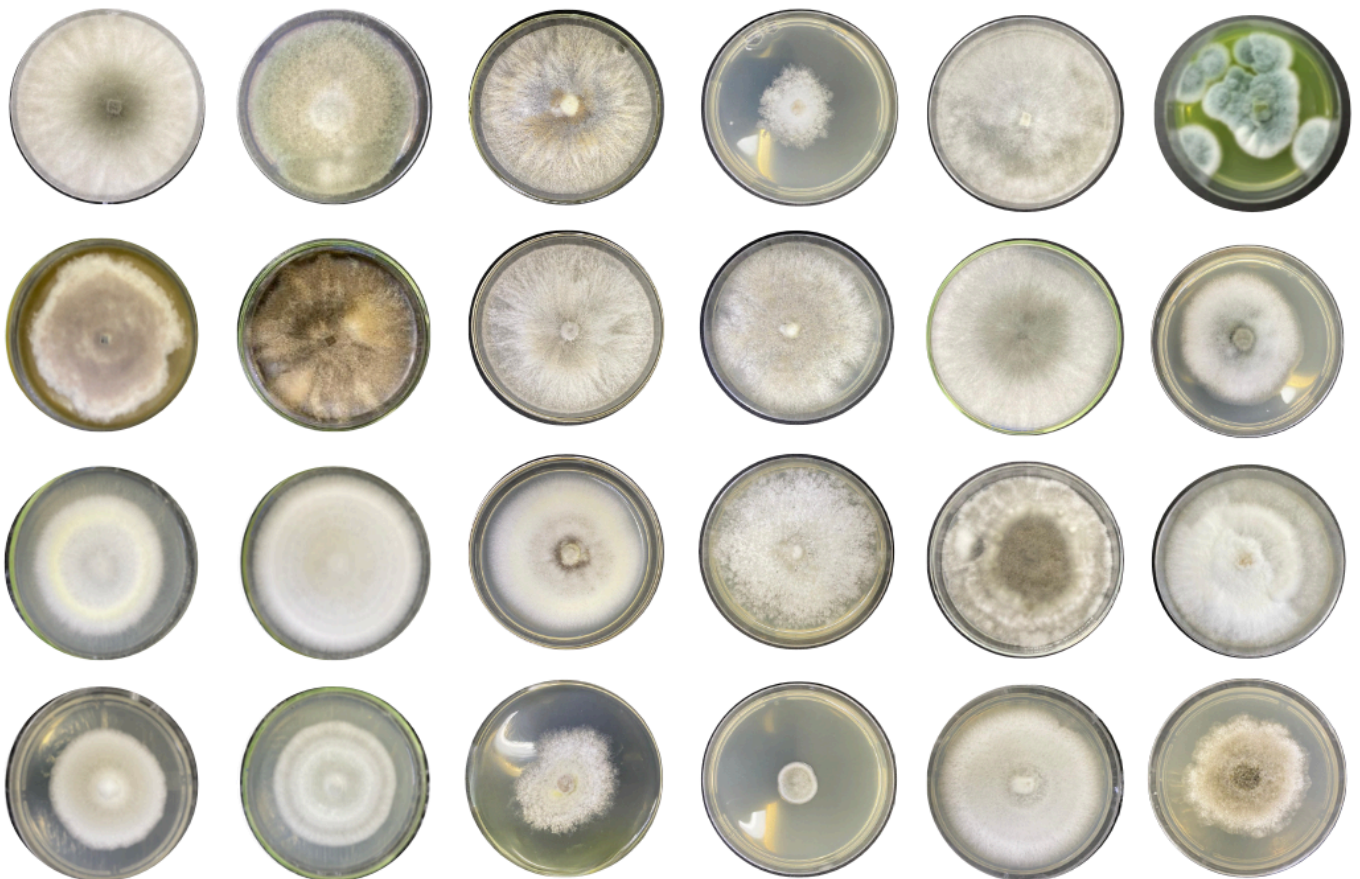


Produção de enzimas hidrolíticas por fungos endofíticos  
isolados de *Gustavia hexapetala* (Alb.) Sm. e *Myrciaria  
dubia* (Kunth) McVaugh. na Amazônia

Jennifer Matos Lopes



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA  
ESCOLA NORMAL SUPERIOR - ENS  
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS  
ISOLADOS DE *Gustavia hexapetala* (Alb.) Sm. E *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh.  
NA AMAZÔNIA**

JENNIFER MATOS LOPES

MANAUS - AM

2024

JENNIFER MATOS LOPES

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS  
ISOLADOS DE *Gustavia hexapetala* (Alb.) Sm. E *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh.  
NA AMAZÔNIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade do Estado do Amazonas como  
requisito parcial à obtenção do título de Licenciada  
em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Francisca da Silva Ferreira

Co-orientadora: Dr.<sup>a</sup> Ieda Hortêncio Batista

MANAUS - AM

2024

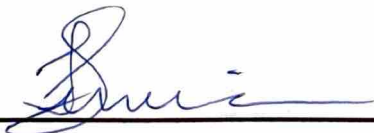
**JENNIFER MATOS LOPES**

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS  
ISOLADOS DE *Gustavia hexapetala* (Alb.) Sm. E *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh.  
NA AMAZÔNIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade do Estado do Amazonas como  
requisito parcial à obtenção do título de Licenciada  
em Ciências Biológicas.

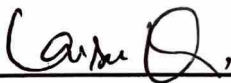
Data de aprovação: 21 de novembro de 2024.

**BANCA EXAMINADORA:**



**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Francisca da Silva Ferreira (UEA)**

Orientadora (Presidente da banca)



**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Larissa Kirsch Barbosa (UEA)**

Membro titular



**Prof. Me. Douglas de Moraes Couceiro (UFAM)**

Membro titular

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
**Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.**

L864p

Lopes, Jennifer Matos

Produção de enzimas hidrolíticas por fungos endofíticos isolados de *Gustavia hexapetala* (Alb.) Sm. e *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh. na Amazônia / Jennifer Matos Lopes . Manaus : [s.n], 2024.

70 f.: color.; 21,0 cm.

TCC - Graduação em Ciências Biológicas- Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2024.

Inclui Bibliografia.

Inclui Apêndice.

Orientador: Ferreira, Francisca da Silva.

Coorientador: Batista, Ieda Hortêncio.

1. Amazônia. 2. Biotecnologia. 3. Camu-camu. 4. Enzimas. 5. Fungos endofíticos. I. Ferreira, Francisca da Silva (Orient.) II . Batista, Ieda Hortêncio (Coorient.) III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Título

CDU(1997)57

*A todas as meninas que, assim como a pequena Jennifer, amam a vida e seus fenômenos que impressionam “como se de um conto de fadas se tratassem”, e sonham em fazer ciência como aquela que aprendemos entusiasmadamente nos livros e vemos com brilho nos olhos na televisão, mas nunca imaginando chegar tão longe.*

*“A vida não é fácil para nenhum de nós. Mas e daí? Nós devemos ter persistência e, acima de tudo, confiança em nós mesmos. Devemos acreditar que somos talentosos em alguma coisa, e que essa coisa, a qualquer custo, deve ser alcançada.” (Marie Curie)*

*Eu acreditei e cheguei aqui. Sigam seus corações, vivam a ciência!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a quem me deu a vida, me apoiou incondicionalmente e me possibilitou chegar aqui, sob sombra, seguindo meus sonhos. À meus pais, Maria Matos e Douglas Lopes, minha irmã, Jakeline, meus avós, Luiza, Edilacy e Manoel, além de toda a minha família, por todo incentivo, dedicação, cuidado, amor e carinho depositados em mim durante toda a minha vida. Eu devo tudo a vocês.

Em especial, agradeço a todos os profissionais educadores que marcaram a minha trajetória acadêmica, desde o ensino fundamental com a minha querida professora de biologia, Luciana Batista, que me inspirou a amar o estudo da vida, eu nunca lhe esqueci. Até a graduação com todos os professores do curso de Ciências Biológicas e outras instituições que fizeram parte da minha formação, que compartilharam comigo um pouco de tudo que conhecemos sobre a vida até hoje, espero fazer jus a seus nomes tão cheios de valores científicos.

Sou grata, ainda, às minhas orientadoras, Francisca Ferreira e Ieda Batista, que me adotaram desde o início com carinho e me deram, dentre tantas, a oportunidade de conhecer a rotina de um laboratório de microbiologia e biotecnologia e, principalmente, o fantástico mundo dos fungos. Obrigada também à Universidade do Estado do Amazonas (UEA) e à Escola Normal Superior (ENS) por me proporcionarem a chance de amar ainda mais o estudo da vida e apropriá-lo como bióloga.

Dentro dessa longa jornada como graduanda, conquistei lindas amizades que espero levar comigo para sempre. Em meio a tantos conhecimentos trocados, auxílios oferecidos, lágrimas derramadas e risadas compartilhadas que marcaram a minha vida e guardarei no meu coração eternamente, agradeço às minhas queridas amigas Diana Martins, Emilly Alves e Raissa Sarges, sem vocês nada disso seria possível, honestamente.

Em extensão, a melhor companhia que eu poderia encontrar, Milene Bentes. É inescrutável o quanto você me apoiou, me motivou e me ajudou a chegar até aqui, com amor, carinho e palavras cheias de compreensão e certezas quando eu tanto desacreditei de mim, sua luz sempre reluziu em mim. Você foi e é a melhor parte disso tudo, obrigada por segurar a minha mão até o final dessa caminhada, e além.

Agradeço também ao grande professor e amigo, Fernando Barbosa, que desde o início foi tão legal comigo e com quem pude aprender tantas coisas novas e impressionantes como as que a gente vê quando criança e sonha em conhecer, além de meu querido amigo Carlos Saboia, o nosso infiltrado na biologia, que sempre me animou e nunca falhou em me arrancar a mais sincera risada, sua amizade foi um conforto nos dias presos a nossa rotina cansativa.

Não posso deixar de agradecer as grandes amigas que a vida me deu e que mesmo distantes (fisicamente) pude sempre sentir no meu coração seu amor e apoio, além de enorme saudade dos nossos anos de ensino médio, Sabrina Simonetti e Nicolý Guedes. Eu amo vocês.

À irmã que eu encontrei nesse mundo, Esmeralda Marialva, que nos momentos difíceis enxugou minhas lágrimas e acreditou em mim, sou grata por sempre estar ao meu lado e ser a melhor amiga que eu poderia ter.

Ao grupo de sete pessoas que moram no outro lado do mundo e não falam a minha língua mas que me ensinaram tanto sobre amor próprio e companheirismo, as suas músicas me acompanharam e me trouxeram conforto durante toda essa trajetória, obrigada por me incentivarem a sonhar o que antes me parecia impossível.

A realização dessa pesquisa não seria possível sem a gentil colaboração das pessoas que se dispuseram a me ensinar, ajudar e generosamente disponibilizaram alguns materiais necessários, agradeço especialmente à prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Antonia de Souza por tanta generosidade, disponibilidade para me atender e todas as orientações dadas, à prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Larissa Barbosa pelos ensinamentos que tanto enriqueceram meus conhecimentos além desse trabalho, e meus parceiros de pesquisa, Raeslen Martins, Raissa Sarges, Adriano Almeida e Beatriz Araújo, que gentilmente me auxiliaram durante as práticas laboratoriais e me acompanharam, junto a risadas descontraídas sobre os experimentos falhos, nas idas ao laboratório.

Conjuntamente, sou grata ao Laboratório ILUM do HUB (EST/UEA) e ao Programa de Mestrado Profissional em Gestão e Regulação de Recursos Hídricos (Prof.Água/UEA), por permitirem a utilização das suas dependências e equipamentos para o desenvolvimento dessa pesquisa e confiarem no meu trabalho, além da Central de Coleções Microbiológicas (CCM/UEA) onde foi feita a deposição dos fungos utilizados nesta pesquisa, e ao Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) onde parte das micrografias presentes neste trabalho foram tiradas. Agradeço ainda ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo fomento durante a vigência do meu projeto de iniciação científica, cujos resultados compuseram parte desta pesquisa.

Ao sr. Altair Santos de Souza e a sr.<sup>a</sup> Irlanda Costa de Amorim, que gentilmente disponibilizaram a sua casa para a realização da coleta do material vegetal de onde parte dos fungos utilizados nesse trabalho foram isolados e que me permitiram experimentar, pela primeira vez, o delicioso sabor do camu-camu, meu profundo obrigada.

Por fim, agradeço imensamente a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a construção desse trabalho. Sem qualquer um de vocês nada disso seria possível.

Obrigada.

*Sob as pétalas de flores caindo,  
Eu corro, tão perdido neste labirinto.  
Mesmo quando eu caio e me machuco,  
Eu continuo correndo em direção ao meu sonho.*

- 방탄소년단, 2016 (Epilogue: Young Forever).

## RESUMO

A Floresta Amazônica engloba uma grande diversidade biológica de plantas e animais, além de outros seres vivos como os microrganismos, dentre estes é possível destacar os fungos endofíticos, seres que estabelecem relações ecológicas com os vegetais a partir da entrada e colonização do interior de uma variedade de tecidos da planta, como sementes, folhas, galhos e frutos. Dentro dessa associação, os endófitos são capazes de sintetizar moléculas bioativas que podem ser utilizadas em diversos ramos da indústria, tendo em vista o seu potencial biotecnológico. Pode-se destacar as enzimas, biomoléculas que atuam como catalisadores nas reações químicas que acontecem no metabolismo dos seres vivos. As enzimas podem ser utilizadas, por exemplo, na produção de tecidos, detergentes, alimentos e de couro. Devido à relevância dessas enzimas e à necessidade de ampliar os estudos enzimáticos relacionados à biodiversidade amazônica, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de hidrolases por fungos endofíticos isolados das plantas nativas da Amazônia, jeniparana (*Gustavia hexapetala*) e camu-camu (*Myrciaria dubia*). Para a obtenção dos endófitos de *M. dubia*, foram coletados fragmentos de folhas, galhos e frutos de dois indivíduos no município de Manacapuru, Amazonas. Realizou-se a lavagem do material, assepsia (utilizando álcool etílico 70%, hipoclorito de sódio 3% e água destilada autoclavada), isolamento (placas BDA + EL triplicatas com quatro fragmentos nas temperaturas de 18 °C e 28 °C), purificação e conservação dos isolados. Os fungos de *G. hexapetala* utilizados nesta pesquisa foram retirados da CCM/UEA. Selecionou-se e caracterizou-se morfológicamente 25 fungos isolados de galhos de cada uma das plantas. Dos 50 fungos selecionados, 31 foram caracterizados em seis diferentes gêneros: *Fusarium* (18%), *Penicillium* (6%), *Helicosporium* (20%), *Aspergillus* (6%), *Rhizoctonia* (6%) e *Guignardia* (6%), sendo um fungo da espécie *Aspergillus niger*. Os demais (38%) não apresentaram características reprodutivas, o que impossibilitou a identificação morfológica. Com a realização dos testes enzimáticos, 6% dos endófitos testados produziram halos de degradação amilolítica (18 mm e 10 mm) e 14% apresentaram resultados positivos para a produção de proteases (14,67 mm, 12,67 mm, 11,33 mm, 11 mm, 10,67 mm, 10 mm e 9,67 mm). Estes resultados destacam a relevância de fungos endofíticos de plantas amazônicas para aplicações biotecnológicas e enfatizam a importância de conservar essas espécies. O estudo também oferece uma base para pesquisas futuras que visem explorar mais profundamente o potencial desses fungos na produção de moléculas bioativas para aplicação em diferentes setores industriais.

Palavras-chave: Amazônia; Biotecnologia; Camu-camu; Enzimas; Fungos endofíticos.

## ABSTRACT

The Amazon Rainforest encompasses a vast biological diversity of plants and animals, as well as other living organisms such as microorganisms. Among these, endophytic fungi stand out as organisms that establish ecological relationships with plants by entering and colonizing a variety of plant tissues, including seeds, leaves, branches, and fruits. Within this association, endophytes can synthesize bioactive molecules that hold potential applications across various industrial sectors, highlighting their biotechnological potential. Enzymes, in particular, are notable biomolecules that act as catalysts in the chemical reactions occurring within the metabolism of living organisms. Enzymes have applications in industries such as textile production, detergents, food processing, and leather manufacturing. Given the relevance of these enzymes and the need to expand enzymatic studies related to Amazonian biodiversity, this study aimed to evaluate the production of hydrolases by endophytic fungi isolated from the native Amazonian plants, jeniparana (*Gustavia hexapetala*) and camu-camu (*Myrciaria dubia*). For the isolation of endophytes from *M. dubia*, fragments of leaves, branches, and fruits were collected from two individuals in the municipality of Manacapuru, Amazonas. The collected material underwent washing, asepsis (using 70% ethanol, 3% sodium hypochlorite, and autoclaved distilled water), isolation (PDA + YE plates in triplicates with four fragments incubated at 18 °C and 28 °C), purification, and preservation of isolates. The fungi from *G. hexapetala* used in this research were obtained from CCM/UEA. Twenty-five fungi isolated from branches of each plant species were selected and morphologically characterized. Of the 50 selected fungi, 31 were classified into six different genera: *Fusarium* (18%), *Penicillium* (6%), *Helicosporium* (20%), *Aspergillus* (6%), *Rhizoctonia* (6%), and *Guignardia* (6%), with one fungus identified as *Aspergillus niger*. The remaining 38% did not exhibit reproductive characteristics, making morphological identification impossible. Enzymatic tests revealed that 6% of the tested endophytes produced amylolytic degradation halos (18 mm and 10 mm), while 14% tested positive for protease production (14.67 mm, 12.67 mm, 11.33 mm, 11 mm, 10.67 mm, 10 mm, and 9.67 mm). These findings highlight the significance of endophytic fungi from Amazonian plants for biotechnological applications and emphasize the importance of conserving these species. The study also provides a foundation for future research aiming to further explore the potential of these fungi in producing bioactive molecules for use in various industrial sectors.

Keywords: Amazon; Biotechnology; Camu-camu; Enzymes; Endophytic fungi.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estados brasileiros que compõem a Amazônia Legal.....	17
Figura 2 - Aspectos morfológicos de <i>G. hexapetala</i> .....	20
Figura 3 - Aspectos morfológicos de <i>M. dubia</i> .....	22
Figura 4 - Formas de interações entre plantas e microrganismos.....	24
Figura 6 - Fluxograma da metodologia do trabalho.....	32
Figura 7 - Localização geográfica do local da coleta do material vegetal.....	33
Figura 8 - Árvores da coleta e processamento do material vegetal.....	34
Figura 9 - Metodologia de isolamento dos microrganismos endofíticos de <i>Myrciaria dubia</i> ..	35
Figura 10 - Assepsia, preparo dos fragmentos e isolamento dos fungos endofíticos.....	36
Figura 11 - Reativação e repique dos fungos endofíticos selecionados.....	38
Figura 12 - Análise micromorfológica pela técnica de microcultivo.....	39
Figura 13 - Cultivo em meio líquido e obtenção do caldo de fermentação para a realização dos testes enzimáticos.....	40
Figura 14 - Etapas do teste enzimático em <i>cup plate</i> .....	40
Figura 15 - Diferentes fungos isolados dos tecidos de <i>M. dubia</i> .....	42
Figura 16 - Frequência relativa (FR) do isolamento dos tecidos vegetais de cada indivíduo...44	
Figura 17 - Diversidade de características apresentadas pelos endófitos de <i>G. hexapetala</i> e <i>M. dubia</i> selecionados.....	45
Figura 18 - Diversidade de gêneros sugeridos dos fungos isolados de <i>G. hexapetala</i> e <i>M. dubia</i> identificados morfológicamente.....	46
Figura 19 - Halos de degradação amilolítica produzidos pelos fungos endofíticos testados....	52
Figura 20 - Halos de degradação proteolítica produzidos pelos fungos endofíticos testados...55	

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Substâncias bioativas produzidas por fungos endofíticos isolados de plantas da região Amazônica.....	27
Quadro 2 - Aspectos macro e micromorfológicos das colônias de fungos endofíticos selecionados.....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições de cultivo para o isolamento dos endofíticos de <i>Myrciaria dubia</i> .....	36
Tabela 2 - Isolamento de fungos endofíticos de diferentes tecidos de <i>Myrciaria dubia</i> por temperatura.....	42
Tabela 3 - Total de fungos isolados por indivíduo, taxa de colonização (TC) e frequência relativa (FR).....	43
Tabela 4 - Atividade amilolítica dos fungos endofíticos isolados de <i>G. hexapetala</i> testados..	52
Tabela 5 - Atividade amilolítica dos fungos endofíticos isolados de <i>M. dubia</i> testados.....	53
Tabela 6 - Produção de amilases por <i>Aspergillus</i> spp. em fermentação submersa.....	54
Tabela 7 - Atividade proteolítica dos fungos endofíticos isolados de <i>G. hexapetala</i> testados.	55
Tabela 8 - Atividade proteolítica dos fungos endofíticos isolados de <i>M. dubia</i> testados.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrômetro
BDA + EL	Batata, dextrose, ágar + extrato de levedura
B.O.D.	Demanda Biológica de Oxigênio
CCM	Central de Coleções de Microrganismos
$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	Álcool etílico
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EST	Escola Superior de Tecnologia
FUNAI	Fundação Nacional dos Povos Indígenas
$\text{H}_2\text{O}$	Água
INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
km	Quilômetro
mL	Mililitro
mg	Miligrama
NaClO	Hipoclorito de Sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Potencial de inibição
rpm	Rotações por minuto
sp.	Espécie
spp.	Espécies
T + A	Tetraciclina + Ampicilina
TIs	Terras Indígenas
UEA	Universidade do Estado do Amazonas

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.</b>	<b>Floresta Amazônica: características, biodiversidade e importância.....</b>	<b>17</b>
2.2.1.	<i>Gustavia hexapetala</i> (Alb.) Sm. (Lecythidaceae).....	19
2.2.2.	<i>Myrciaria dubia</i> (Kunth) McVaugh. (Myrtaceae).....	21
<b>2.3.</b>	<b>Fungos endofíticos e a relação fungo-planta.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4.</b>	<b>Moléculas bioativas e suas aplicações biotecnológicas.....</b>	<b>24</b>
2.4.1.	Produção de enzimas hidrolíticas.....	28
2.4.1.1.	<i>Amilases</i> .....	29
2.4.1.2.	<i>Proteases</i> .....	29
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1.</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>31</b>
<b>3.2.</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>31</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1.</b>	<b>Coleta do material vegetal.....</b>	<b>33</b>
<b>4.2.</b>	<b>Desinfecção do material vegetal e isolamento de fungos endofíticos de <i>Myrciaria dubia</i> (Kunth) McVaugh. (Myrtaceae).....</b>	<b>35</b>
<b>4.3.</b>	<b>Purificação e análise de dados do isolamento.....</b>	<b>36</b>
<b>4.4.</b>	<b>Seleção dos fungos endofíticos.....</b>	<b>37</b>
<b>4.5.</b>	<b>Reativação das linhagens fúngicas.....</b>	<b>37</b>
<b>4.6.</b>	<b>Caracterização morfológica.....</b>	<b>38</b>
<b>4.7.</b>	<b>Análise qualitativa da atividade enzimática.....</b>	<b>39</b>
4.7.1.	Preparo do caldo de fermentação.....	39
4.7.2.	Ensaio qualitativo <i>cup plate</i> .....	40
4.7.3.	Determinação da produção de enzimas e análise de dados.....	41
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>5.1.</b>	<b>Isolamento e purificação de fungos endofíticos de <i>Myrciaria dubia</i> (Kunth) McVaugh (Myrtaceae).....</b>	<b>42</b>

5.1.1.	Análise de dados do isolamento.....	43
<b>5.2.</b>	<b>Seleção e reativação dos fungos endofíticos.....</b>	<b>45</b>
<b>5.3.</b>	<b>Caracterização morfológica.....</b>	<b>45</b>
<b>5.4.</b>	<b>Análise da atividade amilolítica.....</b>	<b>51</b>
<b>5.5.</b>	<b>Análise da atividade proteolítica.....</b>	<b>54</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>58</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>59</b>
	<b>APÊNDICE A - Preparo dos meios de cultura.....</b>	<b>68</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Amazônia representa uma grande diversidade biológica de espécies que compõem a fauna, a flora e a funga, além de outros grupos de seres vivos, como as bactérias, as algas e os protozoários (Lopes *et al.*, 2020; Lemos *et al.*, 2021; Lopes *et al.*, 2023). Dentro do ecossistema amazônico, muitos desses organismos estão intimamente associados e desempenham funções vitais para a sua sobrevivência; uma das relações ecológicas mais estudadas nas últimas décadas é aquela estabelecida entre a flora e a funga, através do endofitismo (Barros *et al.*, 2023).

O termo endofítico foi introduzido pela primeira vez por Bary em 1866, para descrever qualquer organismo vivo que habita os tecidos internos dos vegetais. Com o desenvolvimento de pesquisas envolvendo essa relação, entende-se que fungos endofíticos são aqueles organismos que habitam o interior dos tecidos das plantas, em algum ponto do seu ciclo de vida, sem causar danos aparentes ao hospedeiro (Azevedo; Araújo, 2007; Moraes *et al.*, 2020; Martins *et al.*, 2024). Esses seres vivos podem colonizar uma grande variedade de estruturas da planta, como semente, óvulo, fruto, caule, raiz, folha, tubérculo, broto, lenho, raque e casca (Boas *et al.*, 2020).

Segundo Amaral e colaboradores (2023), na interação fungo-planta, os fungos obtêm nutrientes da planta e, como contrapartida, podem aumentar a resistência do vegetal ao estresse ambiental, protegendo-o contra patógenos, herbívoros e insetos por meio da produção de metabólitos secundários, que muitas vezes são semelhantes aos produzidos pela planta (Maia *et al.*, 2020; Monteiro *et al.*, 2020; Barros *et al.*, 2023). Nesse sentido, alguns endófitos são capazes de produzir compostos químicos que foram originalmente identificados como sendo produzidos apenas pela planta hospedeira (Barros *et al.*, 2023), o que tornou bastante significativo o estudo de fungos endofíticos associados a plantas medicinais em busca de novas moléculas naturais (Kusari *et al.*, 2008; Facundo *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2024).

Os metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos mostraram-se promissores devido à sua grande diversidade estrutural e bioatividades (Agrawal *et al.*, 2022; Maciel, 2024), como antimicrobianos (Souza *et al.*, 2021; Lin *et al.*, 2023), enzimas (Monteiro *et al.*, 2020; Torres *et al.*, 2022), biosurfactantes (Ferreira, 2020), antioxidantes e anticolinesterásicos (Alves *et al.*, 2020), antifúngicos (Maciel, 2024) e antitumorais (Alves, 2023).

Dentre as diversas moléculas bioativas que podem ser produzidas por fungos endofíticos destacam-se as enzimas, biomoléculas que atuam como catalisadores de reações

biológicas e podem ser isoladas e purificadas para serem utilizadas em diversas indústrias (Martins *et al.*, 2024), como para o processamento de alimentos, na indústria têxtil, produção de couro, fabricação de detergentes, produtos farmacêuticos, terapias médicas e biologia molecular (Specian; Costa; Pamphile, 2021). As enzimas microbianas possuem alta rentabilidade, baixo custo de produção, estabilidade em condições extremas e facilidade para manipulação genética, tornando a utilização de fungos endofíticos para a produção e obtenção de enzimas um processo promissor para a biotecnologia (Specian; Costa; Pamphile, 2021).

Diversos estudos demonstraram que fungos endofíticos são capazes de produzir uma ampla variedade de enzimas, podendo-se destacar as amilases, que atuam na catalisação da hidrólise de ligações glicosídicas entre as unidades de glicose das moléculas de amido, e as proteases, que realizam a catalisação da hidrólise das ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas (Monteiro *et al.*, 2020; Torres *et al.*, 2023; Martins *et al.*, 2024).

Outrossim, estima-se que existam cerca de 1 milhão de microrganismos endofíticos diferentes habitando os tecidos vegetais, entretanto, poucas espécies de plantas tropicais já foram estudadas e ainda se sabe pouco sobre os detalhes do funcionamento da interação fungo-planta e os mecanismos de produção de metabólitos secundários dentro dessa relação, além das suas aplicabilidades (Esposito; Azevedo, 2010; Ferreira, 2020).

Pela importância dada à produção de moléculas bioativas para a biotecnologia, destaca-se a necessidade do desenvolvimento de estudos sobre a atividade metabólica de microrganismos a partir da biodiversidade Amazônica. Assim, ao considerar analisar metabólitos microbianos de origem endofítica, é recomendado pesquisar isolados de plantas que já possuem aplicação etnobotânica (Ferreira, 2020).

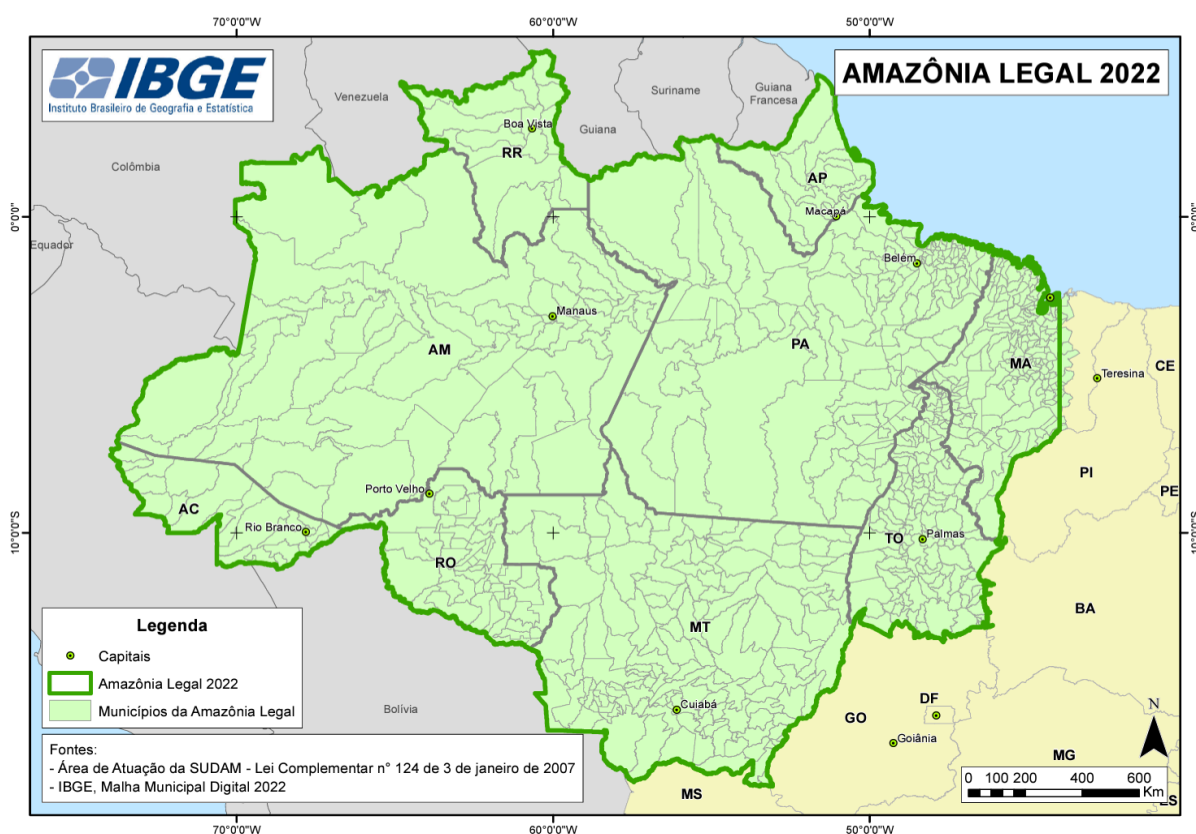
Dessa forma, o presente trabalho visa contribuir com conhecimentos sobre a produção de enzimas hidrolíticas por fungos presentes nos tecidos internos das plantas nativas da Amazônia, jeniparana, *Gustavia hexapetala* (Alb.) Sm. (Lecythidaceae), que apresenta potencial antirreumático e auxilia no tratamento de problemas hepáticos (Corrêa, 1994; Revilla, 2002), e camu-camu, *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh. (Myrtaceae), conhecida pelo alto nível de compostos antioxidantes e potencial antidiabético (García-Chacón *et al.*, 2023), a fim de corroborar com futuros estudos relacionados à taxonomia de fungos endofíticos potencialmente produtores de moléculas bioativas e a aplicação biotecnológica desses compostos.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Floresta Amazônica: características, biodiversidade e importância

A Amazônia é uma floresta tropical que se destaca mundialmente por sua grande biodiversidade e extensão, cobrindo cerca de sete milhões de km<sup>2</sup> entre nove países da América do Sul, sendo que a maior parte ocupa aproximadamente 59% do território brasileiro (Santos *et al.*, 2021; Lopes *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2023), incluindo os Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins e Maranhão, região conhecida como Amazônia Legal (Figura 1) (IBGE, 2022; Silva *et al.*, 2023).

Figura 1 - Estados brasileiros que compõem a Amazônia Legal.



Fonte: IBGE, 2022.

A sua vegetação é caracterizada como floresta ombrófila densa e pode ser dividida em três fisionomias: floresta de igapó, floresta de várzea e floresta de terra firme; seu clima é predominantemente equatorial úmido; 75% dos seus solos são ácidos e inférteis, principalmente podzólicos e latossolos; além disso, comporta a maior bacia hidrográfica do

mundo, representando 5% das terras emersas e cerca de 20% da água doce que deságua nos oceanos (Arruda *et al.*, 2023; Bringel *et al.*, 2024).

Este bioma abriga cerca de 60 mil espécies descritas, incluindo plantas, mamíferos, répteis, invertebrados, anfíbios, peixes e aves, apresentando um elevado nível de endemismo. Isso representa aproximadamente 15% da biodiversidade global (Feng *et al.*, 2021; Mendonza *et al.*, 2023). Mas além da flora e fauna, a Floresta Amazônica abriga uma biodiversidade aparentemente invisível a olho nu, representada pela microbiota que pode estar presente no solo, na água, no ar e em associação com outros seres vivos, como as plantas (Lopes *et al.*, 2020; Lemos *et al.*, 2021; Barros *et al.*, 2023). Segundo a Flora e Funga do Brasil (2024), 1222 espécies de fungos habitam a Amazônia.

Com cerca de 25% de sua área total formada por Terras Indígenas (TIs), essa região também é lar de comunidades cuja riqueza cultural, saberes ancestrais e práticas tradicionais são essenciais para a preservação ambiental (FUNAI, 2023). Ademais, a Floresta Amazônica desempenha um papel importante em alguns processos ambientais, como na fixação de carbono, ciclagem da água e regulação do clima, assim como atua de forma significativa no cenário econômico do Brasil, seja através de produções rurais e outras formas de explorações que utilizam seus recursos naturais para comércio ou uso próprio (Silva *et al.*, 2023).

Apesar de sua importância ambiental, a Amazônia tem enfrentado altos níveis de desmatamento e queimadas há décadas, mas que aumentaram de forma alarmante nos últimos anos (INPE, 2020; Silva *et al.*, 2023). Desde a década de 1960, mais de 20% da cobertura florestal da Amazônia foi perdida devido ao desmatamento e às queimadas. Estima-se que essa perda possa aumentar entre 21% e 40% até 2050, afetando significativamente a biodiversidade local (Feng *et al.*, 2021). Estas ocorrências geram danos irreversíveis ao meio ambiente e à biodiversidade, levando à expansão de áreas degradadas e afetando os estoques de carbono. Ademais, prejudicam as espécies exploradas no extrativismo, o que resulta na extinção de várias espécies da fauna, flora, funga e outros microrganismos (Lopes *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2023).

## 2.2. Espécies hospedeiras

As espécies amazônicas hospedeiras utilizadas neste trabalho foram a jeniparana, *Gustavia hexapetala* (Alb.) Sm. (Lecythidaceae), e o camucamuzeiro, *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh. (Myrtaceae), que serão abordadas a seguir.

### 2.2.1. *Gustavia hexapetala* (Alb.) Sm. (Lecythidaceae)

A família Lecythidaceae A.Rich., pertencente à ordem Ericales, abrange árvores de sub-bosque a emergentes e alguns arbustos, possui 24 gêneros e 355 espécies com distribuição pantropical de ocorrência na Ásia, África, Austrália e América tropical. No Brasil, ocorrem 10 gêneros e 121 espécies (Flora e Funga do Brasil, 2024), com predomínio de riqueza na Amazônia, onde apresenta grande relevância econômica, cultural e ecológica, além de ser emblemática da antiga Floresta Tropical Amazônica (Ribeiro *et al.*, 2022). A Amazônia Central apresenta uma diversidade particularmente elevada de Lecythidaceae, resultado de uma combinação de maior endemismo em comparação a outras regiões e migrações de áreas adjacentes (Milton *et al.*, 2022).

As lecitidáceas ocupam o terceiro lugar em termos de abundância na Floresta Amazônica, ficando atrás apenas de Fabaceae e Sapotaceae, contém um dos gêneros e espécie de árvores amazônicas mais abundantes, a *Eschweilera coriacea* (DC.) S.A.Mori (Steege *et al.*, 2020). Os membros da família são predominantes em diferentes estratos florestais e desempenham um papel crucial em processos biogeoquímicos globais, como o sequestro de carbono (Milton *et al.*, 2022). Duas espécies de Lecythidaceae estão entre as três principais espécies que contribuem para a biomassa na Amazônia de terras baixas: a mata-matá, *E. coriacea*, e a castanheira-da-Amazônia, *Bertholletia excelsa* Bonpl. (Draper *et al.*, 2021; Ribeiro *et al.*, 2022).

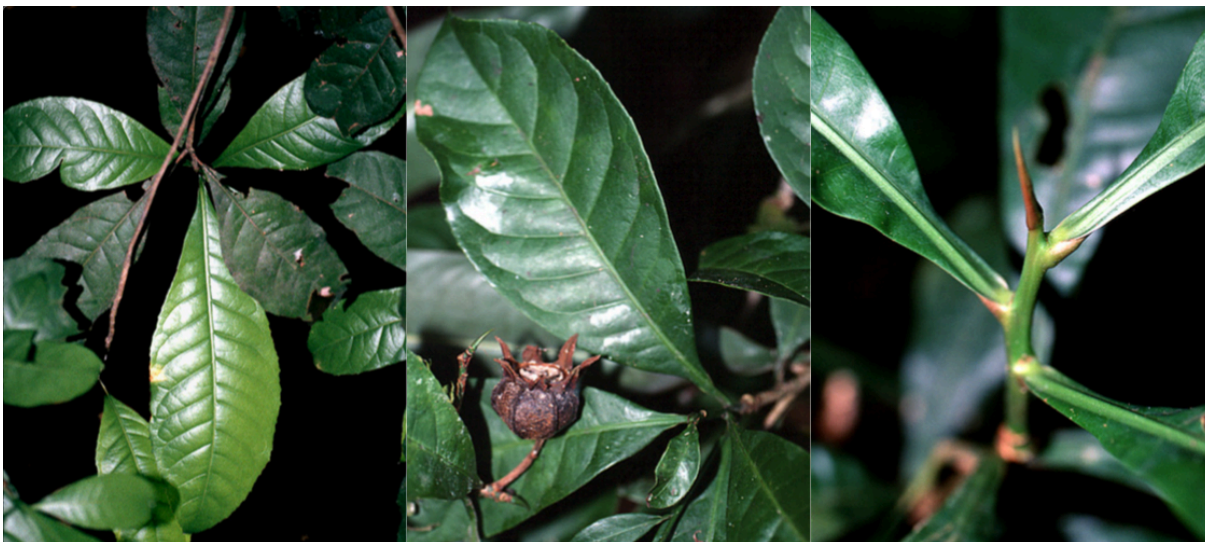
Dentre os gêneros que compõem essa família, *Gustavia* L. possui aproximadamente 40 espécies distribuídas na América Tropical (Prance; Mori, 1979; Ferreira, 2020). No território brasileiro, há registros de dez espécies, das quais quatro são endêmicas. Elas ocorrem principalmente nos domínios fitogeográficos da Amazônia e da Mata Atlântica, com distribuição nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste (Flora e Funga do Brasil, 2024).

Diversos compostos químicos já foram isolados de espécies que pertencem a este gênero, alguns estudos químicos para o tratamento de leishmaniose comprovam atividade antitumoral e anti-inflamatória (Bastos *et al.*, 2007). Realizando pesquisas com a casca do caule de *G. augusta*, Souza *et al.* (2001) isolaram 16 compostos; Almeida *et al.* (2014) isolaram 14 compostos utilizando a casca do caule e as folhas de *G. eliptica*; Pettit *et al.* (2004) isolaram 4 substâncias dos extratos de casca do caule e galhos de *G. hexapetala*, em que identificaram um inibidor de linhagens de células tumorais denominada gustastatina.

*Gustavia hexapetala* (Alb.) Sm. (Figura 2) é conhecida especialmente por suas propriedades medicinais. O uso da casca do caule é relatado como antirreumático (Revilla,

2002), enquanto as folhas são utilizadas no tratamento de problemas hepáticos e na redução de úlceras, seus frutos são usados como eméticos, para induzir o vômito, e a casca da raiz é descrita como tônica e laxativa (Corrêa, 1994).

Figura 2 - Aspectos morfológicos de *G. hexapetala*.



Fonte: Foster, 1992.

Essa espécie ocorre na vegetação de terra firme da Floresta Amazônica e está distribuída, no Brasil, nas regiões Norte (Acre, Amazonas, Pará, Rondônia e Roraima) e no Centro-Oeste (Mato Grosso). É conhecida como jeniparana, mata-fome, castanha-fedorenta, entre outros nomes populares (Flora e Funga do Brasil, 2024).

O estudo de Ferreira (2020) foi pioneiro no isolamento de fungos endofíticos de *G. hexapetala*. Foram obtidos 399 fungos isolados de fragmentos de folhas e galhos que foram agrupados em 20 morfogrupos com oito gêneros identificados: *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Penicillium*, *Guignardia*, *Phomopsis*, *Xylaria*, *Diaphorthe* e os demais desconhecidos (*Mycelia sterilia*). Ao serem realizados testes com 24 destes para a produção de biossurfactantes, 9 apresentaram resultados promissores. Martins e colaboradores (2024), testaram 35 fungos endofíticos de *G. hexapetala* para produção das enzimas hidrolíticas amilases e proteases, dos quais 14,28% apresentaram atividade amilolítica e 51,42% atividade proteolítica.

### 2.2.2. *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh. (Myrtaceae)

A família Myrtaceae Juss. faz parte da ordem Myrtales e é composta por arbustos, subarbustos e árvores que podem ser encontradas em ambiente aquático, terrícola e rupícola. Abrange cerca de 140 gêneros e 6.000 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, com maior diversidade na América do Sul, Austrália, Sudeste Asiático e algumas na África. No Brasil, ocorrem 20 gêneros e 1.208 espécies, distribuídas nos domínios fitogeográficos: Floresta Amazônica, Caatinga, Cerrado, Floresta Atlântica, Pampa e Pantanal (Flora e Funga do Brasil, 2024).

As mirtáceas têm grande relevância econômica e cultural no Brasil. Por exemplo, o eucalipto (*Corymbia* spp. e *Eucalyptus* spp.) é amplamente utilizado na indústria de papel e celulose, enquanto espécies de *Eucalyptus* e *Melaleuca* são valorizadas por suas propriedades antissépticas, pesticidas naturais e uso na perfumaria, devido à presença de óleos aromáticos nas folhas (Silveira *et al.*, 2021). Especiarias como cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr.) e pimenta-da-jamaica (*Pimenta dioica* (L.) Merr. & L.M.Perry) são populares na culinária brasileira. Além disso, espécies de *Eugenia* e *Myrcia* são utilizadas na medicina tradicional como pedra-ume-caá (Saber *et al.*, 2023; Flora e Funga do Brasil, 2024).

Devido aos seus frutos carnosos, várias espécies brasileiras de Myrtaceae são frequentemente cultivadas. Na região amazônica, destacam-se o araçá-boi (*Eugenia stipitata* McVaugh), araçá-pera (*Psidium acidum* (DC.) Landrum), ata (*Annona squamosa* L.), cajá (*Spondias mombin* L.) e camu-camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh.) (Borges *et al.*, 2022).

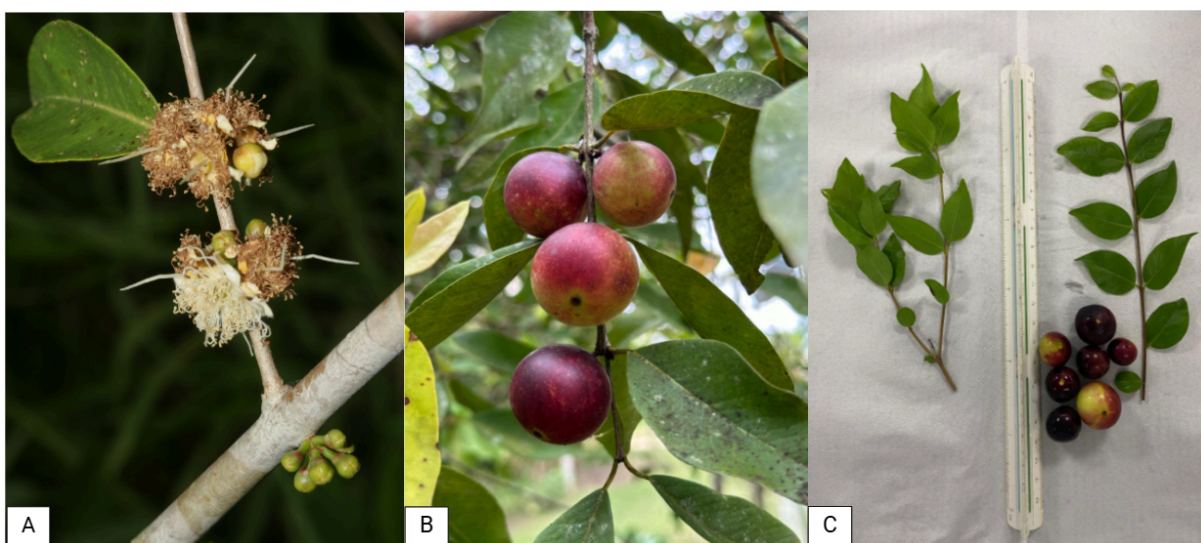
O gênero *Myrciaria* O.Berg possui numerosas espécies frutíferas e está distribuído principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do continente americano, pode ser encontrado em quase todo o território brasileiro, onde há registros de ocorrência de 25 espécies, sendo 18 endêmicas (Flora e Funga do Brasil, 2024).

Além do consumo dos frutos, tanto frescos quanto processados em sucos, geleias e doces, todas as partes das plantas desse gênero são utilizadas para fins terapêuticos ou industriais, como em cosméticos, conservantes alimentares e produtos farmacêuticos. Cascas, folhas, brotos, sementes, raízes e caules são empregados em diversas preparações e formas de aplicação (Faria *et al.*, 2019), há relatos de uma variedade de fitocompostos produzidos que apresentam efeitos inseticidas, antibacterianos, anti-inflamatórios, analgésicos, antioxidantes e citoprotetores, como kaempferol, quercetina, compostos fenólicos, isoquercetina, taninos

hidrolisáveis, antocianinas, flavonoides, entre outros (Pereira *et al.*, 2020; Quatrin *et al.*, 2020; Menezes Filho, 2021).

O camucamuzeiro, *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh. (Figura 3), também conhecido como caçari ou araçá d'água, é uma espécie frutífera perene de porte arbustivo, nativa da região amazônica. Ela ocorre nas áreas inundáveis das margens de rios e igarapés da bacia amazônica. Sua distribuição geográfica abrange os rios da Amazônia peruana, brasileira, colombiana, venezuelana e da Guiana Inglesa (Costa, 2019; Percio *et al.*, 2021).

Figura 3 - Aspectos morfológicos de *M. dubia*.



Fonte: (A) Ripley, 2009; (B, C) Autoria própria.

O camu camu é considerado uma matriz complexa que contém ácidos graxos, alguns aminoácidos, compostos voláteis, minerais e vitaminas, incluindo a vitamina C (ácido ascórbico) (García-Chacón *et al.*, 2023). Também possui moléculas bioativas, como antocianinas (cianidina-3-O-glicosídeo e delphinidina-3-O-glicosídeo), flavonóis (miricetina e quercetina), elagitaninos (ácido elágico e seus derivados), proantocianidinas e carotenóides (luteína,  $\beta$ -caroteno, violaxantina e luteoxantina), que integram seu perfil químico e podem ser utilizados para atrasar ou prevenir diversas doenças crônicas, como dislipidemias, obesidade, doenças cardiovasculares e câncer (Percio *et al.*, 2021; García-Chacón *et al.*, 2023).

Corrêa *et al.* (2015), isolaram 307 fungos endofíticos associados às folhas e caules de *M. dubia*, foram realizados testes para avaliar a atividade antagonista em relação à produção de substâncias voláteis e difusíveis contra os fitopatógenos: *Monilinia fructicola*,

*Colletotrichum gloeosporioides* e *Aspergillus parasiticus*. Observou-se que 22 isolados inibiram o crescimento de pelo menos um dos fitopatógenos alvo, apresentando um potencial de inibição (PI) variando de 25,62% a 93,84%.

### **2.3. Fungos endofíticos e a relação fungo-planta**

Ao longo do processo evolutivo as plantas desenvolveram mecanismos adaptativos complexos, muitos dos quais resultam de interações com microrganismos (Figura 4). A literatura aponta que todas as espécies de plantas que existem no mundo possuem algum microrganismo associado (Esposito; Azevedo, 2010; Martins *et al.*, 2024).

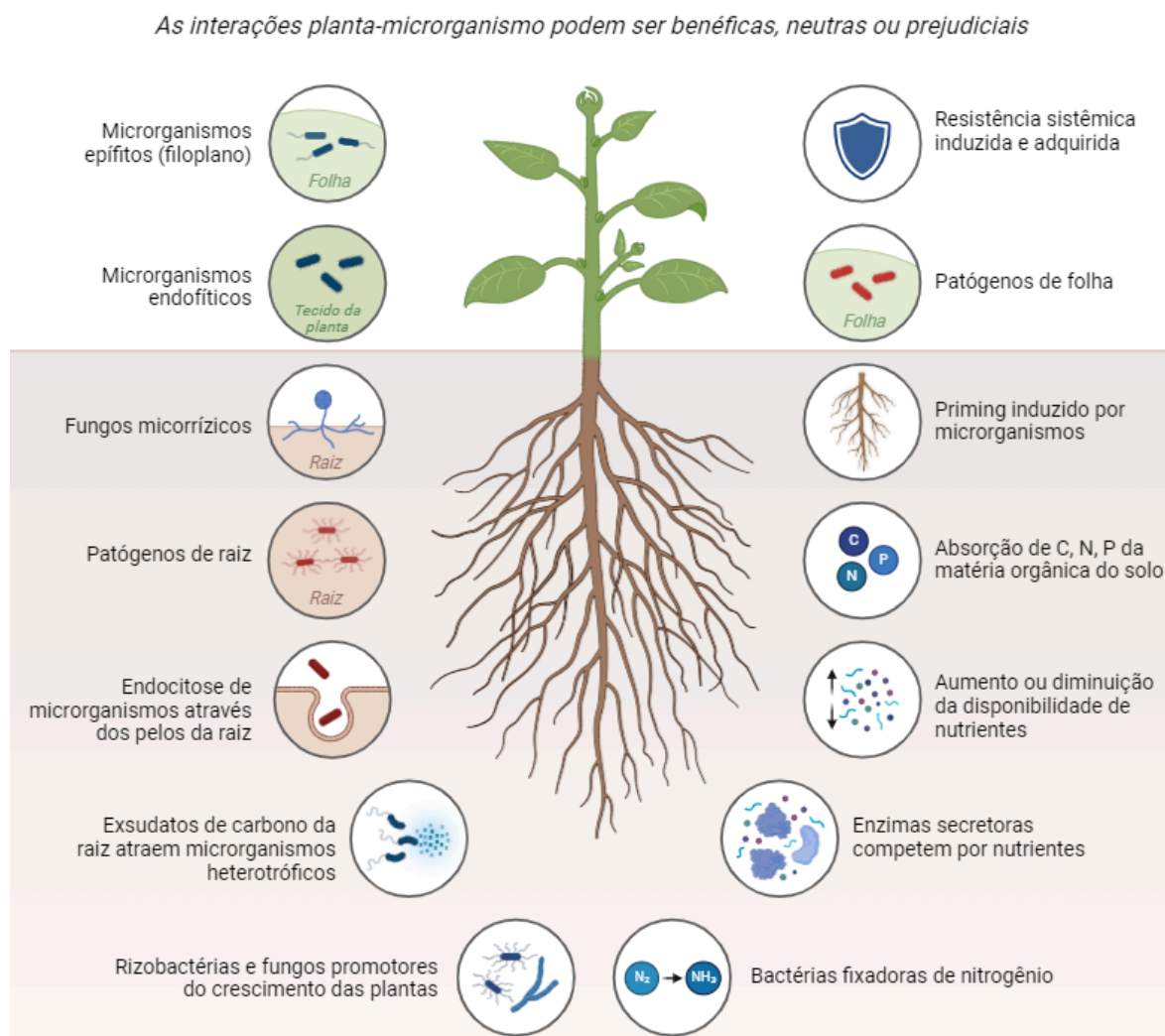
Dentre esses microrganismos, destacam-se os endofíticos, seres que habitam o interior dos tecidos vegetais em pelo menos uma fase de seu ciclo de vida, sem causar danos visíveis ao seu hospedeiro (Azevedo; Araújo, 2007; Moraes *et al.*, 2020; Martins *et al.*, 2024). Entre esses microrganismos estão os fungos, que conseguem colonizar semente, óvulo, fruto, caule, raiz, folha, tubérculo, broto, lenho, raque e qualquer estrutura da planta sem prejudicá-la (Boas *et al.*, 2020). Sua entrada no hospedeiro se dá por meio de aberturas naturais ou artificiais, como estômatos, feridas causadas por ferramentas agrícolas ou microferimentos nas raízes resultantes do contato com o solo (Barros *et al.*, 2023).

O processo de entrada ocorre quando os esporos do fungo germinam, seguidos pelo crescimento das hifas na folha ou na superfície da raiz, resultando na penetração do microrganismo no interior da planta. Para isso, alguns fungos utilizam estruturas especializadas, enquanto outros liberam enzimas que facilitam a quebra da parede celular (Martins, 2024). Oliveira (2010) também menciona a entrada por transferência vertical, que acontece quando uma geração de plantas transmite fungos para a próxima por meio de sementes ou estruturas reprodutivas. Assim, ao germinar, as sementes já contêm fungos endofíticos nas células das plântulas.

Embora esses fungos não causem doenças visíveis no hospedeiro, sua presença não é neutra e apresenta diversas funções no organismo dos hospedeiros. Acredita-se que a interação entre endófitos e plantas pode não se dar apenas pelo equilíbrio entre a virulência e as defesas, mas sim por uma interação complexa e cuidadosamente regulada. Em decorrência da coevolução entre planta e endófitos, é possível que eles alterem a morfologia e a fisiologia do hospedeiro, provocando efeitos como mudanças nos tecidos da planta e desenvolvam mecanismos de resistência, contribuindo para a defesa química das plantas por meio da

produção de metabólitos secundários bioativos (Azevedo, 1998; Araújo, 1996; Ferreira, 2020).

Figura 4 - Formas de interações entre plantas e microrganismos.



Fonte: Adaptado de Kim, 2024.

Esses compostos desempenham papéis essenciais para a saúde da planta, incluindo proteção contra herbivoria, controle de outros microrganismos e aumento da tolerância a alterações ambientais. Outrossim, dependendo do fator ambiental, esses microrganismos podem se tornar potencialmente patogênicos em estado latente (Fontenele *et al.*, 2022).

#### 2.4. Moléculas bioativas e suas aplicações biotecnológicas

Os microrganismos produzem metabólitos secundários em resposta a funções fisiológicas específicas, muitas vezes relacionadas à sua ecologia e interações sociais ou

predatórias. Esses metabólitos estão presentes em diversos habitats e organismos, variando conforme fatores ambientais, como temperatura, pH, salinidade e oxigenação. A produção de metabólitos pelos endófitos depende diretamente das condições fisiológicas do hospedeiro e do ambiente, sendo influenciada pelo crescimento e metabolismo da planta. Fatores como baixa respiração ou pH inadequado dificultam a colonização por endófitos, enquanto climas úmidos e com baixa luz solar favorecem essa interação (Pinto, 2019).

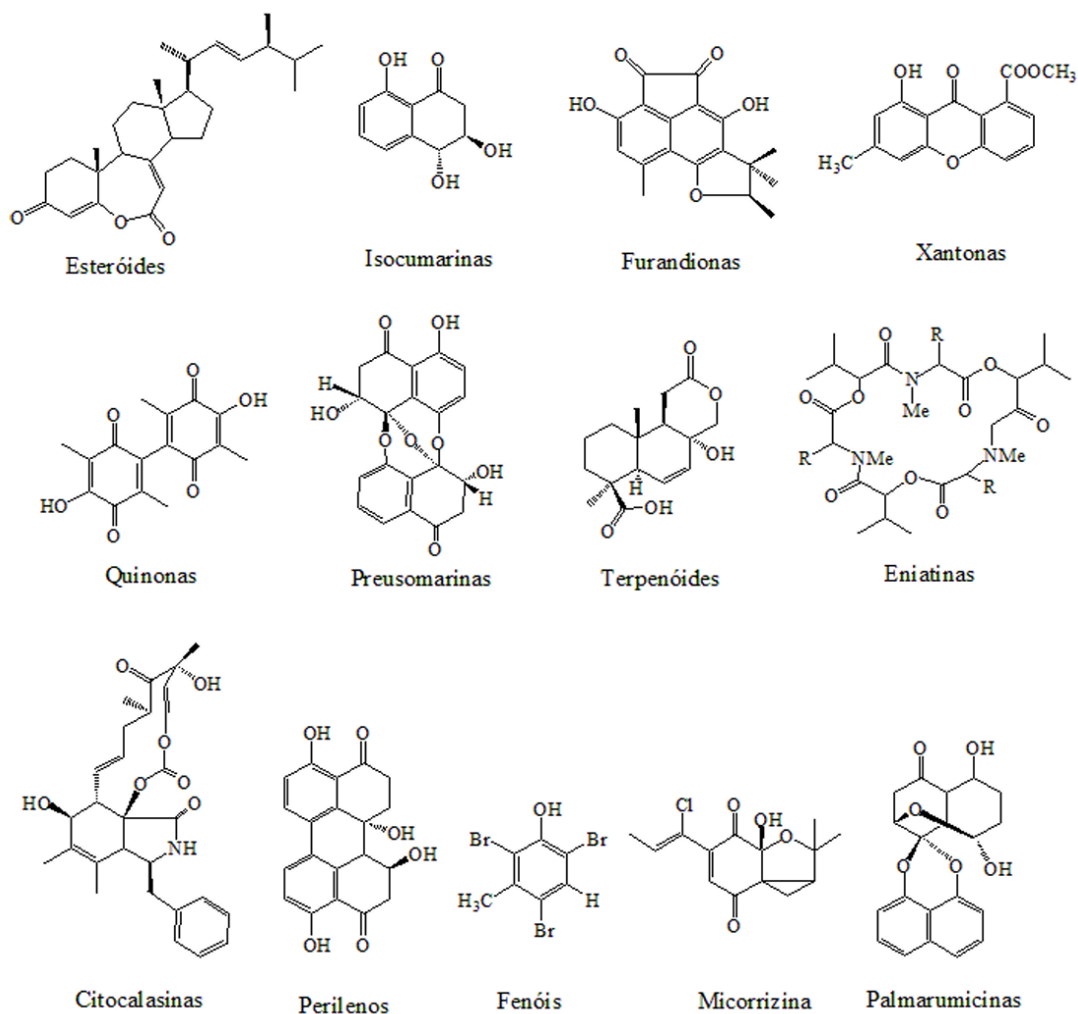
Ao longo da coevolução entre endófitos e suas plantas hospedeiras, estes seres vivos podem ter se ajustado aos tecidos internos dos vegetais por meio de variações genéticas, desenvolvendo ferramentas de transferência de informações entre si (Cui *et al.*, 2019). Ao invadir a planta hospedeira, os microrganismos se adaptam ao microambiente vegetal e incorporam parte do DNA da planta ao seu próprio genoma. Esse processo de coevolução permitiu aos endófitos adquirirem a habilidade de biossintetizar compostos bioativos semelhantes às moléculas produzidas pela própria planta (Pinto, 2019; Martins *et al.*, 2024).

Kusari *et al.* (2008); Facundo *et al.*, (2008); Ferreira (2020) comentam que muitas das substâncias produzidas pelas plantas podem ter sua origem na associação com endófitos, como os fungos, o que justifica o crescente interesse em estudos sobre esses microrganismos. Dessa forma, fungos endofíticos são uma fonte relevante de uma diversidade de metabólitos secundários bioativos (anteriormente conhecidos apenas em plantas), devido à sua versatilidade e grande capacidade de adaptação, podendo crescer em diversos meios e produzir uma abundância de moléculas bioativas em diferentes condições nutricionais.

As moléculas bioativas produzidas pelos fungos endofíticos desempenham funções essenciais no hospedeiro vegetal, como na defesa contra estresses abióticos ao produzirem compostos antioxidantes que protegem contra fatores adversos, como variações extremas de salinidade e temperatura. Eles também atuam contra estresses bióticos, sintetizando substâncias que combatem predadores e microrganismos, promovem o crescimento da planta ao fornecer suporte nutricional, disponibilizando ferro, fósforo e nitrogênio, e ao auxiliar na regulação hormonal (Bacon; White, 2016).

As diversas classes de moléculas produzidas por fungos endofíticos incluem principalmente alcalóides, esteróides, terpenóides, isocumarinas, quinonas, fenilpropanóides, ligninas, fenóis e ácidos fenólicos, além de metabólitos alifáticos, lactonas, citocalasinas, flavonoides, peptídeos e xantonas (Figura 5), os quais podem apresentar atividades hormonais, antibióticas, antitumorais, antifúngicas, citotóxicas, antivirais, imunossupressoras e antiparasitárias, entre outras (Specian *et al.*, 2014; Amaral, 2020; Barros *et al.*, 2023).

Figura 5 - Diversidade estrutural de metabólitos isolados de fungos endofíticos.



Fonte: Schulz *et al.*, 2002.

Existe ainda um crescente interesse em pesquisas sobre endófitos de plantas medicinais, com o objetivo de descobrir novos compostos. Isso se deve à hipótese de que as propriedades terapêuticas possam estar associadas aos endófitos, e não necessariamente à planta em si, ou que essas propriedades resultem da interação entre ambos (Kusari *et al.*, 2008; Facundo *et al.*, 2008; Mussi-Dias *et al.*, 2012, Ferreira, 2020). Por tantas atividades biológicas atribuídas (Quadro 1), destaca-se a importância biotecnológica dos fungos endofíticos e suas possíveis aplicações nas áreas farmacêutica, médica, industrial e também na agricultura (Barros *et al.*, 2023).

Quadro 1 - Substâncias bioativas produzidas por fungos endofíticos isolados de plantas da região Amazônica.

Atividade biológica	Fungo endofítico	Planta hospedeira	Descrição	Referência
Antibacteriana	<i>Phomopsis</i> spp.	<i>Aspidosperma tomentosum</i> Mart <i>Spondias mombin</i> L.	Potencial de inibição do crescimento de bactérias, leveduras e fungos filamentosos.	Corrado; Rodrigues, 2004
	<i>Trichoderma asperellum</i>	<i>Paullinia cupana</i> Kunth	Atividade antimicrobiana contra linhagens de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> suscetíveis e multirresistentes a antibióticos.	Silva, 2016
	<i>Diaporthe phaseolorum</i>			
		<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Euterpe precatoria</i> Mart	Atividade inibitória contra <i>Staphylococcus aureus</i> .
Antifúngica	<i>Curvularia</i> sp., <i>Colletotrichum</i> sp., <i>Acremonium</i> sp. e <i>Aspergillus</i> sp.	<i>Acmella ciliata</i> (Kunth) Cass	Atividade antifúngica frente a <i>Fusarium decemcellulare</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .	Ojeda, 2017
	<i>Fusarium solani</i>	<i>Equisetum arvense</i> L.	Conseguiu inibir o crescimento do fungo patogênico <i>Candida albicans</i> ,	Silva, 2012
	<i>Nectria</i> sp. e <i>Mycelia sterilia</i>	<i>Myrcia guianensis</i> (Aubl.) DC.	Atividade antifúngica contra <i>Candida albicans</i> e contra <i>Penicillium avellaneum</i> .	Banhos <i>et al.</i> , 2014
Citotóxica	<i>Xylaria</i> sp.	<i>Duroia macrophylla</i> Huber	Atividade antitumoral contra a linhagem celular de carcinoma colorretal HCT 116.	Oliveira, 2018
	Isolado B4-3L	<i>Humirianthera ampla</i> (Miers) Baehni	Potencial citotóxico frente a três linhagens de células tumorais (colorretal, glioblastoma e da próstata).	Barbosa, 2018
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Gustavia</i> sp.	Atividade citotóxica entre 50% e 100%, frente às linhagens de células tumorais leucemia, glioblastoma e melanoma.	Almeida, 2014
Enzimática	<i>Pestalotiopsis</i> sp. e <i>Fusarium</i> spp.	<i>Gustavia hexapetala</i> (Alb.) Sm.	Apresentaram halos de degradação amilolítica.	Martins <i>et al.</i> , 2024
	<i>Fusarium</i> spp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Helicosporium</i> sp. e <i>Colletotrichum</i> spp.		Apresentaram halos de degradação proteolítica.	
	<i>Penicillium</i> spp. e <i>Talaromyces</i> spp.	<i>Tillandsia catimbauensis</i> Leme, W. Till & J.A. Siqueira	Capacidade de produzir L-asparaginase.	Silva, 2018
	Isolado PH-R 18	<i>Piper hispidum</i> Sw.	Apresentou atividades amilolítica, pectinolítica e xilanolítica.	Oliveira, 2010
Isolados PHR 16 e PH-R 20	Apresentaram atividades amilolítica e celulolítica.			

Fonte: Autoria própria.

#### 2.4.1. Produção de enzimas hidrolíticas

Entre as diversas moléculas produzidas por esses fungos estão as enzimas, grupo de proteínas que exercem funções fundamentais no metabolismo dos seres vivos, atuando como catalisadores em reações bioquímicas (Lehninger; Nelson; Cox, 1995) e entre suas diversas funções, podem decompor moléculas complexas em unidades menores, desempenhando um papel crucial especialmente na degradação da matéria orgânica, gerando novos produtos (Austríaco, 2022).

As enzimas microbianas são usadas em setores como a indústria têxtil, fabricação de papel, degradação de celulose, curtimento de couro, produção de detergentes e bebidas destiladas, além de serem empregadas na fabricação de cervejas, panificação, produção de xaropes a partir da sacarificação do amido, ração animal, e também nas indústrias química e farmacêutica (Austríaco, 2022).

Celulases, proteases, lipases, amilases, xilanases, tanases e pectinases são algumas das classes de enzimas hidrolíticas empregadas nos diferentes setores industriais (Amaral, 2020; Denti *et al.*, 2022). Nos fungos endofíticos, a produção dessas moléculas ocorre principalmente durante o processo de penetração no hospedeiro, na competição contra fungos fitopatogênicos ou para melhorar o estado nutricional das plantas (Amaral, 2020; Martins *et al.*, 2024).

A forma de nutrição e a diversidade dos substratos que fungos endofíticos podem utilizar para o seu crescimento contribuem para sua habilidade de produzir um amplo conjunto de enzimas extracelulares. Os endófitos são a principal fonte de enzimas para aplicações industriais, principalmente por seu rápido crescimento e baixo custo, em comparação com enzimas derivadas de animais e plantas (Amaral, 2020).

Os avanços nas técnicas de biologia molecular, otimização de fermentação e melhoramento genético possibilitam uma alta produtividade comercial a um custo reduzido. O processo de biotransformação também requer menos energia, pois elimina a necessidade de condições extremas de crescimento e a geração de subprodutos indesejados. As reações geralmente ocorrem em temperatura ambiente, com menor emissão de resíduos industriais, já que produzem resíduos biodegradáveis (Naik, 2019; Pinto, 2019).

Segundo Denti *et al.* (2021), a produção enzimática pode ocorrer de duas formas:

O primeiro é denominado fermentação em estado sólido (FES), onde são empregados substratos sólidos com umidade suficiente para o crescimento do microrganismo, mas sem a presença de água no meio. Esse método de fermentação é aplicado com fungos filamentosos por apresentarem boa tolerância à baixa atividade de água, enzimas como proteases e pectinases são desenvolvidas desse modo (...).

Outro método (...) é a fermentação submersa (FS), onde o microrganismo é inserido na forma de inóculo em um meio líquido, com os nutrientes dissolvidos. Dessa forma é possível controlar a temperatura, pH, agitação e aeração do ambiente. Entre as vantagens desse método de produção está o fácil controle do meio, menor tempo de fermentação e maior produtividade, uma vez que o microrganismo está submerso de forma uniforme, absorvendo os nutrientes com maior eficiência.

#### 2.4.1.1. Amilases

A molécula de amido é essencialmente formada por dois polímeros quimicamente semelhantes: a amilose e a amilopectina. Para que ocorra a hidrólise desses polímeros de alto peso molecular, é necessário que um complexo enzimático atue em conjunto para hidrolisar tanto a amilose quanto a amilopectina (Santos, 2020).

As amilases catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas, que são as ligações químicas que conectam as unidades de glicose (açúcares) nas moléculas de amido e glicogênio. Dentro deste grupo, podemos destacar as  $\alpha$ -amilases, que quebram as ligações internas do substrato (endoamilases), as  $\beta$ -amilases, que realizam a hidrólise das unidades nas extremidades não redutoras do substrato (exoamilases), e as glucoamilases, que liberam unidades de glicose do extremo não redutor das moléculas do substrato (amiloglucosidases) (Spier, 2004; Santos, 2020).

Dentre as enzimas industriais, as amilases apresentam grande importância, correspondendo a cerca de 25% do mercado global de enzimas (Martins *et al.*, 2024). São reconhecidas como as principais enzimas empregadas na indústria alimentícia, especialmente em produtos de panificação e fermentação de bebidas. Além disso, são aplicadas na síntese de biopolímeros, nas indústrias têxteis e produtoras de papel, biodiesel, produtos farmacêuticos, agroquímicos, compostos aromatizantes, no tratamento de poluentes e na demanda por processos industriais mais sustentáveis quanto ao consumo de energia (Pinto, 2019; Santos, 2020).

#### 2.4.1.2. Proteases

As proteases são enzimas cuja função catalítica consiste em hidrolisar as ligações peptídicas das proteínas, quebrando-as em aminoácidos e peptídeos, também são chamadas de peptidases, proteinases e enzimas proteolíticas e são classificadas como peptídeo hidrolases ou peptidases (EC 3.4) (Martins, 2024).

Elas pertencem a um extenso grupo de enzimas da classe das hidrolases e podem ser divididas de acordo com a localização da quebra da ligação peptídica na cadeia do substrato, em endopeptidases (distantes do grupo terminal) e exopeptidases (próximas ao grupo

terminal). Estão entre os três principais grupos de enzimas industriais, representando 40% do mercado global de enzimas (Denti *et al.*, 2021).

Estas enzimas são produzidas por vários seres vivos, sejam intracelular ou extracelular. Normalmente, as proteases extracelulares hidrolisam moléculas grandes em menores, facilitando a absorção pelas células, enquanto as proteases intracelulares desempenham papéis na regulação do metabolismo. Além de suas funções fisiológicas em organismos vivos, as proteases se tornaram extremamente valiosas para diversas aplicações industriais. Os microrganismos são responsáveis por aproximadamente dois terços da produção global de proteases, tornando-se uma das principais fontes de produção e podem ser utilizadas na indústria de detergente, indústria alimentícia, indústria de couro, indústria farmacêutica e de cosméticos (Bezerra, 2021).

Considerando o potencial de produção de moléculas com atividades biológicas por fungos endofíticos, em especial as enzimas hidrolíticas, e suas diversas aplicações biotecnológicas, este trabalho visa contribuir para a descoberta de fungos potencialmente produtores de amilases e proteases, a fim de ampliar os conhecimentos acerca da comunidade microbiana associada às plantas hospedeiras, sobre o funcionamento da relação ecológica estabelecida entre fungo-planta e promover a conservação da biodiversidade amazônica através do potencial que pode ser apresentado por essas espécies e explorado por meio da biotecnologia.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

- Avaliar a produção de enzimas hidrolíticas por fungos endofíticos isolados de plantas nativas da Amazônia.

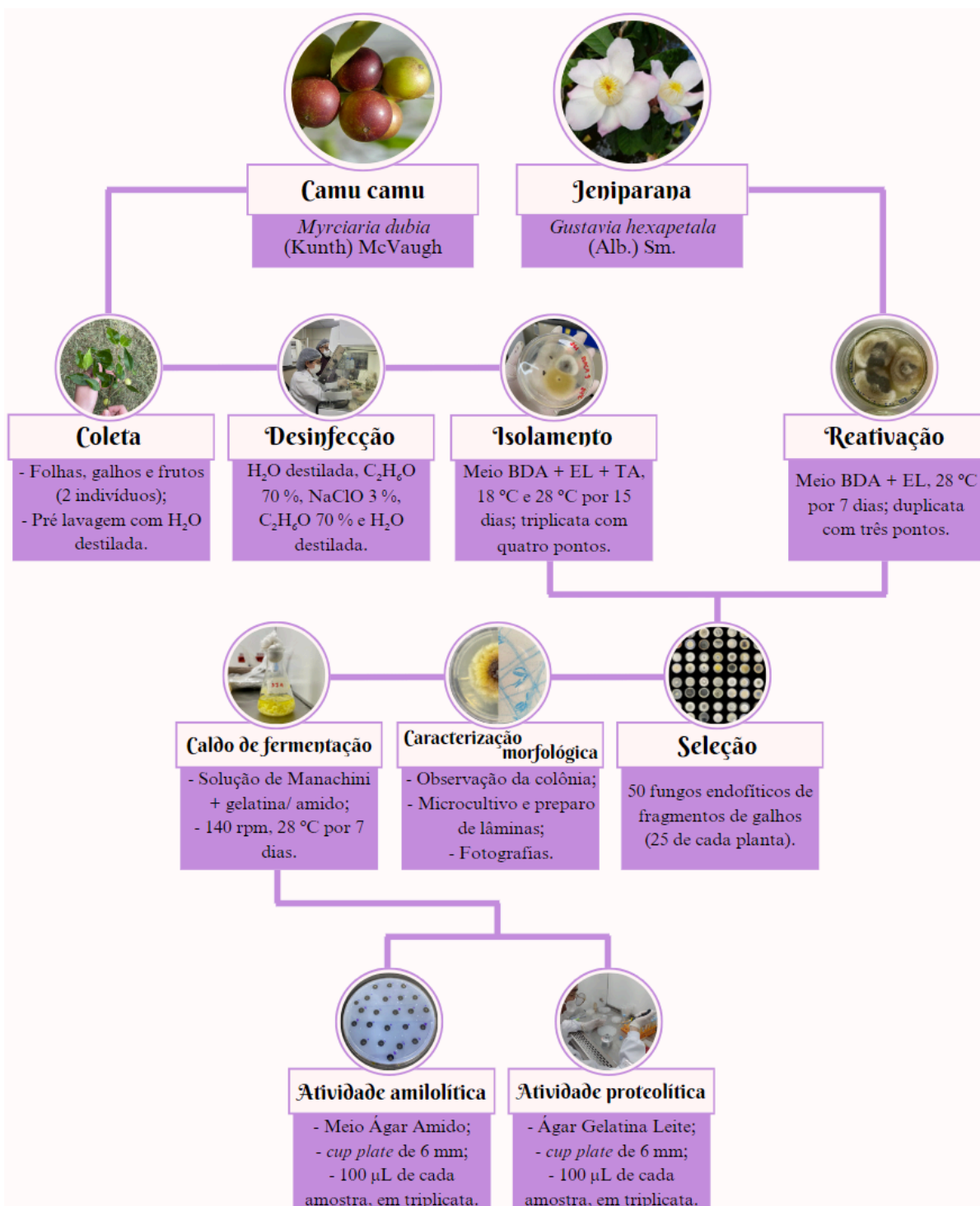
#### 3.2. Objetivos específicos

- Investigar fungos endofíticos de diferentes fragmentos de *M. dubia*.
- Selecionar fungos endofíticos isolados de *G. hexapetala* depositados em uma coleção microbiológica.
- Avaliar a produção de amilases e proteases por fungos endofíticos isolados de *G. hexapetala* e *M. dubia*.
- Identificar a nível de gênero fungos endofíticos potencialmente produtores de enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

No geral, esta pesquisa seguiu as etapas descritas abaixo:

Figura 6 - Fluxograma da metodologia do trabalho.

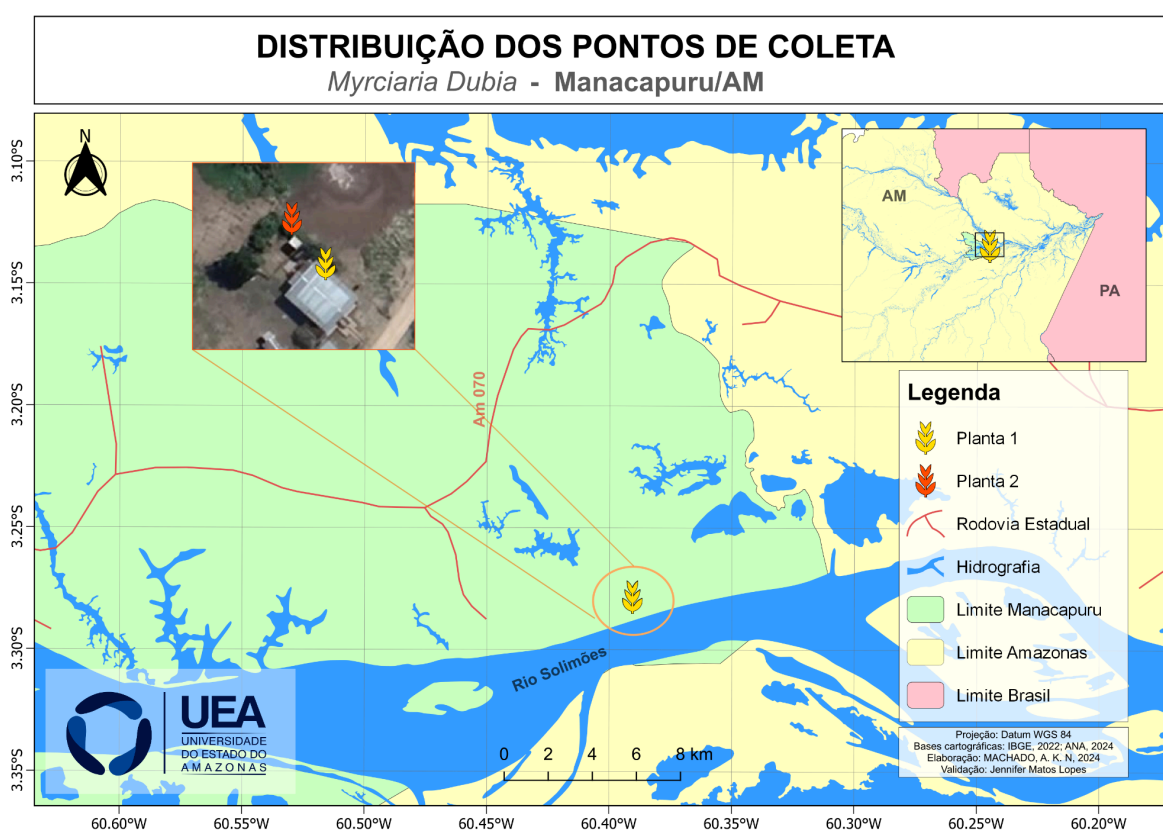


Fonte: Autoria própria.

#### 4.1. Coleta do material vegetal

As amostras de *M. dubia* foram coletadas na Estrada do Arapapá - Igarapé do Lago Preto, zona rural do município de Manacapuru/AM (Figura 7), de coordenadas geográficas: 03°16'42.5"S e 60°23'25.9"O (planta 1), 03°16'42.1"S e 60°23'26.2"O (planta 2) (Figura 8 - E, F). A coleta foi realizada no dia 11 de março de 2024, durante a estação chuvosa na região Amazônica, utilizando-se como critérios de escolha: folhas, galhos e frutos (verdes e maduros) com aparência sadia, sem sintomas visuais de doenças ou lesões.

Figura 7 - Localização geográfica do local da coleta do material vegetal.



Fonte: Autoria própria.

No local da coleta, o material botânico foi selecionado e coletado de dois diferentes indivíduos. Este material (folhas, galhos e frutos) foi pré-lavado com água destilada autoclavada (Figura 8 - G), armazenado em sacos plásticos novos, identificado e acondicionado em caixa de isopor com bolsas de gelo, para conservação (Figura 8 - H). Em seguida, foram transportados para o Laboratório de Biotecnologia - ILUM do HUB - Inovação e Tecnologia, localizado na Escola Superior de Tecnologia da Universidade do Estado do Amazonas (EST/UEA), onde ocorreram os procedimentos laboratoriais.

Figura 8 - Árvores da coleta e processamento do material vegetal.



Fonte: (A, B) Souza, 2023; (C - J) Autoria própria. (A, B) Camucamuzeiro em floração, dezembro de 2023; (C, D) Frutos do camucamuzeiro, março de 2024; (E, F) Árvores onde foram realizadas as coletas; (G) Lavagem de folhas, galhos e frutos logo após coleta; (H)

Acondicionamento do material botânico pós lavagem para serem transportados ao local de procedimento laboratorial; (I, J) Amostras coletadas dos dois indivíduos, planta 1 e 2, respectivamente.

#### 4.2. Desinfecção do material vegetal e isolamento de fungos endofíticos de *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh. (Myrtaceae)

O material vegetal coletado foi processado 24 horas após a coleta. No laboratório, realizou-se uma lavagem em água corrente com o auxílio de uma esponja nova e sabão neutro, a fim de retirar sujidades e possíveis microrganismos epifíticos.

Seguindo a metodologia utilizada por Ferreira (2020) com adaptações (Figura 9), no interior de uma cabine de segurança biológica, as folhas, os galhos e os frutos foram imersos, respectivamente, em água destilada autoclavada (30 segundos), solução de álcool etílico 70% (1 minuto), solução de hipoclorito de sódio 3% (3 minutos), novamente solução de álcool etílico 70% (30 segundos) e água destilada autoclavada. Para cada fragmento utilizou-se novas soluções desinfetantes em que, utilizando uma micropipeta, retirou-se 50  $\mu\text{L}$  da última água de lavagem para fazer o controle de assepsia do isolamento (duplicata), o volume foi inoculado em placas de Petri (100 x 20 mm) contendo o meio de cultura do experimento e espalhado com auxílio de uma alça de Drigalski.

Figura 9 - Metodologia de isolamento dos microrganismos endofíticos de *Myrciaria dubia*.

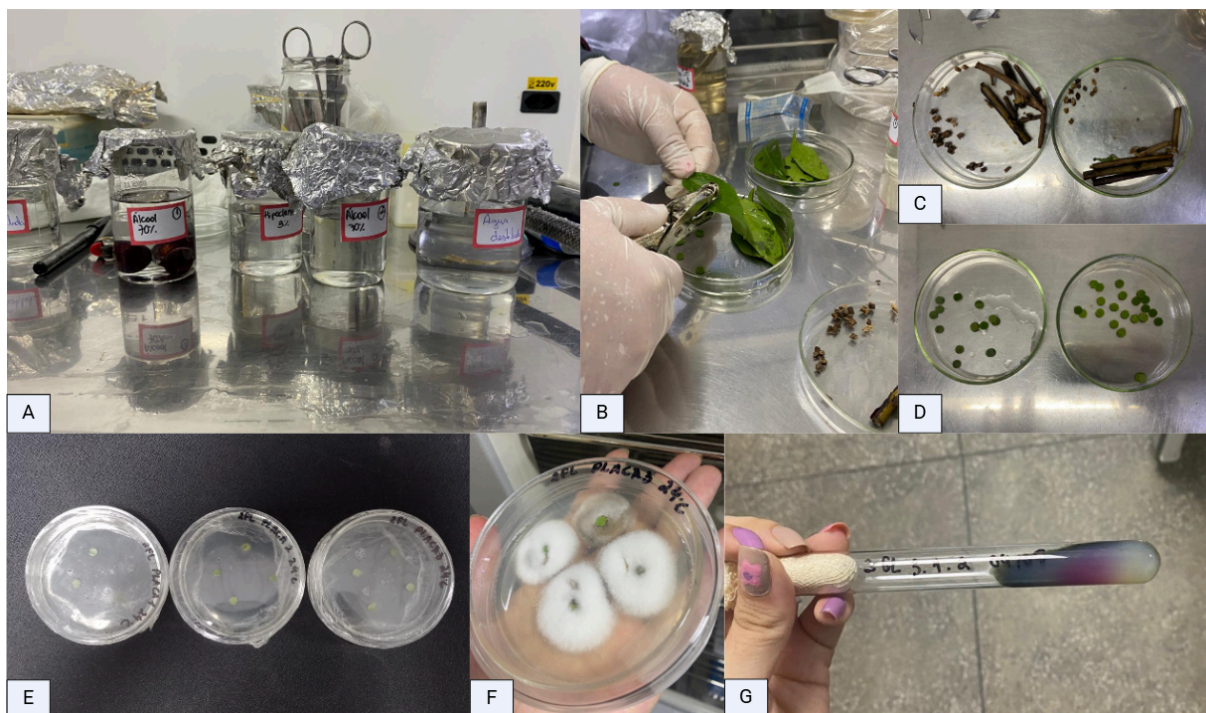


Fonte: Autoria própria. Criado com BioRender.

Após a desinfecção, utilizando furador de papel e lâminas de bisturi estéreis, foram cortados fragmentos de aproximadamente 5 x 5 mm das folhas, galhos e frutos (Figura 10 - B, C, D). Foram inoculados quatro fragmentos em cada placa de Petri contendo meio de cultura BDA + EL (batata, dextrose, ágar + extrato de levedura) (Apêndice A) (Souza *et al.*, 2004) e antibióticos Tetraciclina (50 mg/mL<sup>-1</sup>) e Ampicilina (50 mg/mL<sup>-1</sup>) (T + A), para impedir o

crescimento de bactérias (Figura 10 - E, F). Os experimentos foram realizados em triplicata e as placas foram incubadas em B.O.D. por 15 dias em duas temperaturas: 18 °C e 28 °C (Tabela 1).

Figura 10 - Assepsia, preparo dos fragmentos e isolamento dos fungos endofíticos.



Fonte: Autoria própria. (A) Desinfecção de frutos de *M. dubia*; (B) Corte de fragmentos com o auxílio de um furador de papel esterilizado; (C, D) Fragmentos cortados; (E) Placas de isolamentos após inoculação dos fragmentos; (F) Placa de isolamento com quatro fragmentos inoculados após 4 dias; (G) Fungo endofítico repicado em tubo de ensaio.

Tabela 1 - Condições de cultivo para o isolamento dos endofíticos de *Myrciaria dubia*.

Temperatura	Tecidos vegetais									Total de placas
	Folha			Galho			Fruto			
	Planta 1	Planta 2	Controle	Planta 1	Planta 2	Controle	Planta 1	Planta 2	Controle	
18 °C	03	03	04	03	03	04	03	03	04	30
28 °C	03	03	04	03	03	04	03	03	04	30
Total de fragmentos inoculados	48		-	48		-	48		-	-

Fonte: Autoria própria.

#### 4.3. Purificação e análise de dados do isolamento

As placas de isolamento foram acompanhadas diariamente durante o período de realização do experimento e os fungos endofíticos que começavam a crescer a partir dos

fragmentos eram então repicados (raspagem do micélio) para tubos de ensaio contendo o meio de cultura BDA + EL inclinado e armazenados em B.O.D. na mesma temperatura de isolamento (18 °C e 28 °C). A etapa de purificação iniciou com a transferência das cepas dos tubos inclinados para placas de Petri e realização de repiques sucessivos a fim de obter colônias puras (Figura 10 - G), se caso dois ou mais microrganismos estivessem crescendo juntos, observando as características macromorfológicas.

Posteriormente, os fungos endofíticos isolados foram conservados em triplicata seguindo o método de Castellani (1939).

A partir do número de isolados obtidos, realizou-se o cálculo do índice de colonização e das taxas de frequência, conforme descrito por Petrini; Stone; Carrol (1992).

Taxa de colonização (TC):

$$TC (\%) = \frac{\text{Número total de fragmentos com um ou mais isolados} \times 100}{\text{Número total de fragmentos da amostragem}}$$

Frequência relativa (FR):

$$FR (\%) = \frac{\text{Número total de isolados de um grupo} \times 100}{\text{Número total de isolados}}$$

#### 4.4. Seleção dos fungos endofíticos

As linhagens fúngicas isoladas de *G. hexapetala* foram obtidas a partir do isolamento de Ferreira (2020), depositadas na Central de Coleções Microbiológicas da Universidade do Estado do Amazonas (CCM/UEA).

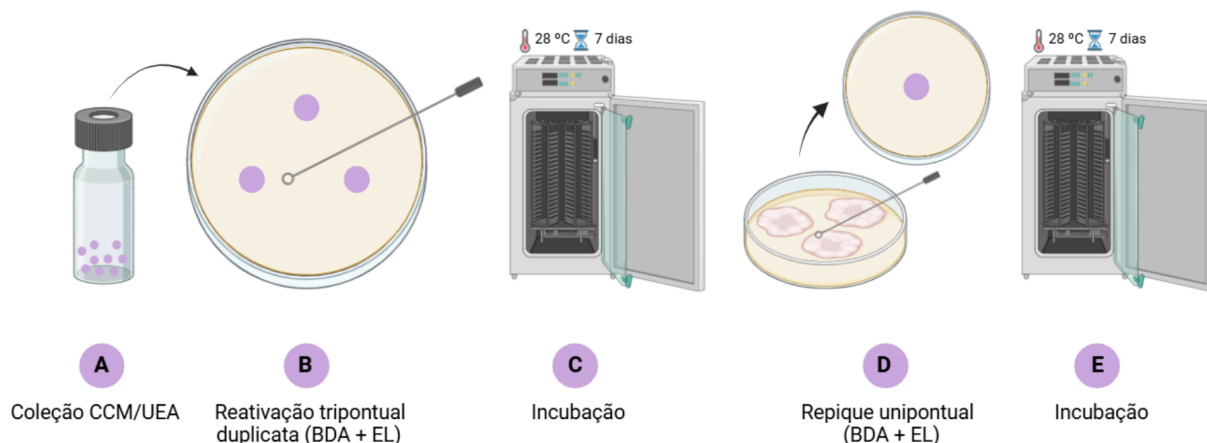
Com base na macromorfologia, selecionou-se 25 fungos de *Gustavia hexapetala* (Alb.) Sm. e 25 fungos de *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh que apresentavam as características macromorfológicas mais distintas observadas e registradas para avaliar a produção de moléculas bioativas, todas as linhagens foram provenientes de fragmentos de galhos das respectivas plantas amazônicas.

#### 4.5. Reativação das linhagens fúngicas

Os fungos endofíticos selecionados de *G. hexapetala* foram reativados em placas de Petri (100 x 20 mm) duplicatas tripontuais, com três fragmentos cada, contendo meio de cultivo BDA + EL e mantidas em incubadora B.O.D., na temperatura de 28 °C, por 7 dias.

Em seguida, para todos os fungos selecionados, foi feito um repique unipontual de cada linhagem no mesmo meio de cultivo e as placas foram mantidas nas mesmas condições de incubação (Figura 11).

Figura 11 - Reativação e repique dos fungos endofíticos selecionados.



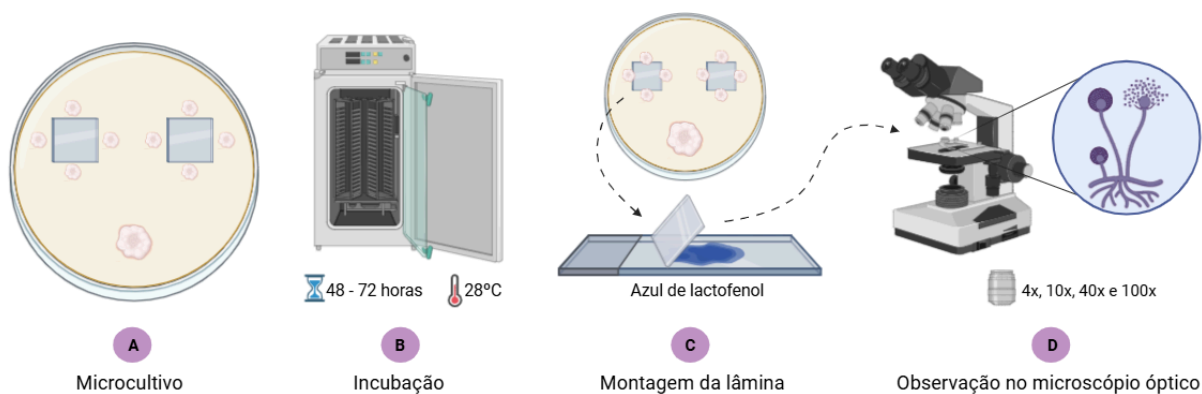
Fonte: Autoria própria. Criado com BioRender.

#### 4.6. Caracterização morfológica

A caracterização da macromorfologia das linhagens fúngicas foi feita a partir da observação das características presentes nas colônias, considerando os aspectos: coloração, textura, relevo, forma da borda, produção de pigmento e exsudato (Pereira, 2001). Foram feitas fotografias das placas para comparação com a literatura (Gilmar, 1959; Bononi; Grandi 1998; Kiffe; Morelet, 1999; Guerrero; Silveira, 2003; Zhao; Liu; Wu, 2007; Almeida *et al.*, 2012; Lazarotto, 2013; Visagie *et al.*, 2014; Ferreira, 2020; Martins *et al.*, 2024). A paleta de cores para definir a coloração das colônias teve como referência o catálogo de cores Suvinil Fresh.

Para a análise micromorfológica realizou-se a produção de lâminas utilizando a técnica de microcultivo, que consiste na inoculação de fragmentos do micélio da amostra nas extremidades de duas lamínulas que são posicionadas dentro da placa de Petri contendo meio BDA + EL. As placas foram incubadas em B.O.D., na temperatura de 28 °C e após 48 - 72 h cada lamínula foi retirada e colocada em uma lâmina de microscopia com uma gota do corante azul de lactofenol (Figura 12). As lâminas foram visualizadas no microscópio óptico (objetivas de 4x, 10x, 20x, 40x e 100x) (Leica DM2500 LED e Nikon Eclipse E200), as hifas e estruturas reprodutivas observadas foram fotografadas e analisadas com base em guias e chaves de identificação.

Figura 12 - Análise micromorfológica pela técnica de microcultivo.



Fonte: Autoria própria. Criado com BioRender.

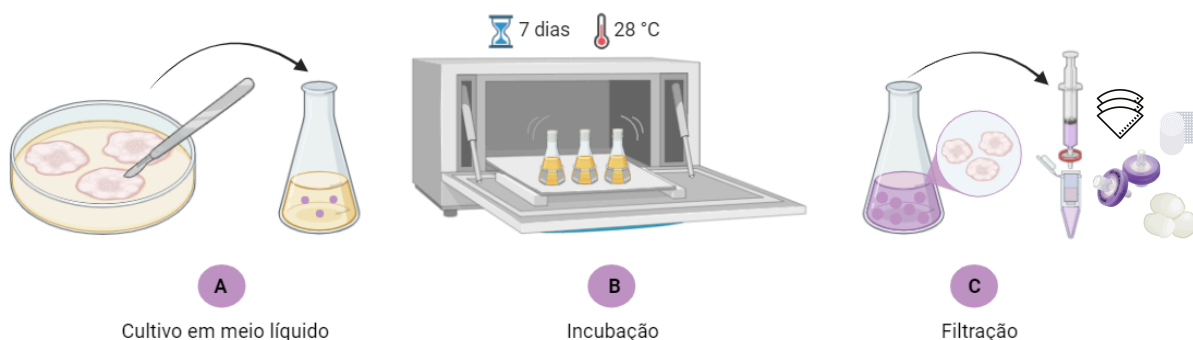
#### 4.7. Análise qualitativa da atividade enzimática

Os testes para a verificação de produção das enzimas hidrolíticas extracelulares amilases e proteases seguiram o método *cup plate*, que consiste na inoculação em meio sólido de alíquotas do caldo de fermentação das linhagens fúngicas após o seu cultivo em meio líquido (Dingle; Reid; Salomons, 1953; Souza; Oliveira; Andrade, 2008; Teixeira *et al.*, 2011; Specian; Costa; Pamphile, 2021; Martins, 2024).

##### 4.7.1. Preparo do caldo de fermentação

Para a realização dos ensaios, após serem reativadas em meio BDA + EL, as linhagens fúngicas foram cultivadas em meio líquido *Solução de Manachini* (Apêndice A) (Manachini; Fortina; Parini, 1987), adicionado de substrato indutor (2%) e pH ajustado para cada enzima: amilase - amido de milho, pH 6,0 e protease - gelatina incolor sem sabor, pH 6,9. Foram introduzidos três discos (6 mm) do micélio de cada colônia em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 60 mL de meio seletivo, que foram incubados em agitador tipo Shaker, sob agitação a 140 rpm, na temperatura de 28 °C, por 7 dias (Figura 13).

Figura 13 - Cultivo em meio líquido e obtenção do caldo de fermentação para a realização dos testes enzimáticos.



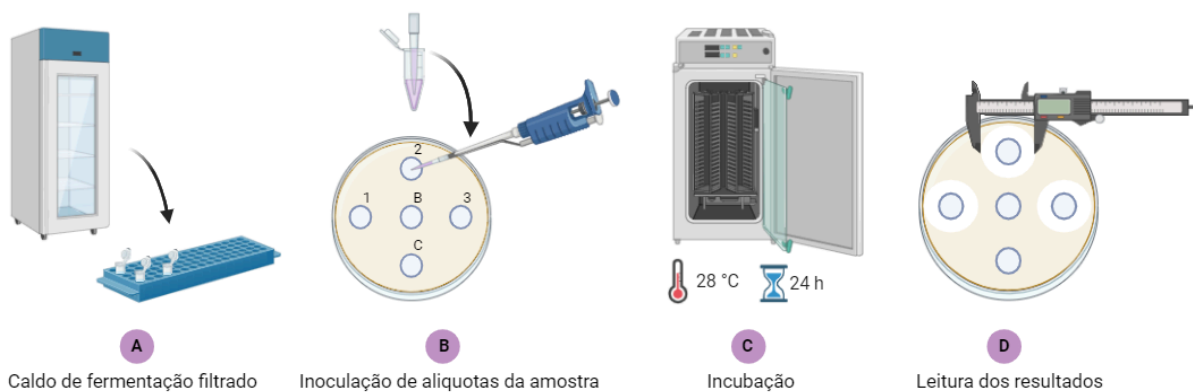
Fonte: Autoria própria. Criado com BioRender.

#### 4.7.2. Ensaio qualitativo *cup plate*

Após o período de incubação em meio líquido, os cultivos foram filtrados com auxílio de papel filtro, gaze, algodão e membrana milipore 0,45  $\mu\text{m}$ . O conteúdo filtrado foi armazenado em refrigerador, à 4 °C.

Em seguida, foram preparados meios sólidos contendo os substratos indutores específicos para cada enzima, sendo ágar-amido para amilase e ágar-gelatina-leite para protease (Apêndice A). Foram feitos *cup plates* de 6 mm na superfície dos meios de cultura em placas de Petri (100 x 20 mm ou 150 x 25 mm), em que se inoculou 100  $\mu\text{L}$  de cada caldo de cultivo, em triplicata (Figura 14). As placas foram incubadas em B.O.D., na temperatura de 28 °C, por 24 horas.

Figura 14 - Etapas do teste enzimático em *cup plate*.



Fonte: Autoria própria. Criado com BioRender. 1, 2, 3= triplicata da amostra; B= branco; C= controle.

#### 4.7.3. Determinação da produção de enzimas e análise de dados

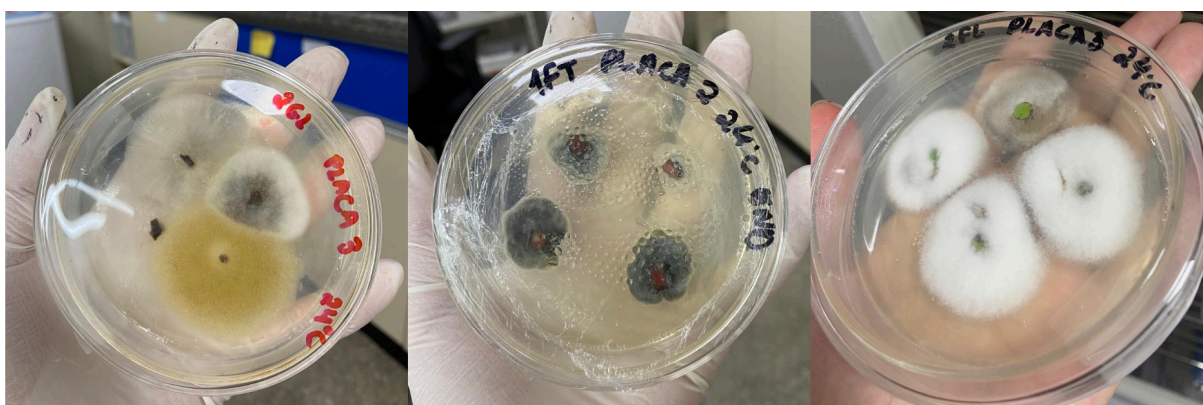
A avaliação da produção de amilases foi feita por meio da revelação do meio ágar-amido com solução de lugol forte que foi borrifado sobre as placas. Para protease não foi necessário a utilização de solução reveladora, observou-se a formação de halos translúcidos ao redor dos *cup plates* das placas ágar-gelatina-leite. Os halos decorrentes da hidrólise enzimática foram medidos com o auxílio de um paquímetro e, a partir dos dados obtidos, calculou-se a média e o desvio padrão da triplicata.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Isolamento e purificação de fungos endofíticos de *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh (Myrtaceae)

Do total de 144 fragmentos isolados, sendo 48 fragmentos de cada tecido avaliado, foram isolados 176 fungos endofíticos, em que 69 fungos são isolados de folhas, 52 fungos isolados de galhos e 55 fungos isolados de frutos (Figura 15) (Tabela 2).

Figura 15 - Diferentes fungos isolados dos tecidos de *M. dubia*.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 2 - Isolamento de fungos endofíticos de diferentes tecidos de *Myrciaria dubia* por temperatura.

Temperatura	Tecidos vegetais						Total
	Folha		Galho		Fruto		
	Planta 1	Planta 2	Planta 1	Planta 2	Planta 1	Planta 2	
18 °C	15	13	13	12	16	13	82
28 °C	21	20	12	15	11	15	94
Total	36	33	25	27	27	28	176

Fonte: Autoria própria.

O número de isolados obtido com esta pesquisa a partir dos fragmentos inoculados foi proporcionalmente superior ao isolamento realizado por Corrêa *et al.* (2015). Utilizando o mesmo meio de isolamento porém temperatura de  $25 \pm 3$  °C, foram amostrados 31 indivíduos de *M. dubia* e para cada indivíduo foram preparados 9 fragmentos de folhas e 9 fragmentos de galhos, totalizando 279 fragmentos de cada tecido. Dessa forma, inoculando 558 fragmentos no total, foram isolados 307 fungos endofíticos. Nesta pesquisa, o número de fragmentos de folhas e galhos inoculados (96) representam 17,2% dos fragmentos inoculados no trabalho

citado. Considerando também o isolamento de fungos dos frutos, o total de fragmentos utilizados representam 25,8% do total inoculado por Corrêa e colaboradores.

Considerando a temperatura ideal de crescimento, os microrganismos isolados podem ser considerados psicrófilos, que são aqueles que se desenvolvem preferencialmente em temperaturas entre 15 °C e 20 °C ou até mesmo em condições mais frias, e mesófilos, que englobam os microrganismos que crescem em uma faixa de temperatura de 25 °C a 40 °C (Pelczar; Chan; Krieg, 1997). Isso demonstra a capacidade de cultivo e adaptação dos diversos microrganismos colonizadores dos tecidos internos da planta hospedeira.

#### 5.1.1. Análise de dados do isolamento

A partir do total de fungos endofíticos isolados, calculando a taxa de colonização (Tabela 3) foi possível determinar que os fragmentos de folhas de ambos os indivíduos amostrados, bem como os fragmentos de galho da planta 2, tiveram 100% de seus fragmentos com crescimento fúngico, já os fragmentos de galho da planta 1 tiveram 91,66% de TC (dois fragmentos não tiveram isolados), enquanto os fragmentos de frutos de ambos os indivíduos apresentaram 95,83% de colonização (um fragmento de cada indivíduo não teve isolados).

Tabela 3 - Total de fungos isolados por indivíduo, taxa de colonização (TC) e frequência relativa (FR).

Indivíduo	Fungos isolados				Taxa de colonização			Frequência relativa		
	Folha	Galho	Fruto	Total	Folha	Galho	Fruto	Folha	Galho	Fruto
Planta 1	36	25	27	<b>88</b>	100%	91,66%	95,83%	40,9%	28,4%	30,7%
Planta 2	33	27	28	<b>88</b>	100%	100%	95,83%	37,5%	30,7%	31,8%
Total	69	52	55	<b>176</b>	<b>100%</b>	<b>95,85%</b>	<b>95,85%</b>	<b>39,2%</b>	<b>29,55%</b>	<b>31,25%</b>

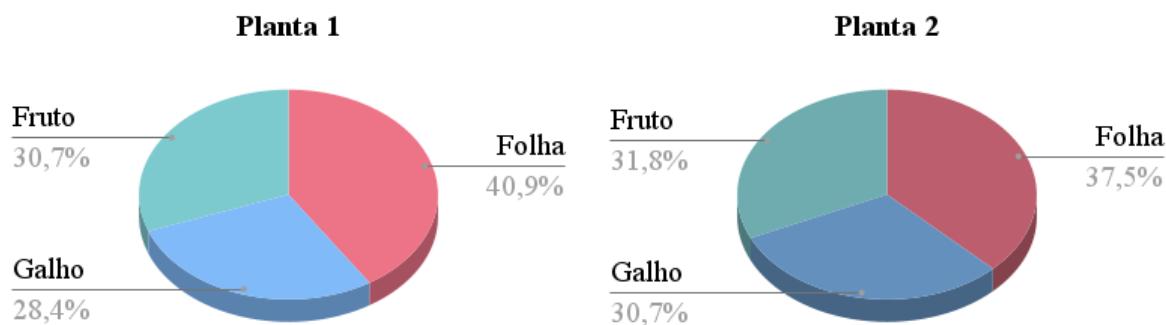
Fonte: Autoria própria.

Isolando fungos endofíticos de Myrtaceae, Silva (2018) também obteve 100% de TC para fragmentos de folhas. Gazis e Chaverri (2010), ao analisarem 225 amostras (90 de folhas e 135 de caule), isolaram 175 endófitos provenientes de 15 árvores de *Hevea brasiliensis* e obtiveram uma taxa de colonização de 90% nas folhas e de 60% nos caules. Esses resultados mostram-se semelhantes aos obtidos nesta pesquisa, em que a maior TC foi para fragmentos de folhas, embora para os outros fragmentos também tenha sido alta.

Quanto à frequência relativa (Figura 16), observou-se que houve maior número de isolados a partir de fragmentos de folha tanto para a planta 1 com 40,9%, quanto para a planta

2 com 37,5%. Para frutos obteve-se 30,7% e 31,8%, e para galhos a FR foi de 28,4% e 30,7%, planta 1 e planta 2, respectivamente.

Figura 16 - Frequência relativa (FR) do isolamento dos tecidos vegetais de cada indivíduo.



Fonte: Autoria própria.

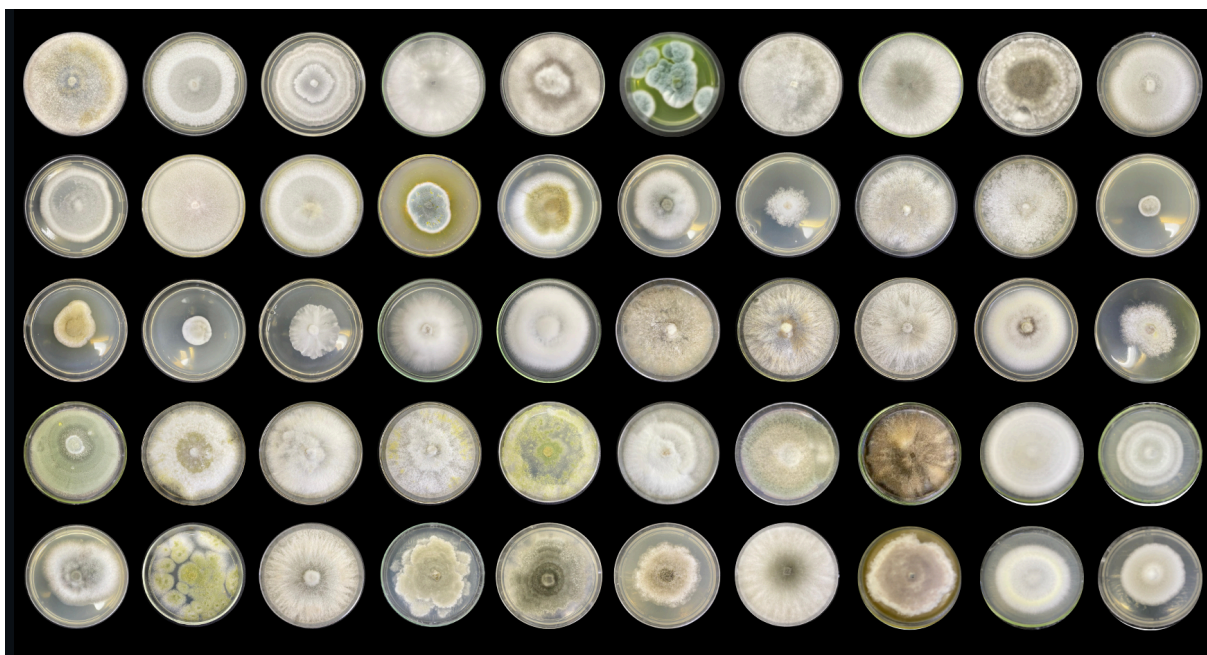
A partir do estudo de Ferreira (2020), a frequência de isolamento indicou um maior número de isolados provenientes dos galhos de *G. hexapetala* no meio BDA + EL, com 74,6%. Nas folhas, também em meio BDA + EL, a frequência foi de 49,6%. Nos meios Aveia e ISP2, a frequência de isolamento continuou mais elevada para os galhos (47,2% e 41,5%, respectivamente) e mais baixa para as folhas. Banhos *et al.* (2014) isolaram 156 fungos endofíticos a partir de 270 fragmentos inoculados de *Myrcia guianensis* (Myrtaceae) e também obtiveram maior FR para galhos (32%) do que para folhas (30,1%), o que difere dos resultados obtidos com esta pesquisa.

Já Souza *et al.* (2004) encontraram uma maior quantidade de endófitos nas folhas (72%) em comparação aos galhos (37,5%) em suas pesquisas com *Palicourea longiflora* (Rubiaceae). Santos e colaboradores (2021), tiveram um total de 28 fungos endofíticos isolados de *Uncaria tomentosa*, desses, 18 (64,2%) foram obtidos a partir de amostras de folhas e 10 (35,7%) de amostras de caule. Conjuntamente, ao investigar as plantas *Pueraria phaseoloides* (Fabaceae) e *Theobroma grandiflorum* (Sterculiaceae), Galvão (1998) obteve as maiores frequências de isolamento nas folhas, com 72,5% e 58,7%, respectivamente. Esses resultados se assemelham com os dados obtidos a partir do isolamento deste trabalho, em que os fragmentos de folhas tiveram maior frequência.

## 5.2. Seleção e reativação dos fungos endofíticos

Para a etapa de seleção, foram selecionadas 25 linhagens isoladas de fragmentos de galhos de *Gustavia hexapetala* depositadas na coleção, e dos 52 fungos endofíticos isolados e já purificados de fragmentos de galhos de *Myrciaria dubia*, também foram selecionados 25 linhagens (Figura 17).

Figura 17 - Diversidade de características apresentadas pelos endófitos de *G. hexapetala* e *M. dubia* selecionados.

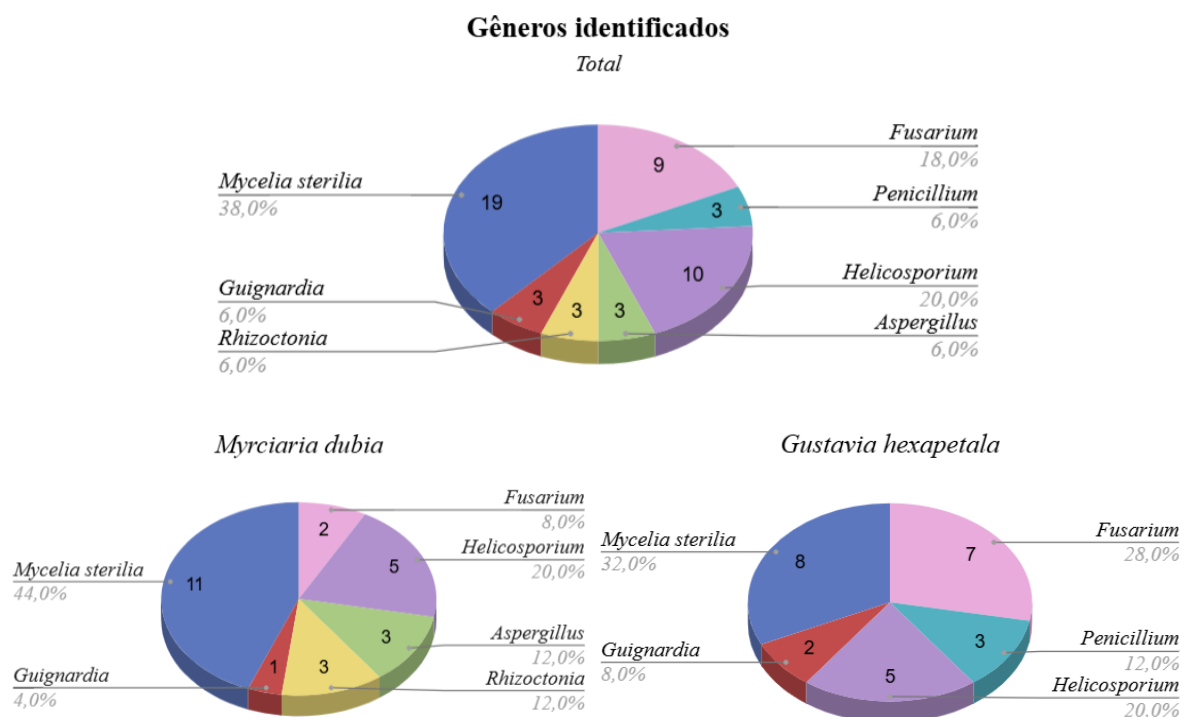


Fonte: Autoria própria.

## 5.3. Caracterização morfológica

Com base na observação das características macro e micromorfológicas e comparação com descrições na literatura, foi possível sugerir a identificação de um fungo da espécie *Aspergillus niger* Tiegh. (isolado de *M. dubia*), e seis diferentes gêneros: *Fusarium* Link (18%), *Penicillium* Link (6%), *Helicosporium* Nees (20%), *Aspergillus* P. Micheli (6%), *Rhizoctonia* DC (6%) e *Guignardia* Viala & Ravaz (6%) (Figura 18). Alguns fungos não produziram estruturas reprodutivas para dar prosseguimento à identificação (*Mycelia sterilia* - 38%). No estudo de Santos *et al.* (2021), de 28 fungos endofíticos isolados, 28,57% não puderam ser identificados por serem estéreis.

Figura 18 - Diversidade de gêneros sugeridos dos fungos isolados de *G. hexapetala* e *M. dubia* identificados morfologicamente.


















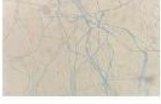

















Fonte: Autoria própria.


































Ao examinar diversos estudos, observa-se que os gêneros de fungos endofíticos mais comumente encontrados em plantas são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Souza *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2006; Diniz *et al.*, 2020), o que se assemelha aos resultados deste trabalho. Endófitos dos gêneros identificados já foram isolados de outras plantas tropicais, como *T. grandiflorum*, *U. tomentosa*, *P. phaseoloides*, *Calycophyllum spruceanum*, *Himatanthus sucuuba*, *Piper hispidum* e *G. hexapetala* (Galvão, 1998; Souza *et al.*, 2004; Oliveira, 2010; Ferreira, 2020; Santos *et al.*, 2021; Mendonça *et al.*, 2023; Martins *et al.*, 2024). Silva (2018) também isolou *A. niger* em espécie de Myrtaceae.












Souza *et al.* (2004) e Ferreira (2020) enfatizam que a escassez de especialistas em taxonomia de fungos microscópicos e a falta de conhecimento sobre a ecologia dessas espécies tem tornado a identificação completa de fungos endofíticos um desafio significativo. Essa limitação ainda impede avanços em pesquisas como esta, o que reflete no número de endófitos não identificados, sendo possível que entre estes existam espécies ainda não descritas.







A seguir, o Quadro 2 apresenta as características macro e micromorfológicas observadas para a sugestão de gêneros das 50 linhagens selecionadas para a avaliação da produção de moléculas bioativas.

















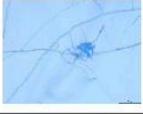

Quadro 2 - Aspectos macro e micromorfológicos das colônias de fungos endofíticos selecionados.

<b>Ghx G-3.3.2-TA</b>	<i>Mycelia sterilia</i>	<b>Ghx G-1.2.1B-TI</b>	<i>Mycelia sterilia</i>	<b>Ghx G-5.4.1-TA</b>	<i>Mycelia sterilia</i>
	<b>Forma da borda</b> Regular		<b>Forma da borda</b> Regular		<b>Forma da borda</b> Irregular
	<b>Coloração</b> - Verso: terra cota - Reverso: grafite		<b>Coloração</b> - Verso: cinza/verde militar - Reverso: conhaque/ cinza chumbo		<b>Coloração</b> - Verso: castor - Reverso: castanho
	<b>Textura</b> Algodonoso		<b>Textura</b> Algodonoso		<b>Textura</b> Pulverulento
	<b>Relevo</b> Plano		<b>Relevo</b> Plano		<b>Relevo</b> Plano
	<b>Pigmento</b> Grafite		<b>Pigmento</b> Conhaque		<b>Pigmento</b> Castanho
	<b>Exsudato</b> -		<b>Exsudato</b> -		<b>Exsudato</b> Hialino
	<b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas.		<b>Micrografia</b> Hifas demáceas septadas.		<b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas.
<b>Ghx G-5.2.1-TA</b>	<i>Mycelia sterilia</i>	<b>Ghx G-3.3.1C-TA</b>	<i>Mycelia sterilia</i>	<b>Ghx G-4.2.1-TI</b>	<i>Guignardia sp.</i>
	<b>Forma da borda</b> Regular		<b>Forma da borda</b> Regular		<b>Forma da borda</b> Irregular
	<b>Coloração</b> - Verso: areia - Reverso: areia/ bege		<b>Coloração</b> - Verso: bege - Reverso: grafite		<b>Coloração</b> - Verso: verde pastel - Reverso: verde militar
	<b>Textura</b> Veludoso		<b>Textura</b> Algodonoso		<b>Textura</b> Algodonoso
	<b>Relevo</b> Apiculado		<b>Relevo</b> Plano		<b>Relevo</b> Membranoso
	<b>Pigmento</b> Bege		<b>Pigmento</b> Grafite		<b>Pigmento</b> Verde militar
	<b>Exsudato</b> -		<b>Exsudato</b> -		<b>Exsudato</b> -
	<b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas.		<b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas.		<b>Micrografia</b> Hifas demáceas septadas, ascósporos elipsoidais, inchados no centro.
<b>Ghx G-4.3.2-TI</b>	<i>Fusarium sp.</i>	<b>Ghx G-2.1.2-TI</b>	<i>Fusarium sp.</i>	<b>Ghx G-1.1.1-TI</b>	<i>Mycelia sterilia</i>
	<b>Forma da borda</b> Irregular		<b>Forma da borda</b> Regular		<b>Forma da borda</b> Irregular
	<b>Coloração</b> - Verso: branco - Reverso: branco		<b>Coloração</b> - Verso: branco/areia - Reverso: conhaque		<b>Coloração</b> - Verso: terra cota - Reverso: grafite
	<b>Textura</b> Algodonoso		<b>Textura</b> Algodonoso		<b>Textura</b> Algodonoso
	<b>Relevo</b> Crateriforme		<b>Relevo</b> Apiculado		<b>Relevo</b> Apiculado
	<b>Pigmento</b> -		<b>Pigmento</b> Conhaque		<b>Pigmento</b> -
	<b>Exsudato</b> -		<b>Exsudato</b> -		<b>Exsudato</b> -
	<b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas, macroconídios em forma de foice.		<b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas, microconídios ovais e retos.		<b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas.
<b>Ghx G-1.3.2-TA</b>			<b>Ghx G-3.3.1-TI</b>		
					
<i>Guignardia sp.</i>			<i>Mycelia sterilia</i>		
<b>Forma da borda</b> Regular	<b>Coloração</b> - Verso: cinza polar - Reverso: cinza polar/ verde militar	<b>Textura</b> Algodonoso	<b>Forma da borda</b> Regular	<b>Coloração</b> - Verso: cinza - Reverso: castanho	<b>Textura</b> Algodonoso
<b>Relevo</b> Plano		<b>Exsudato</b> -	<b>Relevo</b> Apiculado		<b>Exsudato</b> -
<b>Pigmento</b> -	<b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas, ascósporos elipsoidais, inchados no centro.		<b>Pigmento</b> Castanho	<b>Micrografia</b> Hifas demáceas septadas.	

<b>Ghx G-2.3.1-TA</b>	<i>Penicillium sp.</i>	<b>Ghx G-4.4.1-TA</b>	<i>Helicosporium sp.</i>	<b>Ghx G-2.1.1A-TI</b>	<i>Helicosporium sp.</i>
	<b>Forma da borda</b> Irregular		<b>Forma da borda</b> Regular		<b>Forma da borda</b> Regular
	<b>Corolação</b> - Verso: verde folha - Reverso: amarelo		<b>Corolação</b> - Verso: verde militar - Reverso: verde militar		<b>Corolação</b> - Verso: cinza polar - Reverso: cinza polar
	<b>Textura</b> Pulverulento		<b>Textura</b> Algodonoso		<b>Textura</b> Algodonoso
	<b>Relevo</b> Rugoso		<b>Relevo</b> Membranoso		<b>Relevo</b> Plano
	<b>Pigmento</b> Verde folha		<b>Pigmento</b> Verde militar		<b>Pigmento</b> -
	<b>Exsudato</b> Amarelo		<b>Exsudato</b> -		<b>Exsudato</b> -
	<b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas, filiaes e conidios arredondados produzidos em cadeias acrópitas.		<b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas, esporos helicoidais.		<b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas, esporos helicoidais.
<b>Ghx G-2.2.1</b>	<i>Mycelia sterilia</i>	<b>Ghx G-3.3.1B-TA</b>	<i>Fusarium sp.</i>	<b>Ghx G-2.3.1</b>	<i>Helicosporium sp.</i>
	<b>Forma da borda</b> Regular		<b>Forma da borda</b> Regular		<b>Forma da borda</b> Regular
	<b>Corolação</b> - Verso: cinza polar/ verde pastel - Reverso: cinza polar/ verde pastel		<b>Corolação</b> - Verso: branco - Reverso: creme		<b>Corolação</b> - Verso: cinza/ camurça - Reverso: grafite
	<b>Textura</b> Algodonoso		<b>Textura</b> Algodonoso		<b>Textura</b> Algodonoso
	<b>Relevo</b> Plano		<b>Relevo</b> Plano		<b>Relevo</b> Plano
	<b>Pigmento</b> Verde pastel		<b>Pigmento</b> Creme		<b>Pigmento</b> Grafite
	<b>Exsudato</b> -		<b>Exsudato</b> -		<b>Exsudato</b> -
	<b>Micrografia</b> Hifas demáceas septadas.		<b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas, microconidios obovóides e piriformes.		<b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas, esporos helicoidais.
<b>Ghx G-1.2.1B-TA</b>	<i>Fusarium sp.</i>	<b>Ghx G-1.2.2A-TA</b>	<i>Penicillium sp.</i>	<b>Ghx G-3.1.1-TA</b>	<i>Helicosporium sp.</i>
	<b>Forma da borda</b> Regular		<b>Forma da borda</b> Regular		<b>Forma da borda</b> Regular
	<b>Corolação</b> - Verso: branco - Reverso: branco		<b>Corolação</b> - Verso: verde bandeira - Reverso: amarelo palha		<b>Corolação</b> - Verso: cinza polar - Reverso: grafite
	<b>Textura</b> Algodonoso		<b>Textura</b> Algodonoso		<b>Textura</b> Algodonoso
	<b>Relevo</b> Plano		<b>Relevo</b> Plano		<b>Relevo</b> Plano
	<b>Pigmento</b> -		<b>Pigmento</b> Verde bandeira		<b>Pigmento</b> Grafite
	<b>Exsudato</b> -		<b>Exsudato</b> Amarelo		<b>Exsudato</b> -
	<b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas, microconidios ovais e retos.		<b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas, filiaes e conidios arredondados produzidos em cadeias acrópitas.		<b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas, esporos helicoidais.
<b>Ghx G-3.4.1B-TI</b>			<b>Ghx G-2.1.2-TA</b>		
					
<b>Helicosporium sp.</b>			<b>Fusarium sp.</b>		
<b>Forma da borda</b> Irregular	<b>Corolação</b> - Verso: vermelho cerâmica - Reverso: mel	<b>Textura</b> Algodonoso	<b>Forma da borda</b> Regular	<b>Corolação</b> - Verso: branco - Reverso: areia	<b>Textura</b> Algodonoso
<b>Relevo</b> Plano		<b>Exsudato</b> -	<b>Relevo</b> Crateriforme		<b>Exsudato</b> -
<b>Pigmento</b> Vermelho cerâmica	<b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas, esporos helicoidais.		<b>Pigmento</b> -	<b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas, microconidios ovais e retos, endósporos.	

	<p><b>Ghx G-2.2.1A-TA</b></p> <p><b>Fusarium sp.</b></p> <p><b>Forma da borda</b> Regular</p> <p><b>Coloração</b> - Verso: branco - Reverso: branco/ amarelo colonial</p> <p><b>Textura</b> Algodonoso</p> <p><b>Relevo</b> Plano</p> <p><b>Pigmento</b> Amarelo colonial</p> <p><b>Exsudato</b> -</p> <p><b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas, microconídios ovais e retos.</p>		<p><b>Ghx G-2.2.1-TI</b></p> <p><b>Fusarium sp.</b></p> <p><b>Forma da borda</b> Regular</p> <p><b>Coloração</b> - Verso: branco - Reverso: branco</p> <p><b>Textura</b> Algodonoso</p> <p><b>Relevo</b> Crateriforme</p> <p><b>Pigmento</b> -</p> <p><b>Exsudato</b> -</p> <p><b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas, microconídios ovais e retos.</p>		<p><b>Ghx G-2.1.1B-TI</b></p> <p><b>Penicillium sp.</b></p> <p><b>Forma da borda</b> Regular</p> <p><b>Coloração</b> - Verso: verde folha - Reverso: amarelo</p> <p><b>Textura</b> Algodonoso</p> <p><b>Relevo</b> Rugoso</p> <p><b>Pigmento</b> Verde folha</p> <p><b>Exsudato</b> Amarelo</p> <p><b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas, filiares e conídios arredondados produzidos em cadeias acrópitas.</p>
	<p><b>Md GL<sub>1</sub> 1.1.2 28 °C</b></p> <p><b>Aspergillus sp.</b></p> <p><b>Forma da borda</b> Irregular</p> <p><b>Coloração</b> - Verso: verde guarujá - Reverso: amarelo palha</p> <p><b>Textura</b> Pulverulento</p> <p><b>Relevo</b> Membranoso</p> <p><b>Pigmento</b> Verde guarujá</p> <p><b>Exsudato</b> -</p> <p><b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas, filiares e conídios esféricos produzidos em cadeia ao redor da vesícula.</p>		<p><b>Md GL<sub>1</sub> 2.2.1 18 °C</b></p> <p><b>Rhizoctonia sp.</b></p> <p><b>Forma da borda</b> Regular</p> <p><b>Coloração</b> - Verso: cinza polar - Reverso: areia/grafite</p> <p><b>Textura</b> Algodonoso</p> <p><b>Relevo</b> Plano</p> <p><b>Pigmento</b> Grafite</p> <p><b>Exsudato</b> -</p> <p><b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas, células longas e retas formando ângulo de 90° com a hifa principal.</p>		<p><b>Md GL<sub>1</sub> 3.1.1 28 °C</b></p> <p><b>Rhizoctonia sp.</b></p> <p><b>Forma da borda</b> Irregular</p> <p><b>Coloração</b> - Verso: cinza polar - Reverso: areia/grafite</p> <p><b>Textura</b> Algodonoso</p> <p><b>Relevo</b> Plano</p> <p><b>Pigmento</b> Grafite</p> <p><b>Exsudato</b> -</p> <p><b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas, células longas e retas formando ângulo de 90° com a hifa principal.</p>
	<p><b>Md GL<sub>1</sub> 1.1.1 18 °C</b></p> <p><b>Helicosporium sp.</b></p> <p><b>Forma da borda</b> Irregular</p> <p><b>Coloração</b> - Verso: branco/verde guarujá - Reverso: branco/ verde folha</p> <p><b>Textura</b> Algodonoso</p> <p><b>Relevo</b> Rugoso</p> <p><b>Pigmento</b> Verde folha</p> <p><b>Exsudato</b> -</p> <p><b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas, esporos helicoidais.</p>		<p><b>Md GL<sub>1</sub> 2.4.2 18 °C</b></p> <p><b>Mycelia sterilia</b></p> <p><b>Forma da borda</b> Irregular</p> <p><b>Coloração</b> - Verso: branco nuvem - Reverso: areia</p> <p><b>Textura</b> Pulverulento</p> <p><b>Relevo</b> Plano</p> <p><b>Pigmento</b> -</p> <p><b>Exsudato</b> -</p> <p><b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas.</p>		<p><b>Md GL<sub>1</sub> 2.4.1 18 °C</b></p> <p><b>Mycelia sterilia</b></p> <p><b>Forma da borda</b> Irregular</p> <p><b>Coloração</b> - Verso: cinza concreto - Reverso: castor</p> <p><b>Textura</b> Penugento</p> <p><b>Relevo</b> Plano</p> <p><b>Pigmento</b> Castor</p> <p><b>Exsudato</b> -</p> <p><b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas vacuoladas.</p>
<p><b>Md GL<sub>1</sub> 3.1.1 18 °C</b></p> 			<p><b>Md GL<sub>1</sub> 3.4.1 28 °C</b></p> 		
<p><b>Mycelia sterilia</b></p> <p><b>Forma da borda</b> Irregular</p> <p><b>Relevo</b> Plano</p> <p><b>Pigmento</b> -</p> <p><b>Coloração</b> - Verso: cinza concreto - Reverso: bege espuma</p> <p><b>Textura</b> Pulverulento</p> <p><b>Exsudato</b> -</p> <p><b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas.</p>			<p><b>Mycelia sterilia</b></p> <p><b>Forma da borda</b> Regular</p> <p><b>Relevo</b> Apiculado</p> <p><b>Pigmento</b> Chumbo</p> <p><b>Coloração</b> - Verso: cinza concreto - Reverso: cinza concreto e chumbo</p> <p><b>Textura</b> Algodonoso</p> <p><b>Exsudato</b> Sim</p> <p><b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas vacuoladas.</p>		

Md GL <sub>1</sub> 2.4.1 28 °C	<b><i>Guignardia</i> sp.</b> Forma da borda Irregular Coloração - Verso: conhaque - Reverso: amarelo cromo Textura Algodonoso Relevo Apiculado Pigmento Amarelo cromo Exsudato Conhaque Micrografia Hifas hialinas septadas, ascósporos elipsoidais, inchados no centro.	Md GL <sub>1</sub> 2.3.1 28 °C	<b><i>Mycelia sterilia</i></b> Forma da borda Regular Coloração - Verso: branco - Reverso: verde folha Textura Algodonoso Relevo Apiculado Pigmento Verde folha Exsudato Cinza Micrografia Hifas hialinas septadas.	Md GL <sub>1</sub> 1.4.1 28 °C	<b><i>Fusarium</i> sp.</b> Forma da borda Irregular Coloração - Verso: branco - Reverso: branco Textura Penugento Relevo Plano Pigmento - Exsudato - Micrografia Hifas hialinas septadas, macroconídios em forma de foíce, microconídios ovais e retos.
Md GL <sub>1</sub> 1.3.1 28 °C	<b><i>Mycelia sterilia</i></b> Forma da borda Irregular Coloração - Verso: branco gelo - Reverso: areia Textura Penugento Relevo Plano Pigmento - Exsudato - Micrografia Hifas hialinas septadas.	Md GL <sub>1</sub> 1.2.1 28 °C	<b><i>Mycelia sterilia</i></b> Forma da borda Regular Coloração - Verso: branco muvem - Reverso: cinza concreto/verde militar Textura Algodonoso Relevo Apiculado Pigmento Verde militar Exsudato - Micrografia Hifas hialinas septadas.	Md GL <sub>1</sub> 1.1.1 28 °C	<b><i>Mycelia sterilia</i></b> Forma da borda Regular Coloração - Verso: camurça - Reverso: castor Textura Algodonoso Relevo Plano Pigmento Castor Exsudato - Micrografia Hifas hialinas septadas vacuoladas.
Md GL <sub>2</sub> 3.3.1 18 °C	<b><i>Mycelia sterilia</i></b> Forma da borda Regular Coloração - Verso: castor - Reverso: camurça Textura Penugento Relevo Plano Pigmento Camurça Exsudato - Micrografia Hifas hialinas septadas.	Md GL <sub>2</sub> 3.1.1 18 °C	<b><i>Rhizoctonia</i> sp.</b> Forma da borda Regular Coloração - Verso: cinza concreto/castor - Reverso: castor Textura Penugento Relevo Plano Pigmento Castor Exsudato - Micrografia Hifas hialinas septadas, células monilióides.	Md GL <sub>2</sub> 2.2.3 18 °C	<b><i>Aspergillus niger</i></b> Forma da borda Regular Coloração - Verso: areia/castanho - Reverso: amarelo Textura Algodonoso Relevo Apiculado Pigmento Amarelo/preto Exsudato - Micrografia Hifas hialinas septadas, conidióforos demáceos, conídios esféricos produzidos em cadeia ao redor da vesícula.
Md GL <sub>2</sub> 1.1.1 18 °C			Md GL <sub>2</sub> 1.2.1 18 °C		
					
<b><i>Helicosporium</i> sp.</b>			<b><i>Helicosporium</i> sp.</b>		
Forma da borda Irregular	Coloração - Verso: bege mármore - Reverso: creme/verde militar	Textura Pulverulento	Forma da borda Irregular	Coloração - Verso: bege mármore/ camurça - Reverso: castor	Textura Algodonoso
Relevo Plano		Exsudato -	Relevo Plano		Exsudato -
Pigmento Verde militar	Micrografia Hifas hialinas septadas, esporos helicoidais.		Pigmento Castor	Micrografia Hifas hialinas septadas, esporos helicoidais.	

<b>Md GL<sub>2</sub> 1.1.1 28 °C</b>	<b><i>Helicosporium</i> sp.</b>	<b>Md GL<sub>2</sub> 2.1.1 28 °C</b>	<b><i>Fusarium</i> sp.</b>	<b>Md GL<sub>2</sub> 1.2.1 28 °C</b>	<b><i>Aspergillus</i> sp.</b>
	<b>Forma da borda</b> Regular		<b>Forma da borda</b> Regular		<b>Forma da borda</b> Irregular
	<b>Coloração</b> - Verso: bege mármore - Reverso: bege espuma		<b>Coloração</b> - Verso: branco gelo/ creme - Reverso: marfim		<b>Coloração</b> - Verso: verde guarujá - Reverso: amarelo palha
	<b>Textura</b> Algodonoso		<b>Textura</b> Algodonoso		<b>Textura</b> Pulverulento
	<b>Relevo</b> Plano		<b>Relevo</b> Plano		<b>Relevo</b> Membranoso
	<b>Pigmento</b> Bege		<b>Pigmento</b> Amarelo		<b>Pigmento</b> Verde guarujá
	<b>Exsudato</b> -		<b>Exsudato</b> -		<b>Exsudato</b> -
	<b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas, esporos helicoidais.		<b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas, macro- conídios em forma de foice, micro-conídios ovais e retos.		<b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas, filíades e conídios esféricos produzidos em cadeia ao redor da vesícula
<b>Md GL<sub>2</sub> 2.2.1 18 °C</b>	<b><i>Helicosporium</i> sp.</b>	<b>Md GL<sub>2</sub> 1.4.1 18 °C</b>	<b><i>Mycelia sterilia</i></b>	<b>Md GL<sub>2</sub> 3.4.1 18 °C</b>	<b><i>Mycelia sterilia</i></b>
	<b>Forma da borda</b> Regular		<b>Forma da borda</b> Regular		<b>Forma da borda</b> Regular
	<b>Coloração</b> - Verso: branco gelo - Reverso: marfim		<b>Coloração</b> - Verso: verde luar - Reverso: verde militar		<b>Coloração</b> - Verso: cinza concreto - Reverso: conhaque
	<b>Textura</b> Algodonoso		<b>Textura</b> Algodonoso		<b>Textura</b> Algodonoso
	<b>Relevo</b> Plano		<b>Relevo</b> Apiculado		<b>Relevo</b> Apiculado
	<b>Pigmento</b> -		<b>Pigmento</b> Verde militar		<b>Pigmento</b> -
	<b>Exsudato</b> -		<b>Exsudato</b> -		<b>Exsudato</b> -
	<b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas, esporos helicoidais.		<b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas.		<b>Micrografia</b> Hifas hialinas septadas.

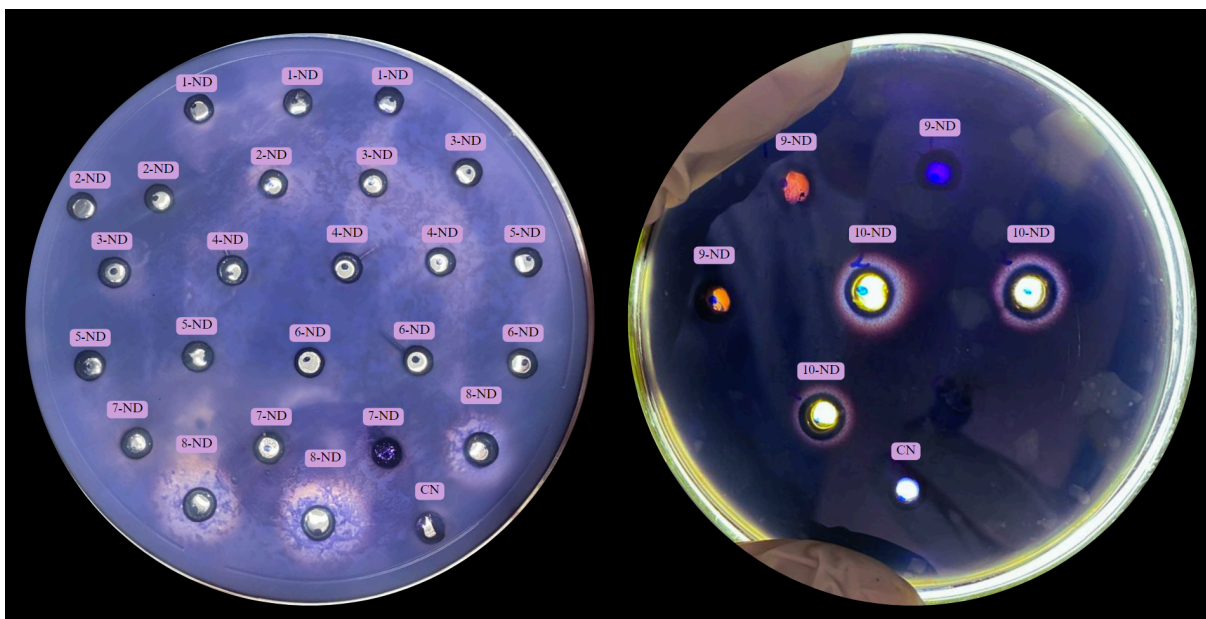
Fonte: Autoria própria. Ghx = *Gustavia hexapetala*; G = galho; TA = Tetraciclina + Ampicilina; TI = Tetraciclina + Itraconazol; Md = *Myrciaria dubia*; GL<sub>1</sub> = galho planta 1; GL<sub>2</sub> = galho planta 2.

#### 5.4. Análise da atividade amilolítica

Com a realização dos testes enzimáticos de atividade amilolítica, 2 dos 50 fungos testados apresentaram halos de hidrólise (Figura 19), sendo um fungo isolado de *G. hexapetala* (*Mycelia sterilia* - Ghx G - 3.3.2 – TA) (Tabela 4), que teve halo de  $18,00 \pm 2,16$  mm, e um fungo isolado de *M. dubia* (*Aspergillus* sp. - Md GL<sub>2</sub> 1.1.2 28 °C) (Tabela 5), que teve halo de  $10,00 \pm 0,82$  mm.

Diversos estudos abordam o potencial de produção de amilases por fungos endofíticos, como no trabalho de Mendonça e colaboradores (2023), em que foram testados 21 fungos de *C. spruceanum* e 24% apresentaram resultados positivos para a produção da enzima. Os autores testaram também 16 fungos endofíticos de *H. succuba*, dos quais 6% apresentaram atividade amilolítica.

Figura 19 - Halos de degradação amilolítica produzidos pelos fungos endofíticos testados.



Fonte: Autoria própria. 1-10 = diferentes fungos testados, sendo 8 o fungo *Mycelia sterilia* (Ghx G - 3.3.2 – TA) e 10 o fungo *Aspergillus* sp. (Md GL<sub>2</sub> 1.1.2 28 °C); ND = Não Detectado; CN = Controle Negativo.

Tabela 4 - Atividade amilolítica dos fungos endofíticos isolados de *G. hexapetala* testados.

Caracterização morfológica	Código de isolamento	Diâmetro do halo (mm)
<i>Mycelia sterilia</i>	Ghx G - 3.3.2 – TA	18,00 ± 2,16
<i>Mycelia sterilia</i>	Ghx G - 1.2.1B – TI	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Ghx G - 5.4.1 – TA	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Ghx G - 5.2.1 – TA	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Ghx G - 3.3.1C – TA	0,00
<i>Guignardia</i> sp.	Ghx G - 4.2.1 – TI	0,00
<i>Fusarium</i> sp.	Ghx G - 4.3.2 – TI	0,00
<i>Fusarium</i> sp.	Ghx G - 2.1.2 – TI	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Ghx G - 1.1.1 – TI	0,00
<i>Guignardia</i> sp.	Ghx G - 1.3.2 – TA	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Ghx G - 3.3.1 – TI	0,00
<i>Penicillium</i> sp.	Ghx G - 2.3.1 – TA	0,00
<i>Helicosporium</i> sp.	Ghx G - 4.4.1 – TA	0,00
<i>Helicosporium</i> sp.	Ghx G - 2.1.1A – TI	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Ghx G - 2.2.1	0,00
<i>Fusarium</i> sp.	Ghx G-3.3.1B -TA	0,00
<i>Helicosporium</i> sp.	Ghx G - 2.3.1	0,00
<i>Fusarium</i> sp.	Ghx G - 1.2.1B - TA	0,00
<i>Penicillium</i> sp.	Ghx G - 1.2.2A – TA	0,00
<i>Helicosporium</i> sp.	Ghx G - 3.1.1 – TA	0,00
<i>Helicosporium</i> sp.	Ghx G - 3.4.1B – TI	0,00
<i>Fusarium</i> sp.	Ghx G - 2.1.2- TA	0,00

<i>Fusarium</i> sp.	Ghx G - 2.2.1A - TA	0,00
<i>Fusarium</i> sp.	Ghx G - 2.2.1 – TI	0,00
<i>Penicillium</i> sp.	Ghx G - 2.1.1B – TI	0,00

Fonte: Autoria própria.

Tabela 5 - Atividade amilolítica dos fungos endofíticos isolados de *M. dubia* testados.

<b>Caracterização morfológica</b>	<b>Código de isolamento</b>	<b>Diâmetro do halo (mm)</b>
<i>Aspergillus</i> sp.	Md GL <sub>2</sub> 1.1.2 28 °C	10,00 ± 0,82
<i>Rhizoctonia</i> sp.	Md GL <sub>1</sub> 2.2.1 18 °C	0,00
<i>Rhizoctonia</i> sp.	Md GL <sub>1</sub> 3.1.1 28 °C	0,00
<i>Helicosporium</i> sp.	Md GL <sub>1</sub> 1.1.1 18 °C	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Md GL <sub>1</sub> 2.4.2 18 °C	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Md GL <sub>1</sub> 2.4.1 18 °C	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Md GL <sub>1</sub> 3.1.1 18 °C	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Md GL <sub>1</sub> 3.4.1 28 °C	0,00
<i>Guignardia</i> sp.	Md GL <sub>1</sub> 2.4.1 28 °C	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Md GL <sub>1</sub> 2.3.1 28 °C	0,00
<i>Fusarium</i> sp.	Md GL <sub>1</sub> 1.4.1 28 °C	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Md GL <sub>1</sub> 1.3.1 28 °C	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Md GL <sub>1</sub> 1.2.1 28 °C	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Md GL <sub>1</sub> 1.1.1 28 °C	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Md GL <sub>2</sub> 3.3.1 18 °C	0,00
<i>Rhizoctonia</i> sp.	Md GL <sub>2</sub> 3.1.1 18 °C	0,00
<i>Aspergillus niger</i>	Md GL <sub>2</sub> 2.2.3 18 °C	0,00
<i>Helicosporium</i> sp.	Md GL <sub>2</sub> 1.1.1 18 °C	0,00
<i>Helicosporium</i> sp.	Md GL <sub>2</sub> 1.2.1 18 °C	0,00
<i>Helicosporium</i> sp.	Md GL <sub>2</sub> 1.1.1 28 °C	0,00
<i>Fusarium</i> sp.	Md GL <sub>2</sub> 2.1.1 28 °C	0,00
<i>Aspergillus</i> sp.	Md GL <sub>2</sub> 1.2.1 28 °C	0,00
<i>Helicosporium</i> sp.	Md GL <sub>2</sub> 2.2.1 18 °C	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Md GL <sub>2</sub> 1.4.1 18 °C	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Md GL <sub>2</sub> 3.4.1 18 °C	0,00

Fonte: Autoria própria.

No estudo de Martins *et al.* (2024), foram testados em *cup plate* 35 fungos endofíticos isolados de *G. hexapetala*, em que 14,28% (5/35) apresentaram halos de degradação amilolítica variando de 6,67 e 10,67 mm. Bezerra (2017) também testou em *cup plate* 15 fungos endofíticos de planta amazônica, em que 6 dos testados apresentaram resultados positivos para esta enzima, com halos variando de 1 a 9 mm. Nesta pesquisa, os resultados obtidos foram semelhantes, sendo que um fungo apresentou halo de hidrólise maior que os relatados (18 mm), sendo considerada uma linhagem promissora para a produção da enzima em grande escala (Orlandelli *et al.*, 2011).

Um dos fungos endofíticos que positivaram para a produção de amilases foi caracterizado morfológicamente como *Aspergillus* sp., este gênero é relatado na literatura como um ótimo produtor de amilases, sendo bastante utilizado em processos industriais (Tabela 6) (Brito, 2017; Santos, 2020). Brito (2017), testou para atividade amilolítica 14 cepas de *Aspergillus* em *cup plate* com meio ágar-amido, destes, 13 mostraram um bom potencial enzimático.

Tabela 6 - Produção de amilases por *Aspergillus* spp. em fermentação submersa.

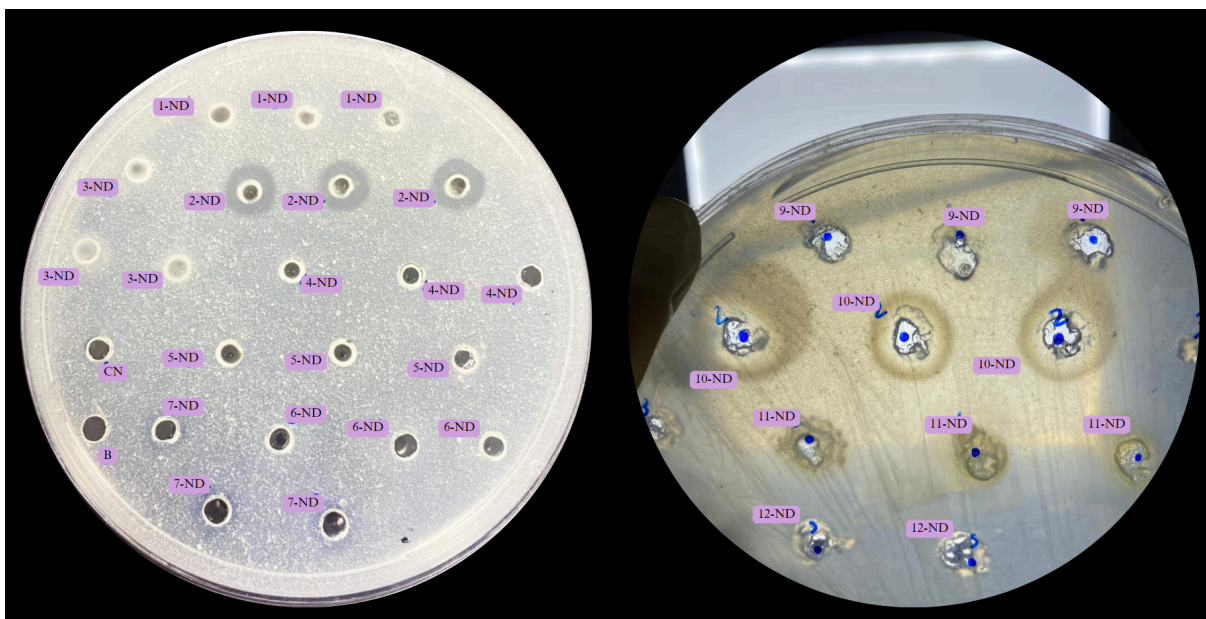
<b>Linhagem fúngica</b>	<b>Substrato</b>	<b>Produtividade</b>	<b>Referência</b>
<i>A. niger</i>	Água de maceração do milho/ sacarose	1744 U mL <sup>-1</sup>	Chimata <i>et al.</i> (2011).
	Farinha de mandioca	10,5 U mL <sup>-1</sup>	Stroparo <i>et al.</i> (2011)
	Batata-doce	0,893U mL <sup>-1</sup>	Tamilarasan <i>et al.</i> (2012)
	Casca de mandioca	19,34 mg mL <sup>-1</sup>	Lawal <i>et al.</i> (2014).
<i>A. gracilis</i>	Amido	131,02 U mg <sup>-1</sup>	Ali <i>et al.</i> (2014).

Fonte: Adaptado de Brito (2017).

### 5.5. Análise da atividade proteolítica

Testando as mesmas linhagens para a produção de enzimas proteolíticas, 14% (7/ 50) dos fungos apresentaram halos de degradação do substrato (Figura 20). Foram estes cinco fungos isolados de *G. hexapetala*, que tiveram halos de 11,33 mm, 11,00 mm, 10,67 mm, 10,00 mm e 09,67 mm, respectivamente (Tabela 7). O desvio padrão, medida que descreve a diferença entre as médias das triplicatas, variou entre 0,00 mm a 0,94 mm. Apenas o último destes foi possível identificar pela caracterização morfológica, sendo pertencente ao gênero *Guignardia*. Os outros dois fungos que positivaram para a produção da enzima foram isolados de *M. dubia*, ambos foram identificados morfológicamente como do gênero *Rhizoctonia* e produziram halos de  $14,67 \pm 1,70$  mm e  $12,67 \pm 2,05$  mm (Tabela 8).

Figura 20 - Halos de degradação proteolítica produzidos pelos fungos endofíticos testados.



Fonte: Autoria própria. 1-12 = diferentes fungos testados, sendo 2 o fungo *Rhizoctonia* sp. (Ghx G - 3.3.1C – TA) e 10 o fungo *Rhizoctonia* sp. (Md GL<sub>1</sub> 2.2.1 18 °C); ND = Não Detectado; CN = Controle Negativo; B = Branco.

Tabela 7 - Atividade proteolítica dos fungos endofíticos isolados de *G. hexapetala* testados.

Caracterização morfológica	Código de isolamento	Diâmetro do halo (mm)
<i>Mycelia sterilia</i>	Ghx G - 3.3.2 – TA	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Ghx G - 1.2.1B – TI	11,33 ± 0,94
<i>Mycelia sterilia</i>	Ghx G - 5.4.1 – TA	11,00 ± 0,81
<i>Mycelia sterilia</i>	Ghx G - 5.2.1 – TA	10,67 ± 0,94
<i>Mycelia sterilia</i>	Ghx G - 3.3.1C – TA	10,00 ± 0,00
<i>Guignardia</i> sp.	Ghx G - 4.2.1 – TI	09,67 ± 0,94
<i>Fusarium</i> sp.	Ghx G - 4.3.2 – TI	0,00
<i>Fusarium</i> sp.	Ghx G - 2.1.2 – TI	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Ghx G - 1.1.1 – TI	0,00
<i>Guignardia</i> sp.	Ghx G - 1.3.2 – TA	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Ghx G - 3.3.1 – TI	0,00
<i>Penicillium</i> sp.	Ghx G - 2.3.1 – TA	0,00
<i>Helicosporium</i> sp.	Ghx G - 4.4.1 – TA	0,00
<i>Helicosporium</i> sp.	Ghx G - 2.1.1A – TI	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Ghx G - 2.2.1	0,00
<i>Fusarium</i> sp.	Ghx G-3.3.1B -TA	0,00
<i>Helicosporium</i> sp.	Ghx G - 2.3.1	0,00
<i>Fusarium</i> sp.	Ghx G - 1.2.1B - TA	0,00
<i>Penicillium</i> sp.	Ghx G - 1.2.2A – TA	0,00
<i>Helicosporium</i> sp.	Ghx G - 3.1.1 – TA	0,00
<i>Helicosporium</i> sp.	Ghx G - 3.4.1B – TI	0,00
<i>Fusarium</i> sp.	Ghx G - 2.1.2- TA	0,00

<i>Fusarium</i> sp.	Ghx G - 2.2.1A - TA	0,00
<i>Fusarium</i> sp.	Ghx G - 2.2.1 – TI	0,00
<i>Penicillium</i> sp.	Ghx G - 2.1.1B – TI	0,00

Fonte: Autoria própria.

Tabela 8 - Atividade proteolítica dos fungos endofíticos isolados de *M. dubia* testados.

<b>Caracterização morfológica</b>	<b>Código de isolamento</b>	<b>Diâmetro do halo (mm)</b>
<i>Aspergillus</i> sp.	Md GL <sub>2</sub> 1.1.2 28 °C	0,00
<i>Rhizoctonia</i> sp.	Md GL <sub>1</sub> 2.2.1 18 °C	14,67 ± 1,70
<i>Rhizoctonia</i> sp.	Md GL <sub>1</sub> 3.1.1 28 °C	12,67 ± 2,05
<i>Helicosporium</i> sp.	Md GL <sub>1</sub> 1.1.1 18 °C	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Md GL <sub>1</sub> 2.4.2 18 °C	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Md GL <sub>1</sub> 2.4.1 18 °C	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Md GL <sub>1</sub> 3.1.1 18 °C	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Md GL <sub>1</sub> 3.4.1 28 °C	0,00
<i>Guignardia</i> sp.	Md GL <sub>1</sub> 2.4.1 28 °C	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Md GL <sub>1</sub> 2.3.1 28 °C	0,00
<i>Fusarium</i> sp.	Md GL <sub>1</sub> 1.4.1 28 °C	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Md GL <sub>1</sub> 1.3.1 28 °C	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Md GL <sub>1</sub> 1.2.1 28 °C	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Md GL <sub>1</sub> 1.1.1 28 °C	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Md GL <sub>2</sub> 3.3.1 18 °C	0,00
<i>Rhizoctonia</i> sp.	Md GL <sub>2</sub> 3.1.1 18 °C	0,00
<i>Aspergillus niger</i>	Md GL <sub>2</sub> 2.2.3 18 °C	0,00
<i>Helicosporium</i> sp.	Md GL <sub>2</sub> 1.1.1 18 °C	0,00
<i>Helicosporium</i> sp.	Md GL <sub>2</sub> 1.2.1 18 °C	0,00
<i>Helicosporium</i> sp.	Md GL <sub>2</sub> 1.1.1 28 °C	0,00
<i>Fusarium</i> sp.	Md GL <sub>2</sub> 2.1.1 28 °C	0,00
<i>Aspergillus</i> sp.	Md GL <sub>2</sub> 1.2.1 28 °C	0,00
<i>Helicosporium</i> sp.	Md GL <sub>2</sub> 2.2.1 18 °C	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Md GL <sub>2</sub> 1.4.1 18 °C	0,00
<i>Mycelia sterilia</i>	Md GL <sub>2</sub> 3.4.1 18 °C	0,00

Fonte: Autoria própria.

Os fungos endofíticos podem ter a capacidade de produzir essas enzimas para serem utilizadas pelo seu metabolismo de forma natural, em processos bioquímicos. Além disso, eles liberam enzimas para degradar o tecido vegetal, facilitando a sua entrada nas plantas, o que constitui um dos principais mecanismos de invasão desses fungos (Azevedo, 1998; Martins, 2024). A produção de proteases pode ser verificada com esta pesquisa e em diversos outros trabalhos como o de Specian; Costa; Pamphile (2021), que investigaram a atividade enzimática de protease do fungo *Diaporthe helianthi*, em que observaram halos de 9,33 mm. Também com o estudo de Diniz *et al.* (2020), em que foram avaliados 8 fungos endofíticos de

*Oenocarpus bacaba* Mart., dos quais 1 (12,5%) apresentou halos de degradação para protease, além de outros 3 (37,5%) para amilase.

Martins *et al.* (2024), testando 35 fungos endofíticos de *G. hexapetala*, 51,42% (18/35) apresentaram halos de degradação proteolítica em *cup plate* com meio ágar-gelatina-leite. Orlandelli *et al.* (2011) testaram para protease 28 fungos isolados da planta medicinal *Piper hispidum* e obtiveram resultados 100% positivos, os autores consideram que medidas de hidrólise do meio sólido acima de 9 mm são consideradas promissoras. Nesta pesquisa, apresentaram resultados positivos 20% dos fungos de *G. hexapetala* e 8% dos fungos de *M. dubia* (14% no total), sendo que todos os sete fungos apresentaram halos acima de 9 mm.

Um dos fungos produtores de proteases segundo esta pesquisa pertence ao gênero *Guignardia*. Sposito *et al.* (2011) analisaram o perfil enzimático do endófito *Guignardia mangiferae* e do fitopatógeno *Guignardia citricarpa*. Os autores destacaram a escassez de estudos sobre a produção enzimática dessas espécies e observaram que elas exibiram um nível elevado de produção de enzimas hidrolíticas.

Outro gênero que apresentou resultados positivos para a produção de proteases foi o *Rhizoctonia*. Comparando com a literatura, na pesquisa de Flores (2022), ao testar fungos endofíticos de soja deste gênero, não foi possível observar atividade proteolítica, o que difere dos dados obtidos com este trabalho.

## 6. CONCLUSÃO

O isolamento utilizando fragmentos de folhas, galhos e frutos de *Myrciaria dubia* possibilitou analisar a abundância de fungos endofíticos que podem ser encontrados em associação com a espécie vegetal e verificar o potencial biotecnológico que pode ser desempenhado por esses organismos.

Selecionou-se e caracterizou-se morfológicamente 50 fungos endofíticos para a realização dos testes enzimáticos, sendo 25 de *G. hexapetala* e 25 de *M. dubia*. A partir da caracterização macro e micromorfológica, foram identificados 6 diferentes gêneros fúngicos pertencentes aos filos Ascomycota e Basidiomycota (*Rhizoctonia*). No entanto, não foi possível identificar 38% dos fungos selecionados, uma vez que não produziram estruturas reprodutivas.

Quanto ao potencial de produção de moléculas bioativas, testando a atividade amilolítica, 4% dos fungos apresentaram resultados positivos. Já para a produção de enzimas proteolíticas, 14% dos fungos testados produziram halos de hidrólise enzimática. Todos os resultados mostraram que as linhagens são promissoras para a produção das moléculas bioativas em grande escala.

Dessarte, esta pesquisa destaca o potencial que pode ser apresentado por fungos endofíticos isolados de plantas nativas da Amazônia, demonstrando novas possibilidades de uso pela biotecnologia em diferentes setores da indústria, e a importância da conservação dessas espécies para a sociedade e o meio ambiente como um todo. É uma base para futuras pesquisas quantitativas, com o objetivo de aprofundar o conhecimento já consolidado, além de explorar a capacidade dessas linhagens fúngicas em diferentes áreas, ampliando a descoberta do seu potencial de produção de moléculas bioativas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, S.; SAMANTA, S.; DESHMUKH, S. K. The antidiabetic potential of endophytic fungi: Future prospects as therapeutic agents. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 3, p. 1159-1165, 2022.
- ALMEIDA, D. A. C.; BARBOSA, F. R.; GUSMÃO, L. F. P. Alguns fungos conidiais aquáticos-facultativos do bioma Caatinga. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 4, p. 924-932, 2012.
- ALMEIDA, M. F. O. **Estudos Químicos e Biológicos de Fungos endofíticos de *Gustavia* sp.** 2014. 195 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus (AM), 2014.
- ALVES, D. **Atividade antitumoral e antibacteriana de metabólitos secundários de fungos endofíticos isolados de *Euterpe oleracea* Mart.** 2023. 42 f. Dissertação (Mestrado em Saúde do Adulto). Universidade Federal do Maranhão, São Luís (MA), 2023.
- ALVES, D. R. *et al.* Atividades antioxidante, anticolinesterásica e citotóxica de metabólitos de fungos endofíticos. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 73684-73691, 2020.
- AMARAL, A. D. O. **Diversidade de fungos endofíticos de clones de seringueira e o seu potencial para produção de enzimas extracelulares e biocontrole de fungos fitopatogênicos.** 2020. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus (AM), 2020.
- AMARAL, C. R. *et al.* Identificação de fungos endofíticos em *Hamelia patens* Jacq. e avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos fúngicos. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 12, n. 5, 2023.
- ARAÚJO, W. L. **Isolamento, Identificação e Caracterização Genética de Bactérias Endofíticas de Porta-Enxertos de Citros.** 1996. 85 f. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba (SP), 1996.
- ARRUDA, F. A. A.; SILVA, J. C. M.; NORA, G. D. A territorialidade e a resistência na floresta amazônica. **Geopauta**, Vitória da Conquista, v. 7, 2023.
- AUSTRÍACO, P. D. **Avaliação do potencial de produção de enzimas extracelulares por fungos endofíticos do babaçu.** 2022. 29 f. Monografia (Graduação em Química) - Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Marabá (PA), 2022.
- AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. **Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants.** In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. *Fungi: multifaceted microbes*. New Delhi: Anamaya Publishers, p. 189-207, 2007.
- AZEVEDO, J. L. **Microrganismos endofíticos.** In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) *Ecologia microbiana*. Jaguariúna: EMBRAPA, p. 117-137, 1998.
- BACON, C. W.; WHITE, J. F. Functions, mechanisms and regulation of endophytic and epiphytic microbial communities of plants. **Symbiosis**, v. 68, n. 1 3, p. 87 98, 2016.

- BANHOS, E. F. D. *et al.* Endophytic fungi from *Myrcia guianensis* at the Brazilian Amazon: distribution and bioactivity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 153-162, 2014.
- BARBOSA, R. N. **Atividade biológica e estudo químico de extratos orgânicos obtidos do fungo endofítico isolado de *Humirianthera ampla***. 2018. 42 f. Monografia (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Sergipe, Lagarto (SE), 2018.
- BARROS, B. N. D. *et al.* Avaliação do potencial biotecnológico de fungos endofíticos associados a espécies vegetais de ocorrência amazônica: uma revisão. **Contribuciones a Las Ciencias Sociales**, v. 16, n. 11, p. 27211-27234, 2023.
- BARY, A. **Morfologie und physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten**. Engelmann: Leipzig, 316p. 1866.
- BASTOS, D. Z. L. *et al.* Biotransformation of betulinic and betulonic acids by fungi. **Phytochemistry**, v. 68, p. 834-839, 2007.
- BATISTA, B. N.; RAPOSO, N. V. D. M.; SILVA, I. D. R. Isolamento e avaliação da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos de açaizeiro. **Fitos**, v. 12, n. 2, p. 161-174, 2018.
- BEZERRA, C. D. S. Caracterização enzimática de *Colletotrichum* spp. isolados de *Paullinia cupana* Kunth. var. *sorbilis* (Mart.). 2021. 105 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus (AM), 2017.
- BEZERRA, V. H. S. **Produção de proteases por fungos endofíticos: uma revisão sistemática**. 2021. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Brasília, Brasília (DF), 2021.
- BOAS, D. F. V. *et al.* Microrganismos endofíticos como fonte de compostos de interesse medicinal—uma breve revisão. **Revista Brasileira de Ciência, Tecnologia e Inovação**, v. 5, n. 1, p. 70-86, 2020.
- BONONI, V. L. R.; GRANDI, R. A. P. **Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos**: 1998.
- BORGES, F. E. *et al.* Características agrônômicas e potencial econômico do fruto Amazônico camu-camu: Uma revisão da literatura. **VIII Fórum Rondoniense de Pesquisa**, v.8, n.1, 2022.
- BRINGEL, S. R. B.; TRIGO, A. R. T. V.; SILVA, M. S. R. **Aspectos Físicos da Bacia amazônica**. In: BRINGEL, S. R. B.; GUTIERREZ, D. M. D. *Águas da Amazônia: natureza e desafios contemporâneos*. Manaus: Editora INPA, 2024.
- BRITO, R. G. D. **Produção de Amilase por *Aspergillus flavus* isolado a partir da mandioca (*Manihot esculenta*)**. 2017. 54f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Coari (AM), 2017.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **J Trop Med Hyg**. v. 24, p. 270-276, 1939.

CORRADO, M.; RODRIGUES, K. F. Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp. **Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms**, v. 44, n. 2, p. 157-160, 2004.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: IBDF, v. 6, 1994.

CORREIA, V. C. S. *et al.* Avaliação da atividade antagonista in vitro de fungos endofíticos associados a camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Journal of Bioenergy and Food Science**, v. 2, n. 4, p. 201-207, 2015.

COSTA, A. S. **Diversidade de visitantes florais e compartilhamento de polinizadores entre açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) e camucamuzeiro (*Myrciaria dubia* H.B.K. [McVaugh])**. 2019. 50 f. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém (PA), 2019.

CUI, J. L. *et al.* Correlation in Chemical Metabolome and Endophytic Mycobiome in *Cynomorium songaricum* from Different Desert Locations in China. **Journal of agricultural and food chemistry**, 2019.

DENTI, A. F. Tecnologia enzimática: classificação, imobilização, suportes e aplicações. **Revista Perspectiva**, v. 45, n. 171, p. 97-110, 2021.

DINGLE, J.; REID, W. W.; SOLOMONS, G. L. The enzymatic degradation of pectin and other polysaccharides. II. Application of the “cup-plate” assay to the estimation of enzymes. **Journal for the Science of Food and Agriculture**, n. 4, p. 149-155, 1953.

DINIZ, F. V. *et al.* Atividade enzimática de fungos endofíticos de bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.). **Biota Amazônia. Macapá**, v. 10, n. 3, p. 7-11, 2020.

DRAPER, F. C. Amazon tree 722 dominance across forest strata. **Nat. Ecol. Evol.** v. 5, p. 757–767, 2021.

ESPOSITO, E., AZEVEDO, J. L. **Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**, 2 ed. EDUCS: Caxias do Sul, 2010.

FACUNDO, V. A. *et al.* Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H. B. K. **Acta Amazônica**, v. 38, p. 743- 748, 2008.

FARIA, J. M. G. *et al.* Potencial de cicatrização da *Psidium guajava* e *Myrciaria Cauliflora* em feridas cutâneas: avaliação histológica em estudo de modelo experimental. **SALUSVITA**, v. 38, n. 4, p. 939-958, 2019.

FENG, X. *et al.* How deregulation, drought and increasing fire impact Amazonian biodiversity. **Nature**, v. 597, p. 516 521, 2021.

FERREIRA, F. S. **Biossurfactantes de fungos endofíticos isolados de *Gustavia* cf. *hexapetala* (Alb.) Sm. (Lecythidaceae) na Amazônia, contra patógenos da cavidade oral**.

2020. 140 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - BIONORTE) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus (AM), 2020.

FLORES, A. C. **Fungos endofíticos de soja: diversidade e prospecção enzimática**. 2022. 78 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavél (PN), 2022.

FONTENELE, L. A. *et al.* Fungos endofíticos na ilha de Upaon-açu, Maranhão, Brasil, e sua importância na conservação da flora. **Estudos dendrológicos e ecológicos na Amazônia: oportunidades e experiências**, v. 1, n. 1, p. 119-134. 2022.

FOSTER, R. B. *Gustavia hexapetala*. **Field Museum of Natural History**. 1992. Disponível em: <<https://plantidtools.fieldmuseum.org/pt/nlp/catalogue/3659866>>. Acesso em: 12 de setembro de 2024.

FUNAI *in* gov.br. **Dia da Amazônia – Funai reforça a importância dos Povos Indígenas para a proteção do bioma**. <https://www.gov.br/funai>. 2023. Disponível em: <<https://www.gov.br/funai/pt-br/assuntos/noticias/2023/dia-da-amazonia-2013-funai-reforca-a-importancia-dos-povos-indigenas-para-a-protecao-do-bioma>>. Acesso em: 26 de setembro de 2024.

Fungi *in* **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB128473>>. Acesso em: 30 de novembro de 2024.

GALVÃO, R. M. S. **Variabilidade Genética, Detectada por RAPD em *Glomerella cingulata*, um dos fungos endofíticos mais frequentes, isolados em *Theobroma grandiflorum*, *Pueraria phaseoloides* e *Scleria pterota***. 1998. 151 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos (SP), 1998.

GARCÍA-CHACÓN, J. M.; MARÍN-LOAIZA, J. C.; OSORIO, C. Camu Camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh): An Amazonian Fruit with Biofunctional Properties—A Review. **American Chemical Society**. v. 8, n. 6, p. 5139-6125, 2023.

GAZIS, R.; CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal ecology**, v. 3, n. 3, p. 240-254, 2010.

GUERRERO, R. T.; SILVEIRA, R. M. B. D. **Glossário Ilustrado de fungos: termos e conceitos aplicados à micologia**. 2 ed. Ed. Universidade/UFRGS, Porto Alegre, 117 p. 2003.

GILMAR, J. C. A. **Manual of Soil Fungi**, 2 ed. Iowa: U.S.A., 1959.

*Gustavia in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB8556>>. Acesso em: 13 de setembro de 2024.

IBGE, gov.br. **Amazônia Legal**. [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). 2022. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/geociencias/cartas-e-mapas/mapas-regionais/15819-amazonia-legal.html>>. Acesso em: 12 de setembro de 2024.

INPE, gov.br. **Focos de Queimada versus/ Desmatamentos (Bioma Amazônia)**. <https://terrabilis.dpi.inpe.br>. 2020. Disponível em: <<https://terrabilis.dpi.inpe.br>>

homologation/dashboard/deforestation/biomes/legal\_amazon/rates/2020\_11\_infoqueima.pdf>. Acesso em: 12 de setembro de 2024.

KIFFER, E; MORELET, M. The Deuteromycetes – Mitosporic fungi – Classification and Generic Keys, **Science Publishers**, 1999.

KIM, S. Plant-Microbe Interactions. **BioRender**. 2024. Disponível em: <<https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-65a030ece6a2ce95b443c3b3-plant-microbe-interactions>>. Acesso em: 12 de setembro de 2024.

KUSARI, S., M. *et al.* An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. **Journal of Natural Products**, v. 2, n. 71, p. 159-162. 2008.

LAZAROTTO, M. **Identificação e caracterização de *Fusarium spp.* e *Pestalotiopsis spp.* associados a *Carya illinoensis* no Rio Grande do Sul.** 2013. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria (RS), 2013.

*Lecythydaceae in Flora e Funga do Brasil.* Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available at:<<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB145>>. Acesso em: 13 de setembro de 2024.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica.** Indianápolis – SP: Sarvier, 2 ed., 839 p., 1995.

LEMOS, L. N. *et al.* Amazon deforestation enriches antibiotic resistance genes. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 153, 2021.

LIN, H. *et al.* Linoleic acid from the endophytic fungus *Diaporthe* sp. HT79 inhibits the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* by destructing the cell membrane and producing reactive oxygen species (ROS). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 192, p. 105423, 2023.

LOPES, M. J. S. *et al.* Impacto do desmatamento e queimadas na biodiversidade invisível da Amazônia. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**. 16, n. 1, 2023.

LOPES, M. J. S. *et al.* Impacts of plant growth promoting rhizobacteria on tropical forage grass in Brazil. **Journal of Agricultural Studies**, v. 8, n. 1, p. 342-356, 2020.

MACIEL, J. R. F. **Investigação química e biológica das interações entre fitopatógenos cítricos e fungos endofíticos isolados de *Citrus sinensis*.** 2024. 110 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP), 2024.

MAIA, V. R. O. *et al.* Fungos endofíticos como promotores de resistência a estresse hídrico e salino: o caso do *Piriformospora indica*. **Brazilian Applied Science Review**, v. 4, n. 2, p. 621-633, 2020.

MANACHINI, P. L.; FORTINA, M. G.; PARINI, C. Purification and properties of endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. **Biotechnology Letters**, v. 9, p. 21-224. 1987.

MARTINS, R. A. *et al.* **Morfocaracterização de fungos endofíticos isolados de *Gustavia cf. hexapetala* na Amazônia e seu potencial para a produção de enzimas industrialmente relevantes.** In: PACHECO, C. S. G.; SANTOS, R. P. *Biotechnology e Biodiversidade: novas perspectivas em pesquisa.* Guarujá: Editora Científica e Digital, p. 52-67, 2024.

MARTINS, R. A. **Potencial enzimático e antimicrobiano de fungos endofíticos isolados de *Gustavia cf. hexapetala* (Aubl.) Sm.** 2024. 46 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus (AM), 2024.

MENDONÇA, G. R. Q. *et al.* Atividade enzimática de fungos endofíticos das plantas medicinais amazônicas Mulateiro (*Calycophyllum spruceanum*) e Sucuuba (*Himatanthus sucuuba*). **Scientia Plena**, v. 19, n. 9, 2023.

MENDOZA, A. Y. G. *et al.* Macrofungos na Amazônia Brasileira e Importância para o Meio Ambiente: Uma Revisão Integrativa. **Revista Valore**, Volta Redonda, v. 8, 2023.

MENEZES FILHO, A. C. P. *Myrciaria glazioviana*, *Myrciaria strigipes* e *Myrciaria trunciflora*: análise sistemática, reprodução, fitoquímica e farmacologia. **Scientific Electronic Archives**, v. 14, n. 8, 2021.

MILTON, T. *et al.* Biomass and demographic dynamics of the Brazil nut family (Lecythidaceae) in a mature Central Amazon rainforest. **Forest Ecology and Management**, v. 509, 2022.

MONTEIRO, M. C. P. *et al.* Enzyme Production by *Induratia* spp. Isolated from Coffee Plants in Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.63, n.1, p.1-9, 2020.

MORAES, G. K. A., FERRAZ, L. F.; CHAPLA, V. M. Compostos orgânicos voláteis de fungos endofíticos e suas aplicações biotecnológicas. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 6, p. 1498-1510, 2020.

MUSSI-DIAS, V. *et al.* Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 261-266, 2012.

*Myrciaria* in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB24032>>. Acesso em: 13 de setembro de 2024.

NAIK, B. S. **Potential Roles for Endophytic Fungi in Biotechnological Processes: A Review.** *Plant and Human Health*, v. 2, p. 327-344. 2019.

OLIVEIRA, J. G. D. S. **Bioprospecção de alcalóides em extratos de fungos endofíticos de *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae).** 2018, 162 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas. Manaus (AM), 2018.

OLIVEIRA, R. L. E. **Isolamento e Avaliação do Potencial Biotecnológico de Fungos Endofíticos de *Piper hispidum*.** 2010. 95 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais). Universidade do Estado do Amazonas. Manaus (AM), 2010.

OJEDA, C. P. O. **Potencial biotecnológico dos microrganismos endofíticos isolados do jambú (*Acmella ciliata* (Kunth) Cass.) para controle de microrganismos patógenos.** 2017.

68 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Produtos Naturais da Amazônia) - Universidade do Estado do Amazonas. Manaus (AM), 2017.

ORLANDELLI, R. *et al.* Produção da enzima protease por fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Piper hispidum* Sw. **Anais VII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar**. Cesumar: Maringá, 2011.

PELCZAR, M. J. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**, v. 2, 2 ed., MAKRON Books: São Paulo, 1997.

PERCIO, J. A. M. *et al.* Técnicas analíticas para avaliação de compostos bioativos do camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Revista Thêma et Scientia**, v. 11, n. 1, 2021.

PEREIRA, M. T. M. *et al.* The in vivo anti-inflammatory potential of *Myrciaria glazioviana* fruits and its chemical profile using mass spectrometry. **Food Bioscience**, vol. 38, p. 100777, 2020.

PEREIRA, O. L. **Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos de sete espécies de orquídeas neotropicais**. 2001. 55f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa (MG), 2001.

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

PETTIT, G. R. *et al.* Isolation and Structure of Gustastatin from the Brazilian Nut Tree *Gustavia hexapetala*. **Journal of natural products**, v. 67, n. 6, p. 983-985, 2004.

PINTO, R. A. D. F. O. **Bioprospeção e caracterização de fungos endofíticos produtores de compostos bioativos isolados de *Dalbergia ecastaphyllum* L. Taub.** 2019. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Alfenas. Alfenas (MG), 2019.

PRANCE, G. T.; MORI, S. A.; Lecythydaceae- Parte I: The actinomorphic-flowered New World Lecythydaceae (*Asteranthos*, *Gustavia*, *Grias*, *Allantoma* & *Cariniana*). *Flora Neotropica Monograph 21*, **New York Bot. Gard**: New York, 1979.

QUATRIN, A. *et al.* Bioaccessibility and catabolism of phenolic compounds from jaboticaba (*Myrciaria trunciflora*) fruit peel during in vitro gastrointestinal digestion and colonic fermentation. **Journal of Functional Foods**, vol. 65, p. 103714, 2020.

REVILLA, J. **Plantas da Bacia Amazônica**. Manaus: INPA, v.1, 2002.

RIBEIRO, M. *et al.* Flora of Espírito Santo: Lecythydaceae. **Rodriguésia**, v. 73, p. e00462021, 2022.

RIPLEY, R. *Myrciaria dubia*. **iNaturalist**. 2009. Disponível em: <<https://www.inaturalist.org/observations/35582224>>. Acesso em: 12 de setembro de 2024.

SABER, F. R. *et al.* Family Myrtaceae: The treasure hidden in the complex/diverse composition. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 64, n. 19, p. 6737–6755, 2023

SANTOS, C. C. C. *et al.* Avaliação da diversidade de fungos endofíticos isolados da planta *Uncaria tomentosa* (Willd.) Dc. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 8, n. 2, 2021.

SANTOS, L. F. O. D. **Triagem de fungos endofíticos de *Moringa oleifera* produtores de asparaginase e amilase**. 2020. 36 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Rondonópolis, Rondonópolis (MT), 2020.

SANTOS, P. D. B. *et al.* Uma proposta para conservação da Biodiversidade Amazônica em espaços formais da cidade de Manaus. **Extensão em Revista**, n. 6, 2021.

SCHULZ, B. *et al.* Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, n. 106, p. 996-1004, 2002.

SILVA, A. J. *et al.* Desmatamento da Floresta Amazônica no Pará: Causas, Impactos e Medidas de Manejo dos Recursos Naturais. **Revista Augustus**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 59, p. 125-151, 2023.

SILVA, F. D. A. **Diversidade de fungos endofíticos de clones de *Paullinia cupana* (Mart.) Ducke e avaliação de seus traços funcionais e potencial biotecnológico**. 2016, 242 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá (MT), 2016.

SILVA, F. G. **Microbiota endofítica da planta medicinal *Equisetum arvense* L. e seu potencial antimicrobiano**. 2012, 73 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco. Recife (PE), 2012.

SILVA, L. S. **Diversidade e tolerância de fungos endofíticos em plantas sujeitas a estresses causados por metais pesados**. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Conservação) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís (MA), 2018.

SILVEIRA, R. M. *et al.* Diversidade da Composição Química dos Óleos Essenciais de *Eugenia* – Myrtaceae: uma revisão. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n. 3, p. 33276-33303, 2021.

SOUZA A. Q. L. **Fungos Endofíticos de Plantas Tóxicas da Amazônia, *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Bentham**. 2001. 102 f. Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos (SP), 2001.

SOUZA, A. Q. L. *et al.* Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Bentham. **Acta Amazônica**, v. 34, p. 185-195. 2004.

SOUZA, C. C. *et al.* Avaliação antimicrobiana de fungos isolados de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (saracura mirá). **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 22723-22739, 2021.

SOUZA, H. Q. D.; OLIVEIRA, L. A. D.; ANDRADE, J. S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 116-124, 2008.

SPECIAN, V.; COSTA, A. T.; PAMPHILE, J. A. Estudo da atividade enzimática do fungo endofítico *Diaporthe helianthi* utilizando diferentes substratos agroindustriais. **Revista de Biotecnologia & Ciência**, v. 10, n. 1, 2021.

SPECIAN, V. *et al.* Metabólitos secundários de interesse farmacêutico produzidos por fungos endofíticos. **UNOPAR Científica - Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 16, n. 4, p. 345-351, 2014.

SPIER, M. R.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, C. R. Produção de  $\alpha$ -Amilase por *Aspergillus* em Fermentação no Estado Sólido de Amido de Mandioca e Bagaço de Cana-de-Açúcar. VI SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA. **Anais Enzitec 2004**. Rio de Janeiro: Enzitec, v. 1. p. 116-116, 2004.

SPOSITO, M. B. *et al.* Enzymatic differences between the endophyte *Guignardia mangiferae* (botryosphaeriaceae) and the citrus pathogen *Guignardia citricarpa*. **Genetics and Molecular Research evolution and tecnologia**, n. 10, p. 243-252, 2011.

STEEGE, H. *et al.* Biased-corrected richness estimates for the Amazonian tree flora. **Sci. Rep.** v. 10. 2020.

TEIXEIRA, M. F. S. *et al.* **Fungos da Amazônia: Uma riqueza inexplorada (Aplicações biotecnológicas)**. Manaus: Edua, 2011.

TORRES, F. L. *et al.* Bioprospecção e potencial biotecnológico de fungos endofíticos associados a plantas do cerrado. **Revista Concilium**, v. 22, n. 1, 2022.

VISAGIE, C. M., *et al.* Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in mycology**, n. 78, p. 343–371, 2014.

ZHAO, G.; LIU, X.; WU, W. Helicosporous hyphomycetes from China. **Fungal Diversity**. n. 26, p.313-524. 2007.

### APÊNDICE A - Preparo dos meios de cultura

Para o preparo dos diferentes meios de cultura utilizados nesta pesquisa, foram necessários os reagentes e substratos descritos abaixo, nas seguintes concentrações:

a. BDA + EL (batata, dextrose, ágar + extrato de levedura)

Componentes	Quantidade
Batata <i>in natura</i>	200 g
Dextrose	20 g
Ágar	15 g
Extrato de Levedura	2 g
Água destilada	1 L

Para o preparo das batatas, foi necessário lavá-las, descascá-las, cortá-las em cubos e cozinhá-las com 1 L de água destilada. Após amolecer, foi coado o caldo do cozimento. Depois de pesar e misturar os outros ingredientes, foi adicionado o caldo de batata e completado o volume de água destilada.

b. Ágar-amido

Componentes	Quantidade
Ágar	18 g
Amido de milho	10 g
Ácido cítrico	0,1865 g
Fosfato de sódio	0,3665 g
Água destilada	1 L

c. Ágar-gelatina-leite

Componentes	Quantidade
Ágar	18 g
Gelatina incolor sem sabor	10 g

Leite desnatado	10 g
Ácido cítrico	0,1865 g
Fosfato de sódio	0,3665 g
Água destilada	1 L

d. Solução de Manachini

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
Fosfato de potássio	2 g
Sulfato de amônia	1 g
Sulfato de magnésio	0,1 g
Fosfato de sódio	0,9 g
Extrato de Levedura	1 g
Água destilada	1 L

Para os testes de atividade amilolítica, foi adicionado 2% (20 g) de amido. Já para os testes de atividade proteolítica, acrescentou-se gelatina incolor na mesma concentração.

Os meios de culturas foram previamente preparados e autoclavados por 15 minutos a 121 °C. No caso dos meios para atividade proteolítica, os substratos (leite desnatado e gelatina) foram preparados separadamente dos demais ingredientes, em que foi feita uma solução contendo 60% da água destilada (300 mL para 500 mL de meio de cultura), que foi então autoclavada por 15 minutos, a partir do momento que a temperatura da autoclave começou a subir.

Após autoclavagem, para os meios sólidos, dentro de uma cabine de segurança biológica e com o auxílio de pipeta graduada com bomba de pipetagem manual, foram transferidos aproximadamente 25 mL/55 mL de cada meio de cultura para placas de Petri (100 x 20 mm ou 150 x 25 mm).

No caso dos tubos com meio inclinado, o processo de transferência de aproximadamente 10 mL foi feito com o auxílio de uma micropipeta (1000-5000 µL) e realizado anteriormente à autoclavagem. Os tubos foram vedados com plástico filme, papel alumínio e liga elástica. Após serem autoclavados, eles foram dispostos em uma superfície de 3,5 cm para a posição inclinada.

No que se refere ao meio líquido, utilizou-se proveta de 100 mL para adicionar o meio de cultura (60 mL) em erlenmeyers de 125 mL. Os frascos foram vedados com plástico filme, papel alumínio e liga elástica e então autoclavados.

Após o preparo do material, as placas e erlenmeyers foram embalados em sacos plásticos e armazenados sob refrigeração a 4 °C.