



**FORMULÁRIO PARA RELATÓRIO FINAL**

**1. Identificação do Projeto**

**Título do Projeto PIBIC/PAIC**

Enzimas de interesse biotecnológico produzidas por *Colletotrichum* spp., endófitos de frutíferas tropicais

**Orientador**

Pedro de Queiroz Costa Neto

**Aluno**

Kelven Wladie dos Santos Almeida Coelho

**2. Informações de Acesso ao Documento**

**2.1 Este documento é confidencial?**

SIM

NÃO

**2.2 Este trabalho ocasionará registro de patente?**

SIM

NÃO

**2.3 Este trabalho pode ser liberado para reprodução?**

SIM

NÃO

**2.4 Em caso de liberação parcial, quais dados podem ser liberados?  
Especifique.**

**OBS.:** Esse trabalho faz parte de outro que está dependendo da identificação molecular dos fungos utilizados nessa pesquisa. Após a identificação será publicado.

**3. Introdução**

A utilização de micro-organismos para a produção de compostos orgânicos de interesse industrial e biotecnológico vem se desenvolvendo significativamente ao passar



# UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

## RELATÓRIO FINAL PIBIC/PAIC 2015-2016



UFAM

dos anos. Seguindo essa linha, fungos endofíticos de diversas espécies vegetais tomam a frente, por apresentarem grande potencial em diversas áreas da Biotecnologia, uma delas é a tecnologia de enzimas.

As enzimas são proteínas essenciais para o sistema metabólico de todos os organismos vivos e têm um papel importante na degradação da matéria orgânica, na infecção do hospedeiro e na deterioração dos alimentos. Nas vias metabólicas, agem em sequências organizadas de rotas catabólicas e anabólicas (LEHNINGER, 2002).

A utilização de enzimas nas indústrias é indispensável, através do seu emprego, é possível aperfeiçoar a qualidade de um produto ou tornar mais fácil a produção do mesmo. Isso se deve ao fato das enzimas atuarem diretamente nas substâncias que compõem um determinado produto, onde cada enzima tem um substrato de atuação específico (LIMA et al., 2001).

Os micro-organismos são a fonte mais recorrida para obtenção de enzimas por apresentarem baixo custo na produção, além de ser possível produzi-las em larga escala (PANDEY et al., 2005).

Segundo Bon, Ferrara e Corvo (2008), as enzimas podem ser aplicadas em diversos setores agroindustriais, incluindo as indústrias de alimentos, papel, têxtil e farmacêutica. Entre as vantagens da utilização enzimática destaca-se o fato de ser um produto natural, que apresenta um alto grau de especificidade nas reações, contribuindo para a eficiência do processo, e ainda, por apresentar a atividade que pode ser regulada, atuando em baixas concentrações e sob condições brandas de pH e temperatura.

Micro-organismos endofíticos que colonizam tecidos das plantas produzem enzimas hidrolíticas extracelulares como mecanismos de resistência para ultrapassar as defesas do hospedeiro que impedem a invasão microbiana e/ou para obter nutrientes do solo (TAN; ZOU, 2001). Dentre essas enzimas, podem ser destacadas pectinases, esterases, celulases, lipases dentre outras (PETRINI et al., 1992). Estudos de micro-organismos endofíticos de plantas tropicais têm recebido muita atenção, devido à diversidade e grande potencial como fonte de compostos bioativos e pelos benefícios que podem proporcionar às plantas (PHOTITA et al., 2001).

Fungos que apresentam esse potencial podem ser futuramente utilizados na produção em larga escala. As lacases podem ser utilizadas como agente branqueador natural para indústria têxtil e papelaria (JORDAAN et al., 2004), na produção de etanol pelo emprego de micro-organismos engenheirados (MAYER; STAPLES, 2002), na



indústria alimentícia para produção de bebidas como agente estabilizante de vinhos, sucos de frutas e de cerveja (MINUSSI et al., 2002), além disso biosensores vem sendo desenvolvidos, utilizando lacase, para determinação de compostos fenólicos, o que é interessante para o controle ambiental.

As amilases pertencem à classe das hidrolases, entre as quais tem  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase e amiloglicosidase e catalisam a hidrólise do amido e seus derivados. As enzimas amilolíticas apresentam vantagens na capacidade de catalisar reações químicas sob condições moderadas, o que nem sempre ocorre com processos químicos, e estes apresentam hidrólises não específicas e formação de produtos não desejados. São utilizadas na obtenção de amido modificado, na produção de xaropes com elevado teor de glicose, em produtos de panificação e na indústria cervejeira.

As amilases ocorrem amplamente em animais, plantas e micro-organismos. Entretanto, devido às vantagens que oferecem, como menor tempo de produção, as amilases produzidas por fungos têm a preferência do mercado de enzimas (REDDY et al., 2003).

As celulasas são enzimas vendidas em grande volume e apresentam importância econômica, tendo diferentes aplicações industriais, como por exemplo, no processamento do amido, produção de ração animal, fermentação de grãos para produção de álcool, extração de suco de frutas e vegetais, polpa e indústria de papel e indústria têxtil (OGEL et al., 2001).

As proteases hidrolisam proteínas com consequente modificação das propriedades físicas, químicas e biológicas originais, sendo a proteólise essencial para todos os organismos e envolvida em diferentes processos fisiológicos (SABOTIC et al., 2007). As proteases representam um dos três maiores grupos de enzimas de interesse industrial com ampla aplicação biotecnológica, especialmente na indústria de alimentos, couro, detergentes e em processos de biorremediação (RAO et al., 1998).

As pectinases formam um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam as substâncias pécicas. Possuem uso nas indústrias de alimentos no amadurecimento de frutas, clarificação e redução de viscosidade em sucos de frutas, tratamentos preliminares do suco de uva para indústrias vinícolas, extração de polpa de tomate, fermentação de chá e chocolate, tratamento de resíduos vegetais, degomagem de fibras, enriquecimento proteico de alimentos infantis e extração de óleos (UENOJO; PASTORE, 2007).



**UFAM**

#### **4. Justificativa**

Os micro-organismos podem ser fontes naturais de moléculas bioativas com ampla aplicação. Os fungos endofíticos avaliados fazem parte da Coleção de Culturas do Laboratório de Princípios Bioativos de Origem Microbiana/LPBOM da Faculdade de Ciências Agrárias/FCA e podem produzir enzimas de interesse biotecnológico.

As enzimas que foram investigadas apresentam diversas aplicações. As amilases, por exemplo, são utilizadas para hidrólise do amido e produção de xaropes, produtos de panificação e indústria cervejeira; as celulases são aplicadas na produção de ração animal, extração de sucos de frutas e polpa e na indústria de papel e indústria têxtil; as proteases apresentam interesse biotecnológico em processos de biorremediação; e as pectinases nas indústrias de alimentos na clarificação e redução de viscosidade em sucos de frutas, extração de polpa de tomate e extração de óleos.

Dentre as enzimas citadas, tem destaque para a lacase que é uma enzima em ascensão, a qual vem sendo amplamente utilizada como substituta de produtos químicos nos processos das indústrias têxteis e papelreira, como branqueador natural: na indústria de alimentos, na produção de bebidas, como agente estabilizante e, na panificação, como melhorador do sabor. Por ser uma oxidase capaz de degradar a lignina, esta enzima possui ampla aplicação industrial e ambiental.

A descoberta de isolados com potencial produtivo a ser melhorado possibilitará a execução de outros trabalhos, além de vir a ser um recurso para solução de problemas ambientais.

#### **5. Objetivos**

##### **5.1 Geral**

Avaliar o potencial produtivo de lacase, amilase, celulase, proteinase e pectinase por fungos endofíticos isolados de hospedeiros tropicais.

##### **5.2 Específicos**



Avaliar a produção de enzimas por *Colletotrichum* spp. endófitos de mangueira (*Mangifera indica* L.);

Avaliar a produção de enzimas por *Colletotrichum* spp. endófitos de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.);

Avaliar a produção de enzimas por *Colletotrichum* spp. endófitos de goiabeira (*Psidium guajava* L.).

## 6. Metodologia

Foram utilizados dez fungos endofíticos de cada um dos hospedeiros citados. Os fungos foram reativados em meio de cultivo BDA (200 g de batata, 15 g de dextrose e 15 g de ágar, diluídos em água destilada para 1 L – pH 6,8) acrescido do antibiótico cloranfenicol (50 µg/mL), para inibir o crescimento de bactérias. As placas de Petri foram incubadas em estufa B.O.D por até sete dias. Todos os fungos utilizados pertencem à Coleção de Culturas do LPBOM/FCA/UFAM.

A avaliação da atividade de lacase seguiu o protocolo descrito por Santos (2007), com modificações. O meio de cultura foi composto por 20 g de ágar acrescido de 0,5% (p/v) de ácido gálico, 15 g de extrato de malte e 1 g de peptona para 1 L de água destilada.

O ácido gálico foi homogeneizado em 50 mL de água destilada e autoclavado a 120 °C, 1 atm, 10 min. Os demais reagentes foram solubilizados em pH 7 e autoclavados (120 °C, 1 atm, 20 min).

Após resfriamento do meio (45-50 °C), foi vertido em placas de Petri e posteriormente inoculadas as culturas fúngicas; e incubadas a 25 °C por cinco dias, no escuro. A atividade da enzima lacase foi detectada pela formação de um halo marrom ao redor das colônias.

A avaliação foi realizada por meio da mensuração de diâmetros perpendiculares da colônia mais o halo decorrente da atividade enzimática, obtendo-se as respectivas áreas. Cada experimento foi realizado em triplicata, de onde se obteve uma média da área do halo de degradação oriundo da atividade da enzima (PEREIRA, 2009).

A atividade da amilase foi observada a partir do cultivo em placas de Petri contendo meio mínimo, no qual a glicose foi substituída por amido (6 g de NaNO<sub>3</sub>, 1,5 g



# UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

## RELATÓRIO FINAL PIBIC/PAIC 2015-2016



UFAM

de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g de KCl, 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01 g de  $\text{FeSO}_4$ , 0,01 g de  $\text{ZnSO}_4$ , 10 g de amido, 15 g de ágar, para 1 L de água destilada, pH 6,8).

As colônias foram incubadas a 25 °C sob fotoperíodo de 12 horas. Após cinco dias de cultivo foi aplicado em cada placa 2 mL de solução lugol (5 g de KI, 1 g de iodo, 100 mL de água destilada), sobre a superfície do meio de cultura. Após 10 minutos, a solução lugol foi descartada e avaliada a atividade amilolítica, caracterizada pela formação de halo claro circundado por uma zona azulada ao redor da colônia (PEREIRA, 2009).

Para a atividade da celulase, foi utilizado cultivo em placas de Petri contendo ágar carboximetilcelulose (1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,5 g de asparagina, 0,5 de KCl, 0,2 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g de  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 g de extrato de levedura, 10 g de carboximetilcelulose, 20 g de ágar, para 1 L de água destilada). As colônias foram incubadas por cinco dias a 25 °C, no escuro, e em seguida submetidas a choque térmico por 16 horas a 50 °C.

Após esse período, foi adicionado 10 mL de solução corante de vermelho congo (2,5 g/L) em tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8. Após 30 minutos a solução foi descartada e as culturas lavadas com 5 mL de solução de NaCl 0,5 M neste mesmo tampão, visando revelar o halo claro e estreito de degradação da celulose ao redor da colônia (PEREIRA, 2009).

Para avaliar a atividade da protease, foi utilizada a metodologia de Hankin e Anagnostakis (1975), modificado. Os isolados foram repicados para placas de Petri contendo meio solidificado composto por 5 g de peptona, 3 g de extrato de levedura, 1 g NaCl, 15 g de ágar, 0,4 g gelatina, para um 1 L de água destilada, com pH 6.

A gelatina foi autoclavada separadamente e misturada ao meio de cultura antes de vertê-lo para as placas. As colônias foram incubadas por 72 horas a 25 °C, no escuro. Após este período o halo, caracterizado por uma região amarelada ao redor da colônia contrastante com o vermelho presente na região em que não houve atividade proteolítica, será revelado por meio da aplicação de 10 mL de vermelho de metila (2%) em cada placa.

A atividade de pectinase foi avaliada conforme a metodologia descrita por Hankin e Anagnostakis (1975). Os isolados foram repicados para meio de cultura sólido composto de 500 mL de solução mineral (2 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 6 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,2 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 mg de  $\text{CaCl}_2$ , 10 µg de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 10 µg de  $\text{MnSO}_4$ , 70 µg de  $\text{ZnSO}_4$ , 50 µg de  $\text{CuSO}_4$ , 10 µg de  $\text{MoO}_3$ ) mais 500 mL de solução de pectina (1 g de extrato de



levedura, 15 g de ágar, 5 g de pectina cítrica). O meio foi ajustado para pH 7. As colônias foram incubadas por cinco dias a 25 °C, no escuro.

O halo de degradação formado por uma região translúcida ao redor da colônia, foi revelado com aplicação de vermelho de metila (2%). A avaliação dos halos de todas as enzimas seguiu o mesmo procedimento para lacase. O delineamento estatístico para todas as atividades enzimáticas foi o inteiramente casualizado (DIC) com três repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparação das médias.

## **7. Resultados e Discussão**

Mangueira, cajueiro e goiabeira são frutíferas de importância para a balança comercial do Brasil. As linhagens de *Colletotrichum* spp. isoladas na condição de endófitos foram avaliadas com relação ao potencial enzimático. Dos 30 endófitos avaliados, 18 apresentaram halo enzimático potencial.

Entre os endófitos de mangueira, o endófito M3 apresentou o maior halo para lacase, com 16,08 mm. A atividade amilolítica foi observada de forma intracelular, ou seja, não houve halo enzimático, porém, foi observada atividade da enzima na área interna da colônia. Para celulase, foram observados valores variando de 1,0 a 4,41 mm.

O maior valor encontrado para protease foi de 6,25 mm, expressado pelo endófito M1, enquanto os demais ficaram com média de 5,0 mm. Para pectinase, apenas três endófitos apresentaram atividade mínima, variando de 4,25 a 5,08 mm.

**Tabela 01** – Médias dos halos enzimáticos (mm) de endófitos de mangueira

Endófitos	Lacase	Amilase	Celulase	Protease	Pectinase
M1	-	*	1,60	6,25	-
M2	-	*	4,00	5,75	-
M3	16,08	*	2,75	4,33	5,00
M4	-	*	3,91	5,58	5,08
M5	-	*	1,08	5,66	-
M6	-	*	3,75	5,00	4,25
M7	-	*	4,41	5,50	-
M8	6,69	*	4,33	5,83	-
M9	10,25	*	3,41	5,83	-
M10	-	*	-	-	-

(-) Não houve atividade

(\*) Não houve atividade extracelular

Entre os endófitos de cajueiro, as linhagens C2, C3, C8 e C10 se destacaram na produção de lacase com 12,91, 13,87, 14,08, e 15,75 mm, respectivamente. A atividade observada para amilase também foi intracelular. Para celulase os valores variaram de 2,66 a 3,42 mm. A atividade proteolítica foi a que apresentou os maiores halos enzimáticos, o endófito C1 apresentou halo de 33,13 mm, enquanto os demais variaram de 25,06 a 29,38 mm, indicando o potencial biotecnológico destes endófitos para produção desta enzima. Não foi observada atividade pectinolítica.

**Tabela 02** – Médias dos halos enzimáticos (mm) de endófitos de cajueiro

Endófitos	Lacase	Amilase	Celulase	Protease	Pectinase
C1	-	*	-	33,13	-
C2	12,91	*	3,41	29,38	-
C3	13,87	*	3,41	25,66	-
C4	9,50	*	3,00	27,07	-
C5	-	*	3,50	26,48	-
C6	-	*	3,08	26,49	-
C7	6,25	*	2,83	28,27	-
C8	14,08	*	2,75	26,28	-
C9	-	*	2,66	26,86	-
C10	15,75	*	3,16	25,79	-

(-) Não houve atividade

(\*) Não houve atividade extracelular



Dos endófitos de goiabeira, nove apresentaram halo para lacase variando de 11,25 mm ao maior halo produzido pelo endófito C9 com 19,0 mm. Também foi observada atividade intracelular para amilase. A atividade celulolítica variou de 0,83 a 4,08 mm enquanto para protease, o maior halo foi observado para o endófito G4 com 21,83 mm. Não houve atividade pectinolítica.

**Tabela 03** – Médias dos halos enzimáticos (mm) de endófitos de goiabeira

Endófitos	Lacase	Amilase	Celulase	Protease	Pectinase
G1	16,50	*	4,08	12,75	-
G2	15,50	*	2,58	4,25	-
G3	14,66	*	2,00	12,33	-
G4	16,58	*	2,95	21,83	-
G5	11,25	*	3,33	13,16	-
G6	19,83	*	1,91	13,75	-
G7	4,91	*	0,83	10,16	-
G8	13,91	*	3,33	14,58	-
G9	19,00	*	3,00	13,75	-
G10	18,25	*	4,00	13,33	-

(-) Não houve atividade

(\*) Não houve atividade extracelular

Em estudo realizado por Silva et al. (2006) com endófitos de *Annona* spp. foi observada atividade apenas para lipase, e nenhuma para as enzimas protease, amilase e celulase. Diferenciando-se de Assis (2010) onde todos os *C. gloeosporioides*, isolados de sintomas de antracnose em frutos de mangueira demonstraram atividade enzimática para amilase, lipase e protease.

Esse fato pode estar diretamente associado a processos de fitopatogenicidade, uma vez que o hospedeiro pode ou não influenciar na fisiologia de determinado organismo. Por exemplo, o fungo *Fusarium proliferatum*, isolado por Kwon e Anderson (2001) como endófito e produtor de lacases, além de ser considerado pela literatura como fitopatógeno de cereais. Estes autores também observaram que todos os isolados avaliados produziram protease, igual ao observado neste estudo. Redman e Rodriguez (2002) relataram que enzimas do grupo das proteases são importantes durante processos de patogênese de *C. coccodes*, onde descobriram que fitopatógenos deficientes na produção desta enzima não foram virulentos.



Para Dianese (1989), as amilases são comumente secretadas por fungos permitindo a hidrólise do amido até glicose, porém, pouco se sabe sobre a ligação desta enzima em processos de patogênese. Lima (2000) observou que um período de incubação superior a dez dias favoreceu a atividade de amilase em todos os isolados de *C. graminicola* testados, o que pode ter influência no presente estudo, onde o período de incubação foi de apenas cinco dias.

Neste trabalho, foi observado maior atividade para protease. Couto (2002) também verificou que *C. musae* obtidos de bananeira demonstraram maior atividade para protease. Para celulase, as linhagens endofíticas investigadas apresentaram atividade mínima, corroborando com Tozze Júnior (2012) que observou atividade para celulase em 92 dos 93 isolados testados. Cruz (2014) observou atividade pectinolítica em todos os isolados; diferenciando-se deste trabalho onde apenas três endófitos de mangueira apresentaram atividade mínima.

É preciso considerar os diversos fatores que podem influenciar na excreção de enzimas extracelulares por fungos endofíticos. Uma vez que o substrato pode influenciar na produção de determinada enzima por ser de fácil ou difícil degradação. Outros fatores como pH, temperatura, luminosidade e tempo de incubação também podem influenciar.

A análise de variância e o teste de Tukey não foram aplicados porque nem todos os endófitos apresentaram atividade para as enzimas avaliadas, por este motivo optamos por não realizá-los.

Os fungos endofíticos do gênero *Colletotrichum* spp., isolados de mangueira, cajueiro e goiabeira destacam-se na produção de enzimas de interesse biotecnológico, visto que apresentaram os melhores valores para lacase e protease, e também que possuem um potencial a ser melhorado em trabalhos futuros na busca por metodologias que otimizem ao máximo a produção dessas enzimas.

## 8. Referências

ASSIS, T.C.; MENEZES, M.; ANDRADE, D.E.G.T.; COELHO, R.S.B. Diferenciação de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* por meio de padrões eletroforéticos de proteínas totais e isoesterase, e produção de enzimas extracelulares. Summa Phytopathologica. Botucatu, v. 36, n. 2, p. 140-144, 2010.



# UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

## RELATÓRIO FINAL PIBIC/PAIC 2015-2016



UFAM

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. Enzimas em biotecnologia – Produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008, 506p.

COUTO, E.F. Estudo comparativo de isolados de *Colletotrichum musae* através de caracteres patogênicos, enzimáticos, fisiomorfológicos e molecular. 2002. (Dissertação de Mestrado). Recife. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 87p.

CRUZ, A.V. Características morfo-culturais e moleculares de isolados de *Colletotrichum guaranicola* Albuq., procedentes do Estado do Amazonas. 2014. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 106p.

DIANESE, J.C. Patologia vegetal: Agressão e defesa em sistemas planta/patógeno. Brasília, Editora Universitária da Universidade de Brasília, 1989, 570p.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, Lancaster, v. 67, p. 597-607, 1975.

JORDAAN, J. et al. Purification and partial characterization of a thermostable laccase from an unidentified basidiomycete. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 34, p. 635-641, 2004.

KWON, S.I.; ANDERSON, A.J. Laccase isozymes: Production by an opportunistic pathogen, a *Fusarium proliferatum* isolate from wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v. 59, p. 235-242, 2001.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica. 3a Ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975p.

LIMA, M.L.F. Caracterizações patogênica, fisiológica e enzimática de isolados de *Colletotrichum graminicola* (Ces) G.W. Wilson, agente causal da antracnose do milho, *Zea mays* L. 2000. 87f. Dissertação (Mestrado em Biologia de fungos) - Universidade Federal de Pernambuco.

LIMA, U.A. et al. Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos, v. 3, Ed. Edgard Blücher, São Paulo, 2001, 593p.

MAYER, A.M.; STAPLES, R.C. Laccase: New functions for an enzyme. *Phytochemistry*, v. 60, p. 551-565, 2002.

MINUSSI, R.C. et al. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, v. 13, n. 6-7, p. 205-216, 2002.

OGEL, J.M. et al. Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science*, Champaign, v. 4, p. 897-902, 2001.

PANDEY, A. et al. Enzyme technology. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc., 2005. 760p.



UFAM

PEREIRA, W.V. Caracterização e identificação molecular de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose da goiaba no Estado de São Paulo. 2009. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 79p.

PETRINI, O.; STONE, J.; CARROLL, F.E. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: A preliminary study. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 60, p. 789-796, 1992.

PHOTITA, W. et al. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. *Mycological Research*, London, v. 105, p. 1508-1513, 2001.

RAO, M.B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Washington, v. 62, p. 597-635, 1998.

REDDY, N.S.; NIMMAGADDA, A.; RAO, K.R.S.S. An overview of the microbial amylase family. *African Journal of Biotechnology*, v. 2, p. 645-648, 2003.

REDMAN, R.S.; RODRIGUEZ, R.J. Characterization and isolation of an extracellular serine protease from the tomato pathogen *Colletotrichum coccodes*, and its role in pathogenicity. *Mycological Research*, Cambridge. V. 106, p. 1427-1434, 2002.

SABOTIC, J. et al. Basidiomycetes harbour a hidden treasure of proteolytic diversity. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 128, p. 297-307, 2007.

SANTOS, E.S. Microrganismos promissores para degradação de compostos fenólicos presentes em bagaço de cana de açúcar, iodo e águas residuais de agroindústrias sulcrocólicas. 2007. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 112p.

SILVA, R.L.O. et al. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: Isolamento, caracterização enzimática e promoção de crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). *Acta Botânica*, v. 20, n. 3, p. 649-655, 2006.

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

TOZZE JUNIOR, H.J. Antracnose do abacateiro: Danos pós-colheita, caracterização do agente casual, quantificação de parâmetros da pré-penetração e monocíclicos e controle químico. 2012. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 124p.

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

