



**FUNGOS ENDOFÍTICOS DE BROMÉLIAS DO PARQUE NACIONAL DO VALE
DO CATIMBAU (CAATINGA) E PRODUÇÃO DE PROTEASES COM AÇÃO
COAGULANTE DO LEITE**

KARLA TORRES LINS DE SOUSA FREIRE

RECIFE

2019

KARLA TORRES LINS DE SOUSA FREIRE

**FUNGOS ENDOFÍTICOS DE BROMÉLIAS DO PARQUE NACIONAL DO VALE DO
CATIMBAU (CAATINGA) E PRODUÇÃO DE PROTEASES COM AÇÃO COAGULANTE
DO LEITE**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Área de Concentração Taxonomia e ecologia de fungos

**KARLA TORRES LINS DE
SOUSA FEIRE**

Orientadora: Cristina Maria de Souza Motta

Co-orientadora: Keila Aparecida Moreira

RECIFE

2019

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Freire, Karla Torres Lins de Sousa

Fungos endofíticos de bromélias do Parque Nacional do Vale do Catimbau (Caatinga) e produção de proteases com ação coagulante do leite / Karla Torres Lins de Sousa Freire- 2019.

83 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Cristina Maria de Souza Mota

Coorientadora: Keila Aparecida Moreira

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos. Recife, 2019.

Inclui referências e apêndice

1. Fungos endofíticos 2. Protease alcalina 3. Caatinga I. Mota, Cristina Maria de Souza (orient.) II. Moreira, Keila Aparecida (coorient.) III. Título

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-015

KARLA TORRES LINS DE SOUSA FREIRE

**FUNGOS ENDOFÍTICOS DE BROMÉLIAS DO PARQUE NACIONAL DO VALE DO
CATIMBAU (CAATINGA) E PRODUÇÃO DE PROTEASES COM AÇÃO COAGULANTE
DO LEITE**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 28/02/2019

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Cristina Maria de Souza Motta – (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dra. Lidiane Roberta Cruz da Silva – Examinador Externo
Universidade Federal de Pernambuco (UFRPE)

Dr. Rafael José Vilela de Oliveira – Examinador Externo
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Alexandre Reis Machado – Examinador Interno
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dra. Oliane Maria Correia Magalhães – Examinador Interno
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dra. Marília de Holanda Cavalcanti Maciel – Suplente externo
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Gladstone Alves da Silva – Suplente interno
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dedico aos meus pais e minhas irmãs por sempre torcerem por mim e estarem sempre ao meu lado, em especial à minha mãe, pelo amor incondicional em todos os momentos da minha vida.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pela proteção, por sempre iluminar meus caminhos e pela oportunidade de estar aqui concluindo mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais, Carlos Alberto de Sousa Freire e Rosalva Torres Lins de Sousa Freire pela força tão grande que me dão em todos os momentos da minha vida, por esse amor incondicional. Em especial a minha mãe, obrigada pelas palavras que sempre me acolhem e me fortalecem. Obrigada por enxugar minhas lágrimas e vibrar com minhas conquistas, por acreditar tanto em mim e ser tão companheira, amiga e não medir esforços pra me ver feliz. Às minhas irmãs Jayne Freire e Julyana Freire, obrigada pela paciência, força e pela nossa amizade. Ao presente de Deus nas nossas vidas, meu sobrinho Joaquim Freire Cardoso, obrigada por existir na minha vida e transformar nosso mundo pra melhor. Eu amo muito vocês.

Ao meu namorado Ademildo Nóbrega, muito obrigada pela atenção, pelo cuidado, por todas as palavras de apoio e incentivo e pela força em todos os momentos em que eu menos esperava e mais precisava e por estar sempre ao meu lado. Obrigada por desejar sempre o meu melhor e fazer de tudo pra me fazer bem, ter você comigo faz toda diferença.

A toda minha família, muito obrigada.

À Universidade Federal de Pernambuco e todos os professores e colaboradores, nestes 10 anos, por contribuir com a minha formação acadêmica.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo apoio financeiro concedido para realização deste trabalho.

Ao Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco pelo espaço e materiais disponibilizados para conclusão deste trabalho e a todos que fazem parte da Micoteca URM, Laboratório de Micologia Ambiental e ao programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, obrigada pelo apoio.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a. Cristina Maria de Souza Motta pela orientação, dedicação, atenção, paciência e credibilidade dispensadas no auxílio da concretização desta tese.

À minha Co-orientadora, Prof^a Dr^a. Keila Aparecida Moreira pela confiança, orientação e dedicação.

Ao meu Co-orientador, Dr. Jadson Bezerra, muito obrigada pelo apoio de sempre e em todos os momentos, pela sua dedicação, ajuda, confiança e amizade. Obrigada por contribuir diretamente pra que eu chegasse até aqui.

À Professora Dr^a. Laura Mesquita Paiva, por me acolher no laboratório de Micologia Ambiental, por vibrar com nossas conquistas e pela grande amizade que construímos. Obrigada por toda ajuda, apoio e dedicação desde o início e por ser referência profissional e pessoal para todos nós.

A todos que fazem parte do Laboratório de Micologia Ambiental, Prof. Alexandre, Ana Patrícia, Amanda, Anthony, Juliana, Layane, Sandy e Thays pela união e amizade. Em especial, Gianne Rizzuto e Letícia Franscisca, obrigada por estarem sempre comigo e pelo companheirismo todos esses anos, dentro e fora da Universidade. Aline Barboza, Tamara Caldas e Jadson Bezerra que me acompanham há tanto tempo e estão sempre do meu lado, obrigada pelos momentos compartilhados. Carlos Fragoso, meu amigo de turma desde o mestrado, obrigada por toda ajuda, apoio e estímulo.

Às minhas grandes amigas desde a graduação, Cristiane Vasconcelos e Nina Rosa, obrigada pela amizade.

Às minhas queridas amigas, Gabrielle Oliveira, Giovana Siqueira, e Poliana Gonçalves pela oportunidade de ter vocês como amigas, por sempre torcerem e acreditarem em mim, pelo companheirismo e por elevarem o meu astral. Obrigada por todos os momentos tão maravilhosos compartilhados e por tornarem os meus dias mais leves e felizes. Aos meus amigos, Suely Amorim e Juliano Amorim, pela amizade e pelo apoio de sempre.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para realização desta conquista. Muito obrigada.

***“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro
passo para a vitória é o desejo de vencer”***
Mahatma Gandhi

Resumo

Os fungos endofíticos habitam de forma assintomática o interior dos órgãos e tecidos dos vegetais e possuem grande importância biotecnológica como potencial fonte de novos produtos naturais de interesse industrial, como na produção de enzimas. As proteases são bastante utilizadas como agente coagulante do leite na indústria de queijo. O presente estudo teve como objetivos avaliar a composição endofítica fúngica das bromélias *Dyckia limae* e *Tillandsia catimbauensis* de área de Caatinga no Parque Nacional do Catimbau, e a produção de enzimas proteolíticas com atividade coagulante do leite pelos endófitos. Para isso, foram coletadas amostras de folhas de 15 indivíduos de cada espécie e, após assepsia, para o isolamento dos fungos, foram utilizados 420 fragmentos de cada espécie vegetal. Um total de 298 endófitos foi isolado, sendo 114 de *D. limae* e 184 de *T. catimbauensis*. A identificação foi feita através de análises morfológicas (macroscópicas e microscópicas) e moleculares, e os resultados demonstraram que estes fungos foram pertencentes a duas classes e 35 gêneros e encontram-se distribuídos nos filos Ascomycota (79,31%), Basidiomycota (13,79%) e Mucoromycota (6,89). *Penicillium* e *Talaromyces* predominam entre os gêneros de fungos endofíticos de *T. catimbauensis* e espécies pertencentes a classe Dothideomycetes entre os de *D. limae*. *Penicillium* sp1 e *Penicillium* sp2 estão sendo descritas como novas espécies para a ciência. Doze isolados pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Talaromyces* foram testados quanto a produção de protease utilizando o método de fermentação submersa com farinha de soja como substrato e todos apresentaram resultados de atividade específica variando de 46,38 a 234,8. Os isolados com os melhores resultados (*Penicillium* sp. URM7965 e *P. decaturense* URM7966) foram utilizados nos testes de coagulação. *Penicillium* sp. URM7965 teve a atividade coagulante máxima em pH 8,5 e a 45°C; a atividade proteolítica em pH 7,0 ou 8,5 a 45°C e permaneceu estável na faixa de pH 6,5 e 7,5 e até 40°C por 180 minutos. Para *P. decaturense* URM7966, a atividade coagulante foi máxima em pH 8,0 a 40°C e a atividade proteolítica em pH 8,0 a 65°C e manteve-se estável na faixa de pH 7,0 e 9,0 e até 40°C por 180 minutos. A atividade máxima de coagulação ocorreu na concentração de 0,02M de CaCl₂ para os dois isolados. O conjunto dos resultados apresentados neste estudo sugere que fungos endofíticos de bromélias apresentam potencial como agente coagulante para utilização em processos de fabricação de queijo.

Palavras-chave: *Penicillium* sp. Protease alcalina. *Dyckia limae*. *Tillandsia catimbauensis*.

Abstract

Endophytic fungi inhabit asymptotically the interior organs and tissues of plants and can confer several benefits to the plants which are associated, besides having great biotechnological importance as potential source of new natural products of interest in different branches of the industries, as in the production of enzymes. Proteases are widely used as a milk coagulant in the cheese industry. The present study had as objective to evaluate the fungal endophytic composition of the bromeliads *Dyckia limae* and *Tillandsia catimbauensis* of the Caatinga area in the Catimbau National Park and the production of proteolytic enzymes with milk coagulant activity by endophytes. For this, leaf samples of 15 individuals of each species were collected and, after asepsis, for the isolation of fungi, 420 fragments of each plant species were used. A total of 298 endophytes were isolated, being 114 of *D. limae* and 184 of *T. catimbauensis*. The identification was made through morphological (macroscopic and microscopic) and molecular analyzes and the results showed that these fungi belonged to two classes and 35 genera and are distributed in the phyla Ascomycota (79,31%), Basidiomycota (13,79 %) and Mucoromycota (6.89). *Penicillium* and *Talaromyces* predominate among the genera of endophytic fungi of *T. catimbauensis* and species belonging to Dothideomycetes among *D. limae*. *Penicillium* sp1 and *Penicillium* sp2 are being described as new species for science. Twelve isolates belonging to the genus *Penicillium* and *Talaromyces* were tested for protease production using the submerged fermentation method with soybean meal as substrate and all showed results of specific activity varying from 46.38 to 234.8.. The isolates with the best results (*Penicillium* sp. URM 7965 and *P. decaturense* URM 7966) were used in the coagulation tests. *Penicillium* sp. URM 7965 had the maximum coagulant activity at pH 8.5 and at 45°C; the proteolytic activity at pH 7.0 or 8.5 at 45°C and remained stable in the range of pH 6.5 and 7.5 and up to 40°C for 180 minutes. For *P. decaturense* URM 7966, the coagulant activity was maximal at pH 8.0 at 40°C and proteolytic activity at pH 8.0 at 65°C and remained stable in the range of pH 7.0 and 9.0 and until 40°C for 180 minutes. The maximum coagulation activity occurred at the concentration of 0.02M CaCl₂ for the two isolates. The set of results presented in this study suggests that endophytic fungi of bromeliads present potential as a coagulant agent for use in cheese making processes.

Keywords: *Penicillium* sp. Alkaline protease. *Dyckia limae*. *Tillandsia catimbauensis*.

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1 – Área de extensão da Caatinga no Brasil.....	18
Figura 2 – Parque Nacional do Catimbau (PARNA do Catimbau).....	21
Figura 3 – Distribuição da bromélia <i>Dyckia limae</i> no Parque Nacional do Catimbau.....	26
Figura 4 – Área de extensão de ocorrência e estimativa da área de ocupação de <i>Dyckia limae</i> no PARNA do Catimbau.....	27
Figura 5 – Distribuição da bromélia <i>Tillandsia catimbauensis</i> em paredões rochosos do Parque Nacional do Catimbau.....	29
Figura 6 – Área de extensão de ocorrência e estimativa da área de ocupação de <i>Tillandsia catimbauensis</i> no PARNA do Catimbau.....	29
Figura 7 – Representação de uma hidrólise protéica catalisada por uma protease.....	37
Figura 8 – Representação da atividade de uma enzima coagulante nas micelas de caseína do leite.....	40
Figura 9 – Mapa de localização do Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil.....	42
Figura 10 – Colonização dos fragmentos das bromélias por fungos endofíticos após 3 dias de incubação em BDA. A - <i>Dyckia limae</i> . B – <i>Tillandsia catimbauensis</i>	50
Figura 11 – Características macroscópicas de A – <i>Neopestalotiopsis</i> B e C – <i>Arcopilus</i> sp. D – <i>Aureobasidium</i> sp. E – <i>Cladosporium</i> sp. F e G – <i>Curvularia</i> sp. H – <i>Dothideomycetes</i> sp. I – <i>Nigrospora</i> sp. J – <i>Talaromyces</i> sp. K – <i>Trichoderma</i> sp. L – <i>Penicillium</i> sp.....	54
Figura 12 – Árvore de Inferência Bayesiana (IB) construída usando sequências de ITS rDNA de 276 fungos, sendo 179 fungos endofíticos obtidos nesse estudo e distribuídos nos filos Ascomycota, Basidiomycota e Mucoromycota. Endófitos isolados da bromélia <i>Tillandsia catimbauensis</i> (Tc) estão em azul e de <i>Dyckia limae</i> (Dl) estão em verde. Valores de probabilidade posterior da IB estão indicados acima dos nós. Sequências de <i>Glomus macrocarpum</i> foram utilizadas como grupo externo.....	58

- Figura 13 – Características macroscópicas e microscópicas de *Penicillium* sp1 (URM 7668) – A. Colônias em CYA, MEA, YES da esquerda para direita (superior = anverso/ inferior= reverso); CREA (inferior = anverso). B e C. Conidióforos. D - G. Estipes, métulas e fiálides. H. Conídios..... 64
- Figura 14 – Características macroscópicas e microscópicas de *Penicillium* sp2 URM 7665 – A. Colônias em CYA, MEA, YES da esquerda para direita (superior = anverso/ inferior= reverso); CREA (inferior = anverso). B e C. Conidióforo. D. Estipe. E. Estipes e fiálides. F – H. Conidióforos e conídios. I. Estipe, métulas e fiálides J. Conídios..... 66
- Figura 15 – Árvore de inferência Bayesiana obtida por análise filogenética de dados combinados de *ITS*, *Tub*, *Cal* e *Rpb2* da seção *Lanata-Divaricata* do gênero *Penicillium*. Endófitos obtidos neste estudo em **negrito**, e novas espécies estão representadas em verde e azul. BPP e ML-BS acima de 0,95 e 70%, respectivamente, são mostrados próximos aos nós. Ramos com suporte total (BPP = 1 e ML-BS = 100%) são espessados. *Penicillium glabrum* CBS 125543 foi utilizado como grupo externo..... 67
- Figura 16 – *Umbelopsis isabellina* (URM 7862). A. Superfície de colônia em MEA após sete dias. B. Esporangióforo simples com esporângio. C. Esporangióforo simples ramificado que surge do mesmo ponto. D. Esporangiospores simples com columelas inconspícuas (setas). Esporangiosporos Barras de escala: 16, 25, 30 e 10 µm, respectivamente..... 69
- Figura 17 – Árvore de Máxima Verossimilhança (ML) obtida com MEGA 7 usando sequências de rDNA de ITS de espécies de *Umbelopsis* com *Spinellus fusiger* (CBS 405.63) e *Phycomyces blakesleeana* (CBS 270.32) como grupos externos. Valores de bootstrap ML acima de 60% são mostrados nos nós. Os isolados obtidos no presente estudo estão em verde..... 70

Figura 18 –	Frascos de Erlenmeyer com crescimento fúngico em meio de cultura (MS-2) para teste de produção de protease após 96h a 120 rpm.....	71
Figura 19 –	A - Coagulação do leite através do extrato bruto enzimático em tampão Tris-HCL (pH 6,2) do isolado de <i>Penicillium</i> URM 7965; B - Amostra do branco contendo leite e CaCl ₂	72
Figura 20 –	Coagulação do leite pelo isolado <i>Penicillium</i> URM 7965.....	73
Figura 21 –	Efeito do pH na atividade coagulante (AC) e na atividade proteolítica (AP) do extrato bruto enzimático de <i>Penicillium</i> sp. URM 7965.....	76
Figura 22 –	Efeito do pH na atividade coagulante (AC) e na atividade proteolítica (AP) do extrato bruto enzimático de <i>Penicillium decaturense</i> URM 7966.....	76
Figura 23 –	Efeito da temperatura na atividade coagulante (AC) e atividade proteolítica (AP) do extrato bruto enzimático de <i>Penicillium</i> sp. URM 7965.....	78
Figura 24 –	Efeito da temperatura na atividade coagulante (AC) e atividade proteolítica (AP) do extrato bruto enzimático de <i>Penicillium decaturense</i> URM 7966.....	78
Figura 25 –	Estabilidade da atividade proteolítica ao pH do extrato bruto enzimático de <i>Penicillium</i> sp. URM 7965 e <i>P. decaturense</i> URM7966, em ensaio de 180 minutos.....	80
Figura 26. –	Estabilidade da atividade proteolítica a temperatura do extrato enzimático de <i>Penicillium</i> sp. URM 7965 e <i>P. decaturense</i> URM7966, ensaio de 180 minutos.....	82
Figura 27 –	Efeito da concentração de CaCl ₂ da atividade coagulante dos extratos bruto enzimáticos de <i>Penicillium</i> sp. URM 7965 e <i>P. decaturense</i> URM 7966.....	84
Figura 28 –	A e B - Coagulação enzimática apresentada pelo isolado <i>Penicillium</i> sp. URM 7965 na concentração de 0,02M de CaCl ₂	84

Lista de tabelas

	Pág.
Tabela 1. Fungos endofíticos de Bromeliaceae caracterizados quanto à produção de protease.....	46
Tabela 2. Frequência absoluta e relativa de fungos endofíticos de <i>Dyckia limae</i> e <i>Tillandsia catimbauensis</i>	51
Tabela 3. pH ótimo da atividade coagulante do leite dos isolados <i>Penicillium</i> sp. URM 7965 e <i>P. decaturense</i> URM 7966 em U/mL.....	73
Tabela 4. Razão (R) entre a atividade coagulante (AC) e proteolítica (AP) dos fungos endofíticos.....	85

SUMÁRIO

	Pág.
1	INTRODUÇÃO..... 16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 18
2.1	CAATINGA 18
2.1.1	Parque Nacional do Vale do Catimbau (Parna do Catimbau)..... 21
2.2	FAMÍLIA BROMELIACEAE Juss..... 22
2.2.1	<i>Dyckia limae</i> L. B. Sm..... 25
2.2.2	<i>Tillandsia catimbauensis</i> Leme, W. Till & J.A. Siqueira..... 27
2.3	FUNGOS ENDOFÍTICOS: CONCEITO E DIVERSIDADE 30
2.3.1	Importância ambiental e biotecnológica dos fungos endofíticos..... 33
2.3.2	Fungos endofíticos na produção de enzimas..... 35
2.3.2.1	Proteases 36
2.3.2.2	Proteases na coagulação do leite 39
3	MATERIAL E MÉTODOS 42
3.1	LOCAL DE COLETA 42
3.2	MATERIAL VEGETAL 42
3.2.1	Isolamento de fungos endofíticos..... 43
3.3	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, TAXA DE COLONIZAÇÃO E FREQUÊNCIA RELATIVA..... 43
3.4	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS..... 44
3.4.1	Extração, amplificação de fragmentos do DNA e Sequenciamento..... 44
3.4.2	Alinhamento das sequências e análise filogenética..... 45
3.5	SELEÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS QUANTO A PRODUÇÃO DE PROTEASE..... 46
3.6	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E PROTEÍNA TOTAL..... 47
3.7	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE COAGULANTE DO LEITE..... 47
3.8	EFEITO DO pH NA ATIVIDADE COAGULANTE E ATIVIDADE PROTEOLÍTICA..... 48
3.9	EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE COAGULANTE E ATIVIDADE PROTEOLÍTICA..... 48
3.10	ESTABILIDADE DA ENZIMA AO pH NA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA..... 49
3.11	ESTABILIDADE DA ENZIMA A TEMPERATURA NA ATIVIDADE

	PROTEOLÍTICA.....	49
3.12	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CaCl ₂ NA ATIVIDADE COAGULANTE DO LEITE.....	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1	ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	50
4.2	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	53
4.3	ANÁLISES FILOGENÉTICAS.....	55
4.3.1	<i>Penicillium</i> sp1 K.T.L.S. Freire, J.D.P. Bezerra & Souza-Motta, sp. nov..	62
4.3.2	<i>Penicillium</i> sp2 K.T.L.S. Freire, J.D.P. Bezerra & Souza-Motta, sp. nov.....	65
4.3.3	<i>Umbelopsis isabelina</i> W. Gams.....	68
4.4	CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS QUANTO A PRODUÇÃO DE PROTEASE.....	71
4.4.1	Determinação da atividade proteolítica e proteína total.....	71
4.4.2	Determinação da atividade coagulante do leite.....	72
4.4.3	Efeito do ph na atividade coagulante e atividade proteolítica.....	73
4.4.4	Efeito da temperatura na atividade coagulante e atividade proteolítica.....	76
4.4.5	Estabilidade da atividade proteolítica ao ph.....	79
4.4.6	Estabilidade da atividade proteolítica a temperatura.....	80
4.4.7	Efeito da concentração de cacl ₂ na atividade coagulante do leite.....	82
4.4.8	Razão entre a atividade coagulante e proteolítica dos extratos bruto enzimáticos	84
5	CONCLUSÃO.....	87
	REFERÊNCIAS.....	88
	APÊNDICE A - MYCOLOGICAL DIVERSITY DESCRIPTION I.....	101

1 - INTRODUÇÃO

A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro localizado no semiárido nordestino e que ocupa uma área de aproximadamente 844.453 km² (CASTELLETTI et al., 2003; MMA, 2017). É uma floresta tropical seca que apresenta uma vegetação arbustiva, espinhosa e ramificada com presença marcante de bromélias, cactáceas e euforbiáceas (COIMBRA-FILHO e CÂMARA, 1996). Alguns estudos demonstram a importância da Caatinga em termos de biodiversidade (LEAL et al., 2005), apesar de já ter sido descrita como um bioma pobre em diversidade e endemismos (VANZOLINI ET AL., 1980; ANDRADE-LIMA, 1982; PRANCE, 1987). A Caatinga conta com 168 unidades de conservação (TEIXEIRA, 2016), dentre elas, o Parque Nacional do Vale do Catimbau (PARNA do Catimbau), criado através do Decreto 913/12 de 2002 com o intuito de preservar os ecossistemas naturais, possibilitando a realização de pesquisas científicas e o desenvolvimento de atividades de educação ambiental (MMA, 2002). Possui uma vegetação bastante heterogênea, com a presença de espécies raras e endêmicas como, por exemplo, as bromélias *Dyckia limae* L.B. Sm e *Tillandsia catimbauensis* Leme, W. Till & J.A. Siqueira (DELGADO JÚNIOR et al., 2014)

Dyckia limae e *T. catimbauensis* são duas espécies da família Bromeliaceae endêmicas do PARN do Catimbau. Essas espécies estão associadas às condições de conservação do Parque, sendo um bom indício da individualidade da região como paisagem natural e um alerta sobre a importância do ecossistema como unidade de conservação da Caatinga (FABRICANTE et al., 2014). As bromélias são bastante diversificadas, com plantas terrestres, epífitas, rupícolas (HOLST e LUTHER, 2004), compreendendo cerca de 3.348 espécies pertencentes a 58 gêneros (Luther, 2012). São conhecidas por desempenhar importantes funções biológicas em comunidades neotropicais (Benzing, 2000), além da importância medicinal (ALBUQUERQUE et al., 2007) e uso na produção de enzimas de interesse biotecnológico, tais como proteases (BRUNO et al., 2010), as quais fazem parte de um grupo de enzimas de grande importância biotecnológica, amplamente utilizadas na indústria têxtil, farmacêutica, de detergentes, alimentos e bebidas (LADEIRA et al., 2010; ZAMBARE et al., 2011) além de serem aplicadas na coagulação do leite para fabricação de diferentes queijos (BRUNO et al., 2011).

Sabe-se que, das aproximadamente 300.000 espécies de plantas existentes na terra, provavelmente cada uma delas apresenta associação com micro-organismos endofíticos, os quais têm sido associados aos vegetais há milhões de anos (KRINGS et al., 2007). Os micro-organismos endofíticos são assim definidos por habitarem o interior de órgãos e tecidos dos vegetais, aparentemente não produzindo sintomas de doença em seus hospedeiros (SCHUTZ e

BOYLE, 2005). Estes podem conferir diversos benefícios às plantas as quais estão associados (BISWAS et al., 2012; WHITE JR. e BACON, 2012) e são também relatados como potenciais produtores de metabólitos considerados de grande importância biotecnológica (BEZERRA et al., 2012; CHANDRA 2012), como as enzimas. Dentre estas, as proteases, que constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais e são utilizadas na formulação de medicamentos, detergentes, na indústria têxtil, de alimentos, bebidas e, principalmente, como coagulantes do leite na fabricação de queijo (GUPTA, 2003; KUMAR, 2005; LADEIRA et al., 2010).

Os estudos realizados com fungos endofíticos, além de demonstrar a importância biotecnológica, têm contribuído para o conhecimento da diversidade mundial de fungos (SIQUEIRA et al., 2008; BUATONG et al., 2011). Alguns estudos mostram que o perfil endofítico é mais diversificado em áreas tropicais úmidas (CHANDRA, 2012) que em regiões secas, desérticas, áridas e/ou semiáridas (SURYANARAYANAN et al., 2011; UNTERSEHER et al., 2012; BEZERRA et al., 2012, 2013). Em áreas de Caatinga são relatados apenas estudos de fungos endofíticos associados a espécies de cactos (BEZERRA et al., 2012, 2013) e nenhum verificou a associação desses micro-organismos com espécies de bromélias de área de Caatinga.

Neste contexto, este estudo teve como objetivos investigar a diversidade de fungos endofíticos das bromélias *D. limae* e *T. catimbauensis* em áreas de Caatinga no Parque Nacional do Vale do Catimbau e avaliar a capacidade dos fungos na produção de enzimas proteolíticas com atividade coagulante do leite.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CAATINGA

A Caatinga, cujo nome de origem tupi-guarani significa “mata branca”, foi assim denominada em referência ao aspecto apresentado pela sua vegetação quando a maioria das árvores perde suas folhas e deixa apenas os troncos esbranquiçados e brilhantes dominarem a paisagem (PRADO, 2003). É um bioma exclusivamente brasileiro localizado principalmente no semiárido nordestino, abrangendo uma área de aproximadamente 844.453 km², o que corresponde a 11% do território nacional e 70% da região Nordeste (CASTELLETTI et al., 2003; MMA, 2017). Embora grande parte deste bioma ocupe o Nordeste do Brasil, como os estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Alagoas, Sergipe, Pernambuco e Bahia, incluindo também o arquipélago de Fernando de Noronha (ANDRADE-LIMA, 1981; RIZZINI, 1963), outra pequena parte se estende também pelo norte do estado de Minas Gerais (Figura 1) (FLORESTAS DO BRASIL EM RESUMO, 2013; MMA, 2015).

Figura 1. Área de extensão da Caatinga no Brasil
Fonte: EMBRAPA



Considerada uma floresta tropical seca (PENNINGTON et al., 2004), a Caatinga é caracterizada por um clima quente com temperaturas que variam de 20 a 28°C

(MARACAJÁ; BENEVIDES, 2006) e regime de chuvas extremamente irregular. A precipitação média anual varia de 240 a 1500 mm, podendo ser inferior a 750 mm em cerca de metade da região de Caatinga. Este clima fortemente sazonal concentra cerca de 50 a 70% das chuvas em três meses consecutivos do ano, com longos períodos de seca em algumas regiões. Além disso, apresenta algumas características consideradas extremas em termos de parâmetros meteorológicos quando comparadas com outras formações brasileiras como, por exemplo, apresenta a mais alta radiação solar, baixa nebulosidade, mais alta temperatura anual, as mais baixas taxas de umidade relativa, precipitação baixa e irregular, limitada em grande parte a um curto período do ano (PRADO, 2003).

Em consequência destas características climáticas, a vegetação da Caatinga apresenta uma grande diversidade de espécies vegetais e é composta em grande parte por espécies caducifólias, que perdem suas folhas em períodos secos para reduzir a perda de água como resposta ao estresse hídrico (GIULIETTI et al., 2004; LOIOLA et al., 2012). Trovão et al. (2007), avaliaram o potencial hídrico e a eficiência da fotossíntese de algumas espécies da Caatinga, com o intuito de compreender as estratégias de sobrevivência utilizadas para adaptação às condições climáticas da região, com isso, os autores concluíram que as espécies estudadas possuem grande capacidade de se adaptar ao estresse hídrico, com estratégias de sobrevivência altamente eficientes que resultam de uma alta complexidade evolutiva.

Um mapeamento feito da cobertura vegetal da Caatinga indica que esta possui aproximadamente 518.635 Km² de cobertura vegetal nativa, o que corresponde a 62,77% da área mapeada. Estes cálculos consideram todas as áreas maiores que 40 ha que são bem conservadas e também as com sinais de atividade antrópica, mas que possuem chances de regeneração ou possibilidade de convivência com intervenções de baixo impacto (MMA, 2007). Este bioma pode ser caracterizado como uma floresta arbórea arbustiva, do qual fazem parte principalmente árvores e arbustos baixos, onde a maioria apresenta espinhos, microfilia e algumas características xerofíticas, além da presença marcante de bromélias, cactáceas e euforbiáceas (LEAL et al., 2003; COIMBRA-FILHO; CÂMARA, 1996).

Apesar de a Caatinga já ter sido descrita por alguns autores como um bioma pobre em diversidade e endemismos (VANZOLINI et al., 1980; ANDRADE-LIMA, 1982; PRANCE, 1987), e apenas 14% das pesquisas serem realizadas em florestas tropicais secas (SÁNCHEZ-AZOFEIFA et al., 2005), estudos mais recentes demonstram a sua importância em termos de biodiversidade (VASCONCELOS et al., 2017). No Brasil, por

exemplo, até o ano de 2014 cerca de 5 mil espécies de fungos já haviam sido registradas, das quais, aproximadamente 850 já foram observadas na Caatinga (MAIA, 2014). Leal et al. (2003), comentam que apesar da diversidade de plantas e animais de ambientes áridos e semiáridos ser menor do que a presente nas grandes florestas tropicais, estas regiões secas apresentam uma fauna e flora adaptadas a condições extremas, tornando estes ambientes com uma alta taxa de endemismos com características e espécies únicas.

Nesta região vivem aproximadamente 27 milhões de pessoas, sendo considerada a região semi-árida mais populosa do mundo, composta principalmente por uma população carente que depende dos recursos obtidos da Caatinga para sobreviver (HAUFF, 2010). Devido a grande biodiversidade apresentada, diversas atividades econômicas podem ser desenvolvidas nesta região, como as voltadas para fins agrosilvopastoris e industriais, com destaque para os ramos farmacêutico, de cosméticos, químico e de alimentos. Com isso, este bioma vem sendo desmatado de forma acelerada, tendo como causa principal o consumo de lenha nativa, que é explorada com fins domésticos e industriais de uma forma ilegal e insustentável. No Brasil, cerca de 60% das áreas susceptíveis à desertificação estão localizadas na Caatinga (MMA, 2017). Sendo assim, a Caatinga é considerada um dos biomas brasileiros mais ameaçados e degradados pela ação antrópica e estima-se que 45,3% da sua área total já tenham sido alterados e que 52% do bioma sofre com problemas de degradação, tornando este o terceiro bioma brasileiro mais modificado, ficando atrás apenas da Mata Atlântica e do Cerrado (CASTELLETTI et al., 2003; HAUFF, 2010; KIILL, 2017; ICMBio, 2018).

Em relação a iniciativas voltadas para conservação deste Bioma, o Departamento de Conservação da Biodiversidade do Ministério do Meio Ambiente, trabalha em nível de conservação de paisagem promovendo a criação e implementação de áreas protegidas (unidades de conservação e corredores, principalmente) e em nível de conservação de espécies, promovendo a conservação de espécies ameaçadas de extinção, o uso sustentável das espécies com potencial de uso e o controle de espécies invasoras.

Apesar disso, atualmente a Caatinga possui apenas 8,4% de seu território protegido em unidades de conservação federais e estaduais, sendo apenas 1,4% de proteção integral (HAUFF, 2010). No entanto, em março de 2015 foi implantado o Refúgio de Vida Silvestre (RVS) Tatu-Bola, criado com intuito de proteger o habitat natural do tatu-bola (*Tolypeutes tricinctus*), mascote da Copa do mundo de futebol em 2014, sendo uma das maiores áreas protegidas da Caatinga e a maior do estado. De acordo com dados da

Agência Estadual de Meio Ambiente (CPRH), a área total protegida da Caatinga em Pernambuco é de 16.280,81 ha e com o RVS Tatu Bola, sobe para 92.278,34 ha, aumentando de 0,2% para 1,2% o percentual de área de preservação do bioma só no estado de Pernambuco (OEKO, 2017; CPRH, 2017). Das 168 unidades de conservação da Caatinga (TEIXEIRA, 2016), o Parque Nacional do Vale do Catimbau (PARNA do Catimbau) é também uma das áreas mais importantes de conservação do bioma no estado.

2.1.1 Parque Nacional do Vale do Catimbau (Parna do Catimbau)

Os parques nacionais (PARNA) são unidades de conservação de uso indireto que tem como objetivo principal, a preservação de ecossistemas naturais de grande relevância ecológica e beleza cênica (SIQUEIRA, 2006). O PARNA do Catimbau é uma das áreas mais importantes de conservação da Caatinga e foi criado através do Decreto 913/12 de 2002 com o intuito de preservar os ecossistemas naturais, possibilitando a realização de pesquisas científicas e o desenvolvimento de atividades de educação ambiental (MMA, 2002; IBAMA, 2002). O parque está localizado no estado de Pernambuco ocupando uma área de aproximadamente 62.300 ha e está inserido no sertão Central, numa área de transição entre o agreste e o sertão do estado, distribuído entre os municípios de Ibimirim, Tupanatinga e Buíque (DELGADO JÚNIOR et al., 2014). Recebeu este nome devido a Serra do Catimbau, localizada no distrito do Catimbau em Buíque, e é numa modificação do relevo conhecido como Chapada de São José que se encontra a maior parte física do parque (VASCONCELOS, 2016).

Figura 2. Parque Nacional do Catimbau (PARNA do Catimbau)



O PARNA do Catimbau apresenta altitudes variando de 370 a 1068 metros, com as maiores altitudes no sudeste da área, e um clima regional BSh'w caracterizado por ser quente e seco, com temperatura média anual de 26°C e precipitação anual em torno de 600mm. Devido a posição geográfica, está submetido aos regimes de outono-inverno (s') e verão-outono (w'), com aproximadamente 60 a 75% das chuvas ocorrendo no período de março a junho, sendo o mês de maio considerado o mais chuvoso e novembro o mais seco (RODRIGUES, 2010; SADMET/INMET, 2013; FERREIRA, 2015). O solo desta região é predominantemente do tipo planossolo e podzólico nas encostas de paredões e, no alto das serras e demais regiões planas, é do tipo litólico. O terreno apresenta uma grande quantidade de afloramentos rochosos e pode variar de levemente a fortemente ondulado (FABRICANTE et al., 2014).

De acordo com Rodal et al. (1998), a vegetação presente no PARNA é bastante heterogênea e pode-se caracterizar ao menos quatro fitofisionomias como, por exemplo, campos rupestres, caatinga arbustiva, vegetação perenifólia e arbustiva perenifólia. A vegetação do tipo caatinga é predominante no Parque, típica da região semi-árida nordestina, nele pode-se observar uma caatinga densa com grande quantidade de plantas e uma caatinga aberta com menos vegetais (MAIA, 2014).

Devido às características físico-climáticas, pode-se observar um mosaico de paisagens com grande biodiversidade. Uma vegetação diversa em espécies e estrutura devido às variações de relevo e topoclima, onde estão presentes espécies de Cerrado, Campos Rupestres e Mata Atlântica, além das típicas da Caatinga (RODRIGUES, 2010). Esta vegetação altamente heterogênea tem a presença marcante de espécies raras e endêmicas como, por exemplo, as bromélias *Dyckia limae* L.B. Sm e *Tillandsia catimbauensis* Leme, W. Till & J.A. Siqueira (DELGADO JÚNIOR et al., 2014), pertencentes a família Bromeliaceae. Essas espécies estão associadas às condições de conservação do Parque, sendo um bom indício da individualidade da região como paisagem natural e um alerta sobre a importância do ecossistema como Unidade de Conservação da Caatinga (FABRICANTE et al., 2014).

2.2 FAMÍLIA BROMELIACEAE Juss.

Bromeliaceae é uma família de monocotiledôneas quase exclusivamente Neotropical, com exceção de apenas uma espécie que ocorre na África Ocidental (GOUDA et al., 2015; CRUZ et al., 2017) e é considerada a segunda maior família de

monocotiledôneas epífitas (MANETTI et al., 2009). Com base nos resultados de estudos filogenéticos e de radiação adaptativa em Bromeliaceae realizados por Givinish et al. (2007; 2011), há evidências de que as bromélias surgiram no Escudo das Guianas há 100 milhões de anos, no período cretáceo, e as subfamílias começaram a divergir umas das outras em torno de 19 milhões de anos atrás, sendo reconhecidas hoje, oito subfamílias, Brocchinioideae, Bromelioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Tillandsioideae. Um estudo de *checklist* de espécies de Bromeliaceae realizado por Ferreira et al. (2015) no Parque Nacional do Catimbau, concluiu que esta família está representada no Parque por 11 espécies, distribuídas em 8 gêneros e 3 subfamílias, sendo a Bromelioideae a mais representativa com 5 gêneros e 5 espécies, seguido da subfamília Pitcairnioideae.

As bromélias são plantas bastante diversificadas e altamente tolerantes e adaptáveis, podendo ser encontradas em litorais ou no calor extremo e seco dos desertos, sendo especialmente comuns em florestas tropicais úmidas e presentes desde o nível do mar até altitudes acima de 4000 m (MANETTI et al., 2009; GIONGO et al., 2013). São representadas por espécies terrestres, epífitas e rupícolas (Holst e Luther, 2004), compreendendo cerca de 3470 espécies pertencentes a 58 gêneros (GOUDA et al., 2015). Estima-se que 40% das espécies e 73% dos gêneros ocorram no Brasil (SANTOS et al., 2005), com maior diversidade na Floresta Atlântica brasileira (MANETTI et al., 2009). Segundo Forzza et al. (2015), somente no Brasil foram catalogadas 1.343 espécies, pertencentes a 44 gêneros, dos quais 17 são endêmicos e ocorrem nas regiões Norte, Nordeste, Sul, Sudeste e Centro-Oeste nos domínios fitogeográficos do Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Amazônia, Pantanal e Pampa.

Representantes desta família são conhecidas por desempenhar importantes funções biológicas em comunidades neotropicais (BENZING, 2000). Por exemplo, as bromélias geralmente possuem suas folhas do tipo lanceoladas largas com ou sem espinhos nas bordas e se encontram normalmente dispostas em forma de rosetas, o que favorece o acúmulo de água formando um tipo de reservatório que serve tanto para o metabolismo da própria planta, como de micro habitat para diversos organismos que vivem associados a bromélias, abrigando várias espécies de animais como anuros, beija-flores, morcegos, abelhas, vespas, aracnídeos e formigas, favorecendo o desenvolvimento, alimentação e abrigo dos mesmos (MOREIRA et al., 2006; NOGUEIRA et al., 2011; DIAS et al., 2014; FORZZA et al., 2015). Em estudo realizado por Nascimento et al., (2012), com o objetivo

de investigar a composição florística de um brejo de altitude, os autores observaram nos estratos mais altos da floresta estudada, que as bromélias apresentam adaptações morfológicas para absorção de água e nutrientes.

Outra relevante característica da família Bromeliaceae é sua importância econômica tanto no uso para alimentação como no uso ornamental e fonte de fibras (BENNETT; BENZING, 2000). A espécie *Neoglaziovia variegata* conhecida como “caroá-verdadeiro”, possui grande valor econômico ao ser utilizada como produtora de fibras (MOREIRA et al., 2006). Em períodos de seca, uma bromélia conhecida popularmente como macambira (*Bromelia laciniosa*), após a queima dos espinhos, é bastante utilizada como alternativa na alimentação do gado (SOUZA; SOUZA, 2016). Também o abacaxi (*Ananas comosus*), que é conhecido como uma das frutas tropicais mais populares do mundo, cultivada em mais de 70 países de clima tropical e subtropical, tanto para consumo da própria fruta como para fabricação de doces, bebidas, sobremesas (MOREIRA et al., 2006; MANETTI, 2009; FRANÇA-SANTOS et al., 2009). Na ornamentação, estas plantas possuem grande destaque em decoração de interiores e projetos paisagísticos, o que se deve a algumas características como a beleza das suas cores e formas, adaptação a pequenos jardins, baixa demanda de cuidados e durabilidade das inflorescências. Devido ao grande valor ornamental destas bromélias e consequente aumento na procura, o extrativismo de seu ambiente natural tem se intensificado e, com isso, colocado algumas espécies em certo grau de ameaça (MOREIRA et al., 2006; MANETTI et al., 2009).

Além da importância ecológica e econômica, pode-se observar o grande potencial medicinal destas plantas. Albuquerque et al. (2007), realizaram uma análise a respeito das informações divulgadas sobre plantas medicinais presentes na Caatinga e utilizadas pelas comunidades tradicionais. Os autores citaram que bromélias são utilizadas com aplicação medicinal como, por exemplo, espécies de *Tillandsia* que são usadas com efeito hemostático, no tratamento de úlceras, reumatismo (*T. recurvata*), como laxante, tratamento de doenças cardíacas (*T. streptocarpa*). Entre outras diversas espécies da família Bromeliaceae como, *Aechmea lingulata*, *Ananas sativus*, *Bromelia laciniosa*, que possuem indicação terapêutica contra diarreia, febre, hepatite, caspas, problemas respiratórios em geral. O abacaxi, além de ser grande destaque como alimento, é também a principal fonte da enzima bromelina. O nome bromelina é dado ao conjunto de enzimas proteolíticas presentes em todas as espécies da família Bromeliaceae que, com base na sua atividade proteolítica possui grande interesse biotecnológico e é normalmente usada para

produção de fármacos, tratamento de distúrbios digestivos, nas indústrias têxteis para amaciamento de fibras, produção de detergentes, além do uso na indústria alimentícia para clarificação de cervejas, preparo de alimentos infantis e dietéticos, amaciamento de carnes e proteases que podem ser utilizadas na coagulação do leite para fabricação do queijo (FRANÇA-SANTOS et al., 2009; BRUNO et al., 2010; 2011).

2.2.1 *Dyckia limae* L. B. Sm.

Dyckia Schult. f. é considerado um gênero monofilético, confirmado por Krapp et al. (2014) através de uma recente e ampla análise filogenética com base em seus moleculares. Em estudo anterior, Krapp et al. (2012), afirmam que a escassez de informação a respeito das relações infragenéricas dentro de *Dyckia*, de sua estrutura genética, variação dentro de espécie e mecanismos de especiação, se deve em parte ao fato de que espécies de *Dyckia* são endêmicas e raras, mal representadas em herbários e coleções vivas e algumas espécies são conhecidas apenas na sua localidade. Além disso, apresenta um alto grau de plasticidade morfológica intraespecífica, o que dificulta uma delimitação em *Dyckia*.

O gênero é pertencente a subfamília Pitcairnioideae (Bromeliaceae) e está representado por cerca de 159 espécies, dentre elas, *Dyckia limae*. No PARNA do Catimbau, a subfamília Pitcairnioideae é a segunda mais representativa (FERREIRA et al., 2015). As espécies deste gênero são terrestres ou rupícolas e possuem suas folhas distribuídas em forma de roseta, geralmente coriáceas com margem espinhosa e diferentes graus de suculência, e apesar de ser característica das bromélias, a disposição das folhas do gênero *Dyckia* não apresenta formação de tanques que favorecem o acúmulo de água (HIRSCH, 2016) (Figura 2). As inflorescências estão inseridas lateralmente, podendo ser simples ou ramificadas e são plantas de hábito fortemente xerofítico. As flores podem ser sésseis ou pediceladas e apresentam pétalas, sépalas e inflorescências com cores variando do vermelho, laranja ao amarelo. Ocorrem no Brasil, Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai, mas é no Brasil que se encontra 83% das espécies conhecidas (KRAPP et al., 2014; MELO, 2016).

Fabricante et al. (2014), trataram a espécie *Dyckia limae* como endêmica do PARNA do Catimbau, mas segundo Forzza et al. (2015), esta possui ocorrência confirmada nos estados de Pernambuco, Paraíba, Sergipe e possivelmente em Alagoas, estando distribuídas

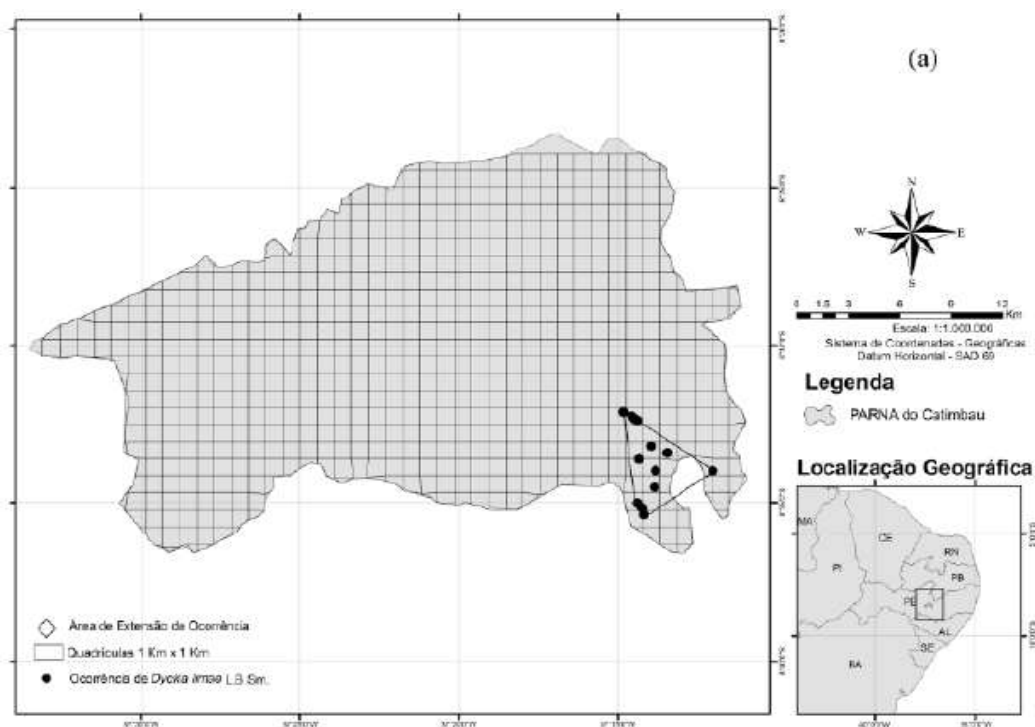
no domínio geográfico da Caatinga e nos tipos de vegetação floresta estacional semidecidual e vegetação sobre afloramentos rochosos.

Dyckia limae apresenta altura variando de 70-80 cm, de 15 a 20 folhas densamente rosuladas, coriáceas, suculentas e as bainhas mais largas que as lâminas. As lâminas possuem formato triangular, canaliculadas, fortemente recurvadas unilateralmente e coloração verde, opaca (FABRICANTE et al., 2014). No PARNA do Catimbau esta espécie está distribuída nas formas rupícola em paredões ou terrícola em solos arenosos, normalmente em indivíduos isolados em altitudes superiores a 800 metros (FERREIRA et al., 2015). De acordo com estudo realizado por Fabricante et al. (2014), a área de extensão de *D. limae* no parque é de 15,1 km², e área de ocupação de 5 km² (Figura 3). Devido a estas características juntamente com dados sobre condições de conservação do PARNA do Catimbau, embora *D. limae* não esteja inserida na lista de espécies brasileiras ameaçadas de extinção, os autores consideram esta em risco crítico.

Figura 3. Distribuição da bromélia *Dyckia limae* no Parque Nacional do Catimbau



Figura 4. Área de extensão de ocorrência e estimativa da área de ocupação de *Dyckia limae* no PARNA do Catimbau



2.2.2 *Tillandsia* sp2 Leme, W. Till & J.A. Siqueira

Pertencente a subfamília Tillandsioideae, *Tillandsia* L. é um dos gêneros mais numerosos dentro da família Bromeliaceae, com cerca de 620 espécies (GÓMEZ ROMERO; NOVARA, 2010; LUTHER 2010), e compreende seis subgêneros, *Tillandsia*, *Allardtia* (A. Dietr.) Baker, *Anoplophytum* (Beer) Baker, *Diaphoranthema* (Beer) Baker, *Phytarrhiza* (Vis.) Baker e *Pseudalcantarea* Mez (BARFUSS et al. 2005). No PARNA do Catimbau, esta subfamília é a terceira mais representativa das bromélias, com um gênero e quatro espécies, são elas, *Tillandsia catimbauensis*, *Tillandsia loliacea*, *Tillandsia recurvata* e *Tillandsia streptocarpa*. O gênero não é endêmico do Brasil e possui distribuição geográfica com ocorrência confirmada em todas as regiões brasileiras (Norte, Nordeste, Centro-oeste, Sudeste e Sul), distribuído nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa, Pantanal (FORZZA et al., 2015). Para Pontes e Agra (2006), *Tillandsia* é um dos gêneros da família Bromeliaceae mais representados na Caatinga, mas com poucos estudos sobre a diversidade do gênero neste bioma.

Espécies deste gênero podem ser epífitas, rupícolas, terrícolas, casmofíticas, saxícolas; caulescentes ou acaulescentes, além de possuir grande valor econômico (MENDONÇA et al., 2005; BÜNEKER et al., 2014; FORZZA et al., 2015). São bastante utilizadas na ornamentação, pois assim como o gênero *Dyckia*, não possuem como característica o acúmulo de água e formação de “tanques”, portanto, não fornece risco à proliferação de mosquitos causadores da dengue (MENDONÇA et al., 2005). Algumas espécies são comercializadas em floriculturas no mundo inteiro (*T. cyanea*, *T. xerographica*, *T. aeranthos*), inclusive na Paraíba como, por exemplo, as espécies nativas *T. gardneri*, *T. tenuifolia* e *T. polystachia*. Além do uso na confecção de arranjos com *T. usneoides*, utilizada em diversas floriculturas do estado (PONTES; AGRA, 2006).

Outra importante característica de espécies de *Tillandsia* é seu uso como bioindicador de poluição ambiental. As plantas epífitas são eficientes biomonitores de poluição do ar por não manterem contato com o solo, utilizando apenas nutrientes da atmosfera, e o uso destas consiste na transferência do espécime coletado em local não poluído para área a ser monitorada (FIGUEIREDO et al., 2001, 2004). Alguns estudos foram realizados utilizando espécies de *Tillandsia* como bioindicadores. Figueiredo et al. (2004), utilizaram a bromélia epifítica *T. usneoides* como um biomonitor de poluição do ar na cidade de São Paulo (SP) através da exposição dos espécimes em diferentes locais da cidade, e concluíram que houve um acúmulo de alguns elementos químicos como Al, As, Cr, Fe, Mo, Sb, Ti, V e Zn, nas plantas expostas em lugares poluídos, indicando esta espécie como um potencial promissor de biomonitoramento da poluição atmosférica em São Paulo.

Para Fabricante et al. (2014), *Tillandsia catimbauensis* é uma espécie endêmica do PARNA do Catimbau. Porém, de acordo com Forzza et al. (2015), a espécie é endêmica do Brasil e nativa da Caatinga, de distribuição restrita ao estado de Pernambuco.

Representantes de *T. catimbauensis* são rupícolas ou eventualmente epífitas, carecem de caule e variam de 27-30 cm de altura com aproximadamente 45 folhas, coriáceas, iguais ou mais curtas que a inflorescência. As lâminas foliares são ligeiramente triangulares, canaliculadas com cerca de 18-25 cm de comprimento. A inflorescência se apresenta simples, oblongo-elipsoide, subereta, densamente florida, com 9 a 11 flores de 26-27 centímetros de comprimento (FABRICANTE et al., 2014). No PARNA do Catimbau, a forma rupícola é predominantemente encontrada, mas também observada na forma epífita.

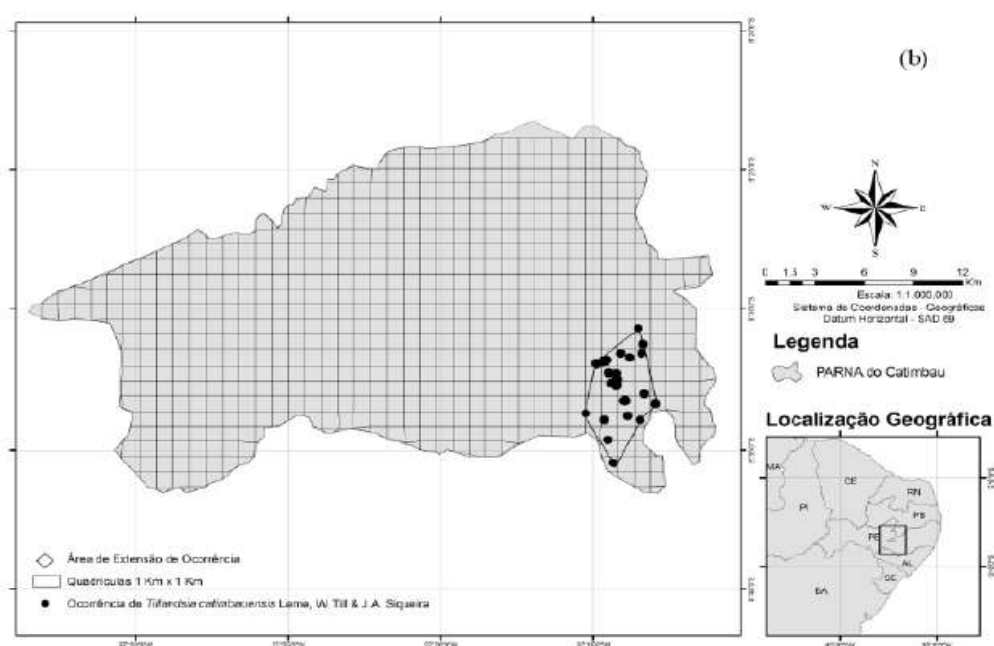
Está restrita a porção do Parque em que ocorrem as serras, sempre em alturas superiores a 800 metros (FERREIRA et al., 2015) (Figura 4).

Assim como para bromélia *Dyckia limae*, Fabricante et al. (2014) realizaram, no mesmo estudo, a categorização do risco de extinção de *T. catimbauensis* no PARNA do Catimbau e observaram que a área de extensão de *T. catimbauensis* no Parque é de 22,1 km², e a área de ocupação de 8,5 km² (Figura 5), e a partir desses dados associados aos dados de conservação do Parque, concluíram que *T. catimbauensis* corre risco crítico de extinção na natureza mesmo ainda não fazendo parte da lista de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção.

Figura 5. Distribuição da bromélia *Tillandsia catimbauensis* em paredões rochosos do Parque Nacional do Catimbau



Figura 6. Área de ocorrência de *Tillandsia catimbauensis* no PARNA do Catimbau



Fonte: Fabricante et al. (2014)

2.3 FUNGOS ENDOFÍTICOS: CONCEITO E DIVERSIDADE

O termo endofítico é derivado do grego e significa “dentro da planta” (*endo* = dentro, e *phytón*, planta). A ciência responsável pelo estudo destes micro-organismos foi estabelecida recentemente como “Endofitologia” por Unterseher et al. (2012), com intuito de facilitar o entendimento da relação entre estes micro-organismos e seus hospedeiros. Estes micro-organismos definidos como endófitos podem ser fungos e bactérias que colonizam o interior de órgãos e tecidos vegetais saudáveis, inter e/ou intracelularmente, e não desenvolvem sintomas visíveis de doenças nos seus hospedeiros (TAN; ZOU, 2001; SCHUTZ; BOYLE, 2005). No caso dos fungos, esta associação se dá principalmente na forma micelial, com isso, para que seja denominado fungo endofítico, é necessário que haja, no mínimo, a presença de hifas no tecido vivo (KAUL et al., 2012). Os fungos endofíticos são considerados um grupo polifilético e bastante diverso na natureza, pertencentes principalmente ao filo Ascomycota (ARNOLD, 2007). Por exemplo, em estudo realizado por Lacerda et al. (2018) sobre a diversidade de fungos endofíticos de *Eucalyptus microcorys*, os autores coletaram 120 folhas da planta ao longo de um ano em uma plantação de eucaliptos na cidade de São Paulo e obtiveram como resultado um total de 709 endófitos, pertencentes a 59 taxa, onde o Filo Ascomycota foi o mais dominante, sendo representado por 99% dos isolados.

Segundo Azevedo (1999), foi no século XIX que estes micro-organismos foram citados pela primeira vez, mas em 1866, através de Bary foi delimitada uma diferença entre estes e os patógenos de plantas. Em 1887, Galippe foi o primeiro cientista a mencionar que diversos vegetais poderiam hospedar micro-organismos no seu interior, e acreditava que estes adentravam nas plantas através do solo (COMPANT et al., 2012).

Encontrados em folhas, flores, frutos, caules e raízes (PARK et al., 2012), estes fungos podem penetrar no hospedeiro de forma horizontal através de aberturas naturais como estômatos e hidatódios ou por feridas causadas por insetos e até mesmo por injúrias causadas nas raízes pelo contato com o solo durante seu crescimento, tendo provavelmente nas raízes a sua principal porta de entrada (AZEVEDO, 1988; ALY et al., 2011).

Ganley et al. (2004), afirmaram que estes micro-organismos desempenham funções primordiais nos ecossistemas, sendo inclusive capazes de retirar nutrientes e realizar uma colonização também de forma vertical, onde são transmitidos para outras gerações de plantas através das sementes do hospedeiro.

A colonização endofítica pode ocorrer de forma sistêmica, local, intercelular ou intracelular, na qual a interação fungo-planta resulta da extensão de resposta da planta através do modo pelo qual o fungo infecta seu hospedeiro (MAKI, 2006). Alguns autores acreditam que estes fungos geralmente não penetram diretamente nas células vegetais, mas crescem como hifas esparsas no espaço intercelular onde gastam grande parte do seu ciclo de vida no hospedeiro, consumindo nutrientes a partir dos fluidos intercelulares das plantas (PARK et al., 2012). Entretanto, esta interação é de grande importância também aos vegetais, pois, ao contrário dos fitopatógenos, estes endófitos podem conferir diversos benefícios às plantas as quais estão associados.

Estes fungos são capazes de ocupar uma infinidade de nichos biológicos como, por exemplo, as plantas superiores, além de possuir grande capacidade de crescimento em ambientes bastante incomuns, como algas, plantas marinhas, gramíneas e raízes de orquídeas (STROBEL; DAYSI, 2003), podem colonizar plantas que crescem em ambientes extremos como o Ártico e Antártica, solos geotérmicos, desertos, florestas tropicais, manguezais e florestas costeiras (CHOWDHARY et al., 2012).

Normalmente, centenas de fungos endofíticos podem ser isolados de uma única planta, onde pelo menos uma espécie se mostra específica ao hospedeiro (TAN; ZOU, 2001). Essa especificidade pode ocorrer devido as diferenças químicas ou teciduais apresentadas pelas estruturas internas dos órgãos das plantas (SILVA et al., 2014). Um estudo realizado por Arnold e Herre (2003), com fungos endofíticos de *Theobroma cacao* de uma Floresta tropical no Panamá, verificou que os endófitos cresceram mais rápido em meios contendo extratos foliares de *T. cacao* do que em meios contendo extrato de outras espécies de árvores co-ocorrentes na região, o que sugere que diferenças na química foliar entre as espécies podem influenciar na associação dos endófitos. Mahapatra e Banerjee (2010), estudando a especificidade dos endófitos aos tecidos de uma mesma planta, verificaram que a frequência de colonização de fungos endofíticos é muito maior nas folhas (44,66%) em comparação aos pecíolos (32,16%) e cascas (23,17%). Demonstrando também evidências para a especificidade tecidual de fungos endofíticos.

Estes estudos visando a verificação da comunidade de fungos endofíticos, além de demonstrar a importância biotecnológica destes, vêm contribuindo para o conhecimento da diversidade mundial de fungos (SIQUEIRA et al., 2008; BUATONG et al., 2011). A maior riqueza e frequência destes endófitos têm sido associadas a ecossistemas com maior biodiversidade (HAWKSWORTH, 2001), sendo mais investigadas em florestas tropicais

úmidas e temperadas. Com isso, alguns estudos mostram que o perfil endofítico é mais diversificado em áreas tropicais úmidas (CHANDRA, 2012) que em regiões secas, desérticas, áridas e/ou semiáridas (SURYANARAYANAN et al., 2011; UNTERSEHER et al., 2012; BEZERRA et al., 2012, 2013), como mostra estudo realizado por Santos et al. (2015) com fungos endofíticos de *Indigofera suffruticosa* coletada na Floresta Atlântica Costeira e na Caatinga durante as estações seca e chuvosa, com isso, os autores concluíram que o maior número de isolados fúngicos foi obtido na Floresta Atlântica Costeira nas duas estações, quando comparado a Caatinga.

No entanto, vários estudos realizados na floresta tropical seca brasileira (Caatinga) têm demonstrado a riqueza de fungos endofíticos associados a plantas de ambientes secos. Em áreas de Caatinga são relatados apenas estudos sobre fungos endofíticos associados a espécies de cactos (BEZERRA et al., 2012, 2013; 2017a; 2017b; 2017c; FREIRE et al., 2015; CROUS et al., 2017). No Brasil, algumas pesquisas verificaram a riqueza de endófitos associados a bromélias, por exemplo, leveduras endofíticas em áreas de Mata Atlântica nas regiões Norte e Sul do país (LANDELL et al., 2006, 2015; FELIX et al., 2017; PITTEK et al., 2017, CROUS et al., 2018), mas até o momento nenhum estudo da diversidade de endófitos associados com espécies de bromélias da Caatinga foi realizado.

Segundo Strobel et al. (2004), a seleção das plantas para isolamento de fungos endofíticos é baseada em alguns critérios como, a escolha de plantas presentes em ecossistemas únicos, as que possuem algum histórico etnobotânico com aplicações e uso de interesse, pois em última análise pode ser proposto que os produtos naturais da planta que possuem poderes de cura estejam atribuídos ao endofítico e não a planta; as que crescem em áreas de grande biodiversidade ou adaptadas a condições limitantes de sobrevivência, pois, de acordo com Rodrigues (2010), a diversidade na comunidade endofítica pode estar relacionada às necessidades adaptativas das espécies vegetais em relação ao ambiente.

Além disso, esses endófitos têm sido associados a vegetais há milhões de anos (KRINGS et al., 2007). Devido a este fato, das aproximadamente 300.000 espécies de plantas existentes na terra, provavelmente cada uma delas abriga micro-organismos endofíticos (STROBEL; DAISY, 2003). Há estimativas de que a biodiversidade destes seja de aproximadamente um milhão de espécies (GANLEY et al., 2004), embora grande parte ainda não tenha sido descrita.

2.3.1 Importância ambiental e biotecnológica de fungos endofíticos

Através da interação com seus hospedeiros, a micobiota endofítica desempenha funções importantes na sanidade dos vegetais como, por exemplo, podendo atuar no controle de fitopatógenos, protegendo as plantas contra o ataque de herbívoros, tornando-as mais resistentes a nematóides, insetos e outros animais (PEIXOTO NETO et al., 2002, KAUL et al., 2012, NUR, 2016). Esteves et al., (2007), realizaram estudo com a planta *Baccharis dracunculifolia* e observaram que a riqueza de fungos endofíticos foi inversamente proporcional a riqueza de herbívoros na planta, provavelmente devido a produção de toxinas por alguma classe de fungos, o que evidencia a importância dos endófitos na defesa de determinados hospedeiros. Em contrapartida, as plantas fornecem estrutura espacial, nutrientes, fotoassimilados (FAETH; FAGAN, 2002), e inclusive precursores para síntese de metabólitos secundários (CLAY; SCHARDL, 2002). Além disso, por possuir atividade antagônica, estes fungos podem ser também utilizados como agentes no biocontrole (OLIVEIRA et al., 2011), promover o crescimento mais rápido das plantas através de mecanismos, embora não totalmente esclarecidos, como a produção de fitohormônios (PEIXOTO NETO et al., 2002, KAUL et al., 2012), e podem melhorar a resistência das plantas a condições de estresses ambientais (CLAY, 1988; WOLOCK-MADEJ e CLAY, 1991), a doenças (CHEN et al., 1994), maior fixação de nitrogênio (TEIXEIRA et al., 2007), possibilitar o hospedeiro explorar habitats extremos, como regiões quentes e secas, com pouca luz e baixa fertilidade do solo. Por exemplo, analisando a relação entre a riqueza de endófitos de *B. dracunculifolia* e a sazonalidade, Esteves et al., (2007) verificaram uma maior riqueza de fungos associados a planta na estação seca (35 morfotaxons) quando comparado com a estação chuvosa (17 morfotaxons).

Os fungos são considerados também como potenciais produtores de uma grande diversidade de metabólitos primários e secundários de grande importância biotecnológica, sendo uma potencial fonte de novos produtos naturais de interesse e exploração na medicina, agricultura, indústria de alimentos e bebidas, uso farmacêutico (STROBEL; DAYSI, 2003; SOUZA et al., 2004, CHAPLA et al., 2013), como enzimas (BEZERRA et al., 2012; CHANDRA, 2012), agentes anti-tumorais (GONÇALVES et al., 2016), toxinas, antibióticos (AZEVEDO, 1998), pigmentos (DEMAIN, 1992).

Pesquisas avaliando esta grande diversidade de compostos bioativos produzidos por micro-organismos constataram que as linhagens produtoras pertencem principalmente ao Reino Fungi (BRAKHAGE; SCHROECKH, 2010). Esta interação de fungos endofíticos

com as plantas proporciona a produção de enzimas extracelulares por estes fungos que podem ser purificadas e utilizadas em uma ampla gama de processos industriais, como no processamento de alimentos, bebidas, produção de medicamentos, detergentes, amaciamento de carnes, indústria têxtil e de couro (WENZEL et al., 2013). Moura et al. (2015), avaliaram o potencial de fungos endofíticos de folhas de amoreira (*Morus nigra*) na biorremediação de corante têxtil e concluíram que os endófitos testados possuem capacidade de degradar corante têxtil, sugerindo os fungos como uma alternativa para o tratamento destes poluentes.

Além disso, vários produtos naturais obtidos de fungos tem se tornado fármacos inovadores contra uma diversidade de doenças (JIANG; AN, 2000). Wenzel et al. (2013), avaliaram a atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de soja (*Glycine max*) e verificaram que alguns fungos foram eficientes contra pelo menos uma bactéria patogênica ao homem. Assim como, Oliveira et al. (2015), isolaram fungos endofíticos de folhas de *Piper glabratum*, também com o objetivo de avaliar a capacidade dos endófitos na inibição do crescimento de bactérias patogênicas ao homem. Os autores concluíram que estes fungos possuem grande potencial na produção de compostos antimicrobianos.

Enzimas como a L-asparaginase (MURALI, 2011; THEANTANA et al., 2007) vem sendo bastante utilizada no tratamento do câncer e pode ser produzida por diversas espécies de fungos endofíticos (SILVA et al., 2015; KRISHNAPURA et al., 2016; PÁDUA et al., 2018), além do taxol, outro poderoso anticancerígeno, isolado inicialmente do endófito *Taxomyces andreanae*, associado a *Taxus brevifolia* e utilizado no combate a diversos tipos de câncer (STIERLE et al., 1993).

Um fato relevante é que o estudo de micro-organismos endofíticos associados a plantas medicinais é de grande importância como uma alternativa na preservação da biodiversidade vegetal. Peixoto Neto et al. (2004), citam a quase extinção da planta medicinal *Taxus brevifolia*, antes da descoberta do fungo endofítico *Taxomyces andreane*, produtor do Taxol, pois, inicialmente, eram necessários cascas de mais de 1000 árvores, cada uma com 100 anos de idade, para se obter um 1 kg de Taxol. A exploração de substâncias com aplicação medicinal de uma fonte microbiana é considerada mais fácil e mais econômica, levando a um aumento na disponibilidade do produto e consequente redução no custo em mercado, minimizando a necessidade de retirada de plantas raras ou de crescimento lento do ambiente. Além disso, alguns endófitos já foram relatados

produzindo os mesmos compostos naturais dos seus hospedeiros (STIERLE et al., 1993; KHIRALLA et al., 2017).

2.3.2 Fungos endofíticos na produção de enzimas

As enzimas são proteínas responsáveis por catalisar reações químicas, e são essenciais no metabolismo de todos os organismos vivos, desempenhando papel fundamental na degradação de matéria orgânica, infecção do hospedeiro e deterioração de alimentos. Com base nas reações que catalisam, podem ser classificadas em oxidoredutases (catalisam reações de oxidoreduções); transferases (catalisam reações de transferência de grupos de uma molécula a outra); hidrolases (catalisam reações de hidrólise); liases (catalisam reações de quebra de ligações); isomerases (catalisam reações de mudança intramolecular, transformando substrato em um produto isômero) e ligases (catalisam a ligação covalente de moléculas, com simultânea quebra de uma ligação de alta energia) (ORLANDELLI et al., 2012).

São bastante empregadas em diversos processos industriais como, por exemplo, no tratamento de efluentes (CASTRO et al., 2005), na indústria têxtil, de alimentos, bebidas e detergentes (MOREIRA et al., 2002; UENOJO; PASTORE, 2007; LADEIRA et al., 2010), medicamentos (HASAN et al., 2006), papel, couro, combustíveis, tendo como principal fonte de produção os micro-organismos (ZIMMER et al., 2009; ORLANDELLI et al., 2012). Comparadas a enzimas provenientes de plantas ou animais, as de origem microbiana tornam-se mais úteis devido à grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, alto rendimento, facilidade de manipulação genética, fornecimento regular e rápido crescimento de microorganismos com baixo custo na produção (HASAN et al., 2006).

Dentre os micro-organismos, os fungos são relatados como principais produtores de uma grande diversidade de compostos bioativos de interesse econômico, sendo os fungos filamentosos a principal fonte de enzimas industriais devido a sua grande capacidade de produzir proteínas extracelulares (BRAKHAGE; SCHROECKH, 2010, SILVA et al., 2017; RIBEIRO e PAMPHILE, 2018). Para os fungos endofíticos, essa capacidade se deve, possivelmente, as relações metabólicas com seus hospedeiros (CHAPLA et al., 2012). Inclusive, para que haja associação endofítica, os fungos produzem enzimas capazes de facilitar a penetração no tecido vegetal (RIBEIRO e PAMPHILE, 2018).

Em estudo realizado por Robl et al. (2013), os autores avaliaram a capacidade de 110 fungos endofíticos na produção de hemicelulases e outras enzimas relacionadas, e destacaram linhagens pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Alternaria*, *Annulohyphoxylon*, e *Talaromyces* como potenciais produtores de enzimas hidrolíticas a serem utilizados como parte de misturas para decompor a biomassa da cana-de-açúcar em nível industrial para produção de etanol. Diversos outros estudos tem demonstrado a capacidade de síntese de enzimas proteolíticas por fungos associados aos vegetais, por exemplo, endófitos pertencentes aos gêneros *Acremonium* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Phomopsis* sp. *Cylindrocladium* sp., *Chaetomium* sp., já foram relatados como bons produtores de proteases (CUZZI et al., 2011; SILVA et al., 2006; WENZEL et al., 2013).

Cuzzi et al. (2011), avaliaram a capacidade de produzir enzimas extracelulares de 11 espécies de fungos endofíticos de *Baccharis dracunculifolia* e observaram o potencial de produção de lipase, amilase e protease por espécies de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Glomerella* sp. Orlandelli et al. (2015), isolaram 98 fungos endofíticos das folhas de *Piper hispidum* Sw (Jaborandi) e testaram quanto a produção de protease, e observaram que 28 endófitos foram capazes de produzir a enzima em meio de cultura específico. Rodrigues et al. (2015), verificaram a produção de enzimas hidrolíticas pelo endófito *Penicillium* sp. isolado de folhas de *Ricinus communis* e os autores constataram a capacidade do fungo na produção de lipase, enzima capaz de realizar a hidrólise de óleos e gorduras, uma característica importante para um possível emprego na síntese de biodiesel. Um outro estudo realizado por Bezerra et al. (2012), os autores isolaram fungos endofíticos da cactácea *Opuntia ficus-indica* (palma forrageira) e a maioria dos isolados apresentou atividade enzimática, indicando potencial promissor na aplicação de processos biotecnológicos envolvendo a produção de pectinases, celulases, xilanases e proteases.

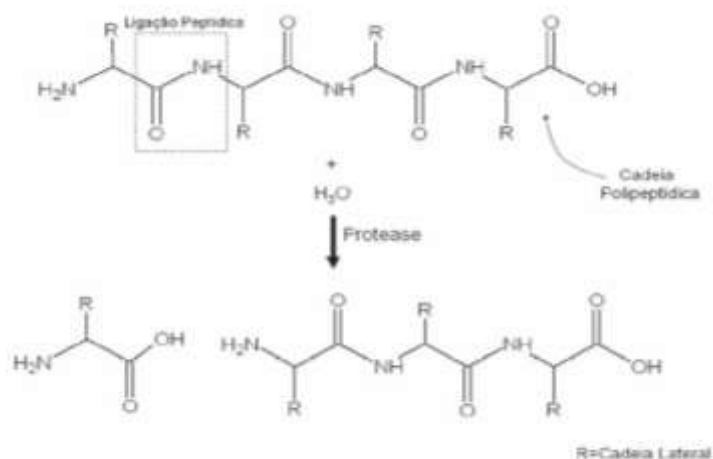
Apesar do grande conhecimento a respeito da capacidade de produção de metabólitos bioativos únicos a partir de fungos, ainda há muito para ser explorado em relação a endófitos (RIBEIRO e PAMPHILE, 2018).

2.3.2.1 Proteases

As proteases (EC 3.4) são um grupo de enzimas pertencentes a classe das hidrolases (Figura 7), e tem como função catalítica hidrolisar as ligações peptídicas das proteínas. Segundo o Comitê de Nomenclatura Enzimática (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NCIUBMB,1992), as proteases pertencem à classe 3

(hidrolases) e subclasse 3.4 (peptídeo-hidrolases ou peptidases) (VERMELHO et al., 2008).

Figura 7. Representação de uma hidrólise protéica catalisada por uma protease



Fonte: Lima et al. (2008)

As proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais e representam cerca de 60% do mercado industrial. O comércio mundial destes biocatalisadores movimenta, por ano, cerca de US\$ 300-600 milhões, sendo 75% representado por enzimas hidrolíticas, das quais dois terços são proteolíticas (SAVITHA et al., 2011). Devido a grande diversidade, alcance específico de ação e capacidade de atividade em uma ampla gama de temperatura e pH têm atraído a atenção de biotecnólogos em todo o mundo (SOUZA et al., 2015). As proteases industriais de origem vegetal como a papaína, bromelina e ficina; e animal (proteases digestivas), não atendem as necessidades do comércio e com isso, as de origem microbiana tem adquirido cada vez mais relevância industrial (VERMELHO et al., 2008). Além de existir uma série de fontes microbianas capazes de produzir esta enzima de forma eficiente (SOUZA et al., 2015).

Apesar de existir o método de fermentação em estado sólido para produção de enzimas a partir de micro-organismos, a fermentação submersa (em estado líquido) é o mais utilizado na produção de enzimas industriais (ORLANDELLI et al., 2012). Este permite a produção de proteases em grandes quantidades num tempo relativamente curto e apresenta outras vantagens como o controle de parâmetros como pH, temperatura, oxigênio e umidade, além de possibilitar a produção em grande escala. As enzimas de origem microbiana são geralmente extracelulares e facilmente produzidas sob este método,

simplificando a produção quando comparadas às proteases de origem animal ou vegetal (ZAMBARE et al., 2011; SANDRI et al., 2015).

Enzimas deste grupo são de grande importância e aplicabilidade biotecnológica, sendo amplamente utilizadas na indústria têxtil, formulação de medicamentos, detergentes, alimentos e bebidas (MOREIRA et al., 2002; GUPTA, 2003; KUMAR, 2005; LADEIRA et al., 2010; ZAMBARE et al., 2011). Na fabricação de detergentes, o uso de enzimas é uma das maiores aplicações da indústria, aumentando a capacidade dos detergentes em remover manchas difíceis, além de tornar ambientalmente seguro (SOUZA et al. 2015). Há muito tempo foi usada a protease obtida de bactérias, mas para purificação desta enzima são necessários métodos de filtração de alto custo para produzir uma preparação enzimática pura, ao contrário da obtida de fungos, que possuem como vantagem a fácil remoção do micélio pelo método de filtração simples, por serem produzidas extracelularmente e diretamente no caldo fermentado (PHADATARE et al., 1993; SAVITHA et al., 2011).

Na indústria farmacêutica são de grande importância na fabricação de medicamentos como pomadas, na preparação de vacinas para tratamento de dermatofitoses, inflamações e desordens cardiovasculares. Na área de cosméticos, a papaína e bromelina são exemplos de proteases utilizadas sobre a pele para realização de alisamento e *peeling* que, através de atividade queratinolítica, são capazes de promover renovação celular (SAWANT; NAGENDRAN, 2014; VIANNA, 2016). Estas duas enzimas proteolíticas são também bastante empregadas para melhorar o valor nutricional de rações, e a papaína é também utilizada na fabricação de meios de cultura e extração de aromas e corantes de plantas (SUMANTHA et al., 2006). Na indústria do couro, auxiliam na remoção de pelos em peles de animais, podendo substituir produtos químicos perigosos e também economizando tempo e promovendo melhor qualidade de couro (VIANNA, 2016). Além disso, possuem uma grande diversidade de aplicações na indústria de alimentos, ao atuar na clarificação de cerveja, sucos e vinho, no amaciamento de carne, processamento do molho e outros produtos de soja, melhoria na qualidade de alimentos ricos em proteínas e principalmente atuando na etapa de coagulação do leite na fabricação de queijo (SAWANT; NAGENDRAN, 2014; SOUZA et al., 2015).

Com base no mecanismo catalítico e pH ótimo para atividade, as proteases podem ser classificadas em alcalinas, neutras ou ácidas. As alcalinas são extensamente utilizadas na indústria de detergentes, já as proteases ácidas, são frequentemente aplicadas na

indústria de alimentos e obtidas principalmente de animais ou fungos. As proteases ácidas de origem fúngica são capazes de substituir a função de três importantes proteases utilizadas no processamento de alimentos, são elas a pepsina, papaína e a renina (IKASARI; MITCHELL, 1996).

2.3.2.2 Proteases na coagulação do leite e fabricação de queijo

O queijo é um alimento produzido através da coagulação do leite e é crescente sua produção no estado de Pernambuco. A região Agreste concentra cerca de 70% da bacia leiteira do estado, o qual já destina aproximadamente 40% (cerca de 1,8 milhão de litros por dia) da produção para fabricação de queijos (IPA, 2009; Jornal do Commercio, 2016).

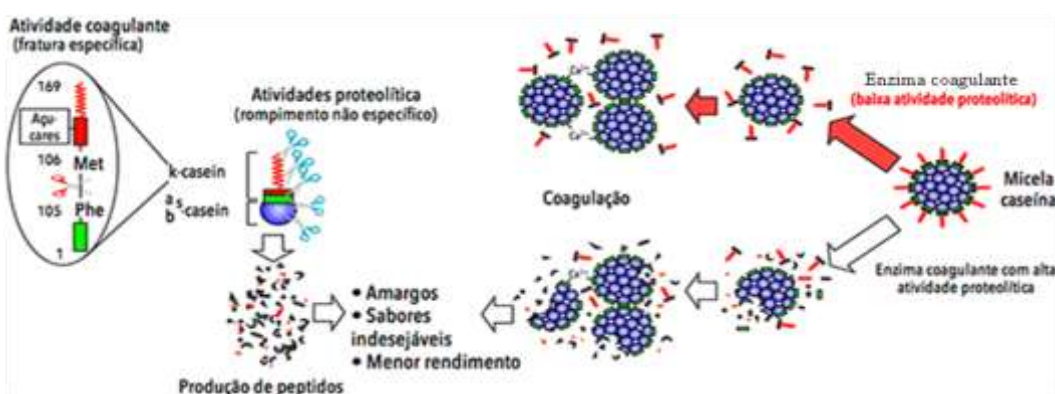
A primeira indicação da produção de queijos surgiu através de pinturas rupestres por volta de 5000 a.C. Essa produção pode ter sido descoberta de forma acidental, através dos nômades que costumavam viajar em dias quentes estocando o leite em sacos feitos de estômago de ruminantes, conseqüentemente, este leite transformava-se em um coágulo mole e a fase líquida (o soro do leite) era provavelmente absorvida pela pele ou perdida por evaporação, concentrando ainda mais o produto. Essa coagulação possivelmente derivou da acidez desencadeada pela atividade de bactérias ou através de enzimas coagulantes presentes nos estômagos animais usados como sacos para transporte. Historicamente, a maioria das preparações enzimáticas para elaboração de queijo foi extraída do estômago de ruminantes, mas enzimas de origem vegetal e microbiana também possuem dados históricos muito antigos (HARBOE et al., 2010).

O leite é formado por uma emulsão de gorduras em água estabilizada por uma dispersão coloidal de proteínas (micelas). As proteínas do leite podem ser divididas em dois grandes grupos: as caseínas e as proteínas do soro. As caseínas são dominantes, representando cerca de 80% das proteínas do leite e estão presentes na forma de micelas de caseína, as quais possuem como principais frações α_1 -, α_2 -, β - e κ -caseínas, (sendo a fração da κ -caseína a única proteína hidrolisada pela renina) e a desestabilização destas micelas é fundamental para que ocorra a formação dos coágulos. Esta coagulação ocorre em duas etapas, a etapa proteolítica em que o componente de estabilização (κ -caseína) é hidrolisado pela enzima para produzir micelas de para- κ -caseína, as quais são sensíveis ao cálcio, o qual desencadeia a agregação das micelas para formar um gel (GUINEE; WILKINSON, 1992). Em contrapartida, as proteínas do soro são um subproduto da

fabricação do queijo e possuem alto valor nutricional sendo amplamente utilizado no meio esportivo como forma de suplemento (ALVES, 2013; LUZ, 2016; SILVA et al., 2017).

Para que ocorra o processo de coagulação, são utilizadas enzimas capazes de realizar essa função, por exemplo, na indústria de alimentos, a renina, ou quimosina, é a principal enzima utilizada na fabricação de queijo, pois esta possui capacidade de clivar a ligação Fenilalanina₁₀₅-Metionina₁₀₆ da k-caseína desestabilizando as micelas de caseína e, conseqüentemente, coagulando o leite (NEVES, 2014; SILVA et al., 2017) (Figura 8). Proteases coagulantes como a pepsina e a renina podem ser obtidas de plantas, animais ou micro-organismos, sendo a renina tradicionalmente obtida a partir do 4º estômago de bezerros em lactação. Bezerros em fase de lactação apresentam uma renina com cerca de 88-94% de quimosina e 6-12% de pepsina, enquanto a de bovinos adultos apresenta 80-90% de pepsina e 10-20% de quimosina (HARBOE et al., 2010; ALVES, 2013). No entanto, devido ao alto custo, escassez, aumento na expansão da produção mundial de queijos, além de questões éticas que envolvem a obtenção do coalho a partir de animais, tem-se intensificado as pesquisas para obtenção de fontes alternativas para produção de enzimas coagulantes e que não comprometam a qualidade do produto. Para isso, estas enzimas alternativas devem apresentar uma alta atividade coagulante e baixa atividade proteolítica, do contrário, poderiam prejudicar o rendimento do queijo, aroma e sabor (MERHEB-DINI et al., 2010; ALECRIM et al., 2015; SILVA et al., 2017).

Figura 8. Representação da atividade de uma enzima coagulante nas micelas de caseína do leite



Fonte: Adaptada de Lacto-LAB (2018)

Diversas pesquisas mostram proteases de origem microbiana sendo estudadas como alternativa para substituição do coalho animal. Fontes microbianas como os fungos despertam maior interesse devido a grande diversidade bioquímica e susceptibilidade a

manipulação genética (ALECRIM et al., 2015). Vishwanatha et al. (2010), selecionaram *Aspergillus oryzae* dentre 16 cepas fúngicas como produtor de enzima com maior atividade coagulante, apresentando uma alta atividade específica, baixa atividade proteolítica, menor termoestabilidade em comparação aos coalhos microbianos existentes, tornando esta uma enzima ideal para utilização nas indústrias de fabricação de queijos. Alecrim et al. (2017), avaliaram a capacidade de produção de protease coagulante do leite e consequente produção de aflatoxina por *Aspergillus flavo furcatis* em fermentação submersa e em estado sólido, concluindo que esta apresenta capacidade de produção da enzima coagulante em ambos meios de fermentação utilizados e a não produção de toxina, indicando a espécie como potencial fonte de enzima coagulante na fabricação de queijo. Martim et al. (2017), investigaram a produção de enzimas coagulantes do leite por seis espécies de cogumelos comestíveis e relataram *Pleurotus albidus* como a espécie que apresentou o maior valor coagulante, além de indicar o perfil enzimático e aplicação na produção de queijo. Em estudo realizado por Santhalin Shellomith e Preetha (2018), os autores avaliaram a produção de enzima coagulante do leite pelo fungo *Penicillium camemberti* em diferentes substratos, indicando este como bom produtor.

Em março de 2017, foi publicada uma patente referente ao processo de obtenção, produto e uso de uma protease coagulante obtida do fungo *Thermomucor indicae-seudaticae*, na fabricação de queijos (SILVA et al., 2017). Em outro estudo, duas espécies de Mucorales, *Mucor pusillus* e *Mucor miehei*, foram relatadas produzindo aspartato proteases (ácida), enzimas com intensa atividade coagulante do leite e baixa atividade proteolítica, podendo ser usadas como substituta da renina na indústria de laticínios (ANDRADE et al., 2002). Atualmente, enzimas coagulantes do leite obtidas a partir das espécies de fungos *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusilus*, *Aspergillus oryzae* já são utilizadas comercialmente (ALECRIM et al., 2015).

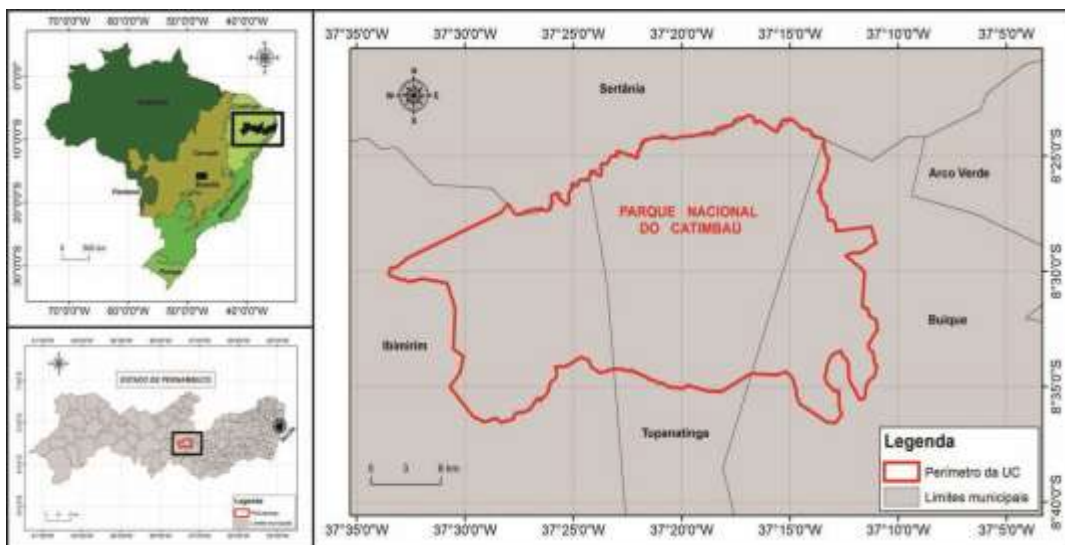
Com isso, este estudo teve como objetivos investigar a diversidade de fungos endofíticos das bromélias *D. limae* e *T. catimbauensis* crescendo em áreas de Caatinga no Parque Nacional do Vale do Catimbau e avaliar a capacidade dos fungos na produção de enzimas proteolíticas com atividade coagulante do leite.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE COLETA

As coletas do material vegetal foram realizadas no Parque Nacional do Catimbau (8°36'35" S, 37°14'40" W) (Figura 9), o qual possui uma área com aproximadamente 62.300ha e está inserido no sertão Central entre os municípios de Ibimirim, Tupanatinga e Buíque, estado de Pernambuco (DELGADO JÚNIOR et al., 2014). O Parque possui uma vegetação bastante diversa, sendo possível caracterizar pelo menos 4 fitofisionomias: campos rupestres, caatinga arbustiva, vegetação florestal perenifólia e a vegetação arbustiva perenifólia (RODAL et al., 1998). As coletas foram autorizadas pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) / Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio); número de permissão: 48641-1 / código de autenticação, emitido em 10 de abril de 2015.

Figura 9. Mapa de localização do Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil.



Fonte: Melo 2012

3.2 MATERIAL VEGETAL

Foram coletadas aleatoriamente amostras de folhas de 15 indivíduos da espécie vegetal *Dyckia limae* e 15 da espécie *Tillandsia catimbauensis*, totalizando 30 amostras. As coletas foram realizadas no período de maio de 2015. Os espécimes vegetais de *T. catimbauensis* encontravam-se distribuídos nos paredões rochosos do PARNA e os de *D.*

limae, no solo. O material vegetal foi acondicionado em sacos plásticos, transportados para o laboratório e processado em até 48 horas.

3.2.1 Isolamento de fungos endofíticos

O material botânico coletado foi processado como descrito por Araújo et al. (2002). Foram cortados cerca de 10 cm da folha de cada indivíduo, lavadas em água corrente e, em seguida, para assepsia, o material vegetal foi cortado em segmentos de cerca de 1cm² e imerso em etanol 70% durante 60s, hipoclorito de sódio (2-2,5%) por 180s, etanol 70% durante 30s, e então lavados três vezes em água destilada esterilizada.

Depois do processamento, 45 fragmentos de cada indivíduo foram inoculados em placas de Petri contendo o meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) suplementado com cloranfenicol (100 mg/L) e tetraciclina (50 mg/L) para restringir o crescimento bacteriano. Os fragmentos de cada indivíduo foram distribuídos em 4 placas, num total de 7 fragmentos por placa e 420 por espécie vegetal. Estas foram incubadas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por até 30 dias. O crescimento fúngico foi observado diariamente e qualquer colônia de fungo encontrada foi isolada, purificada e mantida em BDA para posterior identificação. Para verificar a eficácia da desinfecção da superfície, 1 mL de água da última lavagem foi inoculado em placas de Petri contendo o mesmo meio, e incubadas sob as mesmas condições.

3.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, TAXA DE COLONIZAÇÃO E FREQUÊNCIA RELATIVA

A identificação morfológica foi realizada pela equipe da Micoteca URM604 do Departamento de Micologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), observando-se características macroscópicas e microscópicas, utilizando metodologia e literatura específica (Morton e Smith, 1963; Ellis, 1971; Ellis, 1976; Sutton, 1980; Barnett e Hunter, 1987; Hanlin 1990; Samson e Frisvad, 2004; Domsch et al., 2007; Houbraken et al., 2011), através do cultivo dos fungos em meio de cultura específico para análises das características como cor, textura, diâmetro das colônias e através de lâminas confeccionadas com ácido láctico para análises microscópicas de estruturas como hifas, conídios, conidióforos, a partir de representantes de gêneros fúngicos considerados novidades taxonômicas.

Para todos os representantes dos gêneros *Penicillium* e *Talaromyces*, foi feita uma suspensão de esporos e 1µL da suspensão foi inoculada em três pontos em cada placa de Petri contendo os meios de cultura Czapek Agar Extract (CYA), Ágar Extrato de Malte (MEA), Ágar de Aveia (OA), Dicloran Glicerol (DG18), Extrato de Sacarose em Ágar Czapek (CYAS), Extrato de Levedura em Ágar Sacarose (YES) e Ágar de Sacarose em Creatina (CREA) (Houbraken et al., 2011). Em seguida, as placas foram incubadas a 15 e a 25°C durante 7 dias, e apenas as placas contendo o CYA e o MEA foram também incubadas a 30 e 37°C durante 7 dias. Para as descrições macro-morfológicas utilizou-se apenas o crescimento a 25°C. Para os representantes de todos os outros gêneros, foi feito inóculo central em placas de Petri contendo meio de cultura MEA (Ágar extrato de malte) e incubadas por 7 dias em BOD a 25°C.

A taxa de colonização (TC%) foi calculada pela razão entre o número de fragmentos com crescimento fúngico (Nf) e o número total de fragmentos (Nt) ($FI = Nf/Nt \times 100$) (Araújo et al., 2002) e a Frequência Relativa (FR) de isolamento calculada como o número de isolados de uma espécie dividido pelo total do número de isolados (Photita et al., 2001).

3.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

3.4.1 Extração de DNA, amplificação de fragmentos do DNA e sequenciamento

A biomassa dos endófitos foi obtida a partir de culturas cultivadas em BDA e/ou MEA contidos em placa de Petri, mantidos a 28°C por até sete dias de um representante de cada gênero fúngico isolado. Para extração do DNA genômico foi utilizado o Kit de purificação de DNA genômico da Promega (Wizard Genomic DNA Purification Kit) conforme metodologia proposta pelo fabricante. Para amplificação da região ITS (espaçador interno transcrito do rDNA) foram utilizados os iniciadores ITS1 e ITS4 (White et al., 1990). Para os fungos identificados como pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Talaromyces*, além da região ITS, foram amplificadas as regiões parciais dos genes β -tubulina, calmodulina e RPB2. Os parâmetros para amplificação e as concentrações dos reagentes (dNTPs, cloreto de magnésio, Taq DNA polimerase e tampão de reação) foram realizadas de acordo com Bezerra et al. (2017b). Controles negativos, contendo todos os componentes exceto DNA, foram utilizados em cada procedimento para detectar possíveis

contaminações. O produto das extrações de DNA e das reações de PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1% corados com GelRed (Biotium), e visualizados sob luz UV. Os produtos da amplificação foram purificados utilizando as enzimas exonuclease I e fosfatase alcalina contidas no kit Illustra ExoProStar 1-Step (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante, e posteriormente encaminhados para sequenciamento na Plataforma Multiusuária de Sequenciamento e Expressão Gênica do Centro de Biociências da UFPE.

3.4.2 Alinhamento das sequências e análise filogenética

Os cromatogramas do sequenciamento foram analisados para a determinação das sequências consenso utilizando o programa MEGA v. 7 (Kumar et al. 2016). Após a edição, todas as sequências foram utilizadas para busca das mais similares depositadas no GenBank, utilizando a ferramenta BLASTn. As sequências obtidas foram então alinhadas em conjunto com as recuperadas da base de dados utilizando a ferramenta online MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/>) (Katoh & Standley 2013) e corrigidas manualmente utilizando o programa MEGA v. 7.

Na construção da árvore filogenética (Figura 11) por Inferência Bayesiana (IB) foi empregado o método da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC). O programa Mr. MODELTEST 2.3 (Posada e Buckley, 2004) foi utilizado para selecionar o modelo de substituição de nucleotídeos para análise de BI. Os valores de verossimilhança foram calculados e o modelo foi selecionado de acordo com Akaike Information Criterion (AIC). A análise de IB foi realizada através do programa Mr. Bayes v.3.2.1 (Ronquist e Huelsenbeck, 2012) na plataforma XSEDE do CIPRES science gateway (<http://www.phylo.org/>). As quatro cadeias MCMC foram conduzidas simultaneamente, iniciando as árvores aleatoriamente até 10.000.000 de gerações. As árvores foram amostradas a cada 1.000 gerações, resultando em 10.000 árvores. As primeiras 2.500 árvores foram descartadas da análise. Os valores de probabilidade posterior (Rannala e Yang, 1996) foram determinados da árvore consenso através das 7.500 árvores remanescentes. A árvore foi visualizada no software FigTree (Rambaut, 2009) e exportada para edição. Culturas representativas de parte dos fungos endofíticos isolados e identificados foram depositadas no acervo da Coleção de Culturas – Micoteca URM da UFPE.

3.5 SELEÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS QUANTO A PRODUÇÃO DE PROTEASE

Doze isolados de fungos endofíticos pertencentes aos gêneros *Penicillium* (9) e *Talaromyces* (3) obtidos das folhas de *D. limae* e *T. catimbauensis* (Tabela 1), foram testados quanto a produção de protease. Estes gêneros foram selecionados com base na frequência de isolamento e por já terem sido relatados em diversos outros estudos como bons produtores de enzimas, inclusive proteases com ação coagulante do leite (CUNHA et al., 2016; OZTURKOGLU-BUDAK et al., 2016). Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio Ágar extrato de malte (MEA) por sete dias a 25°C. Para a produção da protease, foi utilizado o método de fermentação submersa (FS) a partir da suspensão de esporos de cada fungo em tubos de ensaio contendo Tween 10% (10 mL por tubo), do qual 300 µL foram colocados em câmara de Neubauer para contagem de esporos e obtenção de uma concentração de, no mínimo, 10⁶ esporos/mL. Em seguida, foi retirado 1mL de cada suspensão de esporos e inoculado em frascos de Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de meio de cultura MS-2 (Meio farinha de soja), modificado de Porto, Campos-Takaki e Lima-Filho (1996), contendo farinha de soja a 4,0% (p/v), K₂HPO₄ 0,435% (p/v), NH₄Cl 0,1% (p/v), MgSO₄ 0,06% e 0,1 mL de solução mineral (100 mg de FeSO₄, MnCl₂, ZnSO₄ e CaCl₂ em 10 mL de água destilada com pH 7,0). Os frascos de Erlenmeyer contendo a suspensão de esporos em meio de cultura, foram incubados em agitador orbital por 96 horas a 120 rpm sob temperatura de 28°C. Após as 96 horas, foram filtrados com papel filtro Whatman nº.1 e o filtrado obtido, considerado extrato bruto enzimático foi estocado e mantido a -20°C até a sua utilização para as determinações analíticas.

Tabela 1. Fungos endofíticos de Bromeliaceae caracterizados quanto à produção de protease

Nº do isolado	Fungo endofítico	Espécie vegetal
D76.341	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Dyckia limae</i>
URM 7965	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Dyckia limae</i>
D61.373	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Dyckia limae</i>
D74.345	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Dyckia limae</i>
D56.375	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Dyckia limae</i>
T184	<i>P. echinulonalgiovense</i>	<i>Tillandsia catimbauensis</i>

T3.155	<i>Penicillium</i> sp1	<i>Tillandsia catimbauensis</i>
T43.186	<i>Penicillium</i> sp2	<i>Tillandsia catimbauensis</i>
URM 7966	<i>P. decaturense</i>	<i>Tillandsia catimbauensis</i>
T95.126	<i>Talaromyces amestolkiae</i>	<i>Tillandsia catimbauensis</i>
T106.150	<i>T. pinophilus</i>	<i>Tillandsia catimbauensis</i>
T158.135	<i>T. diversus</i>	<i>Tillandsia catimbauensis</i>

3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E PROTEÍNA TOTAL

Dos extratos brutos enzimáticos obtidos com os 12 isolados, foram quantificadas a atividade proteolítica e a proteína total. O ensaio proteolítico foi realizado utilizando a azocaseína como substrato para quantificar a protease de acordo com o método descrito por Alencar et al. (2003). A atividade proteolítica foi realizada através da mistura reacional contendo 100µL de azocaseína (1,0% p/v em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6) e 60µL do extrato enzimático, e incubados por 1 hora no escuro em temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ\text{C}$). Posteriormente, a reação foi interrompida pela adição de 480µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% p/v e centrifugada por 5 minutos a 8000 rpm sob temperatura de 4°C . Em seguida, 320µL do sobrenadante foram pipetados e adicionados a 560µL de hidróxido de sódio (NaOH) 1M, e realizada a leitura em espectrofotômetro na absorbância a 440 nm. As dosagens enzimáticas foram expressas em U mL^{-1} . Todos os testes foram realizados em triplicata e a média dos valores de densidade óptica foi utilizada para compor os resultados.

Para determinar as proteínas totais das amostras, foi realizado ensaio seguindo o método de Bradford (1976), utilizando como padrão a soro albumina bovina em diferentes concentrações. Em seguida, o ensaio de proteína total foi realizado através da mistura de 50µL da amostra com 1500µL do reagente de Bradford, em triplicata, e a leitura feita em espectrofotômetro a 595nm. As dosagens de proteína foram expressas em mg/mL^{-1} .

A razão (R) entre atividade coagulante do leite (MCA) e atividade proteolítica (AP) foi determinada pela fórmula $R = \text{MCA (U/mL)} / \text{PA (U/mL)}$.

3.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE COAGULANTE DO LEITE

Atividade coagulante do leite (ACL) da protease contida em cada extrato bruto enzimático obtido foi determinada seguindo o procedimento descrito pela Federação Internacional de Laticínios (IDF), com adaptações. O leite de vaca (Camponesa®)

desnatado em pó foi dissolvido a 10% em 100 mL de uma solução de CaCl_2 0,01M (pH 6,5). Em frascos de vidro (adaptado para uma melhor visualização da formação dos primeiros coágulos do leite), 5 mL da solução contendo leite desnatado na presença de CaCl_2 foi pré-aquecida em banho-maria em temperatura de 35°C durante 10 min. Após esse tempo, o ensaio de coagulação foi realizado pela adição de 60 μL do extrato bruto enzimático aos 5mL deste substrato. Todas as amostras foram preparadas em triplicata. O ensaio branco foi preparado contendo apenas a solução de leite na presença de CaCl_2 .

Exatamente após a adição da solução de leite com CaCl_2 ao extrato bruto enzimático, foi iniciada a contagem do tempo de formação dos primeiros coágulos. A atividade de coagulação foi expressa em International Milk-Clotting Units (IMCU)/mL (IDF, 1992), através da fórmula $400 \times t^{-1}$, sendo representado pela quantidade de enzima que coagula o leite em 1 minuto, definida por conter 400 unidades, e o “t” é o tempo necessário para formação dos primeiros coágulos na solução de leite.

3.8 EFEITO DO pH NA ATIVIDADE COAGULANTE E ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

Para determinação do pH ótimo da atividade coagulante do leite, foi realizado o mesmo procedimento descrito no item 3.7 com a utilização de diferentes pHs utilizando as soluções tampão acetato de sódio (pH 5,5 e 6,0), Tris-HCl (pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0) e glicina-NaOH (pH 8,0; 8,5 e 9,0) a 0,2 M, a temperatura de 35°C, na proporção de 1:1. Assim como, para os testes de efeito do pH na atividade proteolítica, foram realizados conforme descrito no item 3.6.

3.9 EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE COAGULANTE E ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

Para seleção da temperatura ótima, o ensaio de coagulação foi realizado através da incubação das amostras contendo o extrato enzimático na solução de leite e CaCl_2 no tampão glicina-NaOH com os melhores pHs (8,0 e 8,5), por 10 minutos em diferentes temperaturas que variaram de 30 a 95°C, com intervalo de 5°C. A temperatura ótima da atividade proteolítica também foi realizada através da incubação da solução nas mesmas

temperaturas citadas anteriormente, e seguindo os mesmos procedimentos realizados no item 3.7, com tampão glicina-NaOH utilizando os pHs definidos como ótimos (8,0 e 8,5).

3.10 ESTABILIDADE DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA AO pH

Para os testes de estabilidade enzimática ao pH na atividade proteolítica, o ensaio foi realizado através da mistura do extrato bruto enzimático com as diferentes soluções tampão acetato de sódio (pH 5,5 e 6,0), Tris-HCl (pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0) e glicina-NaOH (pH 8,0; 8,5 e 9,0) a 0,2 M, proporção de 1:1 e submetidos a temperatura de 40°C por um total de 180 minutos, onde alíquotas de 60µL foram retiradas nos tempos de 0, 60, 120 e 180 minutos e submetidos aos testes de atividade proteolítica descritos no item 3.7.

3.11 ESTABILIDADE DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA A TEMPERATURA

Para os testes de estabilidade da enzima a temperatura, o extrato bruto enzimático foi incubado em temperaturas que variaram de 35 a 80°C, com intervalo de 5°C. De cada temperatura testada, nos tempos de 0, 60, 120 e 180 minutos, foram retiradas alíquotas de 60µL e adicionadas a 100 µL de azocaseína (tampão glicina-NaOH, pH 8,0), mantidas em temperatura ambiente por 1h no escuro e, em seguida, realizado o teste de atividade proteolítica como descrito no item 3.7.

Posteriormente, as atividades residuais de coagulação do leite e atividade proteolítica foram determinadas sob condições ótimas de pH e temperatura.

3.12 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CaCl_2 NA ATIVIDADE COAGULANTE DO LEITE

Para determinação do efeito da concentração de CaCl_2 foi seguida metodologia proposta por Merheb-Dini et al. (2010). Foi realizado o mesmo procedimento descrito no item 3.8 para análise da atividade coagulante do leite, entretanto, utilizando concentrações crescentes da solução de cloreto de cálcio (0,001; 0,005; 0,01; 0,015 e 0,020 M). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão (DP).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

A partir do terceiro dia de incubação dos fragmentos das bromélias em meio de cultura BDA, foram obtidos os primeiros isolados (Figura 10). Um total de 298 fungos endofíticos foi isolado. Dos 420 fragmentos de *Dyckia limae*, 116 foram colonizados e 114 fungos isolados, resultando em uma taxa de colonização de 27,61%, pertencentes a 19 gêneros e 11 isolados identificados a nível de classe. Em *Tillandsia catimbauensis*, foram colonizados 163 dos 420 fragmentos e 184 endófitos isolados, resultando em uma taxa de colonização de 38,80%, pertencentes a 21 gêneros e 14 isolados identificados a nível de classe (Tabela 2). Alguns endófitos isolados das duas espécies vegetais não cresceram em meio de cultura artificial após a retirada destes do fragmento. São poucos os estudos realizados com endófitos de bromélias no Brasil e nenhum deles verificou esta associação com bromélias da Caatinga. Em estudo conduzido por Landell et al. (2006), os autores realizaram o isolamento de leveduras endofíticas de folhas de 5 espécies de bromélias de área de Mata Atlântica no Rio Grande do Sul, incluindo duas espécies do gênero *Tillandsia*, e obtiveram um total de 138 linhagens pertencentes a 40 espécies.

Figura 10. Colonização dos fragmentos das bromélias por fungos endofíticos após 3 dias de incubação em BDA. A - *Dyckia limae*. B - *Tillandsia catimbauensis*.

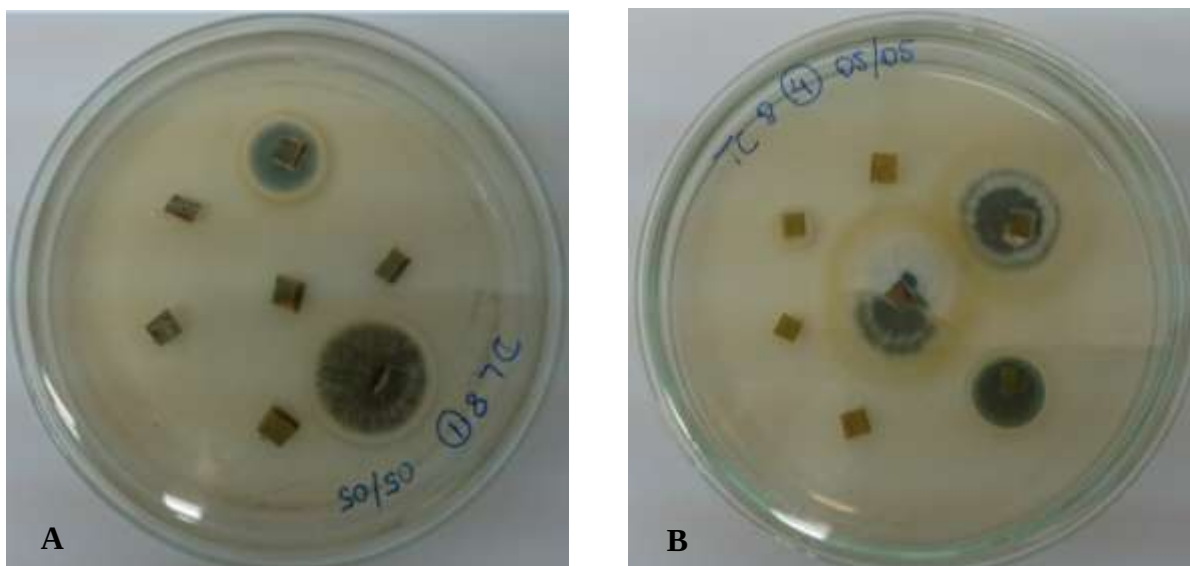


Tabela 2. Frequência absoluta e relativa de fungos endofíticos de *Dyckia limae* e *Tillandsia catimbauensis*

<i>Dyckia limae</i>			<i>Tillandsia catimbauensis</i>		
Gênero	Frequência	Frequência relativa (Fr)	Gênero	Frequência	Frequência relativa (Fr)
<i>Acrocalymma</i> sp.	1	0,02	<i>Cladophialophora</i> sp.	1	0,007
<i>Antracocystis</i> sp.	1	0,02	<i>Cladosporium</i> sp.	1	0,007
<i>Arcopilus</i> sp.	5	0,10	<i>Colletotrichum</i> sp.	7	0,05
<i>Aspergillus</i> sp.	6	0,12	<i>Diaporthe</i> sp.	5	0,036
<i>Aureobasidium</i> sp.	1	0,02	<i>Dothideomycetes</i>	12	0,08
<i>Curvularia</i> sp.	5	0,10	<i>Exophiala</i> sp.	3	0,021
<i>Dothideomycetes</i>	11	0,22	<i>Hypoxyton</i> sp.	1	0,007
<i>Exophiala</i> sp.	1	0,02	<i>Microsphaeropsis</i> sp.	3	0,02
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	1	0,02	<i>Neurospora</i> sp.	2	0,01
<i>Nigrospora</i> sp.	1	0,02	<i>Nigrospora</i> sp.	4	0,028
<i>Paraconiothyrium</i> sp.	1	0,02	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	5	0,036
<i>Penicillium</i> sp.	4	0,08	<i>Penicillium</i> sp.	38	0,16
<i>Phialemoniopsis</i> sp.	1	0,02	<i>Phoma</i> sp.	1	0,007
<i>Pithomyces</i> sp.	1	0,02	<i>Preussia</i> sp.	1	0,007
<i>Pseudozyma</i> sp.	1	0,02	<i>Sarocladium</i> sp.	9	0,065
<i>Saitozyma</i> sp.	1	0,02	<i>Sordariomycetes</i>	2	0,01
<i>Sterigmatomyces</i> sp.	1	0,02	<i>Spegazzinia</i> sp.	1	0,007
<i>Syncephalastrum</i> sp.	2	0,04	<i>Talaromyces</i> sp.	35	0,26
<i>Talaromyces</i> sp.	3	0,06	<i>Tremella</i> sp.	2	0,01
<i>Trichoderma</i> sp.	1	0,02	<i>Trichoderma</i> sp.	1	0,007
			<i>Umbelopsis</i> sp.	8	0,05
			<i>Xylaria</i> sp.	11	0,07
TOTAL	48			153	

*Gêneros em comum em **negrito**

A riqueza de gêneros isolados mostrou-se semelhante nas duas plantas estudadas, no entanto, houve diferença na diversidade dos mesmos, apresentando apenas 5 gêneros e 1 ordem em comum (Tabela 2). Em *T. catimbauensis*, *Penicillium* foi o gênero mais frequente, seguido de *Talaromyces*. Em estudo realizado por Pádua et al. (2018), os autores isolaram um total de 187 fungos endofíticos de *Myracrodruon urundeuva*, sendo 35 destes obtidos a partir de 336 fragmentos de folhas coletadas na Caatinga e 152 endófitos a partir de 336 fragmentos de folhas coletadas da planta em Brejo de altitude, resultando numa taxa de colonização dos fragmentos de 10,41% e 39,58%, respectivamente. Gautam et al. (2012), verificaram a associação de fungos endofíticos com diferentes partes da planta

Cannabis sativa, os autores avaliaram um total de 281 fragmentos da planta, incluindo folhas, caules e pecíolos, e observaram que 212 fragmentos foram colonizados, resultando assim numa taxa de colonização de 77,65%. A maior taxa foi observada no caule (84,94%), seguida das folhas (82,41%) e *Penicillium* foi o segundo gênero mais frequente. Outro estudo realizado na Holanda por Kusari e t al. (2012), teve como objetivo avaliar a diversidade de fungos endofíticos de *C. sativa* e uma espécie pertencente ao gênero *Penicillium* foi o isolado mais frequente. Diversos outros estudos relatam espécies de *Penicillium* em associação endofítica com diferentes espécies vegetais como *Salvadora persica* e *S. oleoides* (KOREJO et al., 2014), *Opuntia fícus indica* (FREIRE et al., 2015), *Bauhinia forficata* (BEZERRA et al., 2015), *Myracrodruon urundeuva* (PÁDUA et al., 2018), *Catharanthus roseus* (ARAÚJO et al., 2018). Representantes deste gênero ocorrem em uma ampla variedade de substratos, estando entre os fungos mais bem distribuídos no mundo (Kirichuk et al., 2017).

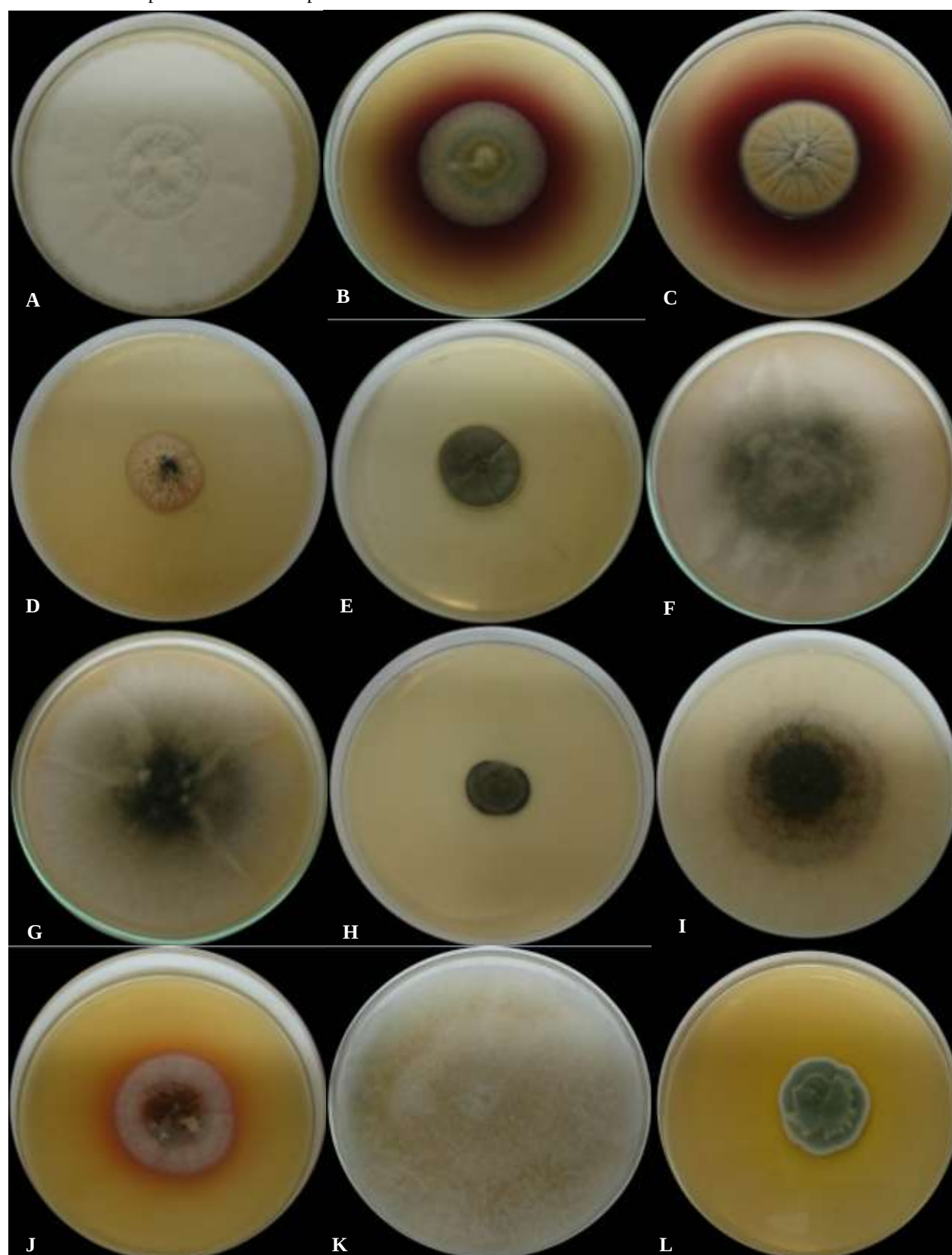
Em associação a bromélia *D. limae*, espécies pertencentes a classe Dothideomycetes foram as mais frequentes (11 isolados), seguido do gênero *Aspergillus* (6). Na associação com os vegetais, diversos fatores influenciam a biodiversidade dos fungos endofíticos. Dentre estes fatores, destacam-se a idade da planta, as condições fisiológicas do hospedeiro, condições ambientais, o tecido ou órgão vegetal utilizado para isolamento, o tempo entre a coleta do material vegetal e o início do isolamento, tamanho dos fragmentos, condições de cultivo, metodologia utilizada e até mesmo o meio de cultura (AZEVEDO, 1998; RIBEIRO e PAMPHILE, 2018).

No presente estudo, apenas 1,07% de todos os gêneros isolados das duas plantas são representantes de leveduras, pertencentes aos gêneros *Pseudozyma* e *Saitozyma*. Espécies de *Pseudozyma* já foram isolados como endófitos de *Ananas comosus* (abacaxi), uma espécie de bromélia, por Tristão et al. (2012). PITTEK et al. (2017), isolaram espécies pertencentes ao gênero *Pseudozyma* do filoplano e tanques de água de duas espécies de bromélias que ocorrem no Brasil (*Canistrum improcerum* e *Vriesea minarum*). Não há registros de espécies de *Saitozyma* em associação endofítica com bromélias. Espécies de endófitos mais frequentemente isoladas são, em sua maioria, pertencentes ao Filo Ascomycota (ARNOLD et al., 2007), o que se assemelha aos resultados obtidos neste estudo, onde o Filo foi representado por aproximadamente 79,31% dos isolados.

4.2 CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA

Todos os isolados de fungos endofíticos foram agrupados em morfotipos de acordo com as características morfológicas do anverso e reverso da colônia, tais como, aspectos da borda, cor, textura e produção de exsudatos. As culturas representativas de alguns dos gêneros fúngicos isolados apresentaram, após 7 dias de crescimento em meio de cultura MEA a 25°C, as seguintes características macroscópicas (Figura 11):

Figura 11. Características macroscópicas de A – *Neopestalotiopsis* B e C – *Arcopilus* sp. D – *Aureobasidium* sp. E – *Cladosporium* sp. F e G – *Curvularia* sp. H – *Dothideomycetes* sp. I – *Nigrospora* sp. J – *Talaromyces* sp. K – *Trichoderma* sp. L – *Penicillium* sp.



4.3 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Um total de 179 sequências da região ITS dos endófitos foi utilizado para compor as análises filogenéticas. Para confirmação dos dados obtidos através das pesquisas no BLASTn, a construção da árvore filogenética mostrou a presença de 29 gêneros de fungos endofíticos nas duas plantas, e a partir dos 298 endófitos isolados, o gênero *Penicillium* foi o mais frequente. Os gêneros mais frequentes e comuns as duas plantas normalmente estão bem representados entre os isolados endofíticos em diversos estudos (FERREIRA et al., 2015; FREIRE et al., 2015; PÁDUA et al., 2018).

Os resultados obtidos da reconstrução filogenética demonstram que estes fungos encontram-se distribuídos nos filos Ascomycota (79,31%), Basidiomycota (13,79%) e Mucoromycota (6,89). Correia et al. (2018), estudando fungos endofíticos de *Begonia* spp. da Mata Atlântica, também isolaram endófitos representantes dos filos Ascomycota (93,5% do total de 426 isolados), Basidiomycota (4,3%) e Mucoromycota (2,2%), em proporções aproximadas as encontradas neste estudo. Nandhini et al. (2018), estudando fungos endofíticos de folhas, ramos e raízes de *Pennisetum glaucum* isolaram 202 endófitos e observaram que todos pertencem ao filo Ascomycota. Massimo et al. (2015), estudaram plantas de ambientes secos no Arizona (EUA) e recuperaram um total de 457 fungos endofíticos a partir de 22.656 fragmentos de plantas, e *Preussia* sp. (Ascomycota) foi o gênero mais frequente. Estes autores afirmam que os endófitos presentes em ambientes desérticos apresentam uma elevada riqueza e são filogeneticamente diversos. Em comparação aos resultados desses autores, o presente estudo mostra também, a grande diversidade de endófitos em ambientes secos.

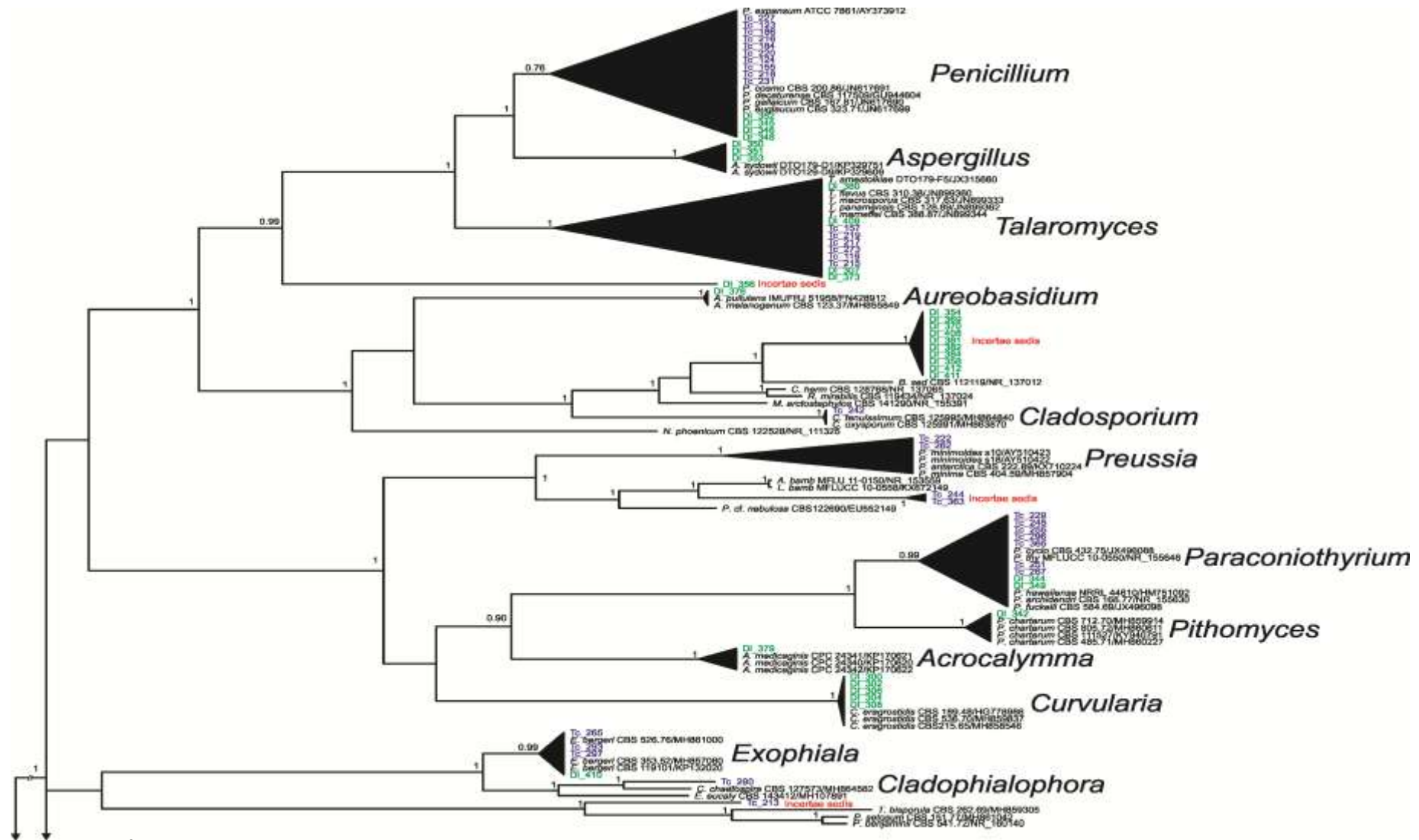


Figura 12. Árvore obtida por Inferência Bayesiana (IB) construída usando sequências de ITS rDNA de 276 fungos, sendo 179 fungos endofíticos obtidos nesse estudo e distribuídos nos filos Ascomycota, Basidiomycota e Mucoromycota. Endófitos isolados da bromélia *Tillandsia catimbauensis* (Tc) estão em azul e de *Dyckia limae* (DI) estão em verde. Valores de probabilidade posterior da IB estão indicados acima dos nós. Sequências de *Glomus macrocarpum* foram utilizadas como grupo externo.

Figura 12. Árvore obtida por Inferência Bayesiana (IB) construída usando sequências de ITS rDNA de 276 fungos, sendo 179 fungos endofíticos obtidos nesse estudo e distribuídos nos filos Ascomycota, Basidiomycota e Mucoromycota. Endófitos isolados da bromélia *Tillandsia catimbauensis* (Tc) estão em azul e de *Dyckia limae* (DI) estão em verde. Valores de probabilidade posterior da IB estão indicados acima dos nós. Sequências de *Glomus macrocarpum* foram utilizadas como grupo externo.

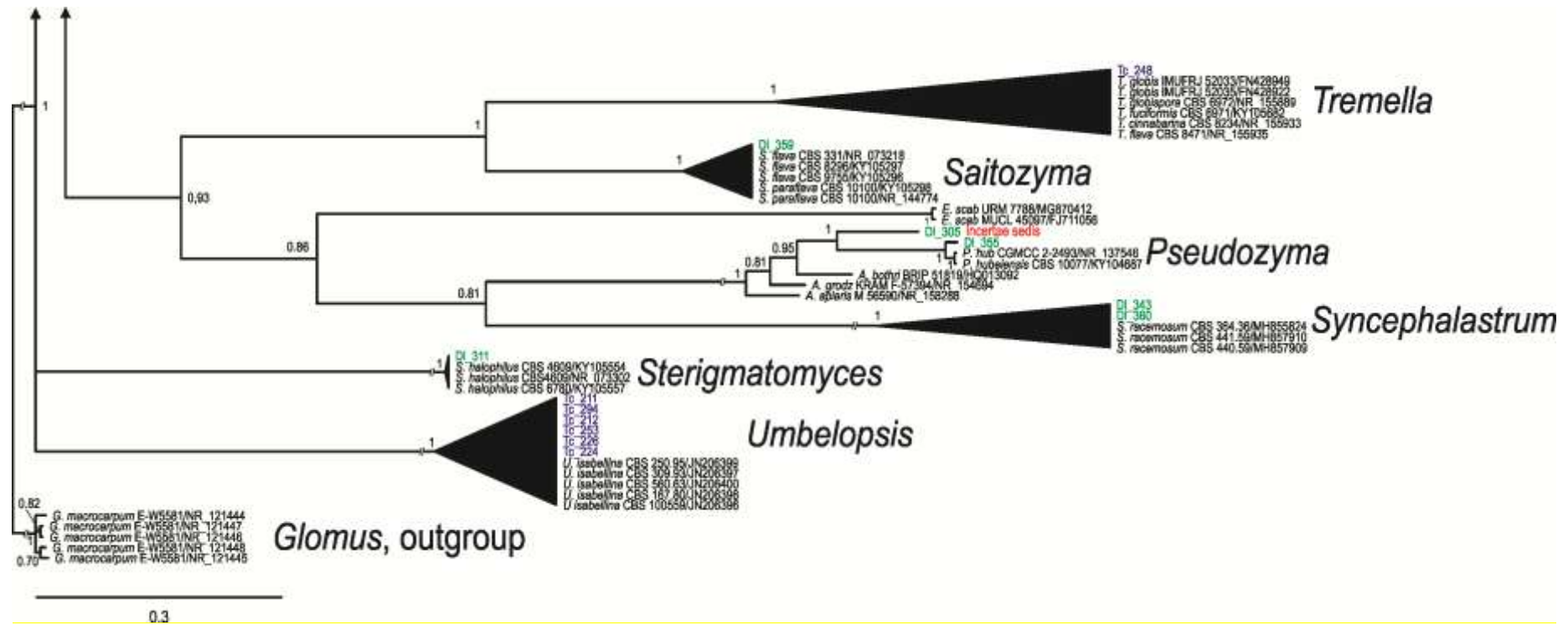


Figura 12. Árvore obtida por Inferência Bayesiana (IB) construída usando sequências de ITS rDNA de 276 fungos, sendo 179 fungos endofíticos obtidos nesse estudo e distribuídos nos filos Ascomycota, Basidiomycota e Mucoromycota. Endófitos isolados da bromélia *Tillandsia catimbauensis* (Tc) estão em azul e de *Dyckia limae* (DI) estão em verde. Valores de probabilidade posterior da IB estão indicados acima dos nós. Sequências de *Glomus macrocarpum* foram utilizadas como grupo externo.

Para todos os fungos previamente identificados pela morfologia como pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Talaromyces*, foi realizada a amplificação, além da região ITS, dos genes β -tubulina, calmodulina e RPB2. Todas as sequências obtidas neste estudo foram utilizadas para realizar busca das sequências mais similares depositadas no banco de dados GenBank. Segundo Aly et al. (2011), uma limitação nos estudos dependentes de cultivo para o conhecimento da diversidade de fungos endofíticos é a coexistência de espécies com crescimento rápido com outras de pouca força competitiva, as quais podem permanecer desconhecidas. No entanto, estudos baseados na análise de DNA auxiliam no conhecimento da comunidade endofítica permitindo uma identificação mais precisa, inclusive, de fungos não esporulantes ou que não crescem em meios de cultura, possibilitando um maior conhecimento da diversidade de fungos endofíticos.

Neste estudo, foram identificadas e descritas duas novas espécies de *Penicillium* na seção Lanata divaricata através da análise das características macroscópicas, microscópicas e filogenéticas, e descritas aqui como *Penicillium* sp1 e *Penicillium* sp2 (Figuras 13 e 14). A reconstrução filogenética foi realizada através das análises de máxima verossimilhança e Bayesiana utilizando uma matriz combinada dos genes ITS, CaM, BenA e RPB2, os quais forneceram topologias suficientes para melhor resolução e separação das espécies, estando de acordo com estudos recentes que descreveram novas espécies nesta seção. Com cerca de 55 espécies, a seção Lanata-Divaricata tem seus representantes descritos pelos autores como principalmente divaricados e com métula subterminal para terminal, em posições intercalares (associadas a conidióforos monoverticilados), sendo um grupo de espécies muito semelhantes entre si e capazes de exibir variações dentro da mesma espécie (Houbraken e Samson, 2011; Visagie et al., 2015). Um total de 55 sequências pertencentes a todas as espécies da seção Lanata-Divaricata foi utilizado para compor as análises combinadas incluindo 1577 caracteres (563 para ITS rDNA, 479 para BenA e 535 para CaM) e *Penicillium glabrum* CBS 125543 foi usado como grupo externo (Figura 14).

Buscas por sequências mais similares usando a ferramenta BLASTn na base de dados do NCBI GenBank mostram que os isolados da nova espécie *P. sp2* possuem os valores de identidade mais próximos de *P. ludwigii* (ITS = 98-99%; CaM = 95%; BenA = 93% RPB2 = 98%), mas as análises filogenéticas agruparam estes endófitos em um único clado com um alto valor de suporte (ML = 100, PP = 1.0), com *P. cluniae* sendo a linhagem filogenética mais próxima. Para os isolados agrupados como pertencentes à nova espécie *Penicillium* sp1, os resultados de busca para sequências similares mostraram

identidade com *P. brasilianum* (ITS = 98-99%, CaM = 97%, BenA = 97-98%, RPB2 = 96%), a mesma relação foi demonstrada nas análises filogenéticas, onde os isolados se agruparam em um clado distinto com alto valor de suporte (ML = 100, PP = 1,0). Outro isolado (URM 7669) demonstrou identidades BLASTn (ITS = 99%; CaM = 94%; BenA = 98%; RPB2 = 99%) e relação filogenética com *P. echinulonalgiovense*. Desde a sua descrição por Abe (1956), *P. echinulonalgiovense* ainda era um nome inválido, mas em estudo de Barbosa et al. (2018) os autores validaram a espécie e aqui, neste estudo, é relatado pela primeira vez como endófito de folhas de *T. catimbauensis*.

Espécies do gênero *Penicillium* ocorrem em uma ampla variedade de substratos e estão entre os fungos mais bem distribuídos no mundo (Kirichuk et al., 2017). Possuem grande importância em diversas áreas como, na medicina (Leal et al., 2010), na agricultura (Iamanaka et al., 2010), nas indústrias de produção de enzimas (Souza et al., 2015), importância ambiental (Prade e Matsumura, 2014), contaminantes de alimentos e ambientes internos (Samson et al., 2004), além disso, diversos autores tem referido estes como endófitos em vários ecossistemas, incluindo florestas tropicais secas (Oliveira et al., 2011, Waqas et al., 2012, Devi e Prabakaran, 2014, Bezerra et al., 2015, González-Teuber et al., 2017).

4.3.1 *Penicillium* sp1 K.T.L.S. Freire, J.D.P. Bezerra & Souza-Motta, sp. nov.

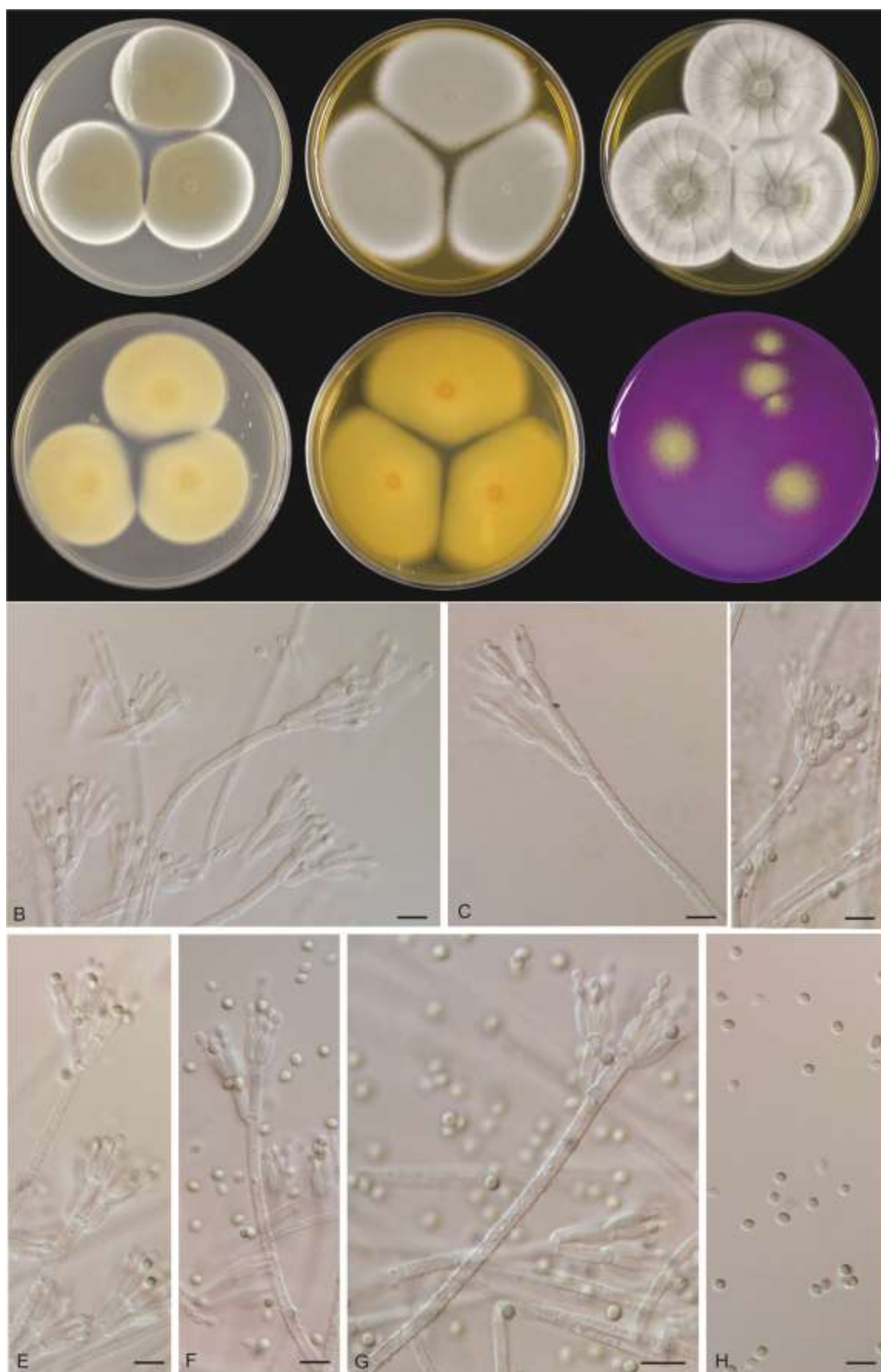
Diâmetro da colônia, 7 dias, em mm: CYA 15°C 22–23; CYA 25°C 39-40; CYA 30°C 39-40; CYA 37°C 10–12; MEA 15°C 25; MEA 25°C 54–55; MEA 30°C 50–51; MEA 37°C 7–8; SIM 50; DG18 24–26; CYAS 29-32; OA 42–43; CREA 27.

Características da colônia: (25°C, 7 d) - CYA: colônias baixas, plana, textura aveludada, esporulação forte. De cor acinzentada a verde-turquesa nas margens, margem esbranquiçada, micélio hialino, creme amarelado invertido. Exsudado ausente. MEA: colônias textura aveludada verde-acinzentada com margens esbranquiçadas, micélio hialino, reverso amarelado a castanho claro. Exsudado ausente. YES: colônias textura aveludada, sulcada, colônias baixas a moderadamente profundas, centralmente verde escuro, coloração variando de verde a acinzentado, pequena margem branca, amarelo reverso, sulcado. Exsudado ausente. OA: colônias de textura aveludada, plana, turquesa-esverdeada a acinzentada, margem esbranquiçada a amarelada, invertida pigmentada

amarelada. Exsudado observado. CYAS: Colônia plana, baixa, textura aveludada, verde-turquesa para creme acinzentado e reverso com margem escura (verde escuro), margem esbranquiçada. Exsudado ausente. DG18: Colônias aveludadas, verde-turquesa, margem branco-verde, reversa acastanhada. Exsudado ausente.

Micromorfologia: MEA (25°C, 7 d) - Conidióforos longos, até 600 μm de comprimento, 3–3.5 μm de largura, biverticilado, frequentemente com ramos laterais; estipes/métulas de parede áspera, 10-13.8 $\times$ 3.2, estipe com 3 métulas, com terminação espatulada, com 3–4 (–5) fiálides por estipe, fiálides ampuliformes 7.4–10.6 $\times$ 3.2 μm ; ramificações 11,6–21,2 $\times$ 3 μm , métulas 7,5–19 $\times$ 3 μm , plântulas 7,5–13 $\times$ 3 μm ; conídios finamente grosseiros e raramente ricamente echinulados, subglobosos a elipsoidais, conídios sem pigmentação, 2–4 $\times$ 2–3 μm .

Figura 13. Características macroscópicas e microscópicas de *Penicillium* sp1 (URM 7668) – A. Colônias em CYA, MEA, YES da esquerda para direita (superior = anverso/ inferior= reverso); CREA (inferior = anverso). B e C. Conidióforos. D - G. Estipes, métulas e fiálides. H. Conídios.



4.3.2 *Penicillium* sp2 K.T.L.S. Freire, J.D.P. Bezerra & Souza-Motta, sp. nov.

Diâmetro da colônia, 7 dias, em mm: CYA 15°C 18–19; CYA 25°C 35–37; CYA 30°C 39–40; CYA 37°C 15–20; MEA 15°C 24–26; MEA 25°C 47–51; MEA 30°C 57–58; MEA 37°C 24–31; SIM 47–52; DG18 24–30; CYAS 30–31; OA 36–37; CREA 24–31.

Características da colônia: (25°C, 7 d) - CYA: colônias aveludadas, radialmente sulcadas. Cinza central a margem turquesa-esverdeada, esbranquiçada. Colônias levemente elevadas, exsudato hialino esparsos, bege reverso. MEA: Colônias aveludadas, verde-acinzentadas com margens levemente esverdeadas, fortemente esporuladas, exsudação ausente, reversa amarelo-marrom. YES: Colônias aveludadas, radialmente sulcadas e concentricamente sulcadas levemente observadas. Coloração cinza-esverdeada com margens esbranquiçadas, ausência de exsudato, reverso amarelo-marrom, radial e concentricamente sulcado. OA: colônias baixas, plano, textura aveludada, verde-acinzentada com margens ligeiramente esbranquiçadas. Exsudado hialino moderadamente observado. Inverta esbranquiçada. CYAS: Colônias aveludadas, coloração cinza-esverdeada com margens esbranquiçadas. Exsudado ausente. Reverso bege-acinzentado, centralmente acastanhado. DG18: Colônias aveludadas, planas, centralmente elevadas, verde-acinzentadas com margens esbranquiçadas, reverso acastanhado com margens claras. Esporulação moderada. Exsudado ausente.

Micromorfologia: MEA (25°C, 7 d) - Conidióforos longos, até 600 µm de comprimento, 2,5 a 3,5 µm de largura, monoverticilados, na maioria das vezes monoverticilados com um ramo distinto, conidióforos biverticilados raramente observados; estipes / métulas de paredes lisas, 13–27,5 × 2,5–3,5, septadas regularmente (3–5 septadas), com uma terminação espatulada (2,5–3,5 µm), frequentemente com 2–4 fiálides, raramente 5 fiálides, fiálides ampulliformes 8,5–10 (–15) × 3–3,5 µm; cadeias de conídios com paredes ásperas, comumente globosas a subglobose, raramente elipsoidais, pigmentadas esverdeadas, 2,5–3 (–4,5) × 2–2,5 (–3,5) µm.

Figura 14. Características macroscópicas e microscópicas de *Penicillium* sp2 URM 7665 – A. Colônias em CYA, MEA, YES da esquerda para direita (superior = anverso/ inferior= reverso); CREA (inferior = anverso). B e C. Conidióforo. D. Estipe. E. Estipes e fiálides. F – H. Conidióforos e conídios. I. Estipe, métulas e fiálides J. Conídios

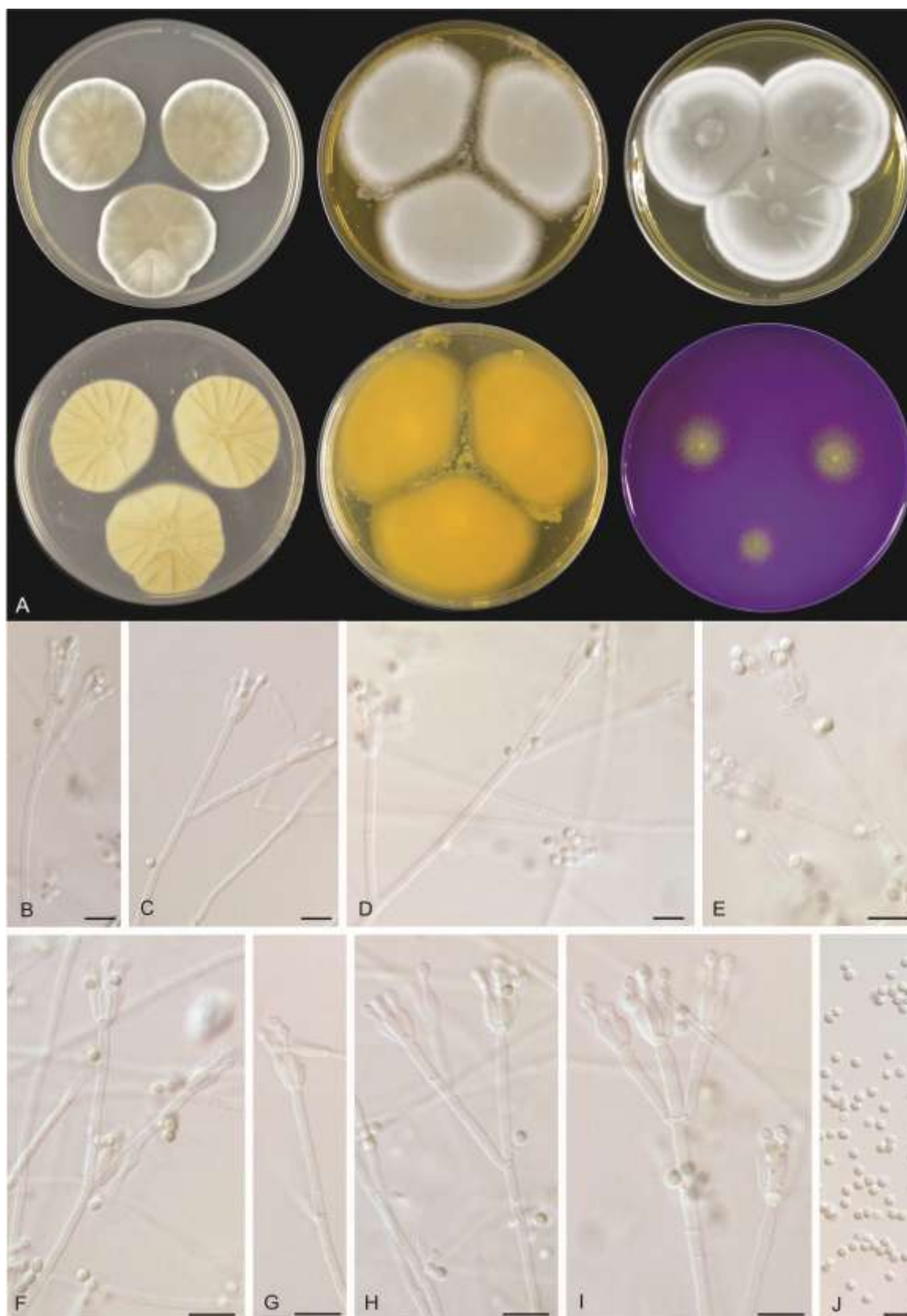
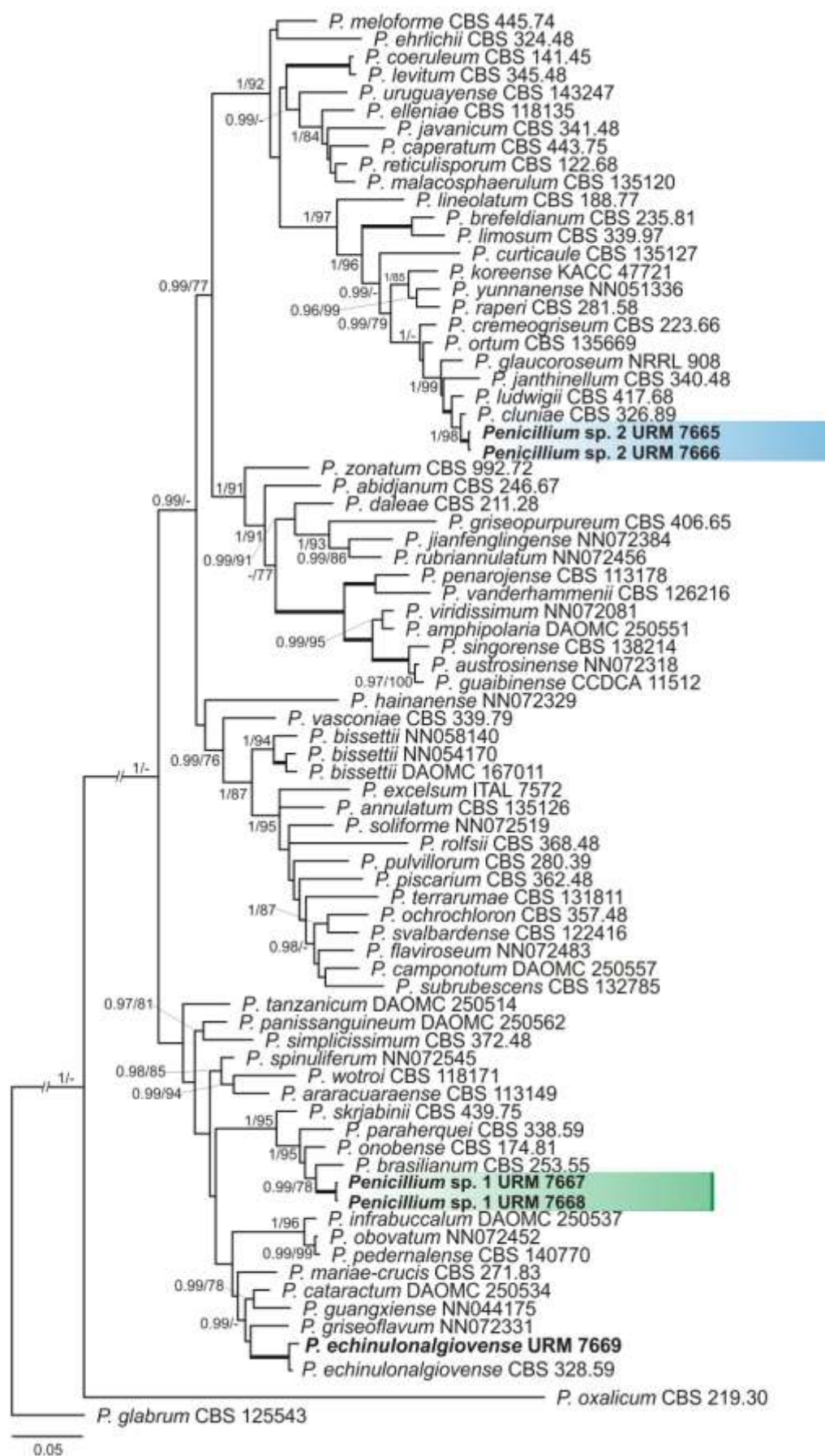


Figura 15. Árvore filogenética obtida por inferência Bayesiana obtida por análise filogenética de dados combinados de *ITS*, *Tub*, *Cal* e *Rpb2* da seção *Lanata-Divaricata* do gênero *Penicillium*. Endófitos obtidos neste estudo em **negrito**, e novas espécies estão representadas em verde e azul. BPP e ML-BS acima de 0,95 e 70%, respectivamente, são mostrados próximos aos nós. Ramos com suporte total (BPP = 1 e ML-BS = 100%) são espessados. *Penicillium glabrum* CBS 125543 foi utilizado como grupo externo.



Para os isolados identificados como pertencentes ao gênero *Umbelopsis*, foi realizada a identificação macroscópica e microscópica (Figura 16) e árvore de máxima verossimilhança (ML) obtida com MEGA 7 usando sequências da região ITS (Figura 16) com intuito de descrever a espécie *Umbelopsis isabelina* como primeiro relato como fungo endofítico no Brasil isolado da bromélia *Tillandsia catimbauensis*. Espécies de *Umbelopsis* já foram isoladas como endófito de folhas e caules de seringueiras (*Hevea brasiliensis*) no Peru por Gazis e Chaverri (2010), endófitos de caule e raiz de uma planta medicinal (*Kadsura angustifolia*) coletada na China por Huang et al. (2015) e, além disso, já foram relatadas em associação a diferentes substratos e hospedeiros (HOFF et al., 2004; BUDZISZEWSKA et al., 2010). No semiárido brasileiro, *U. isabellina* já foi reportada de amostras de solo (UPADHYAY, 1967).

4.3.3 *Umbelopsis isabelina* W. Gams

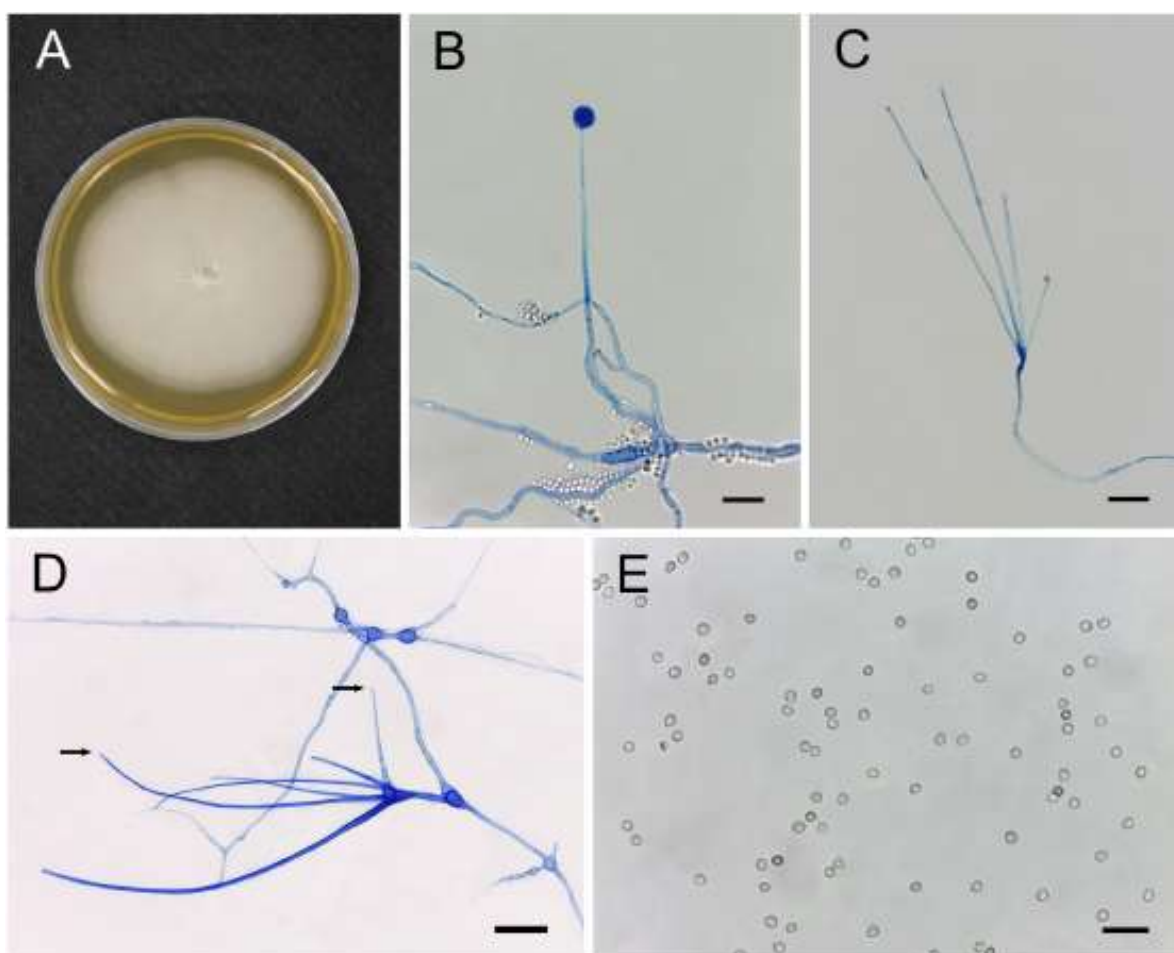
Descrição morfológica: Colônias baixas, até 4 mm de altura, 7 cm de diâmetro, aveludadas, inicialmente brancas, tornando-se cinza escuro em MEA a 25 ° C. Reverso ligeiramente zoneado e cor creme. Esporangióforos simples ou com ramificação simples (até sete) surgindo do mesmo ponto, ramificações simpodiais também observadas, muitas vezes inchadas no ponto de ramificação; 120–300 (–380) µm de comprimento, atingindo 3–5 µm de largura perto da base, 1–2 septado, raramente (–4), afinando gradualmente em direção ao ápice. Esporângios globosos 7–18 µm diâmetro, Multi-esporos, inicialmente hialinos, tornando-se acinzentados, paredes evanescentes, raramente coladas. As columelas são geralmente inconspícuas ou ausentes, quando presentes nos esporangióforos maiores, são muito pequenas, levemente convexas, de paredes lisas, 2 a 3 µm de diâmetro.

Esporangiosporos de forma diversa, principalmente globosos, 2 a 5 µm em diâmetro; também elipsoidal, 4,5 × 2,5 µm, ligeiramente angular, 3,5 µm diam. Clamidósporos presentes no micélio aéreo, de forma variável, globosos, subglobosos e doliformes. Zygosporangia não observado.

Culturas e testes de temperatura: Em MEA a 10 °C, crescimento muito limitado (2,2 cm em dia em sete dias, <1 mm em altura), sem estruturas reprodutivas; a 15 °C, colônias pequenas (<1 mm de altura) com crescimento lento (4,5 cm em dia em sete dias), esporulação fraca, esporangióforos simples ou ligeiramente ramificados; a 20 °C, colônias crescendo até 3 mm de altura com crescimento rápido (7 cm em cinco dias), fraca

esporulação; a 25 °C, colônias crescendo 7 cm em quatro dias e até 3 mm de altura, forte esporulação; a 35 °C, sem crescimento e esporulação.

Figura 16. *Umbelopsis isabellina* (URM 7862). A. Superfície de colônia em MEA após sete dias. B. Esporangióforo simples com esporângio. C. Esporangióforo simples ramificado que surge do mesmo ponto. D. Esporangiospores simples com columelas inconspícuas (setas). Esporangiosporos Barras de escala: 16, 25, 30 e 10 µm, respectivamente



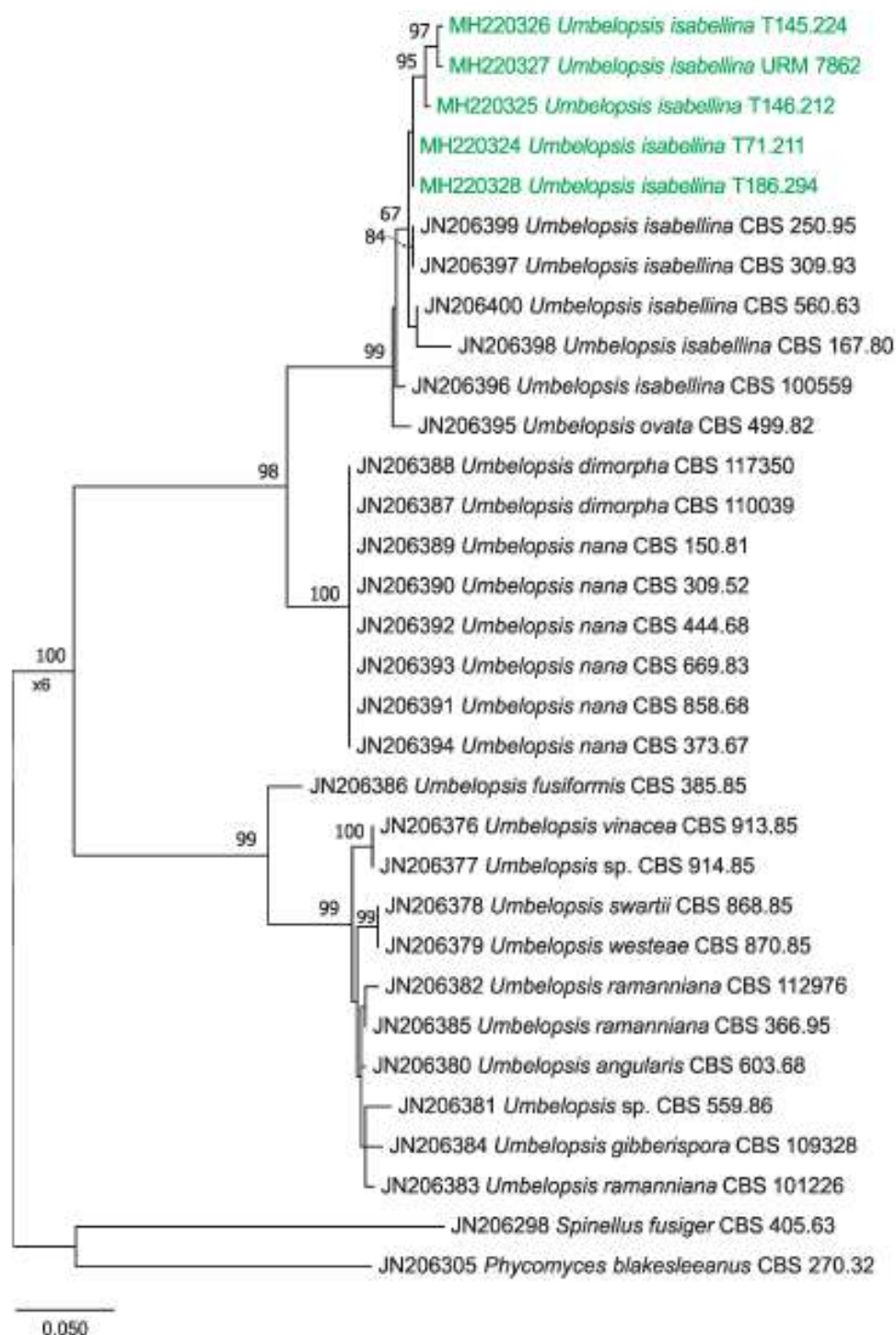


Figura 17. Árvore de Máxima Verossimilhança (ML) obtida com MEGA 7 usando sequências de rDNA de ITS de espécies de *Umbelopsis* com *Spinellus fusiger* (CBS 405.63) e *Phycomyces blakesleeanus* (CBS 270.32) como grupos externos. Valores de bootstrap ML acima de 60% são mostrados nos nós. Os isolados obtidos no presente estudo estão em verde

4.4 CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS QUANTO A PRODUÇÃO DE PROTEASE

Um total de 12 isolados foi utilizado para os testes quanto a produção de protease (Figura 18), atividade proteolítica, proteína total e teste de atividade coagulante do leite e todos apresentaram resultados positivos. Destes, apenas os dois isolados com os melhores resultados de coagulação do leite (*Penicillium* sp. – URM 7965 e *P. decaturense* – URM 7966), um de cada espécie de bromélia, foram escolhidos para dar continuidade aos testes de efeito pH e temperatura e estabilidade enzimática e efeito da concentração de CaCl_2 na atividade coagulante do leite. Os resultados mostram que os fungos selecionados foram capazes de crescer bem em condição não estática após o período de 96h, sob o método de fermentação submersa em meio de farinha de Soja, como apresentado na figura 17.

Os 12 isolados foram selecionados por pertencerem ao gênero *Penicillium* e *Talaromyces*, pois, além de terem sido isolados frequentes nas duas espécies de bromélias, espécies pertencentes ao gênero *Penicillium* já foram relatadas em outros estudos como potenciais produtores de diversos tipos de enzimas, inclusive de proteases com ação coagulante do leite (HASHEM, 2000; IKRAM-UL-HAQ; MUKHTAR, 2007; TAVARES et al., 2012; CUNHA et al., 2016; OZTURKOGLU-BUDAK et al., 2016).

Figura 18. Frascos de Erlenmeyer com crescimento fúngico em meio de cultura (MS-2) para teste de produção de protease após 96h a 120 rpm



4.4.1 Determinação da atividade proteolítica e proteína total

Nos primeiros testes para análise da atividade proteolítica das amostras, os resultados foram expressos em U mL^{-1} . A atividade total enzimática foi exibida em valores da média da densidade óptica após a leitura em espectrofotômetro na absorvância de 440 nm, de 17,22 U/mL para *Penicillium* URM 7965 e 24,42 U/mL para *P. decaturense* URM 7966,

utilizando inicialmente o tampão Tris-HCl pH 6,2. Demonstrando assim que a farinha de soja se apresenta como um bom substrato para produção de protease com ação coagulante.

Na análise de proteína total das amostras utilizando o método de Bradford com diferentes concentrações de soro albumina bovina, o resultado do conteúdo protéico total das amostras foi de 0,126 mg/mL em *Penicillium* URM 7965 e 0,104 mg/mL para *P. decaturense* URM 7966.

4.4.2 Determinação da atividade coagulante do leite

O extrato bruto enzimático dos dois fungos testados apresentou resultados de atividade coagulante do leite. Nos primeiros testes realizados, através da mistura do extrato bruto enzimático com o tampão Tris-HCl (pH 6,2), os fungos *Penicillium* URM 7965 e *P. decaturense* URM 7966, apresentaram a formação dos primeiros coágulos em 3 minutos e 16 segundos e 1 minuto e 3 segundos, respectivamente. Resultando numa forte coagulação que foi capaz de separar a solução em duas fases, como mostra as figuras 19 e 20. Alecrim et al. (2017), define uma forte coagulação como a formação de um coágulo distinto e o soro do leite abundante.

Após obtenção do tempo de formação dos primeiros coágulos e aplicação na fórmula $400 \times t^{-1}$ os resultados foram expressos em International Milk-Clotting Units (U/mL), sendo de 122,44 U/mL para o isolado URM 7965 e 380,95 U/mL para o URM 7966. Estes são resultados anteriores aos testes de seleção das melhores condições de produção em pH e temperatura.

Figura 19. A - Coagulação do leite através do extrato bruto enzimático em tampão Tris-HCL (pH 6,2) do isolado de *Penicillium* sp. URM 7965; B - Amostra do branco contendo apenas leite e CaCl_2

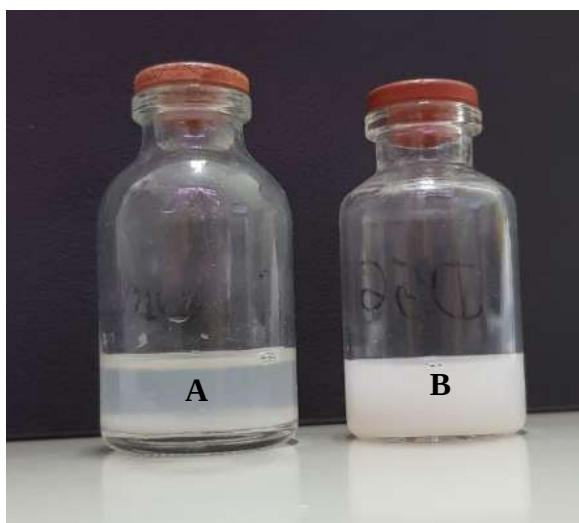


Figura 20. Coagulação do leite pelo isolado *Penicillium* sp. URM 7965



4.4.3 Efeito do pH na atividade coagulante e atividade proteolítica

O extrato bruto dos isolados de *Penicillium*, também apresentou resultados satisfatórios para atividades coagulante e proteásica após a seleção do melhor pH. Para determinação do pH ótimo, a atividade coagulante foi determinada a 35°C nas diferentes soluções tampão de acetato de sódio (pH 5,5 e 6,0), Tris-HCl (pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0), glicina-NaOH (pH 8,0; 8,5 e 9,0), 0,2 M. Foi possível observar que o pH ótimo da atividade coagulante ocorreu em 8,5 em tampão glicina-NaOH para o isolado URM 7965 e 8,0 para o isolado URM 7966 (Tabela 3).

Tabela 3. pH ótimo da atividade coagulante do leite dos isolados *Penicillium* sp. URM 7965 e *P. decaturense* URM 7966 em U/mL

pH/Tampão	<i>Penicillium</i> sp. URM 7965 (U/mL)	<i>P. decaturense</i> URM 7966 (U/mL)
5,5/acetato de sódio	160	153,84
6,0/acetato de sódio	352,94	71,0
6,0/Tris-HCl	83,33	128,34
6,5/Tris-HCl	110,09	98,76
7,0/Tris-HCl	292,68	67,60
7,5/Tris-HCl	104,80	92,30
8,0/Tris-HCl	176,47	183,20

8,0/Glicina	89,55	666,6
8,5/Glicina	615,38	187,5
9,0/Glicina	342,85	108,59

A figura 21 mostra o efeito do pH na atividade coagulante do extrato bruto enzimático do isolado *Penicillium* sp. URM 7965. É possível observar que a partir do pH 7,0 houve uma diminuição da atividade, sendo acompanhada por um pico de atividade em pH 8,5 e um seguinte baixa em pH 9,0. Nota-se também que houve atividade residual em todas as faixas de pH com pico em 100% no pH definido como ótimo. Estes resultados se assemelham aos encontrados por Soares et al. (2015), onde os autores estudaram uma protease obtida do extrato bruto do látex da fruta-pão e o melhor resultado foi apresentado em pH 8,5 para o tampão Tris-HCl. Segundo Souza et al. (2015), espécies de *Penicillium* atraem a atenção para a produção de proteases alcalinas sob condições de fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FSm). Um estudo realizado por Germano et al. (2003) com uma espécie de *Penicillium* produzindo protease no método de FES, verificou alta atividade da enzima entre os pHs 6,0 e 9,0, apesar do pH 6,5 ter sido definido como ótimo. Proteases coagulantes obtidas de *Aspergillus flavo furcatus*, em estudo de Alecrim et al. (2015), apresentaram atividade coagulante em todas as faixas de pH, mas o pH 7,0 foi definido como ótimo.

Estes são resultados interessantes, pois, normalmente as enzimas utilizadas comercialmente na coagulação do leite são designadas como aspárticas, por serem mais ativas em pHs mais ácidos (LLORENTE; BRUTTI; CAFFINI, 2004), por exemplo, Vishwanatha et al. (2010) ao estudarem proteases coagulantes obtidas de *Aspergillus oryzae*, em fermentação em estado sólido, obtiveram alto valor de atividade de coagulação do leite em pH 6,3, indicando esta como um potencial coagulante na indústria de queijo. Silva et al. (2016), estudaram uma protease aspártica purificada do fungo *Rhizomucor miehei* que apresentou maior atividade no pH 5,5. Em trabalho realizado por Sun et al. (2014), os autores obtiveram uma protease purificada de *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* com pH ótimo de atividade também em 5,5. O pH ótimo para atividade coagulante e proteolítica da protease purificada de *Rhizomucor miehei*, estudada por Preetha e Boopathy (1997) foi de 5,6 e 4,1, respectivamente. No entanto, enzimas

empregadas comercialmente também apresentam alta atividade coagulante em pH neutro como mostra o estudo de Soares et al. (2015).

No efeito do pH na atividade proteolítica de *Penicillium* sp. URM 7965, também representado na figura 21, é possível observar o aumento na atividade a partir do pH 5,5, até atingir a taxa máxima em pH 7,0. Após a diminuição da atividade, houve um discreto aumento no pH 8,0 ao 8,5. Segundo Merheb-Dini (2010), o segundo pico de atividade proteolítica pode estar relacionado a presença de outras proteases, visto que, ao estudar uma protease coagulante de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, não foi observado um segundo pico de atividade após a purificação da enzima, como havia observado antes com o extrato bruto enzimático. Além disso, foi possível verificar um aumento na atividade proteolítica em pH 4,5, atingindo a taxa máxima em pH 5,5 e, em seguida, perdendo atividade até 7,5 com ligeiro aumento até pH 9,0.

Para o isolado URM 7966, a seleção do pH ótimo está representada na figura 22, onde é possível observar a atividade coagulante máxima do extrato bruto enzimático no pH 8,0. Houve atividade coagulante em todas as faixas de pH, mas todas se mantiveram abaixo dos 30% de atividade residual, chegando a 100% apenas no pH definido como ótimo. A atividade proteolítica (Figura 22) também foi máxima em pH 8,0, com o mínimo de atividade observado em pH 5,5. Estes resultados se assemelham aos encontrados por Tavares et al. (2012), onde os autores estudaram proteases obtidas de fungos epifíticos e endofíticos associados a *Morinda citrifolia* L. e observaram que o pH ótimo de atividade proteolítica para as proteases obtidas de cepas de *Aspergillus* variou de 6,0 a 9,0 e para *Penicillium* o pH ótimo foi 9,0. Silva et al. (2013), ao estudarem o látex da espécie vegetal *Sideroxylon obtusifolium* como fonte de protease coagulante do leite, obtiveram uma protease com a maior taxa de coagulação em pH alcalino 8,0. Assim como, Tripathi et al. (2011), avaliando proteases do látex da planta *Streblus asper*, as quais apresentaram atividade máxima em pH 9,0. Mas diferem dos resultados encontrados por Castro e Sato (2014) a partir de uma protease parcialmente purificada do fungo *Aspergillus oryzae* LBA 01, sob o método de fermentação em estado sólido, a qual apresentou o maior nível de atividade coagulante no pH 5,0 e 5,5, sendo indicativa de uma protease ácida.

Figura 21. Efeito do pH na atividade coagulante (AC) e na atividade proteolítica (AP) do extrato bruto enzimático de *Penicillium* sp. URM 7965

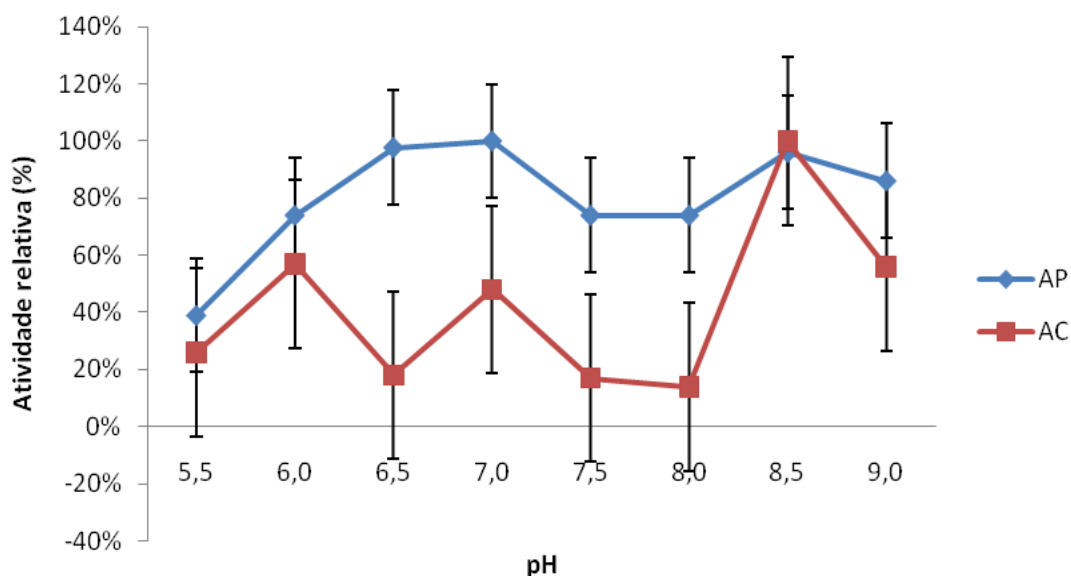
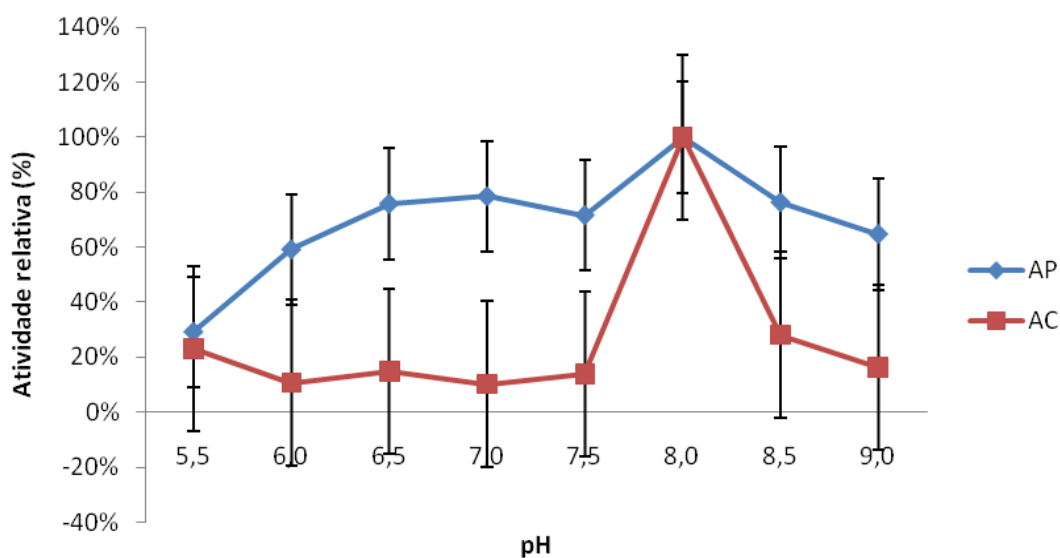


Figura 22. Efeito do pH na atividade coagulante (AC) e na atividade proteolítica (AP) do extrato bruto enzimático de *Penicillium decaturense* URM 7966



4.4.4 Efeito da temperatura na atividade coagulante e atividade proteolítica

A figura 23 mostra os resultados da seleção da temperatura ótima nas atividades coagulante e proteolítica de *Penicillium* sp. URM 7965. Observa-se que o extrato bruto enzimático atingiu sua máxima atividade coagulante a 45°C e proteolítica a 40°C. Houve uma redução brusca de até zero na atividade coagulante do extrato a partir de 85°C,

segundo Soares et al. (2015), isso ocorre provavelmente devido a desnaturação térmica da proteína, onde a enzima perde atividade quando submetida a altas temperaturas.

Resultados similares foram encontrados por Tavares et al. (2012) ao estudarem proteases obtidas de *Aspergillus* e *Penicillium* isolados de *Morinda citrifolia*, onde relataram a temperatura ótima da atividade proteolítica variando de 25°C a 60°C para *Aspergillus* e de 40°C para *Penicillium*. El-Baky et al. (2011), ao estudarem uma protease purificada do basidiomiceto *Piptoporus soloniensis*, observaram uma taxa máxima da atividade coagulante a 35°- 40°C, sendo mais estável em pH 6,0 e abaixo de 40°C. Também para a atividade coagulante e diferindo dos resultados encontrados neste estudo, a protease coagulante obtida de *Aspergillus oryzae* em estudo de Vishwanatha et al. (2010), apresentou a maior atividade em a temperatura de 55°C. A protease purificada de *Rhizomucor miehei* em trabalho realizado por Silva et al. (2016), apresentou temperatura ótima de atividade a 55°C, e 90 e 80% das atividades proteolíticas foram mantidas a 60 e 65°C. Assim como, outros autores obtiveram alta atividade do extrato enzimático em temperaturas mais elevadas como, Martim et al. (2017) estudando a produção de protease coagulante pelo cogumelo *Pleurotus albidus*, observaram a melhor atividade do extrato bruto enzimático a temperatura de 60°C. Uma protease ácida obtida de *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* também apresentou melhor atividade na temperatura de 60°C (Sun et al., 2014). Uma enzima coagulante obtida de *Penicillium oxalicum*, por Hashem (2000), apresentou a maior atividade sob temperatura de 65°C, assim como, a protease obtida de *Aspergillus oryzae* LBA 01 por Castro e Sato (2014), apresentou a temperatura ótima de atividade em 55 e 60°C e Silva et al. (2017a), estudando uma protease ácida obtida de *Phanerochaete chrysosporium*, também observaram atividade máxima de coagulação do leite a 60 – 65°C.

Resultados muito semelhantes podem ser observados no teste para seleção de temperatura ótima para o isolado *Penicillium decaturense* URM 7966 (Figura 24). Assim como para o isolado *Penicillium* sp. URM 7965, o extrato bruto enzimático atingiu sua máxima atividade (100%) a 45°C, com atividade relativa acima de 20% em quase todas as temperaturas testadas, e redução a partir de 70°C, atingindo 0% de atividade nas temperaturas de 85° e 90°C.

Na atividade proteolítica (Figura 23), também foi possível observar a atividade relativa acima de 20% para todas as temperaturas, acima de 70% a partir de 40°C com pico de 100% a 65°C e, em seguida, uma redução gradativa até 90°C. Resultado semelhante foi

observado por Merheb-Dini et al. (2010), cujo extrato enzimático do fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 atingiu a máxima atividade proteolítica na temperatura de 65°C.

Figura 23. Efeito da temperatura na atividade coagulante (AC) e atividade proteolítica (AP) do extrato bruto enzimático de *Penicillium* sp. URM 7965

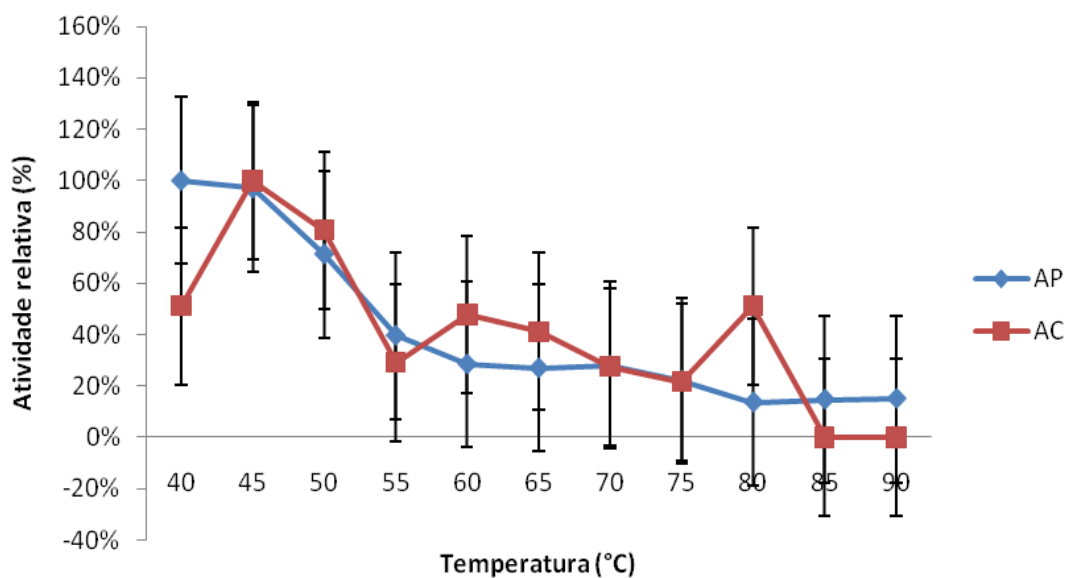
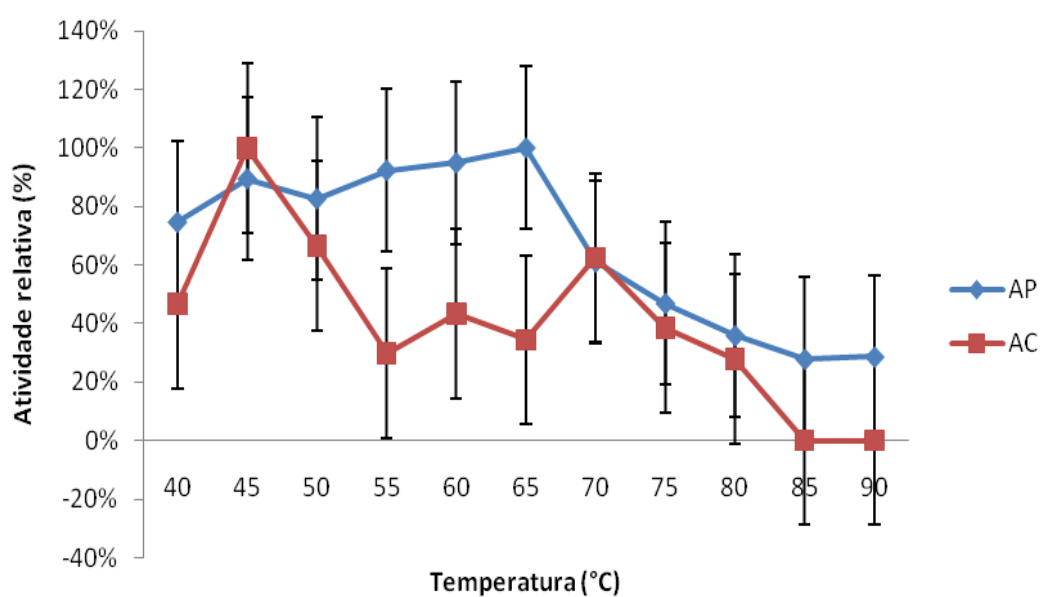


Figura 24. Efeito da temperatura na atividade coagulante (AC) e atividade proteolítica (AP) do extrato bruto enzimático de *Penicillium decaturense* URM 7966

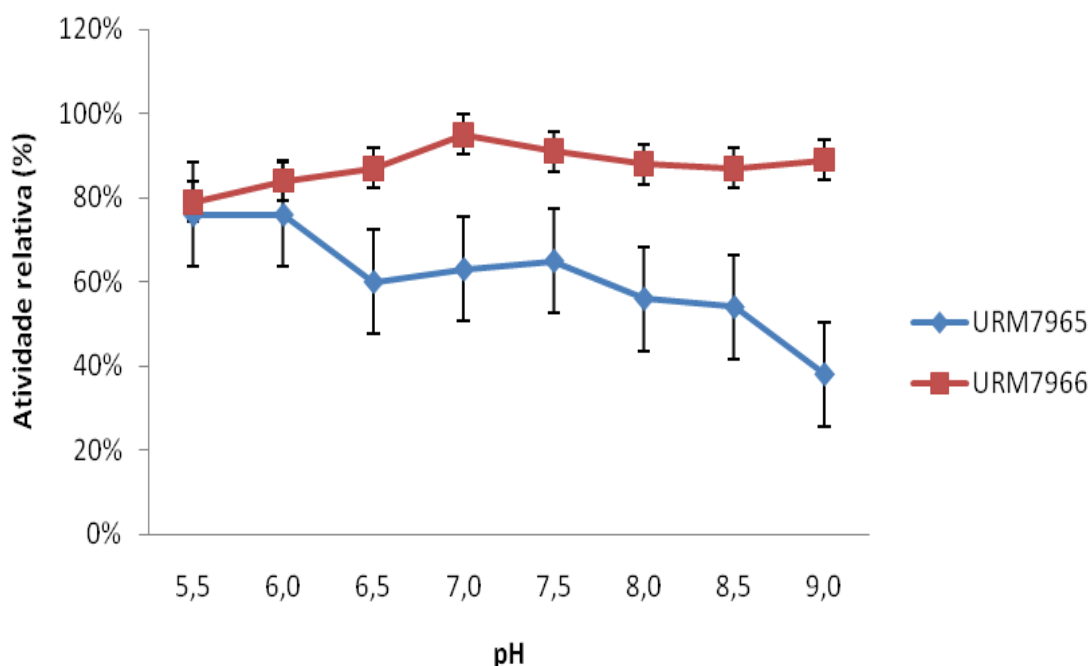


4.4.5 Estabilidade da atividade proteolítica ao pH

A figura 25 mostra a estabilidade do extrato bruto enzimático dos isolados *Penicillium* sp. URM 7965 e *Penicillium decaturense* URM 7966, frente a diferentes valores de pH num período total de 180 minutos. É possível observar que há uma ampla faixa de estabilidade da enzima na atividade proteolítica, principalmente entre os pHs 6,5 e 7,5 com aproximadamente 60 a 65% de atividade relativa para *Penicillium* sp. 7965. Além disso, apresentou atividade relativa em todas as faixas de pH, exibindo um pico no pH 5,5 e 6,0 entre 70% e 80%. O resultado mínimo foi de 7,5% aos 180 minutos para o ensaio em pH 9,0 em tampão Glicina. A protease coagulante obtida de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 por Merheb-Dini (2010), apresentou resultado semelhante a este estudo se mostrar estável na faixa de pH entre 5,0 e 7,0 com atividade relativa de 65 a 70%, mas diferindo dos resultados de estudo realizado por Merheb et al. (2007), com protease de *Thermoascus aurantiacus* a qual manteve alta estabilidade do pH 3,0 ao 9,5. Segundo Harboe et al. (2010), um ponto importante a ser levado em consideração em um coagulante é a sua estabilidade frente ao pH e temperatura do queijo, o qual evita a diminuição no rendimento, minimizando perdas provenientes da variação na firmeza do produto. Segundo Castro e Sato (2014), o estudo das propriedades das proteases como condições ideais de pH e perfis de temperatura e estabilidade são muito importantes pois podem ser utilizados para a aplicação com sucesso das enzimas em processos industriais.

Para o isolado *P. decaturense* URM 7966, a figura 25 também mostra a estabilidade da atividade proteolítica em todas as faixas de pH, apresentando atividade relativa acima de 80%, sendo mais estável na faixa de pH entre 7,0 e 9,0, atingindo 100% de atividade em pH 7,0.

Figura 25. Estabilidade da atividade proteolítica ao pH do extrato bruto enzimático de *Penicillium* sp. URM 7965 e *P. decaturense* URM7966, em ensaio de 180 minutos



4.4.6 Estabilidade da atividade proteolítica a temperatura

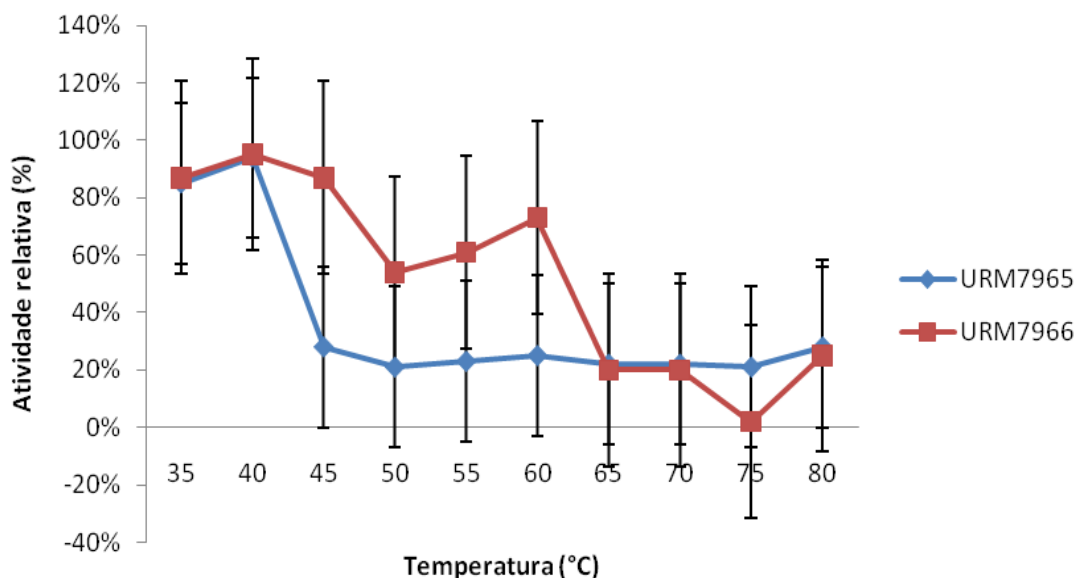
A figura 26 apresenta a estabilidade da atividade proteolítica do extrato bruto enzimático do *Penicillium* sp. URM 7965 e *P. decaturense* URM 7966 a diferentes temperaturas. É possível observar que *Penicillium* sp. URM 7965 apresentou estabilidade em todas as faixas de temperatura com atividade relativa acima de 20%. A atividade máxima observada foi na temperatura de 40°C em 180 minutos no ensaio com o melhor pH (8,5), definido anteriormente. Houve uma redução brusca da atividade com o aumento da temperatura a partir de 45°C. O extrato bruto enzimático de *Penicillium oxalicum* estudado por Hashem et al. (2000) apresentou resultado semelhante aos encontrados neste estudo pois a enzima foi altamente estável até 40°C por aproximadamente 30 minutos, restando 75% de sua atividade original e 58% a 60 minutos. Estes diferem dos resultados encontrados por Soares et al. (2015), onde nos testes de estabilidade de uma enzima de origem vegetal na atividade proteolítica, a atividade relativa se manteve acima dos 40% para todos os tempos e temperaturas, atingindo o valor máximo na temperatura de 70°C em 180 minutos. De acordo com Demir et al. (2008), ao estudarem proteases de *Capparis spinosa*, enzimas estáveis a temperatura para atividade coagulante são uma ótima escolha

na indústria de alimentos, pois, segundo Alves (2013), a taxa de coagulação aumenta com a temperatura, e por isso a importância de uma enzima ser estável a altas temperaturas.

O extrato bruto enzimático de *Penicillium decaturense* URM 7966 (Figura 26), apresentou a máxima estabilidade frente a temperatura de 40°C no tempo de 180 minutos, com atividade relativa acima de 80% assim como os resultados apresentados do isolado URM 7965. A atividade do extrato bruto enzimático também foi reduzida com o aumento da temperatura a partir de 45°C. Em estudo realizado por Silva et al. (2009), o extrato bruto enzimático obtido do fungo *Gliocladium verticilloides*, apresentou alta estabilidade a temperatura da atividade proteolítica com quase 100% de atividade relativa quando mantido até 60°C por um período de 60 minutos, com diminuição de atividade em temperatura superior aos 60°C, redução para 22% na atividade relativa quando incubado a 65°C e menos de 10% quando submetida a altas temperaturas.

Resultados semelhantes a este estudo foram observados por Merheb-Dini (2010) para a protease de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, onde o extrato bruto enzimático permaneceu estável até 45°C por 60 minutos após incubação a 50°C, com aproximadamente 60 a 70% de atividade relativa e zero de atividade após 60°C na atividade proteolítica. Diferindo dos resultados encontrados por Merheb et al. (2007), no qual o extrato enzimático apresentou 100% de estabilidade na atividade proteolítica até 60°C por um período de 60 minutos. Os autores consideram importante a inativação da atividade proteolítica após aumento da temperatura como um bom indicativo do seu uso na produção de queijo. Visto que, uma enzima indicada para a fabricação de queijo deve ter uma alta atividade coagulante e baixa atividade proteolítica, pois, a atividade proteolítica exerce grande influência nas características sensoriais do produto como aroma, textura e sabor (SILVA et al., 2017).

Figura 26. Estabilidade da atividade proteolítica a temperatura do extrato enzimático de *Penicillium* sp. URM 7965 e *P. decaturense* URM7966, ensaio de 180 minutos



4.4.7 Efeito da concentração de CaCl_2 na atividade coagulante do leite

A figura 27 mostra o efeito das diferentes concentrações de cloreto de cálcio (CaCl_2) na atividade coagulante do extrato bruto enzimático de *Penicillium* sp. URM 7965 e *Penicillium decaturense* URM7966. Para *Penicillium* sp. URM7965, a atividade máxima de coagulação ocorreu na concentração de 0,02M de CaCl_2 . O extrato enzimático apresentou atividade coagulante em todas as concentrações de CaCl_2 , com atividade residual acima de 30% para todas as concentrações. O cloreto de cálcio (CaCl_2) tem sido descrito como uma importante substância na formação de coágulos na fabricação de queijo, tendo como função reduzir o tempo de coagulação do leite. Esse sal age na agregação das micelas de caseína quando a temperatura e a concentração desses íons cálcio é suficientemente alta (ANEMA et al. 2005; FERNANDES, 2015).

Diferindo dos resultados encontrados neste estudo, Soares et al. (2015), observaram que 0,01M foi a concentração de CaCl_2 que estimulou uma maior atividade coagulante do extrato bruto enzimático da protease obtida do látex de *Artocarpus altilis*. Silva et al. (2013), também observaram um pico de coagulação da protease do látex de *Sideroxylon obtusifolium* na concentração de 0,01M de cloreto de cálcio. Em estudo realizado por Merheb-Dini (2010), a maior atividade coagulante foi observada na concentração de 0,04

M de CaCl_2 , assim como, em estudo de El-Baky et al. (2011) com o fungo *Piptoporus soloniensis*, os autores observaram o aumento na taxa de coagulação do leite com o aumento da concentração de CaCl_2 , sendo máxima em 0,04 M, com diminuição na atividade coagulante em concentrações superiores a 0,04 M. Silva et al.(2014), também observaram uma máxima atividade na concentração de 0,04 M de CaCl_2 com diminuição da atividade acima desta concentração. Estes autores associam essa diminuição da atividade coagulante provavelmente à saturação de resíduos negativos de micelas de caseína com o aumento da concentração no meio ou pelo aumento excessivo da força iônica. Neste estudo, a concentração máxima utilizada nos testes do efeito da concentração de CaCl_2 foi de 0,02M.

Para o isolado URM 7966, atividade máxima de coagulação, assim como o isolado URM 7965, foi observada numa concentração de 0,02M de CaCl_2 (Figura 27). É possível observar que houve atividade coagulante em todas as concentrações de CaCl_2 , com atividade relativa acima de 60% (Figura 27). Após a primeira etapa de coagulação, estimulada pela ação das enzimas sobre a fração “kapa” da caseína ao destruir a capacidade protetora das micelas, torna as partículas coloidais instáveis na presença de íons cálcio. Com isso, na segunda etapa da coagulação (não enzimática), o cloreto de cálcio age na agregação das micelas de caseína e consequente coagulação do leite (MERHEB-DINI, 2010; FERNANDES, 2015). Segundo Kumar et al. (2005), o cálcio foi considerado um potente ativador com aumento de 250% na atividade de coagulação do leite em relação ao controle (na ausência de íons de cálcio) em estudo realizado com a protease obtida de *Rhizopus oryzae*. Para Ordóñez et al. (2005), a coagulação do leite não depende apenas da concentração de cloreto de cálcio, mas também da temperatura, como observado por Soares et al. (2015), onde os resultados de coagulação na melhor concentração de CaCl_2 foi diretamente proporcional a temperatura, com 100% de atividade residual na temperatura de 80°C.

Figura 27. Efeito da concentração de CaCl_2 da atividade coagulante dos extratos bruto enzimáticos de *Penicillium* sp. URM 7965 e *P. decaturense* URM 7966

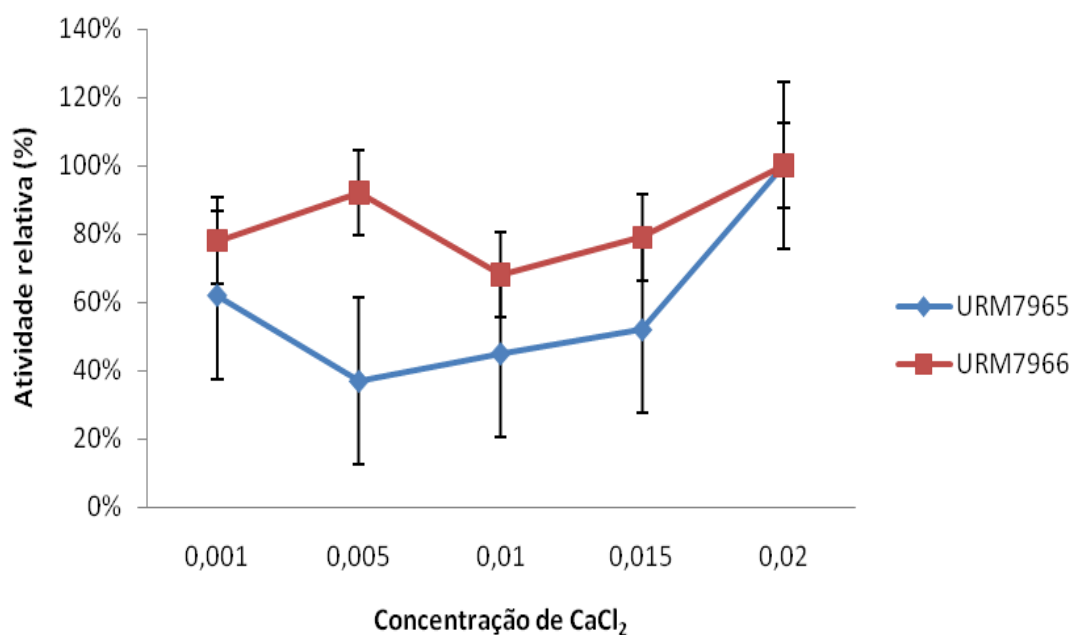


Figura 28. A e B - Coagulação enzimática apresentada pelo isolado *Penicillium* sp. URM 7965 na concentração de 0,02M de CaCl_2



4.4.8 Razão entre a atividade coagulante e proteolítica dos extratos bruto enzimáticos

A tabela 4 mostra os resultados da razão entre a atividade coagulante e proteolítica, antes e depois dos testes das melhores condições de produção da enzima. Os valores

obtidos através da razão entre a AC (U/mL) e AP (mg/mL), foi de 143 e 1784 para *Penicillium* sp. URM 7965 e de 312 e 1081 para *P. decaturense* URM 7966.

Tabela 4. Razão (R) entre a atividade coagulante (AC) e proteolítica (AP) dos fungos endofítico

Isolado		AC (U/mL)	AP (mg/mL) – D.O	R
URM 7965	Sem melhores condições	123	0,86	143
	Com melhores condições	1142	0,64	1784
URM 7966	Sem melhores condições	381	1,22	312
	Com melhores condições	800	0,74	1081

Silva et al. (2013), obtiveram uma razão de 5731 para a protease do látex de *Sideroxylon obtusifolium*, a qual os autores consideram uma alta proporção como um bom indicativo para o uso na produção de queijo. Para Arima et al. (1967), a protease de *Mucor pusillus* F-27, apresentou uma razão entre a atividade coagulante e proteolítica de 2000, que os autores também consideram promissora como um substituto do coalho com base em testes feitos com esta enzima. Segundo Merheb-Dini et al. (2010), os valores obtidos através da razão entre as atividades coagulante e proteolítica é um índice utilizado na caracterização de substitutos do coalho. De acordo com Guinee e Wilkinson (1992), este valor deve ser sempre alto, pois uma proporção elevada previne uma proteólise excessiva e não específica tanto durante a fabricação do queijo quanto a maturação, assegurando a razão proteína-peptídio correta, assim como o sabor, a forma e as características funcionais do queijo.

A protease de *Mucor bacilliformis*, estudada por Areces et al. (1992) apresentou os valores de proporção de 225,5 e 733,5 que os autores consideram semelhante ao observado em outros substitutos industriais. Em trabalho realizado por Silva et al. (2014), a protease obtida por fermentação submersa pelo fungo termofílico *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 apresentou uma razão AC/AP de 510. O extrato enzimático de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1493 no estudo de Alecrim et al. (2015), apresentou atividade coagulante de 68.61 U/ml e uma razão de 1.81. Os valores de atividade de coagulação e a razão foram

significativos para *Pleurotus albidus*, 73,39 U/ml e 21,60, respectivamente, em estudo de Martim et al. (2017). A relação entre a atividade coagulante do leite e a atividade proteolítica é de grande importância na fabricação de queijo, sendo assim, os resultados obtidos neste estudo apresentam uma alta proporção entre as atividades, semelhante a outras enzimas indicadas em outros estudos como potenciais para aplicação na indústria do queijo.

5 CONCLUSÃO

As espécies de bromélias *Dyckia limae* e *Tillandsia catimbauensis*, endêmicas do Parque Nacional do Catimbau, abrigam uma grande diversidade de fungos endofíticos além de ser fonte de novidades taxonômicas, fazendo delas importantes hospedeiros da diversidade ainda subestimada de florestas secas, principalmente da Caatinga. Além disso, os fungos endofíticos das bromélias apresentaram potencial para produção de enzimas proteolíticas e estas enzimas apresentaram grande capacidade coagulante do leite.

Penicillium e *Talaromyces* predominam entre os gêneros de fungos endofíticos de *T. catimbauensis* e espécies pertencentes a classe Dothideomycetes predominam entre os de *D. limae*. *Penicillium* sp1 e *Penicillium* sp2 são propostas como novas espécies para a ciência.

Para utilização em processos biotecnológicos que envolvam a atividade de coagulação do leite estão sendo indicados o pH 8,5 a 45°C para *Penicillium* sp. URM 7965 e pH 8,0 a 40° ou 45°C para *P. decaturense* URM 7966. Para a atividade proteolítica, o pH 7,0 ou o 8,5 a 45°C para *Penicillium* sp. URM 7965 e o pH 8,0 a 65°C para *Penicillium decaturense* URM 7966 são indicados.

As proteases dos extratos brutos enzimáticos tanto do *Penicillium* sp. URM 7965 quanto do *Penicillium decaturense* URM 7966 são estáveis em uma ampla faixa de pH, o que é uma excelente característica para processos biotecnológicos. Já a temperatura é um parâmetro que interfere na estabilidade das proteases dos extratos brutos enzimáticos tanto do *Penicillium* sp. URM 7965 quanto do *Penicillium decaturense* URM 7966.

Este é o primeiro estudo da diversidade de fungos endofíticos das bromélias e do potencial desses fungos em produzirem enzimas coagulantes do leite, sendo aqui sugerido novos estudos com as espécies *Penicillium* sp. URM 7965 e *Penicillium decaturense* URM 7966 para otimização da produção de proteases coagulantes para utilização na indústria de alimentos, principalmente na fabricação de queijo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE MEIO AMBIENTE (CPRH). 2015. Disponível em: <<http://www.cprh.pe.gov.br/home/41858;43088;10;2605;4108.asp>>.
- ALECRIM, M. M., PALHETA, R. A., TEIXEIRA, M. F. S., OLIVEIRA, I. M. D. A. Milk-clotting enzymes produced by *Aspergillus flavo furcatis* strains on Amazonic fruit waste. **International Journal of Food Science & Technology**, 50(1), 151-157. 2015.
- ALECRIM, M. M., MARTIM, S. R., DE SOUZA, B. C., TEIXEIRA, M. F. S. *Aspergillus flavo furcatis*: Aflatoxin test and milk-clotting protease production in submerged and solid state fermentation. **African Journal of Microbiology Research**, 11(7), 312-318. 2017.
- ALVES, L. D. S. 2013. Fabricação de queijo prato com diferentes proteases. *Dissertação de Mestrado*. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/255197>.
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, n. 6, p. 1829-1845, 2011.
- ANDRADE, V. S., SARUBBO, L. A., FUKUSHIMA, K., MIYAJI, M., NISHIMURA, K., CAMPOS-TAKAKI, G. M. D. Production of extracellular proteases by *Mucor circinelloides* using D-glucose as carbon source/substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, 33(2), 106-110. 2002.
- ANEMA, S. G.; LEE S. K.; KLOSTERMEYER, H. Effect of pH at heat treatment on the hydrolysis of κ -casein and the gelation of skim milk by chymosin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 99-106, 2005.
- ANDRADE-LIMA, D. The Caatingas dominium. **Revista Brasileira de Botânica**, v.4, n.2, p.149-163. 1981.
- ANDRADE-LIMA, D. de. Present-day forest refuges in northeastern Brazil. In: G.T. Prance (ed.). Biological diversification in the tropics. pp. 245-251. **Columbia University Press**, Nova York. 1982.
- ALBUQUERQUE, U. P., MEDEIROS, P. M., De ALMEIDA, A. L. S., MONTEIRO, J. M., NETO, E. M. D. F. L., DE MELO, J. G., DOS SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of ethnopharmacology**, 114(3), 325-354. . 2007.
- ALY, A. H; DEBBAD, A; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.90, p.1829 – 1845. 2011.
- ARAÚJO, F. S. A., FREIRE, F., GONÇALVES, F. J. T., LIMA, J. S., GUEDES, M. I. F. Fungos endofíticos associados às plantas de *Catharanthus roseus* no Estado do Ceará. *Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*. 2018.
- ARECES, L. B., BONINO, M. B. D. J., PARRY, M. A., FRAILE, E. R., FERNÁNDEZ, H. M., & CASCONE, O. Purification and Characterization of a Milk Clotting Protease from *Mucor bacilliformis*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 37(3), 283-294. 1992.
- ARIMA, K., IWASAKI, S., & TAMURA, G. Milk clotting enzyme from microorganisms: Part I. Screening test and the identification of the potent fungus part II. The enzyme production and the properties of crude enzyme. *Agricultural and Biological Chemistry*, 31(5), 540-551. 1967.
- ARNOLD, A. E., HERRE, E. A. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). **Mycologia**, 95(3), 388-398. 2003.
- ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal biology reviews**, 21(2), 51-66. 2007.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. (Ed.) **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA, p. 117-137. 1998.

- AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista Brasileira de Botânica**, v.22, n. 2, p. 225-229. 1999.
- BARFUSS, M.H.J., ROSABELLE, S., TILL, W. STUESSY, T.F. Phylogenetic relationships in subfamily *Tillandsioideae* (*Bromeliaceae*) based on DNA sequence data from seven plastid regions. **American Journal of Botany** 92:337-351. 2005.
- BENZING, D.H. *Bromeliaceae: Profile of an adaptative radiation*. **Cambridge University Press**, Cambridge 689 p. 2000.
- BENNETT, B. C., D. H. BENZING. "Ethnobotany of Bromeliaceae in Bromeliaceae: Profile of an adaptative radiation." *Benzing, DH, ed.* 2000.
- BEZERRA, J.D.P., SANTOS, M.G.S., SVEDESE, V.M., LIMA, D.M.M., FERNANDES, M.J.S., PAIVA, L.M., SOUZA-MOTTA, C.M. Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 28: 1989-1995. 2012.
- BEZERRA, J.D.P., LOPES, D.H.G., SANTOS, M.G.S., SVEDESE, V.M., PAIVA, L.M., ALMEIDA-CORTEZ, J.S., SOUZA-MOTTA, C.M. Riqueza de micro-organismos endofíticos em espécies da família Cactaceae. **Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas** 9(2): 19-23. 2012.
- BEZERRA, J.D.P., SANTOS, M.G.S., BARBOSA, R.N., SVEDESE, V.M., LIMA, D.M.M., FERNANDES, M.J.S., GOMES, B.S., PAIVA, L.M., ALMEIDA-CORTEZ, J.S., SOUZA-MOTTA, C.M. Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: a first study. **Symbiosis**. doi: 10.1007/s13199-013-0243-1. 2013.
- BEZERRA, J. D. P., de AZEVEDO, J. L., SOUZA-MOTTA, C. M. Why Study Endophytic Fungal Community Associated with Cacti Species?. In *Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics* (pp. 21-35). **Springer International Publishing**. 2017a.
- BEZERRA, J. D. P.; OLIVEIRA, R. J. V.; PAIVA, L. M. ; SILVA, G. A. ; GROENEWALD, J. Z. ; CROUS, P. W. ; SOUZA-MOTTA, C. M. Bezerromycetales and Wiesneriomycetales ord. Nov. (class Dothideomycetes), with two novel genera to accommodate endophytic fungi from brazilian cactus. **Mycological progress**, v. 16, p. 297-309. 2017b.
- BEZERRA, J. D. P.; SANDOVAL-DENIS, M. ; PAIVA, L. M. ; SILVA, G. A.; GROENEWALD, J. Z.; SOUZA-MOTTA, C.M.; CROUS, P. W. New endophytic *Toxicocladosporium* species from cacti in Brazil, and description of *Neocladosporium* gen. nov.. *Ima Fungus*, P. 77-97. 2017c.
- BRAKHAGE, A.A., SCHROECKH, V. Fungal secondary metabolites - Strategies to activate silent gene clusters. **Fungal Genetics Biology**. 2010.
- BRUNO, M. A., LAZZA, C. M., ERRASTI, M. E., LÓPEZ, L. M. I., CAFFINI, N. O., PARDO, M. F. Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits. **LWT e Food Science and Technology**, 43, 695e701. 2010.
- BRUNO, M.A.; TREJO, S.A.; AVILÉS, F.X.; CAFFINI, N.O.; LÓPEZ, L.M.I. Cloning, Sequencing, and Identification Using Proteomic Tools of a Protease from *Bromelia hieronymi* Mez. **Applied Biochemistry Biotechnology**. 165:583–593. 2011.
- BUATONG, J.; PHONGPAICHIT, S.; RUKACHAISIRIKUL, V.; SAKAYAROJ, J. Antimicrobial activity of crude extracts from mangrove fungal endophytes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 27:3005-3008. 2011.
- BUDZISZEWSKA J, BOULAHDJEL A, WILK M, WRZOSEK M. Soil zygomycetous fungi in Biebrza National Park (Northeast Poland). *Polish Botanical Journal* 55: 391-407. 2010.
- BÜNEKER, H. M., PONTES, R. C., SOARES, K. P. Duas novas espécies de *Tillandsia* L., subgênero *Anoplophytum* (Beer) Baker (*Bromeliaceae*, *Tillandsioideae*) para a flora sul brasileira. **Iheringia. Série Botânica.**, 69(1), 89-96. 2014.

- CASTELLETTI, C. H. M., SILVA, J. M. C. D., TABARELLI, M., SANTOS, A. M. M. Quanto ainda resta da Caatinga? Uma estimativa preliminar. **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife: Editora da Universidade Federal de Pernambuco, 719-734. 2003.
- CASTRO, H. F., MENDES A. A., PEREIRA, E. B., JÚNIOR A. F. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química nova**, v. 28, p. 296-305. 2005.
- CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Production and biochemical characterization of protease from *Aspergillus oryzae*: an evaluation of the physical–chemical parameters using agroindustrial wastes as supports. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 3(3), 20-25. 2014.
- CHANDRA, S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 95:47–59. 2012.
- CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, 421-437. 2013.
- CHEN, C.; BAUSKE, E. M.; MUSSON, G.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; KLOPPER, J.W. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, v.5, p.83-91. 1994.
- CHOWDHARY, K.; KAUSHIK, N.; COLOMA, A. G.; RAIMUNDO, C. M. Endophytic fungi and their metabolites isolated from Indian medicinal plant. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, v. 11, n. 4, p. 467–485. 2012.
- CLAY. K. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. **Ecology** v. 69: p.10–16. 1988.
- CLAY, K., SCHARDL, C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. **The American Naturalist** v. 160: p. 99–S127. 2002.
- COIMBRA-FILHO, A.F., I. de G. Câmara. Os limites originais do bioma Mata Atlântica na região Nordeste do Brasil. **Fundação Brasileira para Conservação da Natureza**, Rio de Janeiro. 1996.
- COMPANT, S.; SESSITSCH, A.; MATHIEU, F. The 125th anniversary of the first postulation of the soil origin of endophytic bacteria – a tribute to M . L . V . Galippe. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 299–301. 2012.
- CORREIA, A. M., LIRA, S. P., ASSIS, M. A., & RODRIGUES, A. Fungal Endophyte Communities in Begonia Species from the Brazilian Atlantic Rainforest. **Current microbiology**, 75(4), 441-449. 2018.
- CRUZ, G. A., ZIZKA, G., SILVESTRO, D., LEME, E. M., SCHULTE, K., e BENKO-ISEPPON, A. M. Molecular phylogeny, character evolution and historical biogeography of *Cryptanthus* Otto & A. Dietr.(Bromeliaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 107, 152-165. 2017.
- CUNHA, J. R. B., DOS SANTOS, F. C. P., DE ASSIS, F. G. D. V., & LEAL, P. L. Cultivo de *Penicillium* spp. em resíduos da colheita de soja para produção de celulase, protease e amilase. *Ceres*, 63(5). (2016).
- CUZZI, C., LINK, S., VILANI, A., Onofre, S. B. Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis Dracunculifolia* DC (ASTERACEAE). **Global Science and Technology**, 4(2). 2011.
- DEMAIN, A. Microbial Secondary Metabolism: a New Opportunity for Industry. **Ciba Foundation Symposium**. 3-23. 1992.
- DELGADO JÚNIOR, D., CAROLINO, G., BURIL, M. T., ALVES, M. Convolvulaceae of National Park Catimbau, Pernambuco, Brazil. **Rodriguésia**, 65(2), 425-442. 2014.
- DEVI NN, PRABAKARAN JJ. Bioactive metabolites from an endophytic fungus *Penicillium* sp. isolated from *Centella asiatica*. *Curr Res Environ Appl Mycol* 4(1): 34-43. 2014.

- DIAS, M. L., PREZOTO, F., de ABREU, P. F., NETO, L. M. Bromélias e suas interações com a fauna. **CES Revista**, 28(1), 3-16. 2014.
- EL-BAKY, H. A., LINKE, D., NIMTZ, M., & BERGER, R. G. PsoP1, a milk-clotting aspartic peptidase from the basidiomycete fungus *Piptoporus soloniensis*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(18), 10311-10316. 2011.
- ESTEVES, D., SOARES, N. R., SANTOS, M. P., OKI, Y., FERNANDES, G. W. Fungos endofíticos como mediadores na relação entre *Baccharis dracunculifolia* e herbívoros no Parque Nacional da Serra do Cipó, MG. SEB, Sociedade de Ecologia do Brasil. Anais **do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**, 23 a 28 de Setembro, Caxambu – MG. 2007.
- FABRICANTE, J. R.; ARAÚJO, K. C. T.; FERREIRA, J. V. A.; CASTRO, R. A.; SILVA, A. C. C. P.; FILHO, J. A. S. Categorização do risco de extinção de *Dyckia limae* L. B. Sm. e *Tillandsia catimbauensis* Leme, W. Till & J. A. Siqueira por meio de critérios de distribuição geográfica. **Revista Biotemas**, 27 (2). 2014.
- FAETH, S. H.; FAGAN, W. F. Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists. **Integrated and Computational Biology** v. 42, p. 360–368. 2002.
- FERREIRA, J. V., FABRICANTE, J. R., FILHO, J. A. S. Checklist preliminar de Bromeliaceae do Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil. 2015.
- FORZZA, R.C.; COSTA, A.; SIQUEIRA FILHO, J.A.; MARTINELLI, G.; MONTEIRO, R.F.; SANTOS-SILVA, F.; SARAIVA, D. P.; PAIXÃO-SOUZA, B.; LOUZADA, R.B.; VERSIEUX, L. 2015. *Bromeliaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB66>>.
- FRANÇA-SANTOS, A., R. S. ALVES, N. S. LEITE, R. P. M. FERNANDES. "Estudos bioquímicos da enzima bromelina do *Ananas comosus* (abacaxi)." **Scientia Plena** 5, no. 11. 2009.
- FELIX CR, NAVARRO HMC, PAULINO GVB, BROETTO L, JANDELL MF. *Carlosrosaea hohenbergiae* sp. Nov. And *Carlosrosaea aechmeae* sp. Nov., two tremellaceous yeasts isolated from bromeliads in north-eastern brazil. *Int J Syst Evol Microbiol* 67: 1752-1757. 2017.
- FERNANDES, J. Produção de queijo origem dos coalhos. Disponível em <http://www.agronegocios.eu/noticias/producao-de-queijo-origem-dos-coalhos/> 2013.
- FREIRE, K. T. L. S.; ARAÚJO, G. R., BEZERRA, J. D., BARBOSA, R. N., SILVA, D. C., SVEDESE, V. M.; SOUZA-MOTTA, C. M. Fungos endofíticos de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.(Cactaceae) sadia e infestada por *Dactylopius opuntiae* (Cockerell, 1896) (Hemiptera: Dactylopiidae). **Gaia Scientia**, 9(2). 2015.
- FIGUEIREDO, A.M.F., SAIKI, M., TICIANELLI, R.B., DOMINGOS, M., ALVES, E.S. MARKERT, B. Determination of trace elements in *Tillandsia usneoides* by neutron activation analysis for environmental biomonitoring. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry** 249:391-395. 2001.
- FIGUEIREDO, A.M.F., ALCALA, A.L., TICIANELLI, R.B., DOMINGOS, M. SAIKI, M. The use of *Tillandsia usneoides* L. as bioindicator of air pollution in São paulo, Brazil. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**. 259:59-63. 2004.
- FLORESTAS DO BRASIL EM RESUMO: dados de 2007 a 2012. 2013. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro, 188p.
- GANLEY, R. J.; BRUNSFELD, S. J.; NEWCOMBE, G. A community of unknown, endophytic fungi in western white pine. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA** 101: 10107–10112. 2004.
- GAZIS, R.; CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. *Fungal ecology*, 3(3), 240-254. 2010.

- GERMANO, S., PANDEY, A., OSAKU, C. A., ROCHA, S. N., & SOCCOL, C. R. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme and microbial technology*, 32(2), 246-251. 2003.
- GIONGO, A., BENEDUZI, A., GANO, K., VARGAS, L. K., UTZ, L., PASSAGLIA, L. M. P. Characterization of plant growth-promoting bacteria inhabiting *Vriesea gigantea* Gaud. and *Tillandsia aeranthos* (Loiseleur) LB Smith (Bromeliaceae). **Biota Neotropica**, 13(3), 80-85. 2013.
- GIULIETTI, A. M., BOCAGE NETA, A. L., CASTRO, A. A. J. F., GAMARRA-ROJAS, C. F. L., SAMPAIO, E. V. S. B., VIRGÍNIO, J. F., HARLEY, R. M. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**, 48-90. 2004.
- GIVNISH, T.J., MILLIAM, K.C., BERRY, P.E., SYTSMA, K.J. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. *Aliso* 23, 3–26. 2007.
- GIVNISH, T.J., BARFUSS, M.H., VAN EE, B., RIINA, R., SCHULTE, K., HORRES, R., GONSISKA, P., JABAILY, R., CRAYN, D., SMITH, J., WINTER, K., BROWN, G., EVANS, T., HOLST, B., LUTHER, H., TILL, W., ZIZKA, G., BERRY, P., SYTSMA, K., Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**. 98, 872–895. 2011.
- GÓMEZ ROMERO, S. E.; NOVARA, L. Bromeliaceae. *Aportes Botanicos de Salta-Serie Flora*, v. 9, n. 7, p. 1-137. 2010.
- GONÇALVES, A. B., FERREIRA MAIA, A. C., RUEDA, J. A., DE FIGUEIREDO CONTE VANZELA, A. P. Fungal production of the anti-leukemic enzyme L-asparaginase: from screening to medium development. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 38(4). 2016.
- GONZÁLEZ-TEUBER M, VILO C, BASCUÑÁN-GODOY L. Molecular characterization of endophytic fungi associated with the roots of *Chenopodium quinoa* inhabiting the Atacama Desert, Chile. *Genomics data* 11: 109-112. 2017.
- GOUDA, E.J., BUTCHER, D., GOUDA, K. 2015. Encyclopaedia of Bromeliads Version 3.1, Disponível em <<http://botu07.bio.uu.nl/bcg/encyclopedia/brome/>>.
- GUINEE, T. P.; WILKINSON, M. G. Rennet coagulation and coagulants in cheese manufacture. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 45, p. 94-104, 1992.
- GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**. 00 1 _/18. 2003.
- HARBOE, M.; BROE, M. L.; QVIST, K. B. 2010. The production, action and application of rennet and coagulants. In LAW, B. A.; TAMIME, A. Y. (Ed.). *Technology of cheesemaking*, Blackwell Publishing , 2ª ed. 482 p.
- HASHEM, A. M. Optimization of milk-clotting productivity by *Penicillium oxalicum*. *Bioresource Technology*, 70, 203–207. 2000.
- HAUFF, S. N. Representatividade do Sistema Nacional de Unidades de Conservação na Caatinga. *Programa das Nações Unidas Para o Desenvolvimento, Brasília, Brazil*, 54. 2010.
- HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235–25. 2006.
- HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, 109: 1422-1432. 2001.
- HIRSCH, L. D. Origem híbrida e padrões de fluxo gênico entre três espécies simpátricas de *Dyckia* (BROMELIACEAE) endêmicas do Rio Grande do Sul: implicações e conservacionistas. **Dissertação de Mestrado**. 2016.

- HOFF JA, KLOPFENSTEIN NB, MCDONALD GI, *et al.* Fungal endophytes in woody roots of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and ponderosa pine (*Pinus ponderosa*). *Forest Pathology* 34: 255-271. 2004.
- HOLST, B.K.; LUTHER, H.E. Bromeliaceae (bromeliad family). In *Flowering plants of the Neotropics* (N. Smith, S.A. Mori, A. Henderson, D.W. Stevenson, S.V. Heald, eds). **Princeton University Press**, Princeton, p.418-421. 2004.
- HUANG, Q., AN, H., SONG, H., MAO, H., SHEN, W., & DONG, J. Diversity and biotransformative potential of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Kadsura angustifolia*. *Research in microbiology*, 166(1), 45-55. (2015).
- IAMANAKA BT, OLIVEIRA IS, TANIWAKI MH. Micotoxinas em alimentos. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, Recife 7(1): 138-161. 2010.
- IBAMA. Decreto, s/n, de 13 de dezembro de 2002. Dispõe sobre a criação do Parque Nacional do Catimbau, nos Municípios de Ibimirim, Tupanatinga e Buíque, no Estado de Pernambuco, e dá outras providências. Brasília. 2002.
- ICMBIO. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. 2012. Caatinga. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/unidadesdeconservacao/biomas-brasileiros/caatinga>>.
- IKASARI, L., MITCHELL, D. A. Leaching and characterization of *Rhizopus oligosporus* acid protease from solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, 19(3), 171-175. 1996.
- IPA, Instituto Agronômico de Pernambuco. Cresce produção de queijos de Pernambuco. 2009. Disponível em: http://www.ipa.br/noticias_detalhe.php?idnoticia=896&secao=1.
- IKRAM-UL-HAQ; MUKHTAR, H. Biosynthesis of acid proteases by *Penicillium griseoroseum* IH-02 in solid-state fermentation. *Pak. J. Botv* 39. 2007.
- JIANG, Z.D., AN, Z. Bioactive fungal natural products through classic and biocombinatorial approaches ,in: A.U. Rahman (Ed.), **Studies in Natural Products Chemistry**; Bioactive Natural Products (Part C), Volume 22Elsevier, New York , pp. 245–272. 2000.
- JORNAL DO COMMERCCIO. Produtores de queijo coalho do Agreste mais perto do sele de qualidade. 2006. Disponível em: <http://jconline.ne10.uol.com.br/canal/economia/pernambuco/noticia/2016/08/26/produtores-de-queijo-coalho-do-agreste-mais-perto-do-selo-de-qualidade-250257.php>.
- KAUL, S., GUPTA, S., AHMED, M., DHAR, M. K. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 4, p. 487–505. 2012.
- KHIRALLA, A., SPINA, R., YAGI, S., MOHAMED, I., LAURAIN-MATTAR, D. Endophytic fungi: occurrence, classification, function and natural products. **Endophytic fungi: diversity, characterization and biocontrol**. 2017.
- KIILL, L.H.P. Bioma Caatinga. AGEITEC – Agência Embrapa de Informação Tecnológica. 2017. Disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/bioma_caatinga/arvore/CONT000glz1ehqv02wx5ok0f7mv200nvg0xn.html>. Acesso em fevereiro de 2017.
- KIRICHUK NN, PIVKIN MV, MATVEEVA TV. Three new *Penicillium* species from marine subaqueous soils. *Mycol Prog* 16(1): 15-26. 2017.
- KRAPP, F., WÖHRMANN, T., DE BARROS PINANGÉ, D. S., BENKO-ISEPPON, A. M., HUETTEL, B., WEISING, K. A set of plastid microsatellite loci for the genus *Dyckia* (Bromeliaceae) derived from 454 pyrosequencing. **American journal of botany**, 99(12), e470-e473. 2012.
- KRAPP, F., PINANGÉ, D.S.B., BENKO-ISEPPON, A.M., LEME, E.M.C., WEISING, K. Phylogeny and evolution of *Dyckia* (Bromeliaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequences. **Plant Systematics and Evolution**, DOI 10.1007/s00606-014-0985-0. 2014.

- KRINGS, M., TAYLOR, T. N. HASS, H., KERP. H., DOTZLER, N., HERMSEN, E. J. Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. **New Phytol** v. 174: p. 648–657. 2007.
- KRISHNAPURA, P. R., BELUR, P. D. Partial purification and characterization of l-asparaginase from an endophytic *Talaromyces pinophilus* isolated from the rhizomes of *Curcuma amada*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 124, 83-91. 2016.
- KUMAR, S.; SHARMA, N. S.; SAHARAM, M. R.; SINGH, R. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**. 2005.
- LACERDA, L. T., GUSMÃO, L. F., RODRIGUES, A. Diversity of endophytic fungi in *Eucalyptus microcorys* assessed by complementary isolation methods. **Mycological Progress**, 17(6), 719-727. 2018.
- LACTO-LAB. Disponível em <http://www.lactolab.com.br/coagulante-liquido-ultra.html>. 2018.
- LANDELL, M. F., MAUTONE, J. N., VALENTE, P. Biodiversity of yeasts associated to bromeliads in Itapuã park, Viamão/RS. **Biociências**, 14, 144-149. 2006.
- LANDELL MF, SANTOS, ARO, VAINSTEIN MH, BROETTO L, SAFAR SVB, MOTT T, RAMOS JP, BRANDÃO LR, ROSA CA, VALENTE, P, FÉLIX, CR, GOMES FCO, PAGANI, DM. *Bullera vrieseae* sp. Nov., a tremellaceous yeast species isolated from bromeliads. *Int J Syst Evol Microbiol* 65: 2466-2471. 2015.
- LEAL, I. R., DA SILVA, J. M. C. Ecologia e conservação da Caatinga. **Editora Universitária UFPE**. 2003.
- LEAL, I.R., SILVA, J.M.C., TABARELLI, M., LACHER JR., T.E. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. **Megadiversidade** 1(1): 139-146. 2005.
- LEAL AFG, MACÊDO DPC, SOUZA-MOTTA CMD, FERNANDES MJDS, MAGALHÃES OMC, NEVES RP. Ocorrência de fungos filamentosos de importância médica em água de bebedouros. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 69(4): 576-579. 2010.
- LOIOLA, M. I. B.; ROQUE, A. A.; OLIVEIRA, A. C. P. Caatinga: Vegetação do semiárido brasileiro. **Revista Ecologia**, v. 4. p. 14-19. 2012.
- LLORENTE, B. E.; BRUTTI, C. B.; CAFFINI, B. O. Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 8182-8189, 2004.
- LUTHER, E.H. An alphabetical list of bromeliad binomials. *Bromeliad Society International, Sarasota*, ed. XII, p. 1-114. 2010.
- LUZ, G. B. Processo de extração das proteínas de soro de leite para produção de concentrado proteico. *Revista E-Tech: Tecnologias para Competitividade Industrial*-ISSN-1983-1838, 9(2), 137-150. 2016.
- LADEIRA, S.A.; ANDRADE, M.V.V.; DELATORRE, A.B.; PEREZ, V.H.; MARTINS, M.L.L. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* sp em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. **Química Nova**, Vol. 33, No. 2, 324-328. 2010.
- MAHAPATRA, S., BANERJEE, D. Diversity and screening for antimicrobial activity of endophytic fungi from *Alstonia scholaris*. **Acta microbiologica et immunologica Hungarica**, 57(3), 215-223. 2010.
- MAKI, C. S. Diversidade e Potencial Biotecnológico de Fungos Endofíticos de Cacao *Theobroma cacao* L. **Tese de Doutorado**, Sector de Agronomia, Genética e Melhoramento de Plantas. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2006.
- MANETTI, L. M., DELAPORTE, R. H., LAVERDE, J. R. Metabólitos secundários da família Bromeliaceae. **Química Nova**, 32(7), 1885-1897. 2009.

- MARACAJÁ, P.B., BENEVIDES, D.S. Estudo da Flora Herbácea da Caatinga no Município de Caraúbas no Estado do Rio Grande do Norte. **Revista de Biologia e Ciências da Terra** 6:165-175. 2006.
- MARTIM, S. R., SILVA, L. S. C., DE SOUZA, L. B., DO CARMO, E. J., ALECRIM, M. M., DE VASCONCELLOS, M. C., TEIXEIRA, M. F. S. *Pleurotus albidus*: A new source of milk-clotting proteases. **African Journal of Microbiology Research**, 11(17), 660-667. 2017.
- MASSIMO, N. C., NANDI DEVAN, M. M., ARENDT, K. R., WILCH, M. H., RIDDLE, J. M., FURR, S. H., STEEN, C., U'REN, J. M., SANDBERG, D. C., ARNOLD, A. E. Fungal endophytes in aboveground tissues of desert plants: infrequent in culture, but highly diverse and distinctive symbionts. *Microbial Ecology*, v. 70, n. 61-76, 2015.
- MELO, J. I. M. Flora do Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil: Boraginaceae sensu lato. **Biotemas**, v. 25, n. 4, p. 109-120, dez. 2012.
- MELO, C. D. A. Filogeografia de cinco espécies de *Dyckia* (Bromeliaceae) endêmicas de uma região do centro-oeste brasileiro, que compreende os biomas cerrado, pantanal e chaco, em comparação com uma congênera, amplamente distribuída. **Dissertação de Mestrado**. 2016.
- MENDONÇA, P. G., BARBOSA, J. C., DEMATTÊ, M. E. S. P. Modelos de regressão para estimativa da área foliar de espécies brasileiras do gênero *Tillandsia* L.(Bromeliaceae). **Ornamental Horticulture**, 11(1). 2005.
- MERHEB-DINI, C., GOMES, E., BOSCOLO, M., DA SILVA, R. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31:(Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31). **Food Chemistry**, 120(1), 87-93. 2010.
- MMA, Ministério do Meio Ambiente. Decreto de 13 de dezembro de 2002. Criação do Parque Nacional do Catimbau. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/dnn/2002/Dnn9771.htm>
- MMA, Ministério do meio ambiente. 2017. Caatinga. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>>. Acesso em março de 2017.
- MMA - Ministério do Meio Ambiente. 2007. Mapa da Cobertura Vegetal dos Biomas Brasileiros. Brasília: MMA. 17 p.
- MOREIRA, B. A., WANDERLEY, M. D. G. L., CRUZ-BARROS, M. A. V. Bromélias: Importância ecológica e diversidade. **Taxonomia e morfologia. Instituto de botânica – IBt**, São Paulo, p. 12, out. 2006.
- MOREIRA, K. A., ALBUQUERQUE, B. F., TEIXEIRA, M. F. S., PORTO, A. L. F., & LIMA FILHO, J. L. Application of protease from *Nocardia* sp. as a laundry detergent additive. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(4), 309. 2002.
- MOURA, G.F., BULLA, L.M.C., POLONIO, J.C. PAMPHILE, J.A. Seleção de endofíticos com potencial biotecnológico na biorremediação de corante têxtil. *Anais Eletrônico IX EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica Uni Cesumar* Nov. n. 9, p. 4-8. ISBN 978-85-8084-996-7. 2015.
- MURALI, T.S. L-asparaginase from marine derived fungal endophytes of seaweeds. **Mycosphere**.147-55. 2011.
- NANDHINI, M., RAJINI, S. B., UDAYASHANKAR, A. C., NIRANJANA, S. R., LUND, O. S., SHETTY, H. S., & PRAKASH, H. S. Diversity, plant growth promoting and downy mildew disease suppression potential of cultivable endophytic fungal communities associated with pearl millet. *Biological Control*, 127, 127-138. 2018.
- NASCIMENTO, L. M., RODAL, M. J. N., SILVA, A. G. Florística de uma floresta estacional no Planalto da Borborema, nordeste do Brasil. **Rodriguésia-Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 63(2). 2012.

- NEVES, K. C. S. Produção de proteases coagulantes por espécies de *Pleurotus* em resíduos vegetais da Amazônia. **Tese de Doutorado**. Programa de pós-graduação em biotecnologia, Renorbio RECIFE. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco). 2014.
- NOGUEIRA, A. C., CÔRTEZ, I. MR., VERÇOZA, F. C. A. Família Bromeliaceae na Área de Proteção Ambiental de Grumari. **Natureza on line**, Rio de Janeiro, v.9, n.2, p. 91-95. 2011.
- NUR, A. Endophytic Fungi to Control of Cocoa Pod Borer (*Conopomorpha cramerella*) on Cocoa Plantation. ISSN: 0975-8585 **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**. 2016.
- OLIVEIRA, C. T., OLIVEIRA A.P.P., SUGAI, L. S. M., POSSIEDE, Y. M. Controle biológico: Fungos endofíticos com potencial antagonico a antracnose da soja *Glycine max* (L.) Merr. SEB, **Sociedade de Ecologia do Brasil**. X Congresso de Ecologia do Brasil, São Lourenço – MG. 16 a 22 de Setembro de 2011.
- OECO. 2017. Disponível em: <<http://www.oeco.org.br/reportagens/refugio-tatu-bola-deixa-de-existir/>>.
- OLIVEIRA CM, REGASINI LO, SILVA GH, PFENNING LH, YOUNG MC, BERLINCK RG, ARAUJO AR. Dihydroisocoumarins produced by *Xylaria* sp. and *Penicillium* sp., endophytic fungi associated with *Piper aduncum* and *Alibertia macrophylla*. *Phytochem Lett* 4(2): 93-96. 2011.
- OLIVEIRA, K.M., BOAS, E.V., BONETT, L.P., JÚNIOR, E.L., BERNARDI-WENZEL, J. Isolamento e atividade antibacteriana de fungos endofíticos de *Piper glabratum* kunth. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**. Sep 8;19(1). 2015.
- ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de Alimentos. Alimentos de Origem Animal**. Porto Alegre: Artmed, v. 2, p. 85-103. 2005.
- ORLANDELLI, R. C., SPECIAN, V., FELBER, A. C., PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, 7(3). 2012.
- ORLANDELLI R.C., ALMEIDA TT, ALBERTO RN, POLONIO JC, AZEVEDO JL, PAMPHILE JA. Antifungal and proteolytic activities of endophytic fungi isolated from *Piper hispidum* Sw. *Braz J Microbiol*. Jun;46(2):359-66. 2015.
- OZTURKOGLU-BUDAK, S., WIEBENGA, A., BRON, P. A., & DE VRIES, R. P. Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese. *International journal of food microbiology*, 237, 17-27. 2016.
- PÁDUA, A. P. S. L. D., FREIRE, K. T. L. D. S., OLIVEIRA, T. G. L. D., SILVA, L. F. D., ARAÚJO-MAGALHÃES, G. R., AGAMEZ-MONTALVO, G. S., SOUZA-MOTTA, C. M. D. Fungal endophyte diversity in the leaves of the medicinal plant *Myracrodruon urundeuva* in a Brazilian dry tropical forest and their capacity to produce L-asparaginase. *Acta Botanica Brasilica*, (AHEAD). 2018.
- PARK, Y. H., LEE, S. G., AHN, D. J., KWON, T. R., PARK, S. U., LIM, H. S., BAE, H. Diversity of fungal endophytes in various tissues of *Panax ginseng* Meyer cultivated in Korea. **Journal of ginseng research**, 36(2), 211. 2012.
- PEIXOTO-NETO, P. A. S., AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia. Ciência e Desenvolvimento**. V. 29, p. 62-76. 2002.
- PEIXOTO NETO, P. A. S., AZEVEDO, J. L., CAETANO, L. C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago, v. 3, n. 4, p. 69-72. 2004.
- PENNINGTON, R. T., LAVIN, M., PRADO, D. E., PENDRY, C. A., PELL, S. K., BUTTERWORTH, C. A. Historical climate change and speciation: neotropical seasonally dry

- forest plants show patterns of both Tertiary and Quaternary diversification. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, 359(1443), 515-538. 2004.
- PHADATARE, S. U.; DESHPANDE, V. V.; SRINIVASAN, M. C. High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): Enzyme production and compatibility with commercial detergents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 6, p. 15-72. 1993.
- PI'ITEK M, LUTZ M, SOUSA FMP, SANTOS ARO, FÉLIX CR, LANDELL MF, GOMES FCO, ROSA CA. *Pattersoniomyces tillandsiae* gen. Et comb. Nov.: linking sexual and asexual morphs of the only known smut fungus associated with bromeliaceae. *Org Divers Evol* 17: 531-543. 2017.
- PONTES, R. A. S., DE FÁTIMA AGRA, M. Flora da Paraíba, Brasil: *Tillandsia* L.(Bromeliaceae). **Rodriguésia**, 47-61. 2006.
- PRADE CA, MATSUMURA ATS. Comunidade de fungos do solo em uma floresta ripária na região de Roca Sales, Rio Grande do Sul, Brasil. *Caderno de Pesquisa* 26(1): 36-46. 2014.
- PRADO, D. As caatingas da América do Sul. In: I.R. Leal, M. Tabarelli & J.M.C. Silva (eds.). *Ecologia e conservação da Caatinga*. pp. 3-73. **Editora Universitária**, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. 2003.
- PRANCE, G.T. Vegetation. In: T.C. Whitmore, G.T. Prance (eds.). *Biogeography and Quaternary history in tropical America*. pp: 28-45. **Oxford Science Publications**, Oxford, Reino Unido. 1987.
- PREETHA, S.; BOOPATHY, R. Purification and characterization of a milk clotting protease from *Rhizomucor miehei*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(5), 573-578. 1997.
- RIBEIRO, A. S.; PAMPHILE, J. A. Micro-organismos endofíticos e seu potencial biotecnológico. **Revista Uningá Review**, v. 29, n. 3, 2018.
- RIZZINI, C.T. Nota prévia sobre a divisão fitogeográfica do Brasil. **Revista Brasileira de Geografia**, Rio de Janeiro: IBGE, ano 25, n. 1, p. 3-64, jan./mar. 1963.
- ROBL D, DELABONA P, MERGEL CM, ROJAS JD, COSTA P, PIMENTEL IC, *et al.* The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. *BMC Biotechnology*. 13(1):94. 2013.
- RODRIGUES, N. M., MOTA FILHO, F. O., PEREIRA, E. C. Impactos Ambientais Na Zona De Amortecimento Do Parque Nacional Do Catimbau, Pernambuco, Brasil. **II Seminário Ibero-Americano de Geografia Física**. Coimbra-PT, 1-13. 2010.
- RODRIGUES, M. L. F., DA SILVA, E. A., BROBA, C. E., OLIVEIRA, A. C. D., KRUGER, C., RAIMUNDO, R. W., STUANI, B. T. Produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo endofítico *Penicillium* sp. isolado das folhas de *Ricinus communis* L. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, 4(2). 2015.
- RODAL, M.J.L.; ANDRADE, K.V.S.; SALES, M.F. GOMES, A.P.S. Fitossociologia do componente lenhoso de um refúgio vegetacional no município de Buíque, Pernambuco. **Revista Brasileira de Biologia** 58: 517-526. 1998.
- RODRIGUES, R. L. Fungos endofíticos associados à *Vellozia compacta* Mart. Ex Schult. F. (Velloziaceae) presentes em afloramentos rochosos nos estados de Minas Gerais e Tocantins. **Dissertação de mestrado**. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais. 2010.
- SADMET/INMET. Seção de Armazenamento de Dados Meteorológicos/Instituto de Meteorologia. 2013. Disponível em <http://www.inmet.gov.br/html/central_servicos/combo_produtos.html>.
- SÁNCHEZ-AZOFEIFA, G. A., QUESADA, M., RODRIGUEZ, J. P., NASSAR, J. M., STONER, K. E., CASTILLO, A., E FAJARDO, L. Research Priorities for Neotropical Dry Forests1. **Biotropica**, 37(4), 477-485. 2005.
- SANDRI, I. G., FONTANA, R. C., DA SILVEIRA, M. M. Influence of pH and temperature on the production of polygalacturonases by *Aspergillus fumigatus*. **LWT-Food Science and Technology**, 61(2), 430-436. (2015).

- SAMSON RA, SEIFERT KA, KUIJPERS AF, HOUBRAKEN JAMP, FRISVAD JC. Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial β -tubulin sequences. *Stud Mycol* 49(1): 175-200. 2004.
- SANTOS, A. J., BITTENCOURT, A. M., NOGUEIRA, A. S. Aspectos econômicos da cadeia produtiva das bromélias na região metropolitana de Curitiba e litoral paranaense. **Floresta**, 35(3). 2005.
- SANTOS, I. P., BEZERRA, J. D. P., SOUZA-MOTTA, C. M., SILVA CAVALCANTI, M., MENEZES LIMA, V. L. Endophytic mycobiota from leaves of *Indigofera suffruticosa* Miller (Fabaceae): The relationship between seasonal change in Atlantic Coastal Forest and tropical dry forest (Caatinga), Brazil. *African Journal of Microbiology Research*, 9(18), 1227-1235. 2015.
- SANTHALIN SHELLOMITH, A. S., PREETHA, B. Production of Milk Clotting Enzyme by *Penicillium camemberti*. **International Journal of ChemTech Research**, 11(02), 275-282. 2018.
- SAVITHA, S., SADHASIVAM, S., SWAMINATHAN, K., LIN, F. H. Fungal protease: production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, 42(2), 298-304. 2011.
- SAWANT, R.; NAGENDRAN, S. Protease: an enzyme with multiple industrial applications. **World Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 568-579. 2014.
- SCHULZ, B., BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, 109: 661-686. 2005.
- SIQUEIRA, G. R. Avaliação da Implementação do Parque Nacional do Catimbau-PE: análise do desenvolvimento sustentável na perspectiva do ecoturismo e da comunidade local. Recife, Universidade Federal de Pernambuco, CFCH Geografia. 2006.
- SILVA, G. A., ALMEIDA, W. E., MARTINS, E. S., & CORTES, M. S. Produção e caracterização de protease obtida por *Gliocladium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, 3(1). 2009.
- SILVA, A.C. et al. Potential of quixaba (*Sideroxylon obtusifolium*) latex as a milk-clotting agent. **Food Science and Technology**, v.33, p.494-499, Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612013000300017&script=sci_arttext>. doi: 10.1590/S0101-20612013005000075. 2013.
- SILVA, I. P. Fungos Endofíticos: Fonte Alternativa a metabólitos secundários de plantas. **Enciclopédia Biosfera**. Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18, p. 3888-3905. 2014.
- SILVA, B. L., GERALDES, F. M., MURARI, C. S., GOMES, E., & DA-SILVA, R. Production and characterization of a milk-clotting protease produced in submerged fermentation by the thermophilic fungus *Thermomucor indica-seudaticae* N31. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(4), 1999-2011. 2014.
- SILVA SANTOS, M. G., PEREIRA BEZERRA, J. D., SVEDESE, V. M., SOUSA, M. A., VASCONCELOS DA SILVA, D. C., CAVALCANTI MACIEL, M. D. H., DE SOUZA-MOTTA, C. M. Screening of endophytic fungi from cactus of the Brazilian tropical dry forest according to their L-asparaginase activity. **Sydowia**, 67, 147-156. 2015.
- SILVA, R. R., SOUTO, T. B., DE OLIVEIRA, T. B., DE OLIVEIRA, L. C. G., KARCHER, D., JULIANO, M. A., CABRAL, H. Evaluation of the catalytic specificity, biochemical properties, and milk clotting abilities of an aspartic peptidase from *Rhizomucor miehei*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 43(8), 1059-1069. 2016.
- SILVA, R. R., DE OLIVEIRA, L. C. G., JULIANO, M. A., JULIANO, L., DE OLIVEIRA, A. H., ROSA, J. C., CABRAL, H. Biochemical and milk-clotting properties and mapping of catalytic subsites of an extracellular aspartic peptidase from basidiomycete fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Food Chemistry*, 225, 45-54. 2017.
- VISHWANATHA KS, RAO AGA, SINGH SA. Production and characterization of a milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85:1849-1859. 2010.

- SILVA, R. D., DINI, C. M., GOMES, E. Aplicação de protease microbiana no processo de fabricação de queijo. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/147070>>. 2017.
- SIQUEIRA, M.V., BRAUN, U., SOUZA-MOTTA, C.M. *Corynespora subcylindrica* sp. nov., a new hyphomycete species from Brazil and a discussion on the taxonomy of corynespora-like genera. **Sydowia** 60(1): 113–122. 2008.
- SOARES, E. F., SILVA, A. C. D., QUEIROZ, A. E. S. D. F., GOMES, J. E. G., HERCULANO, P. N., & MOREIRA, K. A. Potential of breadfruit (*Artocarpus altilis*) latex as a milk-clotting agent. *Ciência Rural*, 45(1), 149-154. 2015.
- SOUZA, A.Q.L., SOUZA, A.D.L., FILHO, S.A., PIHEIRO, M.L.B., 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**, Manaus, v. 34, n. 2. 2004.
- SOUZA, P. M. D., BITTENCOURT, M. L. D. A., CAPRARA, C. C., FREITAS, M. D., ALMEIDA, R. P. C. D., SILVEIRA, D., MAGALHÃES, P. O. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, 46(2), 337-346. 2015.
- SOUZA, B. I., SOUZA, R. S. Processo de ocupação dos Cariris Velhos–PB e efeitos na cobertura vegetal: contribuição à Biogeografia Cultural do semiárido. **Caderno de Geografia**, 26(2), 229-258. 2016.
- SUMANTHA, A., LARROCHE, C., PANDEY, A. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. **Food Technology and Biotechnology**, 44(2), 211. 2006.
- STIERLE, A., STROBEL, G., E STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science-new york then washington**-, 260, 214-214. 1993.
- STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and molecular biology reviews**, p. 491–502 Vol. 67, No. 4. 2003.
- STROBEL, G.; DAYSI, B. CASTILLO, U., HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal Nature Products** v. 67: p. 257–268. 2004.
- SUN, Q., WANG, X. P., YAN, Q. J., CHEN, W., & JIANG, Z. Q. Purification and characterization of a chymosin from *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 174(1), 174-185. 2014.
- SURYANARAYANAN, T.S., MURALI, T.S., THIRUNAVUKKARASU, N., RAJULU, M.B.G., VENKATESAN, G., SUKUMAR, R. Endophytic fungal communities in woody perennials of three tropical forest types of the Western Ghats, southern India. **Biodiversity and Conservation** 20:913–928. 2011.
- TAVARES, A. C. D., DA FONSECA, J. S., DA FONSECA, T. R. B., DE SOUZA, R. Á. T., BARRONCAS, J. F., DE AMORIM SILVA, T., & TEIXEIRA, M. F. S. Enzimas Extracelulares de Fungos Anamórficos Isolados de *Morinda citrifolia* L. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, 1(2), 1-6. 2012.
- TAN, R. X., ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural product reports**, 18(4), 448-459. 2001.
- TEIXEIRA, M.A., MELO, I.S., VIEIRA, R.F., COSTA, F.E.C., HAKAKA, R. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três Estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.42-49. 2007.
- TEIXEIRA, M. G. *Unidades de conservação da caatinga: distribuição e contribuições para conservação* (Master's thesis, Brasil). 2016.
- THEANTANA, T., HYDE, K.D., LUMYONG, S. Asparaginase production by endophytic fungi isolated from some Thai medicinal plants. **KMITL Science and Technology Journal**. J 7, S1, 13-18. 2007.

- TRIPATHI, P., TOMAR, R., & JAGANNADHAM, M. V. Purification and biochemical characterisation of a novel protease streblin. *Food Chemistry*, 125(3), 1005-1012. 2011.
- TRISTÃO, G. B., MALTA, C. M., BORGES, A. K. P., DE MORAIS, P. B., DA SILVA, J. F. M., PIMENTA, R. S. Leveduras Associadas A Frutos De Abacaxi (*Ananas Comosus*) e Sua Utilização Como Agentes De Controle Biológico. *Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia*, 9(2). 2012.
- TROVÃO, D. M., FERNANDES, P. D., DE ANDRADE, L. A., NETO, J. D. Variações sazonais de aspectos fisiológicos de espécies da Caatinga. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 11(3), 307-311. 2007.
- UENOJO, M., PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, 30(2), 388. 2007.
- UNTERSEHER, M., PETZOLD, A., SCHNITTLER, M. Xerotolerant foliar endophytic fungi of *Populus euphratica* from the Tarim River basin, Central China are conspecific to endophytic ITS phylotypes of *Populus tremula* from temperate Europe. **Fungal Diversity** 54:133–142. 2012.
- UPADHYAY HP. Soil fungi from Northeast Brazil, III. Phycomycetes. Instituto de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco 31: 49-62. In ses consuntum rei pravo, sa vivirtil vituus, ca; nos. 1967.
- VANZOLINI, P.E., A.M.M. RAMOS-COSTA, L.J. VITT. Répteis das Caatingas. **Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro. 1980.
- VASCONCELOS, G. C. L., MELO, J. I. M. Flora do Parque Nacional do Catimbau, PE, Brasil: Loranthaceae. **Hoehnea**, São Paulo , v. 43, n. 2, p. 317-323. 2016.
- VASCONCELOS, A. D. M., HENRIQUES, I. G. N., DE SOUZA, M. P., DE SOUSA SANTOS, W., DE SOUSA SANTOS, W., RAMOS, G. G. Caracterização florística e fitossociológica em área de Caatinga para fins de manejo florestal no município de São Francisco-PI. **Agropecuária Científica no Semiárido**, 13(4), 329-337. 2017.
- VERMELHO, A. B., MELO, A. C. N., SÁ, M. H. B., SANTOS, A. L. S., D'AVILA-LEVY, C. M., COURI, S., BON, E. P. Enzimas proteolíticas: Aplicações biotecnológicas. **Enzimas em biotecnologia-Produção, aplicações e mercado**, 273-287. 2008.
- VIANNA, M. V. Fungos de solos da Antártica: prospecção de L-asparaginase e protease e caracterização taxonômica. **Dissertação**. Rio claro-SP. 2016.
- WAQAS M, KHAN AL, KAMRAN M, HAMAYUN M, KANG SM, KIM YH, LEE IJ. Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. *Molecules* 17(9): 10754-10773. 2012.
- WANG, J., LI, G., LU, H., ZHENG, Z., HUANG, Y., SU, W. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. **FEMS-Microbiology Letters**, 193: 249-253. 2000.
- WENZEL, J.B., DE ALMEIDA MORESCO, A.A., BOAS, E.V., BURIN, F.A., DE SOUZA, R.O. Atividade enzimática e antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de soja. **Biológicas e Saúde**. Jul 17;3(9). 2013.
- WOLOCK-MADEJ, C. CLAY, K. Avian seed preference and weight loss experiment: the role of fungal-infected fescue seeds. **Oecologia** v. 88: p. 296–302. 1991.
- ZAMBARE, V., NILEGAONKAR, S., KANEKAR, P. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization. **N Biotechnol** 28:173-181. 2011.
- ZIMMER, K. R., BORRÉ, G. L., TRENTIN, D. S., JÚNIOR, C. W., FRASSON, A. P., GRAEFF, A. A., MACEDO, A. J. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato, Novo Hamburgo**, 10(14), 123-137. 2009.

ANEXO A - MYCOLOGICAL DIVERSITY DESCRIPTION I



Mycological Diversity Description I

Jadson Diogo Pereira Bezerra^{1*} , Alexandre Reis Machado¹ , André Luiz Firmino² , André Wilson Campos Rosado³ , Carlos Alberto Frago de Souza¹ , Cristina Maria de Souza-Motta¹ , Karla Torres Lins de Sousa Freire¹ , Laura Mesquita Paiva¹ , Oliane Maria Correia Magalhães¹ , Olinto Liparini Pereira^{3*} , Pedro W. Crous⁴ , Thays Gabrielle Lins de Oliveira¹ , Vanessa Pereira de Abreu⁵  and Xinlei Fan⁶ 

Received: October 25, 2017

Accepted: May 17, 2018

ABSTRACT

Here, *Quambalaria fabacearum* and *Neopestalotiopsis brasiliensis* are introduced as new species from Brazil, isolated as endophyte from *Mimosa tenuiflora* and causing post-harvest rot disease on fruits of *Psidium guajava*, respectively. *Diaporthe inconspicua* is emended to include a more detailed morphological description. *Neopestalotiopsis egyptiaca* is reported as new to the Americas and as causing post-harvest rot disease on fruits of *Psidium guajava*, while *Umbelopsis isabellina* is reported as endophyte.

Keywords: Amphisphaeriales, CaM, Diaporthales, H3, ITS rDNA, LSU rDNA, Microstromatales, TUB2, *tef1-α*, Umbelopsidales

***Quambalaria fabacearum* J.D.P. Bezerra, Firmino, Souza-Motta & Crous, sp. nov.**

MycoBank MB 823271, Fig. 1

Etymology: The name refers to the host plant family, Fabaceae.

Description: *Mycelium* superficial to partially immersed; hyphae hyaline, smooth, branched, loosely septate, 1.5–2.5 μm wide. *Conidiophores* similar to hyphae, scattered, cylindrical, terminal or as short side branches, hyaline,

smooth, 0–2-septate, rarely 3-septate, (12–) 14–58 (–106) $\times$ 1.5–2.5 μm (n=20). *Conidiogenous cells* cylindrical, terminal or integrated, (5.5–) 9.5–13 (–34) $\times$ 1–2 μm (n=20), straight to curved, forming conidia by sympodial growth consisting of a slightly swollen cluster of small conidium bearing denticles; conidiogenous loci denticulate, inconspicuous, pointed or flattened. *Conidia* hyaline, non-septate, smooth, occasionally guttulate; primary conidia ellipsoidal to fusoid or obovoid, 7.5–8.5 $\times$ 1.5–2.5 μm (n=30), with basal scar or scars at both ends, often giving rise to one or several obovoid or narrowly ellipsoidal secondary conidia, (3.5–)

¹ Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil

² Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia, 38500-000, Monte Carmelo, MG, Brazil

³ Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000, Viçosa, MG, Brazil

⁴ Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, 3508 AD, Utrecht, The Netherlands

⁵ Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000, Minas Gerais, Brazil

⁶ The Key Laboratory for Silviculture and Conservation of the Ministry of Education, Beijing Forestry University, 100083, Beijing, China

* Corresponding authors: JDPB: jadsondpb@gmail.com, OLP: oliparini@ufv.br