



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

**PRODUÇÃO DE PROTEASES POR FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE
PLANTAS DO CERRADO**

Victor Hugo Souto Bezerra

Orientadora: Prof. Dra. Paula Monteiro de Souza

Co-orientadora: Prof. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães

Brasília, 2019

Victor Hugo Souto Bezerra

**PRODUÇÃO DE PROTEASES POR FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE
PLANTAS DO CERRADO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Farmácia da
Universidade de Brasília, como requisito
parcial para obtenção do Título de Bacharel
em Farmácia.

Orientadora: Prof. Dr. Paula Monteiro de
Souza

Co-orientadora: Prof. Dr. Pérola de Oliveira
Magalhães

Victor Hugo Souto Bezerra

**PRODUÇÃO DE PROTEASES POR FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE
PLANTAS DO CERRADO**

BANCA

Professora orientadora: Prof. Dra. Paula Monteiro de Souza
Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde

Avaliador: Samuel Leite Cardoso
Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais, Ana Lúcia e Paulo Ayran, por todo amor e incentivo e por sempre estarem ao meu lado. Não estaria onde estou hoje se não fosse por vocês. Obrigado.

Agradeço a minhas irmãs, Rebecca Bezerra e Ana Paula Bezerra, por todo amor e carinho e por sempre serem uma inspiração para mim.

A minha namorada, Daniela Junqueira, que está comigo desde o início desta jornada. Obrigado por todo amor, paciência e dedicação. Esta conquista também é sua.

Aos meus amigos do curso de Farmácia, os Paulinha, Isís, Camila, Carol, AnaJu, Victória, Mari, Gabriel de Campos, Beatriz e Igor, agradeço pela amizade, companheirismo e ajuda durante todos esses anos. Vocês foram fundamentais para eu conseguir chegar até aqui.

Aos meus amigos de Laboratório, Samuca e Didi, agradeço por todos os momentos de descontração e ensinamentos passados. E agradeço também aos demais colegas e funcionários do Laboratório de Produtos Naturais/UnB por todo apoio.

Um agradecimento especial a minha orientadora, Prof. Dra. Paula Souza, por acreditar na minha capacidade, por toda ajuda e conhecimentos transmitidos. Graças a este trabalho pude ter a certeza do caminho que quero seguir.

Agradeço a Prof. Dra. Pérola Magalhães, que me deu a primeira oportunidade de trabalhar no Laboratório de Produtos Naturais/UnB.

Agradeço a Universidade de Brasília/UnB, por me formar como cidadão e como profissional.

E a todos que de alguma maneira contribuíram nesta caminhada, muito obrigado!

RESUMO

As proteases são produzidas por quase todos os organismos vivos e são responsáveis por catalisar a hidrólise das ligações peptídicas de proteínas em aminoácidos e peptídeos. Nas indústrias, as proteases são utilizadas para a produção de alimentos, insumos farmacêuticos, detergentes, alimentos para animais, produtos químicos e fotografia. Estudos feitos em plantas medicinais de biomas tropicais indicam que fungos endofíticos que habitam os tecidos dessas plantas produzem uma grande variedade de produtos biologicamente ativos. Os fungos endofíticos são definidos então como microrganismos que habitam os tecidos internos das plantas de forma simbiótica, ou seja, sem causar nenhum mal aparente. Nos últimos anos, os fungos endofíticos revelaram-se como uma fonte de grande potencial para a produção de metabólitos secundários com promissoras aplicações na agricultura, no ambiente, na indústria farmacêutica e na indústria de alimentos. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas nativas do Cerrado, frente à produção de proteases de interesse industrial e farmacêutico e avaliar diferentes condições de manutenção e preservação dos fungos endofíticos. Foram reativados 21 fungos endofíticos em placas de Petri com meio de cultura batata-dextrose-ágar. O fungo endofítico OH 03, isolado da planta *Ouratea hexasperma*, se mostrou bastante estável, capaz de produzir proteases na presença de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, temperatura e pH. Dessa forma, foi realizado um planejamento estatístico experimental Plackett–Burman Design com triplicata no ponto central para avaliar a interação de 5 variáveis independentes na produção enzimática para o fungo OH 03. As variáveis escolhidas foram: extrato de levedura, peptona, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, temperatura e pH. As variáveis $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e temperatura foram significativas com efeito negativo e positivo, respectivamente. O fungo OH 03 obteve sua melhor atividade no planejamento PBD com valor igual a 26,13 UI/mL. Além disso, os fungos endofíticos foram armazenados em três temperaturas 8 °C, -20 °C e -80 °C, reativados de três em três meses e avaliados quanto ao seu crescimento. A preservação de microrganismos na temperatura de -80 °C na presença de um agente crioprotetor foi a mais viável, mantendo 86% dos fungos endofíticos armazenados vivos durante 12 meses.

Palavras-chave: fungos endofíticos, proteases, otimização, ensaio enzimático e fermentação submersa.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fungos endofíticos produtores de enzimas de interesse industrial.....	15
Tabela 2: Produtos naturais produzidos por fungos endofíticos e seus efeitos biológicos.	16
Tabela 3: Valores das variáveis independentes do processo experimental para o estudo da produção de protease em cultivo submerso.....	20
Tabela 4: Matriz do design experimental Plackett–Burman com triplicata no ponto central para produção de protease em cultivo submerso para fungo CAG 01	21
Tabela 5: Valores das variáveis independentes do processo experimental para o estudo da produção de protease em cultivo submerso.....	23
Tabela 6: Matriz do Design experimental Plackett–Burman com triplicata no ponto central para produção de protease em cultivo submerso para o fungo OH 03.....	24
Tabela 7: Diferentes meios para avaliação da introdução de novas fontes de carbono e nitrogênio.....	25
Tabela 8: Valores das variáveis independentes do processo experimental para o estudo da produção de protease em cultivo submerso utilizando Design de Composto Central.....	26
Tabela 9: Matriz do planejamento Design do composto central com triplicata no ponto central para produção de protease.	26
Tabela 10: Códigos atribuídos aos fungos endofíticos reativados e suas espécies hospedeiras.	28
Tabela 11: Resultados da atividade de protease utilizando Design experimental Plackett–Burman.	32
Tabela 12: Resultados da atividade de protease utilizando Design experimental Plackett–Burman com as variáveis extrato de levedura, peptona, (NH ₄) ₂ SO ₄ , temperatura e pH para o fungo OH 03.	34
Tabela 13: Coeficiente de regressão para a resposta de atividade de protease	35
Tabela 14: Resultados da atividade de protease utilizando Design experimental CCD para o fungo OH 03.	38
Tabela 15: Análise da variância (ANOVA) da CCD para o modelo quadrático utilizado na otimização da produção de protease.	39
Tabela 16: Avaliação da preservação dos fungos -80 °C.....	41
Tabela 17: Avaliação da preservação dos fungos -20 °C.....	42
Tabela 18: Avaliação da preservação dos fungos 8 °C	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação de hidrólise proteica catalisada por protease (LIMA et al., 2008)	12
Figura 2: Extensão do Cerrado. Fonte: (SIGNIFICADOS, 2018)	16
Figura 3: Esquema para isolamento de fungos endofíticos.....	22
Figura 4: Atividade proteolítica dos fungos endofíticos reativados da coleção de fungos do Laboratório de Produtos Naturais - UnB. As barras de erro representam 95% dos limites de confiança para os resultados obtidos.	29
Figura 5: Cinco fungos endofíticos que apresentaram atividade proteolítica. (A) CAG 01, (B) OH 03, (C) GOI 3, (D) IPE 02 e (E) PT 02.....	31
Figura 6: Avaliação da introdução de outras fontes de carbono e nitrogênio na produção de protease dos fungos OH 03, CAG 01 e IPE 02. A: fungo OH 03; B: CAG 02; C: IPE 02. Meio 1 (peptona 1%, extrato de levedura 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5%, Na_2HPO_4 0,5%, K_2HPO_4 0,1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1%), meio 2 (meio 1 + extrato de malte 1%), meio 3 (meio 1 + caseína 1%) e meio 4 (meio 1 + extrato de 1% + caseína 1%). As barras de erro representam 95% dos limites de confiança para os resultados obtidos.	37
Figura 7: Gráfico de superfície de resposta para a atividade de protease (UI/mL) em função das variáveis extrato de malte (A) e sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (B).....	40
Figura 8: Avaliação da preservação e manutenção dos fungos endofíticos armazenados nas temperaturas de 8 °C, -20 °C e -80 °C.	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – *Analysis of Variance*

BDA – Batata Dextrose Ágar

CCD – Design de Composto Central

PBD – Design Plackett–Burman

TCA – Ácido Tricloroacético

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Proteases e seu papel no mercado de enzimas	11
1.2. Fontes de protease.....	13
1.3. Fungos endofíticos	14
1.4. Cerrado.....	15
1.5. Preservação de microrganismos.....	17
2. OBEJTIVOS.....	18
2.1. Objetivo Geral.....	18
2.2. Objetivos Específicos	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Reativação dos fungos endofíticos isolados de plantas do cerrado	19
3.2. Condição de cultivo	19
3.3. Avaliação quantitativa da atividade proteolítica.....	19
3.4. Análise de variáveis por Plackett–Burman Design para a produção de protease do fungo CAG 01 em cultivo submerso	20
3.5. Isolamento de fungos endofíticos da planta <i>Eugenia dysenterica</i> (cagaita).....	21
3.6. Análise de variáveis por Plackett–Burman Design (PBD) para a produção de protease do fungo CAG 01 em cultivo submerso	22
3.7. Avaliação da introdução de outras fontes de carbono e nitrogênio na produção de proteases nos fungos CAG 01, OH 03, GOI 03 e IPE 02.....	24
3.8. Análise de variáveis através de Design do Composto Central (CCD) na produção de protease do fungo OH 03 em cultivo submerso.....	25
3.9. Avaliação de diferentes condições de manutenção e preservação dos fungos endofíticos isolados do Cerrado brasileiro.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Reativação dos fungos endofíticos isolados de plantas do cerrado	28

4.2.	Avaliação quantitativa da atividade proteolítica.....	29
4.3.	Análise de variáveis independentes por PBD para a produção de protease do fungo CAG 01 em cultivo submerso	31
4.4.	Análise de variáveis independentes por PBD para a produção de protease do fungo OH 03 em cultivo submerso	33
4.5.	Avaliação da introdução de outras fontes de carbono e nitrogênio na produção de proteases nos fungos CAG 01, OH 03, GOI 03 e IPE 02.....	35
4.6.	Análise de variáveis através de Design do Composto Central (CCD) na produção de protease do fungo OH 03.	38
4.7.	Avaliação de diferentes condições de manutenção e preservação dos fungos endofíticos isolados do Cerrado.....	40
5.	CONCLUSÃO	45
6.	REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

1.1. Proteases e seu papel no mercado de enzimas

Com o avanço da tecnologia, uma grande parte das enzimas de interesse industrial e farmacêutico começaram a ser produzidas em grande escala. A procura por enzimas industriais está em constante crescimento, devido principalmente a necessidade de novos processos industriais que sejam sustentáveis (KUMAR et al., 2014). Em 2015, as proteases representavam cerca de 27,6% do mercado global de enzimas, atrás somente das carbohidrases que representavam 47,8%. Até 2024, acredita-se que o mercado mundial de enzimas movimentará cerca de 9,62 bilhões de dólares, sendo as proteases responsáveis por 4,69 bilhões (GRAND VIEW RESEARCH, 2018).

As proteases são enzimas que pertencem a classe das hidrolases e são produzidas por quase todos os organismos vivos. Desempenham uma grande variedade de funções, como regular a atividade de muitas proteínas, colaborar para o processo inflamatório, modular as interações proteína-proteína e gerar, traduzir e ampliar sinais moleculares (LÓPEZ-OTÍN e BOND, 2008). A sua participação no ciclo de vida dos organismos, principalmente aqueles que podem causar doenças, levou as proteases a se tornarem um alvo promissor para o desenvolvimento de agentes terapêuticos contra doenças fatais (RAO *et al.*, 1998).

As proteases são responsáveis por catalisar a hidrólise das ligações peptídicas de proteínas (Figura 1) e as degradarem em aminoácidos e peptídeos (SHANKAR *et al.*, 2010). Industrialmente, as proteases são utilizadas para a produção de alimentos, insumos farmacêuticos, detergentes, alimentos para animais, produtos químicos e fotografia (GRAND VIEW RESEARCH, 2018).

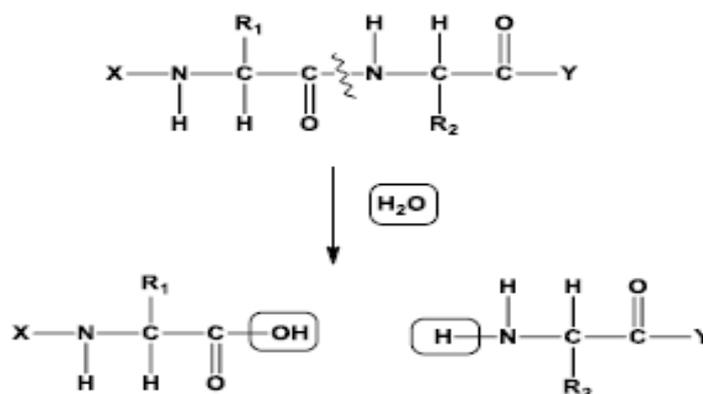


Figura 1: Representação de hidrólise proteica catalisada por protease (LIMA *et al.*, 2008)

Devido a sua ampla utilização em diversas indústrias, as proteases formam um dos grupos de enzimas mais importantes que são empregadas industrialmente. O primeiro emprego das proteases se deu na indústria de laticínios como agente coagulante do leite para a fabricação de queijos. Atualmente, as proteases são usadas em diversas indústrias, como a indústria farmacêutica, indústria do couro, indústria de detergentes e de alimentos (SUMANTHA *et al.*, 2006).

As proteases são classificadas de acordo com a homologia na sequência de aminoácidos, considerando principalmente a estrutura terciária da proteína e os seus sítios catalíticos. Dessa forma, as proteases podem ser classificadas em aspártico, cisteína, glutâmica, metalo, asparagina, serina, treonina e proteases com mecanismo catalítico não reconhecido. Dentro de cada classe as proteases são divididas em famílias de acordo com a homologia na similaridade significativa na sequência de aminoácidos do tipo de enzima da família de cada protease. Como exemplo podemos citar a papaína, uma protease pertencente a classe da cisteína classificadas na família C1 (RAWLINGS *et al.*, 2017).

Nas indústrias de alimentos, as proteases vêm sendo utilizadas a séculos. A produção de enzimas para sua utilização na indústria de alimento se deu por volta de 1874, quando se começou a extrair renina (enzima proteolítica) do estomago de bezerros para a produção de queijo. Hoje em dia, a quimosina produzida por microrganismos geneticamente modificados é mais usada na produção de queijos. Outras proteases, como a papaína, bromelina e ficina são empregadas no amaciamento de carnes e derivados (SENAI, 2009).

Nos últimos anos, as proteases passaram de ingrediente auxiliar para principal ingrediente nos detergentes domiciliares e industriais. O primeiro detergente a utilizar protease foi produzido por Gebrüder Schnyder por volta de 1985 (VOJCIC *et al.*, 2015). Os detergentes que contêm enzimas são vantajosos pois são menos agressivos ao meio ambiente e utensílios de cozinha. Uma protease ideal para ser incorporada em detergentes deve possuir uma larga especificidade a diferentes substratos para promover uma fácil remoção de diversas sujidades (RAO *et al.*, 1998).

1.2.Fontes de protease

Atualmente, os microrganismos representam cerca de dois terços da produção mundial de proteases, tornando-os uma das principais fontes produtoras (KANDASAMY *et al.*, 2016). Com o aumento da demanda, as proteases de plantas e animais não estão sendo suficientes para atender o mercado global, e por isso, os microrganismos estão sendo cada vez mais utilizados, principalmente pelo fato de poderem ser cultivados em grande escala em um tempo relativamente curto (NIRMAL *et al.*, 2011). Além disso, baixo custo de produção, rendimento elevado e crescimento rápido sem depender de fatores externos como clima e questões geográficas favorecem a utilização de microrganismos para a produção de proteases (SHANKAR *et al.*, 2010). O aperfeiçoamento dos processos de fermentação junto com a produção de enzimas por cepas de microrganismos selecionados tornou possível a produção de proteases muito mais puras e bem caracterizadas em grande escala (KIRK *et al.*, 2002).

A produção de proteases por fungos tem crescido nos últimos anos devido à grande variedade de enzimas produzidas quando comparados com as bactérias. As proteases produzidas por fungos são conhecidas por terem atividade em uma ampla faixa de pH (pH 4 a 11) e terem uma alta especificidade com substratos (RANI *et al.*, 2012). Além disso, os fungos geralmente são considerados como fontes seguras e as proteases produzidas são em sua maioria extracelulares, o que facilita a retirada da enzima do caldo de fermentação (SANDHYA *et al.*, 2005).

Grande parte do custo da produção de enzimas é devido ao meio de fermentação dos microrganismos, com isso, otimizar o meio de crescimento é de suma importância para uma produção eficaz. A produção de proteases por microrganismos é bastante influenciada

pelos componentes presentes no meio de cultura, especialmente as fontes de carbono e nitrogênio, íons metálicos, alguns fatores físicos (pH e temperatura) e tempo de incubação. (HADDAR *et al.*, 2010). Sabe-se que as proteases geralmente são produzidas na fase estacionária do crescimento, e por isso, as fontes de carbono e nitrogênio exercem efeitos regulatórios na síntese de enzimas (GUPTA *et al.*, 2002).

1.3.Fungos endofíticos

O termo “endofítico” é usado para definir todos os organismos que durante algum período do seu ciclo de vida habitaram os tecidos internos de seus hospedeiros vivos (ZHANG *et al.*, 2006). Os fungos endofíticos são definidos então como microrganismos que habitam os tecidos internos das plantas de forma simbiótica, ou seja, sem causar nenhum mal aparente (ALY *et al.*, 2011). Atualmente, sabe-se que os fungos endofíticos podem melhorar a habilidade das plantas de tolerar diversos tipos de estresses do ambiente e aumentar a resistência contra pragas e insetos (GOUDA *et al.*, 2016). Dentro dos tecidos, os fungos endofíticos adotam um estado quiescente, permanecendo assim por um longo período de tempo ou durante todo o seu ciclo de vida (SIEBER, 2007).

Nos últimos anos, os fungos endofíticos mostraram-se como uma fonte de grande potencial para a produção de metabolitos secundários com promissoras aplicações na agricultura, no ambiente, na indústria farmacêutica e na indústria de alimentos (ALY *et al.*, 2011). Em comparação com outros microrganismos endofíticos, os fungos produzem um número maior de compostos ativos e esses compostos possuem uma ampla atividade biológica incluindo antibióticos, imunossupressores, anticancerígenos, entre outros (ZHANG *et al.*, 2006).

Embora a habilidade dos fungos endofíticos de produzirem compostos bioativos esteja bem esclarecida, estes ainda não foram amplamente explorados quanto a produção de enzimas industriais, apesar de já serem conhecidos por produzirem enzimas necessárias para a sua sobrevivência, como enzimas para penetrar os tecidos do hospedeiro, obter nutrientes e se proteger de invasores patogênicos (CORRÊA *et al.*, 2014). Contudo, nos últimos anos foram realizados diversos estudos para identificar fungos endofíticos capazes de produzir enzimas de potencial aplicação industrial ou farmacêutica. Na Tabela 1, são

encontrados alguns exemplos de fungos endofíticos com potencial para a produção de enzimas industriais.

Tabela 1: Fungos endofíticos produtores de enzimas de interesse industrial

Fungo endofítico	Planta hospedeira	Enzimas
<i>Curvularia vermiformis</i>	<i>Coleus aromaticus</i>	celulase, protease, lipase
<i>Colletotrichum carssipes</i>	<i>Lawsonia inerims</i>	amilase, protease
<i>Colletotrichum gleosporioides</i>	<i>Costus igneus, Lawsonia inerims</i>	amilase, protease
<i>Acrimonium terrícola</i>	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill.	celulase, protease, xilanase
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill.	celulase, protease, xilanase
<i>Penicillium sp.</i>	<i>Camellia caduca</i>	celulase, lipase, protease, xilanase
<i>Fusariumoxysporum</i>	<i>Musa sp.</i>	protease
<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Acrostichum aureum</i>	celulase, lipase, protease

Fonte: (CORRÊA *et al.*, 2014)

1.4.Cerrado

O Cerrado é o segundo maior bioma no Brasil (Figura 2), atrás somente da Floresta Amazônica, ocupando 23% do território nacional. Possui uma enorme biodiversidade, abrangendo mais de 160.000 espécies de plantas, animais e fungos. Essa diversidade pode ser resultado de condições ambientais adversas, como o clima seco e fogo, selecionando espécies que conseguem sobreviver nessas condições (RATTER *et al.*, 1997).



Figura 2: Extensão do Cerrado. Fonte: (SIGNIFICADOS, 2018)

Plantas medicinais de diversos biomas, incluindo o Cerrado, ganharam grande importância nos últimos anos por serem *habitat* de diversos microrganismos endofíticos de interesse biotecnológico (NORILER *et al.*, 2018). O Cerrado possui uma flora rica e bastante diversificada, sendo um dos biomas mais importantes do planeta em questão de biodiversidade. Estudos feitos em plantas medicinais de biomas tropicais indicam que fungos endofíticos que habitam os tecidos dessas plantas produzem uma grande variedade de produtos biologicamente ativos (CARVALHO *et al.*, 2012). A Tabela 2 mostra alguns exemplos de fungos endofíticos isolados de plantas de biomas tropicais e os compostos bioativos extraídos destes fungos.

Tabela 2: Produtos naturais produzidos por fungos endofíticos e seus efeitos biológicos

Fungo endofítico	Planta hospedeira (nome científico/nome popular)	Bioma	Produto biológico	Efeito biológico
<i>Periconia atropurpurea</i>	<i>Xylopi aromática</i> /pimenta-de-macaco	Cerrado	6,8-dimethoxy-3-(2'-oxo-propyl)-coumarin 2,4-dihydroxy-6-[(1'E, 3'E)-penta-1',3'-dienyl]-benzaldehyde	Antifúngicos
<i>Phomopsis cassiae</i>	<i>Cassia spectabilis</i> /Cássia-do-nordeste	caatinga	3,9,12-trihydroxycalamenenes 3,12-dihydroxycalamenene e 3,12-dihydroxycadalene 3,11,12-trihydroxycadalene	Antifúngicos e citotóxicos
<i>Phoma sorghina</i>	<i>Tithonia diversifolia</i> /mão-de-deus	Cerrado	Antraquinone	Efeito laxativo
<i>Diaporthe sp.</i>	<i>Camellia sinensis</i>	Mata Atlântica	(+)-1,1'-bislunatin	Atividade antibacteriana

Fonte: (BORGES *et al.*, 2009b; GIRALDI e HANAZAKI, 2010; LACERDA *et al.*, 2011; NETO e MORAIS, 2003; SILVA *et al.*, 2010)

1.5.Preservação de microrganismos

O armazenamento e a preservação de microrganismos são indispensáveis para estudos que demandam o uso de microrganismos vivos. A manutenção e a preservação de microrganismos deve ter como objetivo principal manter a vitalidade das células conservando o máximo de células viáveis, dando estabilidade genética ao microrganismo armazenado pelo maior tempo possível (DELLARETTI, 2014).

Diversas técnicas de preservação são utilizadas, como por exemplo liofilização, criopreservação, preservação em óleo mineral, preservação com sílica gel, preservação em água destilada estéril (método de Castellani) e etc. Porém, não existe um consenso acerca da melhor técnica utilizada para a preservação de microrganismos. A escolha e a efetividade da técnica a ser utilizada depende de fatores como: microrganismos a ser preservados, disponibilidade de equipamentos, custo e tempo de armazenamento (AYALA-ZERMENO *et al.*, 2017).

A técnica de criopreservação permite o armazenamento de microrganismos por bastante tempo pois em temperaturas muito baixas a chance de reações bioquímica ocorrerem é zero, evitando assim, mutações genéticas (VIANCELLI *et al.*, 2017). Esta técnica evita danos causados nas células durante o processo de congelamento, causada formação de cristais de gelo no meio intracelular. A presença de um agente crioprotetor reduz a concentração de água no meio intracelular evitando a formação de cristais de gelo. (SOLA *et al.*, 2012)

2. OBEJTIVOS

2.1. Objetivo Geral:

- Avaliar o potencial biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas nativas do Cerrado do Centro-oeste Brasileiro, frente à produção de proteases de interesse industrial e/ou farmacêutico.

2.2. Objetivos Específicos:

- Avaliação quantitativa da produção de proteases pelos fungos endofíticos previamente isolados.
- Avaliação da influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de proteases pelos fungos endofíticos utilizando planejamento estatístico.
- Avaliação de diferentes condições de manutenção e preservação dos fungos endofíticos isolados do Cerrado brasileiro.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.Reativação dos fungos endofíticos isolados de plantas do cerrado

Para selecionar os fungos endofíticos produtores de proteases, todos os 21 fungos endofíticos da coleção do Laboratório de Produtos Naturais - UnB, armazenados previamente em ultrafreezer a - 80 °C, foram inoculados em placas de Petri com meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e incubados durante 7 dias a 28 °C.

3.2.Condição de cultivo

Os fungos endofíticos que cresceram nas placas foram inoculados em Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo (peptona 1%, extrato de levedura 1%, K_2HPO_4 0,1%, Na_2HPO_4 0,5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5% e $(NH_4)_2SO_4$ 0,5%). Cada meio foi incubado a 28°C e 120 rpm por 7 dias. Após a incubação, os meios foram filtrados utilizando papel de filtro em funil de Büchner acoplado a um Kitassato, com condição de baixa pressão criada por bomba de vácuo. O filtrado (extrato bruto) foi utilizado para a quantificação da atividade enzimática.

3.3.Avaliação quantitativa da atividade proteolítica

Para medir a atividade proteolítica foi utilizada a metodologia proposta por Charney e Tomarelli, (1947) com algumas modificações. A reação foi iniciada com a incubação de 500 µL do extrato bruto de cada fungo a 37 °C, na presença de 500 µL de azocaseína a 0,5% (m/v) em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0. A reação foi interrompida após 40 min pela adição de 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v) para precipitação da caseína não hidrolisada. Em seguida, cada amostra foi centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm. Feito isso, 1 mL de sobrenadante foi transferido para uma cubeta de leitura ao qual foi adicionado 1 mL de KOH 5 M. A reação com KOH induz a formação da cor laranja no tubo das amostras, característica dos grupamentos azo em pH alcalino e a intensidade desta coloração é medida em espectrofotômetro a 430 nm.

3.4. Análise de variáveis por Plackett–Burman Design para a produção de protease do fungo CAG 01 em cultivo submerso

O fungo CAG 01 apresentou melhor atividade proteolítica e foi selecionado para avaliar a otimização na produção de proteases frente a algumas variáveis. Os cultivos para fermentação submersas foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL. Foi proposto um planejamento estatístico experimental Plackett–Burman Design (PBD) com triplicata no ponto central para avaliar a interação de 7 variáveis independentes na produção enzimática. As variáveis escolhidas foram: extrato de levedura, peptona, caseína, glicose (NH₄)₂SO₄, temperatura e pH. Após inoculo de um disco de 5mm de diâmetro do fungo CAG 01, os meios foram colocados para crescimento a 120 rpm por 7 dias. Após a incubação, os meios foram filtrados utilizando papel de filtro em funil de Büchner acoplado a um Kitassato, com condição de baixa pressão criada por bomba de vácuo. O filtrado (extrato bruto) foi utilizado para a quantificação da atividade enzimática. As variáveis independentes e os níveis utilizados no planejamento, e a matriz do desenho experimental encontram-se na Tabela 3 e na Tabela 4, respectivamente.

Tabela 3: Valores das variáveis independentes do processo experimental para o estudo da produção de protease em cultivo submerso.

Variáveis independentes	-1	0	1
Extrato de levedura (%)	0,5	1,25	2
Peptona (%)	0,5	1,25	2
Caseína (%)	0,5	1,25	2
Glicose (%)	0,5	1,25	2
(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	0,25	0,625	1
Temperatura (°C)	26	28	30
pH	5	7	9

Tabela 4: Matriz do design experimental Plackett–Burman com triplicata no ponto central para produção de protease em cultivo submerso para fungo CAG 01

Corrida	Extrato de				pH		
	levedura	Peptona	(NH ₄) ₂ SO ₄	Temperatura	inicial	Caseína	Glicose
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
13	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0

3.5. Isolamento de fungos endofíticos da planta *Eugenia dysenterica* (cagaita).

As folhas colhidas no dia do processo, na Faculdade de Ciências da Saúde-UNB, em Brasília-DF (-15.77021; -47.867286) foram previamente lavadas suavemente com água corrente e detergente líquido para retirar terra e sujeira visíveis. Em seguida, dentro do fluxo, cada folha foi totalmente imersa em recipiente contendo álcool 70% por 60 segundos. Depois, as folhas foram imersas, em sequência, em três recipientes contendo hipoclorito de sódio 2% por 60, 90 e 180 segundos respectivamente. Feito isso, as foram imersas em um quinto recipiente contendo álcool 70% por mais 60 segundos. Por último, as folhas foram imersas por 30 segundos em uma sequência de três recipientes contendo

água destilada estéril para lavagem do álcool e do hipoclorito residual. A folha foi enxugada em um papel de filtro estéril. Pequenos fragmentos da folha foram inoculados em uma placa de Petri contendo meio BDA e incubados em estufa a 28 °C até aparecimento dos fungos. Os fungos crescidos da planta foram armazenados dentro de criotubos em solução glicerol 30% (v/v) em ultra freezer. Para controle negativo, 200 µL da água da última lavagem foi inoculada em placa de Petri com meio BDA e a impressão da folha foi feita em outra placa. O esquema para isolamento de fungos endofíticos é mostrado na Figura 3.

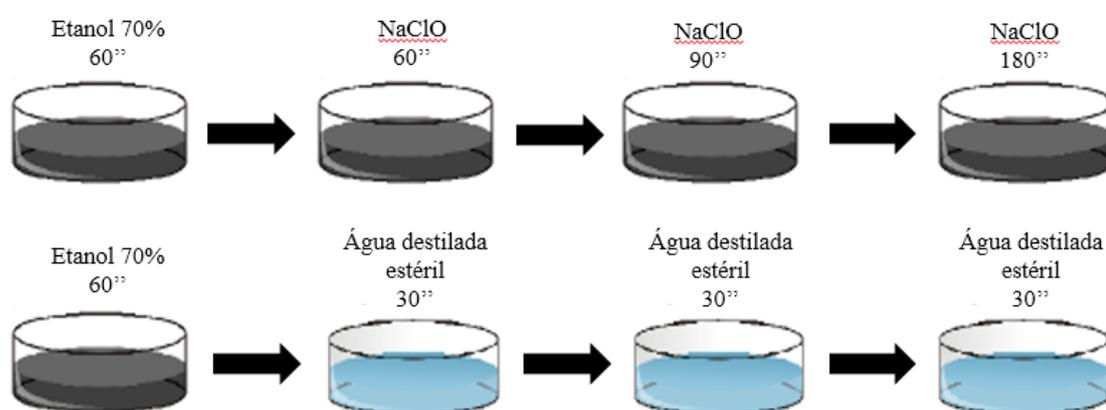


Figura 3: Esquema para isolamento de fungos endofíticos.

3.6. Análise de variáveis por Plackett–Burman Design (PBD) para a produção de protease do fungo CAG 01 em cultivo submerso

O fungo OH 03 foi selecionado para avaliar a otimização na produção de proteases frente a algumas variáveis. Foi proposto um planejamento estatístico experimental Plackett–Burman com triplicata no ponto central para avaliar a interação de 5 variáveis independentes na produção enzimática. As variáveis escolhidas foram: extrato de levedura, peptona, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, temperatura e pH. Após o inóculo de um disco de 5mm de diâmetro do fungo OH 03, os meios foram colocados para crescimento em agitador orbital a 120 rpm por 7 dias. Após a incubação, os meios foram filtrados utilizando papel de filtro em funil de Büchner acoplado a um Kitassato, com condição de baixa pressão criada por bomba de vácuo. O filtrado foi utilizado para a quantificação da atividade enzimática. As variáveis independentes e os níveis utilizados no planejamento, e a matriz do desenho

experimental encontram-se na Tabela 5 e na Tabela 6, respectivamente. A análise estatística dos dados foi feita com ajuda do software Protimiza Experimental Design®, mostrando se as variáveis foram significativas e os seus efeitos (positivo ou negativo). O efeito positivo indica que valores crescentes desta variável podem aumentar a produção enzimática até certo ponto. O efeito negativo indica que valores menores também possam aumentar a produção enzimática até certo ponto.

Tabela 5: Valores das variáveis independentes do processo experimental para o estudo da produção de protease em cultivo submerso.

Variáveis independentes	-1	0	1
Extrato de levedura (%)	0,5	1,25	2
Peptona (%)	0,5	1,25	2
(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	0,25	0,625	1
Temperatura (°C)	24	28	32
pH	4	6	8

Tabela 6: Matriz do Design experimental Plackett–Burman com triplicata no ponto central para produção de protease em cultivo submerso para o fungo OH 03.

Corrida	Extrato de levedura	Peptona	(NH ₄) ₂ SO ₄	Temperatura	pH
1	+1	-1	+1	-1	-1
2	+1	+1	-1	+1	-1
3	-1	+1	+1	-1	+1
4	+1	-1	+1	+1	-1
5	+1	+1	-1	+1	+1
6	+1	+1	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1	+1	-1
8	-1	-1	+1	+1	+1
9	-1	-1	-1	+1	+1
10	+1	-1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	-1	-1
12	-1	-1	-1	-1	-1
13	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0

3.7.Avaliação da introdução de outras fontes de carbono e nitrogênio na produção de proteases nos fungos CAG 01, OH 03, GOI 03 e IPE 02.

Para avaliar a influência da introdução de novas fontes de carbono e nitrogênio na produção de proteases foi proposto o cultivo de 4 fungos com maiores atividades enzimáticas em 4 meios de cultura diferentes como mostrado na Tabela 7. O meio 1 foi utilizado como meio controle, no meio 2 foi adicionado extrato de malte como fonte de carbono, no meio 3 a caseína foi adicionada como fonte de nitrogênio e no meio 4 foram adicionados extrato de malte e caseína. Cada um dos fungos selecionados foi inoculado em

todos os meios, totalizando 16 meios. Os meios foram colocados para crescimento por 7 dias, 28 °C e 120 rpm.

Tabela 7: Diferentes meios para avaliação da introdução de novas fontes de carbono e nitrogênio.

Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4
			- Peptona 1%
- Peptona 1%	- Peptona 1%	- Peptona 1%	- Extrato de levedura 1%
- Extrato de levedura 1%	- Extrato de levedura 1%	- Extrato de levedura 1%	- (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,5%
- (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,5%	- (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,5%	- (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,5%	- Na ₂ HPO ₄ 0,5%
- Na ₂ HPO ₄ 0,5%	- Na ₂ HPO ₄ 0,5%	- Na ₂ HPO ₄ 0,5%	- K ₂ HPO ₄ 0,1%
- K ₂ HPO ₄ 0,1%	- K ₂ HPO ₄ 0,1%	- K ₂ HPO ₄ 0,1%	- MgSO ₄ •7H ₂ O 0,1%
- MgSO ₄ •7H ₂ O 0,1%	- MgSO ₄ •7H ₂ O 0,1%	- MgSO ₄ •7H ₂ O 0,1%	- Extrato de malte 1%
	- Extrato de malte 1%	- Caseína 1%	- Caseína 1%

3.8. Análise de variáveis através de Design do Composto Central (CCD) na produção de protease do fungo OH 03 em cultivo submerso.

Para análise de variáveis através do método de CCD duas variáveis foram escolhidas: extrato de malte, pois o fungo OH 03 apresentou maior atividade de protease na presença de extrato de malte na avaliação de novas fontes de carbono e nitrogênio, e (NH₄)₂SO₄ por ter sido significativo e ter maior efeito negativo no planejamento PBD. Após o inóculo de um disco de 5mm de diâmetro do fungo OH 03, os meios foram colocados para crescimento em agitador orbital a 120 rpm por 7 dias. Após a incubação, os meios foram filtrados utilizando papel de filtro em funil de Büchner acoplado a um Kitassato, com condição de baixa pressão criada por bomba de vácuo. O filtrado foi utilizado para a quantificação da atividade enzimática. As variáveis independentes e os níveis utilizados no planejamento, e a matriz do desenho experimental encontram-se na Tabela 8 e na Tabela 9, respectivamente.

Tabela 8: Valores das variáveis independentes do processo experimental para o estudo da produção de protease em cultivo submerso utilizando Design de Composto Central.

Variáveis independentes	-1,44	-1	0	+1	+1,44
Extrato de Malte (%)	0,19	0,5	1,25	2	2,31
(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	0,10	0,125	0,188	0,25	0,28

Tabela 9: Matriz do planejamento Design do composto central com triplicata no ponto central para produção de protease.

Corrida	Extrato de malte (%)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	-1,44	0
6	+1,44	0
7	0	-1,44
8	0	+1,44
9	0	0
10	0	0
11	0	0

3.9. Avaliação de diferentes condições de manutenção e preservação dos fungos endofíticos isolados do Cerrado brasileiro.

Três pequenos discos de 5mm de cada fungo endofítico reativado da coleção de fungos endofíticos do Laboratório de Produtos Naturais - UnB foram guardados em criotubos contendo 1 mL de solução glicerol 30% estéril e armazenados em três temperaturas diferentes, 8 °C, -20 °C e -80 °C. Dos 16 fungos que foram reativados

inicialmente, 14 foram preservados nesta metodologia. Dois fungos não obtiveram tamanho suficiente para a retirada dos 3 discos de micélio, e por isso, não foram preservados. Os fungos foram reativados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA a cada 3 meses para avaliar sua preservação nas diferentes temperaturas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Reativação dos fungos endofíticos isolados de plantas do cerrado

Dos 21 fungos endofíticos da coleção do Laboratório de Produtos Naturais – UnB reativados, 16 fungos cresceram após 7 dias de incubação em estufa. A Tabela 10 mostra todos os fungos endofíticos reativados da coleção e suas plantas hospedeiras. As marcações de + indicam os fungos que cresceram.

Tabela 10: Códigos atribuídos aos fungos endofíticos reativados e suas espécies hospedeiras.

Nome Científico	Fungos reativados
<i>Calophyllum brasiliense</i>	CAM 01
<i>Calophyllum brasiliense</i>	CBO 02(+)
<i>Caryocan brasiliensis</i>	PEQ 02
<i>Crinum erubescens</i>	CE 01(+)
<i>Eriotheca pubescens</i>	EP 01; EP 02(+); EP 03(+); EP 04(+)
<i>Eugenia dysenterica</i>	CAG 01(+); CAG 02(+); CAG 03(+)
Não identificado	MC 01(+)
<i>Ourátea hexasperma</i>	OH 01; OH 03(+)
<i>Polteria torta</i>	PT 02(+)
<i>Psidium ochracea</i>	GOI 03(+)
<i>Sapindus saponária</i>	BR (+)
<i>Tabebuia ochracea</i>	IPE 02(+); IPE 03; IPE 05(+); IPE 06(+)

(+): fungos cresceram após 7 dias de incubação.

4.2. Avaliação quantitativa da atividade proteolítica

Para selecionar os fungos produtores de protease, os 16 fungos foram cultivados em meio submerso e depois submetidos a ensaio enzimático para quantificação de proteases. O resultado da triagem realizada com os 16 fungos encontra-se na Figura 4.

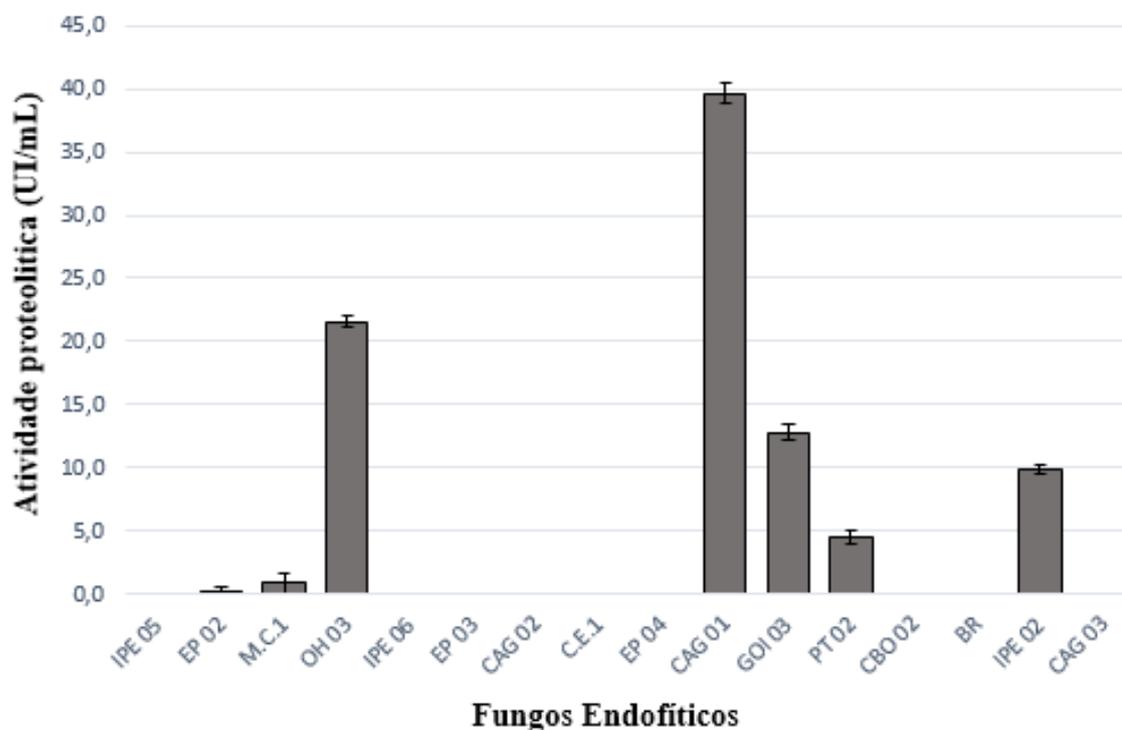


Figura 4: Atividade proteolítica dos fungos endofíticos reativados da coleção de fungos do Laboratório de Produtos Naturais - UnB. As barras de erro representam 95% dos limites de confiança para os resultados obtidos.

Dos 16 fungos testados, sete produziram proteases sendo o fungo codificado como CAG 01 o maior produtor com atividade proteolítica de 39,7 UI/mL (Figura 5 – A). O segundo maior produtor foi o fungo codificado como OH 03 com 21,6 UI/mL (Figura 5 – B) de atividade. Os fungos codificados como GOI 03 (Figura 5 – C), IPE 02 (Figura 5 – D), PT 02 (Figura 6 – E), MC 01 e EP 02 tiveram atividades de 12,8 UI/mL, 9,9 UI/mL, 4,65 UI/mL, 1,0 UI/mL e 0,08 UI/mL respectivamente. Portanto, por apresentar maior atividade, o fungo CAG 01 foi selecionado para futuros planejamentos experimentais de otimização de produção de protease.

De acordo com a literatura, fungos endofíticos já se mostraram produtores de proteases. SUNITHA *et al.* (2013) realizaram um *screening* para a produção de protease de 50 fungos endofíticos isolados das plantas *Alpinia calcarata*, *Bixa orellana*, *Calophyllum inophyllum* and *Catharanthus roseus*, onde 14 fungos (28%) apresentaram atividade proteolítica. RODRIGUES *et al.* (2015) isolaram uma linhagem de *Penicillium sp* da folha de *Ricinus communis L* (mamona) que teve atividade proteolítica quando submetido a crescimento em placa de Petri com meio base (MgSO₄ 0,2 g/L, NaCl 0,1 g/L, extrato de leveduras 0,4 g/L, KH₂PO₄ 0,4 g/L, K₂HPO₄ 0,1 g/L) e 2% de leite em pó desnatado.

BEZERRA *et al.* (2015) avaliaram a produção enzimática de 19 fungos endofíticos isolados de *Bauhinia forficata* (pata-de-vaca) e destes, 13 apresentam atividade proteolítica. BORGES *et al.* (2009a) em seu estudo sobre fungos endofíticos relatam os fungos *Colletotrichum sp.* isolado de *Cinnamomum iners* e *Camellia sinensis*, *Phoma sp.* isolado de *Garcinia cowa* e *Xylaria sp.* isolado da planta *Trichilla connaroides* como bons produtores de protease.

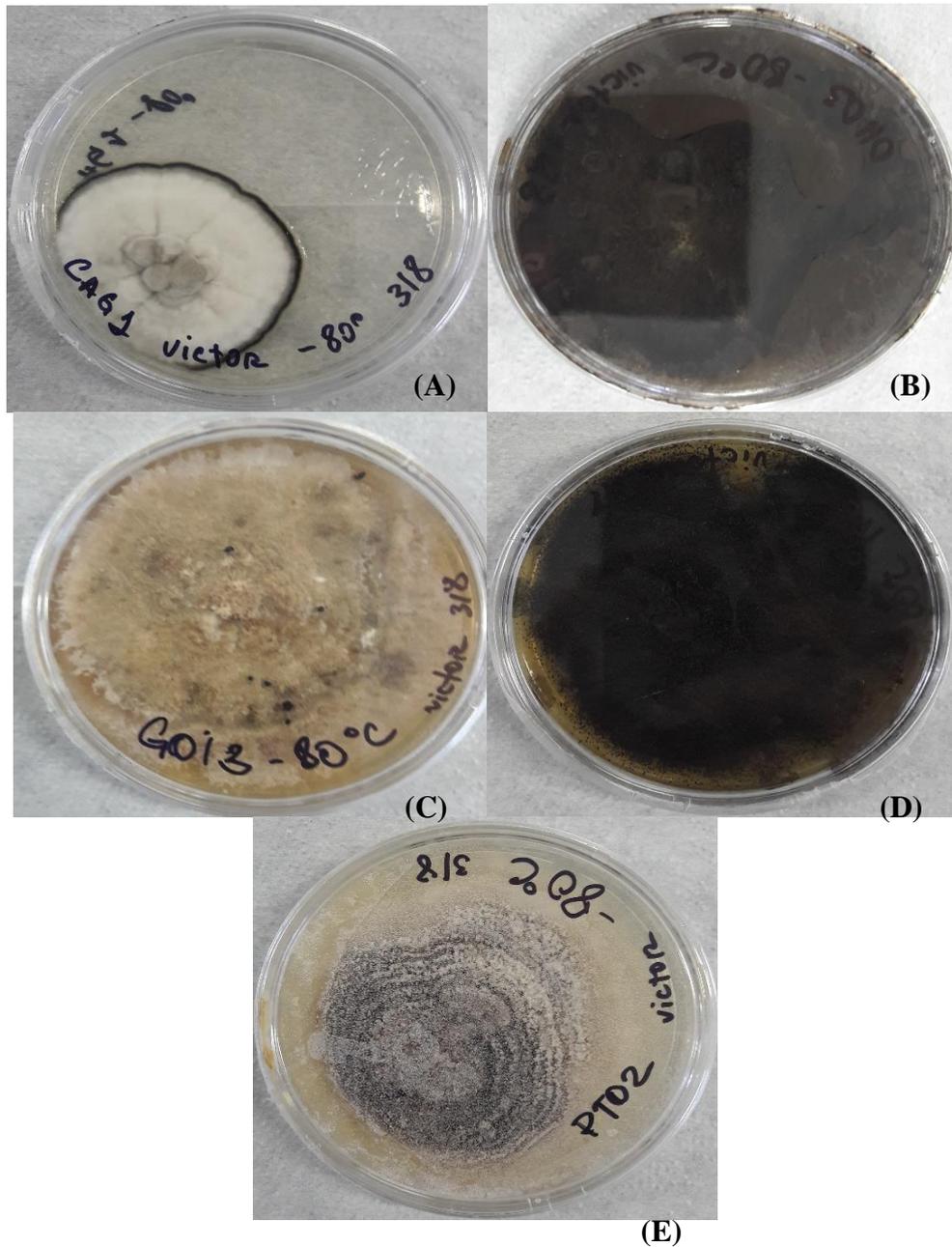


Figura 5: Cinco fungos endofíticos que apresentaram atividade proteolítica. (A) CAG 01, (B) OH 03, (C) GOI 3, (D) IPE 02 e (E) PT 02.

4.3. Análise de variáveis independentes por PBD para a produção de protease do fungo CAG 01 em cultivo submerso

O fungo CAG foi selecionado para análise de variáveis independentes através do planejamento estatístico PBD por ter apresentado maior atividade de protease na avaliação quantitativa de proteases como visto no item 4.2. Neste ensaio, as atividades enzimáticas encontradas não foram significativas. O fungo apresentou maior atividade na corrida de

número 11 com 10,5 UI/mL, como mostrado na Tabela 11, valor muito distante da atividade encontrada no *screening* (39,7 UI/mL) e apresentou atividade 0 na maioria das corridas, incluindo os pontos centrais. A preservação de fungos endofíticos por longos períodos pode causar alterações na sua capacidade de produzir metabolitos secundários. Além disso, o fungo CAG 01 possuía um crescimento bastante lento e irregular. Os fungos endofíticos podem possuir uma certa dependência de seu hospedeiro, por isso, em algumas situações os fungos podem deixar de ser funcionais quando armazenados por longos períodos (AZEVEDO *et al.*, 2000).

Tabela 10: Resultados da atividade de protease utilizando Design experimental Plackett–Burman.

Corrida	Extrato de levedura (%)	Peptona (%)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	Caseína (%)	Glicose (%)	Temperatura (°C)	pH inicial	Atividade (UI/mL)
1	2	0,5	1	0,5	2	26	5	5,05
2	2	2	0,25	0,5	0,5	30	5	2,75
3	0,5	2	1	0,5	0,5	26	9	0
4	2	0,5	1	2	0,5	30	5	0
5	2	2	0,25	0,5	2	30	9	2
6	2	2	1	2	0,5	26	9	0,3
7	0,5	2	1	2	2	30	5	0
8	0,5	0,50	1	0,5	2	30	9	6,8
9	0,5	0,50	0,25	2	0,5	30	9	0
10	2	0,50	0,25	2	2	26	9	0
11	0,5	2	0,25	2	2	26	5	10,5
12	0,5	0,50	0,25	0,50	0,5	26	5	0
13	1,25	1,25	0,63	1,25	1,25	28	7	0
14	1,25	1,25	0,63	1,25	1,25	28	7	0
15	1,25	1,25	0,63	1,25	1,25	28	7	0

A presença de duas novas substâncias (caseína e glicose) pode ter interferido no crescimento do fungo e na sua produção de protease. Alguns trabalhos relatam que a presença de açúcares livres (como a glicose) podem reprimir a síntese de proteases extracelulares de microrganismos. JOHNVESLY e NAIK (2001) em seu estudo em que avaliam a síntese de protease alcalina por *Bacillus sp.* na presença de diferentes fontes de

carbono relatam que a síntese foi totalmente reprimida no meio contendo 1% glicose. HAJJI, REBAI, *et al.* (2008) mostram em trabalho sobre produção de protease por *Aspergillus clavatus* que a ausência de glicose no meio evitou a repressão na produção de protease.

Uma nova tentativa de otimização de protease foi feita com o fungo isolado novamente da folha de *Eugenia dysenterica* como descrito no item 3.9. Porém, o fungo isolado não cresceu no meio líquido e por esse motivo, o fungo CAG foi substituído no planejamento dando lugar o fungo OH 03 com a segunda melhor atividade na triagem de produção de protease dos fungos (item 4.2).

4.4. Análise de variáveis independentes por PBD para a produção de protease do fungo OH 03 em cultivo submerso

O PBD sugeriu a realização de 15 corridas com três pontos centrais para determinar a atividade de protease, avaliando as variáveis selecionadas. O fungo OH 03 obteve sua maior atividade na corrida 2 com 26,13 UI/mL e pior atividade na corrida 3 com atividade 0 com mostrado na Tabela 12.

Tabela 11: Resultados da atividade de protease utilizando Design experimental Plackett–Burman com as variáveis extrato de levedura, peptona, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, temperatura e pH para o fungo OH 03.

Corrida	Extrato de levedura (%)	Peptona (%)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (%)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	pH	Atividade (UI/mL)
1	2	0,5	1	24	4	2,35
2	2	2	0,25	32	4	26,13
3	0,5	2	1	24	8	0,00
4	2	0,5	1	32	4	3,23
5	2	2	0,25	32	8	12,78
6	2	2	1	24	8	0,00
7	0,5	2	1	32	4	18,83
8	0,5	0,5	1	32	8	15,73
9	0,5	0,5	0,25	32	8	18,48
10	2	0,5	0,25	24	8	23,98
11	0,5	2	0,25	24	4	2,10
12	0,5	0,5	0,25	24	4	9,43
13	1,25	1,25	0,625	28	6	23,50
14	1,25	1,25	0,625	28	6	15,88
15	1,25	1,25	0,625	28	6	15,13

Neste estudo, o PBD foi utilizado primeiramente para identificar as variáveis mais significativas na produção de protease pelo fungo OH 03. Para este tipo de planejamento, podem ser consideradas significativas variáveis que apresentem $p < 0,1$ (RODRIGUES e IEMMA, 2005). Logo, as variáveis $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e temperatura foram significativas com efeito negativo e positivo, respectivamente, mostrado na Tabela 13. As demais variáveis, peptona, extrato de levedura e pH não tiveram significância. O $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi selecionado para análise de variáveis de superfície resposta através de Design do Composto Central (CCD) na produção de protease do fungo OH 03. As demais variáveis (extrato de levedura, peptona, pH e temperatura) foram mantidas no seu maior valor. A temperatura não foi

selecionada por já estar em um valor muito elevado, o aumento deste parâmetro poderia acarretar no não crescimento fúngico já que a temperatura de crescimento da maioria dos fungos varia de 22 °C a 32 °C (TORTORA *et al.*, 2012).

Tabela 12: Coeficiente de regressão para a resposta de atividade de protease

Variável	Efeito	Erro padrão	t calculado	valor p
Extrato de levedura	1,30	9,25	0,14	0,892
Peptona	-4,45	9,25	-0,48	0,643
(NH ₄) ₂ SO ₄	-17,58	9,25	-1,90	0,094
Temperatura	19,10	9,25	2,06	0,073
pH	2,97	9,25	0,32	0,757

LAXMAN *et al.* (2005) estudaram a introdução de fontes inorgânicas de nitrogênio, tais como sais de amônio, para otimização da produção de protease pelo fungo *Conidiobolus coronatus* e demonstrou que estes sais foram inibidores da produção de protease quando comparados com fontes orgânicas (por exemplo, extrato de levedura e peptona). JOHNVESLY e NAIK (2001) avaliando a expressão extracelular de protease por *Bacillus sp.* na presença de fonte inorgânicas de nitrogênio obtiveram resultados negativos na expressão na presença de sais de amônio quando comparada com outros sais. Estes estudos corroboram o efeito negativo apresentado na produção de protease pelo sulfato de amônio.

4.5. Avaliação da introdução de outras fontes de carbono e nitrogênio na produção de proteases nos fungos CAG 01, OH 03, GOI 03 e IPE 02.

Sabe-se que a produção de protease de fungos acontece na fase estacionária do crescimento, logo a composição do meio, principalmente as fontes de carbono e nitrogênio, influenciam a produção enzimática. O estudo da avaliação da introdução de outras fontes de carbono e nitrogênio revelou como essas fontes influenciaram os fungos na produção de protease. Por isso, este estudo teve como objetivo avaliar o comportamento destes fungos

frente a diferentes meios com diferentes fontes de carbono e nitrogênio e averiguar em qual meio a produção de protease é maior. Neste estudo, a fonte adicional de carbono escolhida foi o extrato de malte. A caseína foi a escolhida como fonte adicional de nitrogênio.

O fungo codificado como OH 03 teve maior constância no estudo dos meios (Figura 6 – A), tendo atividade em todos os meios testados. O fungo codificado como CAG 01 (Figura 6 – B) obteve sua maior atividade no meio 4 (adição de caseína mais extrato de malte). O fungo codificado como IPE 02 (Figura 6 – C) obteve maior atividade no meio 2 (adição de extrato de malte). O fungo codificado como GOI 3 não teve atividade em nenhum dos meios testados.

Apesar do fungo OH 03 ter apresentado atividade nos 4 meios, o meio contendo acréscimo de extrato de malte teve maior influência na produção de protease, com uma atividade de 21,85 UI/mL. O meio com caseína e extrato de malte obteve a pior produção para o fungo OH 03 (9,07 UI/mL) e melhor produção para o fungo CAG 01 (11,97 UI/mL). O extrato de malte foi selecionado para análise de variáveis de superfície resposta através de CCD na produção de protease do fungo OH 03 junto com o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

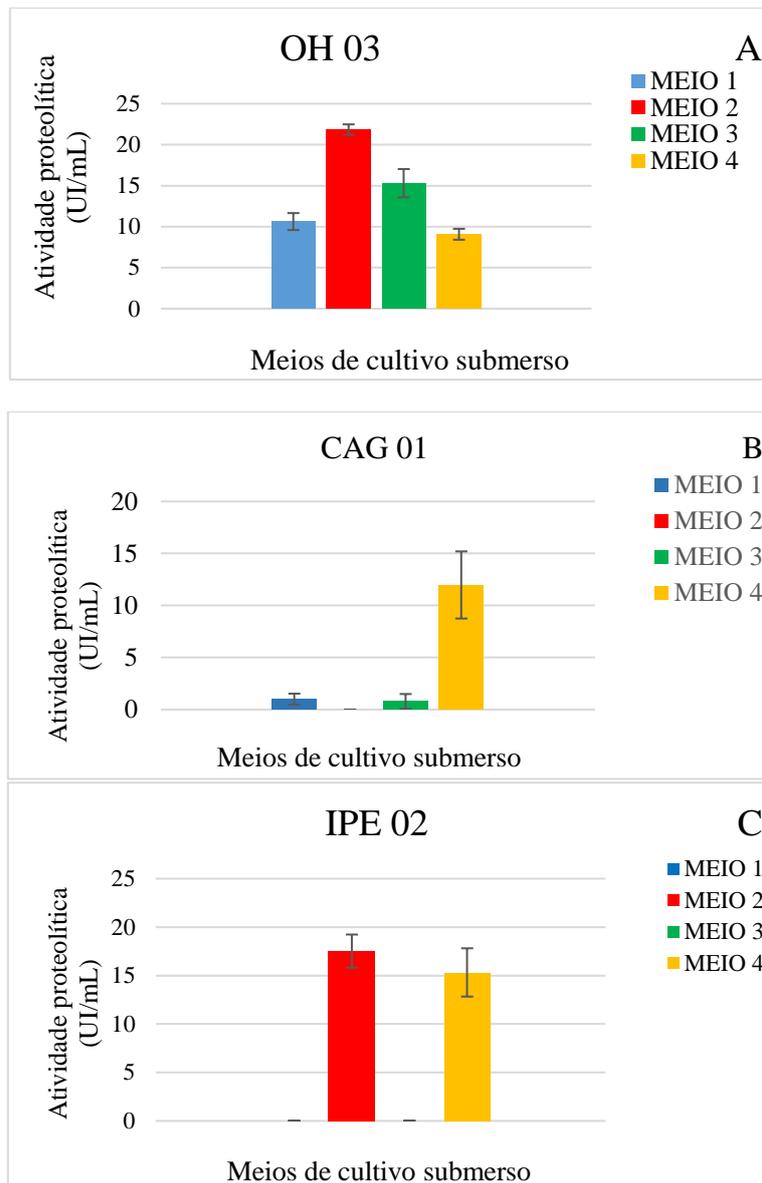


Figura 6: Avaliação da introdução de outras fontes de carbono e nitrogênio na produção de protease dos fungos OH 03, CAG 01 e IPE 02. A: fungo OH 03; B: CAG 02; C: IPE 02. Meio 1 (peptona 1%, extrato de levedura 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5%, Na_2HPO_4 0,5%, K_2HPO_4 0,1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1%), meio 2 (meio 1 + extrato de malte 1%), meio 3 (meio 1 + caseína 1%) e meio 4 (meio 1 + extrato de 1% + caseína 1%). As barras de erro representam 95% dos limites de confiança para os resultados obtidos.

As variações das atividades nos diferentes meios para os 4 fungos mostram que fungos se comportam de formas diferentes nos meios. A forma como cada fungo utiliza as fontes de carbono e nitrogênio é individual e depende de diversos fatores (HADDAR *et al.*, 2010).

Diversos estudos avaliam a influência das fontes de carbono e nitrogênio na produção enzimática. ZAFERANLOO *et al.* (2014) avaliaram a influência destas fontes na produção de protease do fungo endofítico *Alternaria alternata* e destacam que o fungo obteve maior produção no meio contendo extrato de levedura como fonte de nitrogênio. (HAJJI, REBA, *et al.* (2008)) avaliando peptona, caseína, ureia, extrato de levedura, nitrato de sódio e sulfato de amônia como fontes de nitrogênio na produção de protease por *Aspergillus clavatus*, obtiveram maior produção em meio com peptona, extrato de levedura e caseína. WERNECK (2016) estudou o melhor meio para a produção de protease do fungo endofítico extraído da planta *Sapindus saponária* e obteve melhor resultado no meio com a presença adicional de glicose como fonte de carbono.

4.6. Análise de variáveis através de Design do Composto Central (CCD) na produção de protease do fungo OH 03.

Como mencionado anteriormente, extrato de malte e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foram selecionados como variáveis para análise de superfície resposta através da metodologia CCD. Deste modo, 11 corridas foram propostas utilizando este planejamento com 3 pontos centrais e três pontos axiais. As atividades neste modelo variaram de 1,7 UI/mL como menor atividade a 12,05 UI/mL como maior atividade (Tabela 14).

Tabela 13: Resultados da atividade de protease utilizando Design experimental CCD para o fungo OH 03.

Corrida	Extrato de malte (%)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (%)	Atividade (UI/mL)
1	0,5	0,125	10,4
2	2	0,125	3,8
3	0,5	0,25	1,7
4	2	0,25	12,05
5	0,19	0,188	2,925
6	2,31	0,188	13,1
7	1,25	0,10	6,85
8	1,25	0,28	7,3
9	1,25	0,19	4,725
10	1,25	0,19	5,325
11	1,25	0,19	5,175

A análise de variância ANOVA (Tabela 15) indicou que a variável extrato de malte (A) e a relação extrato de malte/(NH₄)₂SO₄ (AB) foram significativas, ou seja, influenciam a produção de protease do fungo OH 03. A variável (NH₄)₂SO₄, avaliação quadrática de extrato de malte (A²) e quadrática de (NH₄)₂SO₄ (B²) não foram significativas. A equação para previsão da atividade proteolítica se encontra logo abaixo.

Tabela 14: Análise da variância (ANOVA) da CCD para o modelo quadrático utilizado na otimização da produção de protease.

Fonte	SQ	GL	MQ	Valor-F	Valor-p
Modelo	124,7332	5	24,94664	8,249953	0.0185
A-Extrato de Malte	41,16281	1	41,16281	13,61271	0.0142
B-(NH₄)₂SO₄	0,004343	1	0,004343	0,001436	0.9712
AB	71,82563	1	71,82563	23,75302	0.0046
A²	10,28541	1	10,28541	3,401427	0.1245
B²	4,393813	1	4,393813	1,453051	0.2820
Falta de Ajuste	14,93259	3	4,977531	53,33069	0.0185
Erro puro	0,186667	2	0,093333		

SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: média dos quadrados; R²=0,89. Nível de significância de 95%.

$$\text{Atividade Protease} = 5,0333 + 2,2683A + 0,0232B + 4,2375AB + 1,3495A^2 + 0,8820B^2$$

O valor-F encontrado de 8,25 indica que o modelo é significativo. Apesar do coeficiente de regressão linear (R²) de 0,89 estar acima do requerido (0,85) a falta de ajuste do modelo foi significativa, indicando que o modelo proposto não é o mais adequado para a região experimental analisada.

O gráfico de superfície de resposta, representado na Figura 7, para atividade de protease em função das variáveis extrato de malte e sulfato de amônio mostra a melhor região de tendência com resposta para o modelo sugerido.

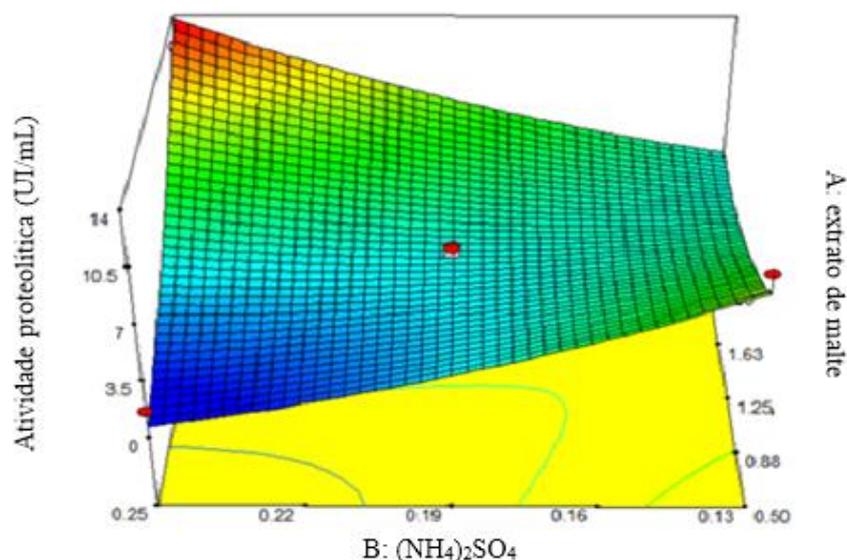


Figura 7: Gráfico de superfície de resposta para a atividade de protease (UI/mL) em função das variáveis extrato de malte (A) e sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (B).

Atualmente, a análise estatística de variáveis através de metodologias de superfícies resposta são cada vez mais utilizadas para otimizar a produção enzimática de diversos microrganismos. São metodologias rápidas e fáceis de serem feitas e são bastante confiáveis (ZHU *et al.*, 2013). Porém, poucos estudos utilizando técnicas estatísticas foram feitos para otimização de protease por fungos endofíticos.

BEN MEFTEH *et al.* (2019) utilizando de técnicas estatísticas (PBD e superfície resposta), otimizaram a produção de protease do fungo endofítico *Penicillium bilaiae* extraído de folhas de *Phoenix dactylifera* com atividade máxima encontrada de 1086,95 UI/ml, valor 5.8 vezes maior que o encontrado inicialmente (186,26 UI/mL).

4.7. Avaliação de diferentes condições de manutenção e preservação dos fungos endofíticos isolados do Cerrado.

O estudo da preservação dos fungos endofíticos armazenados em três diferentes temperaturas foi realizado com a avaliação do crescimento destes fungos quando reativados a cada três meses em placas de Petri com meio BDA. Os fungos foram

reativados até completarem 12 meses de armazenamento. As Tabelas 16, 17 e 18 mostram os fungos que crescerem durante cada período de reativação armazenados a -80 °C, -20 °C e 8 °C, respectivamente.

Tabela 15: Avaliação da preservação dos fungos -80 °C

Fungos	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
BR	+	-	-	-
CAG 02	+	+	+	+
CAG 03	+	+	-	-
CBO 02	+	+	+	+
CE 01	+	+	+	+
EP 03	+	+	+	+
EP 04	+	+	+	+
GOI 03	+	+	+	+
IPE 02	+	+	+	+
IPE 05	+	+	+	+
IPE 06	+	+	+	+
MC 01	+	+	+	+
OH 03	+	+	+	+
PT 02	+	+	+	+

Tabela 16: Avaliação da preservação dos fungos -20 °C

Fungo	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
BR	-	-	-	-
CAG 02	+	+	-	-
CAG 03	+	-	-	-
CBO 02	+	-	-	-
CE 01	+	+	+	+
EP 03	+	+	+	+
EP 04	+	+	+	+
GOI 03	+	+	-	-
IPE 02	+	+	+	+
IPE 05	+	+	+	+
IPE 06	+	+	+	-
MC 01	+	-	-	-
OH 03	+	+	+	+
PT 02	+	+	+	+

Tabela 17: Avaliação da preservação dos fungos 8 °C

Fungo	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
BR	-	-	-	-
CAG 02	+	-	-	-
CAG 03	+	-	-	-
CBO 02	+	-	-	-
CE 01	+	+	+	+
EP 03	+	+	+	+
EP 04	+	+	+	+
GOI 03	+	-	-	-
IPE 02	+	+	-	-
IPE 05	+	+	+	+
IPE 06	+	+	-	-
MC 01	+	+	+	+
OH 03	+	+	+	+
PT 02	+	+	+	+

Após os 12 meses, 85% (Figura) dos fungos armazenados na temperatura de -80 °C apresentaram crescimento quando reativados em placas com meio BDA. Em -20 °C e 8 °C, 50% (figura) dos fungos permaneceram ativos em todas as etapas de avaliação do crescimento. Os fungos CE 01, EP 03, EP 04, IPE 05, OH 03 e PT 02 permaneceram ativos nas três temperaturas testadas durante todos os 12 meses.

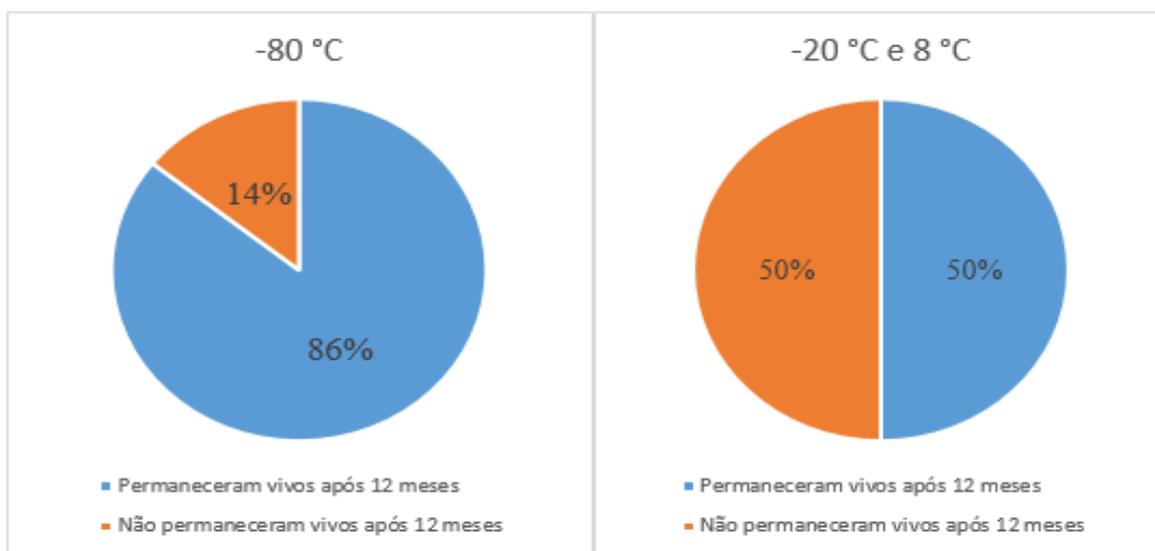


Figura 8: Avaliação da preservação e manutenção dos fungos endofíticos armazenados nas temperaturas de 8 °C, -20 °C e -80 °C.

Na literatura são encontradas diferentes técnicas para a preservação de microrganismos, porém, nenhuma dela é considerada ideal. Cada técnica de preservação possui suas vantagens e desvantagens e em todas ela é possível que ocorra prejuízos as culturas. A escolha da técnica a ser utilizada deve levar em conta fatores como: disponibilidade de material e equipamento, microrganismos que será preservado, custo, tempo etc.

A preservação na temperatura mais baixa (-80 °C) se mostrou a mais eficiente na preservação dos fungos. AYALA-ZERMENO *et al.* (2017) preservou fungos entomopatogênico das espécies *Metarhizium acridum*, *M. anisopliae*, *I. javanica*, *B. bassiana* e *H. thompsoni* por 24 meses na temperatura de -70 °C e 10% de glicerol. RIBEIRO *et al.* (2011) mostrou que a combinação de glicerol mais baixa temperatura foi capaz de preservar fungos endofíticos isolados de plantas de arroz por até 12 meses sem

prejuízo nas suas características morfológicas iniciais. DELLARETTI (2014) em seu trabalho, utilizando a técnica de criopreservação, conseguiu a preservação total de 7 de 12 fungos preservados por 12 meses nas temperaturas de 4 °C e 12 °C com e sem a presença de glicerol 50%.

COSTA *et al.* (2009) em seu estudo sobre preservação de amostras microbiológicas, descrevem que a técnica de congelamento/descongelamento permitiu até hoje elevadas taxas de preservação de culturas microbiológicas. Porém, a metodologia dever ser adequada para cada microrganismo.

5. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou que a preservação de microrganismos na temperatura de -80 °C na presença de um agente crioprotetor (glicerol) foi a mais viável, mantendo aproximadamente 85% dos fungos endofíticos armazenados vivos durante 12 meses.

O fungo OH 03, extraído da planta *Ouratea hexasperma*, se mostrou bastante estável durante todo o trabalho, capaz de produzir proteases na presença de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, temperatura e pH. Obteve sua melhor atividade no planejamento PBD com 26,13 UI/mL, mostrando o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e temperatura como significativas na produção de protease. No planejamento utilizando CCD obteve sua melhor atividade com 12,05 UI/mL.

As técnicas estatísticas utilizadas neste trabalho se mostraram bem eficientes no processo para otimização de proteases, visto que as faixas de produção foram bastantes amplas em ambas as técnicas.

Futuramente, estudos direcionados para encontrar outras formas para a avaliação das melhores fontes de carbono e nitrogênio, com o objetivo de aumentar a produção de protease para valores próximos aos relatados na literatura para outros fungos e encontrar a faixa ótima de produção serão feitos para que sejam realizados os processos de caracterização e purificação da protease produzida pelo fungo OH 03.

6. REFERÊNCIAS

ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 6, p. 1829-45, Jun 2011.

AYALA-ZERMENO, M. A. *et al.* Viability, purity, and genetic stability of entomopathogenic fungi species using different preservation methods. **Fungal Biology**, v. 121, n. 11, p. 920-928, Nov 2017. ISSN 1878-6146 (Print).

AZEVEDO, J. L. *et al.* Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 15-16, 2000. ISSN 0717-3458.

BEN MEFTEH, F. *et al.* Response Surface Methodology Optimization of an Acidic Protease Produced by *Penicillium bilaiae* Isolate TDPEF30, a Newly Recovered Endophytic Fungus from Healthy Roots of Date Palm Trees (*Phoenix dactylifera* L.). **Microorganisms**, v. 7, n. 3, p. 74, 2019.

BEZERRA, J. D. P. *et al.* Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: Diversity and biotechnological potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46(1), p. 49-57, 2015.

BORGES, W. D. S. *et al.* Endophytic Fungi: Natural Products, Enzymes and Biotransformation Reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 13, p. 1137-1163, 2009b.

CARVALHO, C. R. *et al.* The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) from the Brazilian savannah. **Symbiosis**, v. 57, 2012.

CORRÊA, R. C. G. *et al.* Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, n. 10, p. 1467-78, Oct 2014.

COSTA, E. C. *et al.* Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. **Ciência Animal**, v. 19 (2), p. 111-122, 2009.

DELLARETTI, É. M. **Preservação de fungos em baixas temperaturas**. 2014. Programa de Graduação do Bacharelado Interdisciplinar em Biosistemas, Universidade Federal de São João del Rei, Sete Lagoas.

GIRALDI, M.; HANAZAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. **Acta botanica brasílica**, v. 24, n. 2, p. 395-406, 2010.

GOUDA, S. *et al.* Endophytes: A Treasure House of Bioactive Compounds of Medicinal Importance. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1538, 2016.

GRAND VIEW RESEARCH, G. V. R. **Grand View Research - Enzymes Market Analysis and Segment Forecasts to 2024**. Grand View Research, Inc., USA. 2018.

GUPTA, R. *et al.* An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 4, p. 381-95, Dec 2002. ISSN 0175-7598 (Print)

0175-7598.

HADDAR, A. *et al.* Low-cost fermentation medium for alkaline protease production by *Bacillus mojavensis* A21 using hulled grain of wheat and sardinella peptone. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 3, p. 288-94, Sep 2010. ISSN 1347-4421.

HAJJI, M. *et al.* Optimization of alkaline protease production by *Aspergillus clavatus* ES1 in *Mirabilis jalapa* tuber powder using statistical experimental design. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 915-923, 2008.

JOHNVESLY, B.; NAIK, G. R. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus sp.* JB-99 in a chemically defined medium. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 139-144, 2001.

KANDASAMY, S. *et al.* Optimization of protease production from surface-modified coffee pulp waste and corncobs using *Bacillus sp.* by SSF. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 167, Dec 2016.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology** v. 13, n. 4, p. 345-51, Aug 2002. ISSN 0958-1669

LACERDA, A. M. *et al.* Screening de plantas com potencial fitotóxico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 92, n. 4, p. 352-355, 2011.

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

LIMA, S. L. T. D. *et al.* Estudo da atividade proteolítica de enzimas presentes em frutos. **QUÍMICA NOVA NA ESCOLA**, v. 28, p. 47-49, 2008.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BOND, J. S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. **Journal Biological Chemistry**, v. 283, n. 45, p. 30433-7, Nov 7 2008.

NETO, G. G.; MORAIS, R. D. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**, v. 17, n. 4, p. 561-584, 2003.

NIRMAL, N.; SHANKAR, S.; S., L. R. Fungal proteases: An overview. **International Journal of Biotechnology and Biosciences**, International Journal of Biotechnology and Biosciences, v. 1, p. 1-40, 2011.

NORILER, S. A. *et al.* Bioprospecting and Structure of Fungal Endophyte Communities Found in the Brazilian Biomes, Pantanal and Cerrado. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018. Acesso em: 16 jan 2019.

RANI, K.; RANA, R.; DATT, S. Review on latest overview of proteases. **International Journal of Current Life Sciences**: 2012. 12-18.

RAO, M. B. *et al.* Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, Sep 1998.

RATTER, J. A.; IRO, J. F. R. I.; IDGEWATER, S. B. The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. **Annals of Botany**, v. 80, p. 223-230, 1997.

RAWLINGS, N. D. *et al.* The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. **Nucleic acids research**, v. 46, n. D1, p. D624-D632, 2017. ISSN 0305-1048.

RIBEIRO, K. G. *et al.* Isolamento, armazenamento e determinação da colonização por fungos “dark septate” a partir de plantas de arroz. **Revista Agro@mbiente**, v. 5 (2), p. 97-105, 2011. ISSN 1982-8470.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos. 2005.

RODRIGUES, M. L. F. *et al.* Produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo endofítico *Penicillium sp.* isolado das folhas de *Ricinus communis L.* **Revista Brasileira de Energia Renováveis**, v. 4, p. 129- 145, 2015.

SANDHYA, C. *et al.* Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2689-2694, 2005.

SENAI. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Processos Químicos - SENAI**, v. 3, 2009.

SHANKAR, S.; RAO, M.; LAXMAN, R. S. Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria sp.* **Process Biochemistry**, v. 46, n. 2, p. 579-585, 2010.

SIEBER, T. N. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 2-3, p. 75-89, 2007.

SIGNIFICADOS. O que é o Cerrado. Disponível em: <https://www.significados.com.br/cerrado/>, 2018. Acesso em: 22 de maio.

SILVA, F. D. O. *et al.* Chemical compounds of leaves from *Senna spectabilis* (DC) Irwin & Barneby var. *excelsa* (Schrad.) Irwin & Barneby. **Quimica Nova**, v. 33, n. 9, p. 1874-1876, 2010. ISSN 0100-4042.

SOLA, M. C. *et al.* Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. 2012.

SUMANTHA, A.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, p. 211-220, 2006.

SUNITHA, V. H.; DEV, D. N.; SRINIVAS, C. Extracellular Enzymatic Activity of Endophytic Fungal Strains Isolated from Medicinal Plants. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 9 (1), p. 01-09, 2013. ISSN 1817-3047.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. In: (Ed.). **Microbiologia**. 10^a. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VIANCELLI, A. *et al.* Preservation and reactivation of *Candidatus Jettinia asiatica* and *Anammoxoglobus propionicus* using different preservative agents. **Chemosphere**, v. 186, p. 453-458, 2017. ISSN 0045-6535.

VOJCIC, L. *et al.* Advances in protease engineering for laundry detergents. **New Biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 629-34, Dec 25 2015. ISSN 1871-6784.

WERNECK, G. C. **Produção de proteases por fungos endofíticos isolados de plantas do Cerrado**. 2016. (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília-DF, Brasília-DF.

ZAFERANLOO, B. *et al.* Optimization of protease production by endophytic fungus, *Alternaria alternata*, isolated from an Australian native plant. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 1755-62, Jun 2014. ISSN 0959-3993.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, v. 23, n. 5, p. 753-71, Oct 2006.

ZHU, M. J. *et al.* Optimization of neutral protease production from *Bacillus subtilis*: Using agroindustrial residues as substrates and response surface methodology. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 60, n. 3, p. 336-342, 2013. ISSN 1470-8744.