

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

VICTOR HUGO SOUTO BEZERRA

**PRODUÇÃO DE PROTEASES POR FUNGOS ENDOFÍTICOS: UMA REVISÃO  
SISTEMÁTICA**

BRASÍLIA-DF

2021

VICTOR HUGO SOUTO BEZERRA

PRODUÇÃO DE PROTEASES POR FUNGOS ENDOFÍTICOS: UMA REVISÃO  
SISTEMÁTICA

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<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Paula Monteiro  
de Souza

BRASÍLIA-DF

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.

#### Catálogo da Publicação

BB574p Bezerra, Victor Hugo Souto  
Produção de proteases por fungos endofíticos: uma revisão sistemática / Victor Hugo Souto Bezerra; orientador Paula Monteiro de Souza. -- Brasília, 2021.  
87 p.

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

1. Proteases. 2. produção. 3. purificação. 4. fungos endofíticos. 5. proteases fibrinolíticas. I. Souza, Paula Monteiro de , orient. II. Título.

VICTOR HUGO SOUTO BEZERRA

PRODUÇÃO DE PROTEASES POR FUNGOS ENDOFÍTICOS: UMA REVISÃO  
SISTEMÁTICA

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: 29 de novembro de 2021.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dra. Paula Monteiro de Souza

Universidade de Brasília – UnB

---

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior

Universidade de São Paulo – USP

---

Prof. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

A todos os meus familiares e amigos, em especial aos meus avós, que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui e por acreditarem neste sonho junto comigo.

Aos meus amigos de Laboratório, agradeço por todos os momentos de descontração e ensinamentos passados. E agradeço também aos demais professores e funcionários do Laboratório de Produtos Naturais/UnB-FS e do Laboratório de Controle da Qualidade de Medicamentos/UnB por todo apoio durante tantos anos.

Um agradecimento especial a minha orientadora, Professora Dr<sup>a</sup> Paula Souza, por acreditar na minha capacidade, por toda ajuda, paciência e compreensão, não só durante a realização deste trabalho, como também, em outros projetos que realizei sob sua orientação durante a graduação.

Agradeço a Universidade de Brasília/UnB, por me formar como profissional e como cidadão. Serei eternamente grato por ter tido a oportunidade de ter passado por essa universidade.

E por fim, a CAPES pelo apoio financiando a bolsa de mestrado.

A todos meu muito obrigado!

*“Ninguém nasceu no topo da montanha e a escalada sempre vai ser árdua. Somente aquele que resistir ao processo, vai ter direito a vista mais fantástica”*

***Tribo da Periferia***

## RESUMO

As proteases são produzidas por quase todos os organismos vivos e são responsáveis por catalisar a quebra das ligações peptídicas de proteínas em aminoácidos e peptídeos. Nas indústrias, as proteases são utilizadas para a produção de alimentos, insumos farmacêuticos, detergentes, alimentos para animais, produtos químicos e fotografia. Os fungos endofíticos são definidos como microrganismos que habitam os tecidos internos das plantas de forma simbiótica, ou seja, sem causar nenhum mal aparente. Nos últimos anos, os fungos endofíticos mostraram-se como uma fonte de grande potencial para a produção de metabolitos secundários com promissoras aplicações. O objetivo desta revisão sistemática foi identificar na literatura disponível sobre a produção, purificação e caracterização de proteases por fungos endofíticos. Existem poucos estudos completos que exibam inteiramente a produção, caracterização e purificação de proteases de fungos endofíticos. Este estudo seguiu os itens do *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews* (PRISMA) e a pesquisa foi realizada em cinco bancos de dados: *PubMed*, *PMC*, *Science Direct*, *Scopus Articles* e *Web of Science* até o dia 10 de setembro de 2021, sem limitações quanto ao ano de publicação ou idioma. A metodologia dos estudos selecionados foi avaliada por meio da ferramenta adaptada GRADE (*Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation*). Produção, otimização, purificação e caracterização de protease foram os principais resultados avaliados. Dos 6028 estudos inicialmente reunidos, 15 preencheram os critérios de inclusão após um processo de seleção em duas etapas. Apenas dois estudos otimizaram a composição do meio usando projeto estatístico para produção de protease aumentada e dois relataram processos completos de purificação e caracterização da enzima. O gênero *Penicillium* foi o mais citado entre os onze diferentes gêneros de fungos endofíticos avaliados nos artigos selecionados, seguido por *Aspergillus*, *Alternaria* e *Xylaria*. Seis estudos comprovaram a capacidade de alguns fungos endofíticos de produzirem proteases fibrinolíticas, demonstrando que os fungos endofíticos podem ser explorados como produtores de proteases fibrinolíticas para posterior produção de agentes usados na terapia trombolítica. No entanto, mais estudos de caracterização e físico-química são necessários para avaliar o real potencial dos fungos endofíticos como fontes de enzimas industriais.

**Palavras-chave:** Proteases, produção, purificação, fungos endofíticos, proteases fibrinolíticas.

## ABSTRACT

Proteases are produced by almost all living organisms and are responsible for catalyzing the breaking of peptide bonds of proteins into amino acids and peptides. In industries, proteases are used in the production of food, pharmaceutical ingredients, detergents, animal feed, chemicals, and photography. Endophytic fungi are defined as microorganisms that inhabit the internal tissues of plants in a symbiotic way without causing any apparent harm. In recent years, endophytic fungi have shown themselves to be a source of great potential to produce secondary metabolites with promising applications. The purpose of this systematic review was to identify the available literature of production, purification, and characterization of proteases by endophytic fungi. There are few complete studies that entirely exhibit production, characterization, and purification of proteases from endophytic fungi. This study followed the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews (PRISMA), and the search was conducted on five databases: PubMed, PMC, Science Direct, Scopus Articles and Web of Science up until September 10th, 2021, with no time or language restrictions. The methodology of the selected studies was evaluated using GRADE. Protease production, optimization, purification, and characterization were the main evaluated outcomes. Of the 6028 initially gathered studies, 15 met the inclusion criteria after a two-step selection process. Only two studies optimized the medium composition using statistical design for enhanced protease production and two reported the total process of purification and characterization of the enzyme. The genus *Penicillium* was the most cited among the eleven different genera of endophytic fungi evaluated in the selected articles, followed by *Aspergillus*, *Alternaria* and *Xylaria*. Six studies proved the ability of some endophytic fungi to produce fibrinolytic proteases, demonstrating that endophytic fungi can be exploited as producers of fibrinolytic proteases for further production of agents used in thrombolytic therapy. However, further characterization and physicochemical studies are required to evaluate the real potential of endophytic fungi as sources of industrial enzymes.

**Keywords:** Proteases, production, purification, endophytic fungi, fibrinolytic proteases.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação do mecanismo geral de ação das proteases. As proteases quebram proteínas por uma reação de hidrólise (12). .....	15
<b>Figura 2:</b> Aplicação terapêutica geral de proteases. Fonte: próprio autor .....	28
<b>Figura 3:</b> Procedimento para preparação de amostras e isolamento de endófitos. Fonte: próprio autor .....	35
<b>Figura 4:</b> Fluxograma de pesquisa de literatura e critérios de seleção adaptados de PRISMA (163). .....	46

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Exemplos de proteases produzidos por fungos por meio de processo fermentativo em estado sólido. ....	20
<b>Tabela 2:</b> Exemplos de proteases produzidos por fungos por meio de processo fermentativo submerso. ....	21
<b>Tabela 3:</b> Fungos endofíticos produtores de enzimas de interesse industrial .....	32
<b>Tabela 4:</b> Metodologias empregadas para isolamento de fungos endofíticos.....	34
<b>Tabela 5:</b> Resumo das características descritivas dos trabalhos incluídos (n=15).....	48
<b>Tabela 6:</b> Resumo das etapas de purificação, caracterização e propriedades cinéticas das proteases de fungos endofíticos. ....	57
<b>Tabela 7:</b> Risco de viés com base em critérios adaptados do GRADE (165). ....	59

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	15
2.1. Proteases.....	15
2.2. Classificação .....	16
2.3. Fontes de proteases .....	17
2.4. Produção de Protease .....	18
2.5. Aplicação industrial de proteases .....	23
2.5.1. Indústria de detergente.....	23
2.5.2. Indústria de alimentos.....	24
2.5.3. Indústria de couro.....	25
2.5.4. Aplicação terapêutica das proteases.....	26
2.6. Fungos Endofíticos.....	29
2.6.1. Capacidade dos fungos endofíticos em produzir compostos bioativos .....	30
2.6.2. Isolamento de fungos endofíticos .....	33
2.6.3. Identificação de fungos endofíticos .....	35
2.7. Métodos de triagem ( <i>screening</i> ) para avaliar a produção de proteases por fungos ...	37
2.7.1. <i>Screening</i> em meio de cultura sólido .....	37
2.7.2. <i>Screening</i> em meio de cultura líquido.....	38
2.7.3. Método de Gel Dot-Blot.....	39
2.8. Purificação de proteases de fungos .....	39
3. OBJETIVOS .....	41
3.1. Objetivo geral .....	41
3.2. Objetivos específicos .....	41
4. MÉTODOS.....	42
4.1. Estratégias de busca e fontes de informação.....	42
4.2. Seleção dos estudos.....	42
4.3. Critérios de elegibilidade .....	43
4.4. Critérios de exclusão.....	43
4.5. Processo de coleta de dados .....	43
4.6. Risco de viés em estudos individuais.....	44
5. RESULTADOS.....	45
5.1. Seleção dos trabalhos .....	45
5.2. Características dos estudos.....	45

5.3.	Síntese dos resultados .....	47
5.3.1.	Microrganismos.....	47
5.3.2.	Otimização da produção de protease .....	47
5.3.3.	Condições de cultivo.....	51
5.3.4.	Ensaio para quantificação de protease.....	51
5.3.5.	Caracterização enzimática.....	52
5.3.5.1.	<i>pH ótimo e temperatura ótimos</i> .....	52
5.3.5.2.	<i>Inibidores</i> .....	53
5.3.5.3.	<i>Massa molecular</i> .....	53
5.3.5.4.	<i>Sequência de aminoácidos N-Terminal</i> .....	54
5.3.5.5.	<i>Parâmetros cinéticos</i> .....	54
5.3.5.6.	<i>Ponto Isoelétrico</i> .....	54
5.3.5.7.	<i>Termoestabilidade</i> .....	54
5.3.6.	Purificação .....	55
5.4.	Risco de viés .....	58
6.	DISCUSSÃO .....	60
7.	LIMITAÇÕES.....	66
8.	CONCLUSÃO .....	67
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	68
	Anexo 1: Estratégias de busca com palavras-chave e termos MeSH apropriados.....	86
	Anexo 2: Artigos excluídos e razões para exclusão (n=55). .....	87

## 1. INTRODUÇÃO

O mercado mundial de enzimas é dividido em dois setores: o das enzimas industriais que representam 58% do mercado, e o das chamadas enzimas especiais, tais como, enzimas terapêuticas e aquelas destinadas para diagnósticos e pesquisas que representam 42% do mercado (1). A grande eficiência das enzimas, aliada à sua alta especificidade, as tornam agentes de grande potencial tanto para uso industrial como para uso terapêutico (2). As enzimas podem ser extraídas de plantas, animais e microrganismos. Os microrganismos são cada vez mais utilizados como produtores de enzimas, uma vez que enzimas oriundas de animais e plantas não são o suficiente para atender a demanda mundial (3).

As proteases são enzimas que pertencem a classe das hidrolases e são responsáveis por catalisar a hidrólise de ligações peptídicas de proteínas. A importância deste grupo de enzimas, rico em mecanismos de ação e variedade estrutural, mostra o valor das proteases uma vez que são aplicadas em diversos processos industriais, sendo uma das enzimas mais utilizadas industrialmente. Em 2015, as proteases representavam cerca de 27,6% do mercado global de enzimas, atrás somente das carboidrases que representavam 47,8%. Até 2024, acredita-se que o mercado mundial de enzimas movimentará cerca de 17,2 bilhões de dólares, sendo as proteases responsáveis por 4,69 bilhões (1, 4, 5).

Os microrganismos endofíticos são definidos como microrganismos que habitam nos tecidos internos das plantas sem causar nenhum mal aparente (6). Entre esses microrganismos estão os chamados fungos endofíticos. Quando comparado com outros microrganismos endofíticos, os fungos produzem uma gama maior de compostos ativos e esses compostos possuem uma ampla atividade biológica, como por exemplo: antibióticos, imunossuppressores, anticancerígenos, entre outros (7).

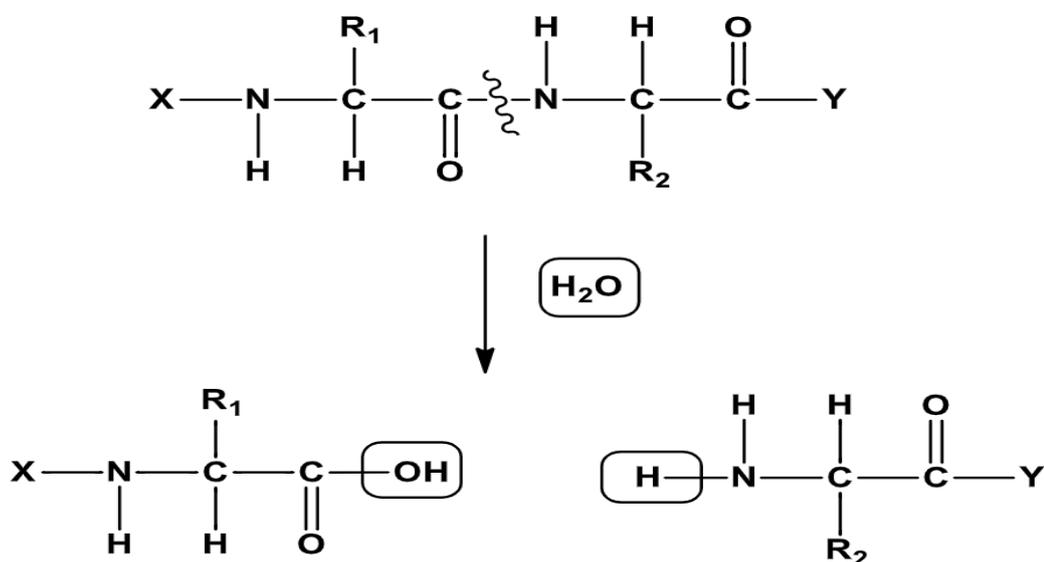
Atualmente, há um movimento mundial em busca de novos meios de produção de princípios ativos obtidos por processos biotecnológicos. Nesse contexto, fungos endofíticos têm sido explorados em sua diversidade biológica como novas fontes de enzimas. Portanto, o isolamento e identificação de fungos endofíticos, o reconhecimento de potenciais produtores de proteases e o estudo das características

dessas enzimas têm se tornado importantes devido ao grande potencial biotecnológico dos fungos endofíticos como fontes de novas proteases que podem ser úteis para indústrias especializadas. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar e identificar na literatura disponível o estado atual de produção, caracterização e purificação de proteases por fungos endofíticos.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Proteases

O uso exacerbado de diferentes produtos químicos nas indústrias ao redor do mundo aumentou a demanda por enzimas industriais, principalmente pela necessidade de novos processos industriais que sejam sustentáveis para minimizar os efeitos no meio ambiente e na saúde dos indivíduos. Com o avanço da tecnologia, grande parte das enzimas de interesse industrial e farmacêutico começaram a ser produzidas em larga escala (8, 9). Proteases são enzimas cuja função catalítica é hidrolisar ligações peptídicas de proteínas em aminoácidos e peptídeos (Figura 1). Elas fazem parte de um grande grupo de enzimas pertencentes à classe das hidrolases (10) e estão entre os três grandes grupos de enzimas industriais e por isso são estudadas extensivamente (11).



**Figura 1:** Representação do mecanismo geral de ação das proteases. As proteases quebram proteínas por uma reação de hidrólise (12).

As proteases são produzidas por todos os organismos vivos (plantas, animais e microrganismos) sejam intracelulares ou extracelulares (13). Elas realizam uma grande variedade de funções fisiológicas e patológicas, como por exemplo, regulam a atividade de muitas proteínas, controlam crescimento e migração celular, coagulação sanguínea, crescimento de tumores e metástase, colaboram para o processo inflamatório, modulam interações proteína-proteína, ativam zimogênios (precursores enzimáticos inativos) e traduzem e amplificam sinais moleculares (14, 15). Geralmente, as proteases extracelulares hidrolisam grandes moléculas em moléculas menores para posterior absorção pelas células enquanto as proteases intracelulares desempenham funções para a regulação do metabolismo. Além das funções fisiológicas em organismos vivos, as proteases tornaram-se extremamente úteis para muitas aplicações industriais (16-19).

A catálise de proteínas realizada em indústrias pode ser feita quimicamente ou enzimaticamente. A hidrólise proteica usando processos químicos é geralmente mais difícil de ser controlada e pode gerar aminoácidos modificados indesejáveis (13). Uma ótima alternativa ao processo químico é o uso de enzimas para catalisar proteínas. As enzimas são moléculas biocatalisadoras utilizadas nas indústrias como alternativa segura e ecológica ao uso de produtos químicos, pois apresentam diversas vantagens, como eficiência, seletividade, capacidade de trabalhar em diferentes condições de pH e temperatura (20, 21).

## **2.2. Classificação**

As proteases são classificadas de acordo com a homologia na sequência de aminoácidos, considerando principalmente a estrutura terciária da proteína e os seus sítios catalíticos. Dessa forma, as proteases podem ser classificadas em aspártico, cisteína, glutâmica, metalo, asparagina, serina, treonina e proteases com mecanismo catalítico não reconhecido. Dentro de cada classe, as proteases são divididas em famílias de acordo com a homologia significativa na sequência de aminoácidos do tipo de enzima da família de cada protease. Como exemplo podemos citar a papaína, uma protease pertencente a classe da cisteína classificada na família C1 (22).

As proteases também são classificadas de acordo com sua faixa de pH ideal em proteases ácidas, neutras ou alcalinas. As proteases ácidas funcionam melhor em faixas de pH mais baixas (pH 2 - 6) e são amplamente utilizadas na indústria alimentícia. As proteases neutras atuam em faixas de pH entre 5 e 8 e são utilizadas na indústria alimentícia. Por último, as proteases alcalinas são eficazes em valores de pH elevados (pH 8 - 12). Dentre os três tipos de proteases, as proteases alcalinas se destacam pelo amplo uso em diversas indústrias como alimentícia, têxtil, couro e farmacêutica. (13, 23, 24).

### **2.3. Fontes de proteases**

As proteases podem ser produzidas e extraídas de plantas, animais e microrganismos. No passado, os animais eram a única fonte de extração de enzimas. Os animais eram abatidos e as enzimas recuperadas para serem utilizadas nas indústrias. Atualmente, os microrganismos representam cerca de dois terços da produção mundial de proteases, tornando-os uma das principais fontes produtoras. Em 2019, as enzimas produzidas por microrganismos representaram cerca de 85% do mercado mundial de enzimas (1). A síntese de proteases pelas plantas depende de vários fatores externos, como clima, tempo e espaço de cultivo. Alguns exemplos de proteases extraídas de plantas são papaína, bromelina, ficina e queratinases. Os animais são capazes de produzir grandes quantidades de protease e de uma forma muito pura. Porém, a extração de proteases por animais é regida por questões políticas, já que depende do abate dos animais. Os animais são responsáveis pela produção de proteases como pepsinas, renina, tripsina pancreática e quimiotripsina (25).

Com o aumento da demanda, as proteases de plantas e animais não estão sendo suficientes para atender ao mercado global e, por isso, os microrganismos são mais utilizados, principalmente porque podem ser cultivados em larga escala em um tempo relativamente curto. Além disso, baixo custo de produção, alto rendimento e rápido crescimento sem depender de fatores externos como clima e questões geográficas favorecem o uso de microrganismos para a produção de proteases. A

otimização dos processos de fermentação juntamente com a produção de enzimas por cepas de microrganismos selecionados tornou possível a produção em larga escala de proteases muito mais puras e bem caracterizadas (17, 26, 27).

A produção de proteases por fungos tem crescido nos últimos anos devido à grande variedade de enzimas produzidas e à fácil separação dos micélios dos meios de cultura quando comparados às bactérias. Proteases produzidas por fungos são conhecidas por terem atividade em uma ampla faixa de pH (pH 4 a 11) e por ter uma alta especificidade com substratos (28). Além disso, os fungos são geralmente considerados como microrganismos GRAS (do inglês, *generally recognized as safe*) e as proteases produzidas são principalmente extracelulares, o que facilita a remoção da enzima do caldo de fermentação (29). Atualmente, os fungos são responsáveis por 60% das enzimas utilizadas nas mais diversas indústrias (13).

Uma variedade de espécies de fungos é conhecida por serem grandes fontes de proteases ativas e funcionais. As cepas mais utilizadas para a produção de proteases industriais são do gênero *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Trichoderma* (25, 30). O gênero *Aspergillus* é conhecido por produzir uma grande quantidade de enzimas extracelulares e essas enzimas são frequentes utilizadas nas indústrias há muito tempo (31). Como exemplo de espécies do gênero *Aspergillus* podemos citar *Aspergillus flavus* (32-34), *Aspergillus niger* (35, 36), *Aspergillus oryzae* (37, 38), entre outros.

## **2.4. Produção de Protease**

Diferentes produtos utilizados nas indústrias alimentícias, química e farmacêuticas são obtidos através de procedimentos fermentativos. A fermentação pode ser definida como a formação de produtos através de processos anaeróbicos cujo objetivo final é a produção de energia, ou seja, a fermentação é uma maneira de se extrair energia de moléculas orgânicas e é um artifício metabólico comum de todos os organismos vivos. Porém, uma definição mais atualizada de fermentação compreende a formação de compostos menores, que pode ser feita de maneira tanto aeróbica quanto anaeróbica. Hoje, a fermentação industrial abrange qualquer

processo industrial utilizado para a produção de um composto conduzido por microrganismos (bactérias, leveduras e fungos) com a formação de um bioproduto desejado, como por exemplo enzimas de interesse industrial (39).

A produção de protease por microrganismos pode ser feita por duas técnicas de fermentação: fermentação submersa (FS) e fermentação em estado sólido (FES). Ambas as técnicas irão influenciar o crescimento microbiano e a produção de enzimas (40). A diferença entre os dois meios de fermentação está na quantidade de água disponível no meio. Na FS, os microrganismos crescem em um meio líquido predefinido com alta disponibilidade de água livre. A FS permite maior controle dos parâmetros físicos (aeração, pH e temperatura) durante o processo de fermentação e fácil recuperação de biomassa e enzimas extracelulares. Na FES o cultivo do microrganismo é feito sobre um material sólido na ausência de água ou em quantidades muito pequenas. A FES apresenta algumas vantagens sobre a fermentação submersa, como por exemplo, a possibilidade de utilizar resíduos agroindustriais como substrato tornando o processo mais barato, demanda menos espaço e energia, e formação de produtos altamente concentrados que facilitam o processamento posterior (13, 24, 41, 42). Na literatura existem diferentes trabalhos sobre a produção de proteases por fungos tanto por FS quanto por FES, como mostrado na Tabela 1 e 2.

**Tabela 1:** Exemplos de proteases produzidos por fungos por meio de processo fermentativo em estado sólido.

Fungo	Fermentação	Tipo de protease	Referência
<i>Penicillium sp.</i>	FES	serino protease	(43)
<i>Aspergillus oryzae</i>	FES	protease alcalina	(44)
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	FES	protease ácida	(44)
<i>Penicillium roquefortii</i>	FES	protease alcalina	(44)
<i>Aspergillus flavipes</i>	FES	protease alcalina	(44)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	FES	serino protease alcalina	(45)
<i>Eupenicillium javanicum</i>	FES	metaloprotease	(46)
<i>Mucor subtilissimus</i>	FES	serino protease	(47)
<i>Aspergillus sydowii</i>	FES	serino protease	(48)
<i>Aspergillus flavus</i>	FES	-	(49)
<i>Engyodontium album</i>	FES	protease alcalina	(50)
<i>Penicillium sp.</i>	FES	protease alcalina	(51)
<i>Pleurotus eryngii</i>	FES	serino protease	(52)
<i>Aspergillus niger</i>	FES	protease ácida	(53)

**Tabela 2:** Exemplos de proteases produzidos por fungos por meio de processo fermentativo submerso.

<b>Fungo</b>	<b>Fermentação</b>	<b>Tipo de protease</b>	<b>Referência</b>
<i>Aspergillus terreus</i> gr.	FS	protease alcalina	(54)
<i>Thermomucor indiciae-seudaticae</i>	FS	protease ácida	(55)
<i>Mucor mucedo</i>	FS	protease aspártica	(56)
<i>Penicillium griseofulvum</i>	FS	-	(57)
<i>Hirsutella rhossiliensis</i>	FS	serino protease	(58)
<i>Beauveria</i> sp.	FS	serino protease	(59)
<i>Myceliophthora</i> sp.	FS	protease alcalina	(60)
<i>Aspergillus awamori</i>	FS	protease ácida	(61)
<i>Aspergillus tamarii</i>	FS	-	(62)
<i>Lentinus crinitus</i> (L.)	FS	proteases ácidas	(63)
<i>Aspergillus oryzae</i>	FS	-	(64)
<i>Aspergillus foetidus</i>	FS	proteases ácidas	(65)

Os componentes do meio de fermentação, como as fontes de carbono e nitrogênio, têm grande influência na síntese de proteases por microrganismos. Fatores físicos e químicos como pH, temperatura, tempo de incubação, agitação e íons metálicos também exercem efeitos regulatórios na produção de proteases. A maneira como cada fungo se comporta diante desses fatores é individual, uma vez que não existe um meio de cultivo específico e bem definido para a produção de protease (17).

Diferentes fontes de carbono e nitrogênio são utilizadas para a síntese de proteases por fungos. Diversos trabalhos, principalmente os que realizam fermentação em estado sólido, utilizam resíduos agroindustriais como fonte de carbono e nitrogênio, como por exemplo resíduos de café (48), farelo de trigo e farelo de algodão (46), cascas de frutas (47), farelo de arroz e bagaço de cana (49), entre outros. Esses resíduos geralmente são ricos em carboidratos, gorduras e proteínas, e por isso, são ótimas fontes de carbono e nitrogênio.

Fontes de carbono simples, como a glicose, são muito utilizadas no meio base para a produção de proteases, pois a produção de algumas macromoléculas está ligada com o aumento da biomassa dos microrganismos que é induzido pela presença de fontes de carbono livre (66). Porém, alguns trabalhos relatam que a presença de açúcares livres no meio de cultivo podem reprimir a produção de proteases extracelulares por microrganismos (67, 68). Fontes de nitrogênio orgânicas (peptona, caseína, extrato de levedura) e inorgânicas ( $\text{KNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) também exercem efeitos na síntese de proteases de microrganismos. Alguns estudos sugerem que a peptona é o substrato ideal para a indução de síntese de protease por fungos (64, 68, 69).

Fatores físicos também influenciam na indução ou repressão da produção de protease, como pH inicial, temperatura, velocidade de agitação e tamanho do inóculo. Dentre os parâmetros físicos, o pH e a temperatura são importantes reguladores da produção enzimática pois podem afetar a estrutura química das enzimas, causando sua desnaturação e perda da atividade catalítica, e ainda, alterar a estabilidade de substratos no meio de cultura (70).

## **2.5. Aplicação industrial de proteases**

Devido ao seu amplo uso em diversas indústrias, as proteases formam um dos grupos mais importantes de enzimas utilizadas industrialmente. O primeiro uso de proteases foi na indústria de laticínios como agente coagulante do leite para fabricação de queijo. Atualmente, as proteases são utilizadas em diversos setores, como farmacêutico, couro, detergente e alimentício (17, 71, 72). Para ser utilizada, características importantes da enzima devem ser conhecidas para que funcione da melhor maneira possível. Portanto, é necessário saber o pH e temperatura ótimos da enzima, especificidade do substrato, estabilidade física e química, e termoestabilidade (73, 74).

### **2.5.1. Indústria de detergente**

Nos últimos 50 anos, as proteases passaram de ingrediente auxiliar para ingrediente principal em detergentes domésticos e industriais. O primeiro detergente a ter protease adicionada à sua formulação foi produzido pelo químico alemão Otto Röhm. A enzima foi adicionada à formulação para remover manchas de proteína (11). O uso de proteases na indústria de detergentes é responsável por aproximadamente 20% do mercado de enzimas comerciais (9). A maioria das proteases incorporadas em detergentes estão na classe de serina-protease alcalina. Os detergentes com enzimas são vantajosos porque são menos agressivos ao meio ambiente e aos utensílios da cozinha, economizam energia e água (diminuem a necessidade de uso de altas temperaturas) e facilitam a remoção de sujidades proteicas (secreções corporais, sangue, manchas de peixe e carne, leite, entre outros). Uma protease ideal para ser incorporada em detergentes deve ter ampla especificidade para diferentes substratos para promover fácil remoção de diferentes tipos de sujeira, estabilidade sob diferentes condições de pH e temperatura e ser compatível com os demais compostos presentes na formulação do detergente (9, 10, 13).

Savitha et al. (72) extraíram e purificaram uma serina protease extracelular de cepas de *Graphium putredinis* e *Trichoderma harzianum* que eram compatíveis com

detergentes comerciais e mostraram uma boa capacidade de remover manchas de sangue em tecido de algodão. Niyonzima et al. (75) isolaram e purificaram uma protease alcalina extraída do fungo *Scopulariopsis* spp compatível com detergentes comerciais e capaz de remover manchas de sangue em tecido de algodão.

Em outro trabalho, Niyonzima et al. (76) isolaram e purificaram uma serina protease alcalina do fungo *Aspergillus terreus* gr. que mostrou ser estável e compatível com diversos surfactantes, alvejantes e detergentes locais e foi capaz de remover manchas de sangue em tecidos de algodão.

### **2.5.2. Indústria de alimentos**

Na indústria alimentícia, as proteases possuem diversas funções e são utilizadas em diversos setores, como para a produção de laticínios, produção de massas, pães e biscoitos e na indústria de carnes. O uso de proteases e enzimas em geral (lipases, amilases, carboidrases) durante o processamento de um alimento é capaz de melhorar a qualidade deste alimento por meio da modificação de aspectos físicos e nutricionais, tornando-o mais saboroso e saudável (9, 77). A produção de enzimas para uso na indústria alimentícia ocorreu por volta de 1874, quando se passou a extrair renina (enzima proteolítica) do estômago de bezerros para a fabricação de queijos (78). Em busca de uma alternativa para a extração de renina de bezerros, diversos estudos foram direcionados para a produção de enzimas usadas para a coagulação do leite a partir de fontes alternativas, como microrganismos. De acordo com Demain et al. (79) proteases produzidas por *Mucor miehei*, *Bacillus subtilis* e *Endothia parasitica* (microrganismos reconhecidos como GRAS) foram substituindo as proteases extraídas de bezerros para a coagulação do leite.

As proteases desempenham um papel importante na indústria de carnes. Eles auxiliam no processo de amaciamento de bovinos, suínos e cordeiros por meio da hidrólise do tecido conjuntivo e fibras musculares (8, 15, 25). Sun et al. (80) clonou um gene de protease aspártica do fungo *Rhizomucor miehei* e expressou em *Pichia pastoris*. A protease purificada foi avaliada quanto à capacidade de amaciamento da

carne na qual obteve resultados melhores do que a papaína (protease comercial disponível para amaciamento da carne). Ryder et al. (81) avaliaram o potencial de quatro preparações comerciais de proteases fúngicas e bacterianas para amaciar carnes. Os resultados mostraram que todas as proteases têm potencial para serem aplicadas como amaciantes de carne devido à sua aparente capacidade de hidrolisar seletivamente proteínas da carne.

O principal ingrediente usado na produção de pães é a farinha de trigo, que contém uma proteína insolúvel chamada glúten. O glúten determina algumas propriedades da massa como elasticidade, sabor, cor e expansão de massa. A adição de proteases reduz o tempo de mistura da massa e resulta em maiores volumes de pão (10, 82). Endo e exoproteinases de *Aspergillus oryzae* (BakeZyme® B500BG) e uma protease neutra de *Bacillus amyloliquefaciens* (Neutrase®) são algumas proteases comerciais usadas para modificar proteínas presentes em farinha de trigo para a produção de pães, biscoitos, bolos e massas (13, 83).

As proteases também são utilizadas na indústria de bebidas para a produção de cerveja e outras bebidas alcoólicas. Além disso, são utilizadas na produção de sucos pois removem a turbidez natural para clarificação de sucos de frutas, na fabricação de molho de soja e produtos derivados da soja (24, 71, 73, 82).

### **2.5.3. Indústria de couro**

A confecção de couro envolve várias etapas, como imersão, depilação, purga e curtimento. Os resíduos gerados por esses processos representam uma ameaça ao ecossistema devido à grande poluição ao meio ambiente e são extremamente nocivos à saúde. O uso de enzimas proteolíticas na indústria do couro vem substituindo agentes químicos tóxicos e perigosos ao meio ambiente (84). O primeiro passo para o processamento do couro é a depilação (remoção dos pelos). As proteases alcalinas produzidas por microrganismos facilitam a depilação, pois o pH básico auxilia na exposição dos folículos capilares, facilitando sua remoção. O processo de depilação com proteases é mais ecológico do que o processo químico que envolve produtos tóxicos, como sulfeto de sódio e sulfeto de hidrogênio. Além disso, o uso de enzimas

proteolíticas não só evita problemas relacionados à poluição ambiental, mas também reduz o risco para os trabalhadores e melhora a resistência e a qualidade do couro (83, 85). As proteases alcalinas são mais utilizadas porque são mais estáveis e ativas nas condições necessárias para o trabalho de remoção dos pelos (24, 86). Atualmente, combinações de tripsina e proteases produzidas por *Bacillus* e *Aspergillus* têm sido utilizadas no processamento de couro (13, 87).

Manavalan et al. (88) identificaram uma protease alcalina e termoestável de *Bacillus megaterium* isolados de águas marinhas que facilitou o processo de remoção de pelos de pele de vaca em comparação com o tratamento químico, e a verificação microscópica mostrou que após o tratamento químico, os fios e os folículos capilares ficaram retidos na pele, diferente do tratamento enzimático que removeu todos os fios e folículos.

Lima et al. (89) extraíram uma protease do fungo *Aspergillus terreus* isolado da espécie *Memora peregrina*, uma planta nativa do Cerrado, e avaliaram seu potencial biotecnológico para a remoção de pelos de pele bovina. A protease parcialmente purificada se mostrou bastante eficiente na depilação de pele bovina.

#### **2.5.4. Aplicação terapêutica das proteases**

Sabe-se que as proteases constituem aproximadamente 2% do genoma humano. Isso indica que as proteases têm funções mais complexas do que simplesmente quebrar proteínas. As proteases são responsáveis por exemplo, pelo crescimento e migração celular, apoptose, regulação da atividade de muitas proteínas, crescimento e metástase de tumores, coagulação do sangue, regulação do processo inflamatório, modulação de interações proteína-proteína, ativação de zimogênios e tradução e amplificação de sinais moleculares. Ao longo dos anos, os cientistas descobriram que as proteases microbianas podem ser usadas para tratar uma variedade de doenças, como câncer, doenças inflamatórias, glaucoma, entre outras (82, 90, 91).

Um coágulo de sangue no tubo vascular é um problema que pode levar à morte devido à falta de fornecimento de sangue para áreas importantes do corpo. A maioria dos agentes trombolíticos externos disponíveis no mercado são proteases. Estudos relatam que a atividade trombolítica exibida por várias espécies bacterianas, fúngicas e animais são importantes para o uso clínico no tratamento de eventos cardiovascular, como estreptoquinase, estafiloquinase, ativadores do plasminogênio tecidual e uroquinase (92, 93). As proteases fibrinolíticas possuem um papel muito importante na área médica e na indústria farmacêutica, uma vez que a degradação da proteína fibrina é uma parte importante no tratamento e na prevenção de trombooses e eventos cardiovasculares.

Ahmad et al. (94) isolaram 16 fungos endofíticos de folhas de *Hibiscus* sp. Dois fungos dos 16, *Fusarium* sp. e *Penicillium citrinium* foram identificados como produtores eficientes de proteases fibrinolíticas. Batista et al. (95) produziram e caracterizaram proteases com alta atividade fibrinolítica de linhagens de *Streptomyces parvulus* isolados de líquens da Região Amazônica.

Uma protease chamada serratiopeptidase tem sido usada clinicamente como agente anti-inflamatório. Esta protease é produzida pela bactéria *Serratia* sp. O tratamento da inflamação aguda e crônica mediada por protease é uma alternativa mais econômica do que outros tratamentos e sem relatos de efeitos adversos (84, 92). As proteases também desempenham um papel crítico como agentes antimicrobianos. Alguns antimicrobianos derivados de enzimas já estão disponíveis no mercado (84, 96). Além disso, o grupo de enzimas colagenase pode tratar várias doenças como cicatrização de feridas, celulite, quelóide, oclusões totais crônicas vasculares, entre outras (97)

As proteases também são utilizadas como ingredientes ativos em formulação de produtos cosméticos. As proteases são inseridas em formulações tópicas para limpar feridas, como úlceras dérmicas, remover a camada de queratina na acne ou psoríase, eliminar calos, remoção de pelos e preparação de vacina para terapia de dermatofitose (doença causada por fungos) (98). Além disso, proteases do grupo das queratinases podem ser utilizadas em formulações para remover cicatrizes e regenerar o epitélio, acelerando o processo de cicatrização (13). Algumas proteases

como a papaína e a bromelina são utilizadas em produtos que auxiliam na limpeza e regeneração da pele. Atuam hidrolisando as ligações peptídicas de queratina e colágeno facilitando a remoção dessas proteínas pelos sabonetes comuns e removendo células mortas por *peeling* e alisamento. (15, 99, 100). As principais aplicações terapêuticas das proteases estão ilustradas na Figura 2.



**Figura 2:** Aplicação terapêutica geral de proteases. Fonte: próprio autor

## 2.6. Fungos Endofíticos

O mundo atual enfrenta diversos desafios relacionados ao crescimento populacional, falta de recursos, sustentabilidade e surgimento de novas doenças. Portanto, a demanda por compostos bioativos de origem natural está em constante crescimento. O uso de compostos extraídos de plantas medicinais pode ser um processo complicado, pois envolve questões externas. Portanto, é importante explorar diferentes fontes para descobrir novos metabólitos bioativos de origem natural (101).

O termo "endofítico" é usado para definir todos os organismos que habitaram os tecidos internos de seus hospedeiros vivos durante algum período de seu ciclo de vida (102, 103). Portanto, fungos endofíticos são microrganismos que habitam os diferentes tecidos internos das plantas sem causar qualquer dano aparente à planta hospedeira (104). A presença de fungos endofíticos em tecidos vegetais fossilizados tem sido relatada a bastante tempo, revelando a antiga interação entre essas espécies (105). A presença de fungos endofíticos foi relatada em todas as espécies de plantas estudadas até o presente momento. Pesquisas recentes indicam que pode haver cerca de 1 milhão de espécies de fungos endofíticos presentes nas plantas, uma vez que 300.000 espécies de plantas são conhecidas e cada planta pode ser habitada por uma ou mais cepas de fungos (6).

Os fungos endofíticos mantêm uma relação próxima com a planta e é descrito que a relação fungo/planta ocorre como uma forma complexa de mutualismo, uma vez que ambos se beneficiam de formas diferentes. Porém, essa interação pode se tornar uma interação patogênica em caso de perda da homeostase entre fungo/planta. Sabe-se que os endofíticos são capazes de melhorar a aptidão das plantas de tolerar diferentes tipos de estresses ambientais, tanto abióticos (seca, temperatura, estresse oxidativo e alta salinidade) quanto bióticos (danos por patógenos) e aumentar a resistência a pragas e insetos. Pesquisas sugerem que os fungos endofíticos são capazes de alterar a distribuição, bioquímica, fisiologia e ecologia das plantas hospedeiras promovendo o seu desenvolvimento com maiores taxas de enraizamento e germinação, maior produção de sementes e de biomassa seja ajudando na captação de nutrientes do ambiente ou com a produção de fitohormônios como, ácido giberélico

e ácido indol acético (103, 106, 107). A biologia incomum de determinadas espécies de plantas crescendo em ambientes críticos (altitudes elevadas, desertos, pântanos, florestas tropicais e solos salinos) ou histórico medicinal, tornam certas espécies favoráveis para sua bioprospecção de fungos endofíticos com potencial interesse industrial e farmacêutico (108).

Os fungos endofíticos podem ser classificados em quatro classes e divididos em dois grupos, baseado nas suas diversidades e papéis funcionais. O primeiro grupo compreende os fungos endofíticos clavicipitáceos (classe 1) e o segundo grupo compreendes os fungos endofíticos não-clavicipitáceos (classes 2, 3 e 4). Os fungos endofíticos clavicipitáceos são microrganismos monofiléticos (conjunto de espécies que compartilham um ancestral comum) e possuem uma gama estreita de hospedeiro. Os fungos endofíticos não-clavicipitáceos são polifiléticos (não possuem um ancestral comum) e possuem um amplo número de plantas hospedeiras. As classes dos fungos endofíticos referem-se as modo de transmissão. As classes 1 e 2 realizam transmissão horizontal ou vertical, enquanto as classes 3 e 4 realizam apenas transmissão vertical (6, 109).

Os fungos endofíticos também podem ser classificados em três comunidades diferentes, sendo elas: endofíticos obrigatórios, endofíticos passageiros e endofíticos facultativos. Os fungos endofíticos obrigatórios habitam os tecidos internos das plantas e não são capazes de colonizar em outro ambiente. Os endofíticos facultativos são os que vivem em associação com as plantas, mas também podem ser encontrados colonizando outros habitats. Por último, os endofíticos que aleatoriamente penetram os tecidos vegetais e não causam nenhuma competição ou proteção vegetal são os fungos endofíticos passageiros (110).

### **2.6.1. Capacidade dos fungos endofíticos em produzir compostos bioativos**

Nos últimos anos, fungos endofíticos têm se mostrado uma fonte de grande potencial para a produção de compostos bioativos com aplicações promissoras na agricultura, meio ambiente, indústria farmacêutica e indústria alimentícia (111).

Existem relatos na literatura que fungos endofíticos produzem diversos compostos bioativos como ciclohexanos, flavonoides, hidrocarbonetos, alcaloides, terpenos e quininos, e que, estes compostos possuem efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, citotóxicos, antimicrobianos entre outros (112).

Muitos desses compostos são os mesmos produzidos pela planta hospedeira, o que pode tornar o fungo endofítico como um substituto para a produção de compostos retirados de plantas medicinais. Como exemplo, podemos citar o agente anticancerígeno taxol, que foi isolado pela primeira vez da casca de *Taxus brevifolia* em 1971. Em 1993, Stierle et al. (113) identificaram que o fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, isolado da planta *Taxus brevifolia* foi capaz de produzir o composto taxol. Desde então, diversos outros estudos identificaram a produção de taxol por fungos endofíticos de outras plantas (114-117).

Em outro exemplo, podemos citar a camptotecina, um fármaco antitumoral, que é extraído das espécies de uma planta nativa da China, *Camptotheca acuminata* (118). Ran et al. (119) identificaram que o fungo endofítico *Fusarium solani*, isolado da planta *C. acuminata*, também foi capaz de produzir o composto camptotecina. Em outro trabalho, Su et al. (120) conseguiram isolar camptotecina dos fungos endofíticos *Fusarium nematophilum*, *Phomopsis vaccinia*, *Alternaria alternata* e *Colletotrichum gloeosporioides*, todos extraídos de *C. acuminata*.

Ruma et al. (121) identificaram fungos endofíticos isolado de espécies de *Garcinia* spp. capazes de produzir compostos com atividade antioxidantes, anti-inflamatória e citotóxicos. Os fungos endofíticos *Aspergillus fumigatus* e *Fusarium* sp. exibiram os resultados mais promissores.

Sabe-se que os fungos endofíticos são produtores de diversas enzimas extracelulares, como amilases, lipases e proteases como parte dos mecanismos de defesa contra outros organismos e para obter nutrientes necessários para seu desenvolvimento (111, 122, 123) . Nos últimos anos, diversos estudos foram realizados para identificar fungos endofíticos capazes de produzir enzimas com potencial aplicação industrial ou farmacêutica (7, 124, 125). Na Tabela 3, são

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

**Tabela 3:** Fungos endofíticos produtores de enzimas de interesse industrial

Fungo endofítico	Planta hospedeira	Enzimas	Referência
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Camellia sinensis</i>	protease, quitinase, amilase	(126)
<i>Talaromyces emersonii</i>	<i>Calophyllum inophyllum</i>	amilase, celulase, pectinase	(127)
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alpinia calcarata</i>	amilase, celulase, protease, lipase	(127)
<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Alpinia calcarata</i>	amilase, celulase, lipase, lacase	(127)
<i>Aspegillus niger</i>	<i>Alpinia calcarata</i>	lipase, lacase	(127)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Alpinia calcarata</i>	amilase, celulase, pectinase	(127)
<i>Colletotrichum falcatum</i>	<i>Bixa orellana</i>	amilase, celulase, protease, lipase	(127)
<i>Colletotrichum truncatum.</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	amilase, lipase, lacase	(127)
<i>Aspergillus japonicus</i>	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill. (Cactaceae)	celulase, pectinase, protease, xilanase	(128)
<i>Fusarium lateritium</i>	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill. (Cactaceae)	celulase, protease, xilanase	(128)
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill. (Cactaceae)	celulase, protease, xilanase	(128)
<i>Phoma tropica</i>	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill. (Cactaceae)	protease, xilanase,	(128)
<i>Fusarium solani</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	celulase, amilase, protease	(129)
<i>Nigrospora sphaerica</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	celulase	(129)
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Acanthus ilicifolius</i>	amilase, celulase, lipase, protease	(130)
<i>Alternaria chlamydosporus</i>	<i>Acanthus ilicifolius</i>	celulase, lipase, protease	(130)
<i>Talaromyces flavus</i>	<i>Potentilla fulgens</i>	lipase, protease, xilanase	(131)
<i>Mortierella hyalina</i>	<i>Osbeckia stellata</i>	Celulase, lipase, protease, xilanase	(131)
<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Glycine max(L.)</i> Merrill	fitase	(132)
<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Sueada maritime</i>	L-asparaginase	(133)

### 2.6.2. Isolamento de fungos endofíticos

O isolamento de fungos endofíticos envolve alguns cuidados especiais que devem ser tomados para que durante o processo sejam excluídos os microrganismos que habitam a superfície dos tecidos vegetais, ou seja, os epífitos. Existe uma certa necessidade de se estabelecer um protocolo de isolamento de fungos endofíticos, já que muitos microrganismos não são “cultiváveis” fora do seu habitat natural (134). Alguns pontos devem ser considerados no processo de isolamento, como por exemplo a espécie de planta utilizada, o órgãos da planta coletado, idade da planta, localização e época da coleta do material vegetal (135). Alguns trabalhos sugerem que a diversidade de fungos endofíticos encontrados em determinada espécie vegetal durante as diferentes estações do ano deve-se a variação dos níveis de metabólitos secundários que a planta produz durante o ano. Outro fator que deve ser levado em consideração para o isolamento de fungos endofíticos é a “saúde” da planta. A escolha do tecido vegetal saudável, sem danos aparentes, diminuem a probabilidade de se isolar microrganismos não-endofíticos e patógenos (6, 136).

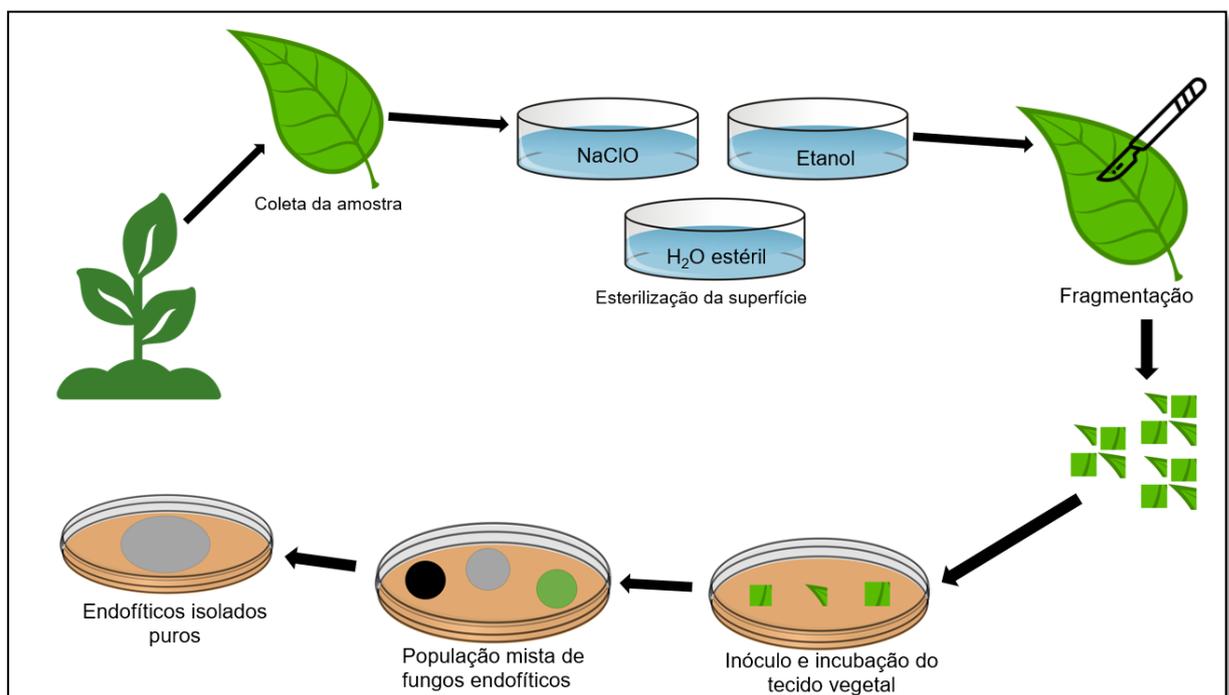
Na literatura, é possível encontrar diferentes metodologias que são utilizadas no isolamento de fungos endofíticos. O processo mais utilizado é o isolamento através da esterilização da superfície do tecido vegetal. Comumente, a esterilização da superfície da planta envolve o tratamento do tecido vegetal com algum oxidante forte ( $\text{NaClO}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) ou um desinfetante (geralmente álcool 70%) por um breve momento, seguido por uma lavagem com água esterilizada para lavagem do material desinfetante, como mostrado na Tabela 4 (137).

**Tabela 4:** Metodologias empregadas para isolamento de fungos endofíticos

Fungo(s) endofítico(s)	Planta hospedeira	Tecido vegetal	Desinfetante, concentração e duração	Referência
<i>Penicillium sp.</i>	<i>Ricinus communis L.</i>	folhas	água esterilizada 60s, etanol 70% 60s, NaClO 2% 4min, etanol 70% 30s	(138)
<i>Xylaria sp.</i>	<i>Palicourea marcgravii</i>	folhas	água corrente, NaClO 1% 5min, etanol 70% 60s, água esterilizada 10min	(139)
<i>Xylaria regalis</i>	<i>Thuja plicata</i>	“cones”	água corrente, etanol 70% 10s, NaClO 4% 60s, água esterilizada	(140)
<i>Ampelomyces sp.</i>	<i>Urospermum picroides</i>	flores	etanol 70% 60s, água esterilizada	(141)
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Chenopodium album</i>	caule, folhas	água corrente, NaClO 2,5 % 30min, etanol 70% 60s, água esterilizada	(142)
<i>Aspergillus fumigatus e Fusarium proliferatum</i>	<i>Oxalis corniculata</i>	raiz e caule	água corrente, NaClO 2,5 % 30min, etanol 70% 60s, água esterilizada	(143)
<i>Alternaria sp.</i>	<i>Sonneratia alba</i>	folhas	etanol 70% 2min	(144)
Diversas espécies	<i>Kadsura angustifolia</i>	caule e raiz	água corrente, etanol 75% 5min, água esterilizada, HgCl 0,1% 3-5min	(145)

Uma das técnicas mais utilizadas é a sugerida por Petrini et al. (146) que consiste em primeiramente, coleta do tecido vegetal saudável e de preferência colhida em até 24 horas antes do início do processo. Feito isso, deve ser feita a lavagem do tecido em água corrente para retirar sujeiras visíveis da superfície. Em seguida, o material vegetal deve ser lavado repetidas vezes em NaOCl e em álcool 70% por

alguns segundos. Após as lavagens, os agentes desinfetantes são removidos com sucessivas passagens do material em água estéril. Esta água pode ser utilizada como controle negativo, indicando uma esterilização bem-sucedida com uma placa de ágar com a amostra da água inoculada sem crescimento de microrganismos. Finalmente, com ajuda de um material cortante estéril, pequenos pedaços do tecido vegetal (3mm-5mm) são depositados em placas de Petri com ágar (Sabouraud, batata dextrose, extrato de malte) e as placas incubada em estufas de crescimento. Uma visão geral do processo de esterilização de superfície é mostrada na Figura 3.



**Figura 3:** Procedimento para preparação de amostras e isolamento de endófitos.

Fonte: próprio autor

### 2.6.3. Identificação de fungos endófitos

A correta identificação de uma espécie abre espaço para um corpo de informação sobre determinado organismo, seus atributos ecológicos, seus papéis fisiológicos e bioquímicos, seus riscos e benefícios. A identificação de fungos endófitos pode ser feita utilizando técnicas de identificação molecular ou técnicas

morfológicas. As técnicas morfológicas são feitas examinando as culturas fúngicas quanto a forma da colônia, cor da colônia, características dos esporos e estruturas reprodutivas. As estruturas então são comparadas com gêneros e espécies de fungos já conhecidas. Essa comparação pode ser feita através de bases de dados (*Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory (ARS, USDA), MycoBank, Index Fungorum, Fungal Planet*). Uma atenção especial deve ser dada a este tipo de técnica, uma vez que muitos fungos possuem características semelhantes o que pode causar incertezas na identificação. Outro ponto a se observar, é que as características morfológicas de alguns fungos é dependente do meio, podendo mudar dependendo do meio cultura em que o fungo está sendo cultivado (106, 147).

Alguns fungos não são capazes de crescer ou esporular *in vitro*, e por isso, só podem ser identificados com técnicas moleculares. A identificação molecular é muito mais confiável comparada com a identificação morfológica, uma vez que características fenotípicas são instáveis e podem ser alteradas dependendo do ambiente. O DNA é extraído das colônias puras de fungos endofíticos com a ajuda de *kits* de isolamento de DNA (148). Uma alternativa, é o isolamento do DNA do fungo endofítico diretamente da planta hospedeira pela técnica de microdissecção de captura a laser (MCL). A MCL permite que células sejam isoladas de tecidos vegetais de maneira rápida e o DNA fúngico é isolado. Esta técnica é útil principalmente para espécies de fungos endofíticos que não crescem *in vitro* (149).

Entretanto, a metodologia molecular mais utilizada para a identificação fúngica é por meio de técnica de PCR (do inglês, *polymerase chain reaction*) e subsequentemente o sequenciamento do DNA. A PCR pode ser feita com o DNA isolado de fungos endofíticos cultivados utilizando *primers* que amplificam o DNA que codificam o RNA ribossômico. Os *primers* de rDNA ITS 1 e 4 (do inglês, *internal transcribed spacer*), gene ribossomal de RNA 18S, sequências parciais de  $\beta$ -tubulina, actina, histona H3, DNA ribossomal nuclear de subunidade grande parcial (nrDNA) e diversos outros segmentos de genes podem ser utilizados para amplificação e sequenciamento de DNA. ITS 1 e ITS 4 são os segmentos de genes mais utilizados para sequenciamento do DNA fúngico (106, 150). As sequências de DNA são comparadas com sequências em banco de dados, como por exemplo o GenBank.

Para identificar o DNA isolado no banco de dados GenBank, primeiro é necessário obter as sequências de um ou mais genes, e usar a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) para procurar correspondências com as sequências de interesse. Assim, uma sequência próxima encontrada pode indicar a identidade de um fungo endofítico. Uma similaridade de mais de 98% na sequência de ITS rDNA pode ser usada na identificação de espécies, e uma similaridade entre 95% e 98% pode ser usada para a identificação de gênero (6, 151).

## **2.7. Métodos de triagem (*screening*) para avaliar a produção de proteases por fungos**

### **2.7.1. *Screening* em meio de cultura sólido**

A avaliação inicial se um fungo endofítico é um potencial produtor de proteases envolve a aplicação de métodos que demonstrem a síntese de enzimas proteolíticas. Diferentes métodos são aplicados, podendo ser métodos qualitativos ou quantitativos. Os métodos realizados em meio sólido são os mais utilizados por serem práticos e rápidos de identificar a produção de enzimas proteolíticas por fungos ou outros microrganismos. Este método admite o *screening* de diferentes espécies fúngicas ao mesmo tempo, e posteriormente, investigações mais aprofundadas permitem dizer se o fungo é capaz de produzir proteases a nível industrial. Geralmente, os fungos são cultivados em um meio apropriado suplementado com algum substrato proteico (gelatina, soro de leite, caseína). Logo, os métodos em meio sólido se baseiam na capacidade dos fungos em utilizar as fontes de nitrogênio presentes secretando enzimas proteolíticas para quebrar as cadeias de proteína no meio em sua volta. A síntese de proteases por parte dos fungos se torna visível após quebra desses substratos proteicos e a formação de um halo em volta do fungo visível a olho nu ou com a ajuda de algum corante ou indicador (13).

Alberto et al. (152) investigou o potencial de 27 fungos endofíticos isolados de 4 espécies de plantas (*Luehea divaricata*, *Trichilia elegans*, *Sapindus saponária* e *Saccharum* spp.) em produzir proteases em meio sólido utilizando gelatina e leite

desnatado como substratos proteicos onde a formação de um halo visível a olho nu indicava a síntese de enzimas proteolíticas. Bezerra et al. (128) avaliou 24 fungos endofíticos isolados de *Opuntia ficus-indica* Mill. em meio sólido utilizando caseína com substrato e com indicação positiva para protease com a forma de um halo visível.

Fouda et al. (153) investigaram o potencial proteolíticos de fungos endofíticos associados a planta *Asclepias sinaica* utilizando meio ágar com malte de levedura suplementado com 1% de gelatina e cloreto mercúrio como indicador para precipitar substrato de proteína não utilizado e ajudar na visualização dos halos. Jagannath et al. (154) utilizou meio GYP-agar (do inglês, *glucose yeast peptone agar*) suplementado com 0,4% de gelatina para investigar o potencial de fungos endofíticos isolados de *Baliospermum montanum* e utilizando uma solução saturada de sulfato de amônio como indicador. Zaferanloo et al. (155) utilizaram meio ágar suplementando com 1% de leite desnatado para averiguar o potencial proteolítico de fungos endofíticos isolados da planta *Eremophila longifolia* empregando uma solução de 10% de ácido tânico com indicador.

### **2.7.2. Screening em meio de cultura líquido**

O método de *screening* em meio de cultura líquido é um método quantitativo que consome mais tempo e mais recursos do que o método em meio sólido. Porém este método é mais sensível e podendo detectar a presença de proteases em quantidades pequenas que passariam despercebidas pelo método em meio sólido além de maior controle de parâmetros físicos (pH, temperatura, agitação) o que pode favorecer a produção de enzimas (156). Patil et al. (157) e Bhagobaty et al. (131) realizaram testes de *screening* em meio líquido contendo caseína e leite desnatado como substratos proteicos, respectivamente. Para Patil et al. (157) uma unidade enzimática representa a quantidade de enzima que libera 1 µg de tirosina nas condições do ensaio enzimático. Para Bhagobaty et al. (131) uma unidade de protease foi definida como a quantidade de enzima necessária para diminuir a DO (densidade óptica) no valor de 0,001 unidades por hora por mL do meio de cultura líquido contendo o substrato de enzima sob as condições do ensaio enzimático.

### **2.7.3. Método de Gel Dot-Blot**

Um novo método para a detecção de proteases extracelulares produzidas por fungos foi desenvolvido por Thirunavukkarasu et al. (158). A metodologia se baseia na técnica de Dot-Blot (comumente utilizada para detecção de proteínas em amostras ou usado para demonstrar a presença de sequência complementar de DNA ou RNA na amostra). Esta técnica envolve a preparação de poços criados em uma placa e gel de acrilamida com gelatina como substrato. Extratos brutos filtrados de fungos são colocados em poços no gel em diferentes pH (5, 7 e 9). O gel é incubado, corado com *Coomassie Brilliant Blue* (R 250), lavado com água destilada e então observado quanto à presença de halos brancos no gel que indicam atividade enzimática. Segundo Thirunavukkarasu et al. (158), esta técnica apresenta vantagens em relação às técnicas convencionais em meio sólido, pois são mais sensíveis à presença de proteases e uma grande quantidade de amostra pode ser testada ao mesmo tempo.

### **2.8. Purificação de proteases de fungos**

A purificação de macromoléculas em geral pode ser realizada total ou parcialmente utilizando um ou mais processos. Os métodos de purificação podem ser adaptados a depender do grau de pureza e separação desejados. O grau de purificação está sujeito a aplicação final da enzima. Enzimas com aplicação em produtos farmacêuticos e uso terapêutico por exemplos, devem estar com alto grau de pureza, necessitando assim múltiplos processos de purificação. Porém, a purificação deve ser feita com o mínimo de processos possíveis afim de se evitar perdas e descaracterização da enzima (159).

As proteases de fungos são purificadas por métodos consagrados baseados nas características físico-químicas das proteases, como: tamanho molecular, carga elétrica, hidrofobicidade, solubilidade, entre outros. Os métodos mais utilizados para a purificação de proteases são: precipitação, cromatografia de troca iônica, cromatografia de afinidade e gel filtração. Segundo, Mandal et al. (13) o método mais organizado para a extração e purificação de proteases de fungos foi descrito por

Budiarto et al. (160) que extraíram e purificaram uma protease extracelular de um fungo derivado do mar. O processo de purificação da protease produzida pelo fungo *Xylaria psidii* foi realizado em três etapas. A primeira etapa envolveu a precipitação da amostra com sulfato de amônio, seguido por dois processos de cromatografia: cromatografia de troca iônica (DEAE-Sepharose) e gel-filtração (Sephadex SG-75).

Werneck (73) realizou uma purificação parcial de proteases extraídas de fungos endofíticos isolados de plantas do Cerrado. Primeiramente as amostras foram liofilizadas no intuito de concentrar a enzima. O processo de purificação parcial foi feito no aparelho AKTA Pure system utilizando uma coluna Hitrap DEAE FF.

Zanphorlin et al. (161) purificaram uma serinoprotease alcalina sintetizada pelo fungo *Myceliophthora* sp. em três etapas. A primeira etapa envolveu a precipitação da enzima com etanol (proporção 1:2). A solução concentrada de enzima foi então purificada com passagem em colunas de gel filtração (Sephacryl S-100) e depois, coluna de troca iônica (Source 15-Q).

Devi et al. (162) purificaram um protease produzida pelo fungo *Aspergillus niger* concentrando a enzima através do método de precipitação com sulfato de amônio e depois passagem da amostra em coluna de troca iônica (DEAE celulose).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar a evidência científica disponível sobre a produção de enzimas proteolíticas por fungos endofíticos.

#### **3.2. Objetivos específicos**

Analisar e identificar na literatura disponível o estado atual de produção, otimização, caracterização e purificação de proteases por fungos endofíticos;

Analisar cada trabalho em relação aos critérios de inclusão e exclusão definidos;

Avaliar a qualidade das evidências dos estudos incluídos na revisão.

## 4. MÉTODOS

### 4.1. Estratégias de busca e fontes de informação

Esta revisão foi conduzida seguindo uma estratégia de busca de acordo com o PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis*) em cinco base de dados bibliográficas (163). O protocolo não foi registrado por se tratar de uma revisão sistemática de estudos *in vitro*. Este tipo de revisão sistemática não é passível para inclusão no PROSPERO (*International Prospective Register of Systematic Reviews*). As bases de dados selecionadas foram: PubMed, PMC, Science Direct, Scopus Articles e Web of Science. Uma busca separada foi feita na base de dados Google Scholar em caso de algum estudo relevante para esta revisão não ter sido selecionado durante a primeira busca nas cinco bases de dados iniciais. A pesquisa dos artigos foi realizada nas bases de dados por dois revisores independentes no mesmo dia para assegurar que a pesquisa foi feita corretamente e que o mesmo número de artigos fosse encontrado. A pesquisa incluiu apenas artigos publicados em revistas científicas até o dia 10 de setembro de 2021, sem limitações quanto ao ano de publicação ou idioma. Um *software* gerenciador de referências foi utilizado para a remoção de referências duplicadas (EndNote™, Thomson Reuters).

### 4.2. Seleção dos estudos

A seleção dos artigos foi feita em duas etapas. Na primeira etapa, após a retirada das referências duplicadas, os títulos e resumos dos artigos restantes foram analisados por dois revisores de forma independente. Esta primeira etapa elegeu os artigos que pareciam atender os critérios de inclusão de acordo com o título e resumo. Quaisquer divergências encontradas entre os dois primeiros revisores em relação a inclusão ou exclusão de qualquer artigo foi resolvida com o auxílio de um terceiro revisor até consentimento mútuo entre os três. Artigos que não possuíam nenhum dos critérios de inclusão ou não estavam relacionados com o tema desta revisão foram excluídos. Na segunda etapa, dois revisores revisaram os artigos remanescentes da

primeira etapa por completo e excluíram aqueles que não preenchiam os critérios de inclusão. Por fim, três revisores analisaram os artigos remanescentes da segunda etapa e selecionaram os artigos que foram incluídos nesta revisão.

#### **4.3. Critérios de elegibilidade**

Para esta revisão, foram selecionados artigos que apresentaram atividade enzimática de proteases produzidas por fungos endofíticos de qualquer espécie, estudos que otimizaram o processo de produção, performaram processos de purificação enzimática (total ou parcial) e realizaram caracterização enzimática (pH e temperatura ótimos, ponto isoelétrico, estabilidade).

#### **4.4. Critérios de exclusão**

Os artigos que apresentavam algum dos seguintes critérios foram descartados: 1) estudos realizados com fungos não-endofíticos; 2) artigos com apenas estudos qualitativos de *screening* ou que não mediram a atividade proteolítica quantitativamente; 3) revisões, cartas, opiniões pessoais, capítulos de livros e conferências; 4) estudos que não mencionaram a produção de proteases por fungos endofíticos e 5) estudos escritos em língua não-inglesa. Para esta revisão, somente foram considerados fungos endofíticos isolados de organismos pertencentes ao reino Plantae. Trabalhos que envolveram fungos micorrizos, que por vezes são classificados como fungos endofíticos, foram descartados com base no critério de exclusão número 1, por considerar que fungos micorrizos não são propriamente fungos endofíticos (164).

#### **4.5. Processo de coleta de dados**

O processo de coleta de dados dos artigos selecionados foi realizado por dois revisores independentes. Um terceiro revisor ficou responsável pela verificação dos dados coletados. Qualquer divergência encontrada entre os dois primeiros revisores em relação a coleta de dados de qualquer artigo foi resolvida com o auxílio do terceiro

revisor até consentimento mútuo entre os três. Os seguintes dados foram coletados dos artigos selecionados: ano de publicação, autor(es), país de publicação, espécie do fungo endofíticos, espécie da planta hospedeira, atividade proteolítica, condições de cultivo, processo de purificação e dados de caracterização enzimática.

#### **4.6. Risco de viés em estudos individuais**

Uma ferramenta de avaliação da qualidade das evidências dos trabalhos foi empregada como metodologia na avaliação dos trabalhos selecionados nesta revisão (165). A ferramenta GRADE (*Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation*) foi adaptada para avaliação de estudos *in vitro*, uma vez que nenhuma outra ferramenta específica para a avaliação destes estudos foi desenvolvida até o momento. Dois revisores independentes classificaram os artigos de acordo com sua qualidade em “alta”, “moderada”, “baixa” ou “muito baixa”. Divergências em relação a classificação dos artigos foi resolvida com o assistência de um terceiro revisor.

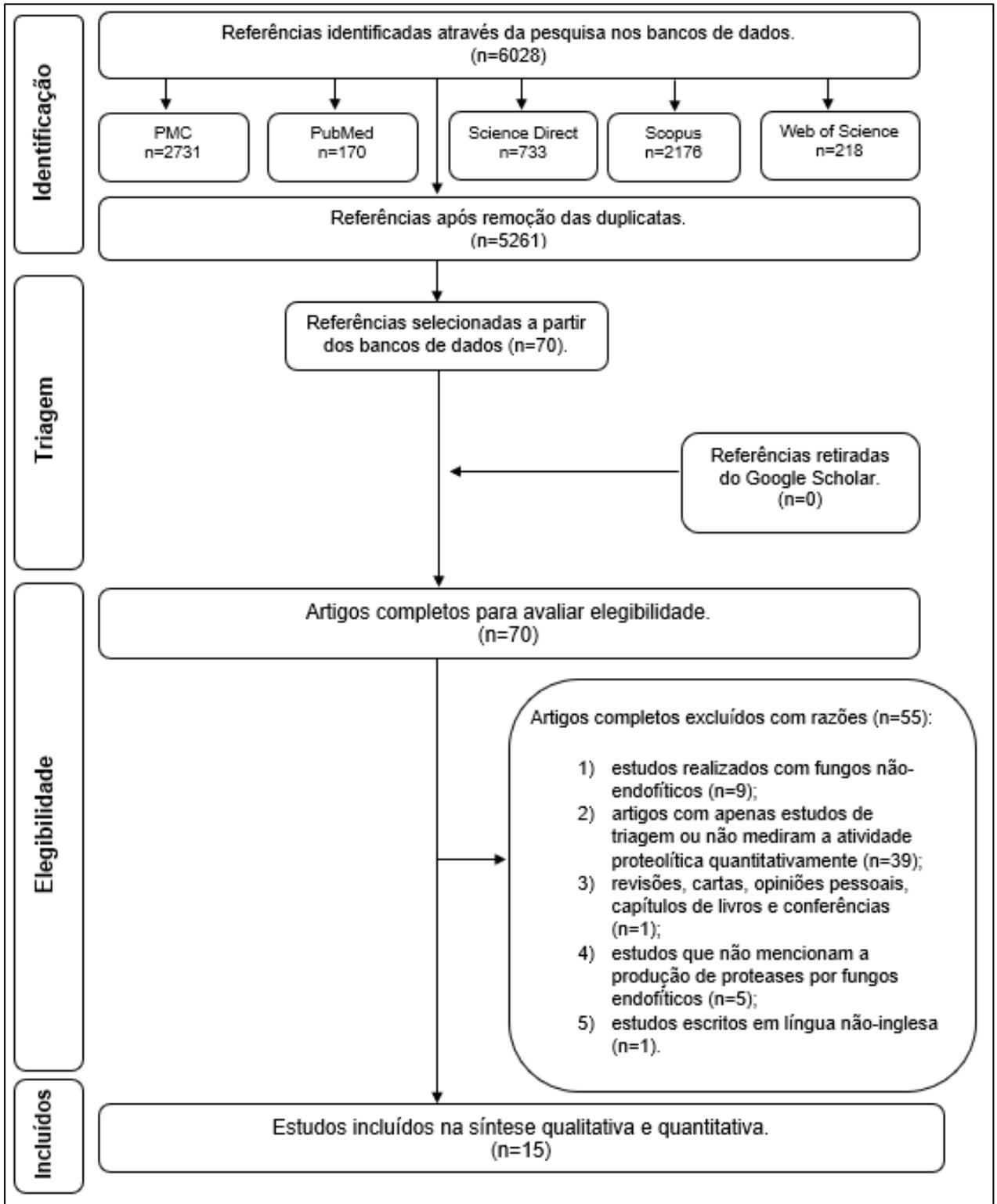
## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Seleção dos trabalhos**

Ao todo, 6028 artigos foram encontrados após a aplicação da estratégia de busca inicialmente estabelecidos nas cinco bases de dados eletrônicas (Anexo1). Na base PMC foram encontradas 2731 referências, 2176 na base de dados Scopus, 733 na base de dados Science Direct, 218 referências no Web of Science e por fim, 170 na base de dados PubMed. Feito o processo de busca completo nas bases de dados citadas, as referências duplicadas foram removidas utilizando o software de gerenciamento de referência EndNote™, permanecendo 5261 referências. Em seguida, uma análise dos títulos e resumos dos artigos foi realizada, descartando 5191 referências, restando 70 artigos. Assim, com base nos critérios de inclusão e exclusão, foi realizada uma avaliação dos textos completos e foram selecionados 15 artigos para esta revisão (131, 166-179). Um fluxograma detalhado sobre o processo de pesquisa, inclusão e exclusão dos artigos é mostrado na Figura 4.

### **5.2. Características dos estudos**

Os estudos selecionados foram desenvolvidos em 8 países diferentes. Cinco trabalhos na Índia (131, 172-174, 176), dois na China (169, 177), dois no Brasil (168, 171), dois no Egito (167, 179), um nos Estados Unidos da América (170), um na Austrália (178), um na Malásia (175) e um na Tunísia (166). Os trabalhos foram publicados em língua inglesa entre os anos de 1994 e 2021. Todos os trabalhos avaliaram a produção de proteases por fungos endofíticos e 9 trabalhos realizaram processos de purificação e caracterização das proteases produzidas (167, 169, 170, 172-175, 177, 179). Um resumo das características descritivas dos trabalhos incluídos é apresentado na Tabela 5.



**Figura 4:** Fluxograma de pesquisa de literatura e critérios de seleção adaptados de PRISMA (163).

### 5.3. Síntese dos resultados

#### 5.3.1. Microrganismos

Entre os trabalhos incluídos nesta revisão, 15 espécies diferentes de fungos endofíticos foram descritos como produtores de protease, sendo eles *Penicillium bilaiae* (166), *Talaromyces flavus* (131), *Mortierella hyalina* (131), *Paecilomyces variabilis* (131), *Penicillium* sp. (131, 171), *Aspergillus ochraceus* (167, 179), *Aspergillus niger* (168), *Verticillium* sp. (169), *Acremonium typhinum* (170), *Aspergillus* sp. (171), *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (172), *Xylaria curta* (173, 174), *Penicillium citrinum* (175), *Fusarium* sp. (175, 177) e *Alternaria alternata* (176, 178). Em oito artigos foi mencionada a identificação molecular do fungo envolvido, cujas espécies foram identificadas com base no ITS-rDNA (166, 168, 172, 173), análise da sequência 18S rRNA (167, 179), região 28S rDNA (174), amplificação por PCR do gene da  $\beta$ -tubulina (131) e uma espécie fúngica foi identificada com base nas características, cor e morfologia dos esporos (176).

#### 5.3.2. Otimização da produção de protease

Entre os 15 trabalhos avaliados nesta revisão, quatro realizaram estudos para a otimização da síntese de proteases. Ben Mefteh et al. (166) utilizou as ferramentas Metodologia de Superfície de Resposta e Plackett-Burman Design para otimizar a produção de protease pelo fungo endofítico *Penicillium bilaiae*. Elgammal et al. (167) e Rajput et al. (176) adotaram um procedimento para a otimização da produção de protease, pelos fungos *Aspergillus ochraceus* e *Alternaria alternata* respectivamente, avaliando diferentes parâmetros como tempo de incubação, pH, temperatura, fontes de carbono e nitrogênio de forma independente e mantendo outros parâmetros constantes, procedimento conhecido como “uma variável por vez”. Zaferanloo et al. (178) aplicaram um experimento fatorial randomizado para otimização da produção de protease pelo fungo endofítico *Alternaria alternata*.

**Tabela 5:** Resumo das características descritivas dos trabalhos incluídos (n=15)

Autores/ano	País	Planta hospedeira	Fungo endofítico	Condições de Cultivo					Atividade enzimática	Principais conclusões
				Fermentação	pH	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Tempo (dias)		
<b>Ben Mefteh et al. (166) - 2019</b>	Tunísia	<i>Phoenix dactylifera</i> L.	<i>Penicillium bilaiae</i>	FS	6,26	24,5	150	-	1086,95 U/mL	Plackett-Burman e Metodologia de Superfície de Resposta foram empregados para otimização do meio de cultura e das condições ambientais e mostraram aumentar significativamente a produção de protease.
<b>Bhagobaty et al. (131) - 2012</b>	Índia	<i>Potentilla fulgens</i> , <i>Osbeckia stellata</i> , <i>Osbeckia chinensis</i> , <i>Camellia caduca</i> , and <i>Schima khasiana</i>	<i>Talaromyces flavus</i> ; <i>Mortierella hyalina</i> ; <i>Paecilomyces variabilis</i> ; <i>Penicillium</i> sp.	FS	-	25	120	0, 1, 2 e 5	<i>Talaromyces flavus</i> : 34.9 U/h/mL	A produção de proteases extracelulares foi maior no meio líquido em comparação com meio sólido. Enzimas que não foram detectadas em ensaios bem meio sólido para alguns isolados foram detectadas em condições de cultura líquida.
<b>Elgammal et al. (167) - 2020</b>	Egito	<i>Ruprechita salicifolia</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i> BT21	FS	8	35	150	-	292±1,8 U/mL	Parâmetros físicos e químicos das condições de cultivo tiveram um papel importante para maximizar a produção de nossa protease.
<b>El-Khoneyzy et al. (179) - 2021</b>	Egito	<i>Ruprechita salicifolia</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i> BT21	FS	8	35	150	6	18489±8,15 U/mL	A caracterização de uma tiol-dependente serino protease mostra resultados promissores fazendo desta protease uma potencial candidata para uso em formulações de detergentes.
<b>Galeano et al. (168) - 2021</b>	Brasil	<i>Axonopus purpusii</i>	<i>Aspergillus niger</i> 9-p	FS	-	30	110	Alíquotas foram retiradas a cada 24 horas por 7 dias	12,01±1,09 U/mL (6º dia)	A capacidade do isolado <i>Aspergillus niger</i> de produzir proteases pode refletir o fato de que esses fungos têm potencial como agentes de biocontrole.

Continuação

<b>Li et al. (169) - 2007</b>	China	<i>Trachelospermum jasminoides</i>	<i>Verticillium</i> sp. Tj33	FS	-	28	160	14	-	A verticase (protease produzida pelo fungo <i>Verticillium</i> sp.) é um degradador direto do coágulo de fibrina sugerindo que pode ser considerada uma candidata para o desenvolvimento de um agente terapêutico potente.
<b>Lindstrom et al. (170) - 1994</b>	Estados Unidos	<i>Poa ampla</i>	<i>Acremonium Typhinum</i>	-	-	-	-	-	27 U/mL	A natureza regulada da proteinase At1 sugere que sua função é importante na interação simbiótica de fungo e planta.
<b>Matias et al. (171) - 2021</b>	Brasil	<i>Myrcia guianensis</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	FS	5	28	150	7	3,63 U/mL	O fungo endofítico <i>Aspergillus</i> sp. com maior atividade de protease demonstrou total eficácia na remoção do biofilme consolidado de <i>S. aureus</i> .
<b>Meshram et al. (172) - 2016</b>	Índia	<i>Aegle marmelos</i>	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	FS	-	26	130	7	6,514 U/mL	O fungo endofítico <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> isolado de <i>A. marmelos</i> possui potencial fibrinolítico in vitro.
<b>Meshram et al. (173) - 2016</b>	Índia	<i>Cathranthus roseus</i>	<i>Xylaria curta</i>	FS	-	26	130	7	34,11 U/mL	A protease de <i>Xylaria curta</i> é uma nova metaloprotease que possui atividade dupla, incluindo degradação direta da fibrina ou pela ativação do plasminogênio tecidual.
<b>Meshram et al. (174) - 2017</b>	Índia	<i>Cathranthus roseus</i>	<i>Xylaria curta</i>	FES	-	28	-	15	103,56 U/mL	A protease de <i>Xylaria curta</i> se destaca como um potencial candidato a agentes terapêuticos para terapia trombolítica.
<b>Noor et al. (175) - 2016</b>	Malásia	Hibiscus	<i>Fusarium</i> sp	-	-	-	-	-	5284 U/mL	Os dois fungos endofíticos, <i>Fusarium</i> sp e <i>Penicillium citrinum</i> , mostraram resultados promissores como enzimas fibrinolíticas.

Continuação

<b>Noor et al. (175) - 2016</b>	Malásia	Hibiscus	<i>Penicilium citrinum</i>	-	-	-	-	-	2200 U/mL	Os dois fungos endofíticos, <i>Fusarium</i> sp e <i>Penicilium citrinum</i> , mostraram resultados promissores como enzimas fibrinolíticas.
<b>Rajput et al. (176) - 2016</b>	Índia	<i>Cupressus torulosa</i> D. Don	<i>Alternaria alternata</i>	FS	-	-	-	10	162 U/ml	<i>Alternaria alternata</i> pode ser explorada industrialmente para a síntese de protease e estudos de otimização podem ser realizados para aumentar a produção de enzimática.
<b>Wu et al. (177) - 2009</b>	China	Crisântemo	<i>Fusarium</i> sp. CICC 480097	FS	-	28	220	6	137 U/mL	A enzima fibrinolítica de <i>Fusarium</i> sp. pode ser um candidato potencial para terapia trombolítica ou prevenção de trombose.
<b>Zaferanloo et al. (178) - 2014</b>	Austrália	<i>Eremophila longifolia</i> .	<i>Alternaria alternata</i> EL-17	FS	6,5	30	-	-	69.86 BAEE units/mg	A protease de <i>A. alternata</i> EL-17 pode ser aplicada na fabricação de queijo e na coagulação do leite.

FS: fermentação submersa; FES: fermentação em estado sólido; rpm: rotações por minuto; (-) Dado não mostrado

### 5.3.3. Condições de cultivo

Diferentes fontes de carbono e nitrogênio foram utilizadas no meio de cultivo dos fungos endofíticos avaliados nos trabalhos desta revisão. Três estudos utilizaram o caldo Czapek Dox ou este meio suplementado com outras fontes de nitrogênio e carbono, como por exemplo extrato de levedura, para o cultivo dos fungos endofíticos para induzir a produção de proteases (172, 173, 178). O fungo endofítico *Verticillium* sp. cultivado no meio contendo sacarose 3%, NaNO<sub>3</sub> 0,3%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1%, extrato de levedura 0,1%, KCl 0,05%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,05% e FeSO<sub>4</sub> 0,001% obteve um atividade proteolítica de 3775 UI/mL (169). A atividade proteolítica encontrada por Meshram et al. (172) no cultivo do fungo *Lasiodiplodia pseudotheobroma* em meio Czapek Dox, que é composto de sacarose 30 g/L, NaNO<sub>3</sub> 3g/L, MgSO<sub>4</sub> 0,5 g/L, KCl 0,5 g/L, FeSO<sub>4</sub> 0,01 g/L foi de 6,514 UI/mL. A presença de uma fonte de nitrogênio orgânico (extrato de levedura) pode ter induzido uma maior produção de protease pelo fungo *Verticillium* sp. (169). Entre os 15 trabalhos avaliados nesta revisão, 12 realizaram o processo de cultivo em fermentação submersa (FS), temperatura variando de 23 °C a 35 °C e agitação de 110 a 220 rpm para o cultivo dos fungos endofíticos (131, 166-169, 171-173, 176-179). Apenas um estudo usou fermentação em estado sólido (FES) para produzir protease (174). Dois estudos não mencionaram o modo de cultivo utilizado (170, 175).

### 5.3.4. Ensaio para quantificação de protease

A atividade proteolítica pode ser medida por diferentes métodos usando diferentes substratos. Quatro artigos selecionados usaram caseína como substrato para avaliar e quantificar a atividade proteolítica (166, 168, 176, 177), em que uma unidade de atividade de protease foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 mol de tirosina ou tripsina por minuto de acordo com a curva padrão. Três trabalhos realizaram ensaio de protease utilizando azocaseína como substrato, em que uma unidade de atividade proteolítica foi definida como µg de azocaseína hidrolisada por minuto sob condições de ensaio padrão de acordo (167, 171, 179) e um trabalho utilizou azoalbumina como substrato (170). Noor et al. (175) quantificaram a atividade proteolítica usando um *kit* de quantificação enzimática e usou um derivado de

fluoresceína tiocarbamoil-caseína (FTC-caseína) como substrato. Zaferanloo et al. (178) utilizaram um *kit* de quantificação de protease (*QuantiCleave™ Protease Assay Kit* - Thermo-Scientific, USA). Quatro artigos realizaram ensaios específicos para atividade fibrinolítica. Li et al. (169) performou um ensaio enzimático adaptado de Xie et al. (180) para quantificar atividade fibrinolítica. Três trabalhos quantificaram a atividade fibrinolítica por meio de ensaio em placas de fibrina (172-174).

### **5.3.5. Caracterização enzimática**

A Tabela 6 apresenta um sumário dos resultados de caracterização dos 9 artigos que realizaram as análises de purificação e caracterização da protease produzida pelos fungos endofíticos.

#### **5.3.5.1. pH ótimo e temperatura ótimos**

A caracterização enzimática quanto ao pH e temperatura ótimos foi descrita em 10 trabalhos (166, 167, 169, 170, 173-175, 177-179). O pH ótimo das proteases produzidas variou entre 6 a 11. Seis proteases apresentaram um pH ótimo igual a 8 (167, 173-175, 177, 179). Duas proteases produzidas por *Fusarium* sp. (175) e *Alternaria alternata* (178) apresentam um pH ótimo igual a 7. A protease produzida pelo fungo *Penicillium bilaiae* apresentou um pH ótimo de 6 (166). A protease produzida por *Verticillium* sp. (169) mostrou um pH ótimo entre 9 e 10 e a protease produzida por *Acremonium typhinum* exibiu um pH ótimo entre 10 e 11 (170). A temperatura ótima das proteases relatadas nos trabalhos variou entre 25 °C e 60 °C. As proteases produzidas por *Aspergillus ochraceu* (167, 179) e *Xylaria curta* (173, 174) mostraram uma temperatura ótima de 50 °C e 35 °C, respectivamente. A protease produzida por *Penicillium bilaiae* apresentou uma temperatura ótima de 25 °C. *Verticillium* sp. produziu uma protease com temperatura ótima entre 50-60 °C (169). A proteases produzidas por *Acremonium typhinum* (170) e *Alternaria alternata* (178) apresentam temperatura ótima de 37 °C. A proteases produzidas por *Fusarium* sp. e *Penicillium citrinum* apresentaram temperatura ótima de 30 °C e 40 °C, respectivamente (175). No trabalho desenvolvido por Wu et al. (177) foi identificado

que a protease produzida por outra cepa de *Fusarium* sp. produziu um protease com temperatura ótima de 45 °C.

#### **5.3.5.2. Inibidores**

Sete dos 15 trabalhos selecionados avaliaram o efeito dos inibidores nas proteases produzidas (166, 169, 170, 173, 174, 177, 179). A protease produzida pelo fungo *Penicillium bilaiae* foi completamente inibida pelo inibidor fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), um inibidor de serino protease. Li et al. (169) identificaram que a protease produzida por *Verticillium* sp. foi totalmente inibida pelo inibidor PMSF e parcialmente inibida por dodecil-sulfato de sódio (SDS) e ditioneitol (DTT). A protease produzida pelo fungo endofítico *Aspergillus ochraceu* (179) foi inibida pelo PMSF, entretanto, foi estimulada pelo DTT e por  $\beta$ -mercaptoethanol. Esta enzima foi classificada como tiol-dependente serino protease. Lindstrom et al. (170) demonstraram que a protease produzida por *Acremonium typhinum* foi parcialmente inibida por PMSF e dicloroisocumarina (DCI), dois conhecidos inibidores de serino proteases. As proteases produzidas pelo fungo *Xylaria curta* (173, 174) em dois trabalhos foram completamente suprimidas por inibidores conhecidos de metaloproteases, como ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e ácido etilenobis(oxietilenonitrilo)tetraacético (EGTA). Wu et al. (177) identificaram que a protease produzida por *Fusarium* sp. foi inibida por PMSF e EDTA.

#### **5.3.5.3. Massa molecular**

Oito estudos determinaram o massa molecular das proteases produzidas pelos fungos endofíticos (169, 170, 172-175, 177, 179). O massa molecular das proteases encontrando nos trabalhos variou de 28 a 80 kDa, sendo que 6 apresentam massa molecular entre 28 e 34 kDa (169, 170, 173-175, 177). O fungo *Aspergillus ochraceu* apresentou a maior atividade específica de protease encontrada com massa molecular de 59 kDa (169).

#### **5.3.5.4. Sequência de aminoácidos N-Terminal**

A sequência de aminoácidos N-terminal de proteases purificadas foi realizada apenas por três artigos. Wu et al. (177) usaram o método de Edman de degradação automatizado para determinar a sequência N-terminal de uma protease fibrinolítica. A sequência N-terminal da protease produzida por *Fusarium* sp. (QASSGTPATIRVLVV) pareceu diferir fortemente de outras proteases fibrinolíticas já relatadas. A sequência N-terminal de uma protease fibrinolítica produzida por *Xylaria curta* também foi determinada pelo método de degradação de Edman automatizado. A sequência N-terminal (SNGPLPGGVWAG) mostrou diferenças em relação às enzimas fibrinolíticas de fungos relatadas anteriormente (173, 174).

#### **5.3.5.5. Parâmetros cinéticos**

Os parâmetros cinéticos de proteases produzidas pelo fungo endofítico *Xylaria curta* foram determinados em dois trabalhos. No primeiro trabalho desenvolvido por Meshram et al. (174) a constante de Michaelis ( $K_m$ ) e a velocidade máxima de reação ( $V_{max}$ ) da enzima purificada foram descritos como sendo 326,6  $\mu\text{M}$  e 0,13  $\mu\text{Mmin}^{-1}$  respectivamente para o substrato azocaseína. Em um segundo trabalho, (173) relataram o  $K_m$  e o  $V_{max}$  da enzima purificada iguais a 246  $\mu\text{M}$  and 1,22 U/ml para fibrina como substrato e além disso, os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  da protease foram 240,9  $\mu\text{M}$  e 1,10 UI/mL para o fibrinogênio como substrato.

#### **5.3.5.6. Ponto Isoelétrico**

O ponto isoelétrico (pI) foi determinado em dois trabalhos. Li et al. (169) identificaram o pI de valor igual a 8,5 de uma protease fibrinolítica purificado produzida pelo fungo *Verticillium* sp.. Wu et al. (177) isolou e purificou uma protease fibrinolítica de *Fusarium* sp. que apresentou ponto isoelétrico de 8,1.

#### **5.3.5.7. Termoestabilidade**

A estabilidade das proteases em relação a mudanças de temperatura foi relatada em três trabalhos. Ben Mefteh et al. (166) avaliou a termoestabilidade da protease produzida pelo fungo *Penicillium bilaiae* nas temperaturas 25, 30, 40, 60 e 70 °C por 20 minutos. A protease manteve totalmente estável por 20 minutos em 30 °C e perdeu 100% da sua estabilidade após 10 minutos em 70 °C. Li et al. (169) aferiu a termoestabilidade da protease produzida pelo fungo *Verticillium* sp. em temperaturas variando entre 30 e 70 °C por 30 minutos. A protease perdeu 50% da sua estabilidade em 50 °C e a 70 °C reduziu completamente sua estabilidade. El-Khonezy et al. (179) avaliou a termoestabilidade da protease produzida pelo fungo *Aspergillus ochraceus* em uma faixa de temperaturas de 25 a 80 °C por 30 minutos. A protease purificada se manteve estável com a temperatura variando de 20 a 60 °C. Depois disso, a atividade relativa da protease caiu rapidamente e a enzima perdeu 85% de sua atividade em 70 °C.

### 5.3.6. Purificação

Dentre os 15 trabalhos selecionados, 9 realizaram processos parcial ou completos de purificação das proteases (167, 169, 170, 172-175, 177, 179). Dois trabalhos purificaram parcialmente as proteases produzidas por *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (172) e *Aspergillus ochraceus* (167) utilizando métodos de precipitação com diferentes concentrações de sulfato de amônio e etanol respectivamente. Em outro trabalho, a mesma protease do fungo endofítico *A. ochraceus* foi totalmente purificada começando com o método de precipitação com sulfato de amônio seguido pela passagem em colunas cromatográficas de gel filtração e de troca iônica (Sephacryl S-200, DEAE-Sephrose e coluna CM-Sephrose, respectivamente) (179). Lindstrom et al. (170) purificaram uma protease produzida por *Acremonium typhinum* usando métodos de ultrafiltração (Centriprep-30) e em seguida, passagem em uma coluna de fenilboronato e finalmente, precipitação com metanol. Seis trabalhos realizaram processos completos de purificação com precipitação inicial com sulfato de amônio seguido de processos cromatográficos. Li et al. (169) purificaram uma protease fibrinolítica produzida pelo fungo *Verticillium* sp. aplicando uma combinação sequencial de cromatografia composta pelas colunas DEAE-52

(troca iônica), Sephadex G-75 (gel filtração) e Octyl Sepharose 4 FF (hidrofóbica). Uma protease fibrinolítica produzida pelo fungo endofítico *Xylaria curta* foi purificada utilizando uma coluna de gel filtração (Sephacryl S-300) (173, 174). Noor et al. (175) purificaram proteases produzidas pelos fungos *Fusarium* sp. e *Penicillium citrinum* usando uma cromatografia líquida de proteína rápida (FPLC) equipada com coluna Hi-Prep 26/10 Desalting e Hi-Trap Benzamidine FF. Wu et al. (177) purificou uma protease fibrinolítica produzida por outra cepa de *Fusarium* sp. utilizando dois processos: passagem por uma coluna MonoQ (troca iônica) e depois, em uma coluna Superdex 75.

**Tabela 6:** Resumo das etapas de purificação, caracterização e propriedades cinéticas das proteases de fungos endofíticos.

Referência	Método(s) de purificação	Fungo endofítico	Atividade específica (UI/mg)	Fator de purificação	Massa molecular (kDa)	Ponto isoelétrico	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	K <sub>m</sub> (μM)	V <sub>max</sub>
<i>Elgammal et al. (167)</i>	Purificação parcial - Fracionamento e precipitação com etanol	<i>Aspergillus ochraceus</i>	384,2±18.0	0,11	-	-	8	50	-	-
<i>El-Khonezy et al. (179)</i>	Precipitação – sulfato de amônio Sephacryl S-200 DEAE-Sepharose CM-Sepharose	<i>Aspergillus ochraceus</i>	111379,5±0.8	15,3	59	-	8	50	-	-
<i>Li et al. (169)</i>	Precipitação – sulfato de amônio DEAE-52 Sephadex G-75 Octyl Sepharose 4 FF	<i>Verticillium sp.</i>	3775	8,1	31	8,5	9-10	50-60	-	-
<i>Lindstrom et al. (170)</i>	Ultrafiltração (Centriprep-30 kDa) Coluna de fenilboronato Precipitação com metanol	<i>Acremonium Typhinum</i>	710 UI/ units/ng protein x10 <sup>-3</sup>	ND	34	-	10-11	37	-	-
<i>Meshram et al. (172)</i>	Purificação parcial - Fracionamento e precipitação com sulfato de amônio e dialise	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	3,56	2,01	80	-	-	-	-	-
<i>Meshram et al. (173)</i>	Precipitação – sulfato de amônio Q-sepharose	<i>Xylaria curta</i>	36,67	9,19	~33	-	8	35	246	1.22 U/ml
<i>Meshram et al. (174)</i>	Precipitação – sulfato de amônio Sephacryl S-300	<i>Xylaria curta</i>	9,22	8,37	~33	-	8	35	326.6	0.13 μM min <sup>-1</sup>
<i>Noor et al. (175)</i>	Precipitação – sulfato de amônio Hi-Prep 26/10 Desalting Hi-Trap Benzamidine FF	<i>Fusarium sp.</i>	246,92	11,2	~34	-	7	30	-	-
<i>Noor et al. (175)</i>	Precipitação – sulfato de amônio Hi-Prep 26/10 Desalting Hi-Trap Benzamidine FF	<i>Penicillium citrinum</i>	198,2	9,7	~34	-	8	40	-	-
<i>Wu et al. (177)</i>	Precipitação – sulfato de amônio Coluna MonoQ Superdex-75	<i>Fusarium sp.</i>	76,111	158,5	28	8.1	8,5	45	-	-

(-) Dado não mostrado

#### 5.4. Risco de viés

Os trabalhos selecionados neste estudo foram avaliados por meio da ferramenta GRADE, como visto na Tabela 7. Dois trabalhos foram classificados como de qualidade muito baixa e três como de baixa qualidade. Bhagobaty et al. (131) foi classificado com sérias limitações de estudo e viés de publicação por usar métodos com alto grau de interferência para a quantificação de proteases. Lindstrom et al. (170) e Rajput et al. (176) foram pontuados com limitação grave porque não mostraram o tamanho da amostra ou o ensaio não foi realizado em pelo menos triplicata. Noor et al. (175) não utilizou um substrato específico para avaliar a atividade fibrinolítica da protease produzida pelos fungos endofíticos *Fusarium* sp. e *Penicillium citrinum*. Sete estudos foram classificados como de qualidade moderada e três como de alta qualidade. Dos 15 trabalhos avaliados, nove foram pontuados como inconsistentes por não apresentarem análise estatística dos dados obtidos ou não citarem se os testes foram realizados em triplicata.

**Tabela 7:** Risco de viés com base em critérios adaptados do GRADE (165).

<b>Autor</b>	<b>Limitação de estudo</b>	<b>Inconsistência</b>	<b>Evidência indireta</b>	<b>Imprecisão</b>	<b>Viés de publicação</b>	<b>Qualidade Geral</b>
<i>Ben Mefteh et al. (166)</i>	√	√	√	√	√	++++
<i>Bhagobaty et al. (131)</i>	X	X	√	√	X	+
<i>Elgammal et al. (167)</i>	√	√	√	√	√	++++
<i>El-Khonezy et al. (179)</i>	√	√	√	√	√	++++
<i>Galeano et al. (168)</i>	√	√	X	√	√	+++
<i>Li et al. (169)</i>	X	X	√	X	√	+++
<i>Lindstrom et al. (170)</i>	X	X	√	X	√	+
<i>Matias et al. (171)</i>	√	X	X	√	√	++
<i>Meshram et al. (172)</i>	√	X	√	Incerto	√	+++
<i>Meshram et al. (173)</i>	√	X	√	Incerto	√	+++
<i>Meshram et al. (174)</i>	√	X	√	Incerto	√	+++
<i>Noor et al. (175)</i>	√	X	√	X	X	++
<i>Rajput et al. (176)</i>	√	X	√	X	X	++
<i>Wu et al. (177)</i>	√	√	√	Incerto	√	+++
<i>Zaferanloo et al. (178)</i>	X	√	√	√	√	+++

Fatores GRADE: √, sem limitações graves; X, limitações graves; Incerto, não é possível classificar o item com base nas informações disponíveis. Qualidade geral: + muito baixa, ++ baixa, +++ moderada e ++++ alta.

## 6. DISCUSSÃO

Sabe-se que a síntese de proteases por parte dos fungos acontece com a necessidade do microrganismo em executar alguma atividade específica no seu habitat. Uma vez isoladas, purificadas e caracterizadas as proteases produzidas por fungos endofíticos possuem ampla aplicação biotecnológica e industrial. Como mencionado, onze diferentes gêneros de fungos endofíticos foram identificados nos artigos avaliados (*Penicillium*, *Talaromyces*, *Mortierella*, *Paecilomyces*, *Aspergillus*, *Verticillium*, *Acremonium*, *Lasiodiplodia*, *Xylaria*, *Fusarium* e *Alternaria*) mostrando uma diversidade de fungos endofíticos produtores de proteases. Meshram et al. (173) relataram pela primeira vez a produção de uma protease fibrinolítica por espécies de *Xylaria*. Nesta revisão, foram selecionados apenas estudos que apresentassem dados quantitativos para produção de proteases. No entanto, vários outros estudos que não foram incluídos nesta revisão avaliaram qualitativamente fungos endofíticos isolados de diversas plantas como potenciais produtores de proteases (152, 153, 181-185).

Os processos de otimização buscam encontrar a melhor condição aceitável para que determinado microrganismo produza a maior quantidade possível da enzima desejada. Atualmente, a análise de variáveis por meio de metodologias estatísticas é amplamente utilizada para otimizar a produção enzimática de diversos microrganismos. São metodologias rápidas, fáceis e bastante confiáveis (180). No entanto, apenas dois estudos utilizaram metodologias estatísticas para otimizar a produção de proteases por fungos endofíticos (186). Ben Mefteh et al. (166) otimizaram a produção de protease do fungo endofítico *Penicillium bilaiae* utilizando dois métodos, Plackett-Burman Design e Box Behnken Design (metodologia de superfície resposta). Um aumento de 1086 vezes na produção de protease foi obtido após a otimização. Neste trabalho, a ferramenta Plackett-Burman Design foi utilizada para encontrar as variáveis significativas que influenciam a produção de protease. Em seguida a ferramenta Box Behnken Design foi adotada para descobrir os níveis ótimos de cada variável e a interação delas no rendimento da produção de protease. Zaferanloo et al. (178) aplicaram um experimento fatorial randomizado para otimização da produção de protease pelo fungo endofítico *Alternaria alternata*, porém o estudo de otimização não foi feito com planejamento fatorial. O uso de técnicas estatísticas são ferramentas melhores para otimizar a produção de enzimas do que o

método tradicional de uma variável por vez, pois permitem avaliar não só a influência individual que cada fator exerce na produção de enzimas, mas também a interação entre eles.

Grande parte do custo de produção de enzimas por microrganismos se deve ao meio de fermentação. A produção de proteases por microrganismos é influenciada pelos componentes presentes nos meios de cultura, principalmente pelas fontes de carbono e nitrogênio, íons metálicos, alguns fatores físicos (pH e temperatura) e tempo de incubação. A síntese de proteases extracelulares também é influenciada pela qualidade da fonte de nitrogênio no meio de fermentação. A maneira como cada fungo utiliza as fontes de carbono e nitrogênio é individual e depende de diversos fatores. Sabe-se que as proteases geralmente são produzidas na fase estacionária de crescimento e, portanto, fontes de carbono e nitrogênio exercem efeitos regulatórios sobre a síntese de enzimas (15, 187).

Dois trabalhos utilizaram o Czapek Dox como meio de cultivo que contém sacarose como fonte de carbono e nitrato de sódio como fonte inorgânica de nitrogênio (172, 173). O trabalho de Meshram et al. (174) foi o único que utilizou a técnica de fermentação em estado sólido e avaliou a influência de diferentes resíduos agroindustriais (farelo de arroz, farelo de trigo, casca de ovo, casca de laranja e casca de banana) na produção de enzimas pelo fungo *Xylaria curta*. Quatro trabalhos avaliaram o efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de protease. Ben Mefteh et al. (166) encontraram manose e extrato de malte como a melhor fonte de carbono na produção de protease pelo fungo *Penicillium bilaiae*. Elgammal et al. (167) mostraram a dextrina como melhor fonte de carbono e peptona como a melhor fonte de nitrogênio para a produção de protease pelo fungo *Aspergillus ochraceus*. Dois estudos que avaliaram as melhores fontes de carbono e nitrogênio para a produção de protease pelo fungo *Alternaria alternata* constataram glicose e soja como a melhor fonte de carbono e extrato de levedura como a melhor fonte de nitrogênio (176, 178). Fontes inorgânicas de nitrogênio não foram identificadas como melhores fontes por nenhum trabalho. De acordo com Kumar et al. (188) fontes de nitrogênio inorgânico rapidamente metabolizadas podem inibir a produção de enzimas.

Além das fontes de carbono e nitrogênio, fatores físicos também influenciam na indução ou repressão da produção de protease, como pH inicial, temperatura, velocidade de agitação e tamanho do inóculo. O pH do meio de cultura regula a síntese enzimática de microrganismos pois pode modificar a estabilidade dos substratos do meio e causar a desnaturação das enzimas, fazendo com que a enzima perca sua atividade catalítica (189). A temperatura e velocidade de agitação são fatores que regulam tanto a produtividade enzimática quanto a morfologia dos fungos. Temperaturas baixas por exemplo, podem reduzir drasticamente o metabolismo dos fungos e temperaturas altas podem causar dano celular. A velocidade de agitação baixa pode interferir na captação dos nutrientes pelo fungo enquanto velocidades altas também podem causar dano celular as células do fungo por choque. O tamanho do inóculo pode regular a produção enzimática pois quantidades grandes de inóculo podem levar a uma competição por nutrientes e redução do oxigênio dissolvido (167). Três trabalhos realizaram ensaios para identificar se algum parâmetro físico influenciou negativamente ou positivamente a produção de proteases pelos fungos endofíticos. Ben Mefteh et al. (166) avaliaram a influência da temperatura inicial e do pH do meio na produção de protease do fungo endofítico *Penicillium bilaiae*. Elgammal et al. (167) realizaram testes para medir o efeito do pH inicial, temperatura, nível de inóculo e agitação na produção de protease pelo fungo endofítico *Aspergillus ochraceus*. Meshram et al. (174) analisaram como os parâmetros temperatura, tempo de incubação e tamanho do inóculo influenciam na produção de proteases do fungo endofítico *Xylaria curta*.

A descoberta de novas fontes produtoras de proteases, como fungos endofíticos, pode ser uma boa estratégia para produzir essas enzimas em nível industrial. A produção de uma ampla gama de proteases com diferentes características físico-químicas implica na ampla aplicabilidade dessas enzimas na indústria alimentícia, farmacêutica, têxtil, de papel e de produtos sanitizantes. Por exemplo, as proteases alcalinas podem ser usadas como compostos bioaditivos nas indústrias têxteis, alimentícias e para aumentar o poder de produtos sanitizantes (190, 191). Nesta revisão, Li et al. (169) e Lindstrom et al. (170) encontraram proteases alcalinas fúngicas com pH ótimos entre 8 e 11, porém, não apresentaram ensaio para a aplicação dessas enzimas. El-Khoneyzy et al. (179) identificou uma protease alcalina

produzida pelo fungo *Aspergillus ochraceus* que se mostrou estável em detergentes comerciais, indicando sua compatibilidade como bioaditivo em detergentes. Os trabalhos publicados por Meshram et al. (173), Meshram et al. (174), Noor et al. (175) e Wu et al. (177) demonstraram a aplicação de proteases alcalinas fibrinolíticas com pH ótimo de 8.

Os parâmetros cinéticos, bem como a estabilidade térmica e o ponto isoelétrico foram apresentados em alguns trabalhos (166, 169, 173, 174, 177, 179). A caracterização enzimática é importante para avaliar a aplicação econômica e industrial dessas enzimas. É de fundamental importância entender o funcionamento e as características de cada protease para aplicá-las em processos de magnitude industrial (65).

A atividade enzimática deve ser avaliada analisando o substrato da reação e o tipo de protease. A caracterização em serina, cisteína ou metaloprotease pode ser realizada por meio de testes com inibidores, conforme demonstrado Ben Mefteh et al. (166), El-Khonezy et al. (179), Li et al. (169), Lindstrom et al. (170), Meshram et al. (173), Meshram et al. (174) e Wu et al. (177). A inibição ou ativação que alguns compostos químicos exercem sobre as enzimas é uma ferramenta muito utilizada para elucidar a natureza bioquímica das enzimas purificadas como sua estrutura e seu mecanismo de ação. Nos trabalhos desenvolvidos por Meshram et al. (173), Meshram et al. (174), por exemplo, foi identificada uma metaloprotease fibrinolítica produzida pelo fungo *Xylaria curta*, e segundo o próprio autor, a natureza de metaloprotease da enzima irá protegê-la do ataque da serpina, uma proteína que geralmente tem como alvo as serino proteases envolvidas na coagulação do sangue.

Para a caracterização de biofármacos, a análise da sequência N-terminal é tipicamente usada para confirmar a identidade da proteína. Ele fornece informações complementares para a análise de massa precisa de proteínas intactas e subunidades. De acordo com Luo et al. (192), a análise da sequência N-terminal de proteínas permite uma comparação posterior com proteínas já estudadas em trabalhos anteriores. A análise da sequência N-terminal da protease fibrinolítica encontrada por Meshram et al. (173), Meshram et al. (174) permitiu a descoberta de

uma enzima bifuncional sem homologia com as proteases fibrinolíticas depositadas nas bases de dados.

O processo de purificação de proteínas em geral envolve uma série de ações para o isolamento de uma proteína específica presente em uma mistura complexa e a remoção de compostos indesejados. Um processo de purificação ideal deve ser feito com o mínimo de passos possíveis para evitar perda da proteína desejada e ser um processo de baixo custo, porém os processos a serem utilizados vão depender da aplicação final da enzima. O nível de pureza de uma determinada protease vai depender da área que será utilizada, assim, proteases que serão destinadas para uso terapêutico devem possuir um maior nível de pureza (159).

O primeiro passo para a recuperação de proteases extracelulares envolve a separação da biomassa celular e do caldo de fermentação onde se encontra as proteases. O próximo passo, envolve a concentração das proteases que pode ser feita através de métodos de filtração ou precipitação. Nas etapas seguintes, geralmente, são feitos procedimentos que envolvem cromatografia em coluna (193). Entre os trabalhos selecionados, dois realizaram uma purificação parcial das proteases, que envolveu processos de precipitação com etanol (167) e precipitação com sulfato de amônio seguido por dialise (172). A precipitação de proteínas com sulfato de amônio é mais utilizada por ser um processo simples, barato e possuir um nível considerável de purificação e recuperação das proteínas (159). Seis estudos aplicaram métodos de precipitação de sulfato de amônio seguidos por processos cromatográficos usando cromatografia de troca iônica, cromatografia de exclusão de tamanho (169, 173, 174, 177, 179) e cromatografia de afinidade para purificação de enzima (175). Um estudo utilizou métodos de ultrafiltração (Centripep-30) seguido de passagem em coluna de fenilboronato e finalmente precipitação com metanol (170).

Conforme mencionado, as proteases são constantemente utilizadas pela indústria farmacêutica para a produção de cosméticos e medicamentos. Recentemente, fungos endofíticos têm sido usados como precursores para a produção de proteases com potencial ação fibrinolítica que podem desempenhar um papel importante na terapia trombolítica. Entre os trabalhos desta revisão, seis exploraram o potencial dos fungos endofíticos para a produção de proteases

fibrinolíticas. Os fungos endofíticos *Verticillium* sp. (169), *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (172), *Xylaria curta* (173, 174), *Fusarium* sp. (175, 177) e *Penicilium citrinum* (175) foram capazes de produzir proteases fibrinolíticas, com potencial aplicação industrial na formulação de agentes usados em terapia trombolítica.

## 7. LIMITAÇÕES

Após a análise dos trabalhos incluídos nesta revisão, alguns pontos precisam ser considerados. Dentre os trabalhos selecionados, apenas dois realizaram processos de otimização enzimática. Os dois trabalhos otimizaram a produção de enzimas com auxílio de técnicas estatísticas mostrando que as metodologias estatísticas devem ser mais utilizadas em processos de otimização, uma vez que, avaliar o efeito de parâmetros físicos e químicos utilizando o método de uma variável de cada vez, na visão dos revisores desta revisão, apenas avalia os efeitos individuais destes parâmetros na produção de enzimas e não otimiza realmente a produção. A ferramenta GRADE utilizada para avaliação da qualidade dos trabalhos foi adaptada para estudos *in vitro*, uma vez que nenhuma outra metodologia específica para análise de qualidade foi desenvolvida até o momento. Apenas três estudos foram classificados como de alta qualidade, mostrando que a maioria dos estudos avaliados apresentava algum viés de risco ou não foi capaz de responder integralmente às questões de revisão definidas nesta revisão sistemática.

## 8. CONCLUSÃO

Esta revisão sistemática apontou diferentes espécies de fungos endofíticos como excelentes produtoras de proteases, com potenciais aplicações em diversos segmentos industriais. O gênero *Penicillium* foi o mais citado entre os onze diferentes gêneros de fungos endofíticos avaliados nos trabalhos selecionados, seguido por *Aspergillus*, *Alternaria* e *Xylaria*. Sabe-se que o uso de metodologias estatísticas são as melhores ferramentas para otimizar as condições de crescimento para produção de enzimas, entretanto, apenas duas utilizaram metodologias estatísticas para otimizar a produção de protease. Isso demonstra a carência de estudos que utilizem técnicas mais eficazes para melhorar o rendimento das proteases para que possam ser produzidas em larga escala. A caracterização da enzima é um processo importante que é realizado para entender as funcionalidades e características de uma protease para avaliar seu potencial econômico e industrial. Nos artigos avaliados, diferentes fontes de carbono e nitrogênio foram utilizadas nos meios de cultura. Isso infere que os fungos endofíticos podem produzir proteases com uma ampla variedade de fontes de carbono e nitrogênio. Seis estudos comprovaram a capacidade de alguns fungos endofíticos de produzirem proteases fibrinolíticas, demonstrando que os fungos endofíticos podem ser explorados como produtores de proteases fibrinolíticas para posterior produção de agentes usados na terapia trombolítica. Portanto, observou-se o grande potencial dos fungos endofíticos como fonte de proteases com potencial aplicação na indústria farmacêutica.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Research GV. Enzymes Market Estimates and Forecasts To 2027. USA: Grand View Research, Inc.,; 2020.
2. Zimmer KR, Borré GL, da Silva Trentin D, Júnior CW, Frasson AP, de Arruda Graeff A, et al. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. *Revista liberato*. 2009;10(14):123-38.
3. Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology molecular biology reviews*. 1998;62(3):597-635.
4. Zanphorlin L, Cabral H, Arantes E, Assis D, Juliano L, Juliano M, et al. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. *Process Biochemistry*. 2011;46(11):2137-43.
5. Grand View Research GVR. Enzymes market analysis and segment forecasts to 2024. United States: Grand View Research Inc.,; 2018.
6. Gupta S, Chaturvedi P, Kulkarni MG, Van Staden J. A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi. *Biotechnology Advances*. 2020;39:107462.
7. Corrêa RCG, Rhoden SA, Mota TR, Azevedo JL, Pamphile JA, de Souza CGM, et al. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. *Journal of industrial microbiology biotechnology*. 2014;41(10):1467-78.
8. Kumar V, Sangwan P, Singh D, Kaur Gill P. Global scenario of industrial enzyme market 2014. 173-96 p.
9. Razzaq A, Shamsi S, Ali A, Ali Q, Sajjad M, Malik A, et al. Microbial Proteases Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2019;7(110).
10. Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1998;62(3):597-635.
11. Vojcic L, Pitzler C, Korfer G, Jakob F, Ronny M, Maurer KH, et al. Advances in protease engineering for laundry detergents. *New biotechnology*. 2015;32(6):629-34.
12. Homaei A, Lavajoo F, Sariri R. Development of marine biotechnology as a resource for novel proteases and their role in modern biotechnology. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016;88:542-52.
13. Mandal S, Banerjee D. Proteases from Endophytic Fungi with Potential Industrial Applications. In: Yadav A. MS, Singh S., Gupta A., editor. *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi Fungal Biology*: Springer, Cham; 2019. p. 319-59.
14. López-Otín C, Bond JS. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(45):30433-7.

15. Souza PMd, Bittencourt MLdA, Caprara CC, Freitas Md, Almeida RPCd, Silveira D, et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2015;46(2):337-46.
16. Borges WdS, Borges KB, Bonato PS, Said S, Pupo MT. Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation reactions. *Current Organic Chemistry*. 2009;13(12):1137-63.
17. Nirmal N, Shankar S, S. LR. Fungal proteases: An overview. *International Journal of Biotechnology and Biosciences*. 2011;1:1-40.
18. Del Rosso JQ. Application of protease technology in dermatology: rationale for incorporation into skin care with initial observations on formulations designed for skin cleansing, maintenance of hydration, and restoration of the epidermal permeability barrier. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*. 2013;6(6):14.
19. Pant G, Prakash A, Pavani J, Bera S, Deviram G, Kumar A, et al. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science*. 2015;9(1):50-5.
20. Zhang Y, He S, Simpson BK. Enzymes in food bioprocessing—novel food enzymes, applications, and related techniques. *Current opinion in food science*. 2018;19:30-5.
21. Jemli S, Ayadi-Zouari D, Hlima HB, Bejar S. Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes. *Critical reviews in biotechnology*. 2016;36(2):246-58.
22. Rawlings ND, Barrett AJ, Thomas PD, Huang X, Bateman A, Finn RD. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic acids research*. 2018;46(D1):D624-D32.
23. Gupta R, Beg QK, Khan S, Chauhan B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied microbiology and biotechnology*. 2002;60(4):381-95.
24. dos Santos Aguilar JG, Sato HH. Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International*. 2018;103:253-62.
25. Gurumalles P, Alagu K, Ramakrishnan B, Muthusamy S. A systematic reconsideration on proteases. *International journal of biological macromolecules*. 2019;128:254-67.
26. Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC. Industrial enzyme applications. *Current opinion in biotechnology*. 2002;13(4):345-51.
27. Shankar S, Rao M, Laxman RS. Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp. *Process Biochemistry*. 2010;46(2):579-85.
28. Rani K, Rana R, Datt S. Review on latest overview of proteases. *International Journal of Current Life Sciences*. 2012;2(1):12-8.
29. Sandhya C, Sumantha A, Szakacs G, Pandey A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process biochemistry*. 2005;40(8):2689-94.

30. Dienes D, Börjesson J, Hägglund P, Tjerneld F, Lidén G, Réczey K, et al. Identification of a trypsin-like serine protease from *Trichoderma reesei* QM9414. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007;40(5):1087-94.
31. Wu T, Mohammad AW, Jahim JM, Anuar N. Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006;39(6):1223-9.
32. Yadav SK, Bisht D, Tiwari S, Darmwal NS. Purification, biochemical characterization and performance evaluation of an alkaline serine protease from *Aspergillus flavus* MTCC 9952 mutant. *Biocatalysis Agricultural Biotechnology* 2015;4(4):667-77.
33. Macchione MM, Merheb CW, Gomes E, Da Silva R. Protease production by different thermophilic fungi. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 2008;146(1):223-30.
34. Malathi S, Chakraborty R. Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-substrate fermentation conditions for use as a depilation agent. *Applied environmental microbiology*. 1991;57(3):712-6.
35. Yang F-C, Lin I-H. Production of acid protease using thin stillage from a rice-spirit distillery by *Aspergillus niger*. *Enzyme microbial technology* 1998;23(6):397-402.
36. O'Donnell D, Wang L, Xu J, Ridgway D, Gu T, Moo-Young M. Enhanced heterologous protein production in *Aspergillus niger* through pH control of extracellular protease activity. *Biochemical Engineering Journal*. 2001;8(3):187-93.
37. Vishwanatha KS, Appu Rao AG, Singh SA. Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chemistry*. 2009;114(2):402-7.
38. Vishwanatha KS, Rao AGA, Singh SA. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2010;37(2):129-38.
39. Stanbury PF, Whitaker A, Hall SJ. Chapter 1 - An introduction to fermentation processes. In: Stanbury PF, Whitaker A, Hall SJ, editors. *Principles of Fermentation Technology* (Third Edition). Oxford: Butterworth-Heinemann; 2017. p. 1-20.
40. Biesebeke Rt, Ruijter G, Rahardjo YS, Hoogschagen MJ, Heerikhuisen M, Levin A, et al. *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations: Progress report on a multi-disciplinary project. *FEMS yeast research*. 2002;2(2):245-8.
41. Thomas L, Larroche C, Pandey A. Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 2013;81:146-61.
42. Sun SY, Xu Y. Membrane-bound 'synthetic lipase' specifically cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by *Rhizopus chinensis*: a comparative investigation. *Bioresource technology*. 2009;100(3):1336-42.
43. Germano S, Pandey A, Osaku CA, Rocha SN, Soccol CR. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme microbial technology* 2003;32(2):246-51.
44. Novelli PK, Barros MM, Fleuri LF. Novel inexpensive fungi proteases: production by solid state fermentation and characterization. *Food Chemistry*. 2016;198:119-24.

45. Silva RRd. Fermentação, purificação e caracterização da protease produzida pelo fungo *Aspergillus fumigatus* Fresenius. São José do Rio Preto - SP: Universidade Estadual Paulista; 2011.
46. Neto YAAH. Fermentação, purificação, caracterização bioquímica e microencapsulação da protease produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum*. Ribeirão Preto - SP: Universidade de São Paulo; 2012.
47. Nascimento TP, Sales AE, Porto CS, Brandão RMP, Takaki MC, Teixeira JAC, et al. Production and characterization of new fibrinolytic protease from *Mucor subullissimus* UCP 1262 in solid-state fermentation. *Advances in Enzyme Research*. 2015;3:81-91.
48. Rocha FTdB. Produção e purificação de protease obtida do fungo filamentoso *Aspergillus sydowii* por fermentação em estado sólido utilizando resíduo de café como substrato. Recife-PE: Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2018.
49. Muthulakshmi C, Gomathi D, Kumar DG, Ravikumar G, Kalaiselvi M, Uma C. Production, Purification and Characterization of Protease by *Aspergillus flavus* under Solid State Fermentation. *Jordan Journal of Biological Sciences*. 2011;4(3).
50. Chellappan S, Jasmin C, Basheer SM, Elyas K, Bhat SG, Chandrasekaran M. Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. *Process Biochemistry*. 2006;41(4):956-61.
51. Agrawal D, Patidar P, Banerjee T, Patil S. Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. *Process Biochemistry*. 2004;39(8):977-81.
52. Cha W-S, Park S-S, Kim S-J, Choi D. Biochemical and enzymatic properties of a fibrinolytic enzyme from *Pleurotus eryngii* cultivated under solid-state conditions using corn cob. *Bioresource Technology*. 2010;101(16):6475-81.
53. de Castro RJS, Nishide TG, Sato HH. Production and biochemical properties of proteases secreted by *Aspergillus niger* under solid state fermentation in response to different agroindustrial substrates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2014;3(4):236-45.
54. Niyonzima FN, More SS. Screening and optimization of cultural parameters for an alkaline protease production by *Aspergillus terreus* gr. under submerged fermentation. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2013;4(1):1016-28.
55. Silva BL, Geraldes FM, Murari CS, Gomes E, Da-Silva R. Production and characterization of a milk-clotting protease produced in submerged fermentation by the thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2014;172(4):1999-2011.
56. Yegin S, Fernandez Lahore M, Guvenc U, Göksungur MY. Production of extracellular aspartic protease in submerged fermentation with *Mucor mucedo* DSM 809. *African Journal of Biotechnology*. 2010;9:6380-6.
57. Jenitta XJ, Priya SE, Gnanadoss JJ. Optimization of culture conditions and inducers for improved protease production by *Penicillium griseofulvum* LCJ231 under

submerged fermentation. *International Journal of Advanced Biotechnology Research* 2015;6(2):152-60.

58. Wang B, Wu W, Liu X. Purification and characterization of a neutral serine protease with nematocidal activity from *Hirsutella rhossiliensis*. *Mycopathologia*. 2007;163(3):169-76.

59. Shankar S, Rao M, Laxman S. Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp. *Process Biochemistry - PROCESS BIOCHEM*. 2011;46:579-85.

60. Zanthorlin LM, Facchini FD, Vasconcelos F, Bonugli-Santos RC, Rodrigues A, Sette LD, et al. Production, partial characterization, and immobilization in alginate beads of an alkaline protease from a new thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*. 2010;48(3):331-6.

61. Negi S, Banerjee R. Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor. *Food Research International*. 2009;42(4):443-8.

62. Ferreira JVdS, Cardoso KBB, Santos ALd, Alencar VdNeS, do Nascimento MC, da Cunha MNC, et al. Produção de proteases por *Aspergillus tamaritii* Kita UCP 1279 isolado da Caatinga utilizando resíduos agroindustriais Projetos inovadores e produção intelectual na microbiologia. 2020:1-388–416.

63. da Silva Magalhães AA, de Amorim Silva T, Teixeira MFS, Cruz Filho RF, da Silva SD, Gomes DMD, et al. Produção e caracterização de enzimas proteolíticas de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693 do bioma amazônico (Polyporaceae). *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi-Ciências Naturais*. 2019;14(3):453-62.

64. Belmessikh A, Boukhalfa H, Mechakra-Maza A, Gheribi-Aoulmi Z, Amrane A. Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by *Aspergillus oryzae*. Comparative study between solid and submerged fermentations on tomato pomace. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 2013;44(3):377-85.

65. Souza PM, Aliakbarian B, Filho EXF, Magalhães PO, Junior AP, Converti A, et al. Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015;81:17-21.

66. Costa JM, Corbellini VA, Scroferneker ML. Study of different nitrogen sources on glucose uptake and production of melanin precursors and fungal mass of *Fonsecaea pedrosoi* cultured in tricyclazole. *Process Biochemistry*. 2004;39(5):633-6.

67. Basappa J, Naik GR. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemical defined medium. *Process Biochemistry*. 2001;37:139-44.

68. Hajji M, Rebai A, Gharsallah N, Nasri M. Optimization of alkaline protease production by *Aspergillus clavatus* ES1 in *Mirabilis jalapa* tuber powder using statistical experimental design. *Applied microbiology and biotechnology*. 2008;79(6):915-23.

69. Rao YK, Lu S-C, Liu B-L, Tzeng Y-M. Enhanced production of an extracellular protease from *Beauveria bassiana* by optimization of cultivation processes. *Biochemical Engineering Journal*. 2006;28(1):57-66.

70. Souza PMd. Produção de proteases por fungos filamentosos isolados do cerrado do centro-oeste brasileiro. São Paulo - SP: Universidade de São Paulo; 2015.
71. Sumantha A, Larroche C, Pandey A. Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective. *Food Technol Biotech.* 2006;44:211-20.
72. Savitha S, Sadhasivam S, Swaminathan K, Lin FH. Fungal protease: production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers.* 2011;42(2):298-304.
73. Werneck GC. Produção de proteases por fungos endofíticos isolados de plantas do Cerrado. Brasília-DF: Universidade de Brasília-DF; 2016.
74. Vieille C, Zeikus GJ. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001;65(1):1-43.
75. Niyonzima, More. Purification and properties of detergent-compatible extracellular alkaline protease from *Scopulariopsis* spp. *Preparative Biochemistry Biotechnology* 2014;44(7):738-59.
76. Niyonzima, More. Purification and characterization of detergent-compatible protease from *Aspergillus terreus* gr. *Journal 3 Biotech.* 2015;5(1):61-70.
77. Tavano OL. Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 2013;90:1-11.
78. Senai. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. *Processos Químicos - SENAI.* 2009;3.
79. Demain AL, Adrio JL. Contributions of microorganisms to industrial biology. *Molecular biotechnology.* 2008;38(1):41.
80. Sun Q, Chen F, Geng F, Luo Y, Gong S, Jiang Z. A novel aspartic protease from *Rhizomucor miehei* expressed in *Pichia pastoris* and its application on meat tenderization and preparation of turtle peptides. *Food chemistry.* 2018;245:570-7.
81. Ryder K, Ha M, Bekhit AE-D, Carne A. Characterisation of novel fungal and bacterial protease preparations and evaluation of their ability to hydrolyse meat myofibrillar and connective tissue proteins. *Food chemistry.* 2015;172:197-206.
82. Banerjee G, Ray AK. Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.* 2017;33(2):119-43.
83. Sawant R, Nagendran S. Protease: an enzyme with multiple industrial applications. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 2014;3(6):568-79.
84. Singh R, Mittal A, Kumar M, Mehta PK. Microbial proteases in commercial applications. *J Pharm Chem Biol Sci.* 2016;4(3):365-74.
85. Jisha V, Robinson BS, Selvanesan P, Sasidharan S, Kizhakkepawothail NU, Sreedharan S, et al. Versatility of microbial proteases. *Advances in enzyme research.* 2013;2013.
86. Jridi M, Lassoued I, Nasri R, Ayadi MA, Nasri M, Souissi N. Characterization and potential use of cuttlefish skin gelatin hydrolysates prepared by different microbial proteases. *BioMed research international.* 2014;2014.
87. Ward O. Proteases. *Comprehensive biotechnology.* 2011:571.

88. Manavalan T, Manavalan A, Ramachandran S, Heese K. Identification of a Novel Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus megaterium*-TK1 for the Detergent and Leather Industry. *Journal biology*. 2020;9(12):472.
89. Lima EE, Franco DG, Galeano RMS, Guimarães NCdA, Masui DC, Giannesi GC, et al. Biochemical characterization of a partially purified protease from *Aspergillus terreus* 7461 and its application as an environmentally friendly dehairing agent for leather industry. *Preparative Biochemistry Biotechnology*. 2020:1-11.
90. Craik CS, Page MJ, Madison EL. Proteases as therapeutics. *Biochemical Journal*. 2011;435(1):1-16.
91. Rodríguez D, Morrison CJ, Overall CM. Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2010;1803(1):39-54.
92. Srilakshmi J, Madhavi J, Lavanya S, Ammani K. Commercial potential of fungal protease: past, present and future prospects. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*. 2015;2(4):218-34.
93. Mane P, Tale V. Overview of microbial therapeutic enzymes. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2015;4(4):17-26.
94. Ahmad MS, Noor ZM, Ariffin ZZ. Isolation and identification fibrinolytic protease endophytic fungi from *Hibiscus* leaves in Shah Alam. *International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering*. 2014;8(10):1070-3.
95. Batista J, Clementino E, Nascimento T, Lima G, Porto T, Porto A, et al. Produção e caracterização de protease fibrinolítica de *Streptomyces parvulus* DPUA 1573. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2017;69(1):123-9.
96. Siritapetawee J, Thammasirirak S, Samosornsuk W. Antimicrobial activity of a 48-kDa protease (AMP48) from *Artocarpus heterophyllus* latex. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2012;16(1):132-7.
97. Alipour H, Raz A, Zakeri S, Djadid ND. Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2016;6(11):975-81.
98. Brandelli A, Daroit DJ, Riffel A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Applied microbiology and biotechnology*. 2010;85(6):1735-50.
99. Shubha J, Srinivas C. Diversity and extracellular enzymes of endophytic fungi associated with *Cymbidium aloifolium* L. *L Afr J Biotechnol*. 2017;16(48):2248-58.
100. Sim Y-C, Lee S-G, Lee D-C, Kang B-Y, Park K-M, Lee J-Y, et al. Stabilization of papain and lysozyme for application to cosmetic products. *Biotechnology letters*. 2000;22(2):137-40.
101. Gupta S, Chaturvedi P, Kulkarni MG, Staden JV. A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi. *Biotechnology Advances*. 2019;107462.
102. Aly AH, Debbab A, Proksch P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied microbiology and biotechnology*. 2011;90(6):1829-45.

103. Gouda S, Das G, Sen SK, Shin H-S, Patra JK. Endophytes: A Treasure House of Bioactive Compounds of Medicinal Importance. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:1538.
104. Bacon CW, White J. *Microbial endophytes*: CRC press; 2000.
105. Redecker D, Kodner R, Graham LE. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*. 2000;289(5486):1920-1.
106. Padhi L, Mohanta YK, Panda SK. Endophytic fungi with great promises: A Review. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*. 2013;3(3).
107. Kaul S, Ahmed M, Zargar K, Sharma P, Dhar MK. Prospecting endophytic fungal assemblage of *Digitalis lanata* Ehrh.(foxglove) as a novel source of digoxin: a cardiac glycoside. *3 Biotech*. 2013;3(4):335-40.
108. Suryanarayanan TS, Wittlinger SK, Faeth SH. Endophytic fungi associated with cacti in Arizona. *Mycological research*. 2005;109(Pt 5):635-9.
109. Rodriguez R, White Jr J, Arnold A, Redman aR. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New phytologist*. 2009;182(2):314-30.
110. Segaran G, Sathivelu M. Fungal endophytes: A potent biocontrol agent and a bioactive metabolites reservoir. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019;21:101284.
111. Rana KL, Kour D, Sheikh I, Dhiman A, Yadav N, Yadav AN, et al. Endophytic fungi: biodiversity, ecological significance, and potential industrial applications. *Recent advancement in white biotechnology through fungi*. India: Springer; 2019. p. 1-62.
112. Rana KL, Kour D, Sheikh I, Dhiman A, Yadav N, Yadav AN, et al., editors. *Endophytic Fungi: Biodiversity, Ecological Significance, and Potential Industrial Applications* 2019.
113. Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*. 1993;260(5105):214-6.
114. Pandi M, Kumaran RS, Choi Y-K, Kim HJ, Muthumary J. Isolation and detection of taxol, an anticancer drug produced from *Lasiodiplodia theobromae*, an endophytic fungus of the medicinal plant *Morinda citrifolia*. *African Journal of Biotechnology*. 2011;10(8):1428-35.
115. De Carvalho CR, Ferreira MC, Amorim SS, da Silva Florindo RH, De Assis JCS, Zani CL, et al. Bioactive Compounds of Endophytic Fungi Associated with Medicinal Plants. *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi*: Springer, Cham; 2019. p. 303-61.
116. Strobel G, Yang X, Sears J, Kramer R, Sidhu RS, Hess W. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology*. 1996;142(2):435-40.
117. Qiao W, Ling F, Yu L, Huang Y, Wang T. Enhancing taxol production in a novel endophytic fungus, *Aspergillus aculeatinus* Tax-6, isolated from *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Fungal biology*. 2017;121(12):1037-44.
118. Dora CL. *Preparação, caracterização e avaliação da eficácia terapêutica de microesferas de camptotecina preparadas a partir da poli- $\epsilon$ -caprolactona*. Florianópolis-SC: Universidade Federal de Santa Catarina; 2003.

119. Ran X, Zhang G, Li S, Wang J. Characterization and antitumor activity of camptothecin from endophytic fungus *Fusarium solani* isolated from *Camptotheca acuminata*. *African health sciences*. 2017;17(2):566-74.
120. Su H, Kang J-C, Cao JJ, Mo L, Hyde K. Medicinal Plant Endophytes Produce Analogous Bioactive Compounds. *Chiang Mai Journal of Science*. 2014;41:1-13.
121. Ruma K, Kumar S, Prakash HS. Antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and cytotoxic properties of fungal endophytes from *Garcinia* species. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2013;5:889-97.
122. Sunitha V, Ramesha A, Savitha J, Srinivas C. Amylase production by endophytic fungi *Cylindrocephalum* sp. isolated from medicinal plant *Alpinia calcarata* (Haw.) Roscoe. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2012;43:1213-21.
123. Rana KL, Kour D, Yadav A, Kumar V, Dhaliwal H, editors. Endophytic microbes from wheat: diversity and biotechnological applications for sustainable agriculture. Proceeding of 57th association of microbiologist of India & International symposium on "microbes and biosphere: What's new What's next"; 2016; Guwahati University, Assam, India.
124. Bezerra JD, Nascimento CC, Barbosa RdN, da Silva DC, Svedese VM, Silva-Nogueira EB, et al. Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: Diversity and biotechnological potential. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2015;46(1):49-57.
125. Shukla S, Habbu P, Kulkarni V, Jagadish K, Pandey A, Sutariya V. Endophytic microbes: a novel source for biologically/pharmacologically active secondary metabolites. *Asian Journal of Pharmacology and Toxicology*. 2014;2(3):1-6.
126. Rabha AJ, Naglot A, Sharma GD, Gogoi HK, Veer V. In Vitro Evaluation of Antagonism of Endophytic *Colletotrichum gloeosporioides* Against Potent Fungal Pathogens of *Camellia sinensis*. *Indian J Microbiol*. 2014;54(3):302-9.
127. Hegde S. Extracellular Enzymatic Activity of Endophytic Fungal Strains Isolated from Medicinal Plants Sunitha V. H, Nirmala Devi. D. and Srinivas C\*. *World Journal of Agricultural Sciences*. 2013;9:1-9.
128. Bezerra J, Santos MGS, Svedese V, Lima D, Fernandes MJS, Paiva L, et al. Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening to enzyme production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012;28.
129. Ayob FW, Simarani K. Endophytic filamentous fungi from a *Catharanthus roseus*: Identification and its hydrolytic enzymes. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2016;24(3):273-8.
130. Maria G, Sridhar K, Raviraja N. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. *Journal of Agricultural technology*. 2005;1(1):67-80.
131. Bhagobaty RK, Joshi SR. Enzymatic activity of fungi endophytic on five medicinal plant species of the pristine sacred forests of Meghalaya, India. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2012;17(1):33-40.

132. Marlida Y, Delfita R, Peri A, Gita C. Isolation, Characterization and Production of Phytase from Endophytic Fungus its Application for Feed. *Pakistan Journal of Nutrition*. 2010;9.
133. Indira K, Jayaprabha N, Balakrishnan DS, Arulmoorthy MP, Srinivasan M. Production, Purification and Characterisation of Extracellular L-asparaginase from Salt Marsh Fungal Endophytes. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2015;4:663-77.
134. Zhang HW, Song YC, Tan RX. Biology and chemistry of endophytes. *Natural product reports*. 2006;23(5):753-71.
135. Azevedo JL. *Microrganismos endofíticos*. Goiânia-GO: Embrapa; 1998.
136. Fang W. Seasonal and Habitat Dependent Variations in Culturable Endophytes of *Camellia sinensis*. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*. 2013;04.
137. Manias D, Verma A, Soni DK. 1 - Isolation and characterization of endophytes: Biochemical and molecular approach. In: Kumar A, Singh VK, editors. *Microbial Endophytes*: Woodhead Publishing; 2020. p. 1-14.
138. Rodrigues MLF, da Silva EA, Borba CE, Oliveira ACD, Kruger C, Raimundo RW, et al. Produção de enzimas hidrolíticos pela fungos endofítico *Penicillium sp* isolado de folhas de *Ricinus communis L*. *Revista Brasileira de Energias Renováveis*. 2015;4:129-45.
139. Cafêu MC, Silva GH, Teles HL, Bolzani VdS, Araújo ÂR, Young MCM, et al. Substâncias antifúngicas de *Xylaria sp.*, um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). *Química Nova*. 2005;28:991-5.
140. Adnan M, Alshammari E, Ashraf SA, Patel K, Lad K, Patel M. Physiological and Molecular Characterization of Biosurfactant Producing Endophytic Fungi *Xylaria regalis* from the Cones of *Thuja plicata* as a Potent Plant Growth Promoter with Its Potential Application. *BioMed Research International* 2018;2018:7362148.
141. Aly AH, Edrada-Ebel R, Wray V, Müller WE, Kozytska S, Hentschel U, et al. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces sp.* isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. *Phytochemistry*. 2008;69(8):1716-25.
142. Lubna, Asaf S, Hamayun M, Khan AL, Waqas M, Khan MA, et al. Salt tolerance of *Glycine max.L* induced by endophytic fungus *Aspergillus flavus* CSH1, via regulating its endogenous hormones and antioxidative system. *Plant physiology and biochemistry* : PPB. 2018;128:13-23.
143. Lubna L, Asaf S, Hamayun M, Gul H, Iqbal A, Ullah I, et al. Plant growth promoting endophytic fungi *Aspergillus fumigatus* TS1 and *Fusarium proliferatum* BRL1 produce gibberellins and regulates plant endogenous hormones. *Symbiosis*. 2018;76.
144. Kjer J, Wray V, Edrada-Ebel R, Ebel R, Pretsch A, Lin W, et al. Xanalteric Acids I and II and Related Phenolic Compounds from an Endophytic *Alternaria sp.* Isolated from the Mangrove Plant *Sonneratia alba*. *Journal of Natural Products*. 2009;72(11):2053-7.
145. Huang Q, An H, Song H, Mao H, Shen W, Dong J. Diversity and biotransformative potential of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Kadsura angustifolia*. *Research in microbiology*. 2015;166(1):45-55.

146. Petrini O, Sieber TN, Toti L, Viret O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural toxins*. 1992;1(3):185-96.
147. Seifert KA, Samson RA, deWaard JR, Houbraken J, Lévesque CA, Moncalvo J-M, et al. Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(10):3901.
148. Schulz B, Boyle C. The endophytic continuum. *Mycological research*. 2005;109(6):661-86.
149. Kerk NM, Ceserani T, Tausta SL, Sussex IM, Nelson TM. Laser Capture Microdissection of Cells from Plant Tissues. *Plant Physiology*. 2003;132(1):27-35.
150. Torres M, Tadych M, White J, Bills G. Isolation and identification of fungal endophytes. 2011. p. 153-64.
151. Garnica S, Schön ME, Abarenkov K, Riess K, Liimatainen K, Niskanen T, et al. Determining threshold values for barcoding fungi: lessons from *Cortinarius* (Basidiomycota), a highly diverse and widespread ectomycorrhizal genus. *FEMS Microbiology Ecology*. 2016;92(4).
152. Alberto RN, Costa AT, Polonio JC, Santos MS, Rhoden SA, Azevedo JL, et al. Extracellular enzymatic profiles and taxonomic identification of endophytic fungi isolated from four plant species. *Genetics and Molecular Research*. 2016;15(4).
153. Fouda AH, Hassan SE-D, Eid AM, Ewais EE-D. Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica* (Bioss.). *Annals of Agricultural Sciences*. 2015;60(1):95-104.
154. Jagannath S, Konappa N, Lokesh A, Bhuvaneshwari, Dasegowda T, Udayashankar AC, et al. Bioactive compounds guided diversity of endophytic fungi from *Baliospermum montanum* and their potential extracellular enzymes. *Analytical Biochemistry*. 2021;614:114024.
155. Zaferanloo B, Virkar A, Mahon PJ, Palombo EA. Endophytes from an Australian native plant are a promising source of industrially useful enzymes. *World journal of microbiology & biotechnology*. 2013;29(2):335-45.
156. Bezerra VHS. Produção de proteases por fungos endofíticos isolados de plantas do cerrado. Brasília - DF: Universidade de Brasília; 2019.
157. Patil MG, Pagare J, Patil SN, Sidhu AK. Extracellular enzymatic activities of endophytic fungi isolated from various medicinal plants. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2015;4(3):1035-42.
158. Thirunavukkarasu N, Suryanarayanan T, Rajamani T, Tharan M. A rapid and simple method for screening fungi for extracellular protease enzymes. *Mycosphere*. 2017;8:131-6.
159. Gentil NO. Purificação parcial de proteases termorresistentes secretadas por *Bacillus sp* SMIA-2 em culturas submersas contendo substratos de baixo custo. Campos dos Goytacazes – RJ: Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro; 2014.
160. Budiarto BR, Mustopa AZ, Tarman K. Isolation, purification and characterization of extracellular protease produced by marine-derived endophytic fungus *Xylaria psidii* KT30. *Coast Life Med*. 2015;5:930-7.

161. Zanphorlin LM, Cabral H, Arantes E, Assis D, Juliano L, Juliano MA, et al. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. *Process Biochemistry*. 2011;46(11):2137-43.
162. Devi MK, Banu AR, Gnanaprabhal G, Pradeep B, Palaniswamy M. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian journal of science technology* 2008;1(7):1-6.
163. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PG. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PLOS Medicine*. 2009;6(7):e1000097.
164. Brundrett M. Understanding the Roles of Multifunctional Mycorrhizal and Endophytic Fungi. 92006. p. 281-98.
165. Huguet A, Hayden JA, Stinson J, McGrath PJ, Chambers CT, Tougas ME, et al. Judging the quality of evidence in reviews of prognostic factor research: adapting the GRADE framework. *Syst Rev*. 2013;2:71-.
166. Ben Mefteh F, Frikha F, Daoud A, Chenari Bouket A, Luptakova L, Alenezi FN, et al. Response Surface Methodology Optimization of an Acidic Protease Produced by *Penicillium bilaiae* Isolate TDPEF30, a Newly Recovered Endophytic Fungus from Healthy Roots of Date Palm Trees (*Phoenix dactylifera* L.). *Microorganisms*. 2019;7(3):74.
167. Elgammal E, El-Khonezy M, Ahmed E, Abd-Elaziz A. Enhanced production, partial purification, and characterization of alkaline thermophilic protease from the endophytic fungus *Aspergillus ochraceus* BT21. *Egyptian Pharmaceutical Journal*. 2020;19(4):338-49.
168. Galeano RMS, Franco DG, Chaves PO, Giannesi GC, Masui DC, Ruller R, et al. Plant growth promoting potential of endophytic *Aspergillus niger* 9-p isolated from native forage grass in Pantanal of Nhecolândia region, Brazil. *Rhizosphere*. 2021;18:100332.
169. Li Y, Shuang J-L, Yuan W-W, Huang W-Y, Tan R-X. Verticase: a Fibrinolytic Enzyme Produced by *Verticillium* sp. Tj33, an Endophyte of *Trachelospermum jasminoides*. *Journal of Integrative Plant Biology - J INTEGR PLANT BIOL*. 2007;49:1548-54.
170. Lindstrom JT, Belanger FC. Purification and Characterization of an Endophytic Fungal Proteinase That Is Abundantly Expressed in the Infected Host Grass. *Plant Physiol*. 1994;106(1):7-16.
171. Matias RR, Sepúlveda AMG, Batista BN, de Lucena J, Albuquerque PM. Degradation of *Staphylococcus aureus* biofilm using hydrolytic enzymes produced by Amazonian endophytic fungi. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2021;193(7):2145-61.
172. Meshram V, Saxena S. Potential fibrinolytic activity of an endophytic *Lasiodiplodia pseudotheobromae* species. *3 Biotech*. 2016;6(1):114.

173. Meshram V, Saxena S, Paul K. Xylarinase: a novel clot busting enzyme from an endophytic fungus *Xylaria curta*. Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry. 2016;31(6):1502-11.
174. Meshram V, Saxena S, Paul K, Gupta M, Kapoor N. Production, purification and characterisation of a potential fibrinolytic protease from endophytic *Xylaria curta* by solid substrate fermentation. Applied biochemistry biotechnology. 2017;181(4):1496-512.
175. Noor Z, Ahmad M, Ariffin Z. Purification and characterisation of fibrinolytic enzymes from endophytic fungi and *Lignosus rhinocerus*. Jurnal Teknologi. 2016;78:53-7.
176. Rajput K, Chanyal S, Agrawal P, Kumar P. Optimization of protease production by endophytic fungus, *Alternaria alternata* isolated from gymnosperm tree-*Cupressus torulosa* D Don. . Word Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science. 2016;6(7):1034-54.
177. Wu B, Wu L, Chen D, Yang Z, Luo M. Purification and characterization of a novel fibrinolytic protease from *Fusarium* sp. CICC 480097. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2009;36(3):451-9.
178. Zaferanloo B, Quang TD, Daumoo S, Ghorbani MM, Mahon PJ, Palombo EA. Optimization of protease production by endophytic fungus, *Alternaria alternata*, isolated from an Australian native plant. World journal of microbiology & biotechnology. 2014;30(6):1755-62.
179. El-Khonezy MI, Elgammal EW, Ahmed EF, Abd-Elaziz AM. Detergent stable thiol-dependant alkaline protease produced from the endophytic fungus *Aspergillus ochraceus* BT21: Purification and kinetics. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2021;35:102046.
180. Xie QL, Lin J, Zhang L. A new assay of fibrinolytic enzymes. Progress in Biochemistry and Biophysics. 2001;28.
181. Sunitha VH, Devi DN, Srinivas C. Extracellular Enzymatic Activity of Endophytic Fungal Strains Isolated from Medicinal Plants Sunitha V. H, Nirmala Devi. D. and Srinivas C\*. World Journal of Agricultural Sciences. 2013;9:1-9.
182. Gupta S, Chaturvedi P. Phytochemical Screening and Extracellular Enzymatic Enumeration of Foliar Endophytic Fungal Isolates of *Centella asiatica* (L.) Urban. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 2015;35:21-4.
183. Meshram V, Kapoor N, Saxena S. Endophytic *Fusarium* isolates from *Aegle marmelos* in Western Ghats of India and their fibrinolytic ability. Sydowia 2016;68:119-30.
184. Wu B, Wu L, Ruan L, Ge M, Chen D. Screening of endophytic fungi with antithrombotic activity and identification of a bioactive metabolite from the endophytic fungal strain CICC 480097. Current microbiology. 2009;58(5):522-7.
185. Sopalun K, lamtham S. Isolation and screening of extracellular enzymatic activity of endophytic fungi isolated from Thai orchids. South African Journal of Botany. 2020;134:273-9.

186. Zhu M-J, Cheng J-R, Chen H-T, Deng M-C, Xie W-H. Optimization of neutral protease production from *Bacillus subtilis*: using agroindustrial residues as substrates and response surface methodology. *Biotechnology and applied biochemistry*. 2013;60(3):336-42.
187. Haddar A, Fakhfakh-Zouari N, Hmidet N, Frikha F, Nasri M, Kamoun AS. Low-cost fermentation medium for alkaline protease production by *Bacillus mojavensis* A21 using hulled grain of wheat and sardinella peptone. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2010;110(3):288-94.
188. Kumar CG, Takagi H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*. 1999;17(7):561-94.
189. Deb P, Talukdar SA, Mohsina K, Sarker PK, Sayem SA. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. *Springerplus*. 2013;2(1):154-.
190. Benmrad MO, Moujehed E, Ben Elhoul M, Zaraï Jaouadi N, Mechri S, Rekik H, et al. A novel organic solvent- and detergent-stable serine alkaline protease from *Trametes cingulata* strain CTM10101. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016;91:961-72.
191. Benmrad MO, Moujehed E, Ben Elhoul M, Mechri S, Bejar S, Zouari R, et al. Production, purification, and biochemical characterization of serine alkaline protease from *Penicillium chrysogenum* strain X5 used as excellent bio-additive for textile processing. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018;119:1002-16.
192. Luo Y, Matejic T, Ng C-K, Nunnally B, Porter T, Raso S, et al. Characterization and Analysis of Biopharmaceutical Proteins. *Separation Science and Technology*. 2010;10.
193. Crueger W, Crueger A. *Biotechnología: manual de microbiología industrial*: Editorial Acribia; 1993.
194. Abou El-Kassem L, Hawas UW, El-Souda S, Ahmed EF, El-Khateeb W, Fayad W. Anti-HCV protease potential of endophytic fungi and cytotoxic activity. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019;19.
195. Amobonye A, Bhagwat P, Pandey A, Singh S, Pillai S. Biotechnological potential of *Beauveria bassiana* as a source of novel biocatalysts and metabolites. *Crit Rev Biotechnol*. 2020;40(7):1019-34.
196. Baazeem A, Almanea A, Manikandan P, Alorabi M, Vijayaraghavan P, Abdel-Hadi A. In Vitro Antibacterial, Antifungal, Nematocidal and Growth Promoting Activities of *Trichoderma hamatum* FB10 and Its Secondary Metabolites. *J Fungi (Basel)*. 2021;7(5).
197. Bajwa R, Abuarghub S, Read DJ. THE BIOLOGY OF MYCORRHIZA IN THE ERICACEAE: X. THE UTILIZATION OF PROTEINS AND THE PRODUCTION OF PROTEOLYTIC ENZYMES BY THE MYCORRHIZAL ENDOPHYTE AND BY MYCORRHIZAL PLANTS. *New Phytol*. 1985;101(3):469-86.
198. Bastos A, Cardoso PG, Santos Í AFM, Trento MVC, Porto LCJ, Marcussi S. Enzymatic Modulators from *Induratia* spp. *Curr Microbiol*. 2020;77(11):3603-11.

199. Bensaci OA, Daoud H, Lombarkia N, Rouabah K. Formulation of the endophytic fungus *Cladosporium oxysporum* Berk. & M.A. Curtis, isolated from *Euphorbia bupleuroides* subsp. *luteola*, as a new biocontrol tool against the black bean aphid (*Aphis fabae* Scop.). *Journal of Plant Protection Research*. 2015;55(1):80-7.
200. Bezerra JD, Nascimento CC, Barbosa Rdo N, da Silva DC, Svedese VM, Silva-Nogueira EB, et al. Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata* : Diversity and biotechnological potential. *Braz J Microbiol*. 2015;46(1):49-57.
201. Bezerra JD, Santos MG, Svedese VM, Lima DM, Fernandes MJ, Paiva LM, et al. Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. *World journal of microbiology & biotechnology*. 2012;28(5):1989-95.
202. Borgi I, Dupuy JW, Blibech I, Lapailierie D, Lomenech AM, Rebai A, et al. Hyperproteolytic mutant of *Beauveria bassiana*, a new biological control agent against the tomato borer. *Agronomy for Sustainable Development*. 2016;36(4).
203. Bryant MK, Schardl CL, Hesse U, Scott B. Evolution of a subtilisin-like protease gene family in the grass endophytic fungus *Epichloë festucae*. *BMC Evol Biol*. 2009;9:168.
204. Cairney JWG, Burke RM. Extracellular enzyme activities of the ericoid mycorrhizal endophyte *Hymenoscyphus ericae* (Read) Korf and Kernan: Their likely roles in decomposition of dead plant tissue in soil. *Plant and Soil*. 1998;205(2):181-92.
205. da Silva MA, Santos C, Pérez-Nevado F, Lima N, da Silva Bentes JL. Enzymatic Activity And Process Of Initial Infection Of Guarana Plant (*Paullinia Cupana*) By Pathogenic And Endophytic Strains Of *Colletotrichum Guaranicola*. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 2021;44(1):67-75.
206. da Silva RR, da Rosa NG, Goncalves de Oliveira LC, Juliano MA, Juliano L, Rosa JC, et al. Biochemical Properties and Catalytic Specificity of a Novel Neutral Serine Peptidase Secreted by Fungus *Pyrenochaetopsis* sp. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2019;187(4):1158-72.
207. De Azevedo Silva F, Liotti RG, Ana Paula de Araújo B, De Melo Reis É, Passos MBS, Dos Santos EL, et al. Diversity of cultivable fungal endophytes in *Paullinia cupana* (Mart.) Ducke and bioactivity of their secondary metabolites. *PLoS ONE*. 2018;13(4).
208. Devi NN, Prabakaran JJ, Wahab F. Phytochemical analysis and enzyme analysis of endophytic fungi from *Centella asiatica*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012;2(3, Supplement):S1280-S4.
209. El-Gendy MM. Keratinase production by endophytic *Penicillium* spp. Morsy1 under solid-state fermentation using rice straw. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010;162(3):780-94.
210. George TK, SubaidaBeevi S, Asok AK, Shaikmoideen JM. PLANT GROWTH PROMOTING ENDOPHYTIC YEAST *GEOTRICHUM CANDIDUM* (JX 477426) FROM ROOTS OF *BRUGUIERA CYLINDRICA*. *Journal of Microbiology Biotechnology and Food Sciences*. 2019;9(2):267-72.

211. Gupta S, Chaturvedi P. Phytochemical screening and extracellular enzymatic enumeration of foliar endophytic fungal isolates of centella asiatica (L.) Urban. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2015;35(1):21-4.
212. Hassan SED. Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of *Teucrium polium* L. *J Adv Res*. 2017;8(6):687-95.
213. Indarmawan T, Mustopa AZ, Budiarto BR, Tarman K. Antibacterial Activity of Extracellular Protease Isolated From an Algicolous Fungus *Xylaria psidii* KT30 Against Gram-Positive Bacteria. *HAYATI Journal of Biosciences*. 2016;23(2):73-8.
214. Jalili B, Bagheri H, Azadi S, Soltani J. Identification and salt tolerance evaluation of endophyte fungi isolates from halophyte plants. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2020;17(7):3459-66.
215. Kapoor N, Rajput P, Abu Mushtaque M, Gambhir L. Bio-prospecting fungal endophytes of high altitude medicinal plants for commercially imperative enzymes. *Bioscience Biotechnology Research Communications*. 2018;11(3):370-5.
216. Katoch M, Salgotra A, Singh G. Endophytic Fungi Found in Association with *Bacopa monnieri* As Potential Producers of Industrial Enzymes and Antimicrobial Bioactive Compounds. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2014;57(5):714-22.
217. Katoch M, Singh A, Singh G, Wazir P, Kumar R. Phylogeny, antimicrobial, antioxidant and enzyme-producing potential of fungal endophytes found in *Viola odorata*. *Annals of Microbiology*. 2017;67(8):529-40.
218. Kudryavtseva NN, Pobedinskaya MA, Balabko PN, Kokaeva LY, Zaichik BT, Kutuzova NA, et al. The proteolytic activity and virulence of *Alternaria alternata* strains, isolated from tomato. *Mikologiya I Fitopatologiya*. 2017;51(2):110-6.
219. Kumar A, Jha PK, Kumar R, Kumar K, Sedolkar V. Antibacterial activity, phytochemical and enzyme analysis of crude extract of endophytic fungus, *Alternaria* sp. isolated from an ethanobotanical medicinal plant *Tridax procumbens*. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 2015;7(6):1111-5.
220. Kuzhalvaymani K, Jacqueline EL, Subha TS. Production, characterization of proteases by solid state fermentation using sugarcane bagasse by *warcupiella spinulosa*. *International Journal of Scientific and Technology Research*. 2019;8(8):384-93.
221. Leake JR, Read DJ. Proteinase activity in mycorrhizal fungi: I. The effect of extracellular pH on the production and activity of proteinase by ericoid endophytes from soils of contrasted pH. *New Phytol*. 1990;115(2):243-50.
222. Lindstrom JT, Sun S, Belanger FC. A Novel Fungal Protease Expressed in Endophytic Infection of *Poa* Species. *Plant physiology*. 1993;102(2):645-50.
223. Liu X, Jia J, Atkinson S, Camara M, Gao K, Li H, et al. Biocontrol potential of an endophytic *Serratia* sp G3 and its mode of action. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2010;26(8):1465-71.

224. Lopez-Llorca LV, Gómez-Vidal S, Monfort E, Larriba E, Casado-Vela J, Elortza F, et al. Expression of serine proteases in egg-parasitic nematophagous fungi during barley root colonization. *Fungal Genet Biol.* 2010;47(4):342-51.
225. Lumyong S, Lumyong P, McKenzie EH, Hyde KD. Enzymatic activity of endophytic fungi of six native seedling species from Doi Suthep-Pui National Park, Thailand. *Canadian journal of microbiology.* 2002;48(12):1109-12.
226. Maccheroni W, Araújo WL, Azevedo JL. Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *colletotrichum*. *Scientia Agricola.* 2004;61(3):298-302.
227. Martins J, Veríssimo P, Canhoto J. Isolation and identification of *Arbutus unedo* L. fungi endophytes and biological control of *Phytophthora cinnamomi* in vitro. *Protoplasma.* 2021.
228. Mishra A, Gond SK, Sharma VK, Verma SK, Kumar J, Singh DK, et al. Characterization of *Pseudofusicoccum adansoniae*, an Endophytic Fungus Residing in Photosynthetic Root of *Tinospora cordifolia*, a Medicinal Plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences.* 2019;89(4):1319-26.
229. Monteiro MCP, Tavares DG, Nery EM, de Queiroz MV, Pereira OL, Cardoso PG. Enzyme production by *Induratia* spp. isolated from coffee plants in Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 2020;63.
230. Orlandelli RC, de Almeida TT, Alberto RN, Polonio JC, Azevedo JL, Pamphile JA. Antifungal and proteolytic activities of endophytic fungi isolated from *Piper hispidum* Sw. *Braz J Microbiol.* 2015;46(2):359-66.
231. Prathyusha P, Rajitha Sri AB, Satya Prasad K. Diversity and enzymatic activity of foliar endophytic fungi isolated from medicinal plants of indian dry deciduous forest. *Der Pharmacia Lettre.* 2015;7(8):244-51.
232. Rajagopal K, Meenashree B, Binika D, Joshila D, Tulsi PS, Arulmathi R, et al. Mycodiversity and biotechnological potential of endophytic fungi isolated from hydrophytes. *Current Research in Environmental and Applied Mycology.* 2018;8(2):172-82.
233. Rajesh PS, Ravishankar Rai V. Hydrolytic enzymes and quorum sensing inhibitors from endophytic fungi of *Ventilago madraspatana* Gaertn. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* 2013;2(2):120-4.
234. Reddy PV, Lam CK, Belanger FC. Mutualistic fungal endophytes express a proteinase that is homologous to proteases suspected to be important in fungal pathogenicity. *Plant physiology.* 1996;111(4):1209-18.
235. Santos IR, Abdel-azeem AM, Mohesien MT, Piekutowska M, Sheir DH, da Silva LL, et al. Insights into the bioprospecting of the endophytic fungi of the medicinal plant *palicourea rigida* kunth (Rubiaceae): Detailed biological activities. *Journal of Fungi.* 2021;7(9).
236. Seshagiri S, Tallapragada P. Optimization of Process Parameters for High Biomass, alpha-amylase and Protease enzyme by *Piriformospora indica* using

Mathematical Model. Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences. 2015;6(4):916-22.

237. Sharma H, Rai AK, Chettri R, Nigam PS. Bioactivities of *Penicillium citrinum* isolated from a medicinal plant *Swertia chirayita*. Archives of Microbiology. 2021.

238. Silva RLDO, Luz JS, Da Silveira EB, Cavalcante UMT. Endophytic fungi of *Annona* spp.: Isolation, enzymatic characterization of isolates and plant growth promotion in *Annona squamosa* L. seedlings. Acta Botanica Brasilica. 2006;20(3):649-55.

239. Sopalun K, Laosripaiboon W, Wachirachaikarn A, Iamtham S. Biological potential and chemical composition of bioactive compounds from endophytic fungi associated with Thai mangrove plants. South African Journal of Botany. 2021;141:66-76.

240. Swetha S, Varma A, Padmavathi T. Statistical evaluation of the medium components for the production of high biomass,  $\alpha$ -amylase and protease enzymes by *Piriformospora indica* using Plackett–Burman experimental design. 3 Biotech. 2014;4(4):439-45.

241. Wu B, Wu L, Ruan L, Ge M, Chen D. Screening of endophytic fungi with antithrombotic activity and identification of a bioactive metabolite from the endophytic fungal strain CPCC 480097. Current Microbiology. 2009;58(5):522-7.

**Anexo 1: Estratégias de busca com palavras-chave e termos MeSH apropriados.**

Base da dados	Pesquisa
PMC (10 de setembro de 2021)	<p>((("peptide hydrolases"[MeSH Terms] OR ("peptide"[All Fields] AND "hydrolases"[All Fields]) OR "peptide hydrolases"[All Fields] OR "protease"[All Fields]) OR ("peptide hydrolases"[MeSH Terms] OR ("peptide"[All Fields] AND "hydrolases"[All Fields]) OR "peptide hydrolases"[All Fields] OR ("proteolytic"[All Fields] AND "enzyme"[All Fields]) OR "proteolytic enzyme"[All Fields]) OR ("peptide hydrolases"[MeSH Terms] OR ("peptide"[All Fields] AND "hydrolases"[All Fields]) OR "peptide hydrolases"[All Fields] OR "peptidase"[All Fields]) OR ("peptide hydrolases"[MeSH Terms] OR ("peptide"[All Fields] AND "hydrolases"[All Fields]) OR "peptide hydrolases"[All Fields] OR "proteinase"[All Fields])) AND ((endophytic[All Fields] AND ("fungi"[MeSH Terms] OR "fungi"[All Fields] OR "fungus"[All Fields])) OR (endophytic[All Fields] AND ("microbiology"[Subheading] OR "microbiology"[All Fields] OR "fungi"[All Fields] OR "fungi"[MeSH Terms])) OR mycoendophyte[All Fields])</p>
PubMed (10 de setembro de 2021)	<p>(protease OR proteolytic enzyme OR peptidase OR proteinase) AND (endophytic fungus OR endophytic fungi OR mycoendophyte)</p>
Scopus (10 de setembro de 2021)	<p>((((( (protease) OR proteinase) OR peptidase) OR proteolytic AND enzyme)) AND ((( endophytic AND fungi) OR endophytic AND fungus) OR mycoendophytics) AND (LIMIT-TO (DOCTYPE, "ar") OR LIMIT-TO (DOCTYPE, "sh"))</p>
Science Direct (10 de setembro de 2021)	<p>(protease OR proteolytic enzyme OR peptidase OR proteinase) AND (endophytic fungus OR endophytic fungi OR mycoendophyte) – Limited to: Research articles, Discussion, News, Short communications and Other</p>
Web of Science (10 de setembro de 2021)	<p>#1 TS=(protease OR proteolytic enzyme OR peptidase OR proteinase) AND #2 TS=(endophytic fungus OR endophytic fungi OR mycoendophyte) COMBINE #1 and #2</p>
Google Scholar (10 de setembro de 2021)	<p>(protease OR proteolytic enzyme OR peptidase OR proteinase) AND (endophytic fungus OR endophytic fungi OR mycoendophyte)</p>

**Anexo 2: Artigos excluídos e razões para exclusão (n=55).**

Referências	Razões de exclusão
Abou El-Kassem et al. (194)	4
Alberto et al. (152)	2
Amobonye et al. (195)	3
Ayob et al. (129)	2
Baazeem et al. (196)	2
Bajwa et al. (197)	1
Bastos et al. (198)	4
Bensaci et al. (199)	2
Bezerra et al. (200)	2
Bezerra et al. (201)	2
Borgi et al. (202)	1
Bryant et al. (203)	4
Cairney et al. (204)	1
da Silva et al. (205)	2
da Silva et al. (206)	1
De Azevedo Silva et al. (207)	2
Devi et al. (208)	2
El-Gendy (209)	1
Fouda et al. (153)	2
George et al. (210)	2
Gupta et al. (211)	2
Hassan (212)	2
Indarmawan et al. (213)	1
Jagannath et al. (154)	2
Jalili et al. (214)	2
Kapoor et al. (215)	2
Katoch et al. (216)	2
Katoch et al. (217)	2
Kudryavtseva et al. (218)	5
Kumar et al. (219)	4
Kuzhalvaymani et al. (220)	1
Leake et al. (221)	1
Lindstrom et al. (222)	2
Liu et al. (223)	1
Lopez-Llorca et al. (224)	4
Lumyong et al. (225)	2
Maccheroni et al. (226)	2
Martins et al. (227)	2
Meshram et al. (183)	2
Mishra et al. (228)	2
Monteiro et al. (229)	2
Orlandelli et al. (230)	2
Prathyusha et al. (231)	2
Rajagopal et al. (232)	2
Rajesh et al. (233)	2
Reddy et al. (234)	2
Santos et al. (235)	2
Seshagiri et al. (236)	2
Sharma et al. (237)	2
Silva et al. (238)	2
Sopalun et al. (185)	2
Sopalun et al. (239)	2
Swetha et al. (240)	2
Wu et al. (241)	2
Zaferanloo et al. (155)	2

**Razões de exclusão:**

- 1) estudos realizados com fungos não-endofíticos;
- 2) artigos com apenas estudos qualitativos de screening ou que não mediram a atividade proteolítica quantitativamente;
- 3) revisões, cartas, opiniões pessoais, capítulos de livros e conferências;
- 4) estudos que não mencionam a produção de proteases por fungos endofíticos;
- 5) estudos escritos em língua não-inglesa.