

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
CENTRO DE ESTUDOS SUPERIORES DE TABATINGA
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANDRÉ ANTÔNIO BATISTA GOMEZ

BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS AO BIRIBÁ
(*Rollinia mucosa* Jacq.) E DESCRIÇÃO DO SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO.

TABATINGA-AM

2024

ANDRÉ ANTÔNIO BATISTA GOMEZ

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS AO BIRIBÁ
(*Rollinia mucosa* Jacq.) E DESCRIÇÃO DO SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO.**

**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro de Estudos
Superiores de Tabatinga - Universidade do
Estado do Amazonas como requisito parcial
para obtenção do título de Licenciado em
Ciências Biológicas.**

**Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cristiane Suely
Melo de Carvalho**

**TABATINGA-AM
2024**



GOVERNO DO ESTADO DO AMAZONAS
CENTRO DE ESTUDOS SUPERIORES DE TABATINGA
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE APRESENTAÇÃO E DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

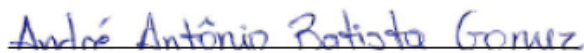
ANDRÉ ANTÔNIO BATISTA GOMEZ

BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS AO BIRIBÁ (*Rollinia mucosa* Jacq.) E DESCRIÇÃO DO SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

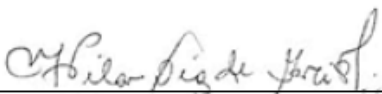
No primeiro (01) dia do mês de março de dois mil e vinte e quatro, o aluno acima citado foi avaliado pela Comissão de Avaliação composta por Dra. Cristiane Suely Melo de Carvalho - Presidente, Dra. Maria Del Pilar Diaz de Garcia – Membro e Ma. Marcella Pereira da Cunha Campos – Membro.

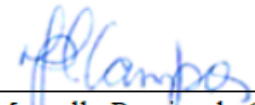
Aprovado ao 01 dia de março de 2024

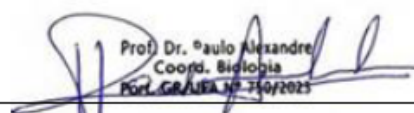
TIPO DE AVALIAÇÃO	NOTA DOS AVALIADORES			MÉDIAS
	1º Avaliador	2º Avaliador	3º Avaliador	
ESCRITA	10	10	10	10,0
ORAL	10	10	10	10,0
NOTA FINAL (MÉDIA FINAL)				10,0


André Antônio Batista Gomez
Aluno


Dra. Cristiane Suely Melo de Carvalho
1ª Avaliadora


Dra. Maria Del Pilar Diaz de Garcia
2ª Avaliadora


Ma. Marcella Pereira da Cunha Campos
3ª Avaliadora


Prof. Dr. Paulo Alexandre
Coord. Biologia
Port. GRA/UEA Nº 710/2023
Dr. Paulo Alexandre Lima Santiago
Coordenador do Curso de Ciências Biológicas

Dedico à minha mãe, Vanderle dos Santos,
minha inspiração de coragem e persistência.
Obrigado por tanto.

AGRADECIMENTOS

À orientação da Professora. Dra. Cristiane Suely Melo de Carvalho que durante todos esses anos de vida acadêmica nos deu liberdade para que nossas mentes pudessem fluir e construir nossos trabalhos da melhor forma possível.

Aos meus amigos da Universidade, Gabrielle Sena, Cristóvão Gassa, Douglas Lopes, Polyana Souza e Ingrid Christyne, que foram essenciais, de forma direta e indireta, para que este trabalho fosse concluído. Nossas interações podem parecer excessivamente exaltadas para outras pessoas, mas formamos uma família que excedeu apenas em ser o amparo de uns aos outros, deixando tudo mais leve. Vocês são os melhores.

À minha mãe, Vanderle dos Santos, a pessoa mais importante neste processo, sua força incomparável me deu incentivo para nunca desistir. Todos os dias procuro retribuir o tempo e esforço investidos em mim, espero que, a partir de agora, consiga ainda mais. Amo você.

Aos meus irmãos, Flávia Alessandra e Luís Eduardo, e meu pai, Luís Antônio, pois posso sentir suas torcidas por mim, mesmo que de longe. Amo vocês.

As minhas amigas de longa data Dunia Castro, Andreia Santos e Mônica Andreia, mesmo que o tempo e as diferentes realidades tenham nos afastado, as lembranças de nossos crescimentos juntos sempre estarão presentes.

As minhas queridas amigas Keylly Evellyn e Jaqueline Valim, companheiras de trabalho inesquecíveis, que me fizeram enxergar o grande potencial que possuo e que por anos eu negava, e acreditar que posso alcançar tudo o que eu quiser, me libertando de muitas inseguranças.

À Professora Dra. Maria Del Pillar e seus incríveis conhecimentos botânicos que me trouxeram esclarecimentos importantíssimos na realização desta pesquisa.

À Secretaria Municipal de Saúde de Tabatinga, em especial o Sr. Janderson Felix, que nunca causou empecilhos nos momentos em que era necessário me ausentar do trabalho para que pudesse focar nos meus estudos.

A UFAM-INC Benjamin Constant que disponibilizou o laboratório e seus equipamentos para que as análises deste trabalho pudessem ser realizadas.

Ao Centro de Estudos Superiores de Tabatinga, em especial a todos os professores com quem pude aprender tanto. A jornada foi longa, mas infinitamente enriquecedora.

“Alguns infinitos são maiores que outros [...] Há dias, muitos deles,
em que fico zangada com o tamanho do meu conjunto ilimitado.
Eu queria mais números do que provavelmente vou ter.”

John Green

RESUMO

GOMEZ, André Antônio Batista. Bioprospecção de fungos endofíticos associados ao biribá (*Rollinia mucosa* Jacq.) e descrição do seu potencial biotecnológico. 2024. 47-f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Universidade do Estado do Amazonas, Tabatinga, 2024.

Fungos endofíticos representam uma vasta diversidade de espécies que residem em várias plantas e são de grande interesse na busca por novos compostos com variabilidade química e biológica. Sua capacidade de colonizar ambientes com interações metabólicas constantes os torna candidatos promissores na produção de enzimas com potencial aplicação biotecnológica. Nesse contexto, o presente estudo isolou linhagens de fungos endofíticos a partir de amostras de folhas, inflorescência, caules e sementes de plantas da espécie *Rollinia mucosa* (Jacq.) e, após a etapa de seleção de linhagens, observou-se o crescimento de fungos filamentosos isolados em meio de cultura dos gêneros *Trichoderma* e *Fusarium*. Os resultados das pesquisas, baseadas na literatura, das atividades enzimáticas Lipolíticas, Proteolíticas, Quitinolíticas e Celulolíticas, para estes gêneros de endofíticos, demonstraram alta variabilidade de usos em pesquisas, com ênfase no controle biológico de fitopatógenos por *Trichoderma* sp. Em conclusão, os resultados da revisão microbiológica e bioquímica mostram que os fungos endofítico *Trichoderma* e *Fusarium* isolado de *R. mucosa* apresentam potencial em termos de produção de metabólicos de interesse industrial e/ou biotecnológico.

Palavras-chave: Fungo endofítico; Enzimas; *Rollinia mucosa*; *Trichoderma*; *Fusarium*.

RESUMEN

GOMEZ, André Antônio Batista. Bioprospección de hongos endófitos asociados a biribá (*Rollinia mucosa* Jacq.) y descripción de su potencial biotecnológico. 2024. 47-f. Proyecto final de curso (Grado en Ciencias Biológicas) – Universidad Estadual de Amazonas, Tabatinga, 2024.

Los hongos endofíticos representan una gran diversidad de especies que residen en diversas plantas y son de gran interés en la búsqueda de nuevos compuestos con variabilidad química y biológica. Su capacidad para colonizar ambientes con constantes interacciones metabólicas los convierte en candidatos prometedores para la producción de enzimas con potencial aplicación biotecnológica. En este contexto, el presente estudio aisló cepas de hongos endófitos a partir de muestras de hojas, inflorescencias, tallos y semillas de plantas de la especie *Rollinia mucosa* (Jacq.) y, luego de la etapa de selección de cepas, se observó el crecimiento de células filamentosas aisladas de medios de cultivo de los géneros *Trichoderma* y *Fusarium*. Los resultados de las investigaciones sobre las actividades enzimáticas lipolíticas, proteolíticas, quitinolíticas y celulolíticas, para estos géneros endofíticos, demostraron alta variabilidad de usos en las investigaciones, con énfasis en el control biológico de fitopatógenos por *Trichoderma* sp. En conclusión, los resultados microbiológicos y químicos obtenidos muestran que los hongos endófitos *Trichoderma* y *Fusarium* aislados de *R. mucosa* tienen potencial en términos de producción metabólica de interés industrial y/o biotecnológico.

Palabras clave: Hongo endofítico; Enzimas; *Rollinia mucosa*; *Trichoderma*; *Fusarium*.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Tecidos vegetais da espécie *Rollinia mucosa* Jacq. utilizados para extração dos fragmentos para isolamento dos endofíticos. (A) folhas e caule, (B) inflorescências e (C) sementes. ----- 28
- FIGURA 02** – Plaqueamento em superfície de fragmentos da *Rollinia mucosa* Jacq ----- 30
- FIGURA 03** – Plaqueamento em superfície para obtenção dos isolados (purificação) 31
- FIGURA 04** – Placas-mãe da folha e inflorescência de *R. mucosa*. Placas de Petri contendo meio de cultura BDA onde dispôs-se de 4 a 5 fragmentos de mesmo tamanho por placa----- 33
- FIGURA 05** – Placas-mãe do caule e semente de *R. mucosa*. Placas de Petri contendo meio de cultura BDA onde dispôs-se de 4 a 5 fragmentos de mesmo tamanho por placa.----- 34
- FIGURA 06** – Isolados de fungos endofíticos de *Rollinia mucosa* Jacq. (purificação) ----- 35

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Meios de cultura para o isolamento de fungos filamentosos de plantas da Amazônia.-----	29
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – Atividade enzimática dos fungos endofíticos do biribá (*Rollinia mucosa* Jacq.)

----- 37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA - Batata dextrose ágar

Jacq. - Nikolaus Joseph von Jacquin

R. mucosa - *Rollinia mucosa*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Geral	15
2.2 Específicos	15
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3.1 Fungos.....	16
3.2 Fungos Endofíticos	18
3.3 Biotecnologia	19
3.4 Bioprospecção de Microrganismos Endofíticos em Plantas.....	20
3.5 Família Annonaceae e espécie <i>Rollinia mucosa</i> Jacq.....	21
3.5.1 Caracterização da Folha da <i>Rollinia mucosa</i> Jacq.....	23
3.5.2 Caracterização da Inflorescência da <i>Rollinia mucosa</i> Jacq.....	23
3.5.3 Caracterização do Fruto da <i>Rollinia mucosa</i> Jacq.....	23
3.5.4 Caracterização da Semente da <i>Rollinia mucosa</i> Jacq.....	24
3.6 Metabolitos produzidos por endofíticos de plantas	24
3.7 Principais espécies de endofíticos e sua importância.....	26
4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	28
4.1 Coleta do material botânico	28
4.2 Desinfecção do material botânico.....	29
4.3 Isolamento de endófitos de <i>Rollinia mucosa</i> Jacq.....	29
4.3.1 Plaqueamento com fragmentos da <i>Rollinia mucosa</i> Jacq.....	30
4.4 Avaliação das Colônias.....	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	33
5.1 Isolamento e seleção dos fungos endofíticos	33
5.2 Crescimento em meio de cultura	33
5.3 Análise enzimática	36
5.4 Potencial uso dos fungos isolados para a biotecnologia	38
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

Ao serem desenvolvidos estudos relacionados a plantas da Amazônia, muitos benefícios à saúde dos seres humanos são desvendados demonstrando a riqueza que essa região possui, tanto para a vida dos seres humanos quanto para todo o ecossistema do planeta. Um dos aspectos altamente instigante correlacionado a estas espécies é sua capacidade de reservar uma alta variedade de microrganismos que, devido ao ambiente restrito de seus tecidos, pode levar a descoberta de grandes potenciais para produção de moléculas bioativas, proteínas e enzimas que tem grande importância na aplicação de processos biotecnológicos e industriais (Cunha Junior *et al.*, 2020).

A área biotecnológica tem ganhado grande visibilidade com o desenvolvimento de técnicas voltadas para o aproveitamento integral de plantas. Uma dessas técnicas é o isolamento de microrganismos endofíticos que podem promover a expansão de conhecimentos sobre a biodiversidade da microbiota de diferentes espécies de plantas e revelar novas formas de utilização dessas espécies como matéria prima para bioprodução, proporcionando, assim, fortalecimento de políticas de defesa a biodiversidade desse ecossistema, contribuindo para sua conservação, sustentabilidade e melhorar o aproveitamento dessas espécies vegetais, não apenas pela população das regiões onde são encontradas, mas também por toda a população brasileira (Souza; Santos, 2017). São estudadas diversas funções relacionadas aos microrganismos endofíticos, principalmente para estudos voltados à indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos, enzimas de interesse biotecnológico, controle biológico de pragas-insetos na agricultura, dentre outras (Astolfi Filho; Silva; Bigi, 2015).

Porém, ao observar a lacuna que ainda permanece nas pesquisas que abrangem as formas como são utilizadas as plantas da região amazônica, a fim de gerar a busca do desenvolvimento socioeconômico para as atividades extrativistas na região, bem como estudos voltados para preservar o bioma da Amazônia, notou-se a viabilidade de elaborar um projeto de pesquisa com ênfase no levantamento da diversidade de espécies vegetais com potencial importância ambiental e econômica. Portanto, serão vistos como objetivos desta pesquisa a busca por representar a qualidade e variabilidade do uso de espécimes vegetais pouco estudados da região amazônica com ênfase nos microrganismos endofíticos que vivem associados a estes e descrever seu potencial para produção de enzimas aplicadas no desenvolvimento de produtos dos mais diversos setores industriais buscando aprimorar e expandir o uso de fontes de energias renováveis que causem menos impacto ao meio ambiente.

Se faz necessário dar atenção as análises microbiológicas e bioquímicas de plantas da região amazônica, pretendendo apontar as possibilidades da utilização de microrganismos endofíticos associados a estas espécies buscando mostrar como este tipo de estudo pode ser aplicado nas áreas de inovação tecnológica associada à responsabilidade social e ambiental, como a biotecnologia.

Com o levantamento bibliográfico referente a utilização biotecnológica de microrganismos endofíticos das espécies de plantas amazônicas, como o Biribá (*Rollinia mucosa* Jacq.), foi evidenciada a carência de informações sobre estes microrganismos e o potencial de produção de enzimas microbianas e suas características bioquímicas. Diante disso, foram aplicados métodos para avaliar a diversidade de microrganismos endofíticos (fungos) isolados a partir de fragmentos de tecidos vegetais da planta da espécie *Rollinia mucosa* Jacq., cultivados no município de Tabatinga-AM, buscando descrever as eventuais atividades enzimáticas e bioquímicas observadas na literatura, para assim despertar a atenção quanto às formas de exploração das plantas da Amazônia e, principalmente, acrescentar informações que evidenciam a importância de se preservar este rico ecossistema com imensa importância para o planeta.

Este trabalho está dividido em seis partes. Inicialmente, a introdução apresenta considerações iniciais sobre o tema. Em seguida, são delineados os objetivos, delimitando o escopo do estudo. Posteriormente, é realizada uma revisão da literatura para aprofundar nos conhecimentos necessários para o desenvolvimento do trabalho. A metodologia aplicada no estudo é então apresentada. O tópico cinco expõe os resultados de forma didática, destacando comparações e análises, enquanto o capítulo seis oferece considerações finais sobre os resultados e a contribuição do trabalho para o meio científico-acadêmico e social.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o potencial biotecnológico de microrganismos endofíticos (fungos) isolados da planta da espécie *Rollinia mucosa* (Jacq.), cultivados em Tabatinga-AM, descrevendo as eventuais atividades enzimáticas dos gêneros isolados observadas na literatura.

2.2 Específicos

- Identificar os fungos endofíticos isolados a nível de gênero a partir de fragmentos de sementes, inflorescências, folhas e caules da planta da espécie *Rollinia mucosa* (Jacq.), utilizando técnicas para análise macromorfológica;
- Descrever as atividades enzimáticas e características bioquímicas dos fungos endofíticos baseados na literatura;
- Inferir o potencial uso da espécie botânica *Rollinia mucosa* (Jacq.) para pesquisas em biotecnologia.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Fungos

Os fungos fazem parte de um grupo de microrganismos eucarióticos inseridos no Reino Fungi (Domínio Eukarya). Estes existem em toda a natureza, tanto no solo, no ar, na água, quanto na poeira doméstica e agrícola, nas plantas, nos troncos apodrecidos, nas frutas, no leite, no plâncton e diversos outros locais (Madigan, 2016). Os fungos desempenham um papel crucial no ciclo da vida, exercendo diversas funções benéficas em setores como a indústria de medicamentos, alimentos, bebidas e química. No entanto, é importante destacar que alguns fungos podem agir como patógenos, causando doenças em plantas, animais ou até mesmo no ser humano (Barbieri; Carvalho, 2001).

Os fungos apresentam uma diversidade de formas, podendo ser unicelulares ou multicelulares. Predominantemente saprófitos, esses organismos realizam reprodução tanto sexuada quanto assexuada. Os fungos microscópicos, em particular, são aclorofilados, não contendo pigmentos fotossintéticos (Frezza, 2010). Embora sejam capazes de absorver energia luminosa para a síntese de compostos orgânicos, sua característica heterotrófica se manifesta na utilização da energia presente nas ligações químicas dos nutrientes (Trabulsi, 2004).

Os fungos exibem estruturas morfológicas compostas por filamentos, conhecidos como hifas, e esporos, que desempenham papel crucial na reprodução. O corpo principal de um fungo é denominado talo. Sua classificação é fundamentada na estrutura de reprodução resultante dos processos sexuais e assexuais. Notavelmente, as técnicas de biologia molecular têm proporcionado uma classificação mais precisa dos fungos, mesmo na ausência de estruturas reprodutivas visíveis (Mezzari; Fuentesfria, 2012).

Para a identificação dos fungos, as estruturas morfológicas, tanto macroscópicas quanto microscópicas quando observadas no microscópio óptico, permitem classificá-los em dois grupos principais: leveduras e bolores, ou fungos filamentosos. As leveduras são morfológicamente definidas como células que se reproduzem por brotamento, cissiparidade ou gemulação (Trabulsi, 2004). Geralmente unicelulares, essas células formam colônias circulares, pastosas ou mucoides. Os bolores, ou fungos filamentosos, são multicelulares e constituídos por hifas que se interligam, formando o micélio. Esse micélio resulta em colônias filamentosas, que podem ter aspecto alongado, aveludado ou pulverulento, apresentando pigmentação variada, como branca, bege, marrom, vinhosa, entre outras. Algumas espécies de fungos possuem melanina na parede celular, conferindo resistência aos raios ultravioleta e às

enzimas líticas produzidas por outros microrganismos. Esses fungos são denominados demáceos (Takahashi, 2016).

A classificação dos fungos é essencialmente fundamentada em critérios morfológicos, reprodutivos e fisiológicos, agrupando-os de acordo com características comuns em níveis taxonômicos distintos. Os principais grupos taxonômicos incluem *Chytridiomycetes*, *Zygomycetes*, *Glomeromycetes*, *Ascomycetes* e *Basidiomycetes* (Madigan, 2016). Essa abordagem visa fornecer uma organização sistemática que reflete as relações evolutivas e as peculiaridades fundamentais desses organismos no reino Fungi.

Diversos estudos têm abordado a estimativa do número de espécies fúngicas conhecidas, refletindo a complexidade e diversidade desse reino. De acordo com Mueller e Schmit (2007), as estimativas globais para o número total de espécies fúngicas variam amplamente, situando-se entre 0,5 a 9,9 milhões. Essas estimativas foram obtidas em estudos conduzidos no período de 1990 a 2006.

No contexto brasileiro, o "Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil" registrou, até o ano de 2010, a descrição de 3.608 espécies fúngicas, das quais 519 foram identificadas na região da Amazônia (Forzza *et al.*, 2010). Esses números indicam a riqueza fúngica no país, destacando a importância da biodiversidade, especialmente em regiões ecologicamente diversas como a Amazônia.

Conforme apontado por Barbieri e Carvalho (2001), aproximadamente dois terços do total de espécies de fungos descritas estabelecem relações íntimas, que podem ser parasíticas, comensalísticas ou mutualísticas, com outros organismos vivos. Dentre essas interações, destaca-se um significativo número de espécies que mantêm associações com plantas. Segundo Rodriguez *et al.* (2009), acredita-se que todas as espécies de plantas que habitam ecossistemas naturais estabeleçam algum tipo de associação simbiótica com fungos.

Essas simbioses podem manifestar-se em diferentes formas, com os fungos podendo ser encontrados nas superfícies vegetais (epifíticos), na rizosfera (região do solo influenciada pelas raízes das plantas) ou mesmo no interior dos tecidos vegetais (endofíticos). Essas interações simbióticas desempenham papéis cruciais na saúde e no desenvolvimento das plantas, contribuindo para a absorção de nutrientes, resistência a patógenos e adaptação a condições ambientais adversas. A compreensão dessas relações simbióticas entre fungos e plantas é fundamental para avanços na agricultura, na ecologia e na compreensão dos ecossistemas naturais (Silva; Malta, 2016).

3.2 Fungos Endofíticos

O termo "endófito" foi introduzido pelo cientista alemão Heinrich Anton de Bary em 1884. Ele é utilizado para descrever microrganismos que residem no interior dos tecidos de plantas. Em uma visão mais abrangente, os fungos endofíticos são caracterizados por viverem pelo menos parte do seu ciclo de vida no interior dos tecidos das plantas hospedeiras, sem causar sintomas patológicos. Essa interação interespecífica oferece um nicho propício para o desenvolvimento e estabelecimento dos fungos nas plantas, conforme destacado por Wilson (1995), Carlile *et al.* (2001) e Azevedo (2010). Esses fungos endofíticos desempenham um papel significativo em diversos aspectos, como na promoção do crescimento das plantas, na resistência a estresses ambientais e na proteção contra patógenos.

Os fungos endofíticos constituem um grupo polifilético altamente diversificado, sendo definidos funcionalmente pela sua ocorrência assintomática nos tecidos de plantas. Eles são encontrados em uma ampla gama de plantas, abrangendo antóceros, briófitas, pteridófitas, gimnospermas e angiospermas. A distribuição desses fungos é extensa, indo desde regiões árticas até os trópicos. Sua presença é notável em diversas espécies de plantas, sendo os ascomicetos, em especial, uma categoria significativa dentro desse grupo (Arnold, 2007; Arnold; Lutzoni, 2007). Muitas espécies de fungos endofíticos desempenham um papel crucial em plantas de importância agrícola (Larran *et al.*, 2002). Essa diversidade e ampla distribuição destacam a relevância dos fungos endofíticos em ecossistemas variados e ressaltam seu potencial impacto na saúde e no desenvolvimento das plantas hospedeiras.

Em quase todas as plantas vasculares, algas marinhas, musgos e samambaias estudadas até o momento, foram identificadas bactérias e fungos endofíticos. É comum isolar centenas de espécies de endófitos a partir de uma única planta, sendo que pelo menos uma delas é específica para o hospedeiro (Chapla, 2013). Essa ampla distribuição e a diversidade de fungos endofíticos ressaltam a importância ecológica desse grupo na interação com uma variedade de plantas e ambientes ao redor do mundo.

Além dessas funções, as enzimas extracelulares desempenham um papel fundamental na obtenção de nutrientes, desempenhando um papel funcional essencial na relação dos fungos com as plantas e o ambiente circundante (Diniz *et al.*, 2020). Essa complexa rede de interações entre fungos endofíticos, plantas e o ambiente destaca a importância desses microrganismos na promoção da saúde e no desenvolvimento sustentável das plantas hospedeiras.

Muitas espécies vegetais já possuem suas comunidades endofíticas isoladas e caracterizadas, tais como: *Citrus* sp. (Araújo *et al.*, 2001); *Triticum aestivum* (Larran *et al.*,

2002); *Dicksonia sellowiana* (Barros., 2003); *Palicourea longiflora* e *Strychnos cogens* (Souza *et al.*, 2004); *Bactris gasipaes* (Almeida *et al.*, 2005); *Glycine max* (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2005); *Citrus limon* (Durán *et al.*, 2005). Estima-se a ocorrência de cerca de 1,5 milhões de espécies endofíticas, sendo que deste total, 10% foram descobertas e apenas 1% examinada quanto ao seu espectro de produção de metabólitos secundários (Guo *et al.*, 2008).

3.3 Biotecnologia

A biotecnologia engloba qualquer técnica que faça uso de organismos vivos ou de seus derivados para criar ou modificar produtos, conhecidos como bioprodutos ou biocompostos. Essa abordagem abrange uma ampla gama de aplicações, desde melhoramento vegetal até o desenvolvimento de microrganismos para fins específicos (Azevedo, 1997). Dessa forma, a biotecnologia inclui desde técnicas simples, como a produção de pães utilizando leveduras (fermento biológico), até tecnologias avançadas como o DNA recombinante, que envolve a manipulação do material genético de seres vivos para expressar características desejáveis (Chekol; Gebreyohannes, 2018). Essa diversidade de aplicações destaca a versatilidade e o potencial da biotecnologia em diversos campos, abrindo caminho para avanços significativos em áreas como agricultura, medicina e indústria.

Na perspectiva sustentável, a biotecnologia tem se concentrado em obter diversos produtos a partir da biomassa. Nesse contexto, muitos processos tradicionalmente realizados em refinarias estão sendo substituídos por processos desenvolvidos em biorrefinarias, adaptados para a síntese de biomoléculas. Essa abordagem abrange a produção de biocombustíveis, enzimas e produtos químicos naturais, contribuindo para a chamada "química verde" (Silvia; Lacerda; Junior, 2005).

Dentre os bioprodutos gerados, destacam-se os compostos bioativos, caracterizados por um alto valor agregado e um vasto potencial de aplicação. Esses compostos encontram utilidade na produção de medicamentos, cosméticos, nutracêuticos e diversos outros produtos voltados para a saúde humana e animal (Guaadaoui *et al.*, 2014). A utilização de biomassa e a produção sustentável de bioprodutos representam avanços significativos na busca por soluções ambientalmente amigáveis e economicamente viáveis.

Entre os bioprodutos com alto valor agregado e aplicação biotecnológica, as enzimas produzidas por microrganismos endofíticos de frutos amazônicos se destacam. O mercado enzimático tem experimentado um crescimento contínuo e significativo nos últimos anos, gerando bilhões de dólares em receitas. Esse aumento na demanda por enzimas microbianas deve-se à ampla e crescente gama de aplicações industriais (Silva; Malta, 2016).

Estudos indicam uma projeção do crescimento global do mercado enzimático de US\$ 5 bilhões em 2016 para US\$ 6,3 bilhões em 2021 (Dewan, 2017). Esse aumento reflete não apenas a diversificação das aplicações das enzimas, mas também a busca por fontes sustentáveis e inovadoras, como as enzimas provenientes de microrganismos endofíticos de regiões ricas em biodiversidade, como a Amazônia. O potencial dessas enzimas em aplicações industriais abre caminho para oportunidades significativas no cenário biotecnológico e econômico.

O estabelecimento de uma agricultura sustentável é crucial para enfrentar os desafios das mudanças climáticas e a diminuição das reservas de energia não renovável, garantindo ao mesmo tempo a segurança alimentar futura. Este é um fator essencial para o desenvolvimento da humanidade. A promoção da sustentabilidade no processamento de alimentos desempenha um papel vital ao evitar o desperdício de subprodutos, fomentar a criação de identidades próprias e regionais nos produtos processados e atrair a atenção dos consumidores para a importância do consumo de alimentos sustentáveis e saudáveis (Silvia; Lacerda; Junior, 2005).

Nesse contexto, a biotecnologia desempenha um papel significativo, pois pode ser utilizada para explorar os frutos de maneira eficiente, gerando riquezas e, ao mesmo tempo, preservando o delicado ecossistema da Amazônia. A integração da biotecnologia com práticas sustentáveis no processamento de alimentos contribui não apenas para a produção de alimentos de alta qualidade, mas também para a conservação do meio ambiente, alinhando-se com os princípios da sustentabilidade (Almeida e Amaral, 2020). Essa abordagem holística busca equilibrar as necessidades humanas com a conservação dos recursos naturais, proporcionando benefícios a longo prazo para a sociedade e o planeta.

3.4 Bioprospecção de Microrganismos Endofíticos em Plantas

O termo "bioprospecção" refere-se a um método ou abordagem que envolve a localização, avaliação e exploração da diversidade de vida em uma determinada região de maneira legal. Seu objetivo primordial é a busca de recursos genéticos e bioquímicos com aplicações comerciais, sempre com a consideração central da conservação para evitar a exaustão dos recursos visados (Silva; Abegg, 2022). Essa prática visa conciliar a utilização responsável dos recursos naturais com a preservação da biodiversidade, assegurando que a exploração dos elementos biológicos ocorra de forma ética e sustentável.

A bioprospecção oferece diversas vantagens, destacando-se: Conhecimento da Biodiversidade: A prática da bioprospecção permite a exploração e compreensão da

diversidade biológica em determinada região; Fornecimento de Substâncias Importantes: Contribui para a descoberta de substâncias valiosas e úteis para a humanidade, como compostos medicinais, enzimas e outros produtos bioativos; Crescimento Econômico: Ao identificar e utilizar de maneira sustentável recursos naturais, a bioprospecção pode impulsionar setores econômicos, como a indústria farmacêutica e de alimentos; Aumento do Mercado de Trabalho: O desenvolvimento de novas indústrias e tecnologias relacionadas à bioprospecção pode criar oportunidades de emprego e promover o crescimento econômico local; Fundo para Conservação e Preservação Ambiental: As atividades de bioprospecção muitas vezes geram recursos financeiros que podem ser direcionados para iniciativas de conservação e preservação ambiental; Contribuição para a Ciência: A bioprospecção amplia o conhecimento científico ao fornecer novas informações sobre a biologia, ecologia e potencial aplicação de organismos e substâncias naturais; Uso Sustentável dos Recursos Naturais: Estimula a exploração responsável e sustentável dos recursos naturais, promovendo a conservação a longo prazo e evitando a degradação ambiental. A soma dessas vantagens contribui para o desenvolvimento equilibrado da sociedade, promovendo a interação sustentável entre as atividades humanas e o meio ambiente (Galvão, Oliveira e Correia, 2021).

Os frutos comestíveis da região do Amazonas representam uma fonte promissora de fungos endofíticos, oferecendo uma ampla variedade de espécies que podem ser exploradas por meio das técnicas de bioprospecção. Notavelmente, foi realizado o isolamento de aproximadamente 210 linhagens pertencentes aos filos Ascomycota e Basidiomycota, encontradas nas polpas de frutos como açaí do Amazonas (*Euterpe precatória*), bacuri (*Platonia insignis*), biribá (*Rollinia mucosa*), buriti (*Mauritia flexuosa*), maracujá do mato (*Passiflora cincinnata*), sapota do Solimões (*Matisia cordata*) e umari (*Geoffroea spinosa*) (Souza *et al.*, 2019). Este amplo espectro de fungos endofíticos, associado aos frutos comestíveis da região, destaca um rico campo para a aplicação de bioprospecção, visando descobertas de substâncias bioativas e compreensão mais profunda das potenciais interações benéficas entre esses microrganismos e os frutos amazônicos.

3.5 Família Annonaceae e espécie *Rollinia mucosa* Jacq.

A família botânica Annonaceae abrange um grande número de gêneros e espécies, a maioria das quais é nativa de regiões tropicais ou subtropicais. Muitas dessas espécies são valorizadas como frutíferas comerciais e cultivadas em diversos países (Mosca, 2006). Essa família botânica apresenta uma notável diversidade e importância econômica, destacando-se por contribuir significativamente para a produção de frutas em diferentes partes do mundo.

A família Annonaceae, pertencente à ordem Magnoliales, destaca-se pela sua vasta diversidade, compreendendo aproximadamente 2.500 espécies e 135 gêneros documentados globalmente (Chatrou *et al.*, 2004). No Brasil, foram identificados até o momento 29 gêneros, abrangendo cerca de 388 espécies (Maas *et al.*, 2011). Entre os gêneros relevantes na família Annonaceae, destacam-se *Annona*, *Rollinia* e *Albernoa*, sendo considerados importantes (Costa *et al.*, 2008). Essa diversidade na família Annonaceae, com sua expressiva presença no Brasil, sublinha a relevância e a potencial importância econômica e ecológica dessas plantas.

A Amazônia possui inúmeras espécies frutíferas, dentre as quais se destaca o biribazeiro (*Rollinia mucosa* [Jacq.] Baill) que apresenta uma ampla distribuição geográfica e produz um fruto conhecido vulgarmente como “biribá”, “biribá-do-pará”, “fruta-da-condessa”, “biribá-de-Pernambuco”, “pinha”, “anona” e “jaca-de-pobre”, o qual tem grande aceitação popular, sendo na maioria das vezes comercializado e consumido *in natura* (Costa e Muler, 1995).

O gênero *Rollinia* compreende cerca de 120 espécies distribuídas pela América do Sul, América Central, África, Ásia e Austrália. Diversas espécies desse gênero produzem frutos comestíveis, incluindo a pinha (*Annona squamosa* L.) e a graviola (*Annona muricata* L.) (Maas, 2014). O gênero é considerado de grande importância na fruticultura da família *Annonaceae* (Nascimento, 2008), contribuindo significativamente para a diversidade e produção de frutas consumidas em várias regiões do mundo.

Trata-se de uma espécie frutífera tropical originária da região Amazônica, com cultivo predominante no Brasil, México e Venezuela. O biribazeiro destaca-se como um dos representantes mais significativos da família Annonaceae, sendo uma planta adaptada ao clima quente e úmido, com altura média de aproximadamente 8 metros (Rainer, 2007).

Apesar da grande aceitação popular, o biribá ainda não possui uma relevância econômica significativa na região Amazônica. No entanto, ele representa uma excelente alternativa econômica devido aos baixos custos de produção, podendo tornar-se uma fonte de renda importante para a população local (Maas, 2014). O biribá pode ser comercializado de forma *in natura* ou na forma de polpa. Além disso, suas aplicações se estendem à produção de doces, geleias, sorvetes e bebidas.

Os pequenos frutos enfrentam desafios significativos em termos de conservação pós-colheita devido às suas altas taxas respiratórias e à perda de água durante o armazenamento. A compreensão da fisiologia e da tecnologia pós-colheita, juntamente com práticas de processamento e conservação, é de extrema importância. Esses conhecimentos fornecem subsídios técnicos essenciais para a ampliação do tempo de armazenamento desses frutos,

contribuindo assim para a preservação de sua qualidade e prolongando sua disponibilidade no mercado (Nascimento, 2008). Esse enfoque é crucial para garantir que os pequenos frutos alcancem os consumidores com características sensoriais e nutricionais preservadas, mesmo após o processo de colheita.

3.5.1 Caracterização da Folha da *Rollinia mucosa* Jacq.

As secções transversais da lâmina foliar do biribazeiro indicam uma organização dorsiventral das folhas, que são do tipo hipoestomático, apresentando tricomas em ambas as faces. A epiderme é simples, com células de secção retangular a elíptica e paredes finas. Os tricomas tectores, simples, pluricelulares e unisseriados, com até 3 células, estão mais concentrados sobre a nervura central na face abaxial. Esses tricomas desempenham funções essenciais, como prevenir a transpiração excessiva, proporcionar uma barreira contra ventos que podem reduzir a umidade relativa na superfície foliar e proteger as folhas contra o acúmulo excessivo de água na superfície foliar (Silva *et al.*, 2005). Essas adaptações são cruciais para a sobrevivência e o bom desempenho fisiológico da planta em seu ambiente natural.

3.5.2 Caracterização da Inflorescência da *Rollinia mucosa* Jacq.

A maioria das espécies pertencentes à família Annonaceae exibe uma inflorescência denominada cimeira, uma estrutura floral ramificada. A cimeira pode se manifestar como terminal, emergindo no ápice do ramo, ou axilar, surgindo nas axilas das folhas. As flores podem ocorrer de maneira solitária ou agrupadas em conjuntos compactos nas cimeiras, muitas vezes destacando-se pela sua grandeza e beleza (Maas, 2014).

Essas flores geralmente apresentam órgãos reprodutivos especializados, como estames e carpelos. Os estames, em alguns casos, são numerosos e dispostos de maneira espiralada ao redor do receptáculo floral. O ovário, por sua vez, é frequentemente classificado como súpero, indicando que está posicionado acima dos demais órgãos florais (Silva *et al.*, 2005).

Essas características conferem à inflorescência da família Annonaceae uma notável diversidade e uma estética distintiva, contribuindo para a singularidade e importância botânica dessa família.

3.5.3 Caracterização do Fruto da *Rollinia mucosa* Jacq.

A infrutescência, popularmente chamada de fruto, é sincárpica, seguindo o padrão observado na maioria das anonáceas (Maas, 2014). Ela é formada pela fusão dos ovários, que

se tornam carnosos e se fundem durante a maturação. Os frutos apresentam formas como obovoide, ovoide, cordiforme e reniforme. Normalmente, podem atingir 1,65 kg, com dimensões variando de 29 a 45 cm. A casca (epicarpo) do fruto, quando imaturo, exibe uma coloração verde-amarelada. Ao alcançar completa maturação, surgem saliências carnosas conhecidas como espículas ou espinhos. Em alguns tipos, os frutos podem não apresentar saliências tão proeminentes. Em termos percentuais, o fruto geralmente possui cerca de 52% de polpa, 42% de casca e 6% de sementes em relação ao peso total (Costa, 1995). Essas características fazem do biribá uma fruta atrativa não apenas em termos de sabor, mas também em termos de composição e versatilidade em várias aplicações culinárias e industriais.

3.5.4 Caracterização da Semente da *Rollinia mucosa* Jacq.

Em Annonaceae, as sementes são albuminosas, elipsoides, com comprimentos que variam entre 5 e 30 mm (Judd *et al.*, 1999). As principais reservas presentes nas sementes incluem lipídeos, proteínas, açúcares e amido, sendo que as proporções dessas substâncias podem variar de acordo com a espécie. Diversos estudos anatômicos realizados com sementes de anonáceas descrevem as substâncias encontradas nos tecidos de reserva, as quais serão utilizadas posteriormente durante a germinação. Além disso, alguns autores relatam a presença de substâncias acumuladas no tegumento das sementes (Maas, 2014)..

Em relação à classificação das espécies da família Annonaceae quanto à tolerância à dessecação, a literatura sugere que essas sementes apresentam uma aparente tolerância à secagem. De acordo com Carvalho *et al.* (2001), sementes de *Annona glabra* L. conseguem suportar uma redução no teor de água até atingirem 10% e podem ser armazenadas congeladas por 365 dias, mantendo uma média de 90% de germinação. Esse tipo de resistência à dessecação e ao congelamento é uma característica importante para o armazenamento e conservação dessas sementes em condições específicas.

3.6 Metabolitos produzidos por endofíticos de plantas

É verdade que muitos microrganismos endofíticos possuem a capacidade de sintetizar compostos bioativos. Esses compostos podem ser utilizados pelas plantas para promover o desenvolvimento, crescimento e induzir mecanismos de defesa. Além disso, essas substâncias podem desempenhar um papel crucial na proteção das plantas contra agentes patogênicos e na produção de substâncias anti-herbívoras. Essa interação simbiótica entre plantas e microrganismos endofíticos destaca a importância dessas associações para a saúde e

adaptação das plantas no ambiente (Mejía *et al.*, 2008).

No âmbito dessa interação, diversos papéis têm sido atribuídos aos fungos endofíticos, incluindo a melhoria da capacidade competitiva da planta, o aumento da tolerância ao estresse abiótico e a proteção contra patógenos e insetos (Arnold; Lewis, 2005; Schulz; Boyle, 2005; Rudgers *et al.*, 2007). Esses fungos desempenham funções multifacetadas que contribuem para a saúde e a adaptação das plantas em seus ambientes específicos.

O estudo de metabólitos secundários presentes em fungos endofíticos é de grande importância, pois essas substâncias têm o potencial de contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos, especialmente para o tratamento de doenças negligenciadas, como a malária, que possui alta ocorrência regional (Souza *et al.*, 2019). A busca por compostos bioativos produzidos por fungos endofíticos pode oferecer alternativas valiosas no desenvolvimento de terapias e no combate a doenças que afetam significativamente determinadas regiões.

O emprego de metabólitos bioativos provenientes de fungos endofíticos oferece diversas vantagens em comparação com a extração direta dessas substâncias a partir das plantas. Essas vantagens incluem a eliminação do impacto da sazonalidade, a redução de problemas ambientais ou questões políticas associadas ao corte ou coleta de partes das plantas, além da obtenção de rendimentos industriais mais eficientes (Gonçalves, 2013). Esse método alternativo de obtenção de compostos bioativos destaca-se pela sua praticidade, sustentabilidade e potencial para contribuir para a produção de substâncias valiosas na indústria farmacêutica, alimentícia e química.

Os produtos naturais obtidos de endófitos abrangem principalmente alcaloides, esteroides, terpenoides, isocumarinas, quinonas, fenilpropanoides, ligninas, fenóis e ácidos fenólicos, metabólitos alifáticos, lactonas, citocatalasinas, flavonoides, peptídeos e xantonas (Specian, 2014). Dado que os endófitos ainda são pouco estudados, especialmente em espécies tropicais, eles emergem como uma fonte promissora de novos produtos para a formulação de medicamentos e como meio de preservar plantas medicinais. Destaca-se que a produção de metabólitos fúngicos em condições *in vitro* apresenta menor custo e melhor otimização, além de os microrganismos serem fontes facilmente renováveis e reprodutíveis quando comparados a outras fontes naturais, como plantas e animais. Diversas técnicas têm sido empregadas para aprimorar a utilização de microrganismos na produção de novos princípios ativos, integrando conhecimentos das áreas de química, bioquímica, microbiologia e biologia molecular.

3.7 Principais espécies de endofíticos e sua importância

Um amplo espectro de espécies de endofíticos pode ser isolado dos tecidos saudáveis de uma única planta. Vários fatores, como a idade da planta, do tecido ou órgão, e o tempo decorrido até o isolamento dos endofíticos, influenciam qualitativa e quantitativamente na biodiversidade da microbiota endofítica (Peixoto, 2004).

Dentre os endofíticos, merecem destaque os actinomicetos, e o gênero *Streptomyces* spp. se destaca como um dos principais produtores de metabólitos bioativos com aplicações na medicina e na indústria, sendo responsável por mais de 80% dos antibióticos conhecidos (Favoretto, 2010).

Várias pesquisas têm corroborado essas afirmações, como evidenciado no estudo de Li *et al.* (2012), no qual os pesquisadores exploraram o potencial de metabólitos produzidos por *Aspergillus fumigatus* isolado de *Melia azedarach*. O estudo revelou dois alcaloides indólicos, fumitremorgina e verruculogeno, que demonstraram uma ação inibidora significativa do apetite em larvas de lagartas (*Mythimna separata*). Outro exemplo é o fracionamento bioguiado do extrato do endófito *Nigrospora* sp., encontrado nas raízes da planta medicinal moringa (*Moringa oleifera*). Esse processo resultou na identificação da griseofulvina, um antibiótico comercial de uso clínico, que mostrou atividade contra seis fungos fitopatogênicos: *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum orbiculare*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotium* (Canuto *et al.*, 2012).

Além disso, em um estudo conduzido por Surono e Narisawa (2017), os autores destacaram a capacidade do fungo endofítico *Phialocephala fortinii* de promover o crescimento vegetal de aspargos (*Asparagus officinalis*). Isso provavelmente ocorreu devido à habilidade do fungo em mineralizar fontes orgânicas de nutrientes no solo, tornando-os assimiláveis pelas plantas.

Sim, de fato, a vasta biodiversidade vegetal presente em países da América Latina, especialmente em climas tropicais, sugere que cada espécie vegetal pode abrigar microrganismos endofíticos ainda não completamente caracterizados. Essa diversidade genética potencialmente inexplorada representa uma fonte valiosa para a descoberta de compostos bioativos e estruturalmente diversos. A capacidade desses microrganismos de produzir metabólitos com propriedades bioativas pouco conhecidas oferece oportunidades para o desenvolvimento de compostos de alto valor agregado (Rodrigues, 2014).

Além disso, o estudo dessas interações metabólicas e as aplicações práticas dos compostos resultantes podem abrir novos campos de pesquisa. Compreender as relações ecológicas entre plantas e seus microrganismos endofíticos, bem como explorar os potenciais

benefícios desses compostos para a agricultura, medicina e outras aplicações, destaca a importância da biodiversidade para inovação e desenvolvimento sustentável (Chapla; Biasetto; Araujo, 2013).

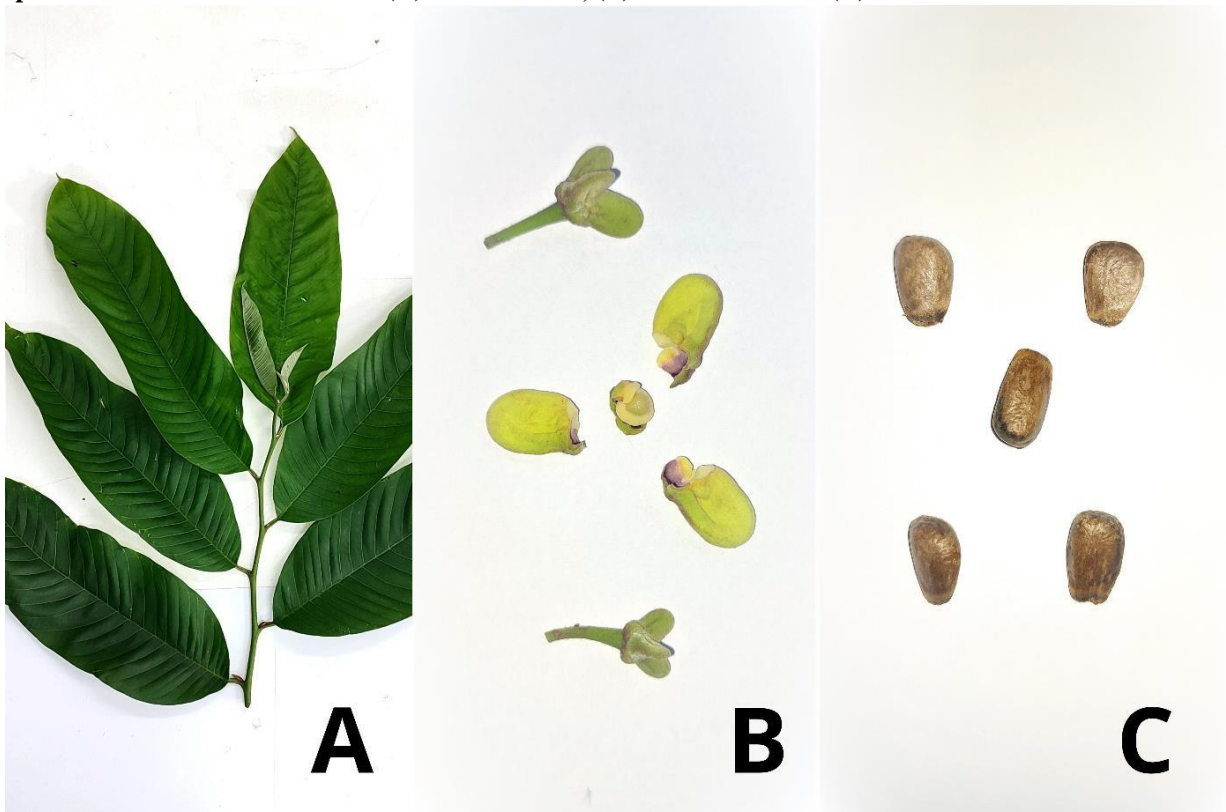
4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

4.1 Coleta do material botânico

O isolamento de fungos endofíticos demandaram cuidados específicos que abrangiam desde a coleta até o armazenamento do material coletado. Foi essencial planejar e organizar adequadamente o ambiente laboratorial para receber as partes da planta, prevenindo a deterioração e evitando contaminações cruzadas, especialmente com microrganismos epifíticos (Lima *et al.*, 2020).

Os tecidos vegetais da espécie *Rollinia mucosa* (Jacq.) utilizados para análise foram coletados em áreas de cultivo do município de Tabatinga-AM e transportados a Universidade Federal do Amazonas – Instituto de Natureza e Cultura do Município de Benjamin Constant, local este que possuía os equipamentos adequados para o armazenamento, conservação e, posteriormente, realização da extração do material para análise (Figura 01).

FIGURA 1 – Tecidos vegetais da espécie *Rollinia mucosa* Jacq. utilizados para extração dos fragmentos para isolamento dos endofíticos. (A) folhas e caule, (B) inflorescências e (C) sementes.



FONTE: O Autor (2024)

Uma exsicata do espécimen, previamente identificada pela Professora Dra. Maria del Pilar (Centro de Estudos Superiores de Tabatinga, Universidade do Estado do Amazonas), encontra-se depositada no Herbário Didático do CESTB/UEA.

4.2 Desinfecção do material botânico

Ao iniciar o trabalho laboratorial, aplicaram-se técnicas para o tratamento da superfície das partes da planta, visando à eliminação dos microrganismos epifíticos, empregando-se o método descrito por Araújo *et al.* (2002). Essas etapas incluíram:

1. Lavagem com Álcool 70%;
2. Tratamento com hipoclorito de sódio;
3. Segunda lavagem com Álcool 70%;
4. Enxágue com Água Destilada.

Inicialmente, lavaram-se as partes da planta em água corrente para remoção de qualquer sujeira e detritos. Após, os exemplares foram lavados em água destilada durante 2 minutos, seguida de Álcool 70% por 2 minutos, hipoclorito de sódio 2,5% por 5 minutos e retorno ao Álcool 70% por 2 minutos. Por fim, lavaram-se as amostras duas vezes com água destilada e então foram secadas em papel filtro estéril.

Estas etapas garantem a desinfecção eficaz da superfície dos frutos, preparando-os para a subsequente extração e análise de fungos endofíticos. Para avaliar a eficácia da desinfecção das superfícies das amostras, adicionou-se 100 µL da água residual da última lavagem de cada fragmento ao meio de cultura, seguido de incubação (Santos *et al.*, 2016).

4.3 Isolamento de endófitos de *Rollinia mucosa* Jacq.

O método para isolar os microrganismos endofíticos consistiu na distribuição de fragmentos das folhas, inflorescências, sementes e caules sobre a superfície do meio de cultura. Posteriormente, as amostras foram incubadas em condições adequadas por um período suficiente para o crescimento fúngico (Santos *et al.*, 2016).

Os meios de cultivo selecionados para o isolamento de fungos endofíticos do biribá atenderam às exigências nutricionais específicas (Lima *et al.*, 2020). O Quadro 1 apresenta as condições dos meios de cultura destinados ao isolamento de fungos filamentosos.

QUADRO 1 – Meios de cultura para o isolamento de fungos filamentosos de plantas da Amazônia.

Microrganismo	Exigências Químicas e Nutricionais	Meio Utilizado
Fungos filamentosos	Ricos em carboidratos	BDA - Agar Batata Dextrose (Potato Dextrose Agar);
	pH ácido	
	Sais minerais	
	pH levemente alcalino	

FONTE: Lima *et al.* (2020)

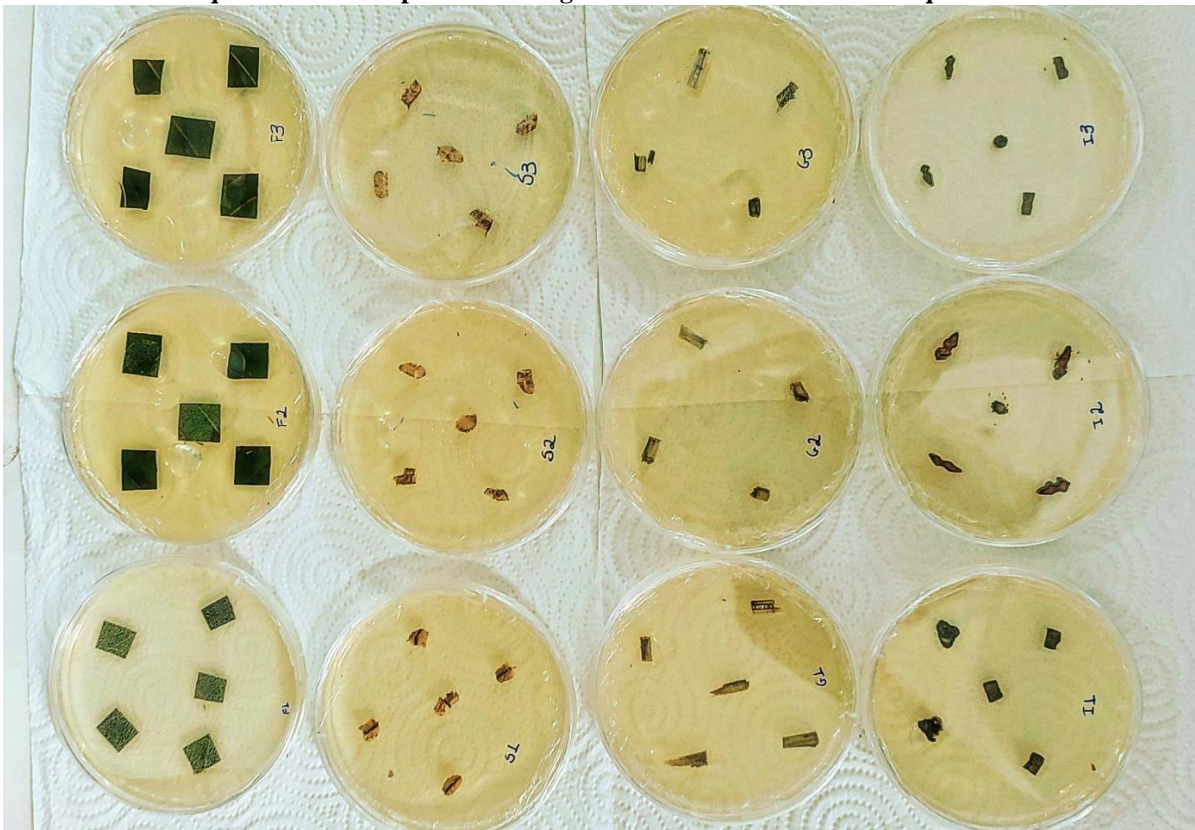
Na etapa de isolamento, as técnicas de plaqueamento em superfície foram empregadas.

O plaqueamento em superfície possibilitou a contagem e o isolamento dos microrganismos que cresceram na superfície do meio de cultura. Posteriormente, as placas foram incubadas à temperatura adequada de 28° e, após o período de dez dias de incubação, foi realizada a contagem das colônias que se desenvolveram nos cultivos. Os microrganismos cresceram tanto na superfície quanto dentro do meio de cultura, formando colônias isoladas (Lima *et al.*, 2020).

4.3.1 Plaqueamento com fragmentos da *Rollinia mucosa* Jacq.

Com auxílio de um bisturi previamente esterilizado, cortaram-se os exemplares obtidos em fragmentos de mesmo tamanho, dispondo-os (de quatro a cinco fragmentos por placa) em placas de *Petri* contendo meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) (Figura 2). Então, foram seladas as placas com parafilme e incubadas a temperatura de 28 °C, durante dez dias, a fim de se observar a presença de culturas fúngicas ao redor dos fragmentos.

FIGURA 02 – Plaqueamento em superfície de fragmentos da *Rollinia mucosa* Jacq.



FONTE: O Autor (2024)

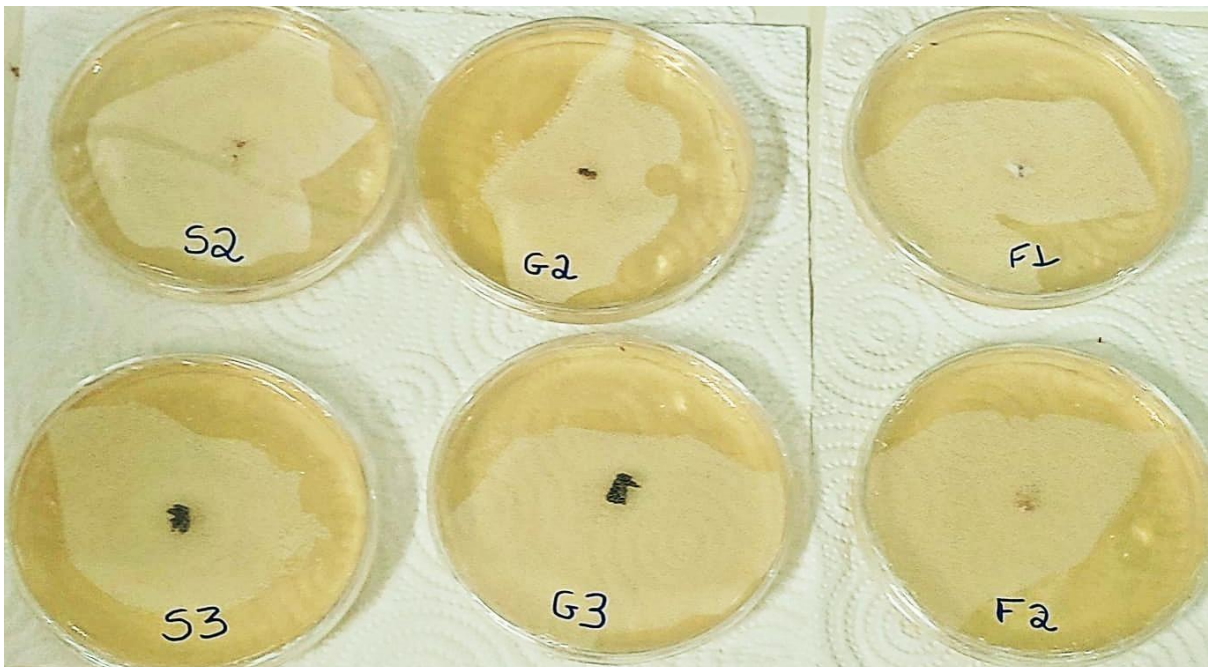
Para diferenciar os isolados, as placas-mãe foram nomeadas com os seguintes códigos: a primeira letra indicando o órgão de origem - folha (F), caule (G), inflorescência (I) e

semente (S); a segunda, o número do isolado. Por exemplo, a placa com código F.1 se refere a placa 1 cujos fragmentos são de origem da folha.

A obtenção dos isolados (purificação) foi realizada por meio de sucessivos repiques em placas de BDA. Cada fungo selecionado para isolamento recebeu um número para identificação e posteriormente foi repicado para purificação.

Após o processamento, 8 fungos foram isolados. Estes foram selecionados de acordo com as características morfológicas macroscópicas. Os isolados foram nomeados por um código composto por uma letra representando o tecido vegetal seguida de um número (F para Folha, G para Caule, I para Inflorescência e S para Semente), conforme visto na Figura 3.

FIGURA 03 – Plaqueamento em superfície para obtenção dos isolados (purificação).



FONTE: O Autor (2024)

4.4 Avaliação das Colônias

Após a purificação, os fungos foram preservados a uma temperatura de 4° C, garantindo a sua estabilidade. As colônias fúngicas foram então meticulosamente caracterizadas e catalogadas, empregando uma abordagem que integra a macromorfologia.

Na macromorfologia, foram observadas e registradas características visíveis a olho nu, tais como a superfície das colônias, a cor do micélio e do verso da colônia, a textura, a pigmentação e a estrutura da borda. Esses aspectos fornecem informações cruciais para a identificação e classificação taxonômica dos fungos (Henning, 2015).

Assim, essas abordagens macromorfológicas proporciona uma análise abrangente e

detalhada das características dos fungos, facilitando sua identificação precisa e contribuindo para o avanço do conhecimento científico no campo da micologia.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

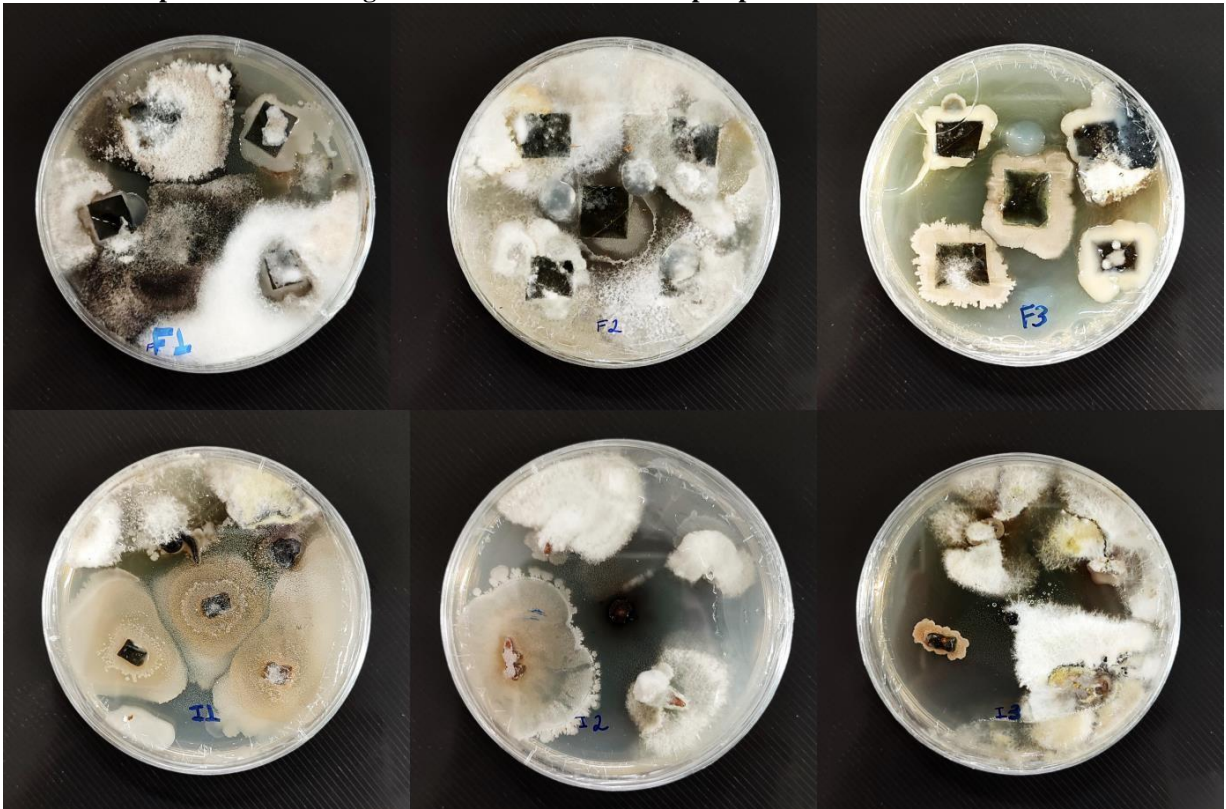
5.1 Isolamento e seleção dos fungos endofíticos

A incubação dos fragmentos da folha, caule, inflorescência e semente forneceu uma ampla diversidade de organismos, dentre eles fungos filamentosos. Todas as placas provenientes dos fragmentos da folha (F.1, F.2 e F.3), caule (G.1, G.2 e G.3), inflorescência (I.1, I.2 e I.3) e semente (S.1, S.2 e S.3) foram observadas após um período de 10 dias. Essa abordagem permitiu a detecção e identificação de uma ampla gama de microrganismos presentes nos diferentes tecidos vegetais, evidenciando a importância da diversidade microbiana associada a essas estruturas vegetais. A observação após o período de incubação é uma prática comum em estudos microbiológicos, permitindo a avaliação do crescimento e desenvolvimento dos microrganismos sob condições controladas de laboratório (Kirk, 2015).

5.2 Crescimento em meio de cultura

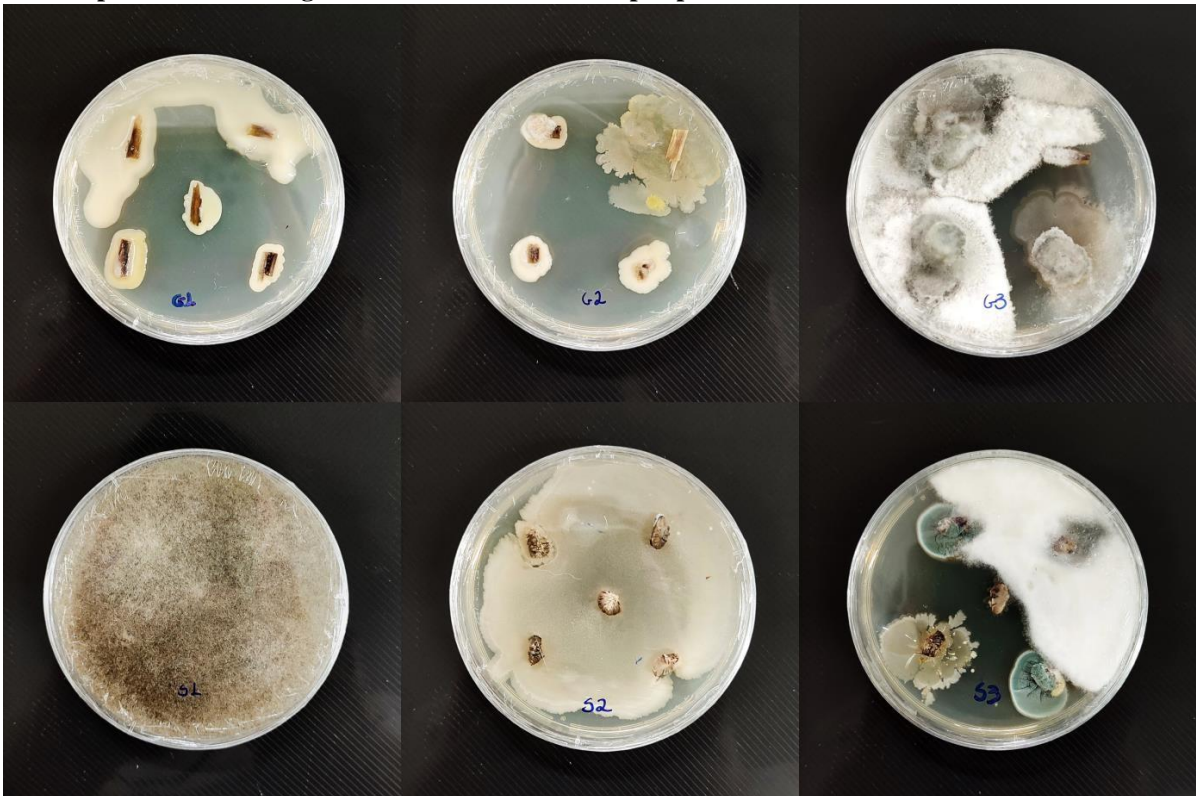
Os fungos endofíticos isolados apresentaram diferentes tonalidades de micélio como branco, verde escuro, verde claro e marrom claro, e diferentes tipos de textura como aveludados e granulados, como pode ser observado nas Figuras 4 e 5.

FIGURA 04 – Placas-mãe da folha e inflorescência de *R. mucosa*. Placas de Petri contendo meio de cultura BDA onde dispôs-se de 4 a 5 fragmentos de mesmo tamanho por placa.



FONTE: O Autor (2024)

FIGURA 05 – Placas-mãe do caule e semente de *R. mucosa*. Placas de Petri contendo meio de cultura BDA onde dispôs-se de 4 a 5 fragmentos de mesmo tamanho por placa.

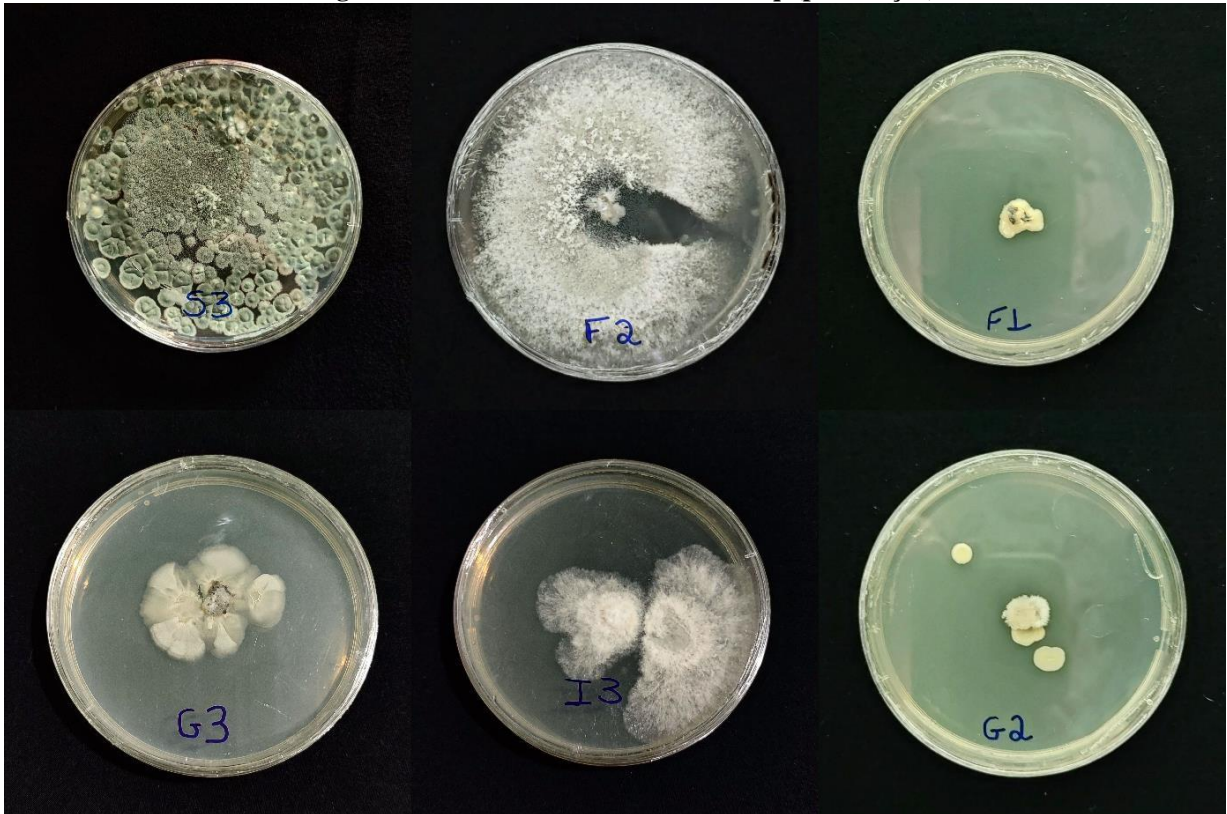


FONTE: O Autor (2024)

A partir destas placas-mãe, as colônias fúngicas que se apresentavam distintas umas das outras, de acordo com observações macroscópicas (coloração e características de crescimento em meio de cultura), foram purificadas em meio BDA, preservadas pelo método da subcultura e armazenadas a ± 4 °C e, após repiques sucessivos, obteve-se, ao final do experimento, 3 isolados fúngicos (Figura 6). A maioria dos isolados teve origem proveniente das folhas e inflorescência de *R. mucosa*, assim como consta no trabalho de Souza *et al.* (2012), que demonstraram uma alta diversidade de fungos endofíticos associados ao gênero *Rollinia* spp.

Na caracterização macromorfológica, os fungos endofíticos obtidos são filamentosos e apresentaram diversidade morfológica, incluindo coloração do micélio, em que foi observado predominância de coloração de micélio aéreo branco e textura aveludada, seguido de isolados de coloração micelial aéreo verde escuro e textura granulosa (Figura 06). Os fungos foram identificados como ascomicota sendo S.3 pertencente à família Hypocreaceae, ordem Hypocreales e gênero *Trichoderma* (Frozza, 2010). Já os fungos F.2 e I.3 pertencentes à família Nectriaceae que engloba o gênero *Fusarium* (Meyer, 2019).

FIGURA 06 – Isolados de fungos endofíticos de *Rollinia mucosa* Jacq. (purificação).



FONTE: O Autor (2024)

Os demais isolados (F.1, G.2 e G.3) foram determinados como bactérias endofíticas, devido à falta de suplementação de antibióticos ao meio de cultura utilizado, sendo, assim, armazenados para pesquisas futuras.

Dória (2012) descreveu morfológicamente o fungo *Fusarium* spp. em meio de cultura carmim, destacando um micélio aéreo branco, altamente ramificado e de crescimento rápido. Nozaki (2003) observou que a aparência da colônia e a coloração dos micélios variavam de algodão aveludado, com alguns isolados apresentando pigmentação arroxeada, enquanto outros exibiam uma gama de cores de branco a amarelo. Mais recentemente, Souza (2016) constatou que as colônias de *Fusarium* spp. desenvolveram micélio flocoso e disperso, com coloração que variava de branco a rosa no anverso e de branco a púrpura no verso. Essas características são consistentes com as observadas no presente estudo.

Este gênero de fungo endofítico já foi isolado de tecidos saudáveis de diversas outras fruteiras, incluindo a pupunheira (Mota, 1998), o tucumãzeiro (Silva, 2011) e o açaizeiro (Batista *et al.*, 2018).

O fato de terem sido verificados isolados do gênero *Trichoderma* sp. nos embriões de *R. mucosa* pode estar relacionado à possibilidade de contaminação, tanto pelo tempo de armazenamento das sementes quanto pelas condições do solo onde foram coletadas as

amostras do espécime vegetal. Isso ocorre porque o embrião não tem contato direto com o ambiente externo até a germinação. No entanto, uma vez que os fungos do gênero *Trichoderma* são ubíquos, sua presença pode ser atribuída à colonização oportunista, especialmente quando há substratos orgânicos presentes no solo (Brito *et al.*, 2010; Ethur, 2006).

Lorito *et al.* (2010) descreveram morfologicamente o fungo *Trichoderma* spp., observando colônias veludas, inicialmente brancas a esverdeadas, podendo adquirir tonalidades como cinza, laranja ou amarelo, dependendo da espécie e das condições de crescimento. Por sua vez, Martínez (2023) observou que as colônias de *Trichoderma* apresentavam crescimento rápido, eram circulares e uniformes, inicialmente de cor esbranquiçada, que se transformava em verde ou azulada após 72 horas. Além disso, foram notadas a presença de hifas hialinas, conidióforos septados e hialinos dispostos em tufos compactados de forma piramidal, fiálides alongadas e alargadas no centro, e conídios ovais com paredes ligeiramente rugosas, observados com uma ampliação de 1000x. Tais características descritas se assemelham notavelmente às que foram observadas durante a condução do estudo em questão.

Este gênero de fungo endofítico tem sido frequentemente encontrado em tecidos sadios de uma variedade de árvores. Estudos anteriores relatam sua presença em sementes de louro-pardo e peroba rosa (Mazarotto, 2023), em árvores de oliveira (Fung, 2023), assim como em espécimes de copaíba (Lima, 2013).

O gênero *Trichoderma* é reconhecido por abrigar diversas espécies amplamente distribuídas em uma variedade de habitats, sendo comumente encontradas em diferentes tipos de solos, com preferência por regiões de clima temperado e tropical (Santos, 2022). Em relação à sua associação com plantas, mais de 200 espécies de *Trichoderma* já foram identificadas e relatadas em várias partes do mundo, desempenhando diferentes papéis como rizosféricas, filosféricas e endofíticas (Yadav *et al.*, 2018). Essa diversidade de espécies de *Trichoderma* associadas às plantas respalda os resultados deste estudo, onde o endófito identificado como *Trichoderma* sp. foi isolado de um fragmento da semente.

5.3 Análise enzimática

Os gêneros *Trichoderma* e *Fusarium* são reconhecidos por sua diversidade de enzimas e habilidades metabólicas (Gomes, 2007). Esses fungos produzem uma variedade de enzimas extracelulares que desempenham papéis importantes em diversas interações ecológicas, incluindo a decomposição de matéria orgânica, a promoção do crescimento de plantas e a

proteção contra patógenos, especialmente no caso das espécies do gênero *Trichoderma* (Lorito *et al.*, 2010).

O *Trichoderma* sp. é reconhecido por sua capacidade excepcional de se disseminar pelo ambiente, utilizando uma variedade de fontes de carbono, nitrogênio e substratos para a produção de suas enzimas e metabólitos. Esse fungo é amplamente empregado comercialmente na produção de diversas enzimas industriais, como celulasas, hemicelulasas e proteases (Fraga, 2021).

Estudos realizados por Bueno (2009) investigaram a produção de enzimas extracelulares por *Fusarium*, concluindo que espécies deste gênero são capazes de produzir diversas enzimas, incluindo amilase, lipase, celulase, proteases (caseinase e gelatinase), lacase (oxidase) e catalase. No entanto, a quantidade produzida de cada enzima varia significativamente entre os isolados. Conforme observado na Tabela 1, essas atividades enzimáticas são compartilhadas por ambos os gêneros fúngicos identificados neste estudo.

Tabela 1 – Atividade enzimática dos fungos endofíticos do biribá (*Rollinia mucosa* Jacq.)

Código do Isolado	Fungo	Atividade enzimática			
		Lipolítica	Proteolítica	Quitinolítica	Celulolítica
S.3	<i>Trichoderma</i> sp.	+	+	+	+
F.2	<i>Fusarium</i> sp.	+	+	+	+

F=folha, S=Semente; Presença (+) ou Ausência (-).

FONTE: Adaptado de Gomes, 2007.

Trichoderma sp. é conhecido por produzir lipases, enzimas que degradam lipídios e gorduras. Essas enzimas desempenham papéis importantes na competição por nutrientes e na supressão de patógenos fúngicos (Coragem, 2023). Por outro lado, *Fusarium* sp. é reconhecido pela sua capacidade de produzir diferentes isoformas de lipases, cada uma com atividades específicas. Estudos, como o realizado por Prazeres (2006), identificaram a linhagem de fungo *Fusarium oxysporum* como a maior produtora de lipase alcalina extracelular em meio de cultura, sendo essa lipase demonstrada com aplicabilidade industrial, sendo utilizada, por exemplo, na modificação de triglicerídeos, síntese de diversos compostos de ésteres e na formulação de detergentes.

As proteases produzidas por *Trichoderma* têm a capacidade de degradar proteínas encontradas nos tecidos de patógenos, além de outros substratos (Pereira, 2011). Em um estudo realizado por Kirsch *et al.* (2019), que avaliou o potencial proteolítico de *Fusarium*

spp., foi destacada a eficácia das proteases isoladas desta espécie na remoção de manchas de tecidos de algodão, demonstrando seu potencial para futuras aplicações biotecnológicas.

Enzimas quitinases são capazes de quebrar a quitina, um componente importante da parede celular de muitos fungos fitopatogênicos. A atividade de quitinase de *Trichoderma* é uma das principais características associadas ao seu potencial de biocontrole de doenças de plantas (Coragem, 2023). Adrio e Demain (2014) demonstraram que as quitinases de *Fusarium* sp. também podem ser eficazes no controle de patógenos fúngicos e na degradação de resíduos de quitina em ambientes aquáticos e terrestres.

As enzimas celulases desempenham um papel fundamental na degradação da celulose, um componente essencial da parede celular das plantas. *Trichoderma* spp. é reconhecido por sua capacidade de produzir diversas celulases, contribuindo assim para a decomposição de resíduos vegetais e a liberação de nutrientes no solo (Basso, 2010). Morais (2016) destacou o potencial biotecnológico dos fungos pertencentes ao gênero *Fusarium* spp. na produção de celulases, ressaltando a importância de estudos futuros para caracterização e otimização das condições de produção dessas e outras enzimas. Essa pesquisa pode abrir caminho para aplicações benéficas ao meio ambiente e para avanços na indústria biotecnológica.

5.4 Potencial uso dos fungos isolados para a biotecnologia

Os fungos endofíticos encontrados neste trabalho têm sido relatados por vários autores com potencial para diferentes usos. Destacam-se nesse processo, a utilização de fungos do gênero *Trichoderma* como micoerbicidas, micoInseticidas ou micoparasitas. Como controladores biológicos, são usados na aplicação de técnicas na produção de “inseticidas microbianos” que diminuem o uso de agroquímicos, com vantagens econômicas e de preservação ambiental. O fungo também pode ser empregado como controlador de doenças em plantas, reduzindo o uso de fungicidas e sendo produzidos em laboratórios brasileiros (Azevedo *et al.*, 2002).

O gênero *Fusarium* abriga várias espécies conhecidas e frequentemente encontradas em uma ampla variedade de plantas, muitas delas de interesse econômico, que, em contraparte ao gênero *Trichoderma*, provocam diversas doenças como murcha vascular, *damping off* e podridões de raiz e colo (Agrios, 2005; Wakelin *et al.*, 2008). Algumas interações entre patógenos e raízes de plantas ocorrem conforme a resposta dos microrganismos a condições de aeração e penetração, além de estresse causado pela umidade do solo. Esses fatores podem proporcionar maior severidade da doença (Carneiro, 2018), dando respaldo ao detectado neste trabalho, uma vez que o endófito identificado como *Fusarium* sp. teve sua origem de

fragmentos da folha, caule e inflorescência.

O gênero *Trichoderma* já foi relatado como um agente de controle biológico contra uma variedade de fungos fitopatogênicos como o próprio gênero *Fusarium*, e os gêneros *Sclerotinia* e o *Rhizoctonia* (Junior *et al.*, 2018). O *Trichoderma* sp. pode colonizar as raízes das plantas e competir com os patógenos por nutrientes e espaço, bem como produzir substâncias antifúngicas que inibem o crescimento dos patógenos. Alguns isolados de *Trichoderma* spp. produzem, *in vitro*, enzimas quitinolíticas e glucanases que são capazes de degradar a parede celular de alguns fitopatógenos (Santin., 2008).

Os isolados de *Trichoderma* spp. oriundos de solo compactado testados, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, apresentam potencial para controle de *Fusarium* spp. em soja (Milanesi *et al.*, 2013). Ainda neste estudo, os isolados de *Trichoderma* spp. também demonstraram promoção do crescimento das plantas devido à capacidade do fungo de melhorar a absorção de nutrientes, estimular o crescimento radicular e produzir hormônios vegetais, como auxinas, que promovem o desenvolvimento das plantas (Milanesi *et al.*, 2013).

Há um crescimento anual de 15% no mercado mundial de biopesticidas. Hoje existem, pelo menos, 246 produtos biológicos à base de *Trichoderma* registrados em diferentes países (Bettiol, 2019).

Os produtos à base de *Trichoderma* representam relevante alternativa para compor o manejo integrado de doenças. No entanto, esta adoção gera a necessidade de pesquisas aplicadas para definição do posicionamento dos produtos, principalmente quanto à dosagem, formas de aplicação, condições ambientais no momento da aplicação, condição de cobertura de solo, compatibilidade de aplicação com outros produtos, entre outras questões que interferem no campo. Em razão disso, *Trichoderma* se tornou um dos fungos mais pesquisados como agente de controle de doenças de plantas e formulação de inoculantes, se apresentando como um dos principais antagonistas para o desenvolvimento e rendimento da produção agrícola.

Portanto, o presente trabalho destaca a importância de explorar novas alternativas no combate aos patógenos que afetam diferentes cultivos, bem como a necessidade de conservar e estabelecer coleções de culturas encontradas nos ecossistemas da Amazônia. Essas ações são fundamentais para impulsionar o avanço da biotecnologia com foco no desenvolvimento sustentável, tanto no Brasil quanto em escala global.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo revelam uma diversidade notável de fungos endofíticos cultiváveis associados à espécie vegetal *Rollinia mucosa* Jacq. No entanto, identificaram-se lacunas significativas que demandam uma investigação mais aprofundada. É crucial explorar áreas da planta onde a microbiota endofítica permanece desconhecida e direcionar esforços para estudar, também, as bactérias endofíticas que coabitam esse mesmo hospedeiro, para assim aprimorar o aproveitamento sustentável da biodiversidade da região da Amazônia.

Além disso, os resultados deste estudo destacam não apenas o potencial dos fungos endofíticos no controle biológico, mas também suas aplicações em outras áreas, como agricultura, indústria farmacêutica e industrial. Portanto, é fundamental enfatizar a importância de explorar os microrganismos endofíticos em sua totalidade, uma vez que sua diversidade, características e aplicabilidades ainda estão em grande parte desconhecidas. Esse conhecimento pode impulsionar avanços significativos em diversas áreas científicas e tecnológicas.

Os microrganismos endofíticos representam uma reserva ainda inexplorada de estruturas químicas únicas, geradas pelas relações coevolutivas entre hospedeiro e endófito. Assim, existem grandes possibilidades de encontrar novos metabólitos secundários com atividades biológicas relevantes em microrganismos endofíticos.

REFERÊNCIAS

- ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, 4(1), 2014. p.117-139.
- AGRIOS, G.N. Plant Pathology. 5.^a ed. Burling-ton, USA, **Elsevier Academic Press**, 2005. 922p.
- ALTERTHUM, F.; RÁCZ, M. L. **Microbiologia** - Trabulsi Alterthum. 6^a ed. São Paulo: Atheneu, 2015.
- ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; KUBLINCKY-SOBRAL, J.; Lacava, P. T. **Manual: isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2002. 86 p.
- ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; SOBRAL, J. K.; LACAVA, P. T.; PIZZARANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. **Guia Prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: Editora CALQ. p.167. 2010.
- ARNOLD, E. A.; LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, p. 541–549, 2007.
- ARNOLD, E. A. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**. V. 21, p. 51-66, 2007.
- ASTOLFI FILHO, S.; SILVA, C. G. N. da; BIGI, M. F. M. A. Bioprospecção e biotecnologia. **Parcerias Estratégicas**, v. 19, n. 38, p. 45-80, 2015.
- AZEVEDO, João Lúcio. Fungos: genética e melhoramento de fungos na biotecnologia. **Biotecnologia, Ciência, Desenvolvimento**, v. 1, p. 12-15, 1997.
- AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L.; MACHERONI Jr, W. Importância dos microrganismos endofíticos no controle de insetos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed) **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa- Meio ambiente. Cap 3, p. 57-93. 2000 (b).
- BARBIERI, R.; CARVALHO, I. F. Coevolução de plantas e fungos patogênicos. **Revista Brasileira de Agrociencia**, Pelotas, v.7, p79-83, 2001.
- BASSO, Thalita Peixoto; GALLO, Cláudio Rosa; BASSO, Luiz Carlos. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 45, p. 1282-1289, 2010.
- BATISTA, B. N.; RAPOSO, N. V. D. M.; SILVA, I. D. R. Isolamento e avaliação da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos de açaizeiro. **Fitos**, v. 12, n. 2, p. 161-174, 2018.
- BETTIOL, Wagner et al. Uso atual e perspectivas do Trichoderma no Brasil. MEYER, MC; MAZARO, SM; SILVA, JC Trichoderma: uso na agricultura. Brasília: **Embrapa**, p. 21-43, 2019.

BRITO, F. S.; MILLER, P. R. M.; STADNIK, M. Presença de *Trichoderma* spp. em composto e suas características para o controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 43-53, 2010.

CARLILE, M. J, WATKINSON, S. C, GOODAY, G.W. The Fungi. 2ed. Elsevier Academic Press, UK, 2001.

CARNEIRO, Solange Monteiro de Toledo Piza Gomes; ZULIAN TEIXEIRA, Marcus. HOMEOPATIA E CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS E SEUS PATÓGENOS. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 17, n. 3, 2018.

CHAPLA, Vanessa M.; BIASETTO, Carolina R.; ARAUJO, Angela R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de química**, p. 421-437, 2013.

CORAGEM, Rafaela Dourado. **Produção de quitinase por fungos do gênero Trichoderma**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso.

COSTA, JP.C. da; MÜLLER, C.H. Fruticultura tropical: o biribazeiro *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. Belém: **EMBRAPA-CPATU**, 1995. 35p. (EMBRAPA- -CPATU. Documentos, 84).

CUNHA JUNIOR, R M.; DOMINGUES, P. B. A.; AMBRÓSIO, R. O.; MARTINS, C. A. F.; SILVA, J. G. B. P. C. P.; PIERI, F. A. Brazilian amazon plants: an overview of chemical composition and biological activity. In: **Natural Resources Management and Biological Sciences**. IntechOpen, 2020. Disponível em: <https://www.intechopen.com/online-first/brazilian-amazon--plants-an-overview-of-chemical-composition-and-biological-activity>. Acesso em: Acesso em 20 abr. 2023.

DA SILVA, Camila Joyce Alves; DO NASCIMENTO MALTA, Diana Jussara. A importância dos fungos na biotecnologia. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT-PERNAMBUCO**, v. 2, n. 3, p. 49-49, 2016.

DA SILVA RUFINO, João Lucas; ABEGG, Maxwel Adriano. Mapeamento Sistemático das produções sobre bioprospecção na Amazônia entre o período de 2010-2020. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 5, p. e34911528179-e34911528179, 2022.

DE ALMEIDA, Alex Fernando; DO AMARAL SANTOS, Claudia Cristina Auler. Frutos amazônicos: biotecnologia e sustentabilidade. **Portal de Livros da Editora**, v. 1, n. 24, p. Lv24-Lv24, 2020.

DINIZ, Fernanda Viana; LIMA, Yara de Moura Magalhães; PAZ, Franciarli Silva da; SILVA, André Lucas Domingos da; GOMES, Laura Cordeiro; SANTOS, Geysel Souza; CARVALHO, Clarice Maia. Atividade enzimática de fungos endofíticos de bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.). **Biota Amazônia**, Macapá, v. 10, n. 3, p. 7-11, 2020.

DÓRIA, Karolina Marie Alix Benedictte Van Sebroeck. **Caracterização morfológica, cultural, molecular e enzimática de isolados de Fusarium spp., de Seringueira**. 2012.

CHATROU, L. W.; RAINER, H.; MAAS, P. J. M. **Annonaceae (Soursop Family)**. In N. Smith (Ed.), Flowering plants of the Neotropics (p. 18-20). Princeton: Princeton University

Press. 2004

ELAD, Y.; CHET, I.; BOYLE, P.; HENIS, Y. (1983) - Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* – Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. **Phytopathology**, vol.73, n.1, p. 85-88.

ELIAS, F. C. de P; SOUSA, I. B. U; PASSOS, J. P; PAULA, C. B. C de; ALMEIDA, E. C. V; CONTIERO, J; ALMEIDA, A. F. Frutos amazônicos como fonte de aplicações biotecnológicas. **Coletânea Frutos amazônicos: biotecnologia e sustentabilidade**. Palmas, TO: EDUFT. p. 10 – 25. 2020.

ETHUR, L. Z. Dinâmica populacional e ação de **Trichoderma no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro**. 2006. 154 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Área de Concentração Fitopatologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

FAVORETTO, Naira Beatriz. **Produção de substâncias bioativas por microrganismos endofíticos isolados do cerrado de São Carlos-SP**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2010.

FRAGA, Marcelo Elias *et al.* Bioprospecção de *Trichoderma* spp. com potencial enzimático. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 37, n. 2, 2021.

FROZZA, Rafaela Campostrini. *et al.* **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. v.1. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. 875p.

FUNG, Andresa Toledo. **Ação de fungos endofíticos de oliveira (*Olea europaea*) sobre formigas-cortadeiras (*Atta sexdens*) e seu fungo mutualista (*Leucoagaricus gongylophorus*)**. 2023.

GALVES, Jeane Macelino; OLIVEIRA, Diná Almeida de; CORREIA, Kelly Bárbara dos Santos. **Bioprospecção na Amazônia: um mapeamento sistemático dos recursos biológicos e genéticos**. 2021.

GOMES, Daniela Neto Ferreira. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco**. 2007.

GONÇALVES, Francisco José Teixeira; FREIRE, Francisco das Chagas Oliveira; LIMA, Joilson Silva Lima. Fungos endofíticos e seu potencial como produtores de compostos bioativos. **Essentia**, Sobral, vol. 15, nº 1, p. 71-92, jun./nov. 2013.

HENNING, Ademir Assis. **Guia prático para identificação de fungos mais frequentes em sementes de soja**. Brasília, DF : Embrapa, 2015.

JUNIOR, Aloisio Freitas Chagas *et al.* Ação de *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. **Agri-environmental sciences**, v. 4, n. 2, p. 9-15, 2018.

KIILL, Lúcia Helena Piedade; COSTA, João Gomes da. Biologia floral e sistema de

reprodução de *Annona squamosa* L.(Annonaceae) na região de Petrolina-PE. **Ciência Rural**, v. 33, p. 851-856, 2003.

KIRSCH, L. de S. *et al.* Caracterização parcial de proteases produzidas por *Fusarium oxysporum* isolado de *Brugmansia suaveolens*.

KIRK, P. M. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. In 8th International Mycological Congress (IMC8). International Mycological Association. 2015.

LARRAN, S.; ROLLAN, C.; ANGELES, B. H.; ALIPPI, H. E.; URRUTIA, M. I. Endophytic fungi in healthy soybean leaves. *Investigación Agraria: Producción y Protección de Vegetales*, p. 173–177, 2002.

LIMA, A. C. M.; SANTOS, I. L. dos; BASTOS, L. T. A. de; PAULA-ELIAS, F. C. de; ALMEIDA, A. F. de. Potencial de frutos amazônicos para a produção de enzimas microbianas. **Coletânea Frutos amazônicos: biotecnologia e sustentabilidade**. Palmas, TO: EDUFT. p. 48 – 63. 2020.

LIMA, A. M. **Potencial de substâncias coloridas produzidas por fungos endofíticos amazônicos para o diagnóstico baciloscópico da tuberculose**. 2013, 109 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) –Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

MADIGAN, Michael T. *et al.* **Microbiologia de Brock - 14ª Edição**. Artmed Editora, 2016.

MAAS, P.; LOBÃO, A.; RAINER, H. 2015 *Annonaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil2015.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110252>>. Acessado em: 23 Jan. 2024.

MAAS, Paul JM et al. An updated index to genera, species, and infraspecific taxa of Neotropical Annonaceae. **Nordic Journal of Botany**, v. 29, n. 3, p. 257-356, 2011.

MARTÍNEZ, Danay Ynfante et al. Caracterización morfo–cultural y variabilidad genética y molecular de aislamientos de *Trichoderma*: **Variabilidad de aislamientos de *Trichoderma***. **Biotecnia**, v. 25, n. 2, p. 194-203, 2023.

MAZAROTTO, Edson José et al. Diversidade de Fungos Endofíticos em Sementes de Espécies Florestais Nativas na Região Sul do Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 49, p. e257357, 2023.

MEZZARI, A.; FUENTEFRIA, A. M.; **Micologia no laboratório clínico**. Barueri, SP: Manole, 2012.

MILANESI, Paola M. et al. Biocontrole de *Fusarium* spp. com *Trichoderma* spp. e promoção de crescimento em plântulas de soja. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, p. 347-356, 2013.

MOSCA, José Luiz; CAVALCANTE, Carlos Eliardo Barros; DANTAS, Tatiana Mourão. Características botânicas das principais anonáceas e aspectos fisiológicos de maturação. **Fortaleza: Embrapa agroindústria tropical**, 2006.

MOTA, A. M.; GASPAROTTO, L. **Fungos associados a síndrome da queda de frutos da pupunheira.** 1998.

MUELLER, G. M.; SCHMIT, J. P. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict?. **Biodiversity and Conservation**, London, v.16, p.1-5, 2007.

Murray, P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M. A.; Tenover, F.C.; Tenover, R.H. 1999. **Manual of Clinical Microbiology.** 7ª ed. ASM, Washington, EUA.1773p.

NASCIMENTO, M. C. S. Constituintes bioorgânicos isolados de *Annona cacans* Warming (Annonaceae) e avaliações de bioatividades. 2008. 173 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2008.

NOZAKI, Denise Nakada. **Variabilidade genética de *Fusarium* spp. isolados de solos e de bananeiras com sintomas do Mal-do-Panamá.** 2003.

PEIXOTO-NETO, P.A.; AZEVEDO; J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos Endofíticos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 29, p. 62-76, 2002.

PEIXOTO, Pedro Accioly Neto Sá; DE AZEVEDO, João Lúcio; CAETANO, Luiz Carlos. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y aromáticas**, v. 3, n. 4, p. 69-72, 2004.

PEREIRA, Fernanda Fumie Onoyama *et al.* **Produção, purificação e caracterização da atividade proteolítica produzida por *trichoderma harzianum*.** 2011.

PIMENTEL, M. R. et al. The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. **Biotechnology Research International**, 2011.

PRAZERES, Janaina Nicanuzia. **Produção, purificação e caracterização da lipase alcalina de *Fusarium oxysporum*.** Tese de Doutorado. 2006.

RODRIGUES, Matheus Vieira Machado. **Potenciais aplicações de microrganismos endofíticos na promoção do desenvolvimento vegetal.** 2014.

RODRIGUEZ, R. J.; WHITE, J. F.; ARNOLD, A. E.; REDMAN, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **The New Phytologist**, Oxford, v.182, p.314-330, 2009.

SANTIN, Rita de Cássia Madail. Potencial do uso dos fungos *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* em *Phaseolus vulgaris*. 2008.

SANTOS, L. S.; RHODEN, S. A.; BARROS, I. T.; TONINI, R. C.G.; MARQUES, R. M.; SOUZA, V. H. E.; PAMPHILE, J. A. A interação harmônica entre fungos e plantas: aspectos da relação endófito/hospedeiro. **Rev. Saúde e Biologia.**, v.8, n.1, p.92-101, 2013.

SANTOS, L. C. R. M. **Resíduos produzidos nas feiras abertas da cidade de Manaus como substrato para o cultivo e produção de lacase por *Pleurotus ostreatus*:** Universidade do

Estado do Amazonas, 2016. 51 f. (Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia). Universidade do Estado Amazonas, 2016.

SANTOS, Tamara Fonseca Bastos. **Bioprospecção de fungos filamentosos endofíticos de espécies medicinais com potencial de produzir moléculas de interesse biotecnológico.** 2018. 83-f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2018.

SANTOS, Amanda Caroline Nascimento dos *et al.* **Trichoderma spp. para o controle biológico de fitopatógenos.** 2022.

SILVA, L.M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V.J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. *Acta Botanica Brasilica*, Porto Alegre, v.19, n.1, p.183-194, 2005.

SILVA, Flavia Martins da; LACERDA, Paulo Sérgio Berço de; JONES JUNIOR, Joel. Desenvolvimento sustentável e química verde. **Química Nova**, v. 28, p. 103-110, 2005.

SILVA, GERARDA BEATRIZ PINTO DA *et al.* Identificação e utilização de *Trichoderma* spp. armazenados e nativos no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Revista Caatinga**, v. 28, p. 33-42, 2015.

SILVA, Jackeline Figueira *et al.* **FUNGOS FITOPATOGÊNICOS ÀS MUDAS DE TUCUMÃ** (*Astrocaryum vulgare* MART.). 2011.

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

SOUZA, K. R. de; ALVES, B. G.; RAPOSO, D. de S.; SOUSA, T. F.; DANTAS, P. H. S.; FELIX, C. G. S.; KRAMER, Y. V.; SILVA, G. F. da; KOOLEN, H. H. F. Criação de uma micoteca de fungos endofíticos de frutas regionais com potencial antimalárico. **Diversidade Microbiana da Amazônia**, Manaus: Editora INPA, vol. 3, p. 39-45. 2019.

SOUZA, R. V.; SOUZA, J. D.; OLIVEIRA, A. D. da S.; RODRIGUES, D. dos S.; SANTOS, C. C. A. do A. Potencial biotecnológico de microrganismos autóctones de frutos amazônicos. **Coletânea Frutos amazônicos: biotecnologia e sustentabilidade.** Palmas, TO: EDUFT. p. 38 – 47. 2020.

SOUZA, B. S.; SANTOS, T. T. Endophytic fungi in economically important plants: ecological aspects, diversity and potential biotechnological applications. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v.4, n.2, pp.113-126, 2017.

SOUZA, Wilza Carla Oliveira de *et al.* **Diversidade genética de *Fusarium* spp. e Manejo Alternativo da Fusariose do abacaxizeiro.** 2016.

SOUZA, Mayane Pereira de *et al.* **Estudo químico de fungos endofíticos associados a *Duguetia stelechantha* e *Rollinia* sp.(Annonaceae).** 2012.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and molecular biology reviews*. P. 491–502, Dez, 2003.

TAKAHASHI, J. P. F., BECEGATO, E. Z., ROCHA, N., KIMURA, L. M., FERNANDES, K. R., & GUERRA, J. M. (2016). A biologia molecular como ferramenta para identificação fúngica em amostras de tecido. **Boletim do Instituto Adolfo Lutz-BIAL**, p. 1-2, 2016.

TRABULSI, Luiz Rachid *et al.* **Microbiologia**. 2004.

WAKELIN, S.A.; Warren, R.A.; Kong, L. e Harvey, P.R. (2008) - Management factors affecting size and structure of soil Fusarium communities under ir-rigated maize in Australia. *Applied Soil Ecology*, vol.39, n.2, p. 201–209.

WILSON, D. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oiko*, 274–276, 1995.

YADAV, S; SHANKER, R. The Effect of Some Enzymes on the Natural Properties of Fiber Clothing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 90, 132-140. (2018)