

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

JAYANARAIAN FERREIRA MARTINS ANDRADE

**PRODUÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE LACASES E PEROXIDASES OBTIDAS DE
Diaporthe spp. ISOLADOS COMO ENDOFÍTICOS DE *Solanum falciforme* Farruggia**

BRASÍLIA
2021

JAYANARAIAAN FERREIRA MARTINS ANDRADE

PRODUÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE LACASES E PEROXIDASES OBTIDAS DE *Diaporthe*
spp. ISOLADOS COMO ENDOFÍTICOS DE *Solanum falciforme* Farruggia

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Homem de Mello.

Co-orientadora: Profa. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista

BRASÍLIA
2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

FF383p Ferreira Martins Andrade, Jayanaraian
Produção e Otimização de Lacases e Peroxidases obtidas de Diaporthe spp. isolados como Endofíticos de Solanum falciforme Farruggia. / Jayanaraian Ferreira Martins Andrade; orientador Mauricio Homem de Mello; co-orientador Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista. -- Brasília, 2021. 83 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -- Universidade de Brasília, 2021.

1. Fungos Endofíticos. 2. Diaporthe. 3. Enzimas Lignolíticas. 4. Planejamentos Fatoriais. I. Homem de Mello, Mauricio, orient. II. de Oliveira Magalhães Dias Batista, Pérola, co-orient. III. Título.

JAYANARAIAAN FERREIRA MARTINS ANDRADE

**PRODUÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE LACASES E PEROXIDASES OBTIDAS DE
Diaporthe spp. ISOLADOS COMO ENDOFÍTICOS DE *Solanum falciforme* Farruggia**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 14 de janeiro de 2021.

BANCA EXAMINADORA

PRESIDENTE:

Prof. Dr. Mauricio Homem de Mello
Membro Interno do Programa
Universidade de Brasília

MEMBROS:

Dra. Paula Monteiro de Souza
Membro Interno do Programa
Universidade de Brasília

Prof. Dr. André Luiz Firmino
Membro Externo do Programa
Universidade Federal de Uberlândia

SUPLENTE:

Dr. Ezequiel Marcelino da Silva
Membro Externo do Programa
Universidade Federal de Tocantins

AGRADECIMENTOS

À Deus primeiramente, toda honra e toda glória, sempre!

Ao meu esposo, André Filipe Sales Andrade, por todo apoio, amor, compreensão, carinho e força, que tanto me foram essenciais nesse período.

À toda minha família que sempre vibrou com minhas conquistas e me incentivou. Em especial aos meus avós, Luiz Gonzaga e Maria do Céu, pelo amor incondicional; à minha mãe, Maria das Graças, por ser um referencial para mim de mulher batalhadora, desbravadora e conquistadora; ao meu pai, Helder Sousa Martins, pelo seu amor, incentivo e cuidado e ao meu irmão Thiago Mehari, por toda a parceria ao longo dos anos e por me dar sobrinhos lindos, Cecília e Caio.

Às minhas amigas Victória Lessa, Alana Almeida e Pâmella Denise, por aguentarem minhas lamúrias e me divertirem tanto.

Ao meu orientador, Maurício Homem de Mello, por toda orientação ao longo dos anos, por confiar no meu trabalho e por não medir esforços para a conclusão desse mestrado, meu muito obrigada!

À professora Pérola Magalhães, pela orientação essencial durante esse trabalho.

À Ana Beatriz Gouvêia, por estar sempre disposta a aprender e a trabalhar, sem você esse trabalhado teria sido impossível.

A todos os meus companheiros de trabalho do Laboratório de Produtos Naturais, em especial ao Samuel Cardoso, pela orientação e ajuda na análise dos meus dados.

Às técnicas Júlia e Patrícia, pela dedicação e apoio durante o todo esse tempo.

Ao professor André Luiz Firmino e ao professor Danilo Batista Pinho, pela parceria na identificação dos fungos.

Ao Dr. Félix Siqueira da Embrapa Agroenergia, pela doação do bagaço de cana, material necessário para realização desse trabalho e pela sua orientação prévia que me foi essencial.

Ao Elias Alves da Silva da Embrapa Agroenergia, por ser um cientista excelente, por me ensinar tanto sobre ensaios enzimáticos e por sempre estar acessível, muito obrigada!

Ao Laboratório de Imunologia Celular, à professora Tatiana Karla, por abrirem as portas do laboratório para que eu pudesse realizar experimentos e ao Lucas Fraga, em especial, por sua amizade de longa data e por se disponibilizar sempre que eu precisei.

À CAPES, pelo suporte financeiro.

E a todos que contribuíram de alguma forma para esse trabalho, meu muito obrigada, de coração!

“Já percorri esse longo caminho da liberdade. Procurei não vacilar e dei muitos passos em falso no percurso. No entanto, descobri que depois de subir um monte bem alto a gente apenas verifica que há muitos outros montes a escalar. Tirei um instante para descansar, para dar uma olhadela no panorama glorioso que me cerca, para olhar para trás e ver a distancia que percorri. Porém só posso descansar um instante, pois com a liberdade vem as responsabilidades e eu não ousa demorar-me, minha longa caminhada ainda não terminou.”

Nelson Mandela

RESUMO

ANDRADE, Jayanaraian Ferreira Martins. **Produção e Otimização de Lacases e Peroxidases obtidas de *Diaporthe* spp. isolados como Endofíticos de *Solanum falciforme* Farruggia.** Brasília, 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2021.

Os fungos endofíticos são microrganismos que colonizam o interior de diversas espécies vegetais nos seus espaços intercelulares ou dentro de células, mantendo um relacionamento simbiótico com eles. Seu potencial biotecnológico como produtores enzimáticos vêm despertando cada vez mais interesse. Neste trabalho, dois fungos endofíticos foram isolados da planta *Solanum falciforme* Farruggia, nativa do Cerrado Brasileiro. Os isolados, “P1” e “P2” foram submetidos à identificação molecular utilizando-se a região ITS para estabelecer a relação filogenética deles: P1 foi agrupado com *Diaporthe stictica* e P2 com *Diaporthe maritima*. Eles foram identificados como pertencentes ao gênero *Diaporthe*, relatado com um dos gêneros de fungo endofítico mais frequentemente isolados. Os dois isolados fúngicos foram analisados quanto à sua capacidade de produção de enzimas oxidativas: lacases e peroxidases totais. Para estabelecer o melhor dia de produção dessas enzimas o perfil de liberação enzimático das enzimas de interesse para cada isolado foi analisado por 30 dias. Para o “P1” foi selecionado o 11º dia (38,63 U_{lacase}/mL; 46,77 U_{peroxidases totais}/mL) e para o “P2” o 10º dia (P2: 41,21 U_{lacase}/mL; 13,55 U_{peroxidases totais}/mL). Para cada isolado foi realizado um planejamento fatorial 2³ com um ponto central em triplicata para otimização da produção enzimática pelos fungos, testando-se os fatores pH inicial do meio nos níveis 4 e 8, a quantidade de peptona, como fonte de nitrogênio, nos níveis 0,0g e 1,0g e bagaço de cana, como fonte de carbono, nos níveis 0,25g e 0,75g; o ponto central combinou o pH inicial, peptona e de bagaço de cana nos níveis 6, 1,0g e 0,50g, respectivamente. Nenhum modelo estabelecido pelos planejamentos fatoriais obteve significância estatística de acordo com os níveis em que esses fatores foram testados (nível de confiança: 95%), apenas os fatores pH inicial, peptona e a interação entre eles foram considerados significativos (p<0,05) para a produção de lacase para o isolado “P1”. De modo geral, a produção enzimática aumentou quando o pH inicial estava no nível mais baixo e a quantidade de peptona no nível mais alto. Esse trabalho gerou dados relevantes sobre a produção extracelular de enzimas oxidativas por fungos endofíticos do gênero *Diaporthe*.

Palavras-chave: *Diaporthe*, enzimas lignolíticas, planejamento fatorial.

ABSTRACT

ANDRADE, Jayanaraian Ferreira Martins. **Production and optimization of laccases and peroxidases obtained from *Diaporthe* spp. isolated as endophytic from *Solanum falciforme* Farruggia.** Brasília, 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2021.

Endophytic fungi are microorganisms able to colonize the interior of plant hosts in intercellular spaces or within cells, maintaining a symbiotic relationship. Endophytic fungi can be isolated from several plant species. Their biotechnological potential as enzyme producers has gained more interest in the last decade. In this work, two endophytic fungi were isolated from *Solanum falciforme* Farruggia, native to Brazilian Cerrado. Isolates, “P1” and “P2” were subjected to molecular identification, using the ITS region to establish their phylogenetic relationship, isolate “P1” was clustered with *Diaporthe stictica*, while “P2” was clustered with *Diaporthe maritima*. The isolates were identified as belonging to the genus *Diaporthe*, reported as one of the most frequently isolated genera of endophytic fungi. They were analyzed for their ability to produce oxidative enzymes: laccases and total peroxidases. Curves of 30 and 15 days were performed to establish the best day of production of these enzymes for each isolate. For “P1”, the 11th day was selected (38.63 U_{laccase}/mL; 46.77 U_{total peroxidases}/mL) and for “P2” the 10th day (P2: 41.21 U_{laccase}/mL; 13.55 U_{total peroxidases}/mL). For each isolate a 2³ experimental design was carried out with a central point in triplicate to optimize enzymatic production, testing the following factors: initial pH of the medium at levels 4 and 8, amount of peptone, as nitrogen source, at levels 0g and 1g and sugarcane bagasse, as carbon source, at levels 0.25g and 0.75g; central point combined initial pH, peptone and sugarcane bagasse at levels 6, 1.0g and 0.50g, respectively. No model established by the experimental designs obtained statistical significance according to the levels at which these factors were tested (confidence level: 95%), only the factors initial pH, peptone and the interaction between them were considered significant (p <0.05) for the production of laccase for the “P1” isolate. In general, enzyme production increased when the initial pH was at the lowest level and the amount of peptone at the highest level. This work generated relevant data on the extracellular production of oxidative enzymes by endophytic fungi of the genus *Diaporthe*.

Key Words: *Diaporthe*, lignolytic enzymes, experimental design

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura básica da lignina. Fonte: Adaptado de http://polymerdatabase.com/polymer%20classes/Lignin%20type.html . Acesso em 01/12/2020.	19
Figura 2 - Ciclo catalítico da lacase. (a) oxidação direta; (b) oxidação indireta. Fonte: adaptado de Agrawal et. al. (2018).	21
Figura 3 - Representação do sítio ativo da lacase. Fonte: Adaptado de Agrawal et. al. (2018)	22
Figura 4 - Ciclo catalítico das peroxidases na presença de peróxido de hidrogênio. Adaptado de Torres et. al. (2003).	23
Figura 5 - Representação de um sistema sendo influenciado por fatores de entrada e suas respostas. Adaptado de Neto (2010).	25
Figura 6 - <i>Solanum falciforme</i> Farruggia.	37
Figura 7 - folhas coletadas de <i>Solanum falciforme</i> Farruggia.	38
Figura 8 - Placas contendo os fragmentos de tecido vegetal para obtenção dos isolados fúngicos. (a) Folha “G”; (b) Folha “P”	38
Figura 9 - Controles e isolados com 3 dias de crescimento. (a) controle da água da última lavagem conforme o protocolo de isolamento; (b) controle da superfície da folha “P”; (c) isolados da folha “G”; (d) controle do ambiente (i.e. fluxo laminar); (e) controle.	39
Figura 10 - Isolados com 5 dias de crescimento. (a) Folha “P”; (b) Folha “G”.	39
Figura 11 - Fungos isolados em meio SB/2%EM. (a) Fungo “P1”; (b) Fungo “P2”; (c) Fungo “P3”.	40
Figura 12 - Confirmação das regiões gênicas de ITS amplificadas. 1) “P1”, 2) “P2 e 3) “P3”. (M) Marcador 1Kb+.	41
Figura 13 - Relação filogenética de sequências parciais de ITS obtida por Máxima Verossimilhança (ML) do fungo P1. Os isolados neste estudo estão destacados em negrito. .	42
Figura 14 - Morfologia de <i>Diaporthe</i> spp. (“P2”) Isolado de <i>Solanum falciforme</i> Farruggia. A. Colônia em BDA depois de 14 dias. B. Conidiomata ramificado em meio de cultura. C. Massa de conidióforos e conídios. D. Conidióforos e conídios. Microscopia óptica. Barra de escala: 10 µm	45
Figura 15 - Fungos isolados em meio BGS. (a) Fungo “P1”; (b) Fungo “P2” frente; (c) Fungo “P2” verso; (d) Fungo “P3” frente; (e) Fungo “P3” verso.	46

Figura 16 - Placa de 96 poços contendo extratos brutos de cultivo de 7 dias com atividade enzimática de lacase. Na coluna 1 e na coluna 2 (poços A, B e C), correspondentes ao “P1” é possível ver a coloração azul-esverdeada claramente, nos poços D, E e F da coluna 2 e na coluna 3, correspondentes ao “P2” é possível ver apenas uma leve coloração esverdeada, indicando uma atividade maior de “P1” do que a de “P2”.....	48
Figura 17 - Gráfico da curva de produção enzimática de lacases e peroxidases totais pelo fungo “P1” durante 30 dias.	50
Figura 18 - Gráfico da curva de produção enzimática de lacases e peroxidases totais pelo fungo “P2” durante 30 dias.	51
Figura 19 - Comparação do crescimento fúngico em meio líquido com e sem glicose por 8 dias. (a) “P1” em meio sem glicose; (b) “P1” em meio contendo glicose; (c) “P2” em meio sem glicose; (d) “P2” em meio contendo glicose.	52
Figura 20 - Gráfico da curva de produção enzimática do fungo “P1” durante 15 dias.	54
Figura 21 - Gráfico da curva de pH do fungo “P1” durante 15 dias.	55
Figura 22 - Gráfico da curva de produção enzimática do fungo “P2” durante 15 dias.	55
Figura 23 - Gráfico da curva de pH do fungo “P2” durante 15 dias.	56
Figura 24 - Gráfico de Pareto dos efeitos dos fatores e suas interações sobre a resposta (atividade de lacase do fungo “P1”). A: pH inicial, B: peptona, C: bagaço de cana. Nível de significância de 95%.....	60
Figura 25 - Gráfico da superfície de resposta para a atividade de lacase (U/mL) em função da quantidade de peptona (X_2) (g) e do pH inicial do meio (X_1) para o fungo “P1”. X_3 : +1.....	61
Figura 26 - Gráfico da superfície de resposta para a atividade de peroxidases totais (U/mL) em função da quantidade de peptona (X_2) (g) e do pH inicial do meio (X_1) para o fungo “P1”. X_3 está fixado no nível -1.	63
Figura 27 - Gráfico da superfície de resposta para a atividade de lacase (U/mL) em função da quantidade de peptona (X_2) (g) e do pH inicial do meio (X_1) para o fungo “P2”. X_3 está no nível -1.....	67
Figura 28 - Gráfico da superfície de resposta para a atividade de peroxidases totais (U/mL) em função da quantidade de peptona (X_2) (g) e do pH inicial do meio (X_1) para o fungo “P2”. ..	70
Figura 29 - Gráfico da curva de produção enzimática de “P1” durante 10 dias em cultivo com todos os níveis do planejamento fatorial no nível +1.	71
Figura 30 - Gráfico da curva de produção enzimática de “P2” durante 10 dias em cultivo com todos os níveis do planejamento fatorial no nível +1.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do meio BGS.	29
Tabela 2 - Fatores e Níveis selecionados para otimização da produção enzimática.	33
Tabela 3 - Matriz do planejamento fatorial. “T” se refere às combinações dos ensaios (tratamentos) e “PC” se refere ao ponto central, realizado em triplicata.	33
Tabela 4 - Sequências dos primers utilizados para amplificar as regiões ITS e LSU.	35
Tabela 5 - Resultados experimentais da atividade enzimática de lacase obtidos pelo planejamento fatorial 2^3 do fungo “P1”. X_1 : pH inicial; X_2 : peptona; X_3 : bagaço de cana. As quantidades de X_2 e X_3 são referentes a cada cultivo de 50 mL	58
Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático utilizado na otimização de lacase do fungo “P1”.....	60
Tabela 7 - Resultados experimentais da atividade enzimática de peroxidases totais obtidos pelo planejamento fatorial 2^3 do fungo “P1”. X_1 : pH inicial; X_2 : peptona; X_3 : bagaço de cana. As quantidades de X_2 e X_3 são referentes a cada cultivo de 50 mL.	62
Tabela 8 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático utilizado na otimização de peroxidases totais do fungo “P1”.....	63
Tabela 9 - Resultados experimentais da atividade enzimática de lacase obtidos pelo planejamento fatorial 2^3 do fungo “P2”. X_1 : pH inicial; X_2 : peptona; X_3 : bagaço de cana. As quantidades de X_2 e X_3 são referentes a cada cultivo de 50 mL	65
Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático utilizado na otimização de lacase do fungo “P2”.....	66
Tabela 11 - Resultados experimentais da atividade enzimática de peroxidases totais obtidos pelo planejamento fatorial 2^3 do fungo “P2”. X_1 : pH inicial; X_2 : peptona; X_3 : bagaço de cana. As quantidades de X_2 e X_3 são referentes a cada cultivo de 50 mL	68
Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático utilizado na otimização de peroxidases totais do fungo “P2”.....	69

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	16
2.1.1 GÊNERO <i>Diaporthe</i>	18
2.3 ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS OXIDATIVAS	19
2.3.1 LACASES.....	20
2.3.2 PEROXIDASES.....	22
2.4 CERRADO BRASILEIRO.....	24
2.5 PLANEJAMENTO FATORIAL.....	24
3 OBJETIVOS	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS	28
4.1.1 PRESERVAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS FUNGOS.....	28
4.2 PREPARO DE MEIOS DE CULTIVOS E SOLUÇÕES	29
4.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO EM MEIO SÓLIDO.....	30
4.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO	30
4.5 DETERMINAÇÃO DE LACASE.....	31
4.6 DETERMINAÇÃO DE PEROXIDASES TOTAIS	32
4.7 PLANEJAMENTO FATORIAL.....	33
4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	34
4.9 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	34
4.9.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	34
4.9.2 AMPLIFICAÇÃO DO DNA, SEQUENCIAMENTO E ANÁLISES FILOGENÉTICAS	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	37
5.1.1 EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO	40
5.1.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA	41
5.1.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO GÊNERO <i>Diaporthe</i>.....	45
5.2 CULTIVO EM MEIO SÓLIDO	46
5.3 CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO	48

5.3.1 CURVA DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DURANTE 30 DIAS	50
5.3.2 CURVA DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DURANTE 15 DIAS	54
5.4 PLANEJAMENTO FATORIAL.....	58
5.4.1 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE PELO FUNGO “P1”.....	58
5.4.2 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PEROXIDASES TOTAIS PELO FUNGO “P1”	62
5.4.3 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE PELO FUNGO “P2”	65
5.4.4 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PEROXIDASES TOTAIS PELO FUNGO “P2”	68
5.5 CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO COM OS 3 FATORES DO PLANEJAMENTO FATORIAL NOS NÍVEIS +1.....	71
6 CONCLUSÕES.....	74
7 REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

O termo “endofítico” é utilizado para se referir a microrganismos que colonizam o interior das plantas e que, de maneira geral, desenvolvem um relacionamento mutualístico com elas (MISHRA *et al.*, 2014). Os fungos endofíticos vivem ao menos um período do seu ciclo de vida dentro de estruturas vegetais, podendo melhorar a capacidade de defesa das plantas contra ataques de insetos e microrganismos fitopatogênicos, promover o crescimento vegetal, fixar elementos úteis para o seu hospedeiro, enquanto encontra uma fonte de nutrição no seu hospedeiro (SUDHA *et al.*, 2016; SUNITHA; DEVI; SRINIVAS, 2013). No entanto, fungos endofíticos também podem se tornar fitopatogênicos (GOMES *et al.*, 2013).

Os fungos endofíticos têm despertado cada vez mais interesse quanto ao seu potencial para produzir metabólitos secundários e enzimas extracelulares que têm emprego industrial (CORRÊA *et al.*, 2014). Nesse sentido, já foram isoladas pectinases, celulases, lipases, xilanases, lacases, fosfatases e proteinases de fungos endofíticos (CALDWELL; JUMPPONEN; TRAPPE, 2000; MACCHERONI, JR.; AZEVEDO, João Lúcio, 1998; PETRINI *et al.*, 1993; REDDY; LAM; BELANGER, 1996; SUTO *et al.*, 2002; WANG, J. W. *et al.*, 2006). Dentro do grupo dos fungos endofíticos, o gênero *Diaporthe* é relatado com um dos mais isolados em vários hospedeiros e espécies desse gênero também já foram relatadas como produtoras de enzimas (ALBERTO *et al.*, 2016; BOTELLA; DIEZ, 2011).

Esses fungos são capazes de produzir enzimas lignolíticas, que são aquelas com capacidade de degradar a lignina, um dos biopolímeros mais abundantes da Terra, mas muito recalcitrante e difícil de ser decomposto. Devido à baixa especificidade dessas enzimas, elas têm o potencial de ser empregadas em diversos processos industriais (KRACHER; LUDWIG, 2016). Essas enzimas podem ser divididas pelo seu modo de ação em dois grupos: (i) as enzimas hidrolíticas (como lipases e proteases) e (ii) as enzimas oxidativas, como as lacases, manganês peroxidases e lignina peroxidases, que são de interesse desse trabalho (CORRÊA *et al.*, 2014).

As enzimas oxidativas possuem aplicação na indústria do papel, atuando na polpação e no branqueamento da celulose; em kits e ensaios para realização de diagnósticos; na degradação de xenobióticos, no tratamento de resíduos lignocelulósicos, na biorremediação do solo, da água e de efluentes têxteis; na produção de etanol, na indústria cosmética, na indústria alimentícia, dentre outras aplicações (BETTIN; BOFF, 2016; HAMID; KHALIL-UR-REHMAN, 2009; KUCHARSKA *et al.*, 2018; KUMAR; CHANDRA, 2020; UPADHYAY; SHRIVASTAVA; AGRAWAL, P. K., 2016).

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi realizar o isolamento de fungos endofíticos de uma espécie vegetal do Cerrado e a sua identificação por morfologia e filogenia molecular, avaliar seu potencial biotecnológico como produtores de enzimas lignolíticas e otimizar sua produção para posterior purificação e potencial aplicação dessas enzimas como biorremediadoras de efluentes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS

Os fungos endofíticos são um grupo diversificado de ascomicetos, que em sua definição mais ampla, são microrganismos que ocorrem de forma assintomática nos tecidos e órgãos vegetais, como folhas, ramos e raízes sem prejuízo imediato para as plantas e trazendo benefícios para ambas partes (YAN, L. *et al.*, 2019). Esses fungos ocorrem em todo o território terrestre, e há relatos de que foram encontrados em todas as espécies de plantas estudadas para esta finalidade até hoje (JALGAONWALA; MAHAJAN, 2011; NITHYA; MUTHUMARY, 2011; TORRES, M. S. *et al.*, 2012; ZAFERANLOO *et al.*, 2013).

Os endofíticos podem ser divididos em dois grandes grupos: (i) os *clavicipitaceus*, que infectam as gramíneas e (ii) os não-*clavicipitaceus*, que são mais comuns em plantas vasculares e não vasculares (RODRIGUEZ *et al.*, 2009). Esses fungos ainda podem ser subclassificados quanto ao seu modo de reprodução (sexuado ou assexuado), seu modo de transmissão (horizontal ou vertical), sua fonte de nutrição, seu local de infecção na planta (raiz ou partes aéreas) e a expressão dessa infecção (sintomática ou assintomática).

Alguns autores relatam que a interação entre os fungos endofíticos e as plantas pode trazer vários benefícios para o crescimento vegetal através da produção de fitohormônios e da fixação de elementos úteis pelos endofíticos; podem melhorar sua proteção contra microrganismos fitopatogênicos e podem aumentar a biodiversidade dos ecossistemas, através da indução de respostas de resistência sistêmica intrínsecas a defesa das plantas e da produção de metabólitos secundários (BAI *et al.*, 2018; FIRÁKOVÁ; ŠTURDÍKOVÁ; MÚČKOVÁ, 2007; HARTLEY; GANGE, 2009; LIU, H. *et al.*, 2017; SASSE, J.; MARTINOIA; NORTEN, 2018; VANDENKOORNHUYSE *et al.*, 2015; WAQAS *et al.*, 2012).

Embora, de maneira geral, a associação entre os fungos endofíticos e as plantas seja benéfica ou neutra, algumas espécies podem ser fitopatogênicas e levar ao surgimento de lesões, descolorações, doenças e retardamento do crescimento vegetal, como o *Diplodia mutila*, que torna-se patogênico por influência da quantidade de luz que a planta recebe durante o seu desenvolvimento, sendo capaz de causar pontos de necrose foliar em *Iriarteia deltoidea*, um espécie de palmeira; o *Aurantioporthe corni*, capaz de causar cancro em *Cornus alternifolia*, espécie vegetal nativa do norte dos Estados Unidos; o *Diaporthe aspalathi* e o *Diaporthe caulivora*, capazes de causar o cancro da haste da soja e o *Epichloe festucaeis* capaz de mudar

sua relação com a gramínea *Lolium perenne* de simbiótica para fitopatogênica devido a condições de estresse nutricional (ÁLVAREZ-LOAYZA *et al.*, 2011; BEIER *et al.*, 2015; EATON; COX; SCOTT, 2011; RENSBURG, VAN *et al.*, 2006; SANTOS, J. M. *et al.*, 2011; SIKORA *et al.*, 2008).

Várias espécies diferentes de fungos endofíticos podem colonizar a mesma parte de uma planta, mas cada espécie pode possuir um local de preferência da planta para se alocar. Além disso, fungos de uma mesma espécie podem produzir substâncias diferentes, dependendo do local onde estão presentes na planta (GANGE *et al.*, 2012) .

Os microrganismos endofíticos associados a plantas representam uma fonte ainda pouco explorada de produtos naturais e de substâncias bioativas novas, que podem conferir a esses microrganismos potencial industrial, uma vez que colonizam um ambiente ecológico ainda pouco explorado (CHAPLA; BIASETTO; ARAÚJO, 2012).

Os fungos endofíticos são estudados como fontes de bioprodutos há mais de 20 anos. Nesse período, inúmeros compostos bioativos já foram isolados com diversas atividades farmacológicas, como: antibióticas, antivirais, anti-fitopatogênicas, imunossupressoras, anticancerígenas, antioxidantes; além de outras atividades, como inseticida, herbicida, larvicida, dentre outras (FORCINA *et al.*, 2015; LI, E. *et al.*, 2008; NATH; PATHAK; JOSHI, 2014; SCHULZ; BOYLE, 2005; SENTHILKUMAR *et al.*, 2007; WU, Y. *et al.*, 2015; ZHANG, G. *et al.*, 2013, 2013).

O principal foco das pesquisas atuais com fungos endofíticos recai sobre a produção e o acúmulo de metabólitos secundários desses microrganismos, mas a atenção sobre a utilização deles como fonte biotecnológica de enzimas industriais vem ganhando interesse cada vez maior, uma vez que a sua produção enzimática para penetrar e colonizar suas hospedeiras já começou a ser conhecida (SURYANARAYANAN *et al.*, 2009).

Segundo Corrêa *et. al* (2014), os fungos endofíticos aparentam ter 2 tipos de sistemas de enzimas extracelulares, responsáveis por degradar os componentes lignocelulósicos da parede celular das plantas: (i) as enzimas hidrolíticas, principalmente as celulases e xilanases e (ii) as enzimas oxidativas, principalmente lacases, peroxidases e ligninases, alvo do presente trabalho que serão discutidas posteriormente.

A localização geográfica das hospedeiras e as condições ecológicas do ambiente podem afetar a produção das substâncias ativas produzidas pelos fungos. Estudos sugerem que os efeitos benéficos, promovidos pelos endofíticos, podem estender-se à degradação de compostos xenobióticos, principalmente em caso de plantas que crescem em locais contaminados (GERMAINE *et al.*, 2006; STROBEL, G.; DAISY, 2003). Alguns endofíticos associados a folhas têm alta produção de enzimas lignolíticas, como as peroxidases (CARROLL, G. C.; CARROLL, F. E., 1978).

2.1.1 GÊNERO *Diaporthe*

Os ascomicetos do gênero *Diaporthe*, também previamente conhecidos como *Phomopsis* em seu estado assexuado, formam um grupo que conta com várias espécies, que pertencem a família Diaporthaceae, a ordem Diaporthales e a classe Dothideomycetes. Atualmente, prezando pela uniformidade prevista no Código Internacional de Nomenclatura de algas, fungos e plantas, o uso do termo *Phomopsis* é preterido por *Diaporthe*, mesmo para descrever fungos desse gênero que são conhecidos apenas em seu estado assexuado, uma vez que ambas nomenclaturas são sinônimas, mas o termo “*Diaporthe*” é priorizado atualmente, uma vez que detém senioridade sobre “*Phomopsis*” (CHEPKIRUI; STADLER, 2017; GOMES *et al.*, 2013; MANAWASINGHE *et al.*, 2019; ROSSMAN *et al.*, 2014). Atualmente o gênero conta com mais de mil espécies cadastradas no MycoBank (acessado em dezembro de 2020).

As espécies desse gênero podem ser encontradas em todo território mundial e são um tipo comum de fungo endofítico. Várias espécies de *Diaporthe* podem infectar diversos hospedeiros ou ainda, da mesma planta podem ser isoladas mais de uma espécie desse gênero. Além disso, a mesma espécie pode ser endofítica ou fitopatogênica, dependendo do seu hospedeiro e do estado de saúde deste. Espécies desse gênero também já foram descritas como saprofíticas e até patogênicas para seres humanos imunocomprometidos e outros mamíferos (GOMES *et al.*, 2013).

Anteriormente, a classificação dos fungos desse gênero se fazia por associação com a espécie vegetal da qual eram isolados, resultando em várias nomenclaturas diferentes para designar o mesmo fungo, porém, como citado previamente, as espécies não são necessariamente específicas para cada planta e um mesmo hospedeiro pode portar mais de uma espécie de endofítico; portanto, atualmente, para identificações mais fidedignas, opta-se por identificação polifásica, utilizando-se principalmente as sequências da região ITS do DNA ribossomal e as

sequência parciais dos genes que codificam o TEF 1- α , a β -tubulina e a calmodulina (REHNER; UECKER, 1994; UDAYANGA *et al.*, 2012).

Do ponto de vista biotecnológico, os fungos *Diaporthe* têm sido relatados como produtores de enzimas, como celulasas, pectinases, proteases e amilases (ALBERTO *et al.*, 2016) e outros metabólitos secundários com potencial industrial, como as Fomosinas D-G e outros compostos, extraídas de *Phomopsis* sp., que possuem atividade antimicrobiana e antifúngica; a Fomosidina, com potente atividade anti-microtúbulos, extraída de *Phomopsis* sp. TUF 95F47 (DAI *et al.*, 2005; KOBAYASHI *et al.*, 2003).

2.3 ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS OXIDATIVAS

A lignina (Figura 1) é um componente importante de materiais vegetais. É uma macromolécula aromática complexa e heterogênea, fornece força e rigidez às paredes e tecidos celulares de todas as plantas vasculares, funcionando como uma cola entre os filamentos e fibras de polissacarídeo (HOFRICHTER *et al.*, 2010). Os componentes polissacarídeos formam microfibras e são densamente acondicionados em camadas de lignina, que auxilia no transporte hídrico, protege contra a atividade de enzimas hidrolíticas e outros fatores externos e que serve como um estabilizador da estrutura vegetal complexa. Depois da celulose, ela é o segundo biopolímero renovável mais abundante da Terra (LEONOWICZ *et al.*, 1999).

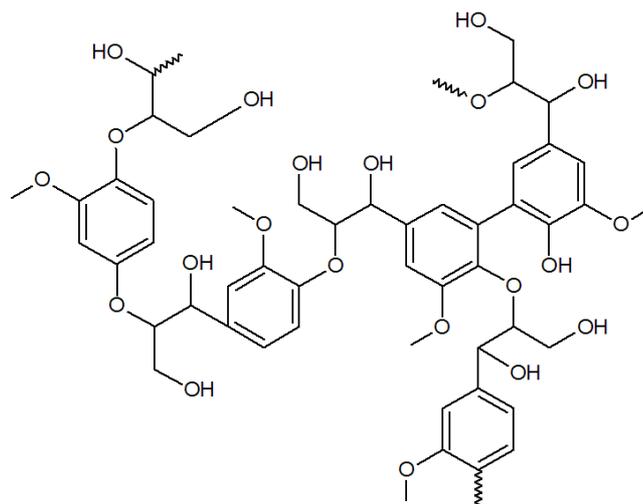


Figura 1 – Estrutura básica da lignina. Fonte: Adaptado de <http://polymerdatabase.com/polymer%20classes/Lignin%20type.html>.

Acesso em 01/12/2020.

As enzimas lignocelulolíticas compõem um amplo grupo de proteínas extracelulares capazes de degradar ou modificar os constituintes da parede celular vegetal, diferenciadas pelo modo de ação, oxidativo (lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase) ou hidrolítico (holocelulases, lipases, esterases e proteases). Essas enzimas possuem baixa especificidade, e por isso são capazes de degradar xenobióticos e têm emprego na indústria têxtil, alimentícia, de papel, de cosméticos, dentre outras (KRACHER; LUDWIG, 2016; WOICIECHOWSKI *et al.*, 2013).

Os principais produtores de enzimas lignolíticas são os basidiomicetos causadores de podridão branca, porém os fungos filamentosos, capazes de degradar a parede celular das plantas, também são capazes de produzi-las e têm uma grande vantagem em relação aos basidiomicetos, pois são mais fáceis de serem cultivados e de terem suas enzimas extracelulares obtidas (CORRÊA *et al.*, 2014).

2.3.1 LACASES

As lacases (oxidase *p*-difenol, EC. 1.10.3.2) são oxidases extracelulares constituídas por glicoproteínas monoméricas, diméricas ou tetraméricas, que geralmente contém de três a quatro átomos de cobre por monômero distribuídos em três sítios redox, também conhecidas como multicobre oxidases; um desses átomos de cobre é responsável pela coloração tipicamente azul dessa enzima (RODRÍGUEZ COUTO; TOCA HERRERA, 2006). Pesquisas reportam isoenzimas com diferentes pesos moleculares, variando entre 50 e 300 kD. A ocorrência de diferentes isoformas de lacase está associada a diversos fatores, como por exemplo as condições de cultivo e à presença de indutores no meio (CHANDRA; CHOWDHARY, 2015; PEZZELLA *et al.*, 2009).

Esta enzima catalisa, principalmente, a oxidação de compostos fenólicos. Como são hábeis para utilizar o oxigênio molecular, as lacases não requerem a adição ou síntese de outros cofatores para exercer sua atividade, no entanto, elas não conseguem oxidar alguns substratos que possuem um tamanho maior do que o seu sítio catalítico (restrição estérica) ou que possuem um potencial redox muito elevado, nesse caso, a presença de certos mediadores químicos, como o 2,2-azino-bis-ethylbentiazolína (ABTS) possibilitam a oxidação dessas moléculas (AGRAWAL, K.; CHATURVEDI; VERMA, 2018; HATAKKA, 1994). A oxidação de compostos direta e indireta pela lacase está esquematizada na Figura 2.

Devido à sua relativa inespecificidade, as lacases são capazes de degradar poluentes e xenobióticos, e possuem emprego em diversas indústrias como na alimentícia, na farmacêutica, na têxtil, na de cosméticos, na deslignificação e braqueamento de madeira para produção de papel, dentre outras (BAJPAI, 2013; BETTIN; BOFF, 2016; D'ANNIBALE *et al.*, 2000; KUCHARSKA *et al.*, 2018; OSIADACZ *et al.*, 1999; TORRES, E.; BUSTOS-JAIMES; LE BORGNE, 2003; UPADHYAY; SHRIVASTAVA; AGRAWAL, P. K., 2016).

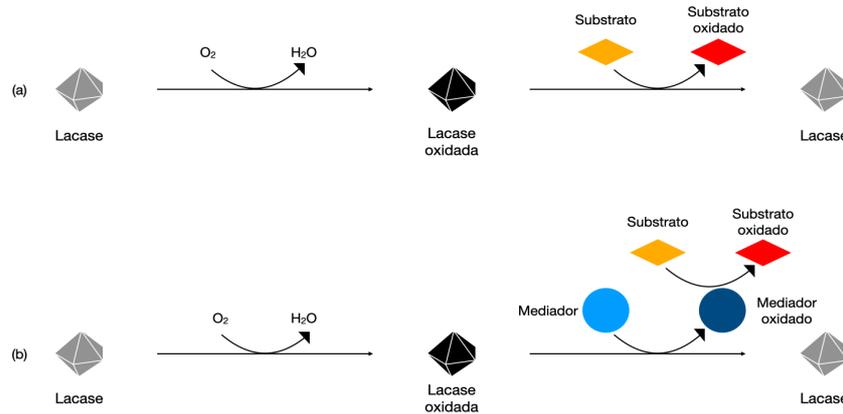


Figura 2 - Ciclo catalítico da lacase. (a) oxidação direta; (b) oxidação indireta. Fonte: adaptado de Agrawal *et. al.* (2018).

O centro catalítico da lacase compreende 3 centros de átomos de cobre: (i) o centro de cobre do tipo 1 (T1), que possui banda de absorção em torno de 600 nm, região visível, do qual advém a coloração azulada, ele contém apenas um átomo de cobre ligado a pelo menos dois resíduos de histidina e um de cisteína; (ii) o centro de cobre do tipo 2 (T2), com baixa absorção na região da luz visível, está ligado a duas histidinas e uma água e o (iii) o centro de cobre tipo 3 (T3), formado por um par de íons de cobre ligados antiferromagneticamente, cada átomo está ligado a três resíduos de histidina. T2 e T3 formam um centro trinuclear que está distante de T1 em média 13 Å e se conectam por uma ligação histidina-cisteína-histidina (BALDRIAN, 2006). Em T1 ocorre a oxidação dos substratos e a transferência de elétrons para T2 e T3; e é no centro trinuclear (T2 e T3) onde ocorre a redução do oxigênio molecular, que funciona como o aceptor final de elétrons, à água (JONES; SOLOMON, 2015) (Figura 3).

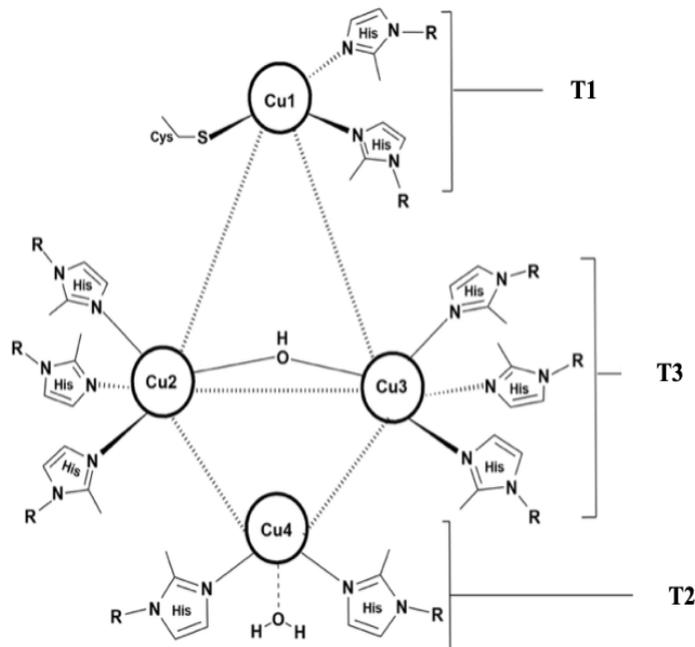


Figura 3 - Representação do sítio ativo da lacase. Fonte: Adaptado de Agrawal et. al. (2018)

2.3.2 PEROXIDASES

As peroxidases (EC 1.11.1.7) são parte da grande família de hemoproteínas, amplamente distribuídas na natureza, que catalisam a oxidação do substrato na presença de peróxido de hidrogênio ou outros peróxidos. Elas apresentam massa molecular na faixa de 30 a 150 kDa. As peroxidases fúngicas extracelulares, isto é: lignina peroxidase (EC 1.11.1.14), manganês peroxidase (EC 1.11.1.13) e peroxidases versáteis (EC 1.11.1.16) pertencem a classe II de peroxidases dentro da família das hemoproteínas (HEINZKILL *et al.*, 1998; WELINDER, 1992). Estas enzimas podem ser extraídas de plantas e diversos microrganismos, incluindo os fungos (GAUTÉRIO *et al.*, 2015).

Estudos mostram que essas enzimas são eficientes na bioremediação de efluentes têxteis como as tintas; na polpação de branqueamento da celulose para produção de papel; na indústria cosmética para a fabricação de cremes clareadores; na degradação de resíduos lignocelulósicos para produção de etanol, na indústria alimentícia com potencial para a produção de flavolizantes, dentre outras aplicações (BARBOSA *et al.*, 2008; FALADE *et al.*, 2017; KUMAR; CHANDRA, 2020; PERALTA-ZAMORA *et al.*, 1997).

Essas enzimas oxidam os substratos em várias etapas de transferências de elétrons e formação de compostos radiculares capazes de oxidar moléculas de substratos, até a última etapa, na qual um peróxido atua como acceptor final de elétrons da reação (WONG, 2009).

A Figura 4 mostra resumidamente o ciclo catalítico das peroxidases. Primeiramente, na presença de peróxido de hidrogênio, o átomo de ferro do grupo heme é oxidado, produzindo o chamado Composto 1, que é um intermediário reativo de alta valência (ferro-oxo porfirina). O Composto 1 é responsável pela oxidação do substrato (RH), reação na qual é reduzido para o Composto 2, que é ainda capaz de oxidar mais uma molécula do substrato, retornando então para o estado de repouso inicial da enzima (TORRES, E.; BUSTOS-JAIMES; LE BORGNE, 2003).

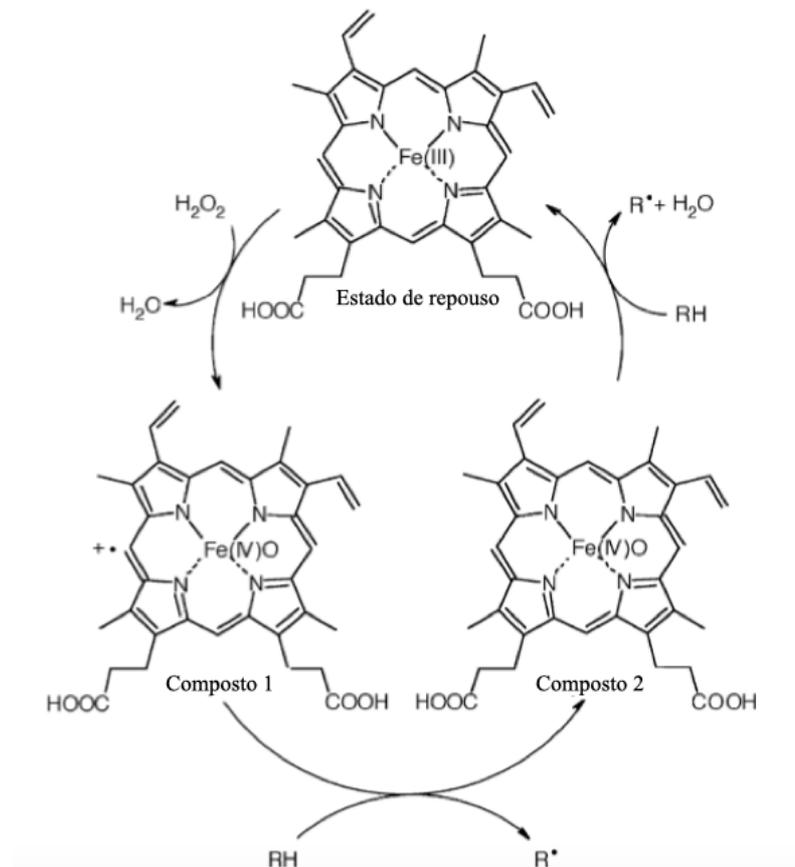


Figura 4 - Ciclo catalítico das peroxidases na presença de peróxido de hidrogênio. Adaptado de Torres et. al. (2003).

2.4 CERRADO BRASILEIRO

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro ocupando uma área de aproximadamente 22% do território nacional (2,04 milhões de quilômetros quadrados). Ele ocupa a área central do Brasil, englobando diversos estados dessa região, incluindo o Distrito Federal. Esse bioma é considerado um *hotspot*, no qual cerca de 5% da biodiversidade da flora e da fauna mundiais são encontrados e pelo menos um terço da biodiversidade brasileira (SANO, 2008; KLINK e MACHADO, 2005; BORLAUG, 2002).

Quando se têm a intenção de utilizar microrganismos como fontes de bioprodutos, é melhor que esses microrganismos sejam isolados da própria região, para evitar que haja invasões biológicas de espécies estranhas ao bioma local, e que potencialmente possam causar impactos imprevisíveis na área (PIVELLO, 2011).

Os relatos na literatura sobre quantificação de enzimas lignolíticas obtidas de fungos endofíticos ainda são muitos escassos, e inexistentes quanto a atividade dessas enzimas obtidas de *Diaporthe* na espécie vegetal *Solanum falciforme* Farruggia.

2.5 PLANEJAMENTO FATORIAL

O planejamento de experimentos é essencial para estabelecer o *layout* sob o qual as hipóteses de pesquisa serão avaliadas. As verificações dependem da utilização de métodos de análise estatística, que dependem da maneira sob a qual as observações foram adquiridas, tornando a etapa do planejamento de experimentos de suma importância para o sucesso do trabalho (MARINHO; CASTRO, 2005).

Geralmente, a otimização de variáveis experimentais é realizada por meio de procedimentos que avaliam o efeito de apenas uma variável por vez (univariado), apresentando desvantagens, principalmente associadas ao maior tempo gasto e à falta de avaliação sobre as interações entre as variáveis que afetam o processo em estudo (CUNICO, M. W. M. *et al.*, 2008). Para otimizar esses parâmetros, a técnica de planejamento fatorial é aplicada.

Segundo Fisher (1935), pai da estatística moderna, os planejamentos experimentais devem seguir a repetição, o controle local e a casualização como princípios fundamentais. A repetição independente dos ensaios (replicatas) torna possível a estimação do erro experimental e demonstra a repetibilidade do experimento; o controle aumenta a exatidão dos resultados, e a casualização, que é a aleatorização da execução dos ensaios, evita que sejam adicionados vieses, sejam eles conhecidos ou não, que possam interferir na resposta observada ou invalidar a estimativa do erro experimental (FISHER, 1935).

No planejamento fatorial o primeiro passo é decidir quais são os fatores (as variáveis de entrada) que afetam ou não as respostas, que são as variáveis de saída, ou parâmetros de análise, do sistema que se investiga. O sistema pode ser representado por uma equação, inicialmente desconhecida, que opera relacionado o efeito das variáveis de entrada, que são as combinações entre os fatores e os níveis, sobre as variáveis de saída, que são as respostas observadas experimentalmente (Figura 5). O objetivo do planejamento fatorial é descobrir qual é essa função para entender a natureza da reação e, dessa forma, possibilitar a escolha das melhores condições de operação do sistema (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Esse tipo de experimento envolve combinações entre os níveis (concentrações, intensidades, valores) de dois ou mais fatores (variáveis), tanto os fatores quanto os seus níveis são definidos segundo o interesse do pesquisador. Se todas as combinações de fatores e níveis são testadas, trata-se de um planejamento fatorial completo (RODRIGUES; IEMMA, 2014, p.95).

Um planejamento fatorial completo com p níveis e k fatores requer no mínimo a realização de p^k ensaios. Um planejamento fatorial completo 2^2 requer a realização de, no mínimo, 4 ensaios para testar todas as combinações possíveis de níveis e fatores. Quando o número de fatores é reduzido, é uma boa opção optar pelo fatorial completo (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

De forma recorrente, a necessidade de replicatas nos experimentos para o cálculo do erro experimental também eleva o número de ensaios a serem realizados, portanto, nos planejamentos fatoriais, é possível a inclusão de um ponto central (PC), que equivale à média dos níveis previamente determinados para cada fator e é no PC que a medida do erro experimental é realizada (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

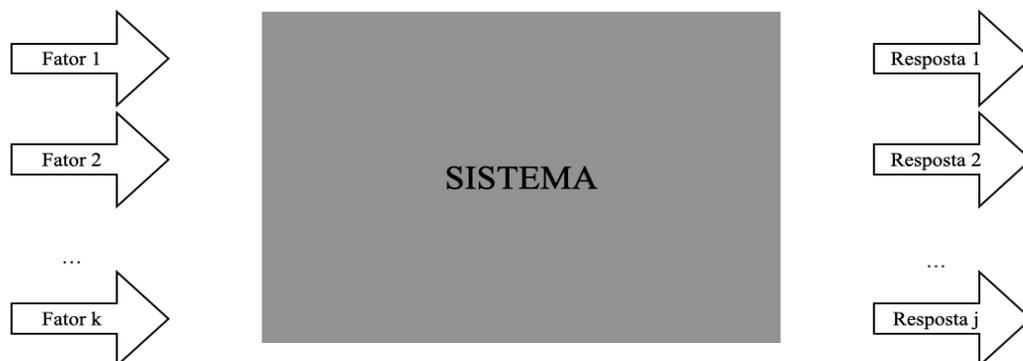


Figura 5 - Representação de um sistema sendo influenciado por fatores de entrada e suas respostas. Adaptado de Neto (2010).

Por sua vez, a significância dos efeitos é calculada pela construção de intervalos de confiança (IC) para cada efeito. Se o zero estiver contido no intervalo de confiança, a leitura feita é a de que existe uma probabilidade de $1 - \alpha$ (sendo α o nível de significância adotado) de que o valor daquele efeito sobre a resposta seja igual a zero, ou seja, não é significativo (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Considerando suas características, os sistemas de planejamento fatorial permitem avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais, quando comparados aos processos univariados, levando à otimização eficiente de um processo (CUNICO *et al.*, 2008).

3 OBJETIVOS

a. Objetivo Geral

- Isolar fungos endofíticos de uma espécie vegetal do Cerrado e obter enzimas oxidativas de interesse industrial e que possam ser usadas na bioremediação de efluentes, realizando a otimização de sua produção.

b. Objetivos específicos

- Isolar e identificar fungos endofíticos isolados de *Solanum falciforme* Farruggia;
- Identificar a espécie vegetal da qual os fungos endofíticos foram isolados;
- Verificar a capacidade de produção de lacases e peroxidases totais pelos fungos isolados;
- Otimizar a produção de lacases e peroxidases através de planejamentos fatoriais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

Foi realizada a coleta de duas folhas da espécie vegetal selecionada para isolamento de fungos na Universidade de Brasília (UnB), campus Darcy Ribeiro, às 15h21 do dia 12 de março de 2019. O isolamento dos fungos seguiu o protocolo a seguir:

Quadro 1 - Protocolo de isolamento de fungos endofíticos

PROTOCOLO DE ISOLAMENTO DE FUNGO ENDOFÍTICO
<ul style="list-style-type: none"> - Fazer a desinfecção da superfície das folhas lavando com água corrente e detergente sem romper o tecido. - Seguir as seguintes imersões em capela de fluxo laminar: <ul style="list-style-type: none"> - 1ª Etanol 70°GL por 60 segundos - 2ª Hipoclorito de sódio 2% por 60 segundos - 3ª Hipoclorito de sódio 2% por 90 segundos - 4ª Hipoclorito de sódio 2% por 180 segundos - 5ª Etanol por 60 segundos - 6ª H₂O autoclavada por 30 segundos - 7ª H₂O autoclavada por 30 segundos - 8ª H₂O autoclavada por 30 segundos - Retirar o excesso de água em papel filtro autoclavado; - Pipetar 500 µL da água da última lavagem em placa com meio BDA para controle negativo; - Fazer a impressão da superfície das folhas em placa com meio BDA para controle negativo da superfície; - Fazer 3 recortes de cada folha e plaquear em placas de Sabouraud + 2% Extrato de Malte

4.1.1 PRESERVAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS FUNGOS

Os fungos isolados foram preservados pelo método de congelamento a -80°C (Ultrafreezer Panasonic -80°C) em solução de glicerol e tween 80 que seguiu o seguinte preparo: dissolução de 0,9 g de cloreto de sódio (NaCl) em 50 mL de água destilada, na qual foi adicionada 50 mL de glicerol e 0,2 mL de tween 80. A solução foi distribuída em criotubos

de 1 mL e autoclavada por 20 minutos a 121°C. Após o procedimento de esterilização, 3 discos de 1 mm de cada fungo isolado foram armazenados nos seus respectivos tubos e acondicionados no freezer.

A manutenção dos fungos foi feita com a realização de repiques periódicos em placas de Petri contendo meio Sabouraud e Extrato de Malte (2%).

4.2 PREPARO DE MEIOS DE CULTIVOS E SOLUÇÕES

- Meio Sabouraud (SB) e Extrato de Malte (EM) 2% (SB/EM2%)

Foram pesados 65 g de ágar Sabouraud dextrose (Acumedia®) e 20 g de extrato de malte (Merck®), que posteriormente foram dissolvidos em água destilada até atingir um litro.

- Meio Sólido de Bagaço de Cana de Açúcar (BGS)

O protocolo seguido foi o de Machado et. al (2005) com adaptações. A composição do meio pode ser vista na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição do meio BGS.

Reagentes	Quantidades (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Dinâmica®)	2
MnSO ₄ .H ₂ O (Dinâmica®)	0,04
NaCl (Cromoline®)	0,1
CaCl ₂ .2H ₂ O (Vetec ®)	0,1
KH ₂ PO ₄ .7H ₂ O (Dinâmica ®)	10
Glicose (Dinâmica ®)	20
Bagaço de Cana em pó	10
Ágar (Acumedia®)	20

O bagaço de cana foi doado pelo Dr. Félix Siqueira, da Embrapa Agroenergia.

O meio líquido foi preparado da mesma forma, porém sem a adição do ágar à formulação. Para alguns ensaios, a glicose foi substituída por peptona (Sigma-Aldrich®).

- Tampão Acetato de Sódio 200 mM pH 5,0

Para obtenção do tampão foram preparadas duas soluções. Para a solução 1 foram pesados 13,12 g de acetato de sódio (Vetec®), que foram dissolvidos em água destilada até

atingir um volume de 800mL; para a solução 2 foram pipetados 3,43 mL de ácido acético Dinâmica®) em água destilada q.s.p 300 mL. Em seguida, foram retirados 293,72 mL da solução 2 e adicionados a 706,28 mL da solução 1 totalizando 1L de tampão. O pH foi ajustado para 5 com Hidróxido de Sódio (NaOH) 1,0 M.

- Solução de ABTS (2,2-azino-bis-(ácido 3 etilbenzotiazol-6-sulfônico)) 5 mM
Foram pesados 0,14g de ABTS (Sigma-Aldrich®) e dissolvidos em água destilada q.s.p 50 mL.
- Solução de H₂O₂ 2 mM
Foram pipetados 226,6 µL de H₂O₂ (Dinâmica ®) em água destilada q.s.p 100 mL.
- Azida Sódica 10%
Foram pesados 5 g de azida sódica (Merck®) e dissolvidos em q.s.p. 50 mL de água destilada.

4.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO EM MEIO SÓLIDO

Para o cultivo em meio sólido, um disco de micélio de 6 mm foi transferido de uma placa de meio sólido de Sabouraud e Extrato de Malte 2% para uma placa de meio BGS, contendo bagaço de cana como indutor da produção de enzimas lignolíticas (MACHADO; MATHEUS; BONONI, 2005). Os fungos foram incubados a 28°C por 7 dias em estufas (Tecnal®), após esse período, o meio sólido foi rompido com auxílio de espátula e transferidos para frascos tipo Erlenmeyer nos quais foram adicionados 30 mL de tampão acetato de sódio 200 mM pH 5,0 para extração das enzimas, os frascos foram colocados em Shaker por 30 minutos, 121 rpm e 28°C, após esse período foi obtido o extrato bruto por filtração em funil de Büchner com papel filtro do tipo Whatman nº 1 e coleta do sobrenadante, os extratos foram acondicionados em tubos do tipo Falcon e armazenados em refrigerador até a análise.

4.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO

O cultivo em meio líquido (BGS) para os fungos endofíticos foi feito em frascos Erlenmeyer de 125 mL ou 250 mL, contendo 50 mL de meio líquido. Os frascos foram autoclavados a 121°C por 20 min. Posteriormente, a inoculação foi feita com a transferência de um disco de 6 mm de micélio fúngico da placa para os Erlenmeyers em fluxo de capela laminar (Veco®).

O cultivo permaneceu em agitação constante em shaker (Innova®) a 28°C e 121 rpm. Após o tempo determinado de cultivo para cada ensaio, os meios foram filtrados com bomba à vácuo (Diapump®) em funil de Büchner com papel filtro do tipo Whatman nº 1 e o sobrenadante foi coletado e nomeados de extrato bruto enzimático (EBE); os EBEs foram transferidos para tubos tipo Falcon, nos quais foram adicionados 400 µL de ázida sódica 10% (v/v) e foram armazenados em refrigerador até a análise.

Antes das análises para determinação das atividades enzimáticas, 5 mL de cada extrato foram filtrados com auxílio de seringa descartável e filtro de membrana hidrofílica de politetrafluoretileno hidrofilizado (H-PTFE) com porosidade de 0,45 µm (Unifil®).

Para as curvas de 30, 15 e 10 dias as amostras foram retiradas a cada dia (3 Erlenmeyers para cada fungo) e todo o conteúdo foi vertido e filtrado.

Nas curvas de 15 dias, o pH foi medido no início e após a retirada de cada amostra em pHmetro (Quimis®), assim como o pH inicial para cada amostra dos planejamentos fatoriais.

4.5 DETERMINAÇÃO DE LACASE

O protocolo para a determinação da atividade de lacase consiste em expor o substrato padrão, ABTS (2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), ao extrato bruto enzimático e monitorar a formação do cátion radical ABTS⁺ por espectrofotometria (absorbância a 420 nm) por 90 segundos de acordo com o protocolo estabelecido por Wolfenden e Wilsons (1982), com adaptações.

Os ensaios foram realizados em placas de Elisa de 96 poços, para cada amostra foram adicionados 180 µL de tampão acetato de sódio 200 mM pH 5, 180 µL de extrato bruto enzimático, e imediatamente antes da leitura foram adicionados 40 µL da solução de ABTS 5 mM. Uma leitura de absorbância foi obtida a cada 5 segundos, totalizando 19 valores de absorbância por amostra, cada ensaio foi realizado em triplicata. A partir da correspondência desses valores com o tempo do ensaio, uma função do primeiro grau ($y = ax+b$) foi obtida e o coeficiente angular foi utilizado para o cálculo da concentração enzimática segundo a equação a seguir:

$$Atividade = \left[\frac{X \Delta x F d}{t_{min} x \varepsilon} 10^6 \right] U_{lacase} \cdot mL^{-1} \text{ (Equação I);}$$

$\bar{X}\Delta$ corresponde a média dos coeficientes angulares das triplicatas;

Fd é o fator de diluição, obtido pela equação II;

t_{min} é o tempo do ensaio em minutos, que corresponde a 1,5;

ε é o coeficiente de extinção molar específico do ABTS, que é 36000 para a concentração de 1 mol/L em caminho óptico de 1 cm, como o poço da placa de 96 poços de Elisa mede 0,5 cm, utilizou-se o valor de 18000;

10^6 é o valor de conversão de mol para μmol .

$$Fd = \frac{Vol_{incubação}}{Vol_{alíquota}} \quad (\text{Equação II});$$

O $Vol_{incubação}$ é o volume total do ensaio, 400 μL ;

O $Vol_{alíquota}$ é o volume da amostra utilizado, 180 μL , como esses valores não se alteram, o valor de Fd é igual a 2,22 para todos os ensaios.

Os ensaios foram realizados no espectrofotômetro Spectramax® Plus 384 (Molecular devices, sunnyvale, USA) a 28°C.

4.6 DETERMINAÇÃO DE PEROXIDASES TOTAIS

A determinação da atividade de peroxidases totais também consiste em expor o mesmo substrato padrão, ABTS (2,2-azino-bis-(3 etilbenzotiazol-6-sulfônico)), ao extrato enzimático, mas agora, na presença de peróxido de hidrogênio, e monitorar a formação do cátion radical ABTS⁺ por espectrofotometria (absorbância a 420 nm) por 90 segundos (HEINZKILL et al., 1998).

Os ensaios foram realizados em placas de Elisa de 96 poços, para cada amostra foram adicionados 140 μL de tampão acetato de sódio 200 mM pH 5, 180 μL de extrato bruto enzimático, 40 μL de H₂O₂ 2 mM e imediatamente antes da leitura foram adicionados 40 μL da solução de ABTS 5 mM. O cálculo para a atividade de peroxidases totais foi o mesmo da equação I, subtraindo-se o valor da atividade de lacases do valor da atividade de peroxidases totais.

$$U_{perox\ totais} \cdot mL^{-1} = Atividade_{perox} - Atividade_{lacases}$$

(Equação III)

Os ensaios também foram realizados no espectrofotômetro Spectramax® Plus 384 (Molecular devices, sunnyvale, USA) a 28°C.

4.7 PLANEJAMENTO FATORIAL

Foi selecionado um planejamento fatorial 2^3 com um ponto central para a otimização da produção de lacases e peroxidases totais pelos fungos. Na tabela 2 estão representados os fatores (variáveis de entrada): o pH inicial do meio de cultivo, a quantidade de peptona (fonte de nitrogênio) e a quantidade de bagaço de cana (indutor enzimático); e os níveis selecionados para eles e para o ponto central.

Tabela 2 - Fatores e Níveis selecionados para otimização da produção enzimática.

Fatores		Níveis		
Real	Codificado	-1	0	1
pH inicial	X ₁	4	6	8
Peptona*	X ₂ (g)	0	1	2
Bagaço de cana*	X ₃ (g)	0,25	0,50	0,75

*Por cultivo (50 mL)

Na tabela 3 encontra-se a matriz do planejamento fatorial, na qual é possível consultar a combinação dos níveis de cada fator em cada combinação de ensaios.

Tabela 3 - Matriz do planejamento fatorial. “T” se refere às combinações dos ensaios (tratamentos) e “PC” se refere ao ponto central, realizado em triplicata.

Ensaio	X1	X2	X3
T1	-1	-1	-1
T2	1	-1	-1
T3	-1	1	-1
T4	1	1	-1
T5	-1	-1	1
T6	1	-1	1
T7	-1	1	1
T8	1	1	1

PC 1	0	0	0
PC 2	0	0	0
PC 3	0	0	0

Todos os ensaios foram aleatorizados por sorteio antes da realização. A variável resposta foi definida como unidade de enzima por mililitros de extrato bruto enzimático ($U_{enzima} \cdot mL^{-1}$) e a otimização foi realizada por Metodologia de Superfície de Resposta.

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas no Microsoft Excel® e no software Design Expert 7.0.

4.9 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Primeiramente, foi realizada uma observação morfológica e microscópica para agrupar os diferentes isolados em grupos com características semelhantes. Porém, diferentes autores citam a ineficiência de uma análise apenas morfológica para correta identificação de microrganismos; portanto, para uma identificação mais fidedigna optou-se pela identificação molecular dos fungos isolados.

4.9.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Os fungos foram cultivados em placas com batata dextrose ágar (BDA) cobertas com papel celofane e mantidas a 25 °C por até duas semanas, variando de fungo para fungo. O micélio foi removido com auxílio de palitos de madeira esterilizados e colocados em microtubos de 2,0 mL juntamente com microesferas (beads), as amostras foram colocadas em um disruptor de células (L-Beader 6, Loccus®) por 30 segundos a 4000 rpm, para liberação do DNA no meio. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o kit de purificação de DNA genômico da Promega (Wizard Genomic DNA Purification Kit) conforme o protocolo do fabricante, com adaptações de Pinho et al. (2013).

4.9.2 AMPLIFICAÇÃO DO DNA, SEQUENCIAMENTO E ANÁLISES FILOGENÉTICAS

As regiões gênicas parciais correspondentes ao *Internal transcribed spacer* - ITS (região espaçadora interna transcrita, em português) e ao *Nuclear Large subunit ribosomal*

ribonucleic acid - LSU foram amplificadas para cada isolado usando os seguintes primers da tabela 4.

Tabela 4 - Sequências dos primers utilizados para amplificar as regiões ITS e LSU.

Loco	Sequência dos primers	Referência
ITS	ITS1- 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'	White et al., 1990
	ITS4 - 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'	
LSU	LR5 – 5' TCCTGAGGGAAACTTCG 3'	Vilgalys & Hester 1990
	LR0R - 5' GTACCCGCTGAACTTAAGC 3'	Rehner & Samuels, 1994

Cada reação de PCR foi preparada utilizando 18 µL de Platinum® PCR SuperMix, 0,4 µL de cada primer na concentração de 10 µM e 1,2 µL de DNA genômico (25 ng/µL). As amplificações foram realizadas de acordo com as especificações de cada primer e do fabricante da Platinum® PCR SuperMix.

O ciclo da PCR foi programado para desnaturação inicial a 92°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 92°C por 40 segundos, anelamento a 52°C por 1 minuto e 30 segundos e extensões a 72°C por 2 minutos antes da extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 0,8 % corados com GelRed™ (Biotium Inc.) para verificar a pureza e tamanho dos fragmentos. Os produtos de PCR foram purificados e sequenciados pela empresa especializada MacroGen Inc., Coreia, Seul, República da Coreia (<http://www.macrogen.com>).

As sequências de nucleotídeos foram editadas com o software MEGA X. Sequências adicionais foram obtidas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para comparação dos isolados por uma análise de BLAST (basic local alignment tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para possível identificação com outras sequências previamente depositadas no GenBank. As novas sequências futuramente serão depositadas no GenBank e ficarão disponíveis para consulta.

Para a análise filogenética, as sequências editadas no MEGA X foram alinhadas pelo software MUSCLE (KUMAR et. al, 2018). Baseando-se nas regiões de ITS amplificadas, uma análise de Máxima Verossimilhança (ML - maximum likelihood, em inglês), para identificar os isolados nesse estudo através da sua relação filogenética com outras espécies previamente identificadas, foi realizada no RAxML-HPC v.8 on XSEDE na plataforma CIPRES Science Gateway com 1.000 reamostragens para cálculo dos valores de Bootstrap (BV) (MILLER, M. A.; PFEIFFER; SCHWARTZ, 2010). A árvore filogenética foi visualizada no software FigTree (RAMBAUT, 2009).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

A árvore da qual os fungos foram isolados foi identificada pelo Prof. Christopher William Fagg como *Solanum falciforme* Farruggia, ela foi escolhida devido a facilidade de acesso. Essa espécie é endêmica do Brasil, restrita ao bioma Cerrado e pode ser encontrada como arbusto ou árvore de até cinco metros de altura. Ela é considerada parte do chamado “grupo de *S. crinitum*”, que inclui pelo menos 10 espécies de *Solanum* com ocorrência confirmada no Brasil, a saber: *S. crinitum* Lam., *S. lycocarpum*, *S. quaesitum* C.V. Morton, *S. medusae* e *S. gomphodes* Dunal; que junto com a *S. falciforme* Farruggia são encontradas fora da Amazônia e *S. altissimum* Benítez, *S. orientale* Benítez, *S. acanthodes* Hook.f., e *S. tricuspidatum* Dunal), que são espécies exclusivas da Amazônia (GOUVÊA; STEHMANN; KNAPP, 2019).

Ela se assemelha, principalmente, às *S. lycocarpum* (lobeira) e *S. crinitum*, mas se distingue pela presença de pelos macroscópicos em formato de foice com pedúnculos longos nos caules jovens, nas inflorescências e no cálice. Além da sua ocorrência no Distrito Federal, ela já foi confirmada em Goiás, na Bahia e em Minas Gerais (FARRUGGIA; BOHS, 2010). Até o momento, não consta o registro dessa árvore no Herbário da Universidade de Brasília, portanto o depósito do registro será realizado.



Figura 6 - *Solanum falciforme* Farruggia.

Foi realizada a coleta de duas folhas que foram designadas de P e G. A primeira, “P”, mediu aproximadamente 8 cm e apresentou um formato deltóide (triangular) alongado na extremidade, com suas margens lobadas. Já a folha “G” mediu aproximadamente 14 cm, com um formato falciforme e margens onduladas. Ambas são opacas dos dois lados das folhas, cobertas de tricomas na superfície com e estrutura penínérvea (nervuras ramificadas), além disso, a folha G apresentou um espinho no terço inferior da sua superfície (Figura 7).



Figura 7 - folhas coletadas de *Solanum falciforme* Farruggia.

O isolamento seguiu o protocolo descrito na seção 4.1. Foram retirados 3 pedaços de cada folha para obtenção dos fungos, como pode ser visto na Figura 8 abaixo.

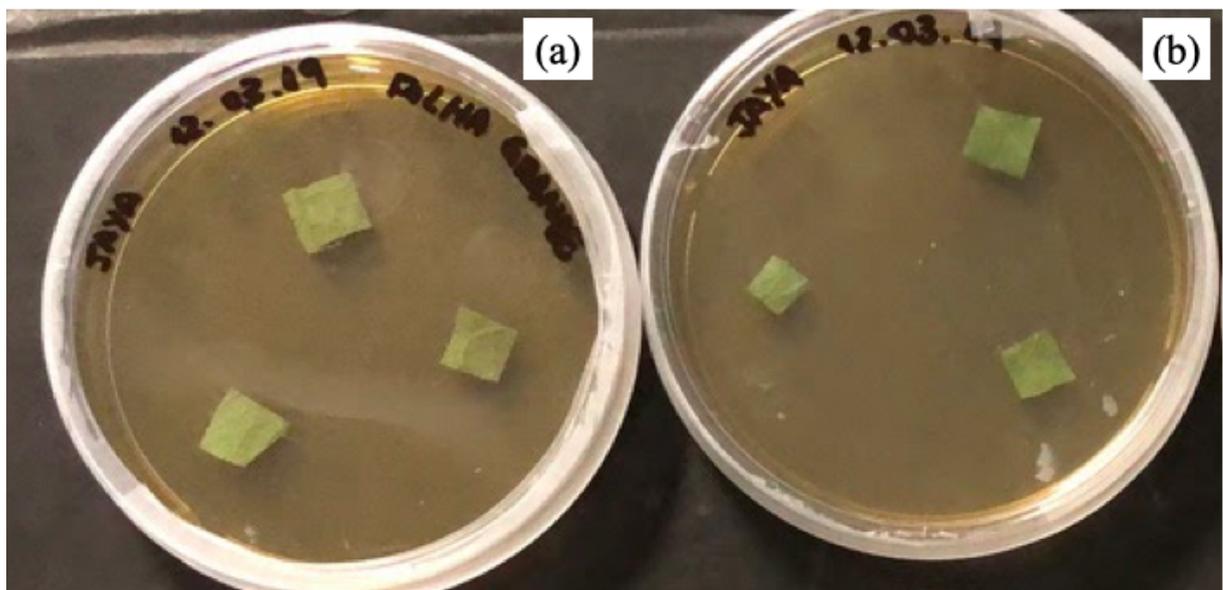


Figura 8 - Placas contendo os fragmentos de tecido vegetal para obtenção dos isolados fúngicos. (a) Folha “G”; (b) Folha “P”.

O resultado dos controles mostra que os fungos são, de fato, endofíticos e que também não houve contaminação do ambiente. Nas Figuras 9 e 10 é possível observar o crescimento de dentro do tecido vegetal para o meio da placa.

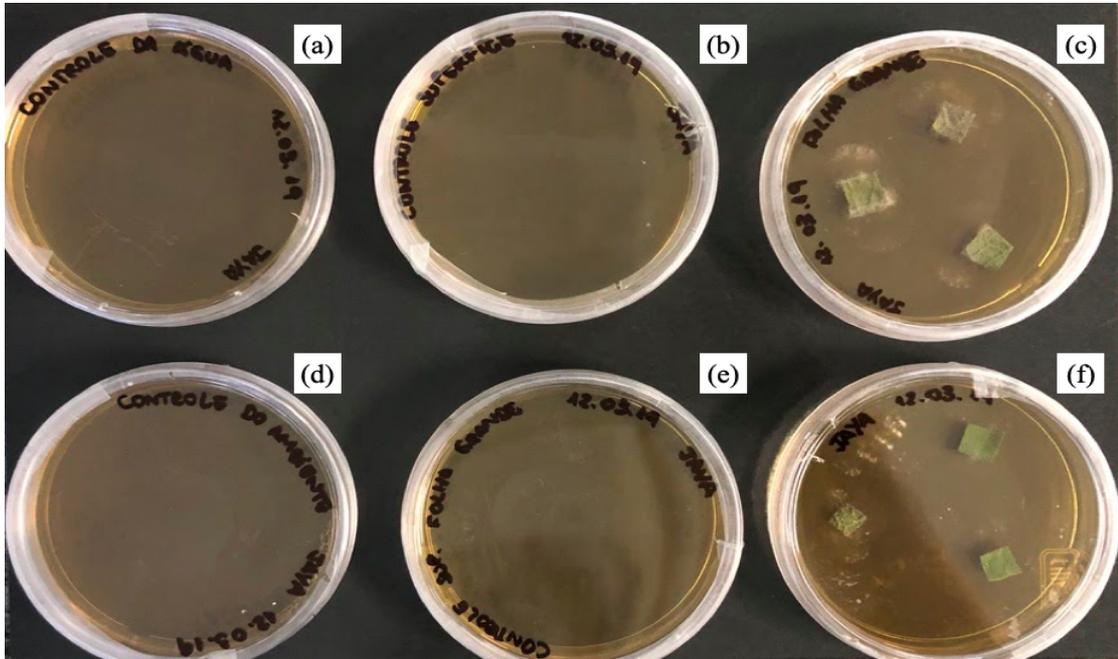


Figura 9 - Controles e isolados com 3 dias de crescimento. (a) controle da água da última lavagem conforme o protocolo de isolamento; (b) controle da superfície da folha “P”; (c) isolados da folha “G”; (d) controle do ambiente (i.e. fluxo laminar); (e) controle.

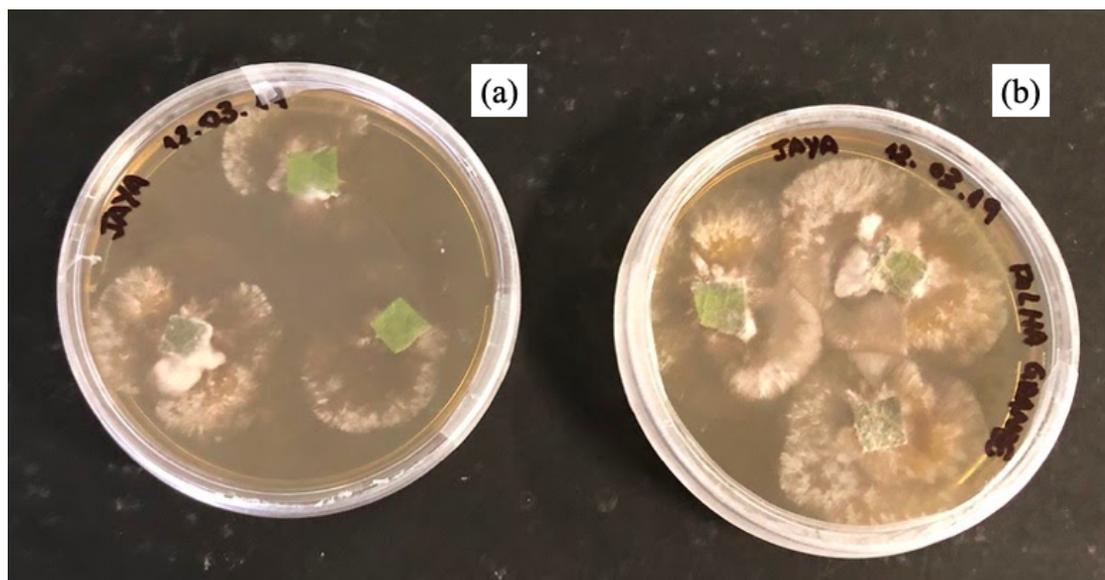


Figura 10 - Isolados com 5 dias de crescimento. (a) Folha “P”; (b) Folha “G”.

De cada placa foram isolados 3 fungos designados: P1, P2 e P3 e G1, G2 e G3, no entanto, devido à contaminação, o fungo G3 foi descartado. A observação morfológica permitiu inferir que os fungos G1 e G2 eram os mesmos que P2 e P3, respectivamente; portanto, optou-se por seguir o trabalho apenas com os fungos isolados da folha “P”.

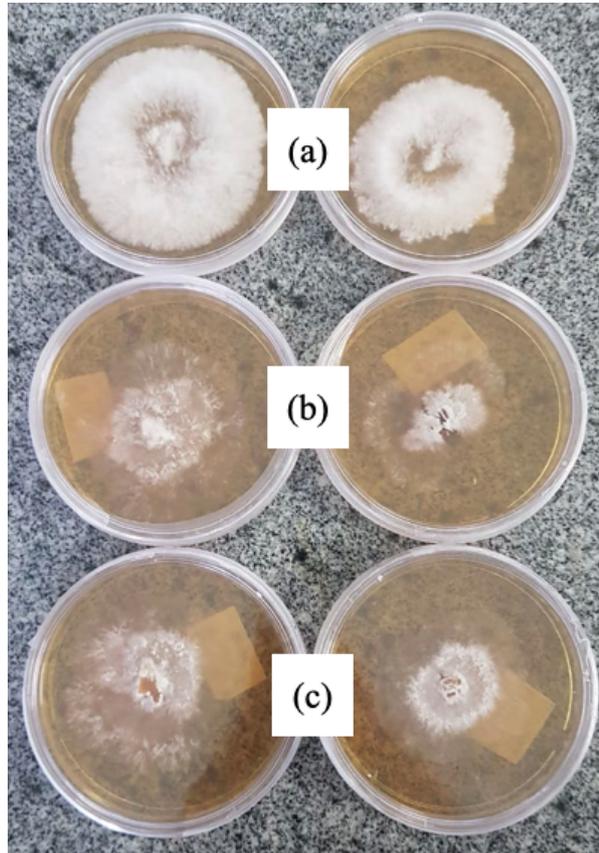


Figura 11 - Fungos isolados em meio SB/2%EM. (a) Fungo “P1”; (b) Fungo “P2”; (c) Fungo “P3”.

Os três fungos apresentam coloração branca, no entanto o fungo “P1” apresentou crescimento aéreo e superficial ao meio, com um aspecto cotonoso; enquanto os fungos “P2” e “P3” apresentaram crescimento com estruturas imersas no meio sólido e aparentam ser mais “ralos” superficialmente (Figura 11). O fungo “P1” demora em média 7 dias para colonizar a placa completamente; “P2” e “P3” demoram em média 12 dias.

5.1.1 EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO

A observação morfológica não é suficiente para se chegar a uma correta identificação, uma vez que as características dos microrganismos podem sofrer, por exemplo, influências do ambiente em que se encontram no momento em que foram isolados. Por isso, a identificação

molecular é mais apropriada para a correta identificação de microrganismos. Os 3 isolados da folha “P” foram então submetidos ao processo para identificação molecular.

Para amplificação do DNA, selecionou-se primers de regiões de ITS (ITS 1 e ITS 4 – aproximadamente 500 pb), considerado o código de barras (barcode) para fungos, e LSU (LR5 e LR0R – aproximadamente 800 pb (SCHOCH *et al.*, 2012). Os produtos da PCR foram então confirmados por meio da eletroforese de gel de agarose 0,8%, corado com GelRed™ e revelado em transluminador ultravioleta, conforme ilustrado pela Figura 12. As regiões amplificadas foram enviadas para purificação e sequenciamento na empresa especializada Macrogen Inc., Coreia.

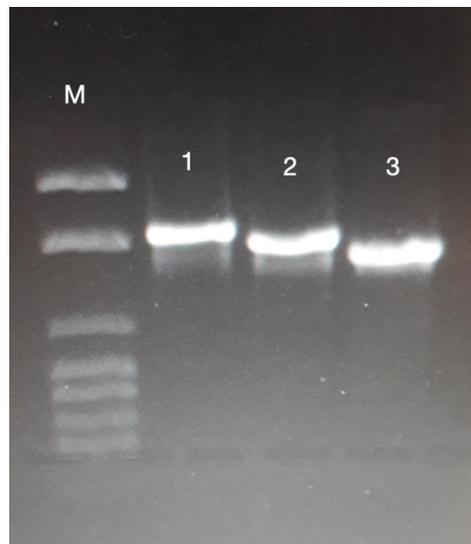


Figura 12 - Confirmação das regiões gênicas de ITS amplificadas. 1) “P1”, 2) “P2 e 3) “P3”. (M) Marcador 1Kb+.

As bandas amplificadas estão próximas da segunda banda do marcador, indicando um tamanho de aproximadamente 1300 pb, confirmando que as regiões selecionadas foram, de fato, amplificadas.

5.1.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA

As sequências obtidas pela Macrogen Inc. foram editadas com o software MEGA X e, então submetidas à comparação com amostras do GenBank utilizando-se o BLAST apenas das regiões de ITS amplificadas, pois a parte correspondente a região LSU apresentou baixa qualidade, segundo observado nos cromatogramas. Todas as sequências de ITS foram relacionadas a sequências de regiões de ITS do gênero *Diaporthe*. Essas sequências serão

depositadas no GenBank futuramente. A árvore filogenética foi construída pelo modelo de Máxima Verossimilhança.

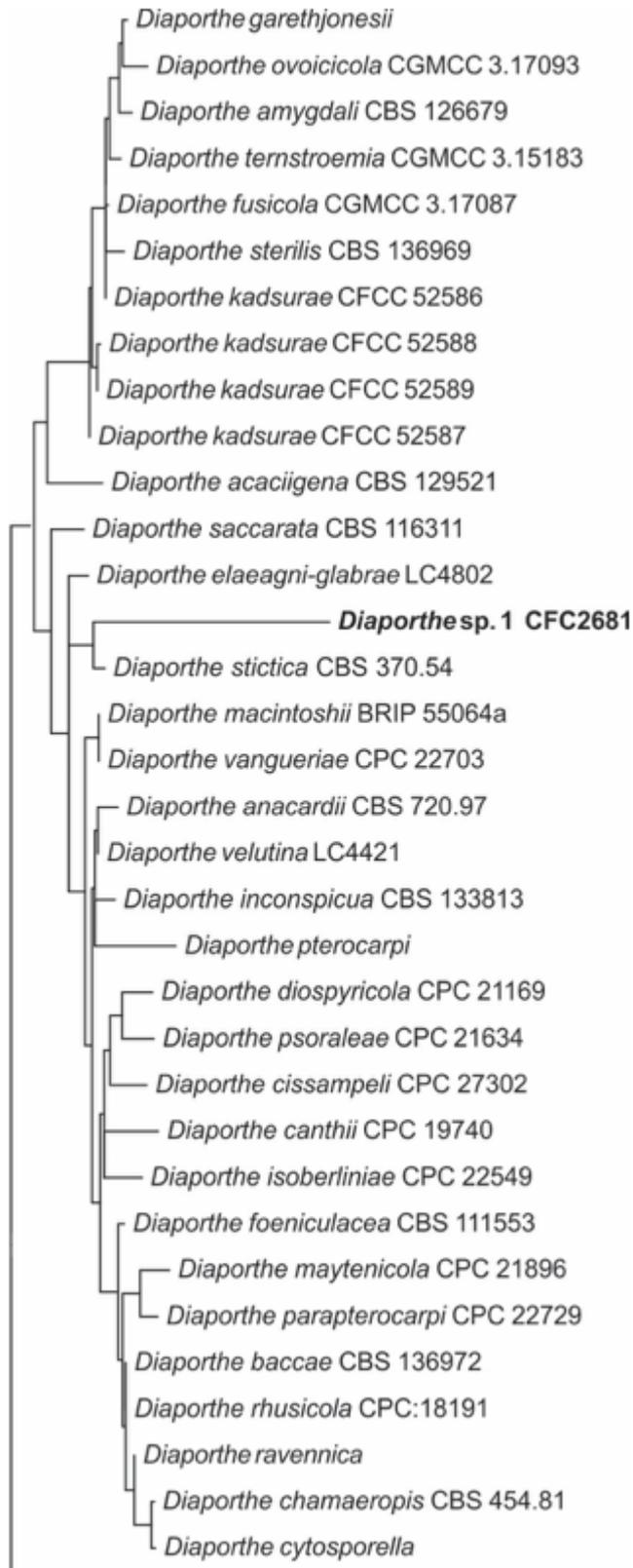
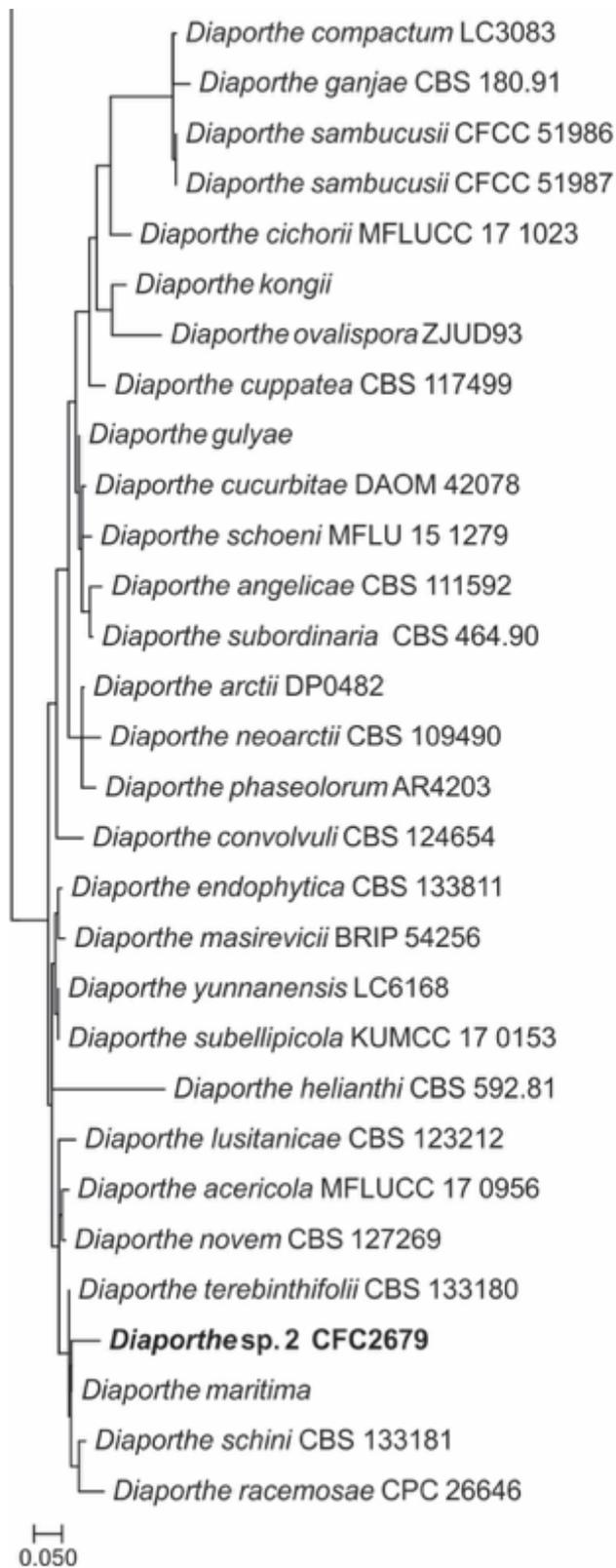


Figura 13 - Relação filogenética de seqüências parciais de ITS obtida por Máxima Verossimilhança (ML) do fungo P1. Os isolados neste estudo estão destacados em negrito.



Continuação da Figura 13: Relação filogenética de sequências parciais de ITS obtida por Máxima Verossimilhança (ML) do fungo P2. Os isolados neste estudo estão destacados em negrito.

A reconstrução das relações filogenéticas entre organismos necessita da aplicação de um método que considere e corrija vários eventos mutacionais no mesmo sítio. De maneira resumida, a Máxima Verossimilhança é um método em que uma hipótese é julgada por quão bem ela prediz os dados observados; a árvore mais verossímil é aquela que tem a maior probabilidade de produzir as sequências observadas com base no modelo evolutivo selecionado pelo pesquisador. Em outras palavras, a relação de verossimilhança de uma topologia, de acordo com um alinhamento, é a soma das verossimilhanças dessa topologia para cada um dos sítios do alinhamento (DEMPSTER, 1972; FELSENSTEIN, 1981; HOLDER; LEWIS, 2003).

Pela relação filogenética estabelecida através das regiões de ITS utilizadas, o isolado “P1” se agrupou com a espécie *Diaporthe stictica* e o isolado “P2” foi agrupado com a espécie *Diaporthe maritima*. No entanto, é importante ressaltar que o tamanho dos ramos reflete divergências entre as unidades taxonômicas operacionais terminais, que no caso desta análise são as espécies; na prática, isso significa que nessa relação filogenética que foi estabelecida pelas regiões amplificadas, o isolado “P2” está mais próximo de *D. maritima* do que “P1” está de *D. stictica* (Figura 13). Apesar de esse gênero já ter sido relatado como um dos gêneros mais comuns de fungos endofíticos isolados (BOTELLA; DIEZ, 2011), para o conhecimento desse trabalho, esse é o primeiro relato de endofíticos do gênero *Diaporthe* em *Solanum falciforme* Farruggia. Não foi possível realizar inferências sobre a relação filogenética através do sequenciamento do isolado “P3”, pois o resultado do sequenciamento indicou contaminação, portanto, decidiu-se seguir o trabalho apenas com os isolados “P1” e “P2”. Uma nova tentativa de identificação para o isolado “P3” será realizada futuramente dos discos que estão conservados.

Há apenas um relato da espécie *D. maritima* em *Picea rubens* (abeto vermelho), no Canadá; da qual foi isolada os metabólitos Fomopsólidos (*Phomopsolides*, em inglês) A, B e C, que possuem atividade antibiótica contra bactérias Gram-positivas, sendo esses metabólitos considerados dominantes para essa espécie. Além de um composto alfa-pirona estável com atividade inseticida (TANNEY *et al.*, 2016). A espécie *D. stictica* também conta com apenas um relato de ocorrência em hospedeiro vegetal, tendo sido isolada pela primeira vez na Itália de *Buxus semperviens* (buxo) por Ribaldi em 1954 e originalmente nomeado de *Phomopsis stictica* (GOMES *et al.*, 2013), maiores informações sobre a produção de seus metabólitos secundários não foram encontradas.

Para se estabelecer uma relação filogenética mais precisa, principalmente do isolado “P1” com alguma espécie de *Diaporthe*, ou ainda avaliar se se trata de uma espécie que ainda

não foi identificada, será necessário a amplificação de outras regiões gênicas, como TEF1- α , β -tubulina e calmodulina, que são regiões utilizadas atualmente preconizadas para identificação molecular de espécies de *Diaporthe* (DISSANAYAKE, A., 2017).

5.1.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO GÊNERO *Diaporthe*

O gênero *Diaporthe* é caracterizado por possuir conidiomata picnidial negro ostiolado contendo fiálides cilíndricas e alongadas (Figura 14.B). As fiálides são as estruturas que produzem os conídios, que no caso desse gênero são hialinos, globosos (Figura 14.C), filamentosos e não septados (Figura 14.D).

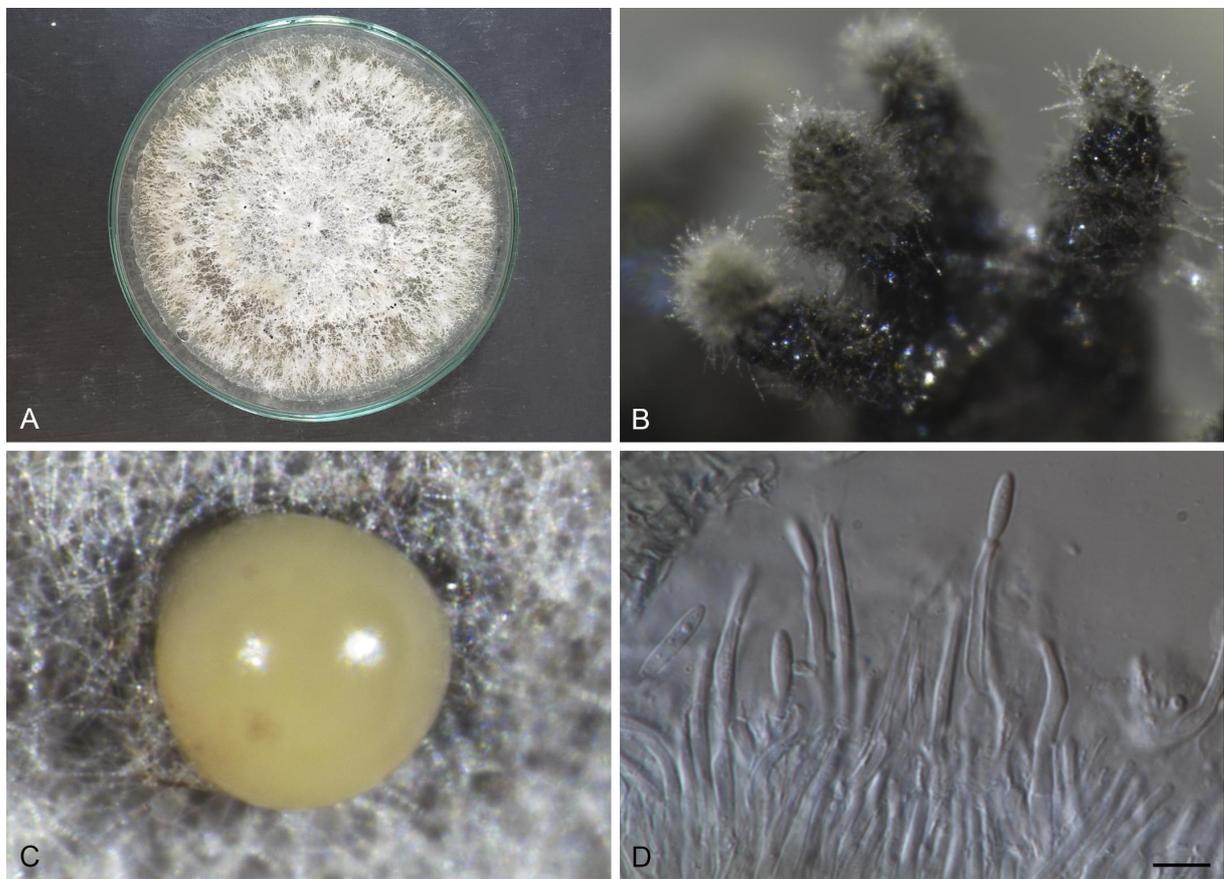


Figura 14 - Morfologia de *Diaporthe* spp. ("P2") Isolado de *Solanum falciforme* Farrugia. **A.** Colônia em BDA depois de 14 dias. **B.** Conidiomata ramificado em meio de cultura. **C.** Massa de conidióforos e conídios. **D.** Conidióforos e conídios. Microscopia óptica. Barra de escala: 10 μ m

5.2 CULTIVO EM MEIO SÓLIDO

Os fungos foram cultivados em meio sólido BGS por 7 dias a 28°C para se verificar a produção de lacases e peroxidases totais segundo o protocolo descrito por Machado et. al. (2005). Como no meio de manutenção, SB/2% EM, o fungo “P1” manteve a mesma característica, crescendo mais superficialmente ao meio, esbranquiçado, porém não colonizou totalmente a placa e cresceu com um aspecto mais enrijecido. Os fungos “P2” e “P3” cresceram bem no meio sólido e, nesse ambiente, apresentaram uma pigmentação esverdeada. A Figura 15 mostra as características dos fungos no meio BGS.

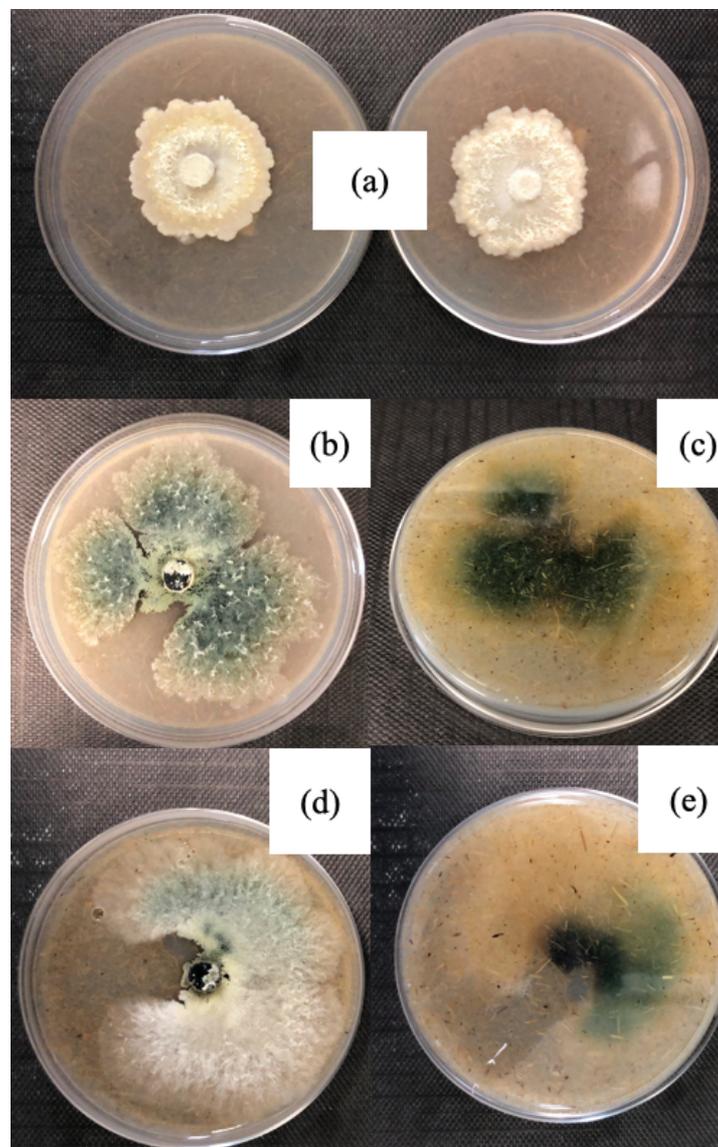


Figura 15 - Fungos isolados em meio BGS. (a) Fungo “P1”; (b) Fungo “P2” frente; (c) Fungo “P2” verso; (d) Fungo “P3” frente; (e) Fungo “P3” verso.

Ao ser repicado novamente em meio SB/2%EM os fungos voltaram a apresentar as características vistas na Figura 11.

O experimento realizado com os extratos brutos obtivos do cultivo em meio sólido não foi capaz de detectar atividade enzimática, então se optou por realizar o cultivo em meio líquido BGS.

5.3 CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO

O cultivo em meio líquido foi realizado pelo mesmo período de 7 dias do cultivo em meio sólido. A observação desses ensaios foi apenas qualitativa, pois se buscava saber se os fungos eram ou não capazes de produzir lacases e peroxidases. A reação tanto de lacases como de peroxidases totais é colorimétrica e pode ser vista a olho nu; quando há atividade enzimática, a oxidação do ABTS leva o extrato bruto, que era levemente amarelado, a se tornar azul-esverdeado, quanto mais forte o tom de azul, maior a atividade enzimática, um exemplo da coloração do ensaio pode ser visto na Figura 16, realizado para determinar a atividade de lacases de “P1” e “P2”.

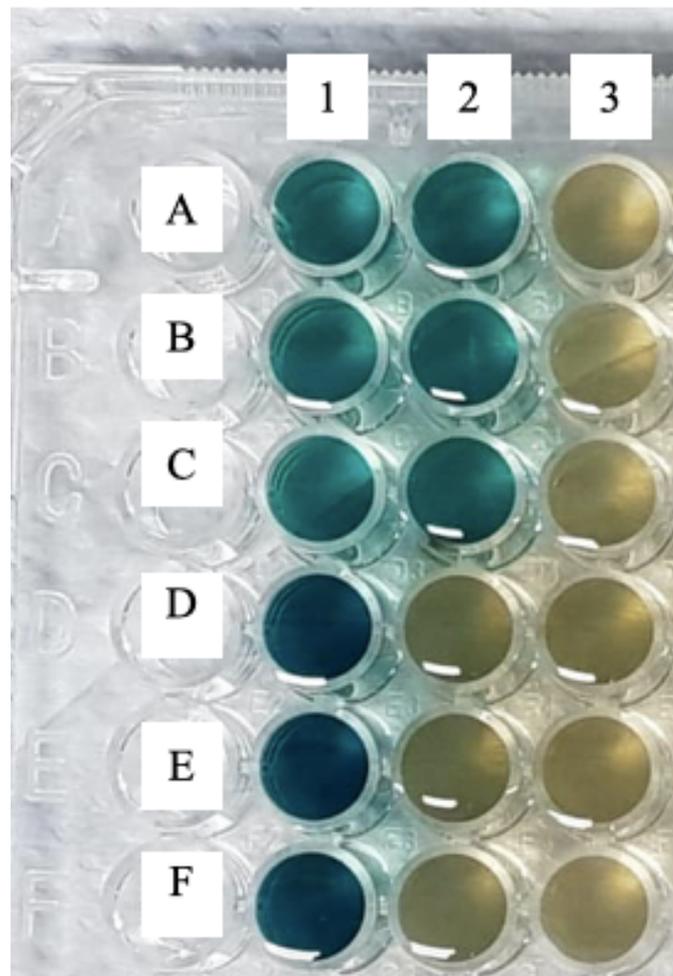


Figura 16 - Placa de 96 poços contendo extratos brutos de cultivo de 7 dias com atividade enzimática de lacase. Na coluna 1 e na coluna 2 (poços A, B e C), correspondentes ao “P1” é possível ver a coloração azul-esverdeada claramente, nos poços D, E e F da coluna 2 e na coluna 3, correspondentes ao “P2” é possível ver apenas uma leve coloração esverdeada, indicando uma atividade maior de “P1” do que a de “P2”.

Como o resultado foi indicativo para produção de lacases e peroxidases, seguiu-se à realização de uma curva de 30 dias para determinar qual seria o dia de produção máxima de enzimas para os fungos “P1” e “P2” nesse período.

5.3.1 CURVA DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DURANTE 30 DIAS

A degradação da lignina é um processo oxidativo atribuído principalmente ao metabolismo secundário, ou à disponibilidade restrita de carbono, nitrogênio ou enxofre, e normalmente não é degradado como única fonte de carbono e energia (SILVA, I. S. *et al.*, 2010).

Os resíduos lignocelulósicos, presentes no meio-ambiente em grande quantidade, são essencialmente compostos de celulose, hemiceluloses e lignina. Esses resíduos podem ser usados como fonte de substratos para indução de produção de diversas enzimas fúngicas, com vistas ao fornecimento de bioprutos para as indústrias (EGGERT; TEMP; ERIKSSON, 1996). Nesse estudo, o resíduo bagaço de cana foi empregado como indutor da produção das enzimas de interesse.

O fungo “P1” foi capaz de produzir tanto lacases quanto peroxidases. O pico da produção de lacases (152,31 U/mL) ocorreu no dia 10 e o de peroxidases totais (136,57 U/mL) no dia 9. Após o 12º dia a produção de peroxidases caiu para níveis próximos de zero, permanecendo assim até o final da curva. No mesmo período, houve também uma queda na produção de lacases, mas seus níveis continuaram elevados em comparação à produção de peroxidases totais, provavelmente o fungo continuou produzindo lacases para aproveitar o resíduo lignocelulósico de bagaço de cana para utilizá-lo como fonte de carbono para manutenção de sua sobrevivência (Figura 17).

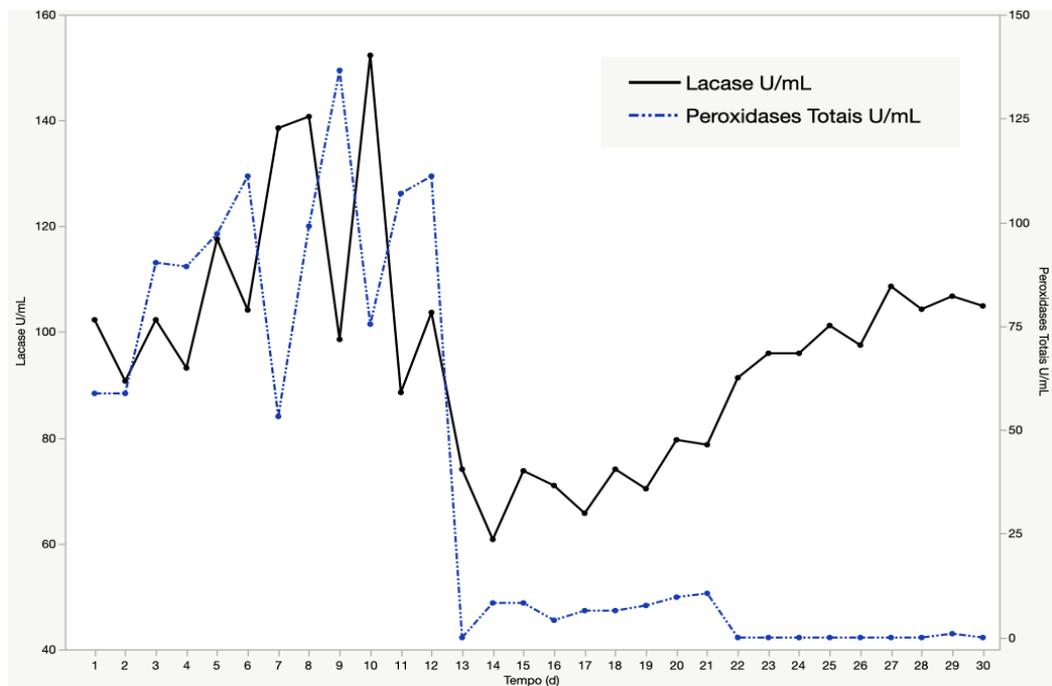


Figura 17 - Gráfico da curva de produção enzimática de lacases e peroxidases totais pelo fungo “P1” durante 30 dias.

Sobre esse experimento, é importante ressaltar que ele foi o único realizado em um espectrofotômetro (Multimode Plate Reader EnSpire® - PerkinElmer) diferente do resto dos outros ensaios, pois após esse ensaio, devido à problemas técnicos do equipamento utilizado, foi necessário buscar outro espectrofotômetro para dar continuidade ao trabalho e realizar as leituras. O cálculo também é realizado pela equação I, mas valor da absorbância que o software desse equipamento dá como resposta oferece apenas um valor final como resultado da diferença entre a última leitura (1 minuto e 30 segundos) e a primeira (30 segundos), o que não é o mais apropriado para explicar uma reação cinética, podendo haver uma superestimação no cálculo das respostas. No entanto, como o objetivo desse experimento foi apenas verificar o dia de pico da produção das enzimas de interesse, o resultado foi utilizado com essa finalidade.

O fungo “P2”, que também foi capaz de produzir as enzimas de interesse para o estudo, teve seu pico de produção no dia 6 para peroxidases totais (19,02 U/mL) e no dia 26 para lacases (26,63 U/mL), sendo a produção de lacases superior à de peroxidases totais, como no fungo “P1” (Figura 18). Provavelmente o fungo optou por utilizar a glicose disponível no meio como fonte de carbono para crescer e se manter até que esse recurso se esgotasse, precisando então produzir lacases para deslignificar a parede celular do resíduo de bagaço de cana para, então utilizar esse recurso como fonte de manutenção.

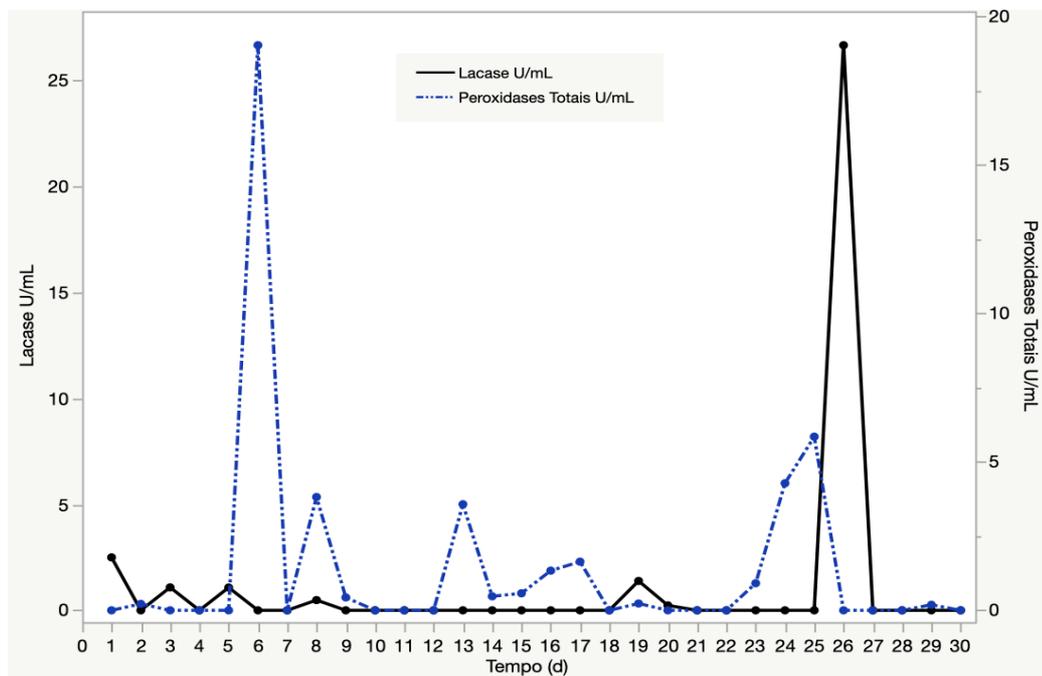


Figura 18 - Gráfico da curva de produção enzimática de lacases e peroxidases totais pelo fungo “P2” durante 30 dias.

Sabe-se que a produção de enzimas lignolíticas é influenciada por fontes de carbono e nitrogênio do meio de cultivo, portanto, a fim de tentar antecipar o dia de maior produção enzimática dos fungos, optou-se por retirar a glicose do meio, assim o fungo não teria uma fonte de carbono simples e fácil de metabolizar disponível, tornando o ambiente estressante para ele e induzindo a produção enzimática em estágios mais iniciais para utilização do bagaço de cana como fonte de carbono (SONGULASHIVILI, G. *et. al.*, 2017).

Primeiramente, testou-se a capacidade dos fungos crescerem sem glicose, o resultado pode ser visto na Figura 19. Naturalmente, os fungos cresceram melhor no meio contendo glicose, uma fonte de carbono simples, do que no meio sem glicose, mas ambos foram capazes de crescer com a restrição imposta. É interessante notar que, como no meio sólido BGS, o fungo “P2” em presença de glicose produziu algum metabólito que deixou o meio esverdeado. Para evitar que os fungos não crescessem o suficiente a ponto de não conseguirem produzir as enzimas de interesse devido à falta de glicose, optou-se por suplementá-lo com peptona, uma fonte orgânica de nitrogênio, na mesma quantidade em que a glicose estava presente anteriormente (20 g/L). Estudos prévios citam a peptona como um indutor da produção de lacase melhor do que outras fontes de nitrogênio inorgânicas (BETTIN *et al.*, 2009; MIKIASHVILI *et al.*, 2006).

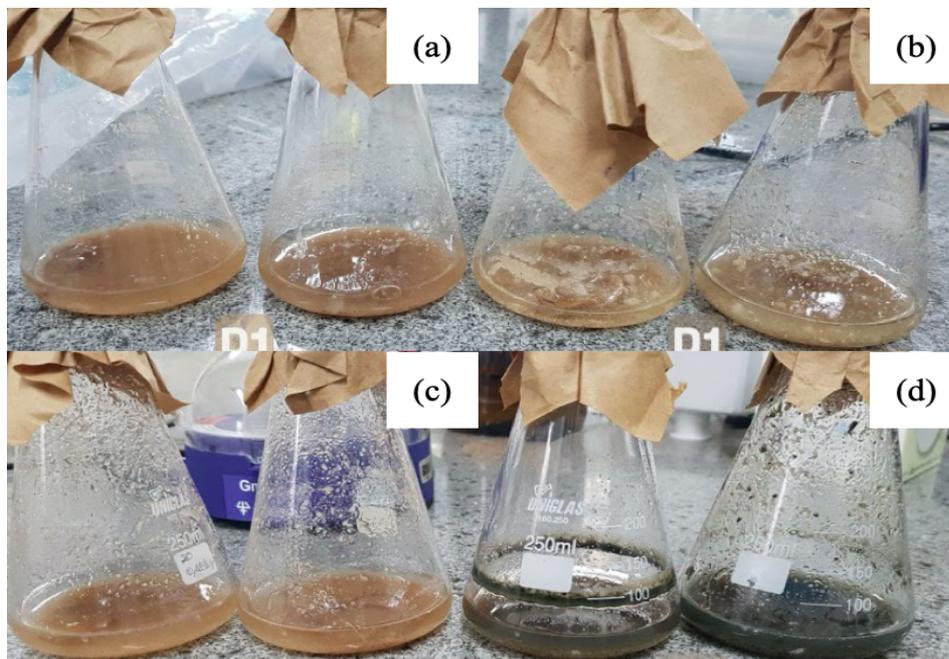


Figura 19 - Comparação do crescimento fúngico em meio líquido com e sem glicose por 8 dias. (a) “P1” em meio sem glicose; (b) “P1” em meio contendo glicose; (c) “P2” em meio sem glicose; (d) “P2” em meio contendo glicose.

Para verificar o perfil de liberação enzimática com a nova composição do meio e para selecionar o melhor tempo de incubação dos cultivos para os planejamentos fatoriais, realizou-se novas curvas de atividade enzimática de 15 dias para cada fungo. O pH também foi medido durante o período do experimento.

5.3.2 CURVA DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DURANTE 15 DIAS

Foi observado que os dois fungos apresentaram um crescimento maior com peptona do que com glicose, indicando que a inserção de uma fonte de nitrogênio foi benéfica para o metabolismo primário do fungo.

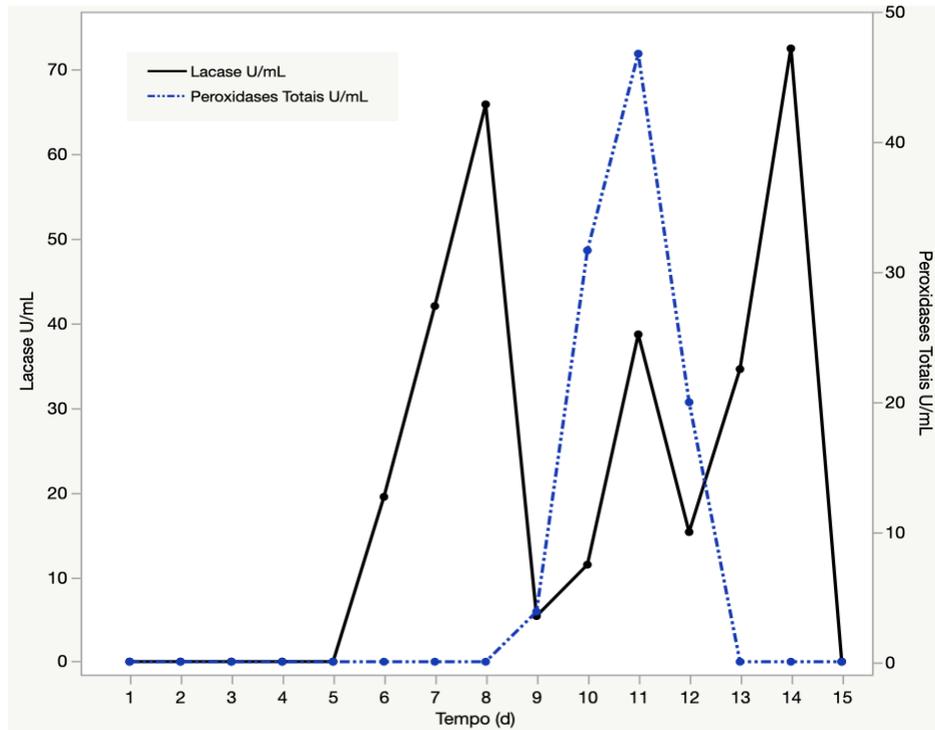


Figura 20 - Gráfico da curva de produção enzimática do fungo “P1” durante 15 dias.

A nova curva de produção enzimática mostrou que a produção de lacase foi iniciada após o 5º dia e a de peroxidases após o 8º dia. Houve três picos de lacase, um em 8 dias (65,77 U/mL), outro em 11 dias (38,63 U/mL) e o máximo em 14 dias (72,38 U/mL); o pico de peroxidases totais ocorreu em 11 dias (46,77 U/mL). Como o objetivo foi verificar a produção e realizar a otimização da produção tanto de lacases quanto de peroxidases totais, optou-se por selecionar o 11º dia como melhor tempo para execução do planejamento fatorial do fungo “P1” (Figura 20).

O pH inicial do meio era 5,5 e o fungo foi tornando-o mais básico com o passar dos dias. No 11º dia, que foi o selecionado para a otimização, o pH do meio era 8,8, no dia seguinte o pH mais alto 8,9 foi marcado (Figura 21).

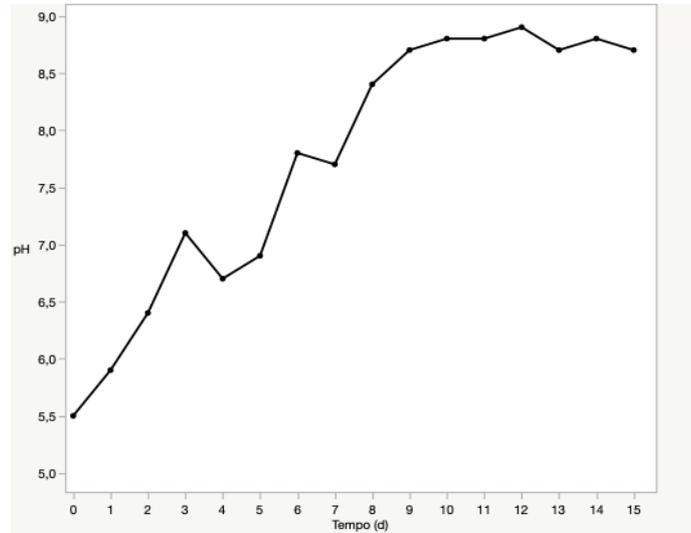


Figura 21 - Gráfico da curva de pH do fungo "P1" durante 15 dias.

A produção enzimática do fungo "P2" em valor absoluto foi menor do que a do fungo "P1". O pico de produção de peroxidases totais foi no dia 10 (13,55 U/mL) e no dia 12 para lacases (41,21 U/mL). Para o planejamento fatorial de "P2" foi selecionado o 10º dia, quando houve a maior produção de peroxidases totais e houve produção de lacases também, ainda que não tenha sido o pico, pois no pico de lacases não houve produção de peroxidases totais. Os resultados podem ser vistos na Figura 22 abaixo.

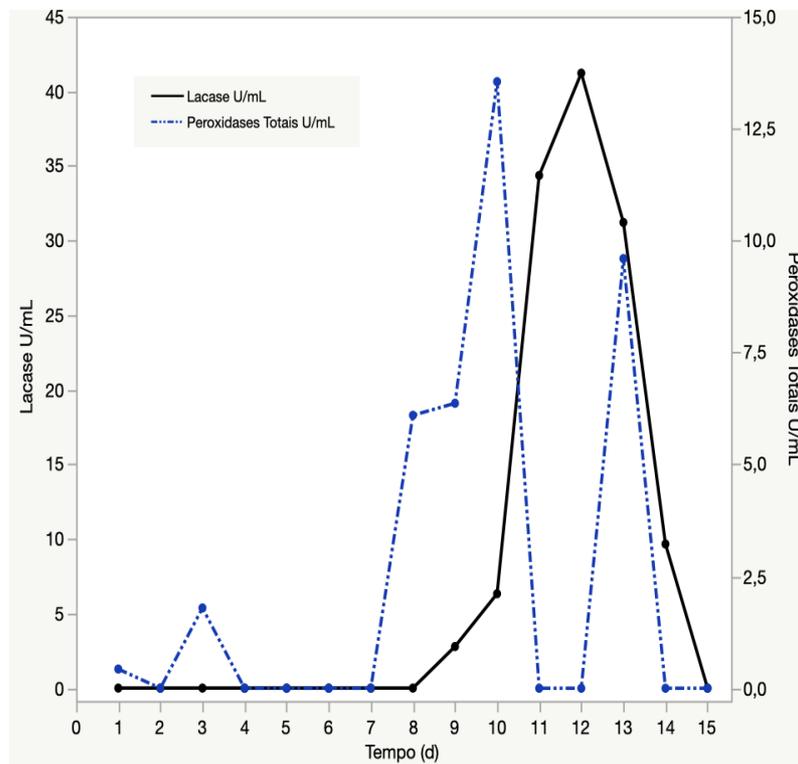


Figura 22 - Gráfico da curva de produção enzimática do fungo "P2" durante 15 dias.

O pH inicial do meio medido foi de 5,7; no 10º dia, o pH do meio era 7,5. O fungo “P2” só atravessou a faixa de pH de 8 no 13º dia de cultivo, permanecendo assim até o final. A curva de pH pode ser vista na Figura 23. De modo geral, o pH do meio de “P2” foi ligeiramente mais baixo do que o de “P1”.

O pH aumentou gradualmente nas duas curvas e não apresentou variações agudas durante o cultivo. A literatura relata uma tendência de diminuição do pH concomitante ao final do pico de produção de lacases, pois com o aumento da massa micelial e o consumo das fontes de carbono e nitrogênio além da fonte de amônia presente no meio leva o metabolismo do fungo a liberar H^+ para o meio, acidificando-o e diminuindo a produção de lacase (STERNBERG; DORVAL, 1979). Nesse trabalho, não se verificou essa queda no pH após o pico de lacase. Entretanto, para a produção de peroxidases são relatadas faixas de pH mais amplas, variando entre 2,0 e 9,0 (HOFRICHTER *et al.*, 2010; MARTINHO *et al.*, 2019).

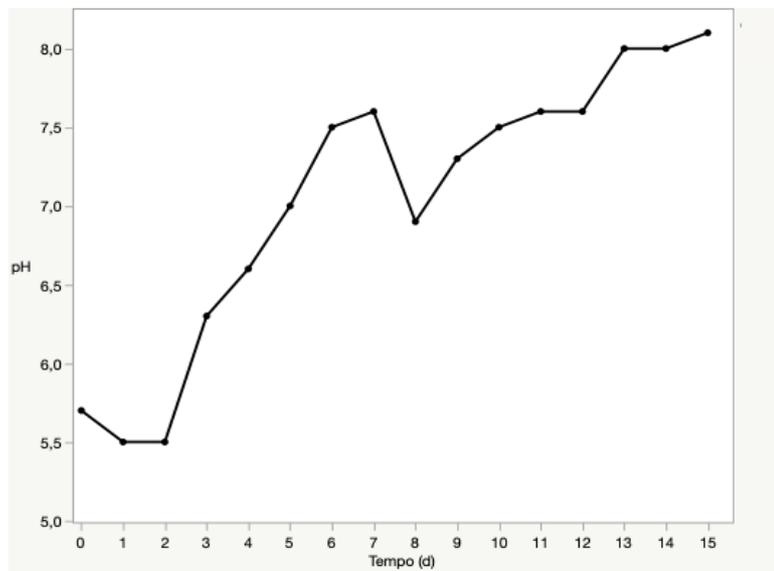


Figura 23 - Gráfico da curva de pH do fungo “P2” durante 15 dias.

Não é possível estabelecer uma comparação direta de produção enzimática de lacases e peroxidases totais dentro do gênero *Diaporthe*, pois a literatura sobre o tema ainda é escassa, mas comparando com outros fungos endofíticos, os isolados desse estudo mostram valores de atividade superiores do que os encontrados em um estudo com o fungo endofítico *Myrothecium verrucaria* MD-R-16, isolado de *Cajanus cajan*, que produziu uma atividade máxima de 11.37 ± 0.26 U/mL de lacase utilizando glicose como fonte de carbono e peptona como fonte de nitrogênio, o fungo não produziu peroxidases (DAN *et al.*, 2015). Em um estudo de Martinho *et al.* (2019) com isolados endofíticos de espécies vegetais de manguezal mostra uma produção

maior de lacases para *Fusarium* sp. (41,5 U/L) e *Hypocrea lixii* (38,0 U/L) e também mostra a capacidade de um *Diaporthe* sp. em produzir lignina peroxidase (36,2 U/L) e manganês peroxidase (19,6 U/L) em cultivo de 7 dias e 28°C em caldo de extrato de malte (Oxoid®) 3%.

Se comparados com a produção de enzimas lignolíticas de basidiomicetos, os isolados deste trabalho apresentam uma produção bem menor, como recentemente mostrado por Schneider et. al. (2018) que encontrou um nível de produção de lacase máximo de 6818 U/mL para o basideomiceto *Marasmiellus palmivorus* VE111.

5.4 PLANEJAMENTO FATORIAL

Os processos industriais requerem enzimas que devem ser produzidas com alto rendimento por meio de processos fermentativos simples e de baixo custo (CORRÊA *et al.*, 2014). Portanto, buscou-se otimizar a produção enzimática dos dois fungos por meio de planejamentos fatoriais.

Para o planejamento fatorial, decidiu-se investigar a influência da fonte de nitrogênio (quantidade de peptona), da fonte de carbono (quantidade de bagaço de cana) e o pH inicial do meio sobre a resposta. O ponto central foi ajustado para pH inicial 6, peptona 1 g e 0,5 g de bagaço de cana.

5.4.1 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE PELO FUNGO “P1”

A Tabela 5 mostra as combinações de fatores de cada ensaio e os seus respectivos resultados para a atividade de lacase obtidos pelo planejamento fatorial realizado.

Tabela 5 - Resultados experimentais da atividade enzimática de lacase obtidos pelo planejamento fatorial 2³ do fungo “P1”. X₁: pH inicial; X₂: peptona; X₃: bagaço de cana. As quantidades de X₂ e X₃ são referentes a cada cultivo de 50 mL

Ensaio	Níveis			Atividade de Lacase (U/mL)
	X ₁	X ₂ (g)	X ₃ (g)	
T1	4	0	0,25	0,00
T2	8	0	0,25	0,00
T3	4	2	0,25	28,86
T4	8	2	0,25	2,97
T5	4	0	0,75	0,82
T6	8	0	0,75	0,00
T7	4	2	0,75	90,69
T8	8	2	0,75	6,66
PC 1	6	1	0,50	0,00
PC 2	6	1	0,50	0,00
PC 3	6	1	0,50	0,00

Os pontos centrais não produziram atividade nesse experimento, o que pode se dever ao fato de que eles tiveram seu pH inicial e a quantidade de peptona ajustados. Apenas a combinação dos ensaios T3, T4, T5, T7 e T8 apresentaram atividade enzimática. A melhor combinação para a produção de lacase para “P1” foi a do ensaio T7, com o pH inicial 4 e os níveis de peptona e bagaço de cana no nível +1.

Observando-se cada fator de maneira independente (Tabelas 5 e 6), o efeito do pH inicial foi negativo (-27,69) e pode ser exemplificado pela comparação entre os ensaios T3 e T4, T5 e T6 e T7 e T8, em todas essas comparações é possível ver que o aumento de pH, enquanto o nível de peptona e de bagaço de cana eram os mesmos (+1, -1; -1, +1 e +1, +1, respectivamente) reduziu a resposta. De forma semelhante, é possível observar o efeito positivo da peptona (32,09) sobre a resposta quando os ensaios T1 e T3, T2 e T4, T5 e T7 e T6 e T8 são comparados, em todas essas comparações há um aumento na resposta quando o fator X_2 passa do nível -1 para o +1 e os outros dois níveis estão fixos (-1, -1; +1, -1; -1, +1 e +1, +1, respectivamente.). E assim como a peptona, o aumento do bagaço de cana afeta a resposta de maneira positiva (16,59), efeito esse exemplificado pela comparação entre os ensaios T3 e T7, T4 e T8 e T5 e T1, nos quais a resposta aumenta quando o fator X_3 passa do -1 para o +1 e os outros fatores permanecem iguais entre os ensaios (-1, +1; +1, +1 e -1, -1, respectivamente).

Em resumo, um efeito positivo significa que o aumento de um fator de um nível mais baixo até certo nível mais alto deve aumentar a resposta; e um efeito negativo significa que esse aumento deve causar uma diminuição da resposta. Mas apenas essa análise não é suficiente para determinar a significância de cada fator e suas possíveis interações para a resposta, portanto uma análise de variância (ANOVA) foi realizada e está resumida na Tabela 6.

A análise estatística mostrou um modelo bem perto da significância e um bom valor do coeficiente de determinação de 0,9413, o coeficiente de determinação indica que quanto mais próximo de 1,00, melhor o ajuste do modelo (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010, p.229).

O pH inicial do meio e a quantidade de peptona, assim como a interação entre eles foram os únicos fatores significativos, essa informação também está ilustrada na figura 24.

Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo linear utilizado na otimização de lacase do fungo “P1”.

FV	SQ	<i>g.l.</i>	MQ	valor de F	<i>p-valor</i>	Efeito
Model	6588,622	6	1098,1	8,0269	0,0579	
A: pH inicial	1533,084	1	1533,08	11,198	0,0442*	-27,69
B: Peptona	2059,347	1	2059,34	15,042	0,0304*	32,09
C: Bagaço de cana	550,357	1	550,357	4,02	0,1387	16,59
AB	1487,797	1	1487,8	10,867	0,0459*	-27,28
AC	434,683	1	434,683	3,175	0,1728	-14,74
BC	523,358	1	523,358	3,823	0,1455	16,18
Falta de ajuste	410,726	1	136,909			
Erro puro	0	2	410,726			

FV: fonte de variação; SQ: soma dos quadrados; *g.l.*: graus de liberdade; MQ: quadrado médio; R²= 0,9413.

*Nível de significância de 95%

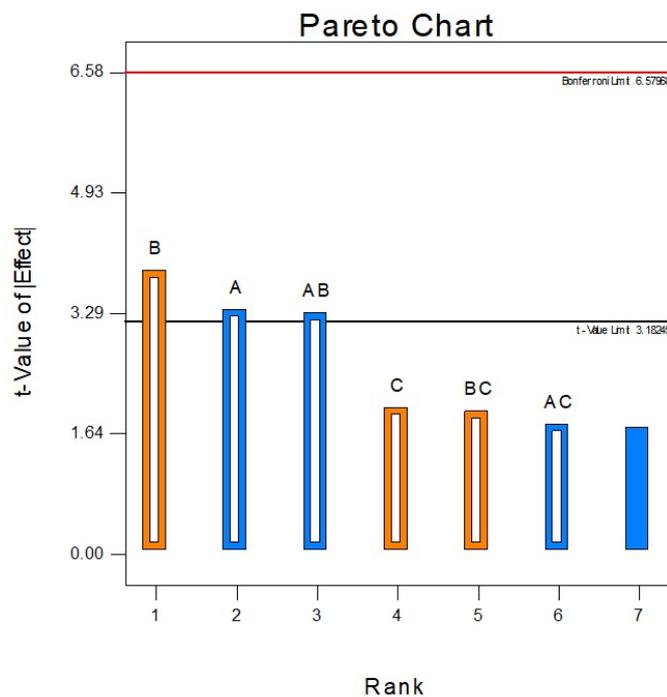


Figura 24 - Gráfico de Pareto dos efeitos dos fatores e suas interações sobre a resposta (atividade de lacase do fungo “P1”). A: pH inicial, B: peptona, C: bagaço de cana. Nível de significância de 95%.

O gráfico de Pareto determina a magnitude e a importância dos efeitos. As barras que cruzam a linha de referência são estatisticamente significativas. Logo, a Figura 25 corrobora com os dados da Tabela 6, que indicam a significância estatística do efeito do pH inicial do meio e da quantidade de peptona sobre a resposta, assim como da sua interação.

Apesar do modelo não ter alcançado a significância estatística, o desenho da superfície de resposta, que pode ser visualizado na Figura 25, mostra uma tendência de a resposta ser maior quando o X_1 está no menor nível (4) e X_2 e X_3 no maior nível (2 g e 0,75 g, respectivamente).

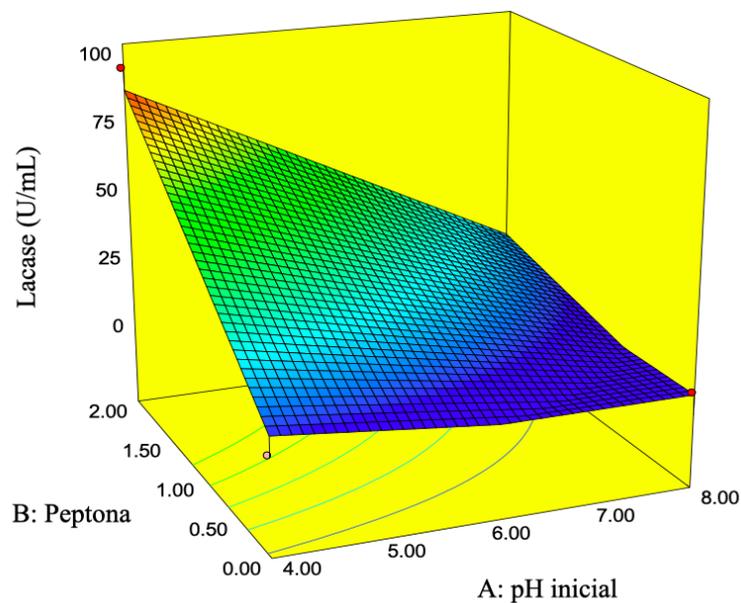


Figura 25 - Gráfico da superfície de resposta para a atividade de lacase (U/mL) em função da quantidade de peptona (X_2) (g) e do pH inicial do meio (X_1) para o fungo “P1”. X_3 : +1.

Segundo esse modelo, a atividade enzimática de lacase para “P1” pode ser calculada pela equação IV:

$$\begin{aligned}
 & -43,8155 \times 7,26825 \times \text{pH inicial} \times 40,7795 \times \text{peptona} \times 89,279 \text{ bagaço de cana} \times \\
 & - 6,818625 \times \text{pH inicial} \times \text{peptona} \times \\
 & - 14,7425 \times \text{pH inicial} \times \text{bagaço de cana} \times 32,353 \text{ peptona} \times \text{bagaço de cana}
 \end{aligned}$$

(Equação IV)

5.4.2 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PEROXIDASES TOTAIS PELO FUNGO “P1”

A Tabela 7 abaixo mostra a combinação entre os níveis e fatores para cada ensaio. Novamente os pontos centrais não produziram atividade enzimática e as únicas combinações com resultado foram os do ensaio T3 (X_1 : -1; X_2 : +1 e X_3 : -1) e do ensaio T6 (X_1 : +1; X_2 : -1; X_3 : +1).

Tabela 7 - Resultados experimentais da atividade enzimática de peroxidases totais obtidos pelo planejamento fatorial 2^3 do fungo “P1”. X_1 : pH inicial; X_2 : peptona; X_3 : bagaço de cana. As quantidades de X_2 e X_3 são referentes a cada cultivo de 50 mL.

Ensaio	Níveis			Atividade de Peroxidases Totais (U/mL)
	X_1	X_2 (g)	X_3 (g)	
T1	4	0	0,25	0,00
T2	8	0	0,25	0,00
T3	4	2	0,25	15,10
T4	8	2	0,25	0,00
T5	4	0	0,75	0,00
T6	8	0	0,75	0,94
T7	4	2	0,75	0,00
T8	8	2	0,75	0,00
PC 1	6	1	0,50	0,00
PC 2	6	1	0,50	0,00
PC 3	6	1	0,50	0,00

Tanto o efeito do pH, quanto o do bagaço de cana foram negativos sobre a resposta, já o efeito da peptona foi positivo. A combinação entre pH inicial do meio e o bagaço de cana foi a única positiva.

Não é possível estabelecer uma relação dos fatores, nos níveis em que foram estudados, sobre a resposta e é isso que a análise estatística mostra (Tabela 8), nenhum dos fatores e nenhuma interação entre eles foi considerada significativa, assim como o modelo também não

foi. No entanto, nota-se novamente uma tendência de se obter uma resposta maior quando o pH está no nível mais baixo (-1) e a quantidade de peptona no nível mais alto (+1) (Figura 26).

Tabela 8 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo linear utilizado na otimização de peroxidases totais do fungo “P1”.

FV	SQ	<i>g.l.</i>	MQ	valor de F	<i>p-valor</i>	Efeito
Modelo	171,625	6	28,604	3,42481	0,1699	
A: pH	25,056	1	25,056	3,00	0,1817	-3,54
B: Peptona	25,056	1	25,056	3,00	0,1817	3,54
C: Bagaço de cana	25,056	1	25,056	3,00	0,1817	-3,54
AB	32,152	1	32,152	3,84962	0,1446	-4,01
AC	32,152	1	32,152	3,84962	0,1446	4,01
BC	32,152	1	32,152	3,84962	0,1446	-4,01
Falta de ajuste	25,056	1	25,056			
Erro puro	0	2	0			

FV: fonte de variação; SQ: soma dos quadrados; *g.l.*: graus de liberdade; MQ: quadrado médio; R²= 0,8726.

*Nível de significância de 95%

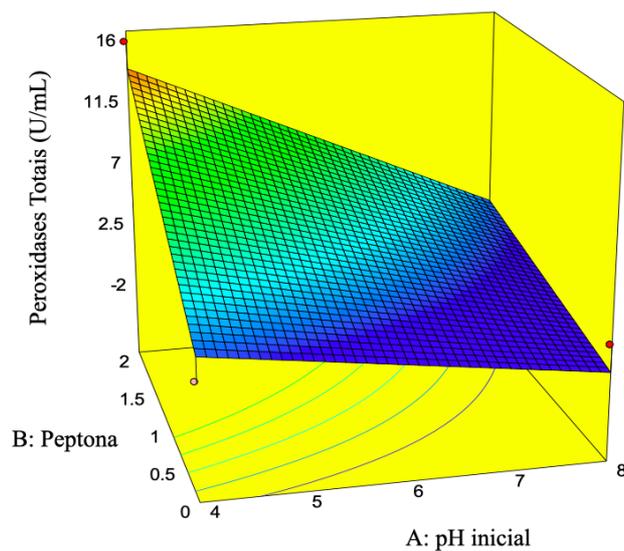


Figura 26 - Gráfico da superfície de resposta para a atividade de peroxidases totais (U/mL) em função da quantidade de peptona (X₂) (g) e do pH inicial do meio (X₁) para o fungo “P1”. X₃ está fixado no nível -1.

A equação V definida pelo modelo para o cálculo da atividade de peroxidases totais está descrita abaixo, no entanto é necessário ressaltar que o modelo não alcançou a significância estatística para os níveis em que esses fatores foram testados. Portanto, o mais indicado seria repetir o planejamento fatorial com níveis mais afastados para cada fator, ou ainda, com outros fatores que ainda não foram considerados para a obtenção de um modelo significativo.

Peroxidases totais

$$\begin{aligned}
 &= 11,0885 \times 7 - 1,88725 \times \text{pH inicial} \times 11,7935 \times \text{peptona} \times \\
 &- 23,117 \text{ bagaço de cana} \times \\
 &- 1,002375 \times \text{pH inicial} \times \text{peptona} \times 4,0095 \times \text{pH inicial} \times \text{bagaço de cana} \times \\
 &- 8,019 \text{ peptona} \times \text{bagaço de cana}
 \end{aligned}$$

(Equação V)

5.4.3 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE PELO FUNGO “P2”

Para o fungo “P2”, o resultado da atividade de lacase, assim como a combinação dos fatores e níveis de cada ensaio estão descritos na Tabela 9 abaixo.

Tabela 9 - Resultados experimentais da atividade enzimática de lacase obtidos pelo planejamento fatorial 2^3 do fungo “P2”. X₁: pH inicial; X₂: peptona; X₃: bagaço de cana. As quantidades de X₂ e X₃ são referentes a cada cultivo de 50 mL

Ensaio	Níveis			Atividade de Lacase (U/mL)
	X ₁	X ₂ (g)	X ₃ (g)	
T1	4	0	0,25	0,85
T2	8	0	0,25	0,00
T3	4	2	0,25	31,03
T4	8	2	0,25	0,00
T5	4	0	0,75	0,00
T6	8	0	0,75	0,061
T7	4	2	0,75	0,00
T8	8	2	0,75	0,00
PC 1	6	1	0,50	22,06
PC 2	6	1	0,50	23,35
PC 3	6	1	0,50	26,46

Nesses ensaios, as combinações de T1, T3, T6 e os pontos centrais resultaram em atividade enzimática, sendo T3 a combinação (-1, +1, -1) com maior valor de atividade. Novamente, o efeito do pH foi negativo sobre a resposta, assim como o efeito do bagaço de cana, o efeito da peptona também foi positivo para produção de lacase para “P2”. Observando apenas a tabela, é difícil estabelecer uma relação dos fatores sobre a resposta, o que é confirmado pela análise de variância dos dados (Tabela 10).

Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo linear utilizado na otimização de lacase do fungo “P2”.

FV	SQ	<i>g.l.</i>	MQ	valor de F	<i>p-valor</i>	Efeito
Modelo	722,664	6	120,444	2,9233	0.2036	
A: pH	126,556	1	126,556	3,0716	0.1780	-7,955
B: Peptona	113,394	1	113,394	2,7522	0.1957	7,523
C: Bagaço de cana	126,556	1	126,556	3,0716	0.1780	-7,955
AB	114,315	1	114,315	2,7745	0.1944	-7,560
AC	127,528	1	127,528	3,0952	0.1768	7,9825
BC	114,315	1	114,315	2,7745	0.1944	-7,560
Curvatura	869,505	1	869,505	21,103	0.0194*	
Falta de ajuste	113,394	1	113,394	22,208	0.0422*	
Erro puro	10,2112	2	5,106			

FV: fonte de variação; SQ: soma dos quadrados; *g.l.*: graus de liberdade; MQ: quadrado médio; R²= 0,85394.

*Nível de significância de 95%

A maior resposta obtida segue a tendência dos ensaios anteriores: a resposta aumenta quando pH está no nível mais baixo e a peptona no nível mais alto (Figura 27).

Nenhum fator ou interação de fatores foi considerada significativa para esses níveis em que foram analisados. O coeficiente de determinação foi de 0,8594; porém a falta de ajuste do modelo obteve significância ($p < 0,05$), o que indica que esse modelo não pode ser utilizado para prever o efeito dos fatores sobre a resposta.

Ademais, a curvatura também foi significativa, essa fonte de variação (FV) reflete o quão bem o modelo prevê a resposta quando todos os fatores estão no nível 0 (pontos centrais). A significância da curvatura indica que esse modelo, que é linear, não consegue explicar muito bem a região central dos dados e não deve ser utilizado para prever o efeito dos fatores sobre a resposta, pois a análise encontrou resíduos muito grandes nesta região. Portanto, um modelo com termos cúbicos ou quadráticos pode ser tentado futuramente, se houver a adição de mais pontos para serem estudados na análise.

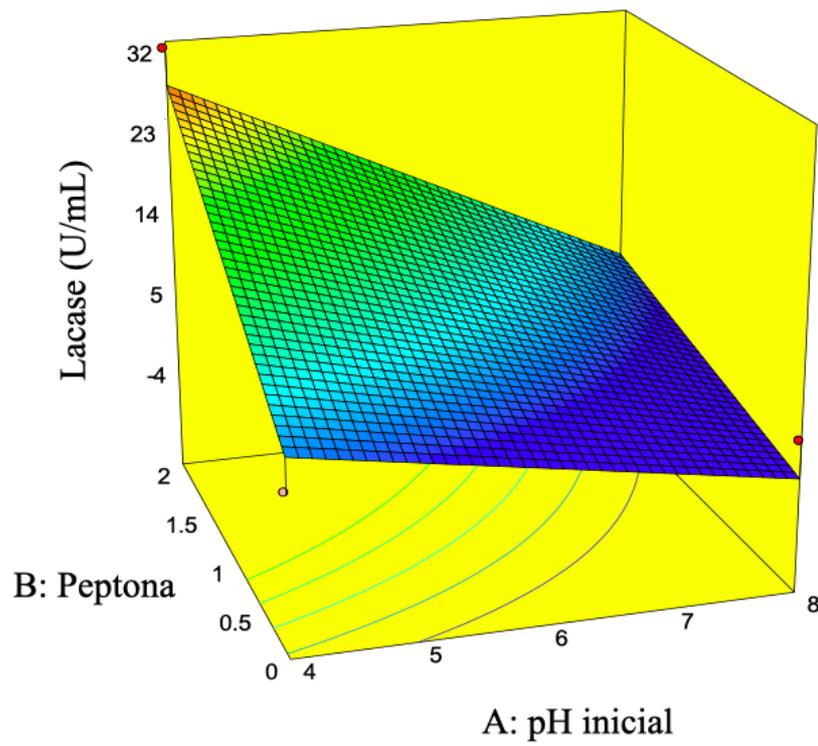


Figura 27 - Gráfico da superfície de resposta para a atividade de lacase (U/mL) em função da quantidade de peptona (X_2) (g) e do pH inicial do meio (X_1) para o fungo “P2”. X_3 está no nível -1.

5.4.4 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PEROXIDASES TOTAIS PELO FUNGO “P2”

Por fim, as atividades de peroxidases totais para o fungo “P2” estão descritas na Tabela 11 junto com as combinações de fatores e níveis para cada ensaio.

Tabela 11 - Resultados experimentais da atividade enzimática de peroxidases totais obtidos pelo planejamento fatorial 2^3 do fungo “P2”. X₁: pH inicial; X₂: peptona; X₃: bagaço de cana. As quantidades de X₂ e X₃ são referentes a cada cultivo de 50 mL

Ensaio	Níveis			Atividade de Peroxidases Totais (U/mL)
	X ₁	X ₂ (g)	X ₃ (g)	
T1	4	0	0,25	0,00
T2	8	0	0,25	0,00
T3	4	2	0,25	0,00
T4	8	2	0,25	0,00
T5	4	0	0,75	0,00
T6	8	0	0,75	0,00
T7	4	2	0,75	12,213
T8	8	2	0,75	0,039
PC 1	6	1	0,50	12,081
PC 2	6	1	0,50	7,062
PC 3	6	1	0,50	2,075

Além dos pontos centrais, apenas os ensaios T7 e T8 tiveram produção de peroxidases totais. Comparando os dois, a diferença está no nível do pH, quando o pH inicial do meio está no nível -1, a resposta foi maior do que quando o pH está no nível +1, seguindo a mesma tendência das outras análises e podendo ser vista na Figura 28, que mostra a superfície de resposta desse planejamento.

Para esse experimento, novamente o efeito do pH inicial foi negativo e o da peptona positivo, assim como o efeito do bagaço de cana. A análise estatística não detectou nenhum

fator ou interação de fatores significante sobre a resposta nos níveis em que foram analisados (Tabela 12).

Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo linear utilizado na otimização de peroxidases totais do fungo “P2”.

FV	SQ	<i>g.l.</i>	MQ	valor de F	<i>p-valor</i>	Efeito
Modelo	111,869	6	18,645	0,8155	0,6210	
A: pH	18,526	1	18,526	0,8103	0,4344	-3,04
B: Peptona	18,764	1	18,764	0,8207	0,4317	3,06
C: Bagaço de cana	18,764	1	18,764	0,8207	0,4317	3,06
AB	18,526	1	18,526	0,8103	0,4344	-3,04
AC	18,526	1	18,526	0,8103	0,4344	-3,04
BC	18,764	1	18,764	0,8207	0,4317	3,06
Falta de ajuste	18,526	1	18,526	0,7401	0,4803	
Erro puro	50,060	2	25,030			

FV: fonte de variação; SQ: soma dos quadrados; *g.l.*: graus de liberdade; MS: quadrado médio; R²= 0,6200. *Nível de significância de 95%

A falta de ajuste também não foi significante, mas o coeficiente de determinação foi baixo (0,6200), unindo esses dois fatos com a falta de significância do modelo, conclui-se que não é possível utilizá-lo para prever o efeito dos fatores sobre a resposta, necessitando-se analisar a influência dos fatores com níveis mais afastados ou ainda outros fatores que possam ser significantes para a resposta.

Os resultados dos planejamentos fatoriais realizados, apesar de não indicarem a significância dos modelos e dos fatores para a resposta, exceto do pH, da peptona e da sua interação para a produção de lacases de “P1”, indicam uma tendência da produção dessas enzimas ser melhor em faixas de pH inicial mais ácidas (Figura 28).

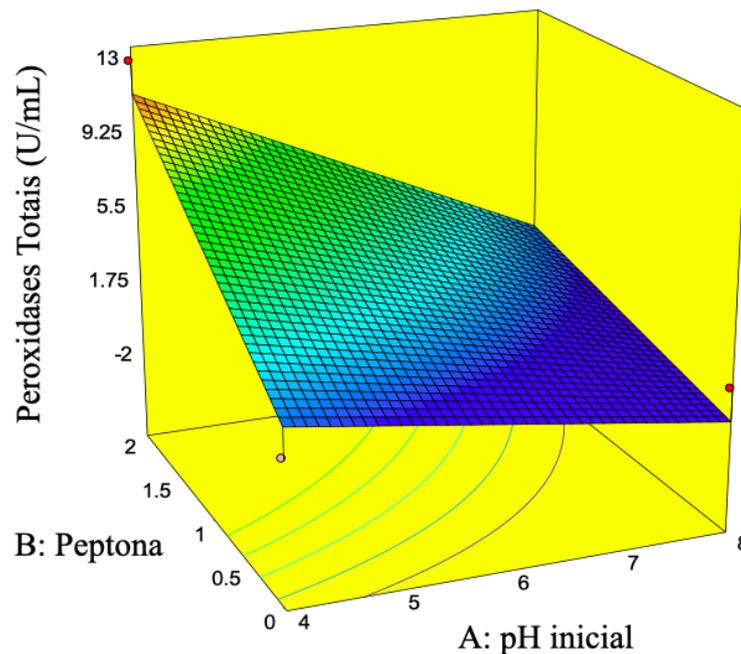


Figura 28 - Gráfico da superfície de resposta para a atividade de peroxidases totais (U/mL) em função da quantidade de peptona (X2) (g) e do pH inicial do meio (X1) para o fungo “P2”.

No entanto, é preciso investigar melhor os fatores peptona e bagaço de cana e a relação carbono / nitrogênio que eles fornecem para o meio de cultivo, pois outros estudos demonstraram que uma relação alta desses dois elementos, apesar de ser benéfica para o crescimento micelial, prejudica a expressão de enzimas lignolíticas (D’AGOSTINI *et al.*, 2011; MARQUES DE SOUZA; ZILLY; PERALTA, 2002; SCHNEIDER, W. D. H. *et al.*, 2018; XU, F., 1997).

Um estudo conseguiu realizar a otimização da produção de lacases para o fungo endofítico *Myrothecium verrucaria* MD-R16 considerando os fatores: tempo de fermentação, temperatura e pH inicial do meio chegando em um valor máximo de 16,53 U/mL com a combinação de 4 dias de fermentação, 30°C e pH inicial 6 (DAN *et al.*, 2015). Outro estudo de otimização obteve sucesso na produção de lignina peroxidase em pH 9,0 e 37°C e na produção de manganês peroxidase em pH 5 e 45°C para *Fusarium* sp. (MARTINHO *et al.*, 2019).

Considerando a variação de condições para produção de peroxidases, para estudos futuros, essas enzimas serão analisadas de forma independente (manganês peroxidases e lignina peroxidases), para que sejam avaliados seus perfis de produção.

5.5 CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO COM OS 3 FATORES DO PLANEJAMENTO FATORIAL NOS NÍVEIS +1

Tendo em vista que, nos dias selecionados para a realização dos planejamentos fatoriais o pH estava na faixa de 8, decidiu-se investigar se o pico de produção poderia ter acontecido antes dos 11º e 10º dias para “P1” e “P2”, respectivamente; pois, potencialmente, o período de adaptação dos fungos seria encurtado e a produção enzimática seria adiantada, ou ainda, se o aumento de pH de 4 para 8 era um fator inibitório para a produção enzimática. Para investigar essa hipótese, seguiu-se a uma nova curva de 10 dias para cada fungo, com a metodologia descrita na seção 4.3. Essa informação também poderia ser importante para justificar a influência negativa do aumento do pH inicial visto nos planejamentos fatoriais apresentados.

A curva do fungo “P1” está demonstrada na Figura 29, com pico de produção de peroxidases totais no 2º dia (4,28 U/mL). A maior produção de lacase ocorreu no 8º dia (3,44 U/mL). De fato, o pico de produção realmente aconteceu antes do 11º dia para peroxidases totais, se comparado com os valores do planejamento fatorial, porém com valores de produção abaixo daqueles obtidos na curva de 15 dias para “P1”. Já para lacase, o resultado do 11º dia obtido no planejamento fatorial (6,66 U/mL) foi mais alto do que o encontrado nessa curva.

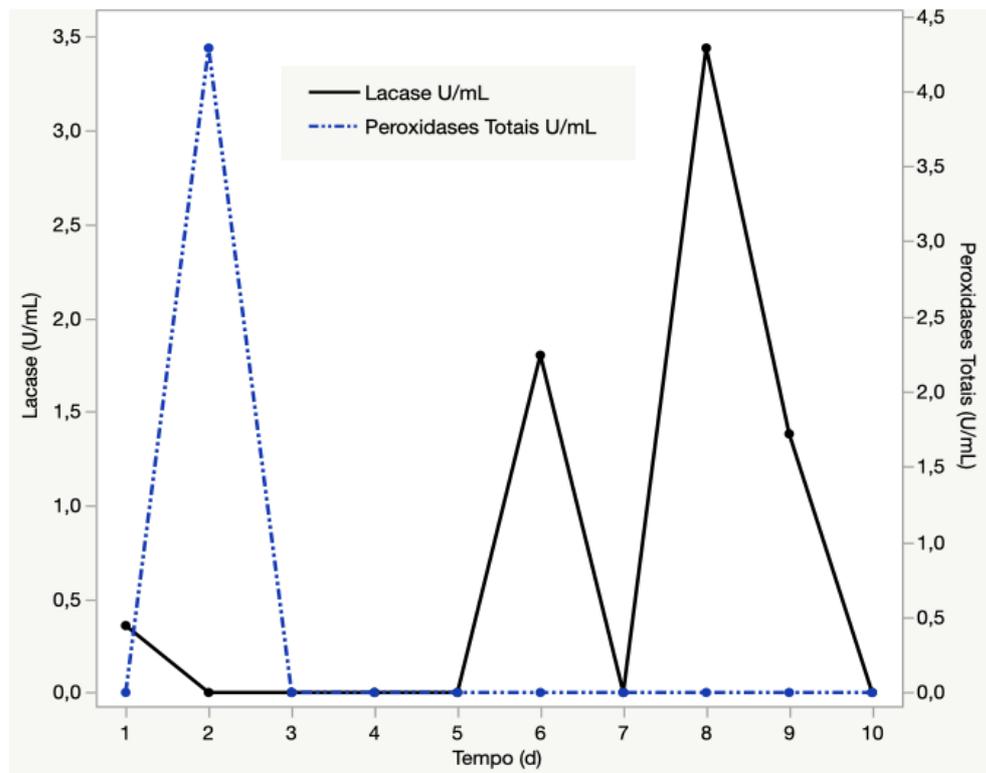


Figura 29 - Gráfico da curva de produção enzimática de “P1” durante 10 dias em cultivo com todos os níveis do planejamento fatorial no nível +1.

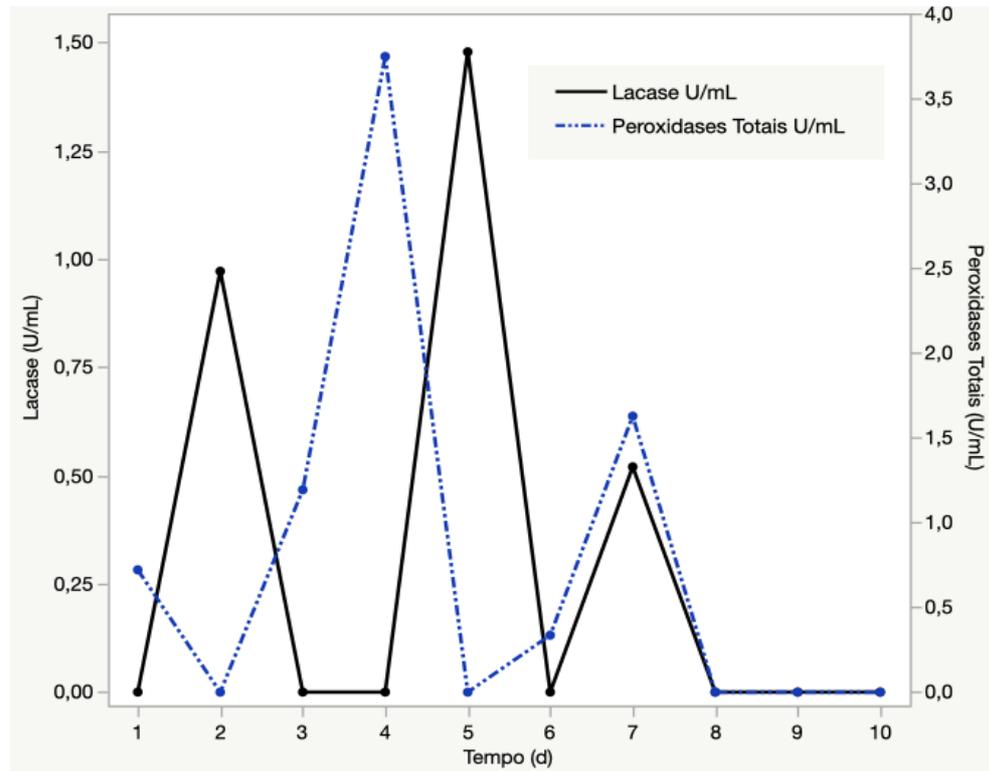


Figura 30 - Gráfico da curva de produção enzimática de “P2” durante 10 dias em cultivo com todos os níveis do planejamento fatorial no nível +1.

Para o fungo “P2”, o pico de peroxidases totais ocorreu no 4º dia (3,75 U/mL) e para lacase no 5º dia (1,48 U/mL). Esses valores foram maiores do que aqueles encontrados no planejamento fatorial (0,04 U/mL e 0,00 U/mL) para o ensaio T8 (+1; +1; +1), confirmando que o pico de atividade enzimática para as enzimas estudadas ocorreu antes dos 10 dias, que foi o período selecionado para a otimização, mas em valores menores do que os pontos centrais e do que aqueles encontrados nas curvas de atividade enzimática de 15 dias (Figura 30).

Também foi observado empiricamente nesse experimento realizado que o fungo não cresceu tanto quanto quando o pH inicial do meio era mais baixo. Considerando o ciclo de crescimento microbiológico, infere-se que, nas condições testadas, os fungos tiveram sua fase lag (fase de adaptação) e sua fase log (fase de crescimento) encurtadas, chegando na fase estacionária mais rapidamente; mas, por terem tido suas primeiras fases encurtadas, eles não foram capazes de crescer o suficiente para uma produção enzimática maior, como ocorre quando o pH inicial do meio é mais baixo e como foi demonstrado pelos planejamentos fatoriais. Portanto, infere-se que os fungos se beneficiam de um pH inicial mais ácido para crescer, ainda que as curvas de pH indiquem uma faixa final de 8 do meio de cultivo no dia em que houve o pico enzimático das enzimas de interesse. Isso está de acordo com um estudo que

relatou um pH inicial entre 4,5 e 6,0 para produção enzimática (ABD EL MONSSEF; HASSAN; RAMADAN, 2016).

Para estudos futuros em busca da otimização da produção de lacases e peroxidases totais, sugere-se investigar outros fatores que possam interferir na resposta, como foi demonstrado que a introdução de complexos de cobre no meio de cultivo induziu a produção de lacases em basidiomicetos (VRSANSKA *et al.*, 2016); em outro estudo, foi demonstrado que a introdução de íons de Cu²⁺ e Fe²⁺ foi capaz de induzir a transcrição do gene da lacase no basidiomiceto *Trametes velutina* 5930 (YANG *et al.*, 2016). Ainda, a relação carbono / nitrogênio, pH em outras faixas, temperatura e outros resíduos lignocelulósicos podem ser analisados, pois são fatores que podem influenciar diretamente a produção de lacases e peroxidases, como já foi demonstrado por diversos autores (ASGHER; ASAD; LEGGE, 2006; BETTIN *et al.*, 2009; MIKIASHVILI *et al.*, 2006; SCHNEIDER, W. D. H. *et al.*, 2018; WANG, F. *et al.*, 2014).

6 CONCLUSÕES

O trabalho foi bem sucedido em isolar fungos endofíticos de uma espécie vegetal do Cerrado brasileiro que para a qual ainda não havia relatos da presença desses microrganismos. Além disso, os isolados tiveram seus gêneros identificados por filogenia molecular utilizando a região ITS e os resultados servirão como base para confirmar as espécies amplificando outras regiões gênicas como calmodulina, β -tubulina e TEF1- α .

As curvas de 30 dias para os dois fungos mostraram que os isolados foram capazes de produzir tanto lacases quanto peroxidases totais, enzimas de interesse industrial. Nas curvas de 15 dias, foi possível ver que a adição da peptona no meio beneficiou o crescimento do micélio fúngico, mas ainda é necessário ver como a relação carbono / nitrogênio afeta a produção enzimática. A troca de glicose por peptona antecipou o pico de lacases de 10 para 8 dias, mas atrasou o de peroxidases totais de 9 para 10 dias no caso do “P1”; no caso de “P2” a troca antecipou o pico de lacase de 26 dias para 12 dias, mas também adiou o de peroxidases totais de 6 para 10 dias.

Os fatores selecionados para realização da otimização, nos níveis em que foram testados, não resultaram em nenhum modelo ou fator com significância estatística, a não ser o pH inicial, a peptona e a interação entre os dois para a produção de lacase para o isolado “P1”; nem apresentaram uma atividade maior do que o picos de produção observados nas curvas de 15 dias para os dias selecionados para os planejamentos fatoriais (P1: 38,63 U_{lacase}/mL ; 46,77 $U_{peroxidases\ totais}/mL$ e; P2: 41,21 U_{lacase}/mL ; 13,55 $U_{peroxidases\ totais}/mL$), mas geraram resultados que podem ser utilizados como base para novas tentativas de otimização, avaliando os fatores em outros níveis ou avaliando outros fatores.

De forma geral, esse trabalho gerou dados inéditos e relevantes para se expandir a escassa literatura sobre a produção de enzimas lignolíticas por fungos endofíticos do gênero *Diaporthe*.

7 REFERÊNCIAS

- ABD EL MONSSEF, R. A.; HASSAN, E. A.; RAMADAN, E. M. Production of laccase enzyme for their potential application to decolorize fungal pigments on aging paper and parchment. **Annals of Agricultural Sciences**, jun. 2016. v. 61, n. 1, p. 145–154.
- AGRAWAL, K.; CHATURVEDI, V.; VERMA, P. Fungal laccase discovered but yet undiscovered. **Bioresources and Bioprocessing**, dez. 2018. v. 5, n. 1, p. 4.
- ALBERTO, R. N. *et al.* Extracellular enzymatic profiles and taxonomic identification of endophytic fungi isolated from four plant species. **Genetics and Molecular Research**, 2016. v. 15, n. 4. Disponível em: <<http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2016/vol15-4/pdf/gmr-15-gmr15049016.pdf>>. Acesso em: 8 jan. 2021.
- ÁLVAREZ-LOAYZA, P. *et al.* Light Converts Endosymbiotic Fungus to Pathogen, Influencing Seedling Survival and Niche-Space Filling of a Common Tropical Tree, *Iriartea deltoidea*. **PLoS ONE**, 31 jan. 2011. v. 6, n. 1, p. e16386.
- ASGHER, M.; ASAD, M. J.; LEGGE, R. L. Enhanced lignin peroxidase synthesis by Phanerochaete Chrysosporium in solid state bioprocessing of a lignocellulosic substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 9 maio. 2006. v. 22, n. 5, p. 449–453.
- BAI, Y. *et al.* Plant behaviour under combined stress: tomato responses to combined salinity and pathogen stress. **The Plant Journal**, fev. 2018. v. 93, n. 4, p. 781–793.
- BAJPAI, P. **Biorefinery in the Pulp and Paper Industry**. [S.l.]: Elsevier, 2013.
- BALDRIAN, P. Fungal laccases – occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, mar. 2006. v. 30, n. 2, p. 215–242.
- BARBOSA, E. Dos S. *et al.* VANILLIN PRODUCTION BY PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM GROWN ON GREEN COCONUT AGRO- INDUSTRIAL HUSK IN SOLID STATE FERMENTATION. **BioResources**, 2008. v. 3, n. 4, p. 1042–1050.
- BARROS NETO, B. De; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.
- BEIER, G. L. *et al.* *Aurantioporthe corni* gen. et comb. nov., an endophyte and pathogen of *Cornus alternifolia*. **Mycologia**, jan. 2015. v. 107, n. 1, p. 66–79.
- BETTIN, F. *et al.* Production of laccases in submerged process by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 in relation to carbon and organic nitrogen sources, antifoams and Tween 80. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, jan. 2009. v. 36, n. 1, p. 1–9.
- BETTIN; BOFF, N. A. Aplicação de Lacases Bruta e Comercial na Descoloração de Misturas de Corantes das Classes Antraquinona, Azo e Trifenilmetano. 2016. p. 4.
- BOTELLA, L.; DIEZ, J. J. Phylogenic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. **Fungal Diversity**, mar. 2011. v. 47, n. 1, p. 9–18.

BORLAUG, N. (2002). Feeding a World of 10 Billion People: The Miracle Ahead. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant**, 38(2), 221-228. Retrieved January 15, 2021, from <http://www.jstor.org/stable/20065038>

CALDWELL, B. A.; JUMPPONEN, A.; TRAPPE, J. M. Utilization of major detrital substrates by dark-septate, root endophytes. **Mycologia**, mar. 2000. v. 92, n. 2, p. 230–232.

CARROLL, G. C.; CARROLL, F. E. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, 15 dez. 1978. v. 56, n. 24, p. 3034–3043.

CHANDRA, R.; CHOWDHARY, P. Properties of bacterial laccases and their application in bioremediation of industrial wastes. **Environmental Science: Processes & Impacts**, 2015. v. 17, n. 2, p. 326–342.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAÚJO, A. R. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. **Revista Virtual de Química**, [S.l.], 2012. p. 421–437.

CHEPKIRUI, C.; STADLER, M. The genus Diaporthe: a rich source of diverse and bioactive metabolites. **Mycological Progress**, maio. 2017. v. 16, n. 5, p. 477–494.

CORRÊA, R. C. G. *et al.* Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, out. 2014. v. 41, n. 10, p. 1467–1478.

CUNICO, M. W. M. *et al.* Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, 30 jun. 2008. v. 9, n. 1. Disponível em: <<http://revistas.ufpr.br/academica/article/view/14635>>. Acesso em: 9 jan. 2021.

D'AGOSTINI, É. C. *et al.* Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. **Scientia Agricola**, jun. 2011. v. 68, n. 3, p. 295–300.

DAI, J. *et al.* Novel Highly Substituted Biraryl Ethers, Phomosines D-G, Isolated from the Endophytic Fungus *Phomopsis* sp. from *Adenocarpus foliolosus*. **European Journal of Organic Chemistry**, dez. 2005. v. 2005, n. 23, p. 5100–5105.

DAN, Z. *et al.* Optimization of Fermentation Parameters for Laccase Production by a Novel Deuteromycete Fungus *Myrothecium Verrucaria* NF-05 Using Response Surface Methodology. *In*: 2ND INTERNATIONAL CONFERENCE ON CIVIL, MATERIALS AND ENVIRONMENTAL SCIENCES, 2015, Guilin, China. **Anais eletrônicos...** Guilin, China: Atlantis Press, 2015. Disponível em: <<http://www.atlantis-press.com/php/paper-details.php?id=18102>>. Acesso em: 8 jan. 2021.

D'ANNIBALE, A. *et al.* Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. **Journal of Biotechnology**, fev. 2000. v. 77, n. 2–3, p. 265–273.

DEMPSTER, A. P. Likelihood. An Account of the Statistical Concept of Likelihood and Its Application to Scientific Inference. A. W. F. Edwards. Cambridge University Press, New York, 1972. xvi, 236 pp., illus. \$13.50. **Science**, 8 set. 1972. v. 177, n. 4052, p. 878–879.

DISSANAYAKE, A. The current status of species in Diaporthe. **Mycosphere**, 2017. v. 8, n. 5, p. 1106–1156.

EATON, C. J.; COX, M. P.; SCOTT, B. What triggers grass endophytes to switch from mutualism to pathogenism? **Plant Science**, fev. 2011. v. 180, n. 2, p. 190–195.

EGGERT, C.; TEMP, U.; ERIKSSON, K. E. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. **Applied and environmental microbiology**, 1996. v. 62, n. 4, p. 1151–1158.

FALADE, A. O. *et al.* Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. **MicrobiologyOpen**, fev. 2017. v. 6, n. 1, p. e00394.

FARRUGGIA, F.; BOHS, L. Two new South American species of *Solanum* section *Crinitum* (Solanaceae). **PhytoKeys**, 1 nov. 2010. v. 1, n. 0. Disponível em: <http://www.pensoft.net/journal_home_page.php?journal_id=3&page=article&type=show&article_id=661&abstract=1>. Acesso em: 8 jan. 2021.

FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**, nov. 1981. v. 17, n. 6, p. 368–376.

FIRÁKOVÁ, S.; ŠTURDÍKOVÁ, M.; MÚČKOVÁ, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. **Biologia**, 1 jan. 2007. v. 62, n. 3. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/doi/10.2478/s11756-007-0044-1>>. Acesso em: 23 dez. 2020.

FISHER, R. A. **The Design of Experiments**. 9ª ed. Reino Unido: Macmillan Pub Co.: [s.n.], 1935.

FORCINA, G. C. *et al.* Stelligosphaerols A and B, Sesquiterpene–Polyol Conjugates from an Ecuadorian Fungal Endophyte. **Journal of Natural Products**, 24 dez. 2015. v. 78, n. 12, p. 3005–3010.

GANGE, A. C. *et al.* Differential effects of foliar endophytic fungi on insect herbivores attacking a herbaceous plant. **Oecologia**, abr. 2012. v. 168, n. 4, p. 1023–1031.

GAUTÉRIO, G. V. *et al.* Purification of Peroxidase from Rice Bran Using Expanded-Bed Ion-Exchange Chromatography. **Adsorption Science & Technology**, fev. 2015. v. 33, n. 2, p. 153–164.

GERMAINE, K. J. *et al.* Bacterial endophyte-enhanced phytoremediation of the organochlorine herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid: Bacterial endophyte-enhanced phytoremediation. **FEMS Microbiology Ecology**, ago. 2006. v. 57, n. 2, p. 302–310.

GOMES, R. R. *et al.* *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, 31 dez. 2013. v. 31, n. 1, p. 1–41.

- GOUVÊA, Y. F.; STEHMANN, J. R.; KNAPP, S. *Solanum medusae* (Solanaceae), a new wolf-fruit from Brazil, and a key to the extra-Amazonian Brazilian *Androceras*/*Crinitum* Clade species. **PhytoKeys**, 27 fev. 2019. v. 118, p. 15–32.
- HAMID, M.; KHALIL-UR-REHMAN. Potential applications of peroxidases. **Food Chemistry**, ago. 2009. v. 115, n. 4, p. 1177–1186.
- HARTLEY, S. E.; GANGE, A. C. Impacts of Plant Symbiotic Fungi on Insect Herbivores: Mutualism in a Multitrophic Context. **Annual Review of Entomology**, jan. 2009. v. 54, n. 1, p. 323–342.
- HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. **FEMS Microbiology Reviews**, mar. 1994. v. 13, n. 2–3, p. 125–135.
- HEINZKILL, M. *et al.* Characterization of Laccases and Peroxidases from Wood-Rotting Fungi (Family Coprinaceae). **Applied and Environmental Microbiology**, 1998. v. 64, n. 5, p. 1601–1606.
- HOFRICHTER, M. *et al.* New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, jul. 2010. v. 87, n. 3, p. 871–897.
- HOLDER, M.; LEWIS, P. O. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. **Nature Reviews Genetics**, abr. 2003. v. 4, n. 4, p. 275–284.
- JALGAONWALA, R. E.; MAHAJAN, R. T. Evaluation of hydrolytic enzyme activities of endophytes from some indigenous medicinal plants. 2011. v. 7, p. 9.
- JONES, S. M.; SOLOMON, E. I. Electron transfer and reaction mechanism of laccases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, mar. 2015. v. 72, n. 5, p. 869–883.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 147-155, 2005.
- KOBAYASHI, H. *et al.* Absolute structure, biosynthesis, and anti-microtubule activity of phomopsidin, isolated from a marine-derived fungus *Phomopsis* sp. 2003. p. 5.
- KRACHER, D.; LUDWIG, R. Cellobiose dehydrogenase: An essential enzyme for lignocellulose degradation in nature – A review / Cellobiosedehydrogenase: Ein essentielles Enzym für den Lignozelluloseabbau in der Natur – Eine Übersicht. **Die Bodenkultur: Journal of Land Management, Food and Environment**, 1 set. 2016. v. 67, n. 3, p. 145–163.
- KUCHARSKA, K. *et al.* Pretreatment of Lignocellulosic Materials as Substrates for Fermentation Processes. **Molecules**, 10 nov. 2018. v. 23, n. 11, p. 2937.
- KUMAR, A.; CHANDRA, R. Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. **Heliyon**, fev. 2020. v. 6, n. 2, p. e03170.
- LEONOWICZ, A. *et al.* Biodegradation of Lignin by White Rot Fungi. **Fungal Genetics and Biology**, jul. 1999. v. 27, n. 2–3, p. 175–185.

- LI, E. *et al.* Pestaloths A–D, Bioactive Metabolites from the Plant Endophytic Fungus *Pestalotiopsis theae*. **Journal of Natural Products**, abr. 2008. v. 71, n. 4, p. 664–668.
- LIU, H. *et al.* Inner Plant Values: Diversity, Colonization and Benefits from Endophytic Bacteria. **Frontiers in Microbiology**, 19 dez. 2017. v. 8, p. 2552.
- MACCHERONI, JR., W.; AZEVEDO, João Lúcio. Synthesis and secretion of phosphatases by endophytic isolates of *Colletotrichum musae* grown under conditions of nutritional starvation. **The Journal of General and Applied Microbiology**, 1998. v. 44, n. 6, p. 381–387.
- MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R.; BONONI, V. L. R. Ligninolytic enzymes production and Remazol brilliant blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, set. 2005. v. 36, n. 3, p. 246–252.
- MANAWASINGHE, I. S. *et al.* High Genetic Diversity and Species Complexity of Diaporthe Associated With Grapevine Dieback in China. **Frontiers in Microbiology**, 2 set. 2019. v. 10, p. 1936.
- MARINHO, M. R. M.; CASTRO, W. B. PLANEJAMENTO FATORIAL: UMA FERRAMENTA PODEROSA PARA OS PESQUISADORES. *In*: COBENGE: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENSINO DE ENGENHARIA, 2005, Campina Grande - PB. **Anais...** Campina Grande - PB: ABENGE, 2005. p. 9.
- MARQUES DE SOUZA, C. G.; ZILLY, A.; PERALTA, R. M. Production of laccase as the sole phenoloxidase by a Brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. **Journal of Basic Microbiology**, 2002. v. 42, n. 2, p. 83–90.
- MARTINHO, V. *et al.* Enzymatic potential and biosurfactant production by endophytic fungi from mangrove forest in Southeastern Brazil. **AMB Express**, dez. 2019. v. 9, n. 1, p. 130.
- MIKIASHVILI, N. *et al.* Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, set. 2006. v. 22, n. 9, p. 999–1002.
- MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *In*: 2010 GATEWAY COMPUTING ENVIRONMENTS WORKSHOP (GCE), 2010, New Orleans, LA, USA. **Anais eletrônicos...** New Orleans, LA, USA: IEEE, 2010. p. 1–8. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/document/5676129/>>. Acesso em: 9 jan. 2021.
- MISHRA, Y. *et al.* Understanding the Biodiversity and Biological Applications of Endophytic Fungi: A Review. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, 2014. v. s8, n. 01. Disponível em: <<http://omicsonline.org/open-access/understanding-the-biodiversity-and-biological-applications-of-endophytic-fungi-a-review-1948-5948.S8-004.php?aid=31222>>. Acesso em: 9 jan. 2021.
- NATH, A.; PATHAK, J.; JOSHI, S. Bioactivity assessment of endophytic fungi associated with *Centella asiatica* and *Murraya koengii*. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, 2014. Disponível em: <http://jabonline.in/abstract.php?article_id=47>. Acesso em: 8 jan. 2021.

NITHYA, K.; MUTHUMARY, J. BIOACTIVE METABOLITE PRODUCED BY PHOMOPSIS SP., AN ENDOPHYTIC FUNGUS IN ALLAMANDA CATHARTICA LINN. 2011. p. 5.

OSIADACZ, J. *et al.* On the use of *Trametes versicolor* laccase for the conversion of 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid to actinocin chromophore. **Journal of Biotechnology**, 1999. p. 9.

PERALTA-ZAMORA, P. *et al.* Remediação de efluentes derivados da indústria de papel e celulose: tratamento biológico e fotocatalítico. **Química Nova**, abr. 1997. v. 20, n. 2, p. 186–190.

PETRINI, O. *et al.* Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, 1993. v. 1, n. 3, p. 185–196.

PEZZELLA, C. *et al.* The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members. **Current Genetics**, fev. 2009. v. 55, n. 1, p. 45–57.

PIVELLO, V.R. Invasões Biológicas no Cerrado Brasileiro: Efeitos da Introdução de Espécies Exóticas sobre a Biodiversidade. **ECOLOGIA.INFO**, 2011, v.33.

RAMBAUT, A. **FigTree 1.2.2**. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>, 2009.

REDDY, P. V.; LAM, C. K.; BELANGER, F. C. Mutualistic Fungal Endophytes Express a Proteinase that Is Homologous to Proteases Suspected to Be Important in Fungal Pathogenicity. **Plant Physiology**, 1 ago. 1996. v. 111, n. 4, p. 1209–1218.

REHNER, S. A.; UECKER, F. A. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycete *Phomopsis*. **Canadian Journal of Botany**, 1 nov. 1994. v. 72, n. 11, p. 1666–1674.

RENSBURG, J. C. J. VAN *et al.* Characterisation of *Phomopsis* spp. associated with die-back of rooibos (*Aspalathus linearis*) in South Africa. **Studies in Mycology**, maio. 2006. v. 55, p. 65–74.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos & Otimização de Processos**. 3ª revisada ed. Campinas, SP: Cárita Editora, 2014. V. 1.

RODRÍGUEZ COUTO, S.; TOCA HERRERA, J. L. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. **Biotechnology Advances**, set. 2006. v. 24, n. 5, p. 500–513.

RODRIGUEZ, R. J. *et al.* Fungal endophytes: diversity and functional roles: *Tansley review*. **New Phytologist**, abr. 2009. v. 182, n. 2, p. 314–330.

ROSSMAN, A. *et al.* (2304) Proposal to conserve the name *Diaporthe eres* against twenty-one competing names (*Ascomycota* : *Diaporthales* : *Diaporthaceae*). **Taxon**, 28 ago. 2014. v. 63, n. 4, p. 934–935.

SANTOS, J. M. *et al.* Resolving the *Diaporthe* species occurring on soybean in Croatia. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, 31 dez. 2011. v. 27, n. 1, p. 9–19.

SASSE, J.; MARTINOIA, E.; NORTHEN, T. Feed Your Friends: Do Plant Exudates Shape the Root Microbiome? **Trends in Plant Science**, jan. 2018. v. 23, n. 1, p. 25–41.

SCHNEIDER, W. D. H. *et al.* High level production of laccases and peroxidases from the newly isolated white-rot basidiomycete *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a stirred-tank bioreactor in response to different carbon and nitrogen sources. **Process Biochemistry**, jun. 2018. v. 69, p. 1–11.

SCHOCH, C. L. *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 17 abr. 2012. v. 109, n. 16, p. 6241–6246.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, jun. 2005. v. 109, n. 6, p. 661–686.

SENTHILKUMAR, N. *et al.* GC-MS analysis of the extract of endophytic fungus, *Phomopsis* sp. isolated from tropical tree species of India, *Tectona grandis* L. 2007. v. 3, n. 3, p. 4.

SIKORA, R. A. *et al.* Mutualistic endophytic fungi and in-planta suppressiveness to plant parasitic nematodes. **Biological Control**, jul. 2008. v. 46, n. 1, p. 15–23.

SILVA, I. S. *et al.* Degradation of lignosulfonic and tannic acids by ligninolytic soil fungi cultivated under microaerobic conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, jun. 2010. v. 53, n. 3, p. 693–699.

SONGULASHVILI, G.; FLAHAUT, S.; DEMAREZ, M.; TRICOT, C.; BAUVOIS, C.; DEBASTE, F.; PENNINCKX, M.J. High yield production in seven days of *Coriolopsis gallica* 1184 laccase at 50 L scale; enzyme purification and molecular characterization. **Fungal Biology**, 2016, 120(4):481–488

STERNBERG, D.; DORVAL, S. Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, fev. 1979. v. 21, n. 2, p. 181–191.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, dez. 2003. v. 67, n. 4, p. 491–502.

SUDHA, V. *et al.* Biological properties of Endophytic Fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2016. v. 59, n. 0. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132016000100413&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 9 jan. 2021.

SUNITHA, V. H.; DEVI, D. N.; SRINIVAS, C. Extracellular Enzymatic Activity of Endophytic Fungal Strains Isolated from Medicinal Plants. 2013. p. 9.

SURYANARAYANAN, T. S. *et al.* Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, fev. 2009. v. 23, n. 1–2, p. 9–19.

SUTO, M. *et al.* Endophytes as producers of xylanase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, jan. 2002. v. 93, n. 1, p. 88–90.

- TANNEY, J. B. *et al.* Production of antifungal and antiinsectan metabolites by the Picea endophyte *Diaporthe maritima* sp. nov. **Fungal Biology**, nov. 2016. v. 120, n. 11, p. 1448–1457.
- TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, abr. 2006. v. 29, n. 2, p. 338–350.
- TORRES, E.; BUSTOS-JAIMES, I.; LE BORGNE, S. Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. **Applied Catalysis B: Environmental**, out. 2003. v. 46, n. 1, p. 1–15.
- TORRES, M. S. *et al.* Endophyte-mediated adjustments in host morphology and physiology and effects on host fitness traits in grasses. **Fungal Ecology**, jun. 2012. v. 5, n. 3, p. 322–330.
- UDAYANGA, D. *et al.* A multi-locus phylogenetic evaluation of *Diaporthe* (Phomopsis). **Fungal Diversity**, set. 2012. v. 56, n. 1, p. 157–171.
- UPADHYAY, P.; SHRIVASTAVA, R.; AGRAWAL, P. K. Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. **3 Biotech**, jun. 2016. v. 6, n. 1, p. 15.
- VANDENKOORNHUYSE, P. *et al.* The importance of the microbiome of the plant holobiont. **New Phytologist**, jun. 2015. v. 206, n. 4, p. 1196–1206.
- VRSANSKA, M. *et al.* Induction of Laccase, Lignin Peroxidase and Manganese Peroxidase Activities in White-Rot Fungi Using Copper Complexes. **Molecules**, 17 nov. 2016. v. 21, n. 11, p. 1553.
- VILGALYS, R., HESTER, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. **J Bacteriol**, 1990. 172:4238–4246.
- WANG, F. *et al.* Enhanced laccase production by *Trametes versicolor* using corn steep liquor as both nitrogen source and inducer. **Bioresource Technology**, ago. 2014. v. 166, p. 602–605.
- WANG, J. W. *et al.* Laccase production by *Monotropa* sp., an endophytic fungus in *Cynodon dactylon*. **Bioresource Technology**, mar. 2006. v. 97, n. 5, p. 786–789.
- WAQAS, M. *et al.* Endophytic Fungi Produce Gibberellins and Indoleacetic Acid and Promotes Host-Plant Growth during Stress. **Molecules**, 7 set. 2012. v. 17, n. 9, p. 10754–10773.
- WELINDER, K. G. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. **Current Opinion in Structural Biology**, jun. 1992. v. 2, n. 3, p. 388–393.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A, Gelfand, D. H, Sninsky, J. J, White TJ. (Eds.) **PCR Protocols: A guide to methods and applications**. San Diego, California, USA. Academic Press, 1990. Pp. 315-322.
- WOICIECHOWSKI, A. L. *et al.* The Pretreatment Step in Lignocellulosic Biomass Conversion: Current Systems and New Biological Systems. In: FARACO, V. (Org.). **Lignocellulose Conversion**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, p. 39–64.

- WONG, D. W. S. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, maio. 2009. v. 157, n. 2, p. 174–209.
- WU, Y. *et al.* The Role of Endophytic Fungi in the Anticancer Activity of *Morinda citrifolia* Linn. (Noni). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015. v. 2015, p. 1–8.
- XU, F. Effects of Redox Potential and Hydroxide Inhibition on the pH Activity Profile of Fungal Laccases. **Journal of Biological Chemistry**, 10 jan. 1997. v. 272, n. 2, p. 924–928.
- YAN, L. *et al.* Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 7 mar. 2019. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00253-019-09713-2>>. Acesso em: 9 jan. 2021.
- YANG, J. *et al.* Laccase Production and Differential Transcription of Laccase Genes in *Cerrena* sp. in Response to Metal Ions, Aromatic Compounds, and Nutrients. **Frontiers in Microbiology**, 12 jan. 2016. v. 6. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.01558/abstract>>. Acesso em: 9 jan. 2021.
- ZAFERANLOO, B. *et al.* Endophytes from an Australian native plant are a promising source of industrially useful enzymes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, fev. 2013. v. 29, n. 2, p. 335–345.
- ZHANG, G. *et al.* Antifungal Metabolites Produced by *Chaetomium globosum* No.04, an Endophytic Fungus Isolated from *Ginkgo biloba*. **Indian Journal of Microbiology**, jun. 2013. v. 53, n. 2, p. 175–180.