, 2004), sendo ferramentas de relevância para o biocontrole. Dunne et al. (1997) utilizou *Stenotrophomonas maltophilia* w81 contra o fungo *Pythium ultimum*, inibindo o crescimento deste significativamente através da produção de proteases extracelulares. Sendo possível também a associação de mais de uma “cepa-biocontrole”, combinadas entre si, com o objetivo de incrementar o nível de proteção da planta (DUNNE et al., 1998). Dentre os isolados da moringa apenas uma cepa de *Trichoderma* sp. e as de *Curvularia lunata* não apresentaram atividade proteolítica, os demais fungos foram capazes de degradar proteínas (figura 4).



Figura II. 13. Degradação proteolítica dos fungos ENIISF1 (*Glomerella sp.*) e ENIISC5 (*Fusarium sp.*).

5. Conclusão

Fungos filamentosos de origem endofítica isolados de *Moringa oleifera* Lam, possuem potencial biotecnológico para síntese de proteases e pectinases, não sendo detectada a produção de amilases e lipases. Proteases são enzimas que estão associadas ao controle biológico de pragas proveniente da interação endófito-planta hospedeira, de modo que os endofíticos da moringa produtores desta enzima podem possuir relação com a capacidade desta planta de resistir ao ataque de microrganismos patogênicos e insetos, sendo necessário um estudo mais intenso que esclareça a relação entre os fungos endofíticos isolados e sua planta hospedeira. Da mesma maneira, as pectinases estão envolvidas em processos de colonização e penetração de microrganismos endofíticos nos vegetais hospedeiros, a produção destas enzimas pode elucidar estes processos contribuindo para um melhor delineamento das relações entre os fungos endofíticos e a moringa.

6. Sugestões para pesquisas futuras

Avaliar a produção de outras enzimas produzidas por microrganismos endofíticos reportadas pela literatura: quitinase, celulasas, xilanases, β -glucanase, ligninases, lipoxigenase, fenilalanina amônio liase e peroxidase (SCHULZ et al., 2002; SESSISTSCH; REITER; BERG, 2004; SILVA et al., 2008).

Estudar a associação da síntese destas enzimas com os processos de colonização, controle biológico, ou outras interações metabólicas destes fungos com a moringa-hospedeira.

Conclusão geral

Este trabalho isolou 22 fungos endofíticos dos gêneros *Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Curvularia lunata*, *Trichoderma* sp., *Colletotrichum* sp. e *Glomerella* sp. e duas bactérias da espécie *Burkholderia gladioli*. Concluindo que a *Moringa oleifera* Lam é uma fonte de fungos endofíticos de interesse comercial e científico conhecidos pela produção de antimicrobianos, importantes no controle biológico e etiológico, produção de enzimas, emulsificantes, etc. Sendo o caulículo da vagem o tecido de maior taxa de colonização (66,67% e 87,5%), seguido pelas folhas (20,83% e 33,33%), a raiz não apresentou colonização por fungos filamentosos. Os dois meios de cultura utilizados PDA e ágar sabouraud não apresentaram diferenças significativas entre si na etapa de isolamento, podendo se utilizar apenas um deles no isolamento de endofíticos da moringa.

Além disso, os microrganismos de origem endofítica isolados de *Moringa oleifera* Lam, possuem potencial biotecnológico para síntese de proteases e pectinases, sendo o primeiro grupo de enzimas associados ao controle biológico de pragas proveniente da interação endófito-planta hospedeira, e as pectinases envolvidas em processos de colonização e penetração de microrganismos endofíticos nos vegetais hospedeiros. Não foi possível detectar a produção de amilases e lipases através da metodologia empregada neste trabalho.

Este estudo também observou que as enzimas produzidas por microrganismos endofíticos variam de isolado para isolado, cepas de um mesmo fungo isoladas de diferentes fontes diferem em sua capacidade de digerir um mesmo substrato.

Referências bibliográficas

- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. New York: John Wiley & Sons. 1996.
- ALMEIDA, L.C.C.; COELHO, R.S.B. Caracterização da agressividade de isolados de *Colletotrichum* de maracujá amarelo com marcadores bioquímico, fisiológico e molecular. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 318-328. 2007.
- ÂNGELO, R. S. Enzimas hidrolíticas. **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2 ed. Caxias do sul: EDUCS, 2010. Cap 8. p. 261-285.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Detecção e identificação dos fungos de importância médica. **Manual de Microbiologia Clínica para o controle de infecções em Serviços de Saúde**. Salvador: Editora Agência Nacional de Vigilância Sanitária SEPN 515. 2004. Módulo VII.
- ARAGÃO, G. M. F. **Identificação e determinação da resistência térmica de fungos filamentosos termo-resistentes isolados de polpa de morango**. 1989. 159f. Dissertação (Mestrado em Ciência de alimentos) – Faculdade de Engenharia de alimentos, Unicamp, Campinas, São Paulo. 1989.
- ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; SOBRAL, J. K.; LACAVA, P. T. **Manual: Isolamento de Microrganismos Endofíticos**. Piracicaba, ESALQ. 2002. 86 p.
- ARAÚJO, W. L. MACCHERONI, W.; AGUILAR- VILDOSO, C. I.; BARROSO, P. A. V.; SARIDAKIS, H. O.; AZEVEDO, J. L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian journal microbiology**, v. 47, n. 3, p. 229-236. 2001.
- ARAÚJO, F. S. M.; LEMOS, J. L. S. Isolamento e identificação de fungos degradadores de petróleo. In: X Jornada de Iniciação Científica do CETEM, Julho de 2002, Rio de Janeiro.
- ARAÚJO, L.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; STADNIK, M. J. Avaliação de formulações de fosfito de potássio sobre *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* e no controle pós-infeccional da mancha foliar de *Glomerella* em macieira. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 1, p. 054-059. 2010.
- ARNOLD, A.; MAYNARD, Z.; GILBERT, G.; COLEY, P.; KURSAR, T. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse?. **Ecology Letters**, v. 3, p. 267–274. 2000.
- ARNOLD, A. E.; LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, v. 88, n. 3, p. 541-549. 2007.

ASSUNÇÃO, I. P.; LIMA, G. S. A.; AMORIM, E. P. R.; MUNIZ, M. F. S.; ENDRES, L. Ocorrência de *Curvularia lunata* em Jurubeba no estado de Alagoas. **Summa Phytopathologica**, v.32, n.4, p.386-387, 2006.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology, Chile**, v. 3, n.1, p. 40-65, 2000.

AZEVEDO, J. L. . Microrganismos Endofíticos. **Ecologia Microbiana**. 1 ed. Jaguariuna: EMBRAPA-CNPMA, 1998, p. 117-137.

BAGLIONE, F. **Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termoresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente**. 1998. 107f. Dissertação (Mestrado em Ciência de alimentos) – Faculdade de Engenharia de alimentos, Unicamp, Campinas, São Paulo. 1998.

BACKMAN, P. A.; SIKORA, R. A. Endophytes: An emerging tool for biological control. **Biological Control**, v. 46, p. 1-3. 2008.

BARROS, E. S.; MESQUITA, J. B.; PASSOS, P. M. P. Qualidade sanitária das sementes de moringa (*Moringa oleifera* L.) provenientes do assentamento Moacir Wanderley, Sergipe. In: 5º Encontro de pós-graduação da UFS, 2009, São Cristovão, Sergipe.

BERNADI, E.; CALDEIRA, M. F.; NASCIMENTO, J. S. Identificação de fungos filamentosos em erva-mate (*Ilex paraguariensis* st. hil.). **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.4, p. 489-493, 2005.

BEZERRA, A. M. E; MEDEIROS FILHO, S.; FREITAS, J. B. S.; TEÓFILO, E. M. Avaliação da qualidade das sementes de *Moringa oleifera* Lam. durante o armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 6, p. 1240-1246. 2004.

BEZERRA, A. M. E.; MOMENTÉ, V. G.; MEDEIROS FILHO, S. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de moringa (*Moringa oleifera* Lam.) em função do peso da semente e do tipo de substrato. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.2, p.295-299. 2004.

BON, E. P. S.; PEREIRA JR, N.; GOTTSCHALK, L. M. F.; SÁ-PEREIRA, P.; ROSEIRO, J. C.; FERRARA, M. A. Bioprocessos para produção de enzimas. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro, RJ: Interciência. Cap 5. 2008.

BOUTROU, R.; GUÉGUEN, M. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p. 1-20. 2005.

BRITO, T. M. L. P.; TEIXEIRA, E. M. B. Aceitabilidade do pão francês enriquecido com pó da folha da *Moringa oleifera* Lam. In: Gabriel Francisco da Silva, rosangela

Bergamasco, Claudia Santana Miranda, Mairim Serafini. (Org.). **Potencialidades da *Moringa oleifera* Lam.** 1 ed. Aracaju: Universidade Federal de Sergipe, 2011, v. 1.

CARDOSO, K. C.; BERGAMASCO, R.; COSSICH, E. S.; MORAES, L. C. K. Otimização dos tempos de mistura e decantação no processo de coagulação/floculação da água bruta por meio da *Moringa oleifera* Lam. **Acta Scientiarum. Technology**. Maringá, v. 30, n. 2, p. 193-198. 2008.

CARROLL, G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, v. 69, n. 1, p. 2-9. 1988.

CARROLL, G.; PETRINI, O. Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage. **Mycologia**, v. 75, p. 53-63. 1983.

COELHO, M. A. Z.; LEITE, S. G. F.; ROSA, M. F.; FURTADO, A. A. L. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **B.CEPPA**, v. 19, n. 1, p. 33-42. 2001.

COLEN, G. **Isolamento de fungos filamentosos produtores de lípases**. 2006. 206f. Dissertação (Doutorado em ciência de alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. 2006.

CORRÊA, Manuel Pio. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Brasília, DF: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984.

CORRÊA, D. B. A.; FERREIRA, M.; BALANI, D. M.; RODRIGUES NETO, J.; DESTÉFANO, S. A. L. Avaliação da região espaçadora 16S-23S DNA_R como marcador molecular para diferenciação de *Acidovorax avenae* subsp. *Cattleyae* e *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* patogênicas a orquídeas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 3, p.233-238. 2007.

COSTA, R. V.; CASELA, C. R.; ZAMBOLIM, L.; FERREIRA, A. S. A antracnose do sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 345-354. 2003.

COSTA, R.V.; SILVA, D.D; COTA, L.V.; PARREIRA, D.F.; FERREIRA, A. S.; CASELA, C.R.. Incidência de *Colletotrichum graminicola* em colmos de genótipos de milho. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.2, p.122-128. 2010.

COSTA, L. E. O. **Diversidade genética, antagonismo microbiano e produção de fitases por bactérias endofíticas de folhas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*)**. 2010. 110 f. Dissertação (Doutorado em microbiologia agrícola) – Pós-graduação em microbiologia agrícola da Universidade federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2010.

COSTA NETO, P. Q. **Isolamento e identificação de fungos endofíticos da pupunha (*Bactris gasipaes kunth*) e caracterização por marcadores moleculares**. 2002. 103 f. Dissertação (Mestrado em genética e evolução) – Programa de pós-graduação em genética e evolução do centro de ciências biológicas e da saúde da universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 2002.

CUZZI, C.; LINK, S.; VILANI, A.; ONOFRE, S. B. Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). **Global science and technology**, v.4, n. 2, p. 47-57. 2011.

CYSNE, J. R. B. **Propagação in vitro de *Moringa oleifera* L.** 2006. 81f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Curso de pós-graduação de fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará. 2006.

DARINI, M; SOARES, M. M. S. R.; CAZENAVE, S. O. S. Isolamento e identificação de fungos filamentosos a partir de “*Cannabis Sativa* l.” **Revista de toxicologia em linha**, n. 3. 2003. Disponível em: < www.sertox.com.br/retel>. Acesso em: 18 jun 2010.

DAYALAN, S. A. J.; DARWIN, P.; PARKASH, S. Comparative study on production, purification of penicillin by *Penicillium chrysogenum* isolated from soil and citrus samples. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 15-19. 2011.

DUNNE, C.; CROWLEY, J. J.; MOËNNE-LOCCOZ, Y., DOWLING, D. N.; DE BRUIJN, F. J.; O’GARA, F. Biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W81 is mediated by an extracellular proteolytic activity. **Microbiology**, v.143, p. 3921-3931. 1997.

DUNNE, C.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; MCCARTHY, J.; HIGGINS, P.; POWELL, J.; DOWLING, D. N.; O’GARA, F. Combining proteolytic and phloroglucinol-producing bacteria for improved biocontrol of *Pythium*-mediated damping-off of sugar beet. **Plant Pathology**, v. 47, p. 299-307. 1998.

ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.28, p.719-725,1982.

ESKIN, N. A. Michael. **Biochemistry of foods**. 2. ed. New York: Academic Press, 1990.

ESPLAR. Disponível em: <www.esplar.org.br>. Acesso em: 27 out 2010.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2 ed. Caxias do sul: EDUCS, 2010.

ESTEVES, J. A.; CABRITA, J. D.; NOBRE, G. N. **Micologia medica**. 2. ed. Lisboa, Portugal: Fundação Calouste Gulbenkian, 1999.

FARIAS, S. G. G.; FREIRE, A. L. O.; SANTOS, D. R.; SILVA, R. B.; FREIRE, J. L. O. Respostas de plantas de moringa (*Moringa oleifera* Lam.) inoculadas com fungos micorrízicos e submetidas ao estresse hídrico. **Engenharia Ambiental**, v. 5, n. 3, p. 036-046. 2008.

FAVORETTO, N. B. Pesq. **Produção de substâncias bioativas por microrganismos endofíticos isolados do cerrado de São Carlos-SP**. 2010. 53 f. Dissertação (Mestrado em biotecnologia) – Curso de pós-graduação em biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 2010.

FERREIRA, P. M. P.; CARVALHO, A. F. U.; FARIAS, D. F.; CARIOLANO, N. G.; MELO, V. M. M.; QUEIROZ, M. G. R.; MARTINS, A. M. C.; MACHADO-NETO, J. G. Larvicidal activity of the water extract of *Moringa oleifera* seeds against *Aedes aegypti* and its toxicity upon laboratory animals. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 2, p. 207-216. 2009.

FRANGE, R. C. C.; GARCIA, M. T. J. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**, v. 30, n. 3, p. 263-271. 2009.

FRÖHLICH, J.; HYDE, K. D.; PETRINI, O. Endophytic fungi associated with palms. **Mycological research**, v. 104, n. 10, p. 1202-1212. 2000.

GALVAGNO, M. A.; FORCHIASSIN, F. Fisiologia dos fungos: crescimento, morfologia e diferenciação. **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2 ed. Caxias do sul: EDUCS, 2010a. Cap 3. p. 89-120.

GALVAGNO, M. A.; FORCHIASSIN, F. Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo. **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2 ed. Caxias do sul: EDUCS, 2010b. Cap 4. p. 121-170.

GANLEY, R. J.; NEWCOMBE, G. Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. **Mycological research**, v.110, p. 318-327. 2006.

GAZIS, R.; CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal ecology**, v. 3, p. 240-254. 2010.

GINALSKA, G.; BANCRES, R.; KORNILLOWICZ-KOWALSKA, T. A thermostable lipase produced by a newly isolated *Geotrichum* – like strain, R59. **Journal of Industrial. Microbiology and Biotechnology**. v. 31, p. 177 -182. 2004.

GOMES, M. L. **Bactérias diazotróficas em cultivares de milho em áreas do cerrado e mata no estado de Roraima**. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Curso de pós-graduação em agronomia da Universidade Federal de Roraima, Boa vista, Roraima, 2009.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. 2 ed. Wiley-Liss, New York, 1994. 485p.

GUIMARÃES, L. H. S.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; MICHELIN, M.; RIZZATTI, A. C. S.; SANDRIM, V. C.; ZANOELO, F. F.; AQUINO, A. C. M. M.; JUNIOR, A. B.; POLIZELI, M. L. T. M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 474-480. 2006.

HALLMANN, J.; QUATD-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian journal microbiology**, v. 43, p. 895-914. 1997.

HARRIS, D. M.; WESTERLAKEN, I.; SCHIPPER, D.; KROGT, Z. A. V. D.; GOMBERT, A. K.; SUTHERLAND, J.; RAAMSDONK, L. M.; BERG, M. A. V. D.; BOVENBERG, R. A. L.; PRONK, J. T.; DARAN, J. Engineering of *Penicillium chrysogenum* for fermentative production of a novel carbamoylated cephem antibiotic precursor. **Metabolic Engineering**, v. 11, p. 125-137. 2009.

KAKDE, R. B.; CHAVAN, A. M. Effect of carbon, nitrogen, sulphur, phosphorus, antibiotic and vitamin sources on hydrolytic enzyme production by storage fungi. **Recent Research in Science and Technology**, v. 3, n. 5, p. 20-28. 2011.

KISHORE, K. H.; MISRA, S.; CHANDRA, D. R.; PRAKASH, K. V. V. R.; MURTY, U. S. Antimicrobial efficacy of secondary metabolites from *Glomerella cingulata*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p.150-152. 2007.

IONITA, A.; MOSCOVICI, M.; POPA, C.; VAMANU, A.; POPA, O.; DINU, L. Screening of yeast and fungal strains for lipolytic potential and determination of some biochemical properties of microbial lipases. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic**, v. 3, p. 147-151. 1997.

KOBLITZ, M. G. **Bioquímica de Alimentos. Teoria e Aplicações Práticas**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LACAVA, P. T.; ANDREONTE, F. D.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento, PCR específico e DGGE. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.41, n.4, p.637-642. 2006.

LACAZ, C. da S.; MINAMI, P. S.; PURCHIO, A. **O grande mundo dos fungos**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo: Polígono, 1970. 255 p

LEITE, C. L.; ESPOSITO, E. Fungos: estrutura e ultraestrutura. **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2 ed. Caxias do sul: EDUCS, 2010b. Cap 1. p. 13-44.

LOCK, L. L. **Seleção de leveduras lipolíticas isoladas de bromélias e produção e caracterização de lipase bruta de *Debaryomyces melissophilus* BI81**. 2007. 125 f. Dissertação (Mestrado em microbiologia agrícola e do ambiente) – Pós-graduação em microbiologia agrícola e do ambiente da Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa - SP: Instituto Plantarum, 2008.

LORITO, M.;HARMAN, G.E.; HAYES, C.K.; BROADWAY, R. M.; TRONSMO, A.; WOO, S. L.; DI PIETRO, A. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. **Phytopathology**, v. 83, n. 3, p. 302-307. 1993.

LUZ, J. S.; SILVA, R. L. O.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M. T. Atividade enzimática de fungos endofíticos e efeito na promoção do crescimento de mudas de maracujazeiro- amarelo. **Caatinga**, v. 19, n. 2, p.128-134. 2006.

MACCHERONI JR, W.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L. Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum*. **Scientia Agricola**, v. 61, n. 3, p. 298-302. 2004.

MACIEL, C. C. S.; SOUZA, M. A.; GUSMÃO, N. B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Produção de enzimas do sistema lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactados por petroderivados. **Exacta**, v. 8, n. 3, p. 299-305. 2010.

MACIEL, V. F. A.; PACHECO, T. F.; GONÇALVES, S. B. Padronização do uso de corante rodamina B para avaliação lipolítica em estirpes fúngicas. **Comunicado técnico**, n.5, 2010.

MAHATO, S. B.; GARAI, S. Advances in microbial steroid biotransformation. **Steroids**, v. 62, p. 332-345. 1997.

MARCHI, C. E.; BORGES, M. F.; MIZUBUTI, E. S. G. Atividades amilolítica e pectinolítica de *Alternaria solani* e a relação com a agressividade em tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v.32, n.4, p.345-352. 2006.

MARCHI, C. E.; FERNANDES, C. D.; GUIMARÃES, L. R. A.; FABRIS, L. R.; BORGES, M. F.; TRENTIN, R. A.; JERBA, V. F. Atividade pectinolítica de *Colletotrichum gloeosporioides* e a relação com a agressividade ao *Stylosanthes* spp. **Bragantia: revista de ciências agrônômicas**, v.68, n.2, p.423-433. 2009.

MARCOS, J. L.; FELIX, C. R. Purification and characterization of a β -glucanase produced by *Trichoderma harzianum* showing biocontrol potential. **Brazilian archives of biology and technology. An international journal**, v. 50, n.1, p. 21-29. 2007.

MELO, I. S; PICCININ, E. Toxic metabolites from culture filtrate of *Fusarium oxysporum* and its effects on cucumber cells and plantlets. *Revista de microbiologia [online]*, v.30, n. 2, p. 104-106. 1999.

MENG, L.; SUN, P.; TANG, H.; LI, L.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; KROHN, K.; HUSSAIN, H.; ZHANG, W.; YI, Y. Endophytic fungus *Penicillium chrysogenum*, a new source of hypocrellins. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, p. 163–165. 2011.

MINUSSI, R. C.; SOARES-RAMOS, J. R. L.; COELHO, J. L. C.; SILVA, D. O. Sugar- cane juice induces pectin lyase and polygalacturonase in *Penicillium gryseoroseum*. **Revista de microbiologia**, v. 29, n. 4. 1998.

MOHAMED, H. A. A.; HAGGAG, W. M. A. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p. 181-191. 2006.

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the fungi**. 3 ed. Englewood, N.J.: Prentice hall, 1990.

MORAES, I. O. Produção de microrganismos. **Biotecnologia industrial**. São Paulo, SP: Edgard Blücher. Cap 9. v3. 2005.

Moringa4. JPG. Largura: 960 pixels. Altura: 720 pixels. Formato: JPG. Tamanho: 219 kb. Disponível em: <www.natureasmedicine.wordpress.com>. Acesso em: 21 fev. 2012.

MOURA, M. C.; PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Avaliação da atividade antibacteriana do extrato aquoso e fração protéica de flores de *Moringa oleifera*. In: II Encontro Nacional de Moringa, 2010, Aracaju, Sergipe.

NDABIGENGESERE, A.; NARASIAH, K. S.; TALBOT, B. G. Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera*. **Water Research**, v. 29, n. 2, p. 703-710. 1995.

NETO, A. C.; LUZ, A.; NAPOLEÃO, T.H.; NAVARRO, D. M. A. F.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Atividade larvicida de extrato salino de sementes de *Moringa oleifera* sobre *Aedes aegypti*. In: II Encontro Nacional de Moringa, 2010, Aracaju, Sergipe.

NISHI, L.; LOVATO, A.; MADRONA, G.S.; WURZLER, G.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L.; VIEIRA, A. M. S. ; ARAÚJO, A.; BERGAMASCO, R. Uso de coagulante natural *Moringa oleifera* Lam para remoção de cianobactérias. In: Gabriel Francisco da Silva, rosangela Bergamasco, Claudia Santana Miranda, Mairim Serafini. (Org.). **Potencialidades da *Moringa oleifera* Lam**. 1 ed. Aracaju: Universidade Federal de Sergipe, 2011, v. 1, p. 373-380.

OKUDA, T.; BAES, A. U.; NISHIJIMA, W.; OKADA, M. Improvement of extraction method of coagulation active components from *Moringa oleifera* seed. **Water Research**, v. 33, n. 15, p. 3373-3378. 1999.

OLIVEIRA, I. C.; TEIXEIRA, E. M. B.; PEREIRA, L. A. Aceitabilidade de sorvetes elaborados com “leite” de soja enriquecidos com pó de *Moringa oleifera* Lam. de diferentes sabores. In: Gabriel Francisco da Silva, rosangela Bergamasco, Claudia Santana Miranda, Mairim Serafini. (Org.). **Potencialidades da *Moringa oleifera* Lam**. 1 ed. Aracaju: Universidade Federal de Sergipe, 2011, v. 1.

PAIVA, C. L. A.; SÁ-PEREIRA, P. A aplicação da biologia molecular na produção de enzimas. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro, RJ: Interciência. Cap 2. 2008.

PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Lectinas e antioxidantes de sementes de *Moringa oleifera*. Potencialidades da *Moringa oleifera* Lam.. In: Silva, G.F.; Bergamasco, R.; Miranda, C.S.A.; Serafini, M.R.. (Org.). **Potencialidades da *Moringa oleifera* Lam**. São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe, 2011, v. 1, p. 83-97.

PARASZKIEWICZ, K.; KANWAL, A.; DLUGONKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. **Journal of Biotechnology**, v. 92, p. 287-294. 2002.

PARASZKIEWICZ, K.; BERNAT, P.; DLUGONKI, J. Effect of nickel, copper, and zinc on emulsifier production and saturation of cellular fatty acids in the filamentous fungus *Curvularia lunata*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 100-105. 2009.

PASTORE, G. M.; MACEDO, G. A. Utilização de fungos na indústria de alimentos. **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2 ed. Caxias do sul: EDUCS, 2010. Cap 10. p. 309-333.

PATERNIANI, J. E. S.; MANTOVANI, M. C.; SANT'ANNA, M. R. Uso de sementes de *Moringa oleifera* para tratamento de águas superficiais. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.13, n.6, p.765–771. 2009.

PEREIRA NETO, L. F. S.; ROSA, G. E.; MORAIS, E. B.; MESQUITA, A. C. O.; TOMÉ, P. H. F. O uso de *Moringa oleifera* como purificador natural de alimentos. In: 4ª Semana do Servidor e 5ª Semana Acadêmica, 2008. Universidade federal de Uberlândia, Minas Gerais.

PEREIRA, V. J.; BASÍLIO, M. C.; FERNANDES, D; DOMINGUES, M.; PAIVA, J. M.; BENOLIEL, M. J.; CRESPO, M. T.; SAN ROMÃO, M. V. Occurrence of filamentous fungi and yeasts in three different drinking water sources. **Water Research**, v. 43, n. 15, p. 3813 – 3819. 2009.

PEREIRA, D. F.; VASCONCELOS, V.M.; MORAIS, F.R.; SILVA, G. F. . Produção de Biodiesel a Partir da *Moringa oleifera* Lam. In: Gabriel Francisco da Silva, Claudia Santana Arcieri Miranda, Rosângela Bergamasco, Miriam Russo Serafini. (Org.). **Potencialidades da *Moringa oleifera* Lam.** São Cristovão: Universidade Federal de Sergipe, 2011, v. I, p. 209-219.

PERIN, L.; ARAÚJO, J. L. S.; REIS, V. M. **O gênero *Burkholderia*: um importante componente da comunidade microbiana**. Documentos 219. Embrapa. 2006.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. **Microbial ecology of leaves**. New York. Springer Verla, 1991. Cap 9. p. 179-197.

PETRINI, O.; STONE, J.; CARROLL, F.E. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. **Canadian Journal of Botany**, v. 60, p. 789-796. 1982.

PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI L.; VIRET, O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, v. 1, p. 185-196. 1993.

PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; HYDE, K. D. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. **Mycological Research**, v.105, p.1508-1513. 2001.

PINOTTI, T.; CARVALHO, P. M. B.; GARCIA, K. M. G.; SILVA, T. R.; HAGLER, A. N.; LEITE, S. G. F. Media Components and amino acid supplements influencing the production of fruit aroma by *Geotrichum candidum*. **Brazilian journal of microbiology**, v. 37, p. 494-498. 2006.

PINTO, I. M. A. **Fungos filamentosos do solo e da água da praia de Boa Viagem, Recife - PE, correlacionados com fatores bióticos e abióticos**. 1989. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco. Recife, Pernambuco. 1989.

PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T.H.; ASSIS, C. R. D.; BEZERRA, R. S.; NAVARRO, D. M. A. F.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Efeito do extrato aquoso de flores de *Moringa oleifera* sobre tripsina e acetilcolinesterase de larvas de *Aedes aegypti*. In: II Encontro Nacional de Moringa, 2010a, Aracaju, Sergipe.

PONTUAL, E. V.; GOMES, F. S.; NAPOLEÃO, T.H.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. A. F.; PAIVA, P. M. G. Efeito do extrato aquoso de flores de *Moringa oleifera* sobre a oviposição de *Aedes aegypti*. In: II Encontro Nacional de Moringa, 2010b, Aracaju, Sergipe.

PONTUAL, E. V.; MOURA, M. C.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, A. F. S.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Flores de *Moringa oleifera*: detecção de atividade termiticida, antibacteriana, inibidora de tripsina e caseinolítica. In: Silva, G.F.; Bergamasco, R.; Miranda, C.S.A.; Serafini, M.R.. (Org.). **Potencialidades da Moringa oleifera Lam.** São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe, 2011, v. 1, p. 153-171

POWELL, R. G.; PETROSKI, R. J. Alkaloid toxins in endophyte-infected grasses. **Natural Toxins**, v. 1, p. 163-170. 1993.

PRAZERES, J. N.; CRUZ, J. A. B.; PASTORE, G. M. Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. **Brazilian journal of microbiology**, v. 37, p. 505-509. 2006.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. 2. ed. Santa Cruz do Sul, RS: Edunisc, 2004a. v. 2.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. 2. ed. Santa Cruz do Sul, RS: Edunisc, 2004b. v. 1.

RANGEL, M. S. **Moringa oleifera. Um purificador natural de água e complemento alimentar para o Nordeste brasileiro**. Aracaju, Sergipe. Disponível em: <<http://www.jardimdeflores.com.br/floresefolhas/A10moringa.htm>>. Acesso em: 25 set. 2010.

RASHID, U.; ANWAR, F.; MOSER, B. R.; KNOTHE, G. *Moringa oleifera* oil A possible source of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8175-8179. 2008.

REDMAN, R. S.; SHEEHAN, K. B.; STOUT, R. G.; RODRIGUEZ, R. J.; HENSON, J. M. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. **Science**, v. 298, n. 1581, p. 1581. 2002.

REZENDE, M. I.; BARBOSA, A. M. I.; VASCONCELOS, A. F. D.; ENDO, A. S. Xilanase production by *Trichoderma harzianum* rifai by solid state fermentation on sugarcane bagasse. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 67-72. 2002.

RIDDELL, R. W. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. **Mycologia**, v. 42, p. 265-270. 1950.

ROLOFF, A.; WEISGERBER, H.; LANG, U.; STIMM, B. *Moringa oleifera* LAM., 1785. **Enzyklopädie der Holzgewächse, Handbuch und Atlas der Dendrologie**. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 2009.

SANTANA, C. R. **Tratamento de água produzida através do processo de flotação utilizando a *Moringa oleifera* Lam. como coagulante natural**. 2009. 155f. Dissertação (Mestrado em Engenharia química). Núcleo de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Sergipe. Sergipe, Aracaju. 2009.

SANTOS, L. S.; OLIVEIRA, M. N.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, A. S.; FERREIRA, I. C. S.; LOPES-JÚNIOR, M. L.; ARRUDA, M. S. P.; SAILVA, M. N.; SOUZA FILHO, A. P. S.; RODRIGUES FILHO, E.; OLIVEIRA, M. C. F. Potencial herbicida da biomassa e de substâncias químicas produzidas pelo fungo endofítico *Pestalotiopsis guepinii*. **Planta Daninha**, v. 26, n. 3, p. 539-548. 2008

SANTOS, L. F.; KOBLITZ, M. G. Proteases. **Bioquímica de Alimentos. Teoria e Aplicações Práticas**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. Cap 3. p. 77-105.

SANTOS MAGALHÃES, W. C.; MISSAGIA, R. V.; COSTA, F. A. F.; COSTA, M. C. M. Diversidade de fungos endofíticos em candeia *Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish. **CERNE [en línea]** v. 14, n. 3, p. 267-273. 2008.

SESSISTSCH, A.; REITER, B.; BERG, G. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 239-249. 2004.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological research**. V. 106, n. 9, p. 996-1004. 2002.

SIKORA, R.A.; SCHÄFER, K.; DABABAT, A.A. Modes of action associated with microbially induced in planta suppression of plantparasitic nematodes. **Australasian Plant Pathology**, v. 36, p. 124-134. 2007.

SILVA, J. C.; MARQUES, R.G.; TEIXEIRA, E. M. B.; CIABOTTI, S. **Determinação da composição química das folhas de *Moringa oleifera* Lam. (*Moringaceae*)**. Disponível em: <http://iftm.edu.br/proreitorias/pesquisa/revista/pdf/Resumo_10.pdf>. Acesso em: 25 set. 2010.

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

SILVA, H. S. A.; TERRASAN, C. F. R.; TOZZI, J. P. L.; MELO, I. S.; BETTIOL, W. Bactérias endófitas do cafeeiro e a indução de enzimas relacionadas com o controle da ferrugem. **Tropical plant pathology**, v.33, n.1, p. 049-054. 2008.

SILVA, D. C. V.; TIAGO, P. V.; MATTOS, J. L. S.; PAIVA, L. M.; SOUZA-MOTTA, C. M. Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do Município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas. **Revista brasileira de botânica**, v. 34, n. 4, p. 607-610. 2011.

SMITH, G. **Introduccion a la micologia industrial**. Alfonso Rodrigues de Castro. Espanha: Acribia, 1963.

SOUZA, A. G.; BOTELHO, J. R.; RODRIGUES, J. C. F.; DANTAS, M. B.; ROSENHAIM, R.; AGUIAR, R.T. ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO E TÉRMICO DO BIODIESEL ETÍLICO DE *Moringa oleifera* LAM. In: Gabriel Francisco da Silva; Rosangela Bergamasco; Claudia Santana Arcieri Miranda; Mairim Russo Serafini. (Org.). **Pontencialidades da *Moringa oleifera* Lam.** 1 ed. São Cristóvão (SE): Universidade Federal de Sergipe, 2011, v. 1, p. 201-207.

SOUZA, C. S.; MIRANDA, R. C. M.; SENA, K. X. F. R.; ARAÚJO, J. M.; CHIAPPETA, A. A.; SOUSA, M. F. V. Q. Isolamento e seleção de microrganismos degradadores de derivados de petróleo. In: 3º Congresso Brasileiro P&D em Petróleo e Gás. 2005. Salvador, Bahia.

SOUZA, A. A.; MENEZES, P. B. S.; XAVIER-FILHO, L.; RODRIGUES, S. A. Atividade antimicrobiana da resina e do extrato do mesocarpo dos frutos de *Moringa oleifera* Lam. In: Encontro Nacional de Moringa, 2009, Aracaju, Sergipe.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 185-195. 2004.

SOUZA, H. Q.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 28, p. 116-124. 2008.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 382-385. 1998.

SUTHERLAND, J.P., FOLKARD, G.K.; MTAWALI, M.A e GRANT, W.D. , 1994. *Moringa oleifera* as a natural coagulant. 20th WEDC Conference Colombo, Sri Lanka.

SUZUKI, M. T. **Isolamento, identificação e caracterização de linhagens endofíticas de *Bacillus thuringiensis* de mandioca (*Manihot esculenta crantz*)**. 2006. 102 f. Dissertação (Mestrado em biotecnologia). Programa de pós-graduação interunidades em biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Report**. v. 18, p. 448-459. 2001.

TOFFOLI, D. J.; COURROL, L. C.; TARELHO, L. V. G.; GOMES, L.; VIEIRA JUNIOR, N. D. Estudo das propriedades ópticas do complexo hipocrelina-lantanídeos. **Boletim Técnico da Faculdade de Tecnologia de São Paulo**, v. 20, p. 12-15. 2006.

TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P.; DE MARCO, J. L.; POÇAS-FONSECA, M. J.; FELIPE, M. S. S. O uso de leveduras e fungos filamentosos para expressão heteróloga de enzimas. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro, RJ: Interciência. Cap 3. 2008.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. Microbiologia. 8. ed. São Paulo: Artmed, 2005. 894 p.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Isolamento e seleção de microrganismos pectinolíticos a partir de resíduos provenientes de agroindústrias para produção de aromas frutais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 509-515. 2006.

VEGA, F. E.; SIMPKINS, A.; AIME, M. C.; POSADA, F.; PETERSON, S. W.; REHNER, S. A.; INFANTE, F.; CASTILLO, A.; ARNOLD, A. E. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico e Puerto Rico. **Fungal ecology**, v. 3, p. 122-138. 2010.

VIEIRA, G. H. F.; MPOURÃO, J. A.; ÂNGELO, A. M.; COSTA, R. A.; VIEIRA, R. H. S. F. Antibacterial effect (*in vitro*) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against gram positive and gram negative bacteria. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 52, n. 3, p. 129-132, mai./jun. 2010.

ANEXO I

Fungos isolados da *Moringa oleifera* Lam.



