

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

**ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Eichhornia
crassipes* (Marth.) Solms DE OCORRÊNCIA NO RIO TARUMÃ-AÇU- AMAZÔNIA
CENTRAL**

RAISSA RODRIGUES SARGES

MANAUS - AM

2024

RAISSA RODRIGUES SARGES

ENIMAS HIDROLÍTICAS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Eichhornia crassipes* (Marth.) Solms DE OCORRÊNCIA NO RIO TARUMÃ-AÇU- AMAZÔNIA CENTRAL

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: Dra. Francisca da Silva Ferreira

Co-orientadora: Dra. Maria Astrid Rocha Liberato

MANAUS - AM

2024

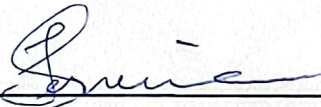
RAISSA RODRIGUES SARGES

ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Eichhornia crassipes* (Marth.) Solms DE OCORRÊNCIA NO RIO TARUMÃ-AÇU- AMAZÔNIA CENTRAL

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

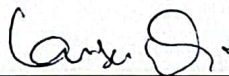
Data de aprovação: 21 de Novembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA:



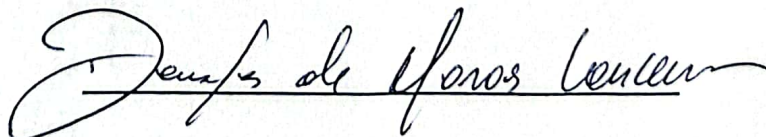
Prof.ª Dr.ª Francisca da Silva Ferreira (UEA)

Orientadora (Presidente da Banca)



Prof.ª Dr.ª Larissa Kirsch Barbosa (UEA)

Membro titular



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.

S245e Sarges, Raissa Rodrigues
Enzimas hidrolíticas de fungos endofíticos isolados de Eichhornia crassipes (Marth.) Solms de ocorrência no Rio Tatumã-Açu- Amazônia Central / Raissa Rodrigues Sarges . Manaus : [s.n], 2024.
52 f.: color.; 21,0 cm.

TCC - Graduação em Ciências Biológicas- Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2024.
Inclui Bibliografia.
Orientador: Ferreira, Francisca da Silva.
Coorientador: Liberato, Maria Astrid Rocha.

1. Amazônia. 2. Fungos endofíticos. 3. Enzimas. 4. Macrófitas aquáticas. I. Ferreira, Francisca da Silva (Orient.) II . Liberato, Maria Astrid Rocha (Coorient.) III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Título

CDU(1997)57

DEDICATÓRIA

À minha querida família, em especial, à minha mãe Maria e aos meus irmãos Alex e Ádrio, vocês são a minha base, meu conforto e o motivo de eu nunca ter desistido dos meus sonhos.

Ao meu amado pai, Antonio, sei que você estaria orgulhoso de mim se estivesse aqui. (In memoriam)

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, por ser a minha força que necessito todos os dias para conseguir alcançar os meus objetivos e, pelas bênçãos e oportunidades que recebi e ainda recebo na minha vida.

À minha mãe Maria Raimunda, por ser a melhor mãe do mundo, por sempre me incentivar nos meus estudos, por nunca ter me deixado sozinha nessa jornada, ela é a minha grande inspiração nessa vida, por ser uma mulher forte e guerreira, ela tem toda a minha admiração, carinho e amor do mundo, a pessoa no qual me tornei hoje devo tudo a você, obrigada por ter sido a minha mãe e o meu pai ao mesmo tempo, sempre se esforçando para que eu e meus irmãos tenham do melhor nessa vida, te amo.ch

Aos meus irmãos Alex e Ádrio por serem os meus melhores amigos desde que nascem, meus caçulas, tenho vocês como meus filhos, sempre estamos juntos para apoiar um ao outros em nossos sonhos e objetivos, quero vê-los realizando todos os sonhos e que brilhem cada vez mais, a relação de irmãos é um pouco engraçada, ao mesmo tempo que puxo a orelha de vocês às vezes, eu seria capaz de dar a minha vida por vocês e se eu pudesse, eu protegeria vocês de toda dor que esse mundo pode causar.

Ao meu amado pai, Antonio Viveiros, mesmo não sendo filha de sangue me acolheu e me amou como se eu fosse, fomos pai e filha de alma e coração, sou grata por ter me criado juntamente com minha mãe, mesmo que ele não esteja mais ao nosso lado eu só tenho a agradecer por ter sido presente na nossa família, ele foi a pessoa mais bondosa e caridosa que conheci nessa vida, não media esforços para me ajudar no que eu precisasse, sei que estaria orgulhoso de mim, saudades.

Ao meu amado Hilgne, por ser meu companheiro desde que nos conhecemos no ensino médio, por ser uma pessoa querida e amada, inteligente e por fazer meus dias mais alegres, te admiro muito e que possamos crescer juntos nessa jornada que é a vida, obrigada por ter me escutado todas as vezes em que quis chorar e desistir de tudo, seu apoio é muito importante para mim, estou aqui para te apoiar em todos os teus objetivos igualmente.

Às minhas queridas amigas, Diana Martins, Emilly Vitória, Jennifer Lopes e Milene Bentes, elas são as melhores pessoas que eu conheci na faculdade, são as minhas irmãs de outras mães, não sei o que seria de mim sem a amizade sincera de vocês, obrigada pelos momentos divertidos, pelo carinho e conselhos, compartilhamos muitas risadas e choro também, foram vários momentos que guardarei para sempre no meu coração e estaremos juntas para o que der e vier, sempre apoiando uma as outras.

À minha orientadora Dra. Francisca Ferreira e à minha co-orientadora Dra. Maria Astrid Liberato pelas orientações, pelos ensinamentos, pela oportunidade de ter realizado essa pesquisa e terem me escolhido como um de seus orientandos, pela oportunidade de aprender a respeito da Microbiologia e Biotecnologia e conhecer cada vez mais a respeito da rotina em laboratório.

Aos meus companheiros de laboratório, especialmente à Jennifer Lopes e ao Adriano Ferrari, por sempre me ajudarem quando eu precisei entender de como algumas técnicas eram realizadas, um pesquisador não se constrói sozinho, sempre há uma equipe no qual a se apoiar e crescer juntos na vida acadêmica.

Ao HUB- Tecnologia e Inovação (UEA/EST), pelas instalações que foram de suma importância para que esse projeto saísse do papel, especificamente, pela oportunidade de usufruir dos espaços dos Laboratórios de Biotecnologia, Microbiologia e Química (ILUM) para a realização dos experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Gestão e Regulação de Recursos Hídricos (ProfÁgua/UEA) por disponibilizar a infraestrutura e equipamentos nos laboratórios para que fossem feitos os experimentos e análises.

À professora Dra. Hiléia Cabral, pelo carinho, por ter me acompanhado desde que iniciei na graduação, graças a ela pude crescer academicamente, participando de projetos de Iniciação Científica e Extensão, e até mesmo nos estágios supervisionados, obrigada pelos ensinamentos, uma grande inspiração e uma grande amiga que a graduação me proporcionou.

Ao professor Dr. Fernando Barbosa, por ser um professor amigo e que sempre compartilha dos mais diversos conhecimentos e curiosidades do mundo da Biologia conosco, é perceptível o amor pela docência e pela área que atua, e também ao meu amigo de outro curso, Carlos Saboia, que tive o prazer de conhecer na Universidade, uma pessoa super querida, obrigada pelos momentos divertidos e risadas.

À professora Dra. Ieda Batista, por ser uma grande companheira nas orientações no laboratório e pela companhia nas saídas de campo para a coleta das macrófitas aquáticas pelo Rio Tarumã-Açu.

À Universidade do Estado do Amazonas, em especial a Escola Normal Superior pela oportunidade de cursar a Licenciatura em Ciências Biológicas, a área que tanto amo e me encontrei como pessoa e profissional.

A todos que de alguma forma fizeram parte da minha caminhada até aqui e que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

Agradeço.

EPÍGRAFE

“Antiga eu, eu quero te dizer para não se perder nessas coisas mesquinhas, seus inimigos vão se derrotar antes de você ter a chance de atacar... Para resumir a história, eu sobrevivi.”

-Long Story Short, Taylor Swift.

RESUMO

As macrófitas aquáticas podem ser colonizadas por fungos endofíticos, microrganismos que habitam os tecidos internos das plantas e que desempenham papéis ecológicos importantes, com potencial biotecnológico, especialmente pela produção de metabólitos bioativos como as enzimas extracelulares. O presente estudo investigou a produção de enzimas hidrolíticas sintetizadas por fungos endofíticos que colonizam *Eichhornia crassipes* (Marth.) Solms de ocorrência no baixo curso do rio Tarumã-açu. As macrófitas aquáticas foram realizadas duas coletas no baixo curso do rio Tarumã-Açu, em Manaus-AM. O isolamento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia - ILUM (EST/UEA) e em duas etapas: a antissepsia dos fragmentos de folha e bulbo da planta; e a inoculação dos fragmentos em 5 pontos equidistantes das placas de Petri contendo meio BDA+EL acrescido dos antibióticos Tetraciclina e Ampicilina. Foram estabelecidos três tratamentos em diferentes temperaturas, sendo o tratamento controle disposto em temperatura ambiente, e os tratamentos em 18 °C e 24 °C realizados em incubadas B.O.D em temperatura controlada. Cada tratamento foi realizado em triplicata e acompanhado durante 15 dias. Para os testes enzimáticos de amilase, protease e lipase foram utilizados meios seletivos sólidos com o repique em tripontuais e para a determinação qualitativa das atividades enzimáticas foi levado em consideração o Índice Enzimático (IE). Foram isolados 18 fungos endofíticos no total, sendo 7 isolados da primeira coleta (Taxa de Colonização igual a 22%) e 11 da segunda coleta (Taxa de Colonização igual a 36%), a Frequência Relativa (Fr) para as folhas foi de 55,5% enquanto que para o bulbo foi de 44,4%. Destes isolados, 11 foram caracterizados por sua macro e micromorfologia, quatro foram caracterizados a nível de gênero por apresentarem estruturas reprodutivas: *Penicillium* spp. e *Helicosporium* sp., dois fungos apresentaram estruturas reprodutivas que não foi possível definir a qual gênero pertencem e cinco não apresentaram estrutura de reprodução, sendo definidos como *Mycelia sterilia*. Dos 11 fungos endofíticos analisados qualitativamente para a produção de enzimas extracelulares (amilase, protease e lipase), apenas as linhagens do gênero *Penicillium* (E.F 1.3.1; E.F. 1.1.1; E.B 2.2.1) resultaram em positivo para a produção de protease, o fungo *Mycelia sterilia* (E.B 1.4.1) positivou para amilase, porém, nenhum fungo testado apresentou índice enzimático positivo para lipase. Sendo assim, estes resultados sugerem que estes fungos endofíticos isolados da *E. crassipes* podem ser promissores para atividades de produção de enzimas hidrolíticas.

Palavras-chaves: Amazônia; Fungos Endofíticos; Enzimas; Macrófitas Aquáticas.

ABSTRACT

Aquatic macrophytes can be colonized by endophytic fungi, microorganisms that inhabit the internal tissues of plants and play important ecological roles with biotechnological potential, especially through the production of bioactive metabolites such as extracellular enzymes. The present study investigated the production of hydrolytic enzymes synthesized by endophytic fungi that colonize *Eichhornia crassipes* (Marth.) Solms, which occurs in the lower course of the Tarumã-Açu River. Aquatic macrophytes were collected in two samples in the lower course of the Tarumã-Açu River, in Manaus-AM. Isolation was performed at the Biotechnology Laboratory - ILUM (EST/UEA) and in two stages: antiseptics of leaf and bulb fragments of the plant; and inoculation of the fragments in 5 equidistant points of Petri dishes containing PDA+EL medium added with the antibiotics Tetracycline and Ampicillin. Three treatments were established at different temperatures, with the control treatment at room temperature and the treatments at 18 °C and 24 °C carried out in B.O.D. incubators at controlled temperature. Each treatment was performed in triplicate and monitored for 15 days. For the enzymatic tests of amylase, protease and lipase, solid selective media were used with three-point subtraction and for the qualitative determination of the enzymatic activities, the Enzymatic Index (IE) was taken into account. A total of 18 endophytic fungi were isolated, with 7 isolates from the first collection (Colonization Rate equal to 22%) and 11 from the second collection (Colonization Rate equal to 36%). The Relative Frequency (Rf) for the leaves was 55.5% while for the bulb it was 44.4%. Of these isolates, 11 were characterized by their macro and micromorphology, four were characterized at the genus level because they presented reproductive structures: *Penicillium* spp. and *Helicosporium* sp., two fungi presented reproductive structures to which it was not possible to define the genus they belonged, and five did not present reproductive structures, being defined as *Mycelia sterilia*. Of the 11 endophytic fungi qualitatively analyzed for the production of extracellular enzymes (amylase, protease and lipase), only the strains of the genus *Penicillium* (E.F 1.3.1; E.F. 1.1.1; E.B 2.2.1) resulted positive for protease production, the fungus *Mycelia sterilia* (E.B 1.4.1) was positive for amylase, however, none of the fungi tested presented a positive enzymatic index for lipase. Therefore, these results suggest that these endophytic fungi isolated from *E. crassipes* may be promising for hydrolytic enzyme production activities.

Keywords: Amazon; Endophytic fungi; Enzymes; Aquatic macrophytes.

LISTA DE ABREVIATURAS

BDA+EL - Batata, Dextrose, Ágar + Extrato de Levedura

BHTA - Bacia Hidrográfica do Rio Tarumã-Açu

B.O.D. - Demanda Biológica de Oxigênio

EST - Escola Superior de Tecnologia

FR - Frequência Relativa de Isolamento

GPS - Sistema de Posicionamento Global

IE - Índice Enzimático

PROFÁGUA - Programa de Pós-Graduação em Gestão e Regulação de Recursos Hídricos

T+A - Tetraciclina + Ampicilina

TC - Taxa de Colonização

UEA - Universidade do Estado do Amazonas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa da distribuição dos pontos de coletas de <i>E. crassipes</i> no baixo curso do Rio Tarumã-Açu.....	12
Figura 2: Coleta do material botânico.....	13
Figura 3: A. Sequência das soluções utilizadas para o processo de antissepsia da planta. B. Inoculação dos fragmentos da planta em Placa de Petri após o processo de antissepsia realizada na Câmara de Fluxo Laminar.....	15
Figura 4: Ilustração da disposição dos fragmentos de folha e bulbo na Placa de Petri contendo meio BDA+ EL com T+A para o isolamento dos fungos endofíticos.....	16
Figura 5: Fluxograma das etapas do isolamento de microrganismos de <i>Eichhornia Crassipes</i>	16
Figura 6: Ilustração do método de microcultivo e preparo das lâminas de observação microscópica.....	19
Figura 7: Ilustração de como os valores do diâmetro do halo de hidrólise e da colônia fúngica foram obtidos.....	21
Figura 8: A. Anverso do isolado E.F 1.3.1. B. Verso da placa do isolado E.F 1.3.1. C. e D. Microscopia óptica do mesmo fungo na objetiva de 40x, onde é possível visualizar os conidióforos.....	26
Figura 9: A. Anverso do isolado E.F 1.4.2. B. Verso da placa do isolado E.F 1.4.2. C. Microscopia óptica do mesmo fungo na objetiva de 4x. D. Microscopia óptica na objetiva de 40x. E e F. Microscopia óptica na objetiva de 100x mostrando as estruturas ovóides nas hifas.....	27
Figura 10: A. e C. Anverso do isolado E.F 1.4.1. B. e D. Verso da placa do isolado E.F 1.4.1. E. Microscopia óptica do mesmo fungo na objetiva de 10x. F F. Microscopia óptica na objetiva de 100x.....	28
Figura 11: A. Anverso do isolado E.F 1.5.1. B. Verso da placa do isolado E.F 1.5.1. C. Microscopia óptica do mesmo fungo na objetiva de 10x. Figura 12D: Microscopia óptica na objetiva de 100x.....	29
Figuras 12: A. Anverso do isolado E.F 2.3.1. B. Verso da placa do isolado E.F 2.3.1. C. Microscopia óptica do mesmo fungo na objetiva de 10x. D. Microscopia óptica na objetiva de 40x, onde é possível observar os aglomerados da estrutura reprodutiva. E. e F. Microscopia na objetiva de 100x, onde é possível observar os conídios.....	30
Figura 13: A. Anverso do isolado E.F 1.1.1. B. Verso da placa do isolado E.F 1.1.1. C e D. Microscopia óptica do mesmo fungo na objetiva de 100x, onde é possível visualizar os conidióforos.....	31

Figura 14: A. Anverso do isolado E.B 1.4.1. B. Verso da placa do isolado E.F 1.4.1. C. Microscopia óptica na objetiva de 10x. D. Microscopia óptica na objetiva de 100x.....	31
Figura 15: A. Anverso do isolado E.B 1.4.2. B. Verso da placa do isolado E.F 1.4.2. C. Microscopia óptica na objetiva de 10x. D. Microscopia óptica na objetiva de 100x.....	32
Figura 16: A e C. Anverso do isolado E.B 2.1.2. B e D. Verso da placa do isolado E.B 2.1.2. E. Microscopia óptica do mesmo fungo na objetiva de 10x. F. Microscopia óptica na objetiva de 100x.....	33
Figura 17: A. Anverso do isolado E.B 2.3.1. B. Verso da placa do isolado E.B 2.3.1. C. Microscopia óptica na objetiva de 40x. D. Microscopia óptica na objetiva de 100x.....	33
Figura 18: Gráfico representando os percentuais das cores das colônias dos fungos endofíticos caracterizados.....	35
Figura 19: Gráfico representando os percentuais das texturas das colônias dos fungos endofíticos caracterizados.....	36
Figura 20: Gráfico representando os percentuais quanto à produção de exsudato dos fungos endofíticos caracterizados.....	36
Figura 21: Gráfico representando os percentuais quanto à produção de pigmento dos fungos endofíticos caracterizados.....	37
Figura 22: Verso do teste enzimático para atividade amilolítica do fungo E.B 1.4.1 mostrando o halo de degradação das triplicatas.....	38
Figura 23: Verso do teste enzimático para atividade amilolítica do fungo E.F 2.3.1 mostrando o halo de degradação das triplicatas.....	38
Figura 24: Verso do teste enzimático para atividade amilolítica do fungo E.B 2.1.2 mostrando o halo de degradação das triplicatas.....	39
Figura 25: Anverso e verso do teste enzimático para atividade proteolítica do fungo E.F 1.4.1 mostrando o halo de degradação.....	40
Figura 26: Anverso e verso do teste enzimático para atividade proteolítica do fungo E.B 1.4.2 mostrando o halo de degradação.....	40
Figura 27: Anverso e verso do teste enzimático para atividade proteolítica do fungo E.B 1.4.1 mostrando o halo de degradação.....	41
Figura 28: Anverso e verso do teste enzimático para atividade proteolítica do fungo E.F 1.1.1 mostrando o halo de degradação.....	42
Figura 29: Anverso e verso do teste enzimático para atividade lipolítica do fungo E.B 1.4.2 mostrando o halo de degradação.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Organização das condições de cultivo para o isolamento dos fungos endofíticos, respectivamente, o total de placas por tipo de fragmento vegetal e total de fragmentos inoculados em placas.....	16
Tabela 2: Representação do quantitativo de fungos endofíticos isolados de <i>E. crassipes</i> por fragmentos e total, juntamente com sua Taxa de Colonização da primeira e segunda coleta.....	22
Tabela 3: Total de fungos endofíticos isolados de <i>E. crassipes</i> e as Frequências de isolamento da folha e do bulbo.....	24
Tabela 4: Informações gerais dos fungos endofíticos isolados de <i>E. crassipes</i>	25
Tabela 5: Resumo das características morfológicas e suas respectivas identificações dos fungos endofíticos isolados de <i>Eichhornia crassipes</i>	34
Tabela 6: Resultado qualitativo da produção de amilases por fungos endofíticos isolados de <i>E. crassipes</i>	39
Tabela 7: Resultado qualitativo da produção de proteases por fungos endofíticos isolados de <i>E. crassipes</i>	42
Tabela 8: Resultado qualitativo da produção de lipases por fungos endofíticos isolados de <i>E. crassipes</i>	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	4
2	OBJETIVOS.....	5
2.1	Objetivo geral.....	5
2.2	Objetivos específicos.....	5
3.	REVISÃO DA LITERATURA.....	6
3.1	Bacia Hidrográfica do Rio Tarumã-Açu.....	6
3.2	Macrófitas Aquáticas.....	6
3.3	Fungos endofíticos.....	7
3.4	Compostos Bioativos.....	9
3.4.1	Enzimas.....	9
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	11
4.1	Coleta das macrófitas aquáticas.....	11
4.2	Isolamento dos fungos endofíticos.....	13
4.3	Purificação e preservação dos fungos endofíticos.....	17
4.4	Cálculo do Índice de Colonização e Taxa de Frequência de Isolamento..	17
4.5	Caracterização macromorfológica.....	18
4.6	Caracterização micromorfológica.....	18
4.7	Testes para amilases.....	19
4.8	Testes para proteases.....	20
4.9	Testes para lipases.....	20
4.10	Análise do Índice Enzimático.....	20
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5.1	Isolamento de fungos endofíticos e taxa de colonização.....	22
5.2	Caracterização macro e micromorfológica.....	24
5.3	Análise da atividade enzimática.....	37
5.3.1	Amilases.....	37
5.3.2	Proteases.....	40
5.3.3	Lipases.....	43
6.	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

1. INTRODUÇÃO

A Amazônia está mergulhada em uma rica biodiversidade, incluindo os vegetais, animais e microrganismos (Souza *et al.*, 2016), além disso, apresenta uma diversa composição de bacias hidrográficas, por exemplo a Bacia Hidrográfica do Rio Tarumã-Açu, que está localizada na cidade de Manaus, Estado do Amazonas, Amazônia Central, na qual já foram observadas extensas esteiras flutuantes de macrófitas aquáticas, como a *Eichhornia crassipes* (Marth.) Solms. Tais plantas aquáticas podem indicar a ocorrência de eutrofização e, até mesmo um estado de degradação dos trechos da bacia em questão (Costa, 2010).

As macrófitas aquáticas são plantas macroscópicas que podem habitar desde em brejos até aos locais submersos (Rejmánková, 2011). Assim como em todos os outros vegetais, os tecidos vegetais das macrófitas podem ser habitados por fungos endofíticos, que são microrganismos que vivem no interior de plantas sem causar dano aparente ao seu hospedeiro, podendo habitar no interior de folhas, caules, frutos e raízes (Azevedo *et al.*, 2000; Petrini, 1991).

Os endófitos têm a capacidade de produção de metabólitos secundários, os bioativos, como mecanismo de sobrevivência, sendo esses compostos de extrema importância para a biotecnologia (Gonçalves; Freire; Lima, 2013). Os fungos endofíticos que habitam em regiões tropicais fornecem um maior número de produtos naturais quando comparados com outros ambientes, como os temperados (Bills *et al.*, 2002).

Os fungos endofíticos e seus bioativos com potencialidades para a medicina, indústria e agricultura são relativamente poucos estudados (Ferrara, 2006), entretanto, eles vêm cada vez mais despertando o interesse da comunidade científica (Gonçalves; Bastos; Hanna, 2017). A área da micologia voltada aos fungos endofíticos tem grande relevância para a indústria biotecnológica, partindo do fato de que tais microrganismos produzem uma diversidade de bioativos, provenientes do metabolismo secundário, que confere a eles a possibilidade de adaptação ao meio ambiente em que se estabelecem. Por outro lado, essas moléculas bioativas também podem ser empregadas em diversos processos biotecnológicos com aplicações que podem facilitar o bem-estar do homem e sua relação com a natureza. Dessa forma, a pesquisa com fungos endofíticos com potencial para produção de enzimas de interesse econômico poderá contribuir com o desenvolvimento social e econômico da região amazônica.

Entre os bioativos de interesse, as enzimas são bastante requisitadas no campo biotecnológico, principalmente amilases, lipases e proteases. As amilases são enzimas

utilizadas na indústria de alimentos, e as lipases e proteases são utilizadas na indústria de detergentes (Souza; Oliveira; Andrade, 2008). Apesar das enzimas serem bastante requisitadas, as pesquisas realizadas com os bioativos sintetizados por fungos endofíticos são poucos em comparação com a biodiversidade destes fungos em específico (Oliveira *et al.*, 2021). Portanto, esta pesquisa pretendeu investigar a produção de atividades enzimáticas (amilases, lipases e proteases) produzidas por fungos endofíticos isolados da macrófita aquática, *Eichhornia crassipes* (Marth.) Solms.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Investigar a produção de enzimas hidrolíticas sintetizadas por fungos endofíticos que colonizam *Eichhornia crassipes* (Marth.) Solms de ocorrência no baixo curso do rio Tarumã-açu, Amazônia Central.

2.2. Objetivos específicos

- Isolar fungos endofíticos *Eichhornia crassipes* (Marth.) Solms de ocorrência no baixo curso do rio Tarumã-açu;
- Realizar testes enzimáticos referentes às amilases, lipases e proteases produzidas pelos fungos endofíticos isolados de *Eichhornia crassipes* (Marth.) Solms;
- Caracterizar a morfologia macroscópica e microscópica dos fungos endofíticos isolados de *Eichhornia crassipes* (Marth.) Solms.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Bacia Hidrográfica do Tarumã-Açu

A Bacia Hidrográfica do Rio Tarumã- Açu (BHTA) compreende as zonas norte e oeste do Município de Manaus, capital do Estado do Amazonas, Amazônia Central, ocupa uma área de 1.372,73 km², o que corresponde a 12% do território da cidade de Manaus. O Rio Tarumã-açu, principal da Bacia, é afluente da margem esquerda do Rio Negro e limita a oeste a expansão urbana de Manaus (Costa; Silva; Silva, 2013; Costa, 2010).

Há muito tempo que a BHTA vem sendo utilizada pela população local e pelos turistas para fins recreativos e de lazer como balneários, ocasionando no local, uma grande concentração de bares e restaurantes flutuantes, marinas públicas e privadas, estaleiros e hospedarias (Costa, 2010). A Bacia Hidrográfica do Tarumã-Açu é uma das quatro grandes bacias hidrográficas da cidade de Manaus e que é alvo de poluição, considerando que a sua utilização inadequada para a diluição de efluentes *in natura* compromete a utilização direta das águas da BHTA (Damasceno; Soares, 2022).

3.2. Macrófitas Aquáticas

As macrófitas podem ser definidas como plantas aquáticas macroscópicas (Rejmánková, 2011). O termo macrófita surgiu pela primeira vez por Weaver e Clements (1938) como herbáceas que crescem na água e solos cobertos por água, enquanto que para o Programa Internacional de Biologia (IBP) as macrófitas aquáticas são caracterizadas como vegetais que habitam desde brejos até ambientes totalmente aquáticos incluindo desde algas macroscópicas até plantas vasculares (Scremin-Dias *et al.*, 1999). Em termos ecológicos, as macrófitas aquáticas são as principais produtoras primárias no ecossistema aquático, logo são de extrema importância para herbívoros e detritívoros. Por outro lado, as plantas aquáticas oxigenam a água, participam da ciclagem de nutrientes, removem nutrientes de ambientes eutrofizados, protegem as margens do corpo d'água contra a erosão e servem de esconderijos para alguns animais aquáticos como os crustáceos, peixes e larvas de insetos, atuam como suporte para a desova de moluscos, anfíbios e pássaros (Rejmánková, 2011; Scremin-Dias *et al.*, 1999; Xavier *et al.*, 2021).

Dentre a diversidade de espécies de macrófitas aquáticas que ocorrem na Amazônia Central, o gênero *Eichhornia* Kunth, pertencente à família Pontederiaceae, é um dos

representantes que compõem essa flora aquática, sendo a *Eichhornia crassipes* (Marth.) Solms de maior relevância e conhecimento do gênero. O gênero *Eichhornia* ocupa diversos ambientes aquáticos como rios, lagos, reservatórios, pântanos e até mesmo podem colonizar ambientes modificados pelo homem (Barret, 1988). Costa (2010) relataram que em seus trabalhos de campo foram encontradas extensas esteiras de macrófitas aquáticas em trechos da BHTA, entre elas, a *E. crassipes*, por ser uma região antropizada, a presença dessas herbáceas aquáticas podem sugerir que naquele ambiente aquático está ocorrendo o processo de eutrofização.

A *E. crassipes* é uma erva flutuante nativa da América do Sul tropical e foi introduzida em todos os continentes (Pott; Pott, 2000) e serve de alimento e abrigo para peixes e mamíferos aquáticos, como o peixe-boi por exemplo, ao longo dos rios amazônicos (Lopes *et al.*, 2015). Conhecida popularmente como Jacinta d'água ou aguapé, a planta tem a capacidade de crescer em diferentes tipos de ecossistemas aquáticos, incluindo lagos, riachos, lagoas, cursos de água e valas, seja em climas frios e quentes, o que permite que a planta desafie a estabilidade ecológica destes corpos de água (Ayanda; Ajayi; Asuwaju, 2020).

3.3. Fungos endofíticos

Os endófitos são todos os microrganismos que habitam no interior de plantas sem causar problemas aparentes ao hospedeiro (Azevedo *et al.*, 2000; Moraes *et al.*, 2020). Tais microrganismos foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX, porém somente no final dos anos 70 do século XX que os endofíticos começaram a ganhar destaque nos trabalhos científicos (Santos; Varavallo, 2011). O conceito de endofíticos foi atualizado por Azevedo e Araujo (2007) quando é dito que os endófitos são todos os microrganismos que podem ou não crescer em meios de cultura e que habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar danos ao hospedeiro e sem produzir estruturas no vegetal. Os endófitos se diferenciam dos microrganismos fitopatogênicos e dos epifíticos, sendo os primeiros causadores de doenças em plantas e os segundos são microrganismos que habitam a superfície dos órgãos e tecidos vegetais.

Os endofíticos são representados por fungos e bactérias, principalmente, e considerando que os fungos endofíticos foram o alvo desta pesquisa, estes também podem ser definidos como microrganismos que habitam órgãos de plantas e que, em algum momento do seu ciclo de vida, podem colonizar os tecidos internos sem causar danos aparentes aos vegetais, esses tecidos podem incluir o de folhas, caules e até sementes (Petrini, 1991; Martins, 2024). Os fungos endofíticos sintetizam metabólitos secundários que podem ser benéficos para plantas atuando

na regulação do crescimento, no combate a microrganismos fitopatogênicos, no aumento da resistência a estresse abiótico, e na proteção contra insetos (Matasyoh *et al.*, 2011; Pinto, 2019).

3.3.2. Fungos endofíticos com Potencial Biotecnológico

Os fungos endofíticos são representantes do grupo de microrganismos que tem se destacado pela produção de metabólitos bioativos (Strobel e Daisy, 2003) e são de grande importância para a biotecnologia pelo fato destes produzirem metabólitos como os ácidos fenólicos, benzopirranonas, flavonoides, quinonas, terpenoídes, tetralonas e xantonas, dentre outros (Gonçalves; Freire; Lima, 2013; Barros *et al.*, 2023). Alguns dos representantes destes endofíticos que apresentam essas propriedades são: *Fusarium* sp, *Alternaria* sp, *Penicillium* sp, *Pestalotiopsis* sp, *Xylaria* sp, entre outros (Pinheiro *et al.*, 2020).

Alguns fungos endofíticos isolados, como a *Pestalotiopsis microspora*, da planta cuja espécie é a *Terminalia morobensis* (Papua Guiné) que produzem antioxidantes como a pestacina e a isopestacina (Harper *et al.*, 2003); Também o *Fusarium solani*, fungo associado à *Camptotheca acuminata* produziu um antineoplásico muito potente, se trata do alcalóide camptotecina (Kusari; Zuhlke; Spitteller, 2009); O paclitaxel, composto bastante utilizado para produzir medicamentos anticancerígenos, que originalmente era obtido da planta medicinal *Taxus brevifolia* também foi descoberto que o fungo *Taxomyces andreanae*, isolado dessa mesma planta produz esse composto anticancerígeno (Calderani; Orlandelli; Pamphile, 2016). Os fungos endofíticos também podem apresentar atividades antioxidantes, Alves *et al.* (2020) obtiveram em seu trabalho três extratos de fungos endofíticos que expressaram ótimas atividades antioxidantes.

As macrófitas aquáticas podem ser colonizadas por fungos endofíticos de importância biotecnológica, como por exemplo, de 8 endofíticos isolados de macrófitas provenientes do Rio Negro, todos positivaram para a produção de proteases e amilases, 5 para pectinase, 3 para celulase e 1 positivou para lacase (Lima *et al.*, 2020). Também foram observadas promissoras atividades antagonísticas de 3 fungos endofíticos isolados de duas espécies do gênero *Eichhornia* contra os fitopatógenos *Colletotrichum* sp. e *Alternaria alternata* (Loosli *et al.*, 2024).

3.4. Compostos Bioativos

Os compostos bioativos podem ser definidos como compostos químicos que exercem uma alta atividade biológica em benefício de um organismo (Oliveira *et al.*, 2018), dentre esses compostos bioativos que os organismos produzem, especialmente os vegetais, existem os metabólicos primários e os secundários. O metabolismo dos fungos pode ser comparado com o metabolismo das plantas devido a certas semelhanças, no entanto, os fungos têm rotas bioquímicas peculiares que resultam em metabólitos específicos de uma determinada espécie (Canuto *et al.*, 2012).

Os metabólitos primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia, ou seja, possuem grande importância para a sobrevivência do organismo (Taiz e Zeiger, 2017). A maioria dos compostos bioativos de fungos são derivadas do metabolismo secundário, no qual geram produtos de baixo peso molecular que pertencem a diversas classes químicas, os metabólitos secundários são compostos ou produtos naturais que não estão relacionadas com o crescimento e desenvolvimento da planta e, podem ser secretados no meio de cultura durante o crescimento e diferenciação de um organismo e são bastante utilizados para fins industriais (Specian *et al.*, 2014; Taiz e Zeiger, 2017). Os metabólitos secundários podem ser utilizados em pesquisas para diversos fins tais como: controle biológico de insetos-praga, fitopatógenos e nematoides, e até mesmo a descoberta de compostos anticancerígenos (Lacava; Sebastianes, 2010).

3.4.1. Enzimas

As enzimas são moléculas proteicas, com exceção do grupo de moléculas de RNA catalíticas, que possuem a função de catalisar reações químicas nos organismos, sendo assim, são responsáveis por diminuir a energia de ativação necessária para que as reações químicas ocorram (Carneiro, 2007). As enzimas são utilizadas em diversas áreas, como a Biologia Molecular e Biomedicina, assim como na fabricação de produtos tecnológicos e de tratamento de resíduos pelo fato dessas moléculas serem versáteis, não precisarem de altas temperaturas e nem pH em valores extremos (Orlandelli *et al.*, 2012).

Segundo Spier (2005), as enzimas são endocelulares em sua grande maioria, porém, algumas são exocelulares, ou seja, são excretadas para fora da célula. Os fungos são bastante utilizados na produção de enzimas de interesse econômico (Santos e Varavallo, 2011; Austríaco, 2022), isso deve-se ao fato de que esses microrganismos produzem enzimas hidrolíticas extracelulares como seus mecanismos de defesa e para as plantas hospedeiras contra

patógenos e também para obter nutrientes do solo e, essa produção ocorre quando há o processo de penetração do fungo na planta hospedeira ou durante a competição contra os fungos fitopatogênicos (Luz *et al.*, 2006; Orlandelli *et al.*, 2011).

Para os autores Pardo *et al.* (2022), as enzimas provenientes de microrganismos apresentam maior potencial devido a facilidade de produção por conta da possibilidade de cultivo em grande escala, tempo relativamente curto, substratos para cultivo de fácil acesso e baixo custo. Por exemplo, Luz *et al.* (2006) tiveram em seus resultados que alguns fungos endofíticos isolados do maracujazeiro-amarelo apresentaram atividade lipolítica, enquanto que no trabalho de Martins (2024), dos trinta e cinco fungos isolados de *Gustavia cf. hexapetala*, 14,28% apresentaram atividade amilolítica e 51,42% tiveram resultados positivos para atividade proteolítica.

As amilases são enzimas que hidrolisam o amido e podem liberar diversos produtos, dentre esses, a dextrina e progressivamente pequenos polímeros compostos por unidades de glicose (Frazier; Westhoff, 1988; Gupta *et al.*, 2003), e podem ser classificadas em α -amilases, β -amilases, isoamilases, glucoamilases, ciclodextrina-glucoamiltransferase (Cornelis, 1987), que atuam diretamente na hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 do amido, glicogênio e polissacarídeos (Santos, 2020). As amilases são consideradas como as principais enzimas utilizadas na indústria alimentícia, em produtos panificados, além de que elas possuem aplicações biotecnológicas como: a síntese de biopolímeros, biodiesel, produtos farmacêuticos, agroquímicos e compostos de sabor (Bon; Pereira, 1999; Jaeger; Eggert, 2002; Santos 2020).

As proteases fazem parte de um grande grupo de enzimas hidrolíticas que são classificadas pelo seu local de ação e estrutura do sítio ativo da enzima, apresentam grande importância bioquímica e fisiológica, devido ao fato de que elas apresentam funções para o organismo como a nutrição, renovação de proteínas, crescimento, adaptação, regulação, esporulação, germinação, doenças e morte (Ward, 2011). Para Li *et al.* (2013) e Bezerra (2021) as proteases apresentam diversidade estrutural e funcional, funções que vão desde a reciclagem intracelular de proteínas até a digestão de nutrientes e elas foram aplicadas pela primeira vez em detergentes, couro e alimentos industriais centenas de anos atrás, sendo assim, as atividades catalíticas dessas enzimas as tornam uma escolha barata para a hidrólise de ligações peptídicas para uso industrial. Os diferentes tipos de proteases foram descritos conforme exemplos importantes de enzimas proteolíticas comercializadas na indústria e, um dos principais tipos são as exoproteases, que atuam nas extremidades ou próximo às extremidades das cadeias peptídicas, denominadas como aminopeptidases e carboxipeptidases (Rao *et al.*, 1998).

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise e a síntese de acilgliceróis com ácidos graxos de cadeia longa (Jaeger; Eggert, 2002) e são encontradas nos tecidos de animais e plantas. Enquanto que para Roveda, Hemkemeier e Colla (2010) as lipases, denominadas triacilglicerol-acil hidrolases, catalisam a hidrólise e a síntese de triacilgliceróis, que são os estéres de glicerol e ácidos graxos de cadeia longa. O papel fisiológico das lipases é hidrolisar triglicerídeos em diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos e glicerol, nos eucariontes, as lipases estão relacionadas com os vários estágios do metabolismo de lipídeos, incluindo a digestão de gordura, absorção, reconstituição e o metabolismo de lipoproteínas, já nas plantas, as lipases são encontradas em forma de reserva de energia nos seus tecidos (Balashev *et al.*, 2001; Houde; Kademi; Leblanc, 2004). As lipases comercialmente úteis são geralmente obtidas a partir de microrganismos que produzem uma grande variedade de lipases extracelulares, sendo assim, essas enzimas lipolíticas possuem aplicações biotecnológicas bem promissoras, como nos processos de química orgânica, produção de detergentes, síntese de biossurfactantes, na indústria oleoquímica, láctea e agroquímica, na fabricação de papel, nutrição, cosméticos e produtos farmacêuticos (Sharma; Chisti; Banerjee, 2001).

Considerando o potencial dos fungos endofíticos associados com plantas tropicais, em particular com a espécie aquática, *Eichhornia crassipes* (Marth.) Solms, a prospecção para o isolamento e a consequente possibilidade de se obter metabólitos de interesse biotecnológico como as enzimas, a partir destes isolados, este trabalho visa contribuir para a descoberta de microrganismos com potencial para produção de amilases, proteases e lipases.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coletas das macrófitas aquáticas

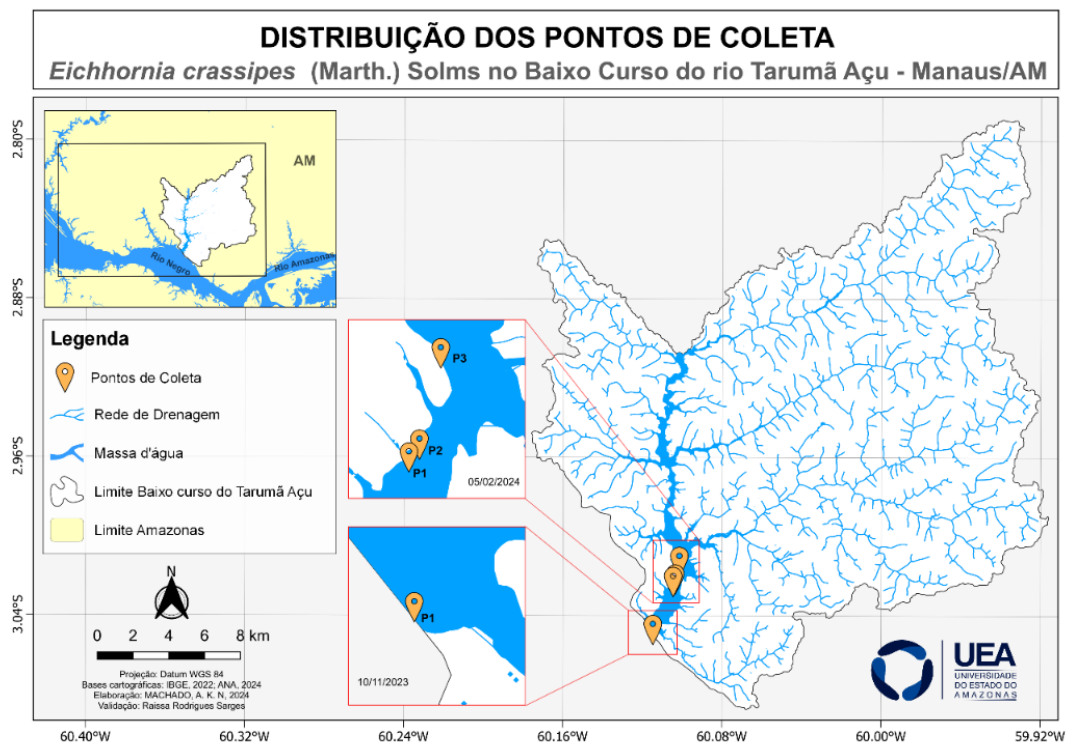
As coletas de *Eichhornia crassipes* foram feitas no baixo curso do Rio Tarumã-Açu, trecho que banha a cidade de Manaus, Estado do Amazonas, Amazônia Central com o apoio do grupo de pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Gestão e Regulação de Recursos Hídricos (ProfÁgua/UEA). O ponto de partida foi na Marina do Davi, localizado no Bairro Ponta Negra, e foram realizadas duas excursões para coleta, uma em novembro de 2023, durante a fase de vazante do ciclo hidrológico, e a outra em fevereiro de 2024, durante a fase de cheia do ciclo hidrológico.

Na primeira coleta, devido ao baixo nível das águas do rio, só foi possível selecionar um ponto de coleta, que foi definido pelo Sistema de Posicionamento Global (GPS) nas coordenadas 3°02'50.0"S 60°06'53.0"W, Ponto 1, com a coleta de um indivíduo para o isolamento, pois era o único indivíduo disponível no ambiente.

Na segunda coleta, com o auxílio de lancha para navegar no trecho do baixo curso, foram selecionados três pontos de coleta, todos os pontos foram diferentes da primeira e foram definidos pelo Sistema de Posicionamento Global (GPS) nas coordenadas: 3°01'22.6"S 60°06'17.4"W; 3°01'18.1"S 60°06'12.7"W; e 3°00'46.1"S 60°06'05.2"W, que correspondem aos pontos de coleta 1, 2, e 3, respectivamente. Em cada ponto, foram selecionados um indivíduo da macrófita aquática para o isolamento, esses pontos da segunda coleta foram definidos conforme o trajeto realizado pelo grupo de pesquisa.

Os pontos de coleta estão representados na Figura 1, e as coletas foram realizadas manualmente (Figura 2).

Figura 1: Mapa da distribuição dos pontos de coletas de *E. crassipes* no baixo curso do Rio Tarumã-Açu.



Fonte: Autoria própria

Figura 2: Coleta manual de *E. crassipes* no baixo curso do Rio Tarumã-Açu.



Fonte: Arquivo Pessoal

Após a coleta, as macrófitas passaram por uma breve lavagem com água destilada esterilizada e em seguida foram armazenadas em sacos plásticos e colocadas dentro de caixa térmica com água, a fim de que a planta não murchasse. O material coletado foi transportado para o Laboratório de Biotecnologia- ILUM (EST/UEA), onde foram realizadas as sucessivas etapas da pesquisa.

4.2. Isolamento dos fungos endofíticos

O isolamento dos endofíticos ocorreu no mesmo dia da coleta. Os fungos endofíticos foram isolados a partir dos fragmentos de folhas e bulbo de *Eichhornia crassipes* (Marth.) Solms.

O material coletado passou por processo de higienização e antissepsia, e dessa forma folhas e bulbos foram lavados com sabão neutro, água corrente e utilizando uma esponja nova para a retirada de sujidades e de fungos epifíticos da superfície da planta.

Posteriormente, no interior da Cabine de Segurança Biológica, as folhas e os pedaços do bulbo foram introduzidos, respectivamente, em água destilada estéril por 1 minuto, em solução de álcool 70% por 1 minuto, em solução de hipoclorito a 3% por 40 segundos, em

álcool 70% por 30 segundos, por fim, na água destilada estéril por 30 segundos (Figura 3A), conforme metodologia utilizada por Araújo *et al.* (2001) com modificações. Após a antissepsia, os fragmentos de folhas foram cortados com auxílio de um furador estéril de 5 mm de diâmetro e os fragmentos do bulbo utilizando lâmina de bisturi estéril, cortados em quadrados de 5 mm² de área. Em seguida, os fragmentos vegetais (folha e bulbo) foram inoculados em Placa de Petri contendo o meio de cultivo Ágar Batata Dextrose e Extrato de Levedura (BDA + EL) acrescido dos antibióticos Tetraciclina e Ampicilina (T + A), para evitar o crescimento de bactérias no meio de cultivo (Figura 3B).

O experimento ocorreu em triplicatas para o indivíduo da primeira coleta, enquanto que para a segunda coleta não foi em triplicata e foi considerado uma placa para cada indivíduo para cada fragmento (folha e bulbo) e para cada tratamento (18 °C e 24 °C), ou seja, placa 1 (indivíduo 1), placa 2 (indivíduo 2) e placa 3 (indivíduo 3), totalizando 12 placas para cada coleta. Foram inoculados cinco fragmentos equidistantes de folhas e bulbo (Figura 4), totalizando 15 fragmentos de folhas e 15 fragmentos de bulbo para cada tratamento (18 °C e 24 °C) para cada coleta, sendo assim, com a somatória das duas coletas, foram inoculados 30 fragmentos de folha e 30 fragmentos de bulbo (Tabela 1).

Para o controle do experimento foi inoculado em Placas de Petri contendo o mesmo meio de cultivo (BDA + EL) 50 µL de água destilada autoclavada proveniente da última lavagem do processo de antissepsia dos fragmentos da planta (folha e bulbo).

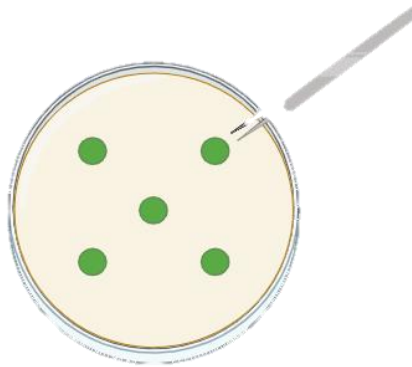
Após a inoculação, as placas contendo os fragmentos inoculados e os controles foram identificadas e colocadas na incubadora B.O. D por 15 dias, 8 placas na temperatura de 18° C e 8 placas na temperatura de 24° C (Jacyntho; Nunez, 2013; Souza *et al.*, 2016), a escolha por essas temperaturas foi feita para fins de comparação entre duas temperaturas diferentes, uma mais baixa e outra mais alta, que fazem parte da faixa de temperatura média de regiões tropicais. Um resumo das etapas de um isolamento de fungos endofíticos se encontra na Figura 5.

Figura 3: A. Sequência das soluções utilizadas para o processo de antissepsia da planta. B. Inoculação dos fragmentos da planta em Placa de Petri após o processo de antissepsia realizada na Câmara de Fluxo Laminar.



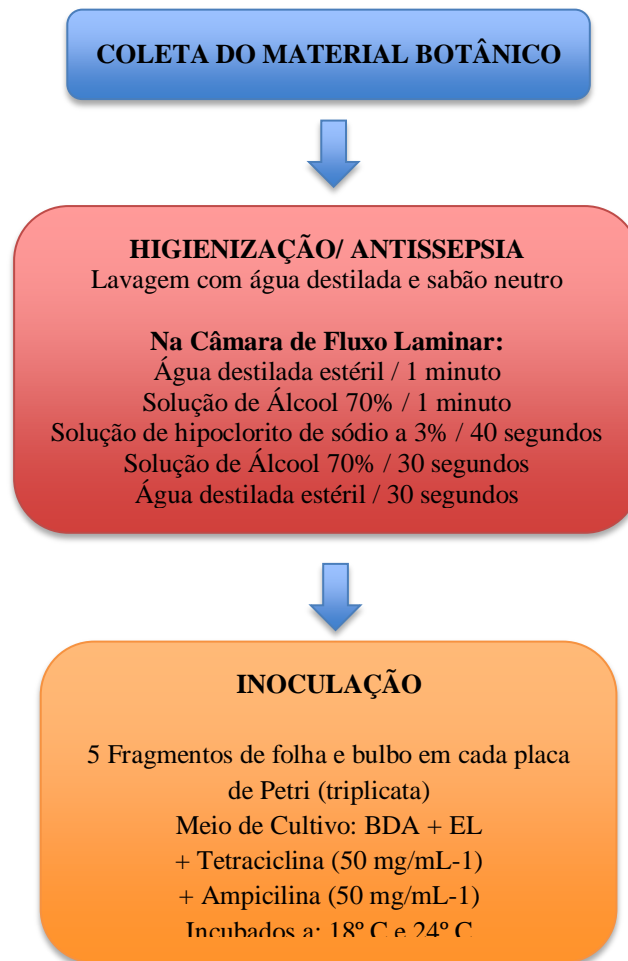
Fonte: Arquivo pessoal

Figura 4: Ilustração da disposição dos fragmentos de folha e bulbo na Placa de Petri contendo meio BDA+ EL com T+A para o isolamento dos fungos endofíticos.



Fonte: Autoria própria.

Figura 5: Fluxograma das etapas do isolamento de microrganismos de *Eichhornia crassipes*.



Fonte: Ilustração de autoria própria, porém adaptado de Ferreira (2020)

Tabela 1: Organização das condições de cultivo para o isolamento dos fungos endofíticos, respectivamente, o total de placas por tipo de fragmento vegetal e total de fragmentos inoculados em placas.

Condições de Cultivo		Total de Placas	
Meio BDA+EL (T+A)*	Temperaturas	Folha	Bulbo
	18° C	03 x 5 = 15	03 x 5 = 15
	24° C	03 x 5 = 15	03 x 5 = 15
	Controle	02	02
Total de fragmentos inoculados por cada parte da planta:		30	30
Total de fragmentos inoculados nas duas coletas:		60	

*T+A- Tetraciclina + Ampicilina.

4.3. Purificação e preservação dos fungos endofíticos

No período de quinze dias de monitoramento nos dois tratamentos de temperatura, assim que uma colônia fúngica crescia em um fragmento da planta presente na placa, era feito o repique um tubo de ensaio com meio inclinado (BDA+EL) e mantidos na B.O.D com a temperatura em 18° C (Ferreira, 2020). Quando cresciam duas ou mais colônias diferentes no mesmo tubo, incluindo leveduras, eram realizados repiques sucessivos para novos tubos de ensaio e depois transferidos para placas de Petri, justamente para obter isolados puros para a preservação.

Os fungos endofíticos isolados e purificados foram preservados seguindo a metodologia de Castellani (1939), no qual consiste no armazenamento dos discos dos micélios crescidos no meio BDA+EL em um frasco pequeno de vidro contendo água destilada estéril.

4.4. Cálculo do Índice de Colonização e Taxa da Frequência de Isolamento

Para avaliar os resultados referentes ao isolamento, foram analisados a Taxa de Colonização (TC), juntamente com a Frequência relativa do isolamento (Fr), seguindo os cálculos descritos por Azevedo (1998):

Taxa de Colonização:

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

Frequência Relativa:

$$Fr = \frac{\text{Número total de isolados de um grupo} \times 100}{\text{Número total de isolados}}$$

4.5. Caracterização macromorfológica

A caracterização macromorfológica consiste na análise das características da colônia fúngica que são visíveis a olho nu, como a cor do verso e anverso da colônia, textura do micélio, borda (regular ou irregular), relevo (plano ou apiculado), produção de exsudato ou não, e se é produzido pigmento, verificar se é difusível ou não ao meio de cultura.

Para fazer essa caracterização, os endofíticos foram inoculados em repique unipontual na placa de Petri contendo meio BDA+EL. Para as linhagens fúngicas que esporulavam bastante, foi realizado o processo de preparo de suspensão de esporos conforme a metodologia de Samson *et al.* (2014), utilizando 4 mL de uma solução salina + Tween 80 na concentração de 0,5% e completados com 36 mL da solução salina a 0,9%, totalizando 40 mL da solução em cada tubo Falcon.

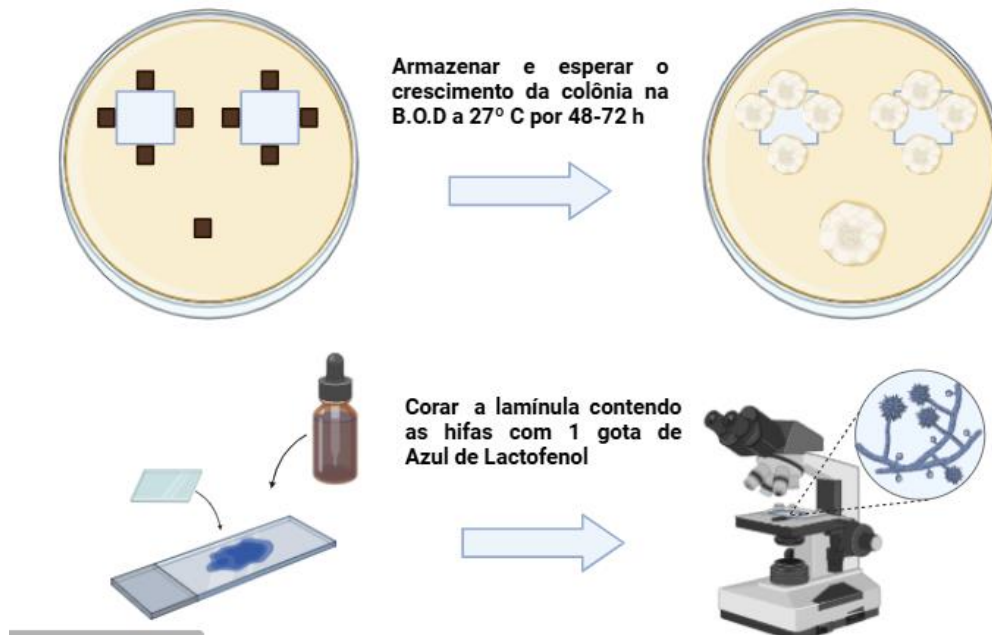
Para a coleta de esporos para a suspensão foi feita a raspagem do micélio com a ajuda dessa solução autoclavada, em seguida, foi feita a filtração em Erlenmeyer com a ajuda de gazes. Em cada ponto de inoculação, foi determinada a utilização de 10^7 esporos e, para isso, 1.200 μ L da solução de esporos coletadas foram adicionados em tubos Eppendorf e foram centrifugados a 4.000 rpm por 2 minutos. Após a centrifugação, quase toda a solução do tubo foi retirada, sobrando apenas o suficiente para inocular nas placas, a inoculação foi de 1 μ L da suspensão de esporos em unipontual na superfície da placa contendo o meio de cultura.

4.6. Caracterização micromorfológica

A análise das características microscópicas, como os tipos de hifas e estruturas reprodutivas, é o que define a caracterização micromorfológica, é por meio dela que é possível identificar a nível de gênero as linhagens fúngicas isoladas. Essa análise é possível através da técnica de microcultivo, onde em uma placa contendo o meio BDA+EL, pedaços pequenos e quadrados da colônia são dispostos nos quatro lados da lamínula, o experimento foi em duplicata na mesma placa, além de ter sido inoculado uma parte do micélio em um terceiro ponto equidistante (sem a lamínula) para ser a testemunha do crescimento do microcultivo (Figura 6). As placas de Petri contendo o material de microcultivo foram armazenados na B.O.D com temperatura de 27 °C, por 48-72 horas.

Após o crescimento das hifas, as lamínulas foram transferidas para uma lâmina contendo uma gota de azul de lactofenol para que fosse possível a visualização das hifas e estruturas reprodutivas com o auxílio obrigatório de um Microscópio Óptico.

Figura 6: Ilustração do método de microcultivo e preparo das lâminas de observação microscópica.



Fonte: Ilustração de autoria própria, feita no site BioRender.

4.7. Testes para amilases

Para a avaliação de atividades amilolíticas dos fungos endofíticos foi utilizado o meio de cultivo BDA + amido de milho, conforme proposto por Souza *et al.* (2016). Para o preparo do meio foram utilizados 10 g de dextrose, 7,5 g de ágar, 10 g de amido solúvel, 100 mL de caldo de batata e 400 mL de água destilada. Todos os reagentes foram homogeneizados em Erlenmeyer de 1.000 mL e foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

Foi adicionado 1 µL das suspensões de esporos (preparadas da mesma forma citada na metodologia de caracterização macromorfológica), inoculadas diretamente na superfície do meio de cultura justamente para que as colônias crescessem uniformemente e fosse possível visualizar o halo de degradação, esse mesmo procedimento foi feito com os testes de proteases e lipases. No meio BDA + amido de milho, os fungos foram inoculados em tripontuais equidistantes, equivalendo a triplicatas, e foram armazenadas à temperatura de 20 °C por 7 dias. Após esse período, as placas foram coradas com solução de Lugol a 1% para revelar se os fungos produziram o halo de degradação do amido ou não.

4.8. Testes para proteases

O meio de cultivo utilizado para a avaliação de atividade proteolítica foi o Ágar-Leite (Queiroz e De Souza, 2020). O meio de cultivo foi preparado com 25 g de leite desnatado e 7,5 g de ágar para 500 mL de água destilada, o meio foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

Os inóculos foram dispostos em três pontos equidistantes na placa, foram mantidos na temperatura de 20 °C por 7 dias. Com a utilização do meio Ágar-Leite não é necessário utilizar corante, por conta do halo de degradação das proteínas serem translúcidos e ser bem visível na placa.

4.9. Testes para lipases

O meio de cultura utilizado para a determinação de atividade lipásica consiste na seguinte composição: 5g de peptona; 8g de ágar; 1g de NaCl; 0,06g de CaCl₂ e 1.200 µL de Tween 80 para 500 mL de água destilada, esterilizados em autoclave a 121° C por 15 minutos e vertidos em placas de Petri, metodologia adaptada de Alves *et al.* (2020).

Em repique tripontuais, os fungos foram inoculados no meio e foram mantidos em temperatura de 20° C por 7 dias. Após esse período, as linhagens que positivaram para a atividade lipásica extracelular apresentam um halo de degradação opaco.

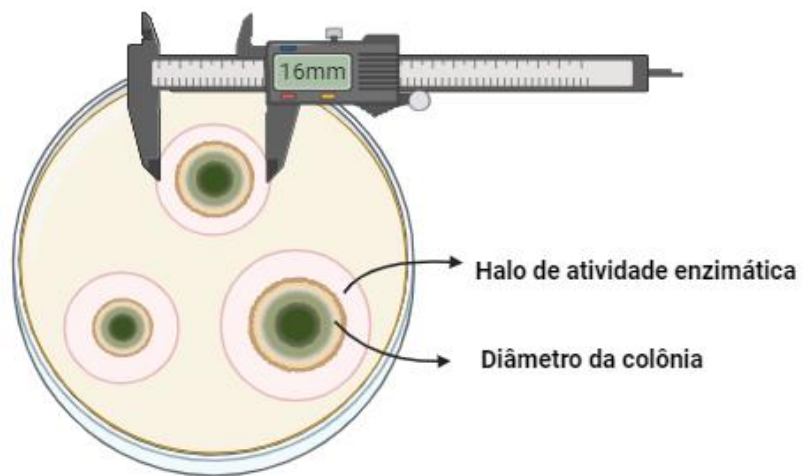
4.10. Análise do Índice Enzimático

Para a análise qualitativa das atividades enzimáticas foram considerados valores padrões de Índice Enzimático (IE) de Hankin e Anagnostakis (1975), que consiste na razão entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia ($IE = DH / DCM$; onde DH é o Diâmetro Médio do Halo de Degradação e DCM é o Diâmetro Médio de Crescimento Microbiano). Valores de IE iguais a 1,0 indicam resultado negativo, enquanto que valores acima de 1,0 indicam resultado positivo, e valores acima de 2,0 mostram boas zonas de degradação (fortemente positivos). A medição do tamanho dos diâmetros foi feita com a utilização de um paquímetro (Figura 7).

Índice Enzimático:

$$\text{IE} = \frac{\text{Diâmetro Médio do Halo de Degradação}}{\text{Diâmetro Médio de Crescimento Microbiano}}$$

Figura 7: Ilustração de como os valores do diâmetro do halo de hidrólise e da colônia fúngica foram obtidos.



Fonte: Ilustração de autoria própria, feita no site BioRender.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento de fungos endofíticos e taxa de colonização

Obteve-se da primeira coleta de *E. crassipes* o total de sete fungos endofíticos isolados, sendo cinco obtidos a partir dos fragmentos de folha e dois dos fragmentos do bulbo, e a temperatura que apresentou maior número de isolados foi a de 18 °C. Considerando que o total de fragmentos inoculados foi 30 para cada tipo de fragmento, folha e bulbo, seguindo o cálculo da Taxa de Colonização, o isolamento das folhas apresentou maior TC, que foi de 16%, enquanto que para o bulbo, a TC foi de 6%, sendo assim, a Taxa de Colonização total da primeira coleta foi de 22%, isso significa que 78% dos fragmentos não apresentaram crescimento de fungos endofíticos (Tabela 2).

Tabela 2: Representação do quantitativo de fungos endofíticos isolados de *E. crassipes* por fragmentos e total, juntamente com sua Taxa de Colonização da primeira e segunda coleta.

Coleta 1				
	Temperaturas		Total de isolados por fragmentos	Taxa de Colonização (%)
Fragmentos	18° C	24° C		
Folha	3	2	5	16%
Bulbo	2	-	2	6%
Total de isolados			7	22%
Coleta 2				
	Temperaturas		Total de isolados por fragmentos	Taxa de Colonização (%)
Fragmentos	18° C	24° C		
Folha	3	2	5	16%
Bulbo	5	1	6	20%
Total de isolados			11	36%

Na segunda coleta foram obtidas 11 linhagens fúngicas isoladas, sendo cinco isolados de folha e seis isolados do bulbo, e a TC foi de 16% e 20%, respectivamente. Logo, o bulbo foi o fragmento vegetal que apresentou maior taxa de isolados em relação à folha, comparando com o resultado do primeiro isolamento. Com relação à temperatura de crescimento dos isolados, o maior número ocorreu a 18° C, assim como na primeira coleta, inclusive, a temperatura é apontada como um dos fatores de grande importância para o isolamento dos fungos endofíticos, considerando que em seu habitat natural, o clima influencia a germinação de esporos dos fungos (Ferreira *et al.*, 2021). A Taxa de Colonização total foi de 36%, ou seja, 64% dos fragmentos não apresentaram crescimento fúngico, as plantas da segunda coleta apresentaram maior número de linhagens isoladas quando comparadas com a planta da primeira coleta (Tabela 2). Em seu trabalho de isolamento de fungos endofíticos de *E. crassipes* coletadas na Lagoa de Salto Grande da cidade de Americana/SP, Almeida (2018) obteve crescimento fúngico em 24 fragmentos do total de 300 fragmentos de folhas amostradas, logo, tendo uma Taxa de Colonização igual a 8%, valor diferente da que foi encontrada nesta pesquisa.

No total, somatória do primeiro e do segundo isolamento, foram isoladas 18 colônias fúngicas, somatória da primeira e da segunda coleta, sendo 10 endofíticos isolados da folha e 8 do bulbo, com isso, a frequência relativa de isolamento (Fr) foi maior para as folhas (55,5%), enquanto que para o bulbo foi de 44,4% (Tabela 3). Diferentemente, Almeida *et al.* (2015) isolaram fungos endofíticos das folhas de *Eichhornia crassipes* coletadas na várzea do alto Rio Paraná e obtiveram em seus resultados uma frequência de isolamento mais alta, no qual o valor da Frequência relativa de isolamento foi de 88,5%.

Rajagopal *et al.* (2018) buscando avaliar a micodiversidade e o potencial biotecnológico de três espécies de macrófitas aquáticas coletadas de um lago presente no Parque Zoológico Anna (Chennai-Índia): *Eichhornia crassipes* (Pontederiaceae), *Nymphaea nouchali* (Nymphaeaceae) e *Vallisneria spiralis* (Hydrocharitaceae), conseguiram isolar 12 espécies diferentes de fungos endofíticos (12 indivíduos, também) da *E. crassipes*, 18 de *N. nouchali* e 11 espécies da *V. spiralis*. Fanani, Triastuti e Sulmartiwi (2021), em seu isolamento de fungos endofíticos de *E. crassipes* coletadas de um rio em Wonoayu- East Java (Indonésia), para a análise antimicrobiana para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, incubadas a 30 °C, tiveram oito linhagens fúngicas isoladas e purificadas. Enquanto que Abdel-Wareth, Ali e El-Shazly (2023) isolaram fungos endofíticos de *E. crassipes* coletadas de cursos d'água da província de Garbia, no Egito, no qual foram incubadas a 28 °C e, obtiveram, no total, 17

isolados da folha e seis do pecíolo. Todos os isolamentos exemplificados resultaram em número de fungos endofíticos próximos de 18.

Também já foram isolados 18 fungos endofíticos tanto da folha quanto do pecíolo de *E. crassipes*, nessa pesquisa, os autores Govindan e Gunasekaran (2022), afirmaram que macrófitas aquáticas abrigam em menor número, em suas folhas e pecíolo, os fungos endofíticos, sendo assim, considerado de baixíssima riqueza e que essa riqueza e a densidade dos fungos variam de acordo com a estrutura dos tecidos vegetais da *Eichhornia*, por exemplo, o pecíolo é uma parte da planta que é bulbosa e bastante esponjosa, com espaço aéreo bem grande, o que pode contribuir para a baixa riqueza de endofíticos.

Tabela 3: Total de fungos endofíticos isolados de *E. crassipes* e as Frequências de isolamento da folha e do bulbo.

	Frequência relativa de isolamento (%)
Folha	55,5%
Bulbo	44,4%
Total de Isolados	18

5.2. Caracterização macro e micromorfológica

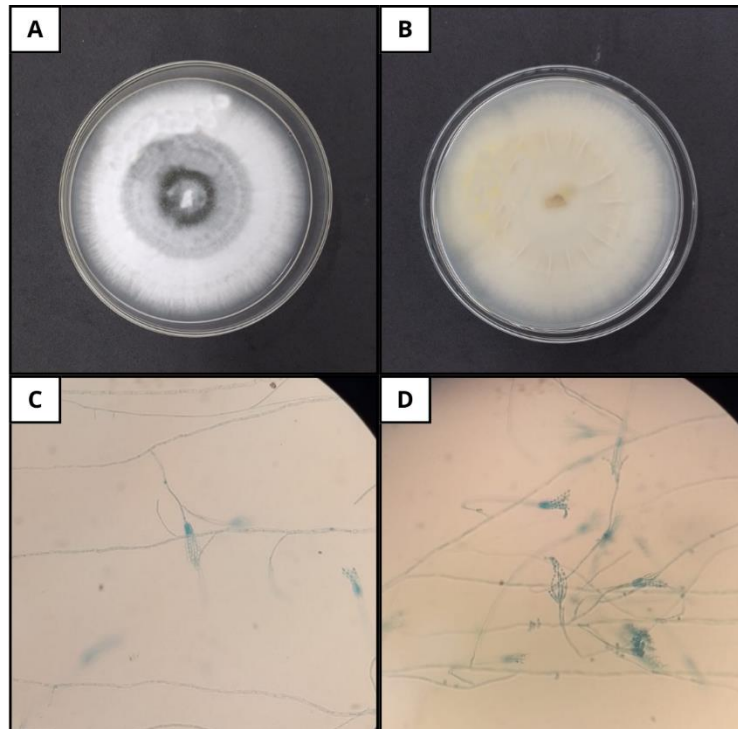
Entre os isolados obtidos na pesquisa, foram caracterizados morfologicamente 11 linhagens, isso porque 7 isolados não sobreviveram após sucessivos repiques devido às contaminações. Posteriormente, as mesmas linhagens foram usadas para os testes enzimáticos. Todos receberam uma codificação padrão própria: E.F (Endofítico Folha) ou E.B (Endofítico Bulbo), seguidos pelos números da placa, fragmento e indivíduo, respectivamente, exemplo: E.F 1.5.1, fungo isolado da folha e que foi o primeiro indivíduo que cresceu no fragmento 5 da placa 1. Um resumo das informações de cada fungo endofítico isolado é encontrado na tabela 4.

Tabela 4: Informações gerais dos fungos endofíticos isolados de *E. crassipes*.

Microrganismo	Coleta	Fragmento de origem	Temperatura de isolamento
E. F 1.4.1	1	Folha	18 °C
E. F 1.4.2	1	Folha	18 °C
E. F 2.3.1	1	Folha	24 °C
E. F 1.3.1	1	Folha	24 °C
E. B 1.4.2	1	Bulbo	18 °C
E. F 1.1.1	2	Folha	18 °C
E. F 1.5.1	2	Folha	24 °C
E. B 1.4.1	2	Bulbo	18 °C
E. B 2.1.2	2	Bulbo	18 °C
E. B 2.2.1	2	Bulbo	18 °C
E. B 2.3.1	2	Bulbo	18 °C

O isolado E.F 1.3.1 apresentou um micélio de coloração verde folha com branco no anverso e bege no verso, algodinoso, sem produção de pigmento e exsudato e borda regular (Figuras 8A e 8B), em sua microscopia, as hifas foram classificadas como septadas, hialinas e foi possível observar a presença de conidióforos e seus respectivos conídios perpendiculares às hifas em formato de “vassoura”, logo se caracterizando como um fungo do gênero *Penicillium* (Figuras 8C e 8D). Os conidióforos de *Penicillium* spp. variam entre estruturas simples (fiálides solitárias) a padrões mais complexos com diferentes níveis de ramificação, podendo ser simétricos ou assimétricos (Visagie *et al.*, 2014).

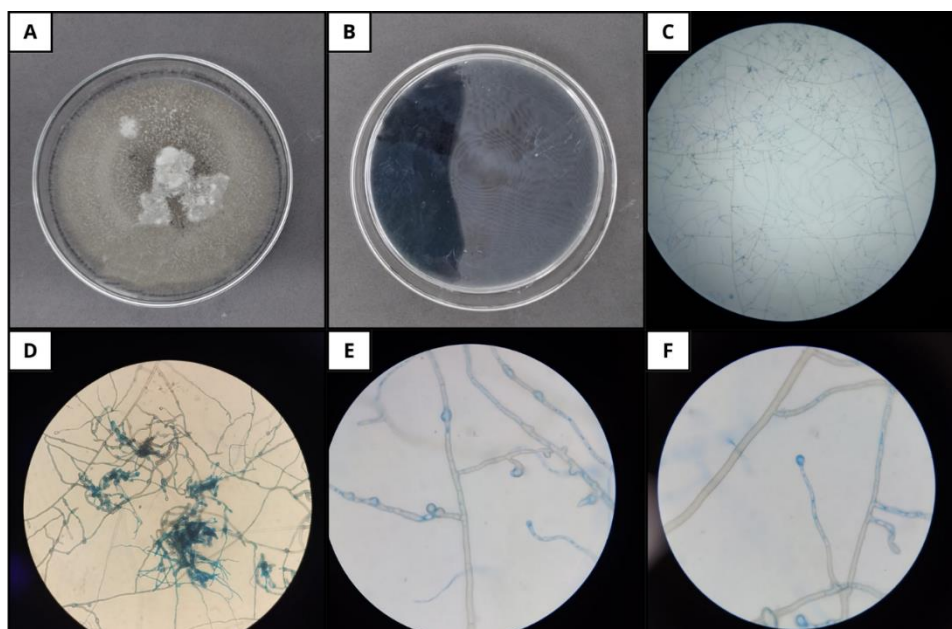
Figura 8: **A.** Anverso do isolado E.F 1.3.1. **B.** Verso da placa do isolado E.F 1.3.1. **C. e D.** Microscopia óptica do mesmo fungo na objetiva de 40x, onde é possível visualizar os conidióforos.



Fonte: Arquivo pessoal.

O fungo E.F. 1.4.2 apresentou coloração micelial grafite/preto no anverso e no verso, textura algodoadosa, sem relevo, pigmento escuro não difusível no meio, produziu exsudato e tinha borda regular (Figuras 9A e 9B), quanto às hifas, são septadas e demáceas, e apresentaram estruturas globosas ao longo delas e apresentam estrutura reprodutiva ovoide que ficam dispostas em regiões terminais ou laterais de ramos curtos de hifas (Figuras 9C, 9D, 9E e 9F). No entanto, não é possível definir com certeza o gênero do fungo em questão pelo fato de que se parece com diferentes gêneros, entre eles, tanto o gênero *Blastomyces* quanto o *Chrysosporium* apresentam hifas hialinas com conídios ovoides a piriformes que nascem em regiões terminais ou laterais de hifas curtas (Kidd *et al.*, 2016). Não há relatos de fungos do gênero *Blastomyces* em macrófitas aquáticas, porém, já foi relatado por Basha *et al.* (2019) a presença de endofítico do gênero *Chrysosporium* de macrófitas aquáticas.

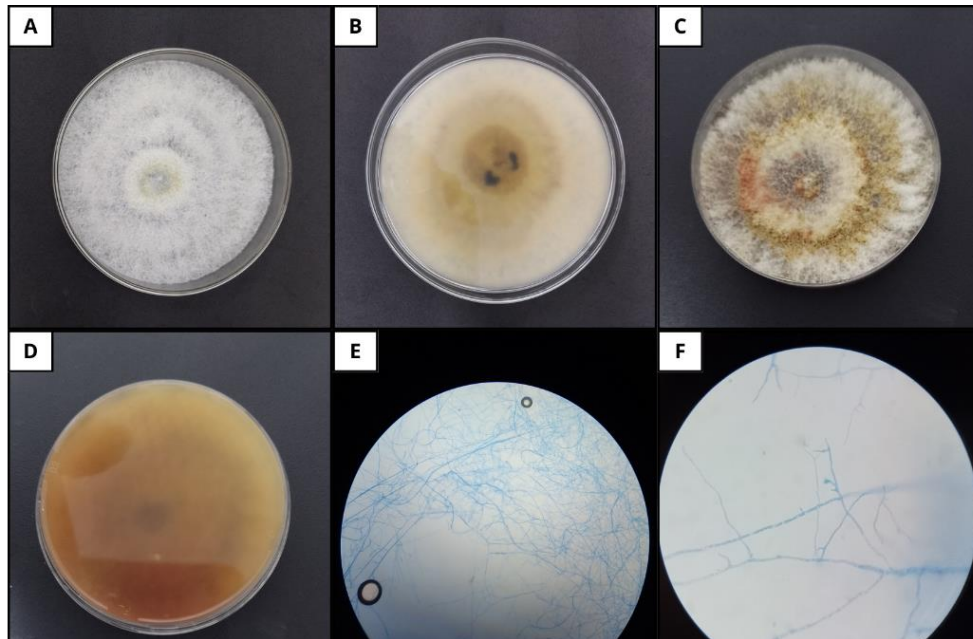
Figura 9: **A.** Anverso do isolado E.F 1.4.2. **B.** Verso da placa do isolado E.F 1.4.2. **C.** Microscopia óptica do mesmo fungo na objetiva de 4x. **D.** Microscopia óptica na objetiva de 40x. **E e F.** Microscopia óptica na objetiva de 100x mostrando as estruturas ovoides nas hifas



Fonte: Arquivo pessoal.

O endofítico E.F 1.4.1 foi caracterizado por diferentes colorações, variando entre branco, amarelo palha e laranja no anverso, as cores apresentadas no verso da placa variam entre bege, amarelo, laranja, castor, camurça e vermelho, logo produzindo pigmento dessas mesmas cores difusível no meio, de forma progressiva, ou seja, mudando bastante conforme o passar dos dias, apresentou também borda regular (Figuras 10A, 10B, 10C e 10D), na microscopia foi possível observar as hifas septadas e hialinas, sem estrutura reprodutiva (Figuras 10E e 10F).

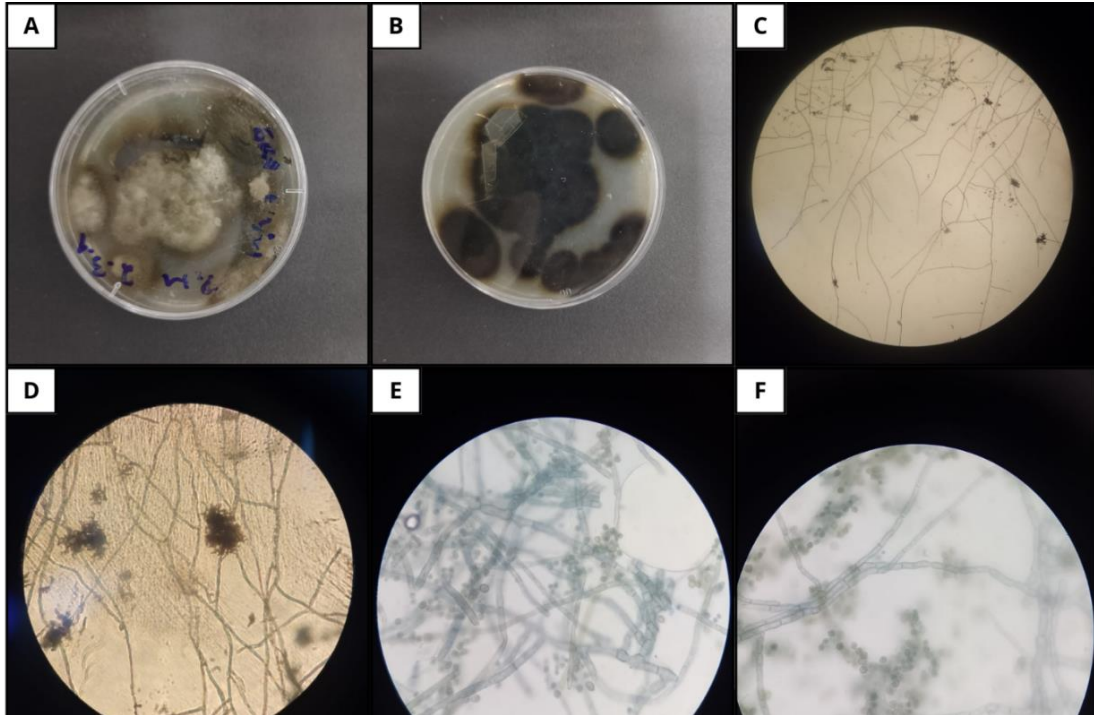
Figura 10: **A. e C.** Anverso do isolado E.F 1.4.1. **B. e D.** Verso da placa do isolado E.F 1.4.1. **E.** Microscopia óptica do mesmo fungo na objetiva de 10x. **Figura F.** Microscopia óptica na objetiva de 100x.



Fonte: Arquivo pessoal.

O isolado E.F 2.3.1 apresentou a colônia de coloração verde militar e no verso da placa, a cor verde/grafite, textura veludosa, não produziu pigmento e nem exsudato, borda irregular e relevo rugoso (Figuras 11A e 11B), quanto à microscopia, as hifas são demáceas e septadas, além disso, apresentou muitos agrupamentos de conídios elípticos demáceos em formato de “cachos de uva”, principalmente em regiões terminais das hifas (Figuras 11C, 11D, 11E e 11F). Com a observação das estruturas reprodutivas não é possível afirmar à qual gênero exatamente esse fungo pertence, porém, existem algumas possibilidades, uma delas é o gênero *Cladosporium*, que segundo Kidd *et al.* (2016), as colônias são de coloração verde oliva e verde/preto no verso e os conidióforos apresentam um arranjo de conídios que lembram “cachos de uva” demáceos. Também há semelhanças com os fungos do gênero *Fonsecaea*, no qual apresenta colônias de mesma coloração e os conídios se ramificam em pequenas cadeias, elipsoidal e de coloração verde oliva (De Hoog *et al.*, 2004).

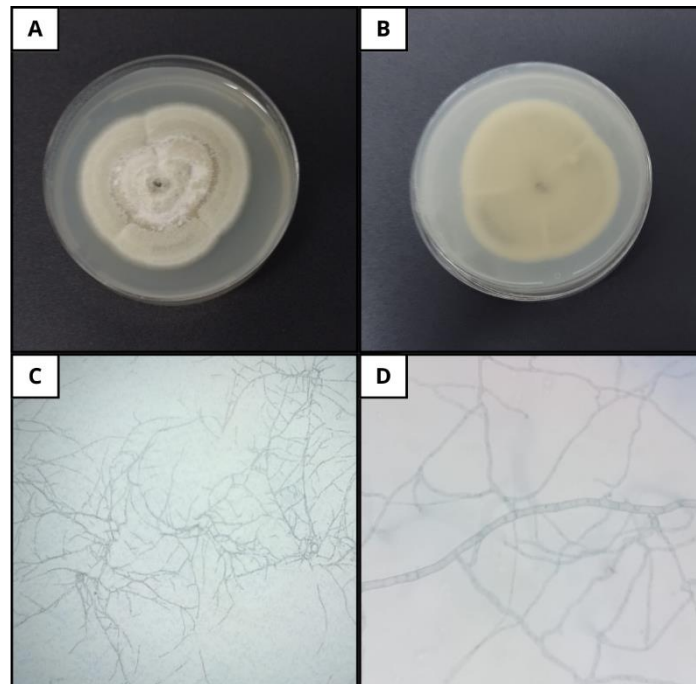
Figuras 11: **A.** Anverso do isolado E.F 2.3.1. **B.** Verso da placa do isolado E.F 2.3.1. **C.** Microscopia óptica do mesmo fungo na objetiva de 10x. **D.** Microscopia óptica na objetiva de 40x, onde é possível observar os aglomerados da estrutura reprodutiva. **E. e F.** Microscopia na objetiva de 100x, onde é possível observar os conídios.



Fonte: Arquivo pessoal.

O fungo E.F 1.5.1 apresentou o micélio de colorações variando entre verde claro e branco gelo no anverso, e o verso apresentou coloração bege e verde militar, textura membranosa, sem pigmento e exsudato, borda regular, relevo apiculado e levemente rugoso (Figuras 12A e 12B), as hifas são hialinas, cenocíticas e não apresentaram estruturas reprodutivas (Figura 12C e 12D).

Figura 12: **A.** Anverso do isolado E.F 1.5.1. **B.** Verso da placa do isolado E.F 1.5.1. **C.** Microscopia óptica do mesmo fungo na objetiva de 10x. **D:** Microscopia óptica na objetiva de 100x.

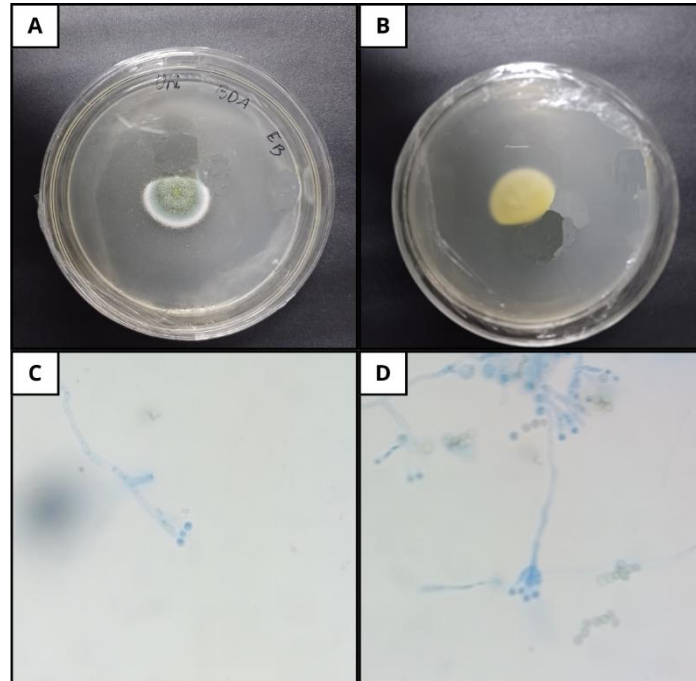


Fonte: Arquivo pessoal.

Os fungos E.F 1.1.1 e E.B 2.2.1 apresentaram as características de colônias: cor do micélio variando entre verde folha e verde militar com a borda branca, no verso apresentou a cor creme e com um pigmento amarelo não difusível no meio, textura veludosa, produziu exsudato, borda regular e relevo apiculado (Figuras 13A e 13B). As hifas são cenocíticas e hialinas e apresentaram conidióforos com formato de “vassoura”, como as dos fungos do gênero *Penicillium* (Figura 13C e 13D).

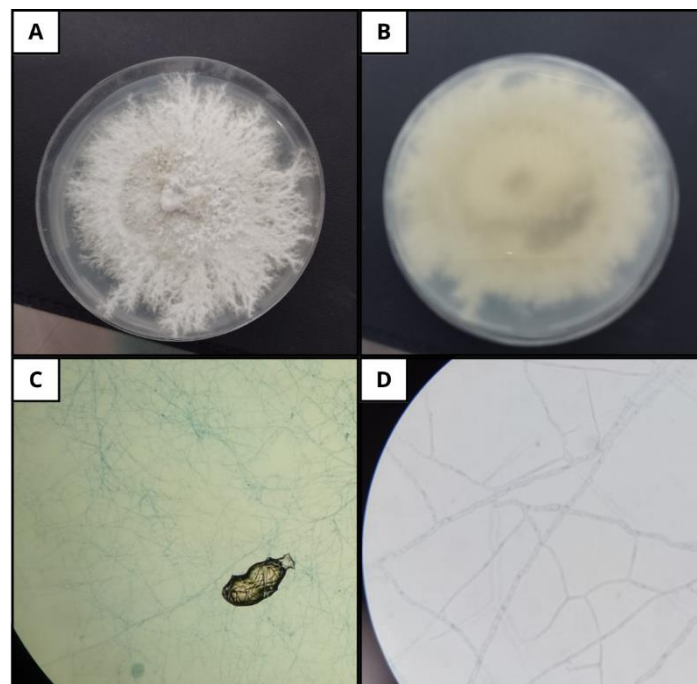
O endofítico E.B 1.4.1 possuiu micélio branco e no verso coloração bege, textura penugenta, não produziu pigmento e nem exsudato, borda irregular e relevo apiculado (Figuras 14A e 14B), as hifas são hialinas e não apresentou conidióforos e nem conídios (Figuras 14C e 14D). O isolado E.B 1.4.2 possuiu uma colônia de coloração branca e no verso era bege, textura veludosa, não produziu pigmento e nem exsudato, borda regular e sem relevo (Figuras 15A e 15B), as hifas são cenocíticas, hialinas e possuem muitas ramificações, também apresentou partes em que a hifa se enrolava como uma hélice, se assemelhando aos fungos pertencentes ao gênero *Helicosporium* (Figura 15C e 15D), já que os fungos deste gênero apresentam conídios helicoidais (Xiao *et al.*, 2023).

Figura 13: **A.** Anverso do isolado E.F 1.1.1. **B.** Verso da placa do isolado E.F 1.1.1. **C e D.** Microscopia óptica do mesmo fungo na objetiva de 100x, onde é possível visualizar os conidióforos.



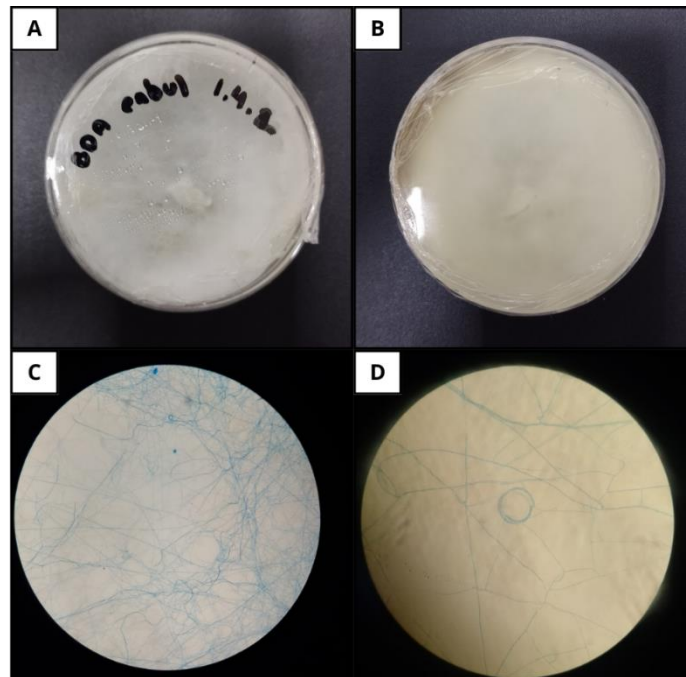
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 14: **A.** Anverso do isolado E.B 1.4.1. **B.** Verso da placa do isolado E.F 1.4.1. **C.** Microscopia óptica na objetiva de 10x. **D.** Microscopia óptica na objetiva de 100x



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 15: **A.** Anverso do isolado E.B 1.4.2. **B.** Verso da placa do isolado E.F 1.4.2. **C.** Microscopia óptica na objetiva de 10x. **D.** Microscopia óptica na objetiva de 100x.

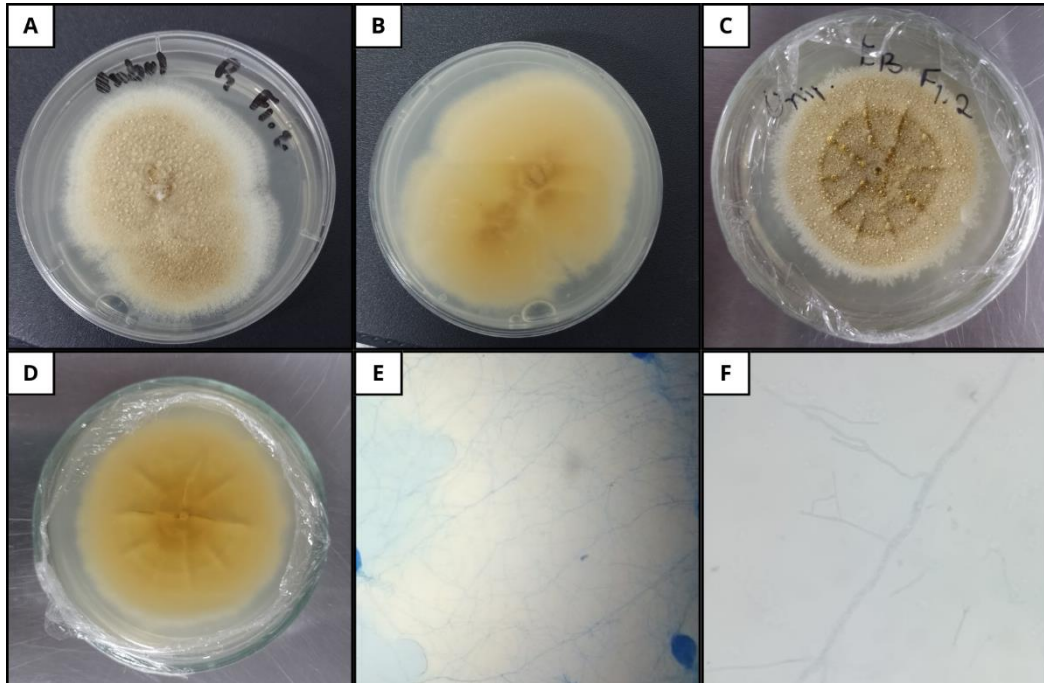


Fonte: Arquivo pessoal.

O fungo E.B 2.1.2 apresentou coloração micelial creme e castor, no verso a coloração era caramelo, cujo pigmento da mesma cor, porém, não difusível no meio, textura penugenta produziu exsudato, a borda variou entre regular e irregular e relevo rugoso (Figuras 16A, 16B, 16C e 16D), as hifas são cenocíticas e hialinas e sem a presença de estruturas reprodutivas (Figuras 16E e 16F).

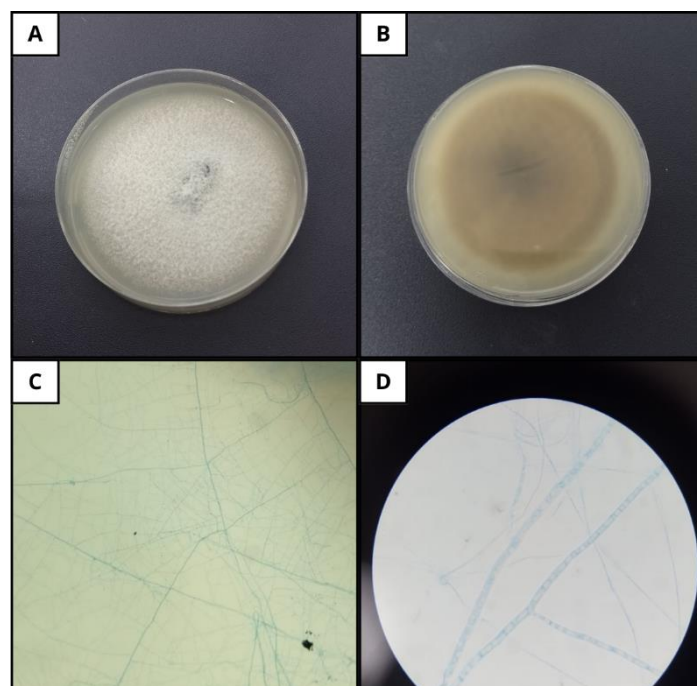
O endofítico E.B 2.3.1 tinha coloração branca e cinza concreto no micélio, a cor do verso uma mistura entre bege, castor e camurça, o pigmento era da cor camurça e não era difusível no meio, textura pulverulenta, borda regular e sem produção de exsudato e sem relevo (Figuras 17A e 17B), com a observação microscópica foi possível definir que as hifas são septadas e hialinas, sem estruturas reprodutivas (Figuras 17C e 17D). Um resumo contendo as informações dos fungos caracterizados se encontram na Tabela 5.

Figura 16: A e C. Anverso do isolado E.B 2.1.2. B e D. Verso da placa do isolado E.B 2.1.2. E. Microscopia óptica do mesmo fungo na objetiva de 10x. F. Microscopia óptica na objetiva de 100x.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 17: A. Anverso do isolado E.B 2.3.1. B. Verso da placa do isolado E.B 2.3.1. C. Microscopia óptica na objetiva de 40x. D. Microscopia óptica na objetiva de 100x.



Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 5: Resumo das características morfológicas e suas respectivas identificações dos fungos endofíticos isolados de *Eichhornia crassipes*.

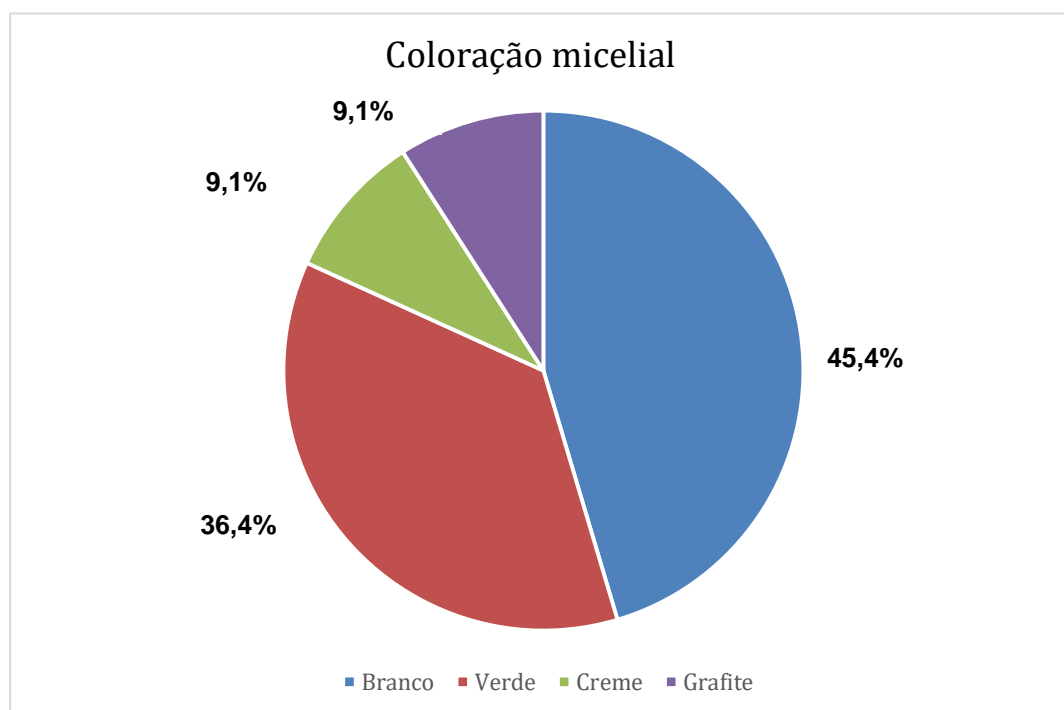
Sugestão de Gênero/Código	Cor Frente	Cor Verso	Textura	Exsudato	Pigmento
<i>Penicillium</i> sp. E.F 1.3.1	Branco e verde folha	Bege	Algodonoso	Não	Não
Não definido E.F 1.4.2	Grafite e Preto	Preto	Algodonoso	Sim/transparente	Sim/Não difusível/ Preto
<i>Mycelia sterilia</i> E.F 1.4.1	Branco e amarelo	Bege e Laranja	Pulverulento	Não	Sim/ Difusível/ Laranja
<i>Mycelia sterilia</i> E.F 1.5.1	Verde pastel	Bege e verde	Membranoso	Não	Não
Não definido E. F 2.3.1	Verde militar	Verde militar	Veludoso	Não	Sim/Não difusível/ Verde
<i>Penicillium</i> sp E.F 1.1.1	Verde folha	Creme	Veludoso	Sim/ Amarelo	Sim/Não difusível/ Amarelo
<i>Penicillium</i> sp E.B 2.2.1	Verde folha	Creme	Veludosa	Sim/ Amarelo	Sim/Não difusível/ Amarelo
<i>Mycelia sterilia</i> E.B 1.4.1	Branco	Bege	Penugenta	Não	Não
<i>Helicosporium</i> sp. E.B 1.4.2	Branco	Bege	Veludoso	Não	Não
<i>Mycelia sterilia</i> E.B 2.1.2	Creme e castor	Caramelo	Penugento	Sim/transparente	Sim/ Não difusível/ Creme

<i>Mycelia sterilia</i>	Branco e	Bege e Castor	Pulverulento	Não	Sim/Não
E.B 2.3.1	Cinza				difusível/ Castor

Em relação às cores dos micélios, cinco dos fungos apresentaram coloração branca (45,4%), sendo assim, o maior quantitativo para essa característica, seguido por quatro de coloração verde (36,4%), um fungo de cor creme (9,1%) e um de coloração grafite/preto (9,1%) (Figura 18). Quanto às texturas foi bem diversificado, o maior quantitativo foi para a textura veludosa, totalizando quatro endofíticos (36,4%), dois de textura algodonosa (18,2%), dois para fungos penugentos (18,2%), dois fungos pulverulentos (18,2%) e um para a textura membranosa (9,1 %) (Figura 19).

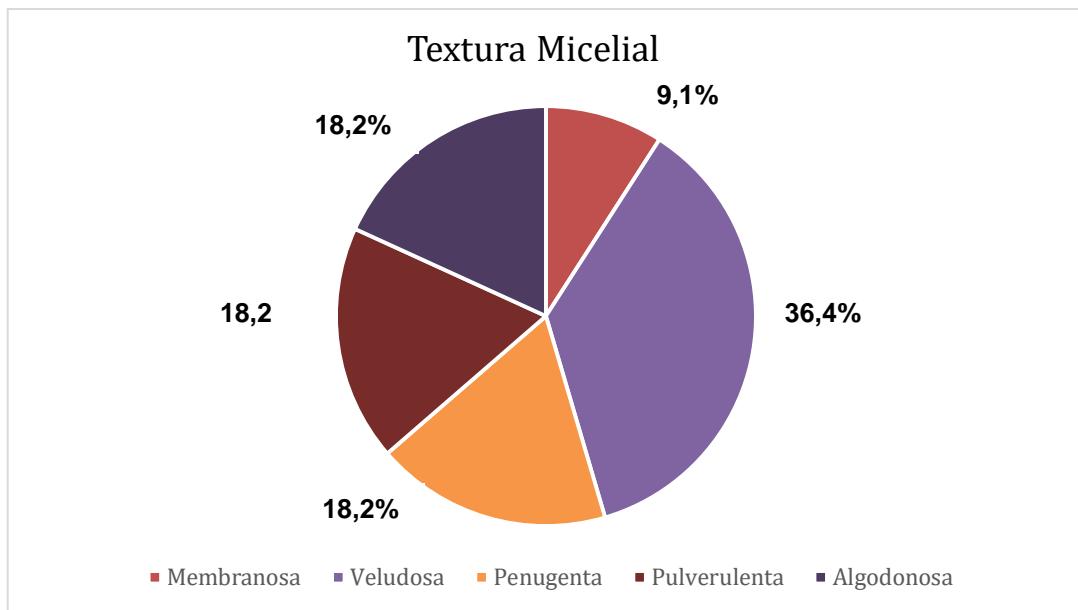
A maioria dos isolados não produziram exsudato, total de sete fungos endofíticos (63,6%), enquanto que quatro apresentaram em sua colônia a produção de exsudato (36,4%) (Figura 20). Apenas sete linhagens fúngicas produziram pigmento, destes, 54,5% possuem pigmento que não são difusíveis no meio de cultura e 9,1% é difusível no meio (Figura 21).

Figura 18: Gráfico representando os percentuais das cores das colônias dos fungos endofíticos caracterizados.



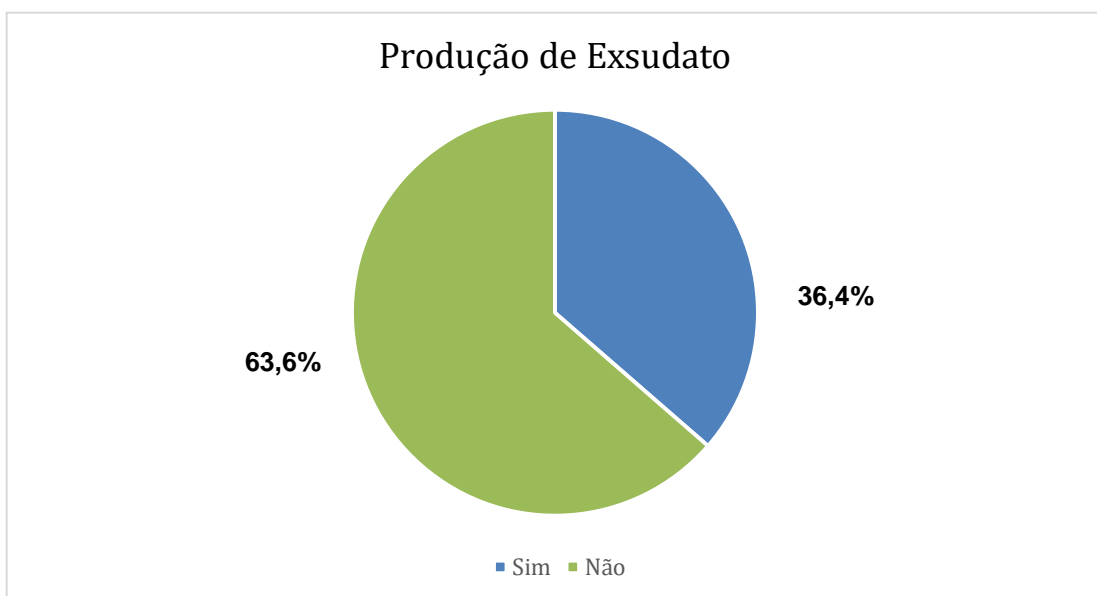
Fonte: Autoria própria

Figura 19: Gráfico representando os percentuais das texturas das colônias dos fungos endofíticos caracterizados.



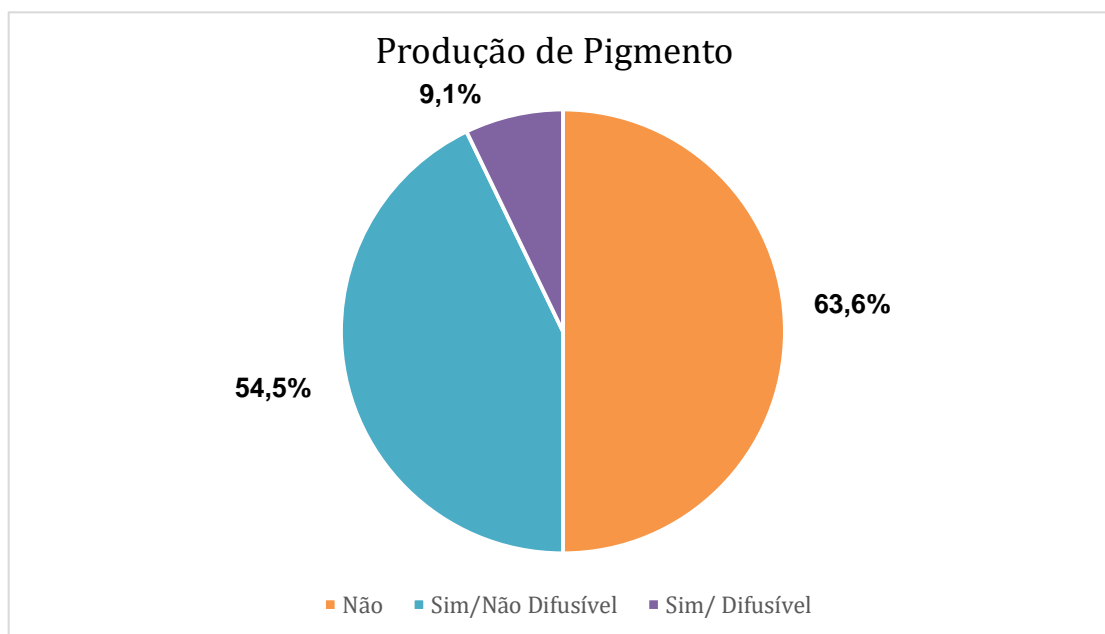
Fonte: Autoria própria

Figura 20: Gráfico representando os percentuais quanto à produção de exsudato dos fungos endofíticos caracterizados.



Fonte: Autoria própria

Figura 21: Gráfico representando os percentuais quanto à produção de pigmento dos fungos endofíticos caracterizados.



Fonte: Autoria própria

5.3. Análise da atividade enzimática

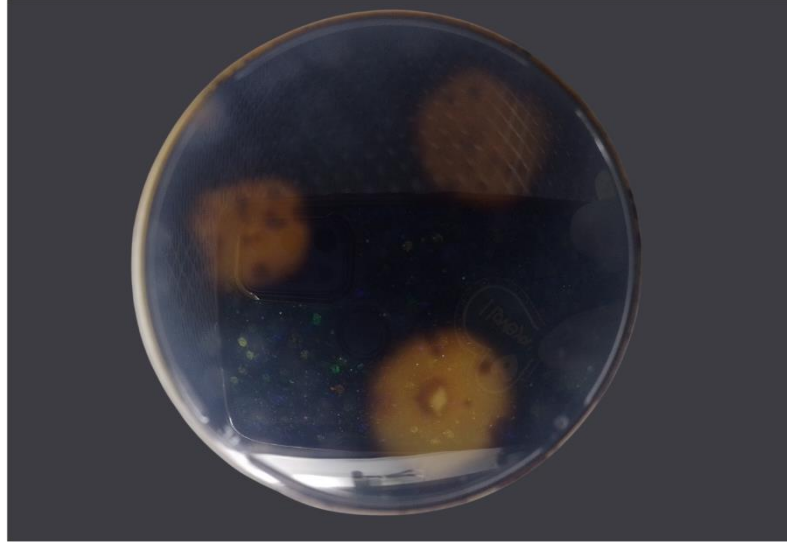
5.3.1. Amilases

De todos os 11 fungos endofíticos testados, apenas três produziram o halo de degradação do amido, o halo do fungo E.B 1.4.1 é bem perceptível por ter uma coloração mais clara e amarelada se destacando em relação ao Lugol (Figura 22), sendo assim, apresentando IE igual a 1,07, considerado como resultado positivo, porém, não é promissor o suficiente para produção enzimática em larga escala. Os halos dos fungos E.F 2.3.1 e E.B 2.1.2 eram bem pequenos, quase imperceptíveis nas fotografias (Figuras 23 e 24), sendo os Índices Enzimáticos, respectivamente, iguais a 0,57 e 0,12, por serem menor 1 não são considerados ótimos produtores (Tabela 6).

Souza *et al.* (2016) realizaram testes para a produção de amilases de 11 fungos endofíticos isolados de *E. crassipes* coletados de uma região portuária da cidade de Manaus (AM), destes, dois fungos apresentaram IE positivo e dois fortemente positivos. Enquanto que os autores Lima *et al.* (2020) fizeram ensaios enzimáticos para amilase em 8 fungos endofíticos

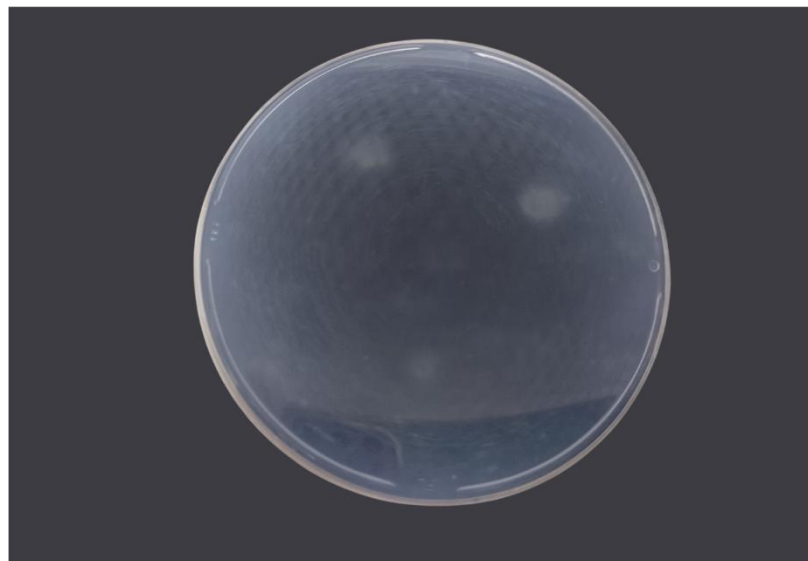
isolados de macrófitas aquáticas coletadas no Rio Negro-Manaus/AM e todos positivaram para a produção dessa enzima.

Figura 22: Verso do teste enzimático para atividade amilolítica do fungo E.B 1.4.1 mostrando o halo de degradação das triplicatas.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 23: Verso do teste enzimático para atividade amilolítica do fungo E.F 2.3.1 mostrando o halo de degradação das triplicatas.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 24: Verso do teste enzimático para atividade amilolítica do fungo E.B 2.1.2 mostrando o halo de degradação das triplicatas.



Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 6: Resultado qualitativo da produção de amilases por fungos endofíticos isolados de *E. crassipes*.

Caracterização morfológica	Fungos Endofíticos	Meio BDA+Amido (sólido)			Resultado
		Diâmetro da colônia (mm)	Diâmetro do halo (mm)	Índice Enzimático	
<i>Mycelia sterilia</i>		25 ± 2,49	23,3 ± 1,63	1,07	Positivo
Não definido	E.B 1.4.1	11,6 ± 3,29	6,66 ± 1,24	0,57	-
<i>Mycelia sterilia</i>	E.F 2.3.1	24,6 ± 3,09	3 ± 0,81	0,12	-
<i>Mycelia sterilia</i>	E.B 2.1.2	ND	ND	-	-
Não definido	E.F 1.5.1	ND	ND	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	E.F 1.4.2	ND	ND	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	E.F 1.1.1	ND	ND	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	E.B 2.2.1	ND	ND	-	-
<i>Helicosporium</i> sp.	E.F 1.3.1	ND	ND	-	-
<i>Mycelia sterilia</i>	E.B 1.4.2	ND	ND	-	-
<i>Mycelia sterilia</i>	E.B 2.3.1	ND	ND	-	-
<i>Mycelia sterilia</i>	E.F 1.4.1	ND	ND	-	-

*ND = não detectado.

5.3.2. Proteases

Os ensaios enzimáticos para a atividade proteolítica revelaram que 6 fungos endofíticos apresentaram um halo de degradação translúcido a redor na colônia, porém, os isolados E.F 1.4.1, E.B 1.4.1 e E.B 1.4.2 apesar de terem formado o halo, os valores do Índice Enzimático foram menores que 1,0, que é considerado negativo para a produção de proteases, pois isso significa que o halo de degradação foi menor que o tamanho da colônia (Figuras 25, 26 e 27).

Figura 25: Anverso e verso do teste enzimático para atividade proteolítica do fungo E.F 1.4.1 mostrando o halo de degradação.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 26: Anverso e verso do teste enzimático para atividade proteolítica do fungo E.B 1.4.2 mostrando o halo de degradação.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 27: Anverso e verso do teste enzimático para atividade proteolítica do fungo E.B 1.4.1 mostrando o halo de degradação.



Fonte: Arquivo pessoal.

Os fungos E.F 1.3.1, E.F 1.1.1 e E.B 2.2.1 foram os únicos que apresentaram resultados positivos com os valores do IE maiores que 1,0 (Tabela 7), sendo assim, os halos foram um pouco maiores que o tamanho da colônia (Figura 28). O que todos os fungos que apresentaram resultados positivos têm em comum é o fato de todos pertencem ao gênero *Penicillium*, onde Bezerra (2021) desenvolveu que o fungo endofítico *Penicillium aurantiogriseum* isolado de *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae), produtor de proteases, como de grande importância industrial.

Apesar de três fungos endofíticos isolados de *E. crassipes* terem positivados para os testes, nenhuma das linhagens apresentaram IE maior que 2,0, logo, não sendo considerados como promissores para produção de proteases em larga escala. Lima *et al.* (2020) também realizaram ensaios enzimáticos para proteases com os fungos endofíticos isolados de macrófitas aquáticas provenientes do rio Negro, porém, o meio utilizado era o meio sólido de gelatina, todos os 8 isolados testados apresentaram resultados fortemente positivos para atividade proteolítica, com índices enzimáticos variando entre 1,9 a 4,2. Nos testes de Rajagopal *et al.* (2018) para proteases com fungos endofíticos isolados de macrófitas aquáticas, incluindo a *Eichhornia crassipes*, 4 linhagens apresentaram resultados positivos para a atividade proteolítica.

Figura 28: Anverso e verso do teste enzimático para atividade proteolítica do fungo E.F 1.1.1 mostrando o halo de degradação.



Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 7: Resultado qualitativo da produção de proteases por fungos endofíticos isolados de *E. crassipes*.

Caracterização morfológica	Fungos Endofíticos	Meio Ágar-Leite (Sólido)			Resultado
		Diâmetro da colônia (mm)	Diâmetro do halo (mm)	Índice Enzimático	
<i>Penicillium</i> sp.	E.B 2.2.1	22,6 ± 1,24	26,6 ± 3,68	1,17	Positivo
<i>Penicillium</i> sp.	E.F 1.1.1	24,3 ± 0,81	27 ± 0,81	1,11	Positivo
<i>Penicillium</i> sp.	E.F 1.3.1	20,3 ± 2,49	22,3 ± 1,7	1,09	Positivo
<i>Helicosporium</i> sp.	E.B 1.4.2	22,3 ± 2,49	20,6 ± 3,3	0,92	-
<i>Mycelia sterilia</i>	E.F 1.4.1	34,5 ± 1,6	23 ± 1	0,66	-
<i>Mycelia sterilia</i>	E.B 1.4.1	33,6 ± 6,18	11,6 ± 1,24	0,34	-
Não definido	E.F 1.4.2	ND	ND	-	-
<i>Mycelia sterilia</i>	E.F 1.5.1	ND	ND	-	-
<i>Mycelia sterilia</i>	E.B 2.1.2	ND	ND	-	-
<i>Mycelia sterilia</i>	E.B 2.3.1	ND	ND	-	-
Não definido	E.F 2.3.1	ND	ND	-	-

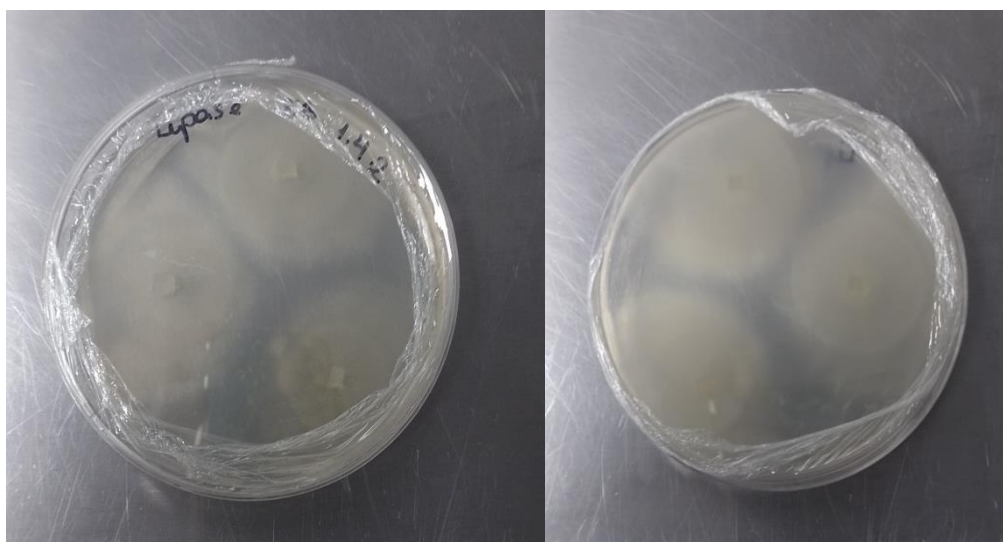
*ND = não detectado

5.3.3. Lipases

Em relação aos testes enzimáticos voltados para atividade lipolítica, apenas 1 fungo endofítico apresentou um halo opaco no meio de cultivo, o isolado E.B 1.4.2 (Figura 29), no entanto, o halo foi menor que o tamanho da colônia e conseqüentemente o IE foi de 0,79, considerado como resultado negativo (Tabela 8).

Como o quantitativo de fungos que positivaram para a produção de lipases foi nula, uma possibilidade para explicar essa situação é que a difusão das enzimas, nesse caso as lipases, é influenciada pelo peso molecular delas, que pode impedir essa difusão pelo ágar, sendo assim, a atividade enzimática pode ser considerada baixa ou inexistente (Silva, 2011). Os autores Nascimento, Dos Santos e Andrade (2014) enfatizam que é muito importante conhecer detalhadamente as particularidades de cada cepa para a obtenção de um produto fúngico porque cada fungo é diferente e essas diferenças que ocorrem por algum fator podem interferir no seu desenvolvimento, dessa forma proporcionando diferentes respostas ou resultados.

Figura 29: Anverso e verso do teste enzimático para atividade lipolítica do fungo E.B 1.4.2 mostrando o halo de degradação.



Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 8: Resultado qualitativo da produção de lipases por fungos endofíticos isolados de *E. crassipes*.

Caracterização morfológica	Fungos Endofíticos	Meio Suplementado com Tween 80 (Sólido)			
		Diâmetro da colônia (mm)	Diâmetro do halo (mm)	Índice Enzimático	Resultado
<i>Helicosporium</i> sp.	E.B 1.4.2	35,6 ± 3,3	28,3 ± 3,09	0,79	Negativo
<i>Penicillium</i> sp.	E.F 1.1.1	ND	ND	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	E.F 1.3.1	ND	ND	-	-
<i>Mycelia sterilia</i>	E.F 1.4.1	ND	ND	-	-
<i>Mycelia sterilia</i>	E.B 1.4.1	ND	ND	-	-
Não definido	E.F 1.4.2	ND	ND	-	-
<i>Mycelia sterilia</i>	E.F 1.5.1	ND	ND	-	-
<i>Mycelia sterilia</i>	E.B 2.1.2	ND	ND	-	-
<i>Mycelia sterilia</i>	E.B 2.3.1	ND	ND	-	-
Não definido	E.F 2.3.1	ND	ND	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	E.B 2.2.1	ND	ND	-	-

*ND = não detectado

6. CONCLUSÃO

A pesquisa realizada com a macrófita aquática *Eichhornia crassipes* coletada no baixo curso do Rio Tarumã-Açu permitiu isolar fungos endofíticos de folhas e bulbo e investigar o seu potencial biotecnológico através da produção de enzimas extracelulares.

Foi possível isolar 18 fungos endofíticos da espécie vegetal em questão, sendo 10 isolados da folha e 8 do bulbo e, a temperatura que obteve melhor desempenho para o crescimento de colônias fúngicas nos fragmentos da planta foi a de 18 °C.

Com a análise macro e micromorfológica dos fungos foi possível observar que as características foram bem diversas, porém, a maioria dos fungos (45,4%) apresentaram coloração micelial branca, 36,4% tinham textura veludosa, 63,6% não produziram exsudato e nem pigmento. O estudo permitiu determinar quatro linhagens a nível de gênero: três eram pertencentes ao gênero *Penicillium* e um do gênero *Helicosporium*, dois fungos apresentaram estruturas reprodutivas mas não foi possível identificar com exatidão o gênero a qual pertencem. A maioria dos isolados (cinco linhagens) não apresentaram estruturas reprodutivas, sendo classificadas como *Mycelia sterilia*.

Nos testes enzimáticos, três fungos que resultaram positivo para a produção de protease, um positivou para amilase e nenhum fungo testado apresentou índice enzimático positivo para lipase.

Embora nenhum dos que apresentaram halo de hidrólise conseguiram atingir o Índice enzimático maior que 2,0 para serem considerados promissores para produção de enzimas em larga escala, a pesquisa possibilitou a descoberta de fungos endofíticos que produzem protease e amilase, mesmo que em pouca quantidade, portanto, possuem potencial biotecnológico para produção de compostos bioativos, sendo assim, pode abrir portas para que novos testes em diferentes condições de cultivo, substratos e com novas metodologias sejam realizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-WARETH, M. T. A.; ALI, E. A. M.; EL-SHAZLY, M. A. Biological Activity and GC-MS/MS Analysis of Extracts of Endophytic Fungi Isolated from *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. **Journal of Applied Biotechnology Reports**, v. 10, n. 1, p. 895-909, 2023.
- ALMEIDA, T. T. **Potencial biorremediador do fungo endofítico *Mucor* sp. Isolado da macrófita aquática *Eichhornia crassipes* (Mart.)**. Tese de doutorado. Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, 2018.
- ALMEIDA, T. T. *et al.* Molecular characterization of the endophytic fungal community associated with *Eichhornia azurea* (Kunth) and *Eichhornia crassipes* (Mart.) (Pontederiaceae) native to the Upper Paraná River floodplain, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 2, p. 4920-4931, 2015.
- ALVES, C. S. *et al.* Seleção de fungos endofíticos produtores de lipase. In: **Micologia [recurso eletrônico]: fungos e/ou metabólitos como objeto de estudo**/ Organizador: Neto, B. R. da S. Capítulo 17. Ponta Grossa, PR: Atena, 2020.
- 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.
- ARAÚJO, W. L. *et al.* Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian journal of microbiology**, v. 47, n. 3, p. 229-236, 2001.
- AUSTRÍACO, P. D. **Avaliação do potencial de produção de enzimas extracelulares por fungos endofíticos do babaçu**. Monografia (Graduação em Química) – Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Marabá (PA), 2022.
- AYANDA, O. I.; AJAYI, T.; ASUWAJU, F. P. *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms: Uses, challenges, threats, and prospects. **The Scientific World Journal**, v. 2020, n. 1, p. 3452172, 2020.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA, p. 117-137, 1998.
- AZEVEDO, J. L. *et al.* Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic journal of biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 15-16, 2000.
- AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. (Eds.) **Fungi: multifaceted microbes**. CRC Press, Boca Raton. p. 189-207, 2007.
- BALASHEV, K. *et al.* Novel methods for studying lipids and lipases and their mutual interaction at interfaces: Part I. **Atomic force microscopy Biochimie**, 2001.
- BARRETT, S.C.H. Evolution of breeding systems in *Eichhornia* (Pontederiaceae): a review. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 741-760, 1988.

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.

BASHA, J. *et al.* Analysis of Endophytic Fungal Extracts of Therapeutically important Hydrophytes for different Chemical Compounds. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 12, n. 10, p. 5004-5006, 2019.

BEZERRA, V. H. S. Produção de proteases por fungos endofíticos: uma revisão sistemática. il. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) — Universidade de Brasília, Brasília, 2021.

BILLS, G. *et al.* Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi. In: WATLING, R.; FRANKLAND, J.C.; AINSWORTH, A.M.; ISAAC, S. & ROBINSON, C.H. **Tropical Mycology: Micromycetes**, New York, p. 165-194, 2002.

BON, E. P. S.; PEREIRA Jr., N. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro: E.P.S. Bon. p. 110, 1999.

CALDERANI, F. A.; ORLANDELLI, R. C.; PAMPHILE, J. A. Compostos bioativos com propriedades antitumorais produzidos por fungos endofíticos. **Uningá Review**, v. 25, n. 2, 2016.

CANUTO, K. M. *et al.* **Fungos endofíticos: perspectiva de descoberta e aplicação de compostos bioativos na agricultura**. Embrapa, ISSN 2179-8184. 2012.

CARNEIRO, E. A. **Imobilização de lipase de Candida antarctica tipo B em Toyopearl**. Orientador: SANT'ANA, H. B. de. 2007. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia. Depto. de Engenharia Química, Fortaleza, 2007.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **J Trop Med Hyg.**;24:270-6, 1939.

CORNELIS, P. Microbial amylases. **Microbiological Sciences**, v. 4, n. 11, p. 342-343, 1987.

COSTA, J. S. da. **Relatório de situação bacia hidrográfica do Tarumã-açu** [livro eletrônico]: transformações antrópicas e qualidade da água. 1. ed. Manaus, AM: ed. do autor, 2010.

COSTA, E. B.; DA SILVA, C. L.; DA SILVA, M. L. Caracterização física de bacias hidrográficas na região de Manaus-AM1. **Caminhos de Geografia** [online]. v. 14, n. 46, p. 93-100, 2013.

DAMASCENO, S. B.; SOARES, D. A. S. Valoração dos atributos ambientais da bacia hidrográfica do Tarumã-Açu no município de Manaus, AM. **Planejamento e gestão das bacias hidrográficas brasileiras**. Goiânia: CEGRAF/UFG, p. 150-167, 2022.

DE HOOG, G.S. *et al.* Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* species. *Med. Mycol.* 42: 405-416, 2004.

DIOGO, H. C.; SARPIERI, A.; PIRES, M. C. Preservação de fungos em água destilada. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 80, p. 591-594, 2005.

FANANI, A. Z.; TRIASTUTI, J.; SULMARTIWI, L. Identification and antimicrobial activity test of endophytic fungi from water hyacinth petiole (*Eichhornia crassipes*) against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2021. p

FERRARA, M. A. Fungos Endofíticos. Potencial para a Produção de Substâncias Bioativas. **Rev Fitos** [Internet]. v. 2 n. 01, p. 73-79, 2006. Disponível em: <<https://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/43>>. Acesso em: 10 Jul. de 2023.

FERREIRA, F. S. **Biossurfactantes de fungos endofíticos isolados de *Gustavia cf. hexapetala* (Alb.) Sm. (Lencythidaceae) na Amazônia, contra patógenos da cavidade oral**. Tese de doutorado. Universidade Federal do Amazonas, 2020.

FERREIRA, I. S. *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, p. 132-141, 2021.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Food Microbiology**. 4 ed. p. 390-397. New York: McGraw-Hill International Edition, 1988.

GONÇALVES, B.; BASTOS, E.; HANNA, S. Prospecção tecnológica de fungos endófitos e aplicações na indústria farmacêutica. **Cadernos de Prospecção**, v. 10, n. 1, p. 56-67, 2017.

GONÇALVES, F. J. T.; FREIRE, F. C. O; LIMA, J. S. Fungos endofíticos e seu potencial como produtores de compostos bioativos. **Essentia**, Sobral, v. 15, n. 1, p. 71-92, jun./nov. 2013.

GOVINDAN, V.; GUNASEKARAN, A. Endophytes fungi associated with a Water hyacinth of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. **Int. J. Sci. Res. in Biological Sciences Vol**, v. 7, n. 3, 2020.

GUPTA, R. *et al.* Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochem**. 38: 1599-1616, 2003.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications. **Appl Biochem Biotechnol** .v. 118, p.155–170, 2004.

JACYNTHO, P. G. F.; NUNEZ, C. V. Isolamento e Identificação de Fungos Endofíticos de *Carapa Guianensis* e *Duroia Macrophylla*. In: **II Congresso de Iniciação Científica PIBIC/CNPq-PAIC/FAPEAM**. 2013.

JAEGER, K.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.

KIDD, S. *et al.* **Descriptions of medical fungi**. 3 ed. ISBN: 9780646951294. Australia, 2016.

KUSARI, S.; ZÜHLKE, S.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 1, p. 2-7, 2009.

LACAIVA, P. T; SEBASTIANES, F. L de S. Fungos endofíticos: biodiversidade e aplicações biotecnológicas. In: **Fungos: uma introdução à biologia, biologia, bioquímica e biotecnologia**/ ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. 2. ed. Revisada e ampliada. Caxias do Sul: Educs, 2010.

LI, Q.; YI, L.; MAREK, P.; IVERSON, B. L. Commercial proteases: present and future. **FEBS letters**, v. 587, n. 8, p. 1155-1163, 2013.

LIMA, J. M. *et al.* Fungos produtores de enzimas associados à macrófitas aquáticas do rio Negro, Manaus. **Biota Amazônia** ISSN 2179-5746. Macapá, v. 10, n. 3, p. 52-57, 2020. Disponível em <<http://periodicos.unifap.br/index.php/biota>> Acesso em: 11.10.2024.

LOPES, A. *et al.* Conhecendo as macrófitas aquáticas da Amazônia. Capítulo em: **Conhecendo as áreas úmidas amazônicas: uma viagem pelas várzeas e igapós**/ LOPES, A; PIEDADE, M. T. F. Editora INPA, ISBN: 978-85-211-0135-2, 2015.

LOOSLI, A. W. M. *et al.* Atividade antagonística in vitro de fungos endofíticos isolados de duas macrófitas aquáticas contra fitopatógenos. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 17, n. 2, p. e11072-e11072, 2024.

LUZ, J. S. *et al.* Atividade enzimática de fungos endofíticos e efeito na promoção do crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo. Universidade Federal Rural do Semi-Árido Mossoró. **Revista Caatinga**, v. 19, n. 2, p. 128-134 abril-junho, 2006.

MARTINS, R. A. **Morfocaracterização de fungos endofíticos isolados de *Gustavia cf. hexapétala* na Amazônia e seu potencial para produção de enzimas industrialmente relevantes**. 2024. Tese de Doutorado. Universidade do Estado do Amazonas.

MATASYOH, J. C. *et al.* Larvicidal activity of metabolites from the endophytic *Podosporas* against the malaria vector *Anopheles gambiae*. **Parasitology Research**, v.108, n. 3, p.561 –566, 2011.

MENDES, R.; AZEVEDO, J. L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: **Anais do 5º Congresso Brasileiro de Micologia**, p. 129-140, 2007.

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. 1498-510, 2020.

NASCIMENTO, C. S.; DOS SANTOS, V. L.; ANDRADE, M.H.C. Análise da produção de protease e lipase por fungos filamentosos isolados do fruto da macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq) Lood. ex Mart). **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 336-343, 2014.

OLIVEIRA, J. *et al.* Fungos, diversidade e prospecção no Brasil: Um recurso pouco explorado?. **Metodologias e Aprendizado**, [S. l.], v. 4, p. 149–163, 2021. DOI: 10.21166/metapre.v4i.1959. Disponível em: <https://publicacoes.ifc.edu.br/index.php/metapre/article/view/1959>. Acesso em: 21 jul. 2023.

OLIVEIRA, R. da S. *et al.* Compostos bioativos naturais: agentes promissores na redução do estresse oxidativo e processos inflamatórios. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 5, n. 2, 2018. Recuperado de <https://periodicos.ufac.br/index.php/SAJEBTT/article/view/1643>

ORLANDELLI, R. C. *et al.* Produção da enzima protease por fungos endofíticos isolados da planta medicinal Piper hispidum Sw., Anais Eletrônico VII EPCC – **Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar CESUMAR** – Centro Universitário de Maringá. Editora CESUMAR Maringá – Paraná – Brasil 2011.

ORLANDELLI, R. C. *et al.* Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v.7, n.3, p.97-109, set.-dez., 2012.

PARDO, S. N. F. *et al.* Avaliação do potencial biotecnológico de fungos endofíticos. **Braz J Dev**, v. 8, n. 5, p. 33120-40, 2022.

PEREIRA, O. L. **Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos de sete espécies de orquídeas neotropicais**. Orientador (a): KASUYA, M. C. M. Tese (mestrado)-Universidade Federal de Viçosa. Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, 2001.

PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. *In*: ANDREWS, J.; HIRANO, S. S. (Eds). **Microbial Ecology of Leaves New York**. Springer Verlag. p.179-197, 1991.

PINHEIRO, J. B. *et al.* Atividade larvicida de fungos endofíticos: uma revisão. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, p. 35761-35774, 2020.

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

POTT, V. J.; POTT, A. **Plantas aquáticas do pantanal**. Embrapa, Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal (Corumbá, MS). – Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000.

QUEIROZ, C.; DE SOUSA, A. C. B.. Produção de enzimas hidrolíticas por fungos filamentosos em diferentes substratos sólidos. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 51849-51860, 2020.

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

RAJAGOPAL, K. *et al.* Mycodiversity and biotechnological potential of endophytic fungi isolated from hydrophytes. **Cur Res Environ Appl Mycol**, v. 8, n. 2, p. 172-82, 2018.

REJMÁNKOVÁ, E. The role of macrophytes in wetland ecosystems. *Journal of Ecology and Field Biology*. v. 34, n. 4, p. 333-345, 2011.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. *Food Science and Technology*, v. 30, p. 126-131, 2010.

SAMSON, R. A. *et al.* Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in mycology*, v. 78, n. 1, p. 141-173, 2014.

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

SANTOS, T. T; VARAVALLO, M. A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v. 32, n. 2, p. 199-212, jul./dez. 2011.

SCREMIN-DIAS. E. *et al.* **Nos jardins submersos da Bodoquena / guia para identificação de plantas aquáticas de Bonito e região**. Campo Grande, MS: Ed. UFMS, 1999.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases, *Biotechnology Advances*, v. 19, Issue 8, p. 627-662. ISSN 0734-9750, 2001.

SILVA, M. S., **Atividade enzimática extracelular de leveduras isoladas da fermentação do cacau**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana, p. 82, 2011.

SPECIAN, V. *et al.* Metabólitos secundários de interesse farmacêutico produzidos por fungos endofíticos. *Journal of Health Sciences*, v. 16, n. 4, 2014

SPIER, M. R. **Produção de Enzimas Amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidade por Fermentação No**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, 2005.

SOUZA, H. Q. de; OLIVEIRA, L. A. de; 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.

SOUZA, R.D.N. *et al.* Atividade Enzimática em fungos endofíticos isolados seletivamente de *Eichhornia crassipes* coletada em área portuária de Manaus-AM. In: OLIVEIRA, L.A.; FERNANDES, O.C.; JESUS, M.A.; BENTES, J.L.S.; ANDRADE, S.L.; SOUZA, A.Q.L.; SANTOS, C. (Org.). **Diversidade microbiana da Amazônia**. 1. ed. Manaus: INPA, 2016, v. 1, p. 227-233.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 6ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2017.

VISAGIE, C. M. *et al.* Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Stud. Mycol.* 78: 343-371, 2014.

WARD, O. P. Proteases. **Comprehensive Biotechnology**. doi: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00222-1. p. 571–82, Epub, 2011.

WEAVER, J. E.; CLEMENTS, F. E. **Plant Ecology**. 2. ed. McGraw-Hill, New York. 1938.

XAVIER, J. *et al.* Macrófitas aquáticas. **Caracterização e importância em reservatórios hidrelétricos. Cemig. 96p**, 2021.

XIAO, X. *et al.* Additions to the Genus *Helicosporium* (Tubeufiaceae, Tubeufiales) from China with an Identification Key for *Helicosporium* Taxa. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 7, p. 775, 2023.