INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIAS E TECNOLOGIA GOIANO BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MATHEUS MENDONÇA DE SOUZA MARQUES

PROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE ENZIMAS A PARTIR DA MICROBIOTA ENDOFÍTICA RADICULAR E RIZOSFÉRICA DE Hymenaea courbaril AMOSTRADA EM ECOSSISTEMA DE PANTANAL E CERRADO

11/2019 RIO VERDE – GO

MATHEUS MENDONÇA DE SOUZA MARQUES

Prospecção de micro-organismos produtores de enzimas a partir da microbiota endofítica radicular e rizosférica de *Hymenaea courbaril* amostrada em ecossistema de Pantanal e Cerrado

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina TCC, do curso de bacharelado em ciências biológicas do Instituto Federal de educação, ciência e tecnologia goiano — campus Rio verde — IFG, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel.

Orientador (a): Prof.^a Dr^a Luciana Cristina Vitorino

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

M357p Mendonça de Souza Marques, Matheus

Prospecção de micro-organismos produtores de enzimas a partir da microbiota endofítica radicular e rizosférica de Hymenaea courbaril amostrada em ecossistema de Pantanal e Cerrado / Matheus Mendonça de Souza Marques; orientadora Luciana Cristina Vitorino. -- Rio Verde, 2019.
28 p.

Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) - Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2019.

- 1. amilases. 2. proteases. 3. lipases. 4. jatobá.
- I. Cristina Vitorino, Luciana, orient. II. Título.

Responsável: Johnathan Pereira Alves Diniz - Bibliotecário-Documentalista CRB-1 n°2376



Repositório Institucional do IF Goiano - RIIF Goiano Sistema Integrado de Bibliotecas

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICOCIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Téc	nico-Científica
[] Tese	[] Artigo Científico
[] Dissertação	[] Capítulo de Livro
[] Monografia – Especialização	[] Livro
[X] TCC - Graduação[] Produto Técnico e Educacional - Tip	[] Trabalho Apresentado em Evento o:
	ro-organismos produtores de enzimas a partir da microbiota rmenaea courbaril amostrada em ecossistema de Pantanal e
Informe a data que poderá ser disponib O documento está sujeito a registro de O documento pode vir a ser publicado c	patente? [] Sim [x] Não
DECLARAÇÃO I O/A referido/a autor/a declara que:	DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA
1. o documento é seu trabalho orig e não infringe os direitos de qualquer o	inal, detém os direitos autorais da produção técnico-científica utra pessoa ou entidade;
de autor/a, para conceder ao Instituto	materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos eitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados o documento entregue;
	igidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue la apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de
2	Rio Verde, 02/12/2019. Local Data
_Matheus Mena Assinatura do Au	tor e/ou Detentor dos Direitos Autorais
Ciente e de acordo:	natura do(a) orientador(a)
ASSI	natura uota, onentauorta,



INSTITUTO FEDERAL GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE DIRETORIA DE ENSINO GERÊNCIA DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

ATA DE DEFESA DO TRABALHO DE CURSO (TC)

ANO	SEMESTRI	
2019	02	

No dia d + do mês de No Je mblo de 2019, às O + horas e O
minutos, reuniu-se a banca examinadora composta pelos docentes
LAYARA ALEXANDRE BESSA, LUCIANA CRISTINA
VITORINO E DENISE ALMEIDA FONSECA FIUZA.
para examinar o Trabalho de Curso (TC) intitulado
PROSPECCAD DE MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE
ENZIMAS A PARTIR DA MICROBIOTA ENDOFÍTICA RADICULAR E RIZOSFER.
DE HYMENAGA COURBARIL AMOSTRADA EM ECOSSISTEMA DE PANTALNAL E CERRADO
do(a) acadêmico(a) MATHEUS MENDONCA DE SOUZA MARQUES,
Matrícula nº_ <i>ZOLGLO2230530384</i> do curso de
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOZÓGICAS do IF Goiano - Câmpus Rio Verde. Após
a apresentação oral do TC, houve arguição do candidato pelos membros da banca
examinadora. Após tal etapa, a banca examinadora decidiu pela APROVACAO do(a)
acadêmico(a). Ao final da sessão pública de defesa foi lavrada a presente ata, que segue
datada e assinada pelos examinadores.
Rio Verde, 27 de Novembro de 2019.
duciana Distina Vitorino
Nome: Orientador(a)
Josepona Janandre Bersa
Nome: Membro
Venise almeida forsica Liuza
Nome: Membro

Observação:

() O(a) acadêmico(a) não compareceu à defesa do TC.

Dedico este traba	alho a todos que u semelhante, de	suas mãos para i	

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos	que possuem p	lena consciência	de que contr	ribuíram para	a elaboração d	leste
trabalho.						

RESUMO

MARQUES, MATHEUS MENDONÇA DE SOUZA. Prospecção de micro-organismos

produtores de enzimas a partir da microbiota endofítica radicular e rizosférica de Hymenaea

courbaril amostrada em ecossistema de Pantanal e Cerrado. 2019. Trabalho de Conclusão de

Curso (Graduação) – Bacharelado em Ciências Biológicas. Instituto Federal Goiano - Campus

Rio Verde, Goiás. Rio Verde Goiás, 2019.

O Cerrado e o Pantanal são biomas muito biodiversos, mas abioticamente muito distintos

entre si. Apesar disso, Hymenaea courbaril, popularmente conhecida como Jatobá, é

amplamente distribuída por estes dois biomas. É uma planta popularmente conhecida pelos

seus diversos usos, em especial pelas propriedades medicinais e por sua utilização na

recuperação de áreas degradadas, no entanto, pouco se sabe a identidade e sobre o papel

funcional da microbiota rizosférica e endofítica desta planta. Devido a significância desta

espécie se faz necessária a obtenção de dados para sua conservação e valorização. Neste

contexto, esta pesquisa teve como objetivo avaliar o potencial para síntese enzimática da

microbiota amostrada na rizosfera e nas raízes de Hymenaea courbaril amostrada no bioma

Cerrado e no Pantanal. Foram avaliados 20 isolados fúngicos e 20 isolados bacterianos. O

potencial para síntese enzimática foi avaliado em meios de cultura contendo substratos para

reação enzimática de amilases, proteases e lipases. Entre os isolados fúngicos de maior

destaque são eles, FSCR6 e FSCR 8, apresentando índices enzimáticos de 21 e 17mm para

amilase e 15 e 18mm para protease respectivamente; e entre isolados bacterianos de maior

destaque são, BSCE8 e BSCE7, apresentando índices enzimáticos de 10 e 9mm para amilase

e 5 e 4mm para protease respectivamente, no entanto a síntese de lipase foi nula, além da

microbiota do Cerrado se mostrar mais eficiente neste quesito, micro-organismos rizosféricos

isolados também se mostraram mais eficientes do que os endofíticos.

Palavras-chave: amilases, proteases, lipases, jatobá.

ABSTRACT

MARQUES, MATHEUS MENDONÇA DE SOUZA. Prospecting of enzyme-producing microorganisms from the root and rhizospheric endophytic microbiota of *Hymenaea courbaril* sampled in Pantanal and Cerrado ecosystem. 2019. Course Conclusion Paper (Undergraduate) - Bachelor of Biological Sciences. Goiano Federal Institute - Rio Verde Campus, Goiás. Rio Verde Goiás, 2019.

The Cerrado and the Pantanal are very biodiverse but abiotically very distinct biomes. Nevertheless, Hymenaea courbaril, popularly known as Jatoba, is widely distributed throughout these two biomes. It is a plant popularly known for its various uses, especially for medicinal properties and its use in the recovery of degraded areas, however, little is known about the identity and functional role of rhizospheric and endophytic microbiota of this plant. Due to the significance of this species it is necessary to obtain data for its conservation and valorization. In this context, this research aimed to evaluate the potential for enzymatic synthesis of the microbiota sampled in the rhizosphere and roots of Hymenaea courbaril sampled in the Cerrado and Pantanal biomes. Twenty fungal isolates and twenty bacterial isolates were evaluated. The potential for enzymatic synthesis was evaluated in culture media containing substrates for enzymatic reaction of amylases, proteases and lipases. Among the most prominent fungal isolates are FSCR6 and FSCR 8, with enzymatic indices of 21 and 17mm for amylase and 15 and 18mm for protease respectively; and among the most prominent bacterial isolates are BSCE8 and BSCE7, with enzymatic indices of 10 and 9mm for amylase and 5 and 4mm for protease respectively, however lipase synthesis was null, and the Cerrado microbiota was more efficient in this regard. Isolated rhizospheric microorganisms were also more efficient than endophytic microorganisms.

Keywords: amylases, proteases, lipases, jatobá.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Biomas e <i>Hymenaea courbaril</i>	11
1.2 Micro-organismos endofíticos e rizosféricos	12
1.3 Enzimas microbianas	12
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. METODOLOGIA	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5. CONCLUSÕES	24
6 REFERÊNCIAS	25

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biomas e Hymenaea courbaril

O Cerrado é um dos maiores biomas do Brasil, com diversas fitofisionomias e altos índices de diversidade biológica. De acordo com KLEIN (2000), o bioma ocupa mais de 1,5 milhão de km², o que é equivalente a 22% do território brasileiro, atingindo vários dos 26 estados, principalmente o Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e Distrito Federal. O Cerrado tem predominância de ambientes quentes, com períodos de seca e de chuva e incêndios naturais causados em época de seca. Segundo MAYERS (2000) o Cerrado é considerado um hotspot e a savana mais rica que existe em relação a biodiversidade. Tem como características a temperatura média de 25° C, poucas planícies e muitos relevos, um solo pobre em nutrientes e com pH variando em 4 a 6, aproximadamente. Apresenta como vegetação uma vasta cobertura de gramíneas com pequenas árvores e arbustos retorcidos.

Outro bioma brasileiro muito biodiverso é o Pantanal, sendo considerado uma das regiões úmidas mais extensas do mundo. Em contrapartida, o Pantanal ocupa mais de 150.000 km² no Brasil (IBGE, 2004), sendo 1,76% do território brasileiro, também atingindo o Paraguai e a Bolívia. Possui clima quente e úmido, de acordo com POTT e DA SILVA (2015), com temperatura média anual variando entre 22 a 26° C. Geralmente a umidade é alta devido à água acumulada no solo nos períodos de cheia. Segundo DO AMARAL FILHO (1986), esses solos possuem alta porosidade, o que auxilia na absorção da água das chuvas. O pantanal possui uma grande biodiversidade florística (CAVALCANTI, 1999), sendo sua fitofisionomia uma micela de vegetações de biomas vizinhos, o que confere uma heterogeneidade para região (POTT e ADÁMOLI, 1996).

Popularmente conhecido como Jatobá, *Hymenaea courbaril* é uma planta que atinge de 10 a 15 metros, pertencente à família Fabaceae, bastante encontrada nas regiões tropicais do Brasil. Possui frutos com farinha comestível e alto teor proteico (NOGUEIRA et al., 2001; CAMPOS e UCHIDA, 2002; LORENZI, 1998). É uma espécie com distribuição ampla, capaz de se adaptar em diferentes ambientes, provavelmente devido às baixas exigências nutritivas e hídricas, sendo observada em solos ácidos, com baixa fertilidade e bem drenados (LEE e LANGENHEIM, 1975). No entanto, LORENZI (1998) relata que formações florestais secas são mais propícias para o desenvolvimento de *Hymenaea courbaril* do que ambientes úmidos.

Estudos voltados para a microbiota rizosférica desta espécie ainda são escassos na literatura.

1.2 Micro-organismos endofíticos e rizosféricos

Sabe-se que micro-organismos rizosféricos têm como característica viver em tecidos internos ou em torno de tecidos radiculares dos vegetais, sem prejudicar os hospedeiros (ANDREOTE e CARDOSO, 2016). De acordo com BALDANI, et al. (1997) e HARDOIM et al., (2008), a microbiota capaz de se associar às plantas pode ser classificada em: endofíticos facultativos, que podem viver no solo ou associado às raízes, e endofíticos obrigatórios que vivem apenas em raízes. Há também micro-organismos diazotróficos, que passam de períodos saprófitos para endofíticos, ou seja, se alimentam de matéria orgânica e depois vão para os tecidos das plantas, respectivamente. Os micro-organismos rizosféricos podem colonizar o solo ou a superfície das raízes, sendo favorecidos pela liberação de exsudatos radiculares (ANDREOTE e CARDOSO, 2016). A interação entre rizobactérias e gramíneas, por exemplo, é muito intensa (BALDANI et al., 1997), podendo os rizosféricos colonizarem os tecidos internos vegetais, estabelecendo modo de vida endofítico (ANDREOTE et al., 2014). TARAFDAR e KUMAR (1996) afirmam que micro-organismos rizosféricos induzem resistência aos vegetais, aumentando a tolerância das plantas a impactos bióticos e abióticos, como estresse hídrico, deficiência de nutrientes e ataque de fitopatógenos. Conforme DA SILVA et al. (2018), o uso de micro-organismos rizosféricos pode reduzir o tempo de germinação nas plantas e aumentar a capacidade dessas se estabelecerem em campo. De fato, esses micro-organismos são essenciais para as plantas, dado que são capazes de fixar nitrogênio, solubilizar fosfatos, produzir fitormônios e enzimas, além de atuarem contra patógenos, aumentando os níveis de crescimento e desenvolvimento de culturas (SILVEIRA, 2001).

As plantas possuem a capacidade de alterar a composição da microbiota rizosférica devido à liberação de compostos orgânicos variados (GRAYSTON et al., 1998) gerando também uma identidade a este grupo de micro-organismos atraídos por estes compostos exsudados (SICILIANO et al., 1998), podendo também gerar mudanças bioquímicas na rizosfera (PARMAR e DARDAWAL, 1999), sustentando a ideia de que interações plantabactérias possuem um histórico de co-evolução. (STURZ e CHRISTIE, 2003).

1.3 Enzimas microbianas

Muitos dos traços funcionais exercidos por micro-organismos simbióticos passam pela capacidade destes em sintetizarem enzimas como fosfatases, amilases e proteases, importantes

para a função microbiana, mas que podem ser aproveitadas em processos biotecnológicos, atuando na catalise de reações químicas diversas, sendo de extrema importância para os organismos vivos e também na degradação de matéria orgânica (LEHNINGER et al.,1995). ITOH et al. (1990), elucidam que elas possuem grande valor no aspecto biotecnológico, e enzimas inéditas e novos usos estão sendo descobertos a partir de pesquisas multidisciplinares, tornando o seu uso de industrial cada vez mais intenso e mais barato (SANT'ANNA JUNIOR, 2001).

Tem sido crescente o número de micro-organismos simbióticos descritos como potenciais produtores de enzimas comerciais. Endofíticos isolados de tubérculos de Pachyrhizus erosus (jacatupé), por exemplo, apresentaram atividade enzimática, onde linhagens de *Nocardiopsis* apresentaram atividade amilolítica e lipolítica, enquanto linhagens de Staphylococcus apresentaram atividade proteolítica (STAMFORD et alt., 1998). Segundo TAN e ZOU (2001), a produção de enzimas por micro-organismos varia conforme a especificidade entre meio hospedado e micro-organismo. POLIZELI et al., (1991) relatam que a produção de enzimas líticas por micro-organismos acaba por facilitar a entrada de rizosféricos e endofíticos nos tecidos vegetais. Tais enzimas também funcionam quebrando as defesas do hospedeiro para obtenção de nutrientes (TAN e ZOU, 2001), por isso, os microorganismos simbióticos a plantas têm despertado atenção para seu potencial em produzir enzimas de interesse biotecnológico. Para estudos de produção enzimática, LUZ et al. (2006) propuseram avaliar a produção enzimática de linhagens de fungos simbióticos isolados de alguns vegetais, onde observou-se diversos gêneros com capacidade para produzir lipases e proteases. Atualmente, os micro-organismos mais explorados para a produção de enzimas comerciais são fungos dos gêneros Aspergillus niger, Rhizopus oryzae e Rhizomucor meihei e leveduras como Saccharomyces spp. e Candida spp (ROCHA, 2010).

O uso de enzimas visa a melhoria de processos e produtos, logo, uma enzima de qualidade é aquela que proporciona um produto com qualidade superior e custos inferiores (ABRAHÃO NETO, 2001). Segundo ORLANDELLI et al. (2012), as enzimas atuam em diversas áreas dentro dos meios de produção, como por exemplo no processamento de fibras têxteis (ANDREAUS e CAVACO-PAULO, 2008), na indústria de papel e celulose (PAIVA e SÁ-PEREIRA, 2008), em cosméticos (SIM et al., 2003), na fabricação de alimentos e bebidas (GIESE, 2008), na panificação e produção de laticínios (VITOLO, 2001), etc.

As enzimas mais estudadas são de origem vegetal e animal. No entanto, as que se originam através de micro-organismos possuem altíssima capacidade para aplicação

industrial, pois podem ser fabricadas facilmente através de processos de fermentação (ORLANDELLI et al., 2012). As enzimas microbianas são de grande interesse no setor biotecnológico, onde as proteases se destacam, sobretudo na esfera industrial, seguidas das amilases (MICHELIN, 2005). Vale ressaltar que o uso de micro-organismos para a obtenção de enzimas oferece um leque de vantagens, como por exemplo, produção intensificada, flexibilidade para produção de várias enzimas, facilidade de cultivo em ambiente controlado, sensibilidade a alterações genéticas permitindo a obtenção de linhagens melhores para fabricação de enzimas, e assim, através destas vantagens, minimizando os impactos ao meio ambiente.

Portanto, como produtores de enzimas, micro-organismos apresentam um grande potencial e podem produzir amilases, que são capazes de degradar o amido, a principal substância de reserva dos vegetais, estando entre as enzimas mais importantes no meio industrial e de grande relevância biotecnológica. Conforme PANDEY et al. (2000) são também utilizadas em detergentes, sacarificação, têxtil, papel e fermentação, além de serem inclusas em diversas áreas da saúde. Segundo MOTTA (2009) a amilase possui uma importante atuação na digestão pelos seres vivos, iniciando seu papel já na mastigação através da amilase salivar e continuando seu trabalho no duodeno pela amilase pancreática, degradando amido e glicogênio.

Já as proteases são responsáveis por 40% do mercado de biocatalisadores (SOARES et al., 1999), capazes de clivar ligações peptídicas, fazendo parte de processos fisiológicos, como por exemplo, gerando respostas imunológicas diante a patógenos, além de serem utilizadas em processamento de alimentos, bebidas, couro e pele, amaciamento de carnes e como a amilase, também está inclusa na produção de detergentes e na produção de fármacos (RAO et al., 1998), ainda atuando na hidrólise de proteínas de membrana e parede celular de hospedeiros, facilitando a penetração e a infecção por micro-organismos patógenos ou não (TREMACOLDI, 2009).

E por fim, lipases, que, conforme HASAN et al. (2006) é um grupo de enzimas responsáveis por catalisar a hidrólise de triglicerídeos com grandes cadeias, se fazendo bastante presente no aspecto industrial, constituindo juntamente com amilases e proteases, outro dos principais biocatalisadores, atuando também nas indústrias de detergentes, alimentos, cosméticos, perfumaria e aromas, auxiliando na biocatálise de fármacos, produção de agroquímicos e químicos finos, biossensor, biorremediação, além de estar presente também

na degradação de lipídeos em seres vivos, para a obtenção de nutrientes, sendo secretada pela pâncreas (MOTTA, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial da microbiota endofítica radicular e rizosférica de *Hymenaea* courbaril (Jatobá) para produção de enzimas de interesse biotecnológico.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade de síntese de amilases;
- Avaliar a capacidade de síntese de proteases;
- Avaliar a capacidade de síntese de lipases;
- Comparar a síntese enzimática da microbiota endofítica radicular e rizosférica de Hymenaea courbaril amostrado no Pantanal com a da microbiota desta mesma planta, amostrada no Cerrado.

3. METODOLOGIA

Foram utilizados micro-organismos pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Agrícola do IF Goiano, campus Rio Verde. Estes micro-organismos foram previamente isolados a partir das raízes e rizosfera de plantas de *Hymenaea courbaril* coletadas no Parque da Serra de Caldas (Rio Quente-GO) - 17 48"29.77" S 48 41'59.61"O, elevação 985 m, altitude 5.28 km - e Parque Natural Municipal de Piraputangas (MS) - 19 14'26.79"S 57 37'20.23"O, elevação 351 m, altitude 17.37 km-. Foram testados 20 isolados fúngicos, destes, 6 do Pantanal (FPAE1, FPAE2, FPAE3, FPAE4, FPAE5 e FPAE6) e 14 do Cerrado (FSCE1, FSCE2, FSCE3, FSCR4, FSCR5, FSCR6, FSCR7, FSCR8, FSCR9, FSCR10, FSCR11, FSCR13, FSCR14 e FSCR15) e 20 bacterianos, destes, 10 do Pantanal (BPAE1, BPAE2, BPAE3, BPAE4, BPAE8, BPAR12, BPAR18, BPAR19, BPAR26 e BPAR32) e 10 do Cerrado (BSCE1, BSCE2, BSCE5, BSCE7, BSCE8, BSCR10, BSCR12, BSCR14, BSCR16 e BSCR19). Inicialmente estes isolados foram mantidos em glicerol 10% em freezer -80 °C, ativados em meio AN (ágar nutriente), com pH ajustado em 7 para bactérias e BDA (ágar batata dextrose), com o pH ajustado em 5,5 para fungos. Os inóculos bacterianos foram crescidos em estufa bacteriológica a 37 °C por 48 horas e os inóculos

fúngicos mantidos a esta temperatura por tempo necessário para as colônias atingirem diâmetros entre 5 a 6 centímetros.

Os testes síntese enzimática também foram conduzidos nos meios AN (bactéria) e BDA (fungos) sólidos, contendo substratos específicos para atividade de cada enzima avaliada. Para lipase foi utilizado como substrato lipídico 1% de Tween 80 e 5% de azeite extra virgem, sendo o halo produzido pela atividade fúngica e bacteriana revelado em radiação UV, através do corante Rodamina B a 0,001%. Para amilase, foi utilizado como substrato uma solução de amido a 1%, sendo o halo revelado com Lugol e para protease foi utilizado meio ágar-leite, contendo uma solução de leite em pó desnatado a 2%, sendo a revelação feita a olho nu, através do halo incolor entorno da colônia, conforme os protocolos de MALAJOVICH (1990; 2015) (Figura 1).

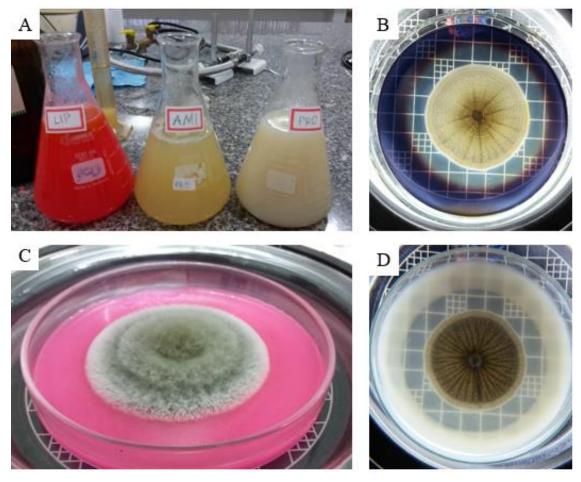


Figura 1. A: meios ainda não solidificados, enriquecidos com seus respectivos substratos, para verter sob placas de petri; B: placa de petri com meio BDA enriquecido com amido revelado halo enzimático com Lugol; C: placa de petri com meio BDA enriquecido com lipídeo, cor rosada devido ao corante Rodamina B; D: placa de petri com meio BDA enriquecido com proteína, halo enzimático incolor adjacente a colônia.

Os testes foram conduzidos em triplicata, sendo os fungos inoculados aos meios para o teste de atividade enzimática, por meio de fragmentos miceliais de 5 mm de diâmetro. As bactérias foram inoculadas utilizando-se 20 µL de cultura obtida a partir de caldo AN. Previamente as culturas bacterianas tiveram sua DO (densidade ótica) ajustada para valores semelhantes (de forma a serem inoculadas quantidades semelhantes de células para todos os isolados). A DO foi lida utilizando-se espectrofotômetro UV-VIS a 600nm. Os fragmentos miceliais fúngicos e os 20 µL de cultura bacteriana foram dispostos centralmente nas placas contendo os substratos de atividade.

Os dados dos índices enzimáticos obtidos para os diferentes isolados foram submetidos a ANOVA e teste de médias (Tukey a 5% de probabilidade e t). As análises foram conduzidas utilizando-se o software estatístico Sisvar (5.6). Os dados foram expressos em milímetros de halo enzimático obtido a partir da porção terminal da área de crescimento da colônia.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os isolados fúngicos apenas alguns mostraram atividade enzimática – FPAE5, FSCR4, FSCR5, FSCR6, FSCR8, FSCR9, FSCR11, FSCR15 -, entre eles, os fungos FSCR6, FSCR8, FSCR 9, FSCR11, FSCR15 demonstraram atividade enzimática, sendo esta verificada em meio enriquecido com amido e proteína; os demais - FPAE5, FSCR4 e FSCR5 tiveram atividade enzimática apenas no meio enriquecido com amido (Gráfico 1), no entanto em destaque para síntese enzimática se teve FSCR6 com 21mm para amilase e 15mm para protease, e FSCR8 com 17mm para amilase e 18mm para protease (Tabela 1).

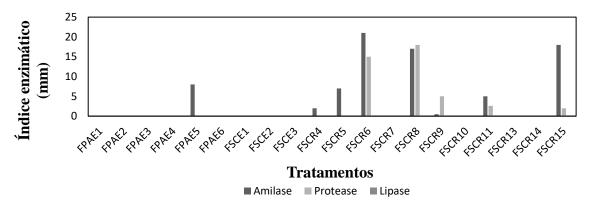


Gráfico 1. Índice enzimático (mm) observado para isolados fúngicos endofíticos e rizosféricos de *Hymenaea courbaril* amostrada no Pantanal - MS e na Serra de Caldas - GO. Abreviações: F (fungos), PA (Pantanal), SC (Serra de Caldas), E (endofíticos) e R (rizosféricos).

Tabela 1. Índice enzimático (mm) observado quantitativamente para isolados fúngicos endofíticos e rizosféricos de *Hymenaea courbaril* amostrada no Pantanal - MS e na Serra de Caldas - GO.

	Tr. 4	Índice Enzi	mático (mm)
	Tratamentos	Amilase	Protease
	FPAE1	0,0 I	0,0 F*
E	FPAE2	0,0 I	0,0 F
ĘĘ	FPAE3	0,0 I	0,0 F
Pantana	FPAE4	0,0 I	0,0 F
P	FPAE5	8,0 D	0,0 F
	FPAE6	0,0 I	0,0 F
	FSCE1	0,0 I	0,0 F
	FSCE2	0,0 I	0,0 F
Serra de Caldas	FSCE3	0,0 I	0,0 F
	FSCR4	2,0 G	0,0 F
	FSCR5	7,0 E	0,0 F
ᆽ	FSCR6	21,0 A	15,0 B
9	FSCR7	0,0 I	0,0 F
Q	FSCR8	17,0 C	18,0 A
Ľ	FSCR9	0,5 H	5,0 C
šei	FSCR10	0,0 I	0,0 F
01	FSCR11	5,0 F	2,6 D
	FSCR13	0,0 I	0,0 F
	FSCR14	0,0 I	0,0 F
	FSCR15	18,0 B	2,0 E

^{*}Médias seguidas pela mesma, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nos testes conduzidos com os isolados bacterianos, exceto as bactérias BPAE8, BSCE5, e BSCR12, todas elas produziram enzimas (Gráfico 2), no entanto, destacou-se a bactéria BSCE8 com 10mm para amilase e 5mm para protease; e a bactéria BSCE7 com 9mm para amilase e 4mm para protease, no entanto a bactéria BSCR14 também se destacou, mas apenas para amilase, com 9mm de halo enzimático e a BPAR26 apenas para protease 9mm (Tabela 2).

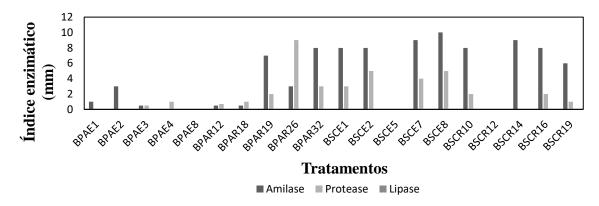


Gráfico 2. Índice enzimático (mm) observado para isolados bacterianos endofíticos e rizosféricos de *Hymenaea courbaril* amostrada no Pantanal - MS e na Serra de Caldas - GO. Abreviações: B (bactérias), PA (Pantanal), SC (Serra de Caldas), E (endofíticos) e R (rizosféricos).

Tabela 2. Índice enzimático (mm) observado quantitativamente para isolados bacterianos endofíticos e rizosféricos de *Hymenaea courbaril* amostrada no Pantanal - MS e na Serra de Caldas - GO.

		Índice Enzir	nático (mm)
	Tratamentos	Amilase	Protease
	BPAE1	1,0 G	0,0 I
	BPAE2	3,0 F	0,0 I
	BPAE3	0,5 H	0,5 H
13]	BPAE4	0,0 I	1,0 F
更	BPAE8	0,0 I	0,0 I
Pantana	BPAR12	0,5 H	0,7 G
P	BPAR18	0,5 H	1,0 F
	BPAR19	7,0 D	2,0 E
	BPAR26	3,0 F	9,0 A
	BPAR32	8,0 C	3,0 D
	BSCE1	8,0 C	3,0 D
2	BSCE2	8,0 C	5,0 B
g ₃	BSCE5	0,0 I	0,0 I
<u> </u>	BSCE7	9,0 B	4,0 C
•	BSCE8	10,0 A	5,0 B
þ	BSCR10	8,0 C	2,0 E
1.3	BSCR12	0,0 I	0,0 I
Serra de Caldas	BSCR14	9,0 B	0,0 I
•	BSCR16	8,0 C	2,0 E
	BSCR19	6,0 E	1,0 F

^{*}Médias seguidas pela mesma, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Conforme pesquisou STAMFORD (1998), suas tabelas (2 e 3) demonstraram isolados bacterianos com potenciais superiores aos aqui apresentados, onde uma bactéria do gênero *Bacillus* sp. apresentou um halo de 26mm, sendo o seu padrão (*Aspergillus oryzae* NRLL 2022) 46mm, a melhor aqui apresentada foi BSCE8 com 10mm de halo enzimático para amilase; para protease o melhor aqui apresentado foi BPAR26 com 9mm contra 5mm de uma bactéria do gênero *Staphylococcus* sp., embora que o padrão apresentado para protease tenha atingido 15mm (*Streptomyces fradiae* NRRL 1195), no entanto para os isolados fúngicos tivemos o FSCR6, apresentando 21mm para o índice enzimático em meio enriquecido com amido contra 19mm apresentado por *Nocardiopsis sp.*, sendo este o melhor fungo para atividade amilolítica tratado no trabalho de STAMFORD (1998); para protease, o fungo FSCR8 produziu 18mm, comparado com o melhor de STAMFORD (1998), que foi um fungo do gênero *Pithomyces* sp. que apresentou um halo enzimático a 12mm e também maior do que o fungo padrão testado no trabalho aqui comparado (*Streptomyces fradiae* NRRL 1195, 15mm) citado anteriormente.

Portanto, fungos rizosféricos obtidos de solo rizosférico de *H. courbaril* apresentaram potencial para produção de amilase consideravelmente superior ao potencial dos fungos endofíticos, no entanto para produção de protease, dados estatísticos não apresentaram diferença, porém há uma tendência para fungos rizosféricos (Gráfico 3).

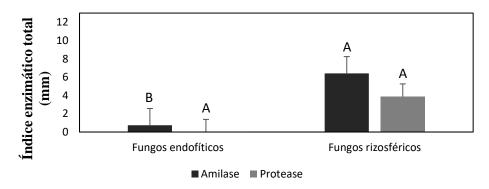


Gráfico 3. Índice enzimático total (mm) observado para todos os isolados fúngicos endofíticos e rizosféricos de *Hymenaea courbaril* amostrada no Pantanal - MS e na Serra de Caldas - GO. Abreviações: FR (fungos rizosféricos) e FE (fungos endofíticos). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si de acordo com o teste t a 5% de probabilidade.

Bem como observado para os isolados fúngicos, os isolados bacterianos rizosféricos apresentaram uma síntese enzimática superior ao potencial apresentado por isolados bacterianos endofíticos visualmente falando, mas estatisticamente não houve diferença (Gráfico 4).

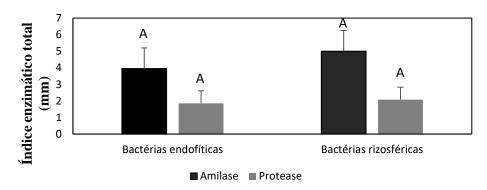


Gráfico 4. Índice enzimático total (mm) observado para todos os isolados bacterianos endofíticos e rizosféricos de *Hymenaea courbaril* amostrada no Pantanal - MS e na Serra de Caldas - GO. Abreviações: BR (bactérias rizosféricas) e BE (bactérias endofíticas). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si de acordo com o teste t a 5% de probabilidade.

Conforme HOPKINS (1995), a população de micro-organismos rizosféricos podem superar em até 50% as populações do solo adjacente, devido ao gradiente gerado pela exsudação de nutrientes, portanto supõe-se que tal diferença entre esses grupos de micro-organismos se dê devido à competição mais intensa no exterior dos tecidos radiculares dos vegetais, já que populações de micro-organismos não estão bem estabelecidas no ambiente rizosférico, logo eles devem ser mais flexíveis e eficientes para obtenção de nutrientes.

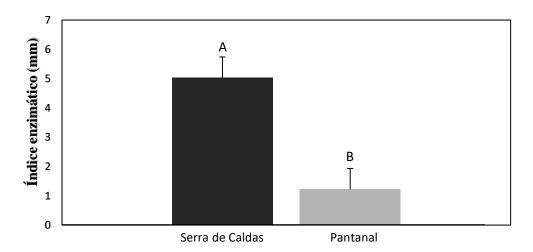


Gráfico 5. Índice enzimático total (mm) observado para todos os isolados entre biomas (Serra de Caldas - GO e Pantanal – MS). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si de acordo com o teste t a 5% de probabilidade.

É notável a discrepância de produção enzimática pela microbiota dos biomas, sendo que a Serra de Caldas apresentou micro-organismos mais aptos a produção de amilase e protease do que o Pantanal. Sabemos que micro-organismos rizosféricos e endofíticos são

favorecidos pela exsudação de nutrientes pelas raízes, e isto aumenta a interação da microbiota rizosférica com os vegetais (ANDREOTE e CARDOSO, 2016) e conforme citado anteriormente, também aumenta a competitividade entre micro-organismos. LORENZI (1998) afirma que vegetações secas são mais favoráveis para o desenvolvimento de *Hymenaea courbaril*, desenvolvimento este que também exsuda alguns nutrientes devido ao atrito da raiz com o solo durante seu crescimento (WILLADINO, 2005), além de que devido à alta umidade no solo do pantanal e o movimento de substratos devido as cheias, os nutrientes se encontram parcialmente dissolvidos, combinando tais informações, é possível explicar a diferença entre a capacidade de síntese enzimática da microbiota de cada ambiente.

Quando comparamos os grupos de micro-organismos, estes pareceram ser igualmente produtores de enzimas estatisticamente falando, todavia no Gráfico 5 é possível ver uma leve tendência para bactérias em relação a síntese de enzimas.

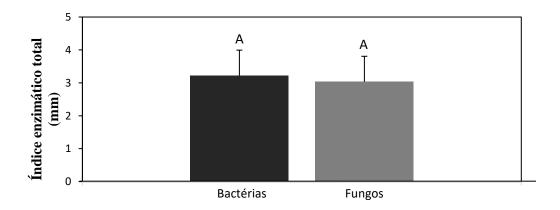


Gráfico 6. Índice enzimático total (mm) observado para isolados bacterianos e fúngicos endofíticos e rizosféricos de *Hymenaea courbaril* amostrada no Pantanal - MS e na Serra de Caldas - GO. Abreviações: B (bactérias) e F (fungos). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si de acordo com o teste t a 5% de probabilidade.

Portanto, deve-se levar em conta a quantidade de isolados fúngicos e suas taxas de produção, pois mesmo que possuam um desenvolvimento mais lento em relação aos isolados bacterianos, ambos se mostram interessantes para produção de enzimas. Além de que, sob aspectos biotecnológicos, conhecendo-se as reais exigências nutricionais, de temperatura e pH dos micro-organismos em questão, seria possível o desenvolvimento de protocolos para crescimento e síntese enzimática em escala industrial.

Em relação a porcentagem total de fungos e bactérias que apresentaram atividade enzimática, teve-se que 40% dos isolados fúngicos foram capazes de produzir amilase e 25% protease, enquanto que entre os isolados bacterianos 80% produziram amilase e 70% protease,

porém, com relação a lipases, nenhum dos isolados testados, tanto fúngicos como bacterianos demonstrou capacidade para a síntese de altas concentrações de enzimas desta classe. (Gráfico 6).

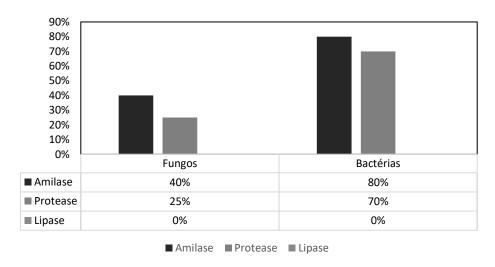


Gráfico 7. Porcentagem total de micro-organismos que demonstraram atividade enzimática e seus respectivos valores.

SILVA (2015) cita em seu trabalho, pesquisas para produção de amilases, com um percentual de 56,4 a 88,6% de micro-organismos rizosféricos apresentando atividade enzimática, isso pode ser explicado devido à grande presença de amido como fonte de reserva que se tem nas raízes, caules e frutos dos vegetais, que estão constantemente caindo e degradando-se sob o solo (NUNEZ-SANTIAGO, 2004), gerando características a microbiota do solo. De acordo com SOUZA (2008) dentre os isolados fúngicos pesquisados, 40% produziram amilases. TIGGEMEN (2015), obteve 180 isolados de diversas fontes, como por exemplo, óleo de oliva, requeijão, extrato de tomate, farelo e óleo de soja, creme de leite e carne, onde 12,2% produziram amilases e 17,2% produziram proteases, isto significa que a fonte de coleta de micro-organismos é relevante para a quantidade total de isolados capazes de produzir as enzimas em questão. Tratando-se de lipases, onde a expressão foi nula, esses dados entram de acordo com o verificado por DAKORA e PHILLIPS (2002). Estes, explicaram que entre enzimas e compostos orgânicos e inorgânicos exsudados por vegetais, obtidos na rizosfera de várias espécies, não são observados lipídeos e lipases, por outro lado, amilases e proteases são observadas.

5. CONCLUSÕES

A microbiota endofítica radicular e rizosférica amostrada, mostraram potencial para produção de amilases e proteases, no entanto para lipases, o potencial foi nulo;

Tanto isolados fúngicos quanto bacterianos amostrados tiveram maior potencial para produção de amilase do que protease;

Este trabalho corrobora com a hipótese de que no solo a quantidade de compostos lipídicos é irrisória;

Micro-organismos da rizosfera de *Hymenaea courbaril* (Jatobá) amostrada no Cerrado foram mais eficientes em termos de síntese enzimática que micro-organismos da rizosfera da mesma planta amostrada no Pantanal;

Os micro-organismos rizosféricos testados apresentaram maior potencial para síntese enzimática do que os endofíticos.

6. REFERÊNCIAS

ABRAHÃO NETO, J. Algumas aplicações de enzimas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.;

ANDREAUS, J.; CAVACO-PAULO, A. Enzimas no processamento de fibras têxteis. In:

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. A.; CORVO, M. L. (Eds.). Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, p. 179-204, 2008.

ANDREOTE, F.; CARDOSO, E. Microbiologia do solo. 2.ed. Piracicaba: ESALQ, 2016.

ANDREOTE, F.D.; GUMIERE, T.; DURRER, A. **Exploring interactions of plant microbiomes**. Scientia Agricola, Piracicaba, v. 71, n. 6, p. 528-539, 2014.

BALDANI, J. I. et al. **Recent advances in BNF with non-legume plants**. Soil Biology and Biochemistry, v. 29, n. 5-6, p. 911-922, 1997.

BALDANI, V. L. D. et al. **Burkholderia brasilensis sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica**. ANAIS-ACADEMIA BRASILEIRA DE CIENCIAS, v. 69, p. 116-116, 1997.

CAMPOS, M. A. A.; UCHIDA, T. Influência do sombreamento no crescimento de mudas de três espécies amazônicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 3, p. 281-288, 2002.

CAVALCANTI, R. B. Ações prioritárias para a conservação da biodiversidade do Cerrado e Pantanal. Conservation International do Brasil, Belo Horizonte, 1999.

DA SILVA, Cintia Faria et al. Multifunctional potential of endophytic and rhizospheric microbial isolates associated with Butia purpurascens roots for promoting plant growth. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 111, n. 11, p. 2157-2174, 2018.

DAKORA, F. D.; PHILLIPS, D. A. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. In: **Food Security in Nutrient-Stressed Environments: Exploiting Plants' Genetic Capabilities**. Springer, Dordrecht, p. 201-213, 2002.

DO AMARAL FILHO, Z. P. Solos do Pantanal mato-grossense. ARA" BOOCK, p. 91, 1986.

GIESE, E. C. Produção de betaglucanases por *Trichoderma harzianum* Rifai para obtenção de glucooligossacarídeos a partir de botriosferana. 2008. 138 f. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho, 2008.

GRAYSTON, S. J. et al. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 3, p. 369-378, 1998.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. **Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth.** Trends in microbiology, v. 16, n. 10, p. 463-471, 2008.

HOPKINS, W. G.; HUNER, N. P. Introduction to plant physiology. New York: John Willey and Sons. 1995.

IBGE. **Mapa de Biomas e de Vegetação**. 2004. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm Acesso em: 16 set. 2019.

ITOH, T. et al. Use of shed snake skin as a model membrane for in vitro percutaneous penetration studies: comparison with human skin. Pharmaceutical research, v. 7, n. 10, p. 1042-1047, 1990.

KLEIN, A. L. Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois. Unesp, 2000.

LANGENHEIM, J. H; LEE, Y. T.; Systematics of the genus Hymenaea L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae). University of California Press, 1975.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2.ed. **Nova Odessa**: Instituto Plantarum, v.1. 352p. 1998.

LUZ, J. S. et al. Atividade enzimática de fungos endofíticos e efeito na promoção do crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo. Revista Caatinga, v. 19, n. 2, p. 128-134, 2006.

MALAJOVICH M.A. **Meio de ágar-amido**. Guia nº 78. Disponível em: https://bteduc.com/guias/78_Preparacao_do_meio_de_agar-amido.pdf. Acesso em: 15 set. 2019.

MALAJOVICH M.A. **Meio de ágar-leite**. Guia nº 79. Disponível em: https://bteduc.com/guias/79_Preparacao_do_meio_de_agar-leite.pdf. Acesso em: 24 nov. 2019.

MALAJOVICH M.A. **Solução de amido**. Guia nº 57. Disponível em: https://bteduc.com/guias/57_Solucao_de_amido.pdf. Acesso em: 15 set. 2019.

MICHELIN, M. Estudo da glucoamilase e da alfa-amilase produzidas pelo fungo *Paecilomyces variotii*: purificação, caracterização bioquímica e relações filogenéticas. 2005. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MOTTA V. T. **Bioquímica Clínica para o Laboratório**: Princípios e Interpretações. Rio de Janeiro: Medbook, 2009.

NOGUEIRA, R. T. et al. Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. stilbocarpa. **Phytochemistry**, v. 58, n. 8, p. 1153-1157, 2001.

NUNEZ-SANTIAGO, M. C.; BELLO-PEREZ, Luis Arturo; TECANTE, A. Swelling-solubility characteristics, granule size distribution and rheological behavior of banana (*Musa paradisiaca*) starch. **Carbohydrate polymers**, v. 56, n. 1, p. 65-75, 2004.

ORLANDELLI, R. C. et al. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. SaBios-Revista de Saúde e Biologia, v. 7, n. 3, 2012.

PAIVA, C. L. A.; SÁ-PEREIRA, P. A aplicação da Biologia Molecular no aprimoramento da produção de enzimas. SaBios: Rev. Saúde e Biol., v.7, n.3, p.97-109, set.-dez., 2012

PANDEY, A. et al. Advances in microbial amylases. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 31, p. 135-152, 2000.

PARMAR, N.; DADARWAL, K. R. Stimulation of nitrogen fixation and induction of flavonoid-like compounds by rhizobacteria. **Journal of applied Microbiology**, v. 86, n. 1, p. 36-44, 1999.

POLIZELI, M. L. T. M.; JORGE, J. A.; TERENZI, H. F. Pectinase production by *Neurospora crassa*: purification and biochemical characterization of extracellular polygalacturonase activity. Journal of General Microbiology, London, v. 137, n. 8, p. 1815-1823, ago. 1991.

POTT, A.; ADÁMOLI, J. Unidades de vegetação no Pantanal dos Paiaguas. 1996.

POTT, A.; DA SILVA, J.S.V. Terrestrial and aquatic vegetation diversity of the Pantanal wetland. In: **Dynamics of the Pantanal Wetland in South America**. Springer, Cham, 2015. p. 111-131.

RAO, M. B. et al. "Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases." **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**. vol. 62,3 (1998): 597-635.

ROCHA, C. P. Otimização da produção de enzimas por Aspergillus niger em fermentação em estado sólido. 2010. Dissertação de mestrado. Uberlândia/MG.

SANT'ANNA JUNIOR, G. L. **Produção de enzimas microbianas**. LIMA, UA; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). Biotecnologia industrial-processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, p. 351-362, 2001.

SICILIANO, S. D. et al. Differences in the microbial communities associated with the roots of different cultivars of canola and wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 844-851, 1998.

SILVA, V. M. A. et al. Atividade enzimática de actinobactérias do semiárido. **Rev. Bras. Geofís**, v. 8, p. 560-572, 2015.

SILVEIRA, E. B. **Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças.** Proteção de plantas na agricultura sustentável. Recife: UFRPE, p. 71-100, 2001.

SIM, Y. C.; NAM, Y. S.; SHIN, E.; KIM, S.; CHANG, I. S.; RHEE, J. S. **Proteolitic enzyme conjugated to SC-glucan as transdermal drug penetration enhancer**. Pharmazie, Berlin, v. 58, n. 4, p. 252-256, abr. 2003.

SOARES, V. F.; FERREIRA, V. S.; BON, E. P. S. 1999. Produção de Proteases de *Bacillus subtilis* usando óleo de soja como fonte de carbono. In: 4º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. Resumos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 98pp.

SOUZA, H. Q.; DE OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 116-124, 2008.

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

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R. Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. **Soil and Tillage Research**, v. 72, n. 2, p. 107-123, 2003.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. Natural product reports, v. 18, n. 4, p. 448-459, 2001.

TARAFDAR, J. C.; KUMAR, R. The role of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi on crop, tree and grasses grown in an arid environment. Journal of Arid Environments, v. 34, n. 2, p. 197-203, 1996.

TIGGEMEN, L. et al. Seleção de micro-organismos para diferentes sistemas enzimáticos. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 1545-1550, 2015.

TREMACOLDI, C. R. Proteases e Inibidores de Proteases na Defesa de Plantas Contra Pragas. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2009.

VITOLO, M. Aplicações de enzimas na tecnologia de alimentos. **Biotecnologia industrial:** biotecnologia na produção de alimentos. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, v. 4, p. 387-420, 2001.

WILLADINO, L. et al. Sistema vascular e exsudatos radiculares. Michereff SJ, Andrade GT, Menezes M. Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. Recife: Imprensa Universitária, p. 19-40, 2005.