



Atividade enzimática de fungos endofíticos das plantas medicinais amazônicas Mulateiro (*Calycophyllum spruceanum*) e Sucuuba (*Himatanthus sucuuba*)

Enzymatic activity of endophytic fungi of the Amazonian medicinal plants Mulateiro (*Calycophyllum spruceanum*) and Sucuuba (*Himatanthus sucuuba*)

G. R. Q. Mendonça^{1*}; A. B. S. Coradin¹; R. S. A. Neto²; M. S. Romualdo²; F. V. Diniz³; C. M. Carvalho⁴.

¹Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, Universidade Federal do Acre, 69915-900, Rio Branco, Acre, Brasil

²Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental, Universidade Federal do Acre, 69915-900, Rio Branco, Acre, Brasil

³Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Produção Vegetal, Universidade Federal do Acre, 69915-900, Rio Branco, Acre, Brasil

⁴Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Universidade Federal do Acre, 69915-900, Rio Branco, Acre, Brasil

*gleisonrafael13@gmail.com

(Recebido em 31 de janeiro de 2023; aceito em 13 de setembro de 2023)

Os microrganismos endofíticos residem nos tecidos das plantas sem tipicamente causar malefícios durante parte do seu ciclo de vida e são conhecidos principalmente por seu papel benéfico para a planta hospedeira. Dentre suas diversas aplicabilidades, fungos endofíticos são uma fonte de muitas enzimas industriais interessantes, como lipases, amilases, proteases e celulases. Assim, esse trabalho teve como objetivo analisar a atividade enzimática de fungos endofíticos associados às plantas medicinais amazônicas mulateiro (*Calycophyllum spruceanum*) e sucuuba (*Himatanthus sucuuba*). Foram reativadas morfoespécies de fungos endofíticos em meio Batata-Dextrose-Ágar e incubados a 28 °C. Os fungos reativados foram identificados pela análise macro e micromorfológica e avaliados quanto a atividade enzimática *in vitro*. Os fungos endofíticos de *C. spruceanum* avaliados produzem protease (52%), celulase (33%), lipase (33%) e amilase (24%). Os fungos endofíticos de *H. sucuuba* avaliados também apresentaram alto potencial na produção de enzimas extracelulares como celulase (69%), protease (62%), lipase (12%) e amilase (6%). Os gêneros fúngicos *Phomopsis* e *Fusarium* apresentaram maior quantidade de estirpes com atividade positiva. Os fungos endofíticos de *C. spruceanum* e *H. sucuuba* são promissores produtores de enzimas de interesse industrial.

Palavras-chave: protease, *Phomopsis*, *Fusarium*.

Endophytic microorganisms reside in plant tissues without typically causing harm during part of their life cycle and are primarily known for their beneficial role for the host plant. Among their many applications, endophytic fungi are a source of many interesting industrial enzymes, such as lipases, amylases, proteases and cellulases. Thus, this work aimed to analyze the enzymatic activity of endophytic fungi associated with the Amazonian medicinal plants mulateiro (*Calycophyllum spruceanum*) and sucuuba (*Himatanthus sucuuba*). Morphospecies of endophytic fungi were reactivated in Potato-Dextrose-Agar medium and incubated at 28 °C. Reactivated fungi were identified by macro and micromorphological analysis and evaluated for *in vitro* enzymatic activity. The evaluated endophytic fungi of *C. spruceanum* produce protease (52%), cellulase (33%), lipase (33%) and amylase (24%). The evaluated endophytic fungi of *H. sucuuba* also showed a high potential in the production of extracellular enzymes such as cellulase (69%), protease (62%), lipase (12%) and amylase (6%). The fungal genera *Phomopsis* and *Fusarium* present a greater quantity of strains with positive activity. The endophytic fungi of *C. spruceanum* and *H. sucuuba* are promising producers of enzymes of industrial interest.

Keywords: protease, *Phomopsis*, *Fusarium*.

1. INTRODUÇÃO

A Amazônia abriga cerca de 50% da biodiversidade global, e quase 70% desta floresta está localizada na Amazônia Brasileira, representando cerca de um terço das florestas tropicais do

mundo. Tal variedade de espécies de plantas justifica o fomento de novas pesquisas de plantas nativas e seus fungos endofíticos como possíveis fontes produtoras de substâncias de interesse tecnológico [1]. Dentre estas espécies amazônicas de interesse podem ser citadas as plantas medicinais *Calycophyllum spruceanum* e *Himatanthus sucuuba*.

Calycophyllum spruceanum Benth. Hook. f. ex K. Schum (Rubiaceae) é uma espécie nativa da Amazônia que pode ser encontrada no Brasil, Bolívia, Equador e Peru [2]. É especialmente distribuída ao longo do rio Amazonas, onde forma agrupamentos quase homogêneos, chamados matas-de-pau-mulato no Brasil ou capironais no Peru. A árvore é popularmente conhecida no Brasil pelo nome de mulateiro ou pau mulato e sua madeira é intensamente explorada pela indústria [3].

Das várias propriedades medicinais do mulateiro destacam-se cicatrizante, antimicótica, antibacteriana, antioxidante, antienvhecimento, dermatológica, antiparasítica, repelente e inseticida, sendo empregada inclusive em cosméticos. Esta planta possui metabólitos eficazes na proteção contra raios ultravioleta, funcionando como rejuvenescedor [4].

Outra planta medicinal amazônica de interesse é *Himatanthus sucuuba* (Spruce ex Müll. Arg.) Woodson, conhecida popularmente como sucuuba, planta cujo látex, casca do caule e folhas possuem ácidos fenólicos, lupeol, ácido β -diidro-plumbericínico, plumericina, plumerídeo, entre outros componentes. Alguns destes têm sido associados a atividades biológicas como antiúlcera, anti-inflamatória e cicatrizante [5].

Himatanthus sucuuba é uma planta conhecida principalmente na Amazônia Brasileira, onde exhibe características próprias como uma espécie latescente, de tronco e casca rugosa, possui folhas glabras, coriáceas e de margens inteiras com poucas flores, grandes e brancas e os frutos são geminados contendo sementes aladas. Estudos já descreveram a presença de irinóides, substâncias essas que têm várias atividades biológicas e, usadas popularmente, para tratar dores nas costas, dor de dente e para a cicatrização de feridas [6].

Além das plantas amazônicas, os microrganismos endofíticos também desempenham importante papel na produção de moléculas de interesse. Os endófitos representam microrganismos que residem nos tecidos das plantas sem tipicamente causar qualquer efeito adverso às plantas durante uma parte considerável do seu ciclo de vida e são conhecidos principalmente por seu papel benéfico para a planta hospedeira. Esses microrganismos podem sintetizar *in vitro* metabólitos secundários semelhantes aos metabólitos produzidos *in vivo* por suas plantas hospedeiras, e os produtos oriundos do metabolismo primário e secundário de fungos endofíticos já tem comprovadas aplicações em diversas áreas tecnológicas [7].

Dentre as substâncias de interesse tecnológico produzido por microrganismos endofíticos, as enzimas hidrolíticas tem despertado interesse. A enzima amilase, por exemplo, é utilizada no processo de fabricação do açúcar, conferindo uma redução no teor de amido do açúcar. As lipases têm a capacidade de hidrolisar gorduras em ácidos graxos e gliceróis na interface água-lipídio e podem reverter a reação em meios não aquosos e as torna as enzimas mais utilizadas em várias aplicações industriais [8]. Proteases são responsáveis por catalisar a quebra de ligações peptídicas de proteínas em aminoácidos e peptídeos. Na indústria, as proteases são utilizadas para a produção de alimentos, insumos farmacêuticos, detergentes, alimentos para animais, produtos químicos e fotografia [9]. A produção de celulase por microrganismos está sendo estudada para reduzir o custo de quebra da biomassa vegetal por hidrólise e fermentação de açúcares [10].

A principal desvantagem tecnológica da aplicação dessas enzimas como biocatalisadores é o alto custo do emprego das enzimas, a partir da imobilização enzimática, que tem se mostrado uma poderosa ferramenta para melhorar as propriedades enzimáticas, como a alta atividade e seletividade [11].

Assim, este trabalho tem como objetivo analisar a atividade enzimática de fungos endofíticos associados a plantas medicinais amazônicas mulateiro (*Calycophyllum spruceanum*) e sucuuba (*Himatanthus sucuuba*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reativação de fungos endofíticos

Foram reativadas morfoespécies de fungos endofíticos isolados de caule e folha de *Calycophyllum spruceanum* e *Himatanthus sucuuba* armazenados na coleção de fungos endofíticos do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Acre (UFAC). A reativação das amostras fúngicas armazenadas em água destilada foi realizada por meio da inoculação dos fungos em meio Batata-Dextrose-Ágar-BDA (200g de batata, 20g de dextrose e 15g de ágar em 1 L de água destilada) e incubação a 28 °C por 7 dias.

Observado crescimento micelial, os fungos foram transferidos para tubos com meio BDA e armazenados a temperatura ambiente [12]. As reativações que apresentaram crescimento de contaminantes junto ao crescimento fúngico foram submetidas a purificação fúngica utilizando a técnica de estria por esgotamento [13].

2.2 Identificação de fungos endofíticos

Os fungos endofíticos foram caracterizados de acordo com suas características macro e micromorfológicas. Para a caracterização macromorfológica, foram observadas características da colônia, como cor, textura e produção de pigmentos [13].

A identificação micromorfológica dos fungos endofíticos reativados foi realizada a partir da técnica de microcultivo. Estes foram inoculados em cubos de 1 cm² de meio BDA e meio Aveia (30 g de aveia, 15 ágar para 1L de água destilada) cobertos com lamínula, em placas de Petri. As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 7 dias para crescimento micelial. Posteriormente, as lamínulas foram coradas com azul de lactofenol para observação das estruturas reprodutivas em microscópio ótico [14] e utilizada bibliografia específica para identificação [15].

2.3 Ensaio Enzimático

A avaliação da produção enzimática de fungos endofíticos foi realizada após cultivo das estirpes em meio BDA durante 7 dias a 28 °C. Posteriormente, discos de 5 mm de diâmetro de micélio fúngico foram inoculados em meios específicos para cada enzima e incubadas a 28 °C por 7 dias.

2.3.1 Atividade celulolítica

Para o teste de degradação de celulose, discos foram inoculados em meio sólido contendo 10g de ágar carboximetilcelulose (CMC) e 15g de ágar para 1L de água destilada. Após incubação, as placas foram coradas com iodo sublimado por 10 min para a revelação e mensuração do halo de degradação de CMC [16].

2.3.2 Atividade amilolítica

Para avaliar a degradação de amido, discos foram inoculados em meio mínimo (0,19g de NaNO₃, 0,59g de KH₂PO₄, 0,25g de MgSO₄.7H₂O, 0,25g de KCl, 0,005g de FeSO₄.7H₂O, 15g de ágar) acrescido de 2,7g de extrato de carne, 4,5g de peptona e 1% de amido para 1 L de água destilada. Após período de incubação foi utilizado iodo sublimado por 10 min como agente revelador. Os resultados das reações enzimáticas positivas foram identificados pela formação de um halo de degradação translúcido ao redor da colônia [17].

2.3.3 Atividade lipolítica

Para avaliar a degradação de lipídeos, discos foram inoculados em meio mínimo (0,19g de NaNO_3 , 0,59g de KH_2PO_4 , 0,25g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25g de KCl , 0,005g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5g glicose e 15g ágar para 1L), suplementado com 2% de Tween 80, e ajuste de pH a 6,5 [18]. A reação enzimática é positiva para lipase quando observada formação de cristais de ácido láurico em volta da colônia após 7 dias a 4 °C.

2.3.4 Atividade proteolítica

Para avaliar a degradação de proteína, discos foram inoculados em meio mínimo (0,19g de NaNO_3 , 0,59g de KH_2PO_4 , 0,25g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25g de KCl , 0,005g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5g de glicose e 15g de ágar para 1L de água destilada), suplementado com 2% de leite desnatado e pH ajustado a 6,5. Os resultados das reações enzimáticas positivas foram identificados pela formação de um halo de degradação translúcido ao redor da colônia [17].

2.4 Índice Enzimático e atividade enzimática

A determinação do índice enzimático foi expressa mediante a relação do diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia [19]. Os isolados que exibiram os maiores índices nos meios de cultivo avaliados são os que possuem maior potencial enzimático extracelular [20] Todas as atividades foram avaliadas em triplicata. $IE = dh / dc$, onde: IE: índice enzimático, dh: diâmetro do halo e dc: diâmetro da colônia.

3. RESULTADOS

Foram reativados 37 fungos endofíticos, sendo 21 (57%) de *Calycophyllum spruceanum* e 16 (43%) de *Himatanthus sicutuba*, que estavam armazenados na coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia da UFAC.

Foram analisadas as características macro e micromorfológicas (Figura 1) dos fungos endofíticos de *C. spruceanum* e identificados os gêneros *Phomopsis* (29%), *Fusarium* (19%), *Penicillium* (9%), *Lasiodiplodia* (5%), *Xylaria* (5%), *Trichoderma* (5%), e de *H. sicutuba* foram identificados os gêneros *Fusarium* (19%), *Phomopsis* (19%), *Paecilomyces* (6%), *Penicillium* (6%), *Colletotrichum* (6%) e *Pestalotiopsis* (6%). Os fungos que não produziram estrutura reprodutiva para caracterização por métodos macro e micromorfológicos foram caracterizados como Micélio estéril.

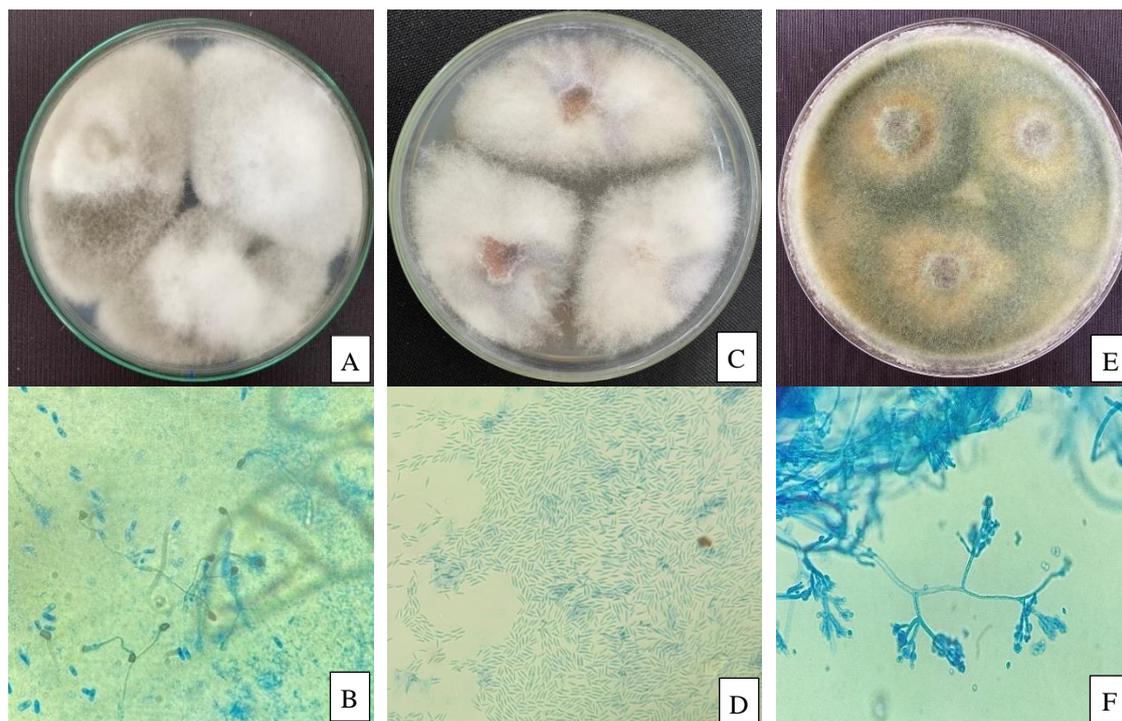


Figura 1: Análise macro e micromorfológica dos fungos endofíticos **A e B**. *Colletotrichum* sp. 1 (2.3366) isolado de *Calycophyllum spruceanum*; **C e D**. *Fusarium* sp. 1 (2.2853) isolado de *Himatanthus sucuuba*; **E e F**. *Trichoderma* sp. 1 (2.3025) isolado de *Calycophyllum spruceanum*.

Todos os fungos endofíticos de *C. spruceanum* reativados foram submetidos aos ensaios enzimáticos em substrato sólido. Foi observado que os fungos endofíticos de *C. spruceanum* avaliados produzem enzimas extracelulares de interesse industrial como protease (52%), celulase (33%), lipase (33%) e amilase (24%) (Tabela 1).

Tabela 1. Produção de enzimas por fungos endofíticos de *Calycophyllum spruceanum*.

| Registro | Identificação | Índice Enzimático | | | |
|----------|-----------------------------|-------------------|-------------|-------------|-------------|
| | | Amilase | Protease | Lipase | Celulase |
| 2.3043 | <i>Phomopsis</i> sp. 1 | - | 1,02 ± 0,03 | - | - |
| 2.3085 | <i>Phomopsis</i> sp. 2 | - | 1,02 ± 0,03 | - | - |
| 2.3186 | <i>Phomopsis</i> sp. 3 | - | - | 1,18 ± 0,05 | - |
| 2.3228 | <i>Phomopsis</i> sp. 4 | 1,01 ± 0,01 | 1,14 ± 0,16 | 1,23 ± 0,02 | - |
| 2.3482 | <i>Phomopsis</i> sp. 5 | - | - | - | 1,30 ± 0,13 |
| 2.3076 | <i>Phomopsis</i> sp. 6 | - | - | - | 1,15 ± 0,48 |
| 2.1518 | <i>Fusarium</i> sp. 1 | - | - | 1,20 ± 0,04 | - |
| 2.3096 | <i>Fusarium</i> sp. 2 | - | - | 1,23 ± 0,06 | - |
| 2.3341 | <i>Fusarium</i> sp. 3 | - | - | - | - |
| 2.3099 | <i>Fusarium</i> sp. 4 | 1,33 ± 0,01 | - | 1,31 ± 0,04 | - |
| 2.2566 | <i>Penicillium</i> sp. 1 | - | - | - | - |
| 2.1506 | <i>Penicillium</i> sp. 2 | - | - | - | - |
| 2.2540 | <i>Lasiodiplodia</i> sp. 1 | - | 1,05 ± 0,09 | - | 1,60 ± 0,09 |
| 2.3025 | <i>Trichoderma</i> sp. 1 | 1,01 ± 0 | - | - | 1,50 ± 0,64 |
| 2.2546 | <i>Xylaria</i> sp. 1 | - | 1,01 ± 0,01 | - | - |
| 2.3366 | <i>Colletotrichum</i> sp. 1 | - | 1,09 ± 0,04 | - | - |
| 2.3350 | Micélio estéril sp. 1 | - | 1,01 ± 0,01 | 1,39 ± 0,20 | - |
| 2.1654 | Micélio estéril sp. 2 | 1,17 ± 0,12 | 1,34 ± 0,07 | - | 1,10 ± 0,09 |
| 2.3304 | Micélio estéril sp. 3 | - | 1,10 ± 0,02 | 1,39 ± 0,15 | 1,10 ± 0,09 |
| 2.2417 | Micélio estéril sp. 4 | - | 1,72 ± 0,21 | - | - |
| 2.3048 | Micélio estéril sp. 5 | 1,01 ± 0 | 1,01 ± 0,01 | - | 6,0 ± 0 |
| | % | 24 | 52 | 33 | 33 |

Os fungos endofíticos de *H. succuba* avaliados também apresentaram alto potencial na produção de enzimas extracelulares de interesse industrial como celulase (69%), protease (62%), lipase (12%) e amilase (6%) (Tabela 2; Figura 2).

Tabela 2. Produção de enzimas por fungos endofíticos de *Himatanthus succuba*.

| Registro | Identificação | Índice Enzimático | | | |
|----------|-----------------------------|-------------------|------------|------------|------------|
| | | Amilase | Protease | Lipase | Celulase |
| 2.2853 | <i>Fusarium</i> sp. 1 | - | 1,1 ± 0,19 | - | 1,0 ± 0,00 |
| 2.3445 | <i>Fusarium</i> sp. 2 | - | - | - | 1,0 ± 0,00 |
| 2.3499 | <i>Fusarium</i> sp. 3 | - | 1,5 ± 0,43 | - | - |
| 2.2859 | <i>Phomopsis</i> sp. 1 | - | 1,3 ± 0,14 | 1,0 ± 0,00 | 1,8 ± 0,20 |
| 2.2838 | <i>Phomopsis</i> sp. 2 | - | - | - | 1,4 ± 0,44 |
| 2.3026 | <i>Phomopsis</i> sp. 3 | - | - | - | 1,0 ± 0,00 |
| 2.2825 | <i>Penicillium</i> sp. 1 | - | - | - | - |
| 2.2219 | <i>Paecilomyces</i> sp. 1 | - | - | - | - |
| 2.3441 | <i>Colletotrichum</i> sp. 1 | - | - | - | 1,9 ± 0,47 |
| 2.2939 | <i>Pestalotiopsis</i> sp. 1 | - | 1,0 ± 0,04 | - | 2,7 ± 0,70 |
| 2.2910 | Micélio estéril sp. 1 | - | 1,2 ± 0,03 | 1,0 ± 0,00 | 1,7 ± 0,10 |
| 2.2216 | Micélio estéril sp. 2 | - | 1,8 ± 0,38 | - | 1,8 ± 0,21 |
| 2.1773 | Micélio estéril sp. 3 | 1,1 ± 0,15 | 1,4 ± 0,35 | - | 1,0 ± 0,00 |
| 2.1694 | Micélio estéril sp. 4 | - | 1,3 ± 0,32 | - | - |
| 2.2365 | Micélio estéril sp. 5 | - | 1,0 ± 0,00 | - | 3,2 ± 0,47 |
| 2.3539 | Micélio estéril sp. 6 | - | 1,5 ± 0,00 | - | - |
| | % | 6 | 62 | 12 | 69 |

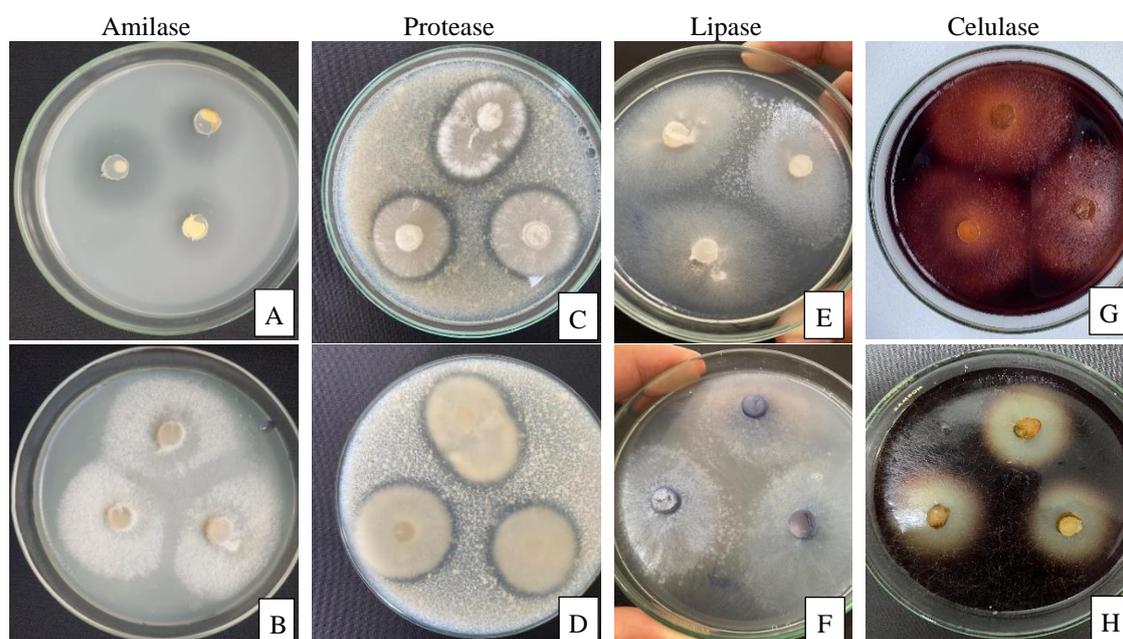


Figura 2. Atividade enzimática de fungos endofíticos de *Calycophyllum spruceanum* e *Himatanthus succuba*. **A e B.** Atividade amilolítica de (A) Micélio estéril sp. 3 (2.1773) e (B) Micélio estéril sp. 1 (2.3350); **C e D.** Atividade proteolítica de Micélio estéril sp. 4 (2.2417); **E e F.** Atividade lipolítica de (E) *Fusarium* sp. 4 (2.3099) e (F) *Fusarium* sp. 1 (2.1518); **G e H.** Atividade celulolítica de (G) *Fusarium* sp. 4 (2.3099) e (H) Micélio estéril sp. 5 (2.3048).

Os gêneros fúngicos que se destacaram quanto ao potencial em produzir amilase foram *Phomopsis* (16,6%), *Fusarium* (16,6%) e *Trichoderma* (16,6%). Já em relação a produção de protease, destacaram-se representantes dos gêneros *Phomopsis* (20%) e *Fusarium* (10%). Quanto a produção de lipase, *Phomopsis* (33,3%) e *Fusarium* (33,3%) tiveram destaque, semelhante à

produção de celulase, onde *Phomopsis* (27,5%) e *Fusarium* (11%) tiveram resultados promissores (Figura 3).

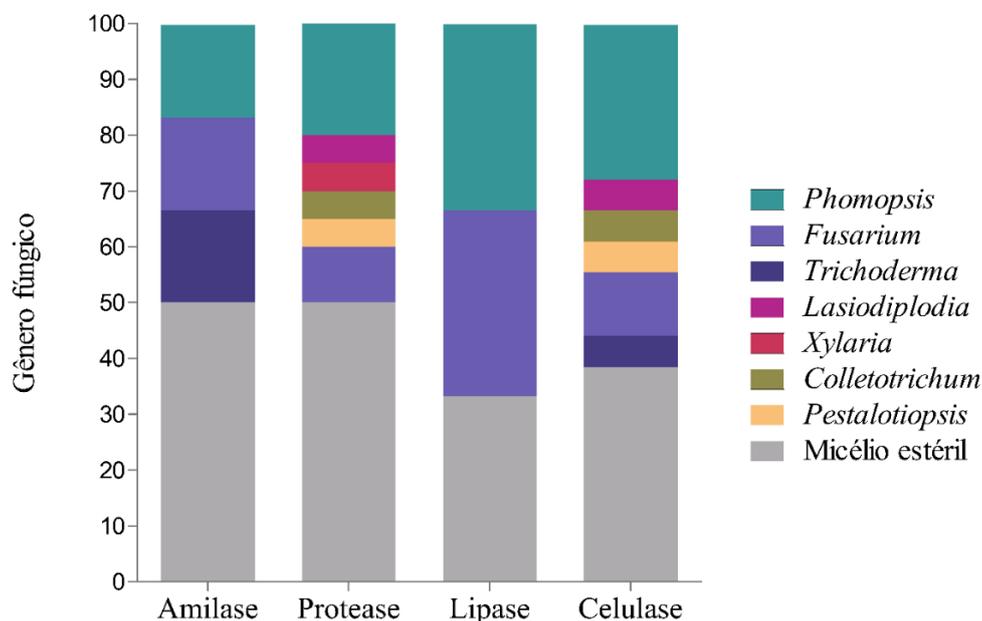


Figura 3. Fungos endofíticos isolados de *Calycophyllum spruceanum* e *Himatanthus sucuuba* com atividade enzimática positiva para amilase, protease, lipase e celulase.

4. DISCUSSÃO

Os fungos endofíticos de *Calycophyllum spruceanum* e *Himatanthus sucuuba* são potenciais produtores de enzimas de interesse industrial, sendo os isolados de *C. spruceanum* avaliados produtores de protease (52%), celulase (33%), lipase (33%) e amilase (24%) e os isolados de *H. sucuuba* produtores de celulase (69%), protease (62%), lipase (12%) e amilase (6%). Ao avaliar a atividade enzimática de fungos endofíticos da espécie amazônica *Oenocarpus bacaba*, foi observado que 62,5% dos isolados analisados apresentaram atividade para celulase, 37,5% para amilase e 12,5% para protease e lipase [21].

O estudo do perfil enzimático *in vitro* de fungos endofíticos das espécies amazônicas *C. spruceanum* e *H. sucuuba* revelou que 52% e 62% dos fungos isolados apresentaram atividade proteolítica, respectivamente. Na produção dessa enzima *in vitro*, foram observadas atividades das estirpes Micélio estéril sp. 4 (2.2417), Micélio estéril sp. 2 (2.1654) e *Phomopsis* sp. 4 (2.3228), isolados de *C. spruceanum*. Outras três morfoespécies do gênero *Phomopsis* apresentaram atividade proteolítica, além de representantes dos gêneros *Lasiodiplodia*, *Xylaria* e *Colletotrichum*. Isolados de *H. sucuuba* destacaram-se Micélio estéril sp. 2 (2.2216), *Fusarium* sp. 3 (2.3499) e Micélio estéril sp. 3 (2.1773). Outros representantes dos gêneros *Phomopsis* e *Pestalotiopsis* isolados de *H. sucuuba* também demonstraram potencial proteolítico. Em seu habitat natural, endófitos produzem proteases que desempenham papel importante no controle biológico de fitopatógenos, a partir da degradação de paredes celulares de hifas dos patógenos [22]. Na indústria, é crescente a demanda por fontes alternativas de proteases, onde proteases microbianas ganham destaque por sua ampla aplicabilidade em diversos processos biotecnológicos, como o processamento de alimentos e produtos farmacêuticos, além da indústria do couro e de detergentes [8]. *Penicillium janthinellum* (produtor de Carboxipeptidase P) e *Aspergillus oryzae* (produtor de Flavorzyme) são exemplos de fungos produtores de proteases com uso comercial difundido a nível global [11].

Em relação a atividade celulolítica, 33% dos fungos isolados de *C. spruceanum* e 69% dos isolados de *H. sucuuba* apresentaram resultados positivos. Isolados de *C. spruceanum*

destacaram-se Micélio estéril sp. 5 (2.3048), *Lasiodiplodia* sp. 1 (2.2540) e *Trichoderma* sp. 1 (2.3025). Outras duas morfoespécies do gênero *Phomopsis* foram positivos para atividade celulolítica. Isolados de *H. sucuuba* com destaque para produção de celulase foram Micélio estéril sp. 5 (2.2365), *Pestalotiopsis* sp. 1 (2.2939) e *Colletotrichum* sp. 1 (2.3441). Outros representantes dos gêneros *Fusarium* e *Phomopsis* isolados de *H. sucuuba* também apresentaram atividade positiva para a produção de celulase *in vitro*. Endófitos fúngicos produtores de celulase já relatados na literatura incluem *Fusarium solani* isolado de *Catharanthus roseus* [23] e *Phomopsis* sp. isolado de *Pinus massoniana* [24]. As celulases, juntamente com as hemicelulases e as pectinases, estão entre os grupos mais importantes de enzimas que são empregadas no processamento de materiais lignocelulósicos para a produção de ração, combustível e de produtos químicos [25]. Na indústria têxtil, as celulases são utilizadas para tratamento de fibras e no processo de maceração, na indústria alimentícia para extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais, na indústria de ração animal essa enzima pode promover um aumento na qualidade nutritiva e na indústria de biocombustíveis atua na produção de etanol lignocelulósico [8].

Entre os fungos endofíticos isolados de *C. spruceanum*, 24% apresentaram atividade amilolítica, enquanto para os isolados de *H. sucuuba* foram apenas 6%. *Fusarium* sp. 4 (2.3099), Micélio estéril sp. 2 (2.1654), *Phomopsis* sp. 4 (2.3228) e *Trichoderma* sp. 1 (2.3025) destacam-se entre os isolados de *C. spruceanum*, enquanto apenas o isolado Micélio estéril sp. 3 (2.1773) apresentou atividade amilolítica entre os isolados de *H. sucuuba*. Ao avaliar a atividade amilolítica de fungos endofíticos da espécie amazônica *Oenocarpus bacaba*, *Phomopsis* sp., *Penicillium* sp. e um isolado Micélio estéril foram destacáveis [21]. As enzimas amilolíticas representam cerca de 30% do total de enzimas industriais e devido às enormes vantagens do processamento enzimático do amido sobre hidrólise química, as amilases hoje substituem o uso de produtos químicos agressivos nas indústrias [25].

Do total de fungos avaliados quanto a atividade lipolítica, 33% dos isolados de *C. spruceanum* e 12% dos isolados de *H. sucuuba* apresentaram resultado positivo. Dos isolados de *C. spruceanum*, destacam-se Micélio estéril sp. 1 (2.3350) e sp. 3 (2.3304) e *Fusarium* sp. 4 (2.3099). Outros isolados dos gêneros *Fusarium* e *Phomopsis* também produziram lipase *in vitro*. Foram destacáveis entre os isolados de *H. sucuuba* as morfoespécies *Phomopsis* sp. 1 (2.2859) e Micélio estéril sp. 1 (2.2910) com atividade positiva para a produção dessa enzima. Quando avaliada a atividade lipolítica de fungos endofíticos da espécie amazônica *Oenocarpus bacaba*, somente um isolado do gênero *Phomopsis* apresentou resultado positivo [21]. Outros representantes do gênero *Fusarium* também são relatados como produtores de lipases [26]. Em seu habitat, essas enzimas são produzidas por endófitos para auxiliar na entrada desses microrganismos no tecido vegetal, na obtenção de nutrientes e para enfrentamento de mecanismos de defesa do hospedeiro durante a etapa de colonização [27]. Endófitos capazes de produzir lipases têm sido alvo de pesquisas nos últimos anos devido sua ampla aplicação catalisadora de reações de interesterificação, alcoólise, acidólise, esterificação e aminólise na natureza e quando sob condições adequadas *in vitro* [8].

A produção de enzimas microbianas desponta como importante setor alternativo para a biotecnologia industrial, onde esses catalisadores biológicos são utilizados para a aceleração de processos químicos [11]. Além da hábil produção enzimática, microrganismos ganham destaque devido a possibilidade de produção em larga escala e viabilidade ecológica [28].

5. CONCLUSÃO

Os fungos endofíticos das espécies amazônicas *Calycophyllum spruceanum* e *Himatanthus sucuuba* são potenciais produtores de enzimas proteolíticas, celulolíticas, amilolíticas e lipolíticas, onde os gêneros fúngicos *Phomopsis* e *Fusarium* apresentaram maior quantidade de estirpes com atividade positiva.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Neri-Numa IA, Carvalho-Silva LB, Morales JP, Malta LG, Muramoto MT, Ferreira JEM, et al. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh—Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. *Food Res Int.* 2013;50(1):70-6. doi: 10.1016/j.foodres.2012.09.032
2. Saldaña CL, Cancan JD, Cruz W, Correa MY, Ramos M, Cuellar E, et al. Genetic diversity and population structure of capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth.) from the Peruvian Amazon revealed by RAPD markers. *Forests.* 2021;12(8):1125. doi: 10.3390/f12081125
3. Santos AB, Ribeiro-Oliveira JP, Carvalho CM. Sobre a botânica, a etnofarmacologia e a química de *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex K. Schum. *Rev Bras Plantas Med.* 2016;18(1):383-9. doi: 10.1590/1983-084X/15_152
4. Dookie R, Garcia A, Silva E, Nunez C, Silva W, Espinar MF. Estudo fitoquímico e ação antimicrobiana de *Calycophyllum spruceanum* (Mulateiro). *Braz J Dev.* 2021;7(5):53676-88. doi: 10.34117/bjdv.v7i5.30573
5. Ribeiro-Gomes MF, Viana-Diniz F, de-Araújo AV, Priscila-Peters PP, Maia-Carvalho C. Diversity and antibacterial activity of endophytic fungi of the Amazonian medicinal plant sucuba [*Himatanthus sucuuba* (Spruce ex Müll. Arg.) Woodson]. *Rev Acad Colomb Cienc Exactas Fis Nat.* 2022;46(178):217-32. doi: 10.18257/raccefyn.1525
6. Da Silva MB, Da Silva MP, Dos Reis Júnior JDD, Lima CAC, De Oliveira Souza A. Therapeutics activities of Amazonian plant *Himatanthus sucuuba* (Spruce ex Müll. Arg.) Woodson (Apocynaceae): a review. *J Adv Biol Biotechnol.* 2021;24(2):1-14. doi: 10.9734/JABB/2021/v24i230197
7. Pardo SNF, Fernandes GG, Lima VMS, Rego VM, De Souza WP, Ribeiro RV. Avaliação do potencial biotecnológico de fungos endofíticos. *Braz J Dev.* 2022;8(5):33120-40. doi: 10.34117/bjdv8n5-033
8. Shankar Naik B, Abrar S, Krishnappa M. Industrially important enzymes from fungal endophytes. In: Yadav AN, Singh S, Mishra S, Gupta A, editors. *Recent advancement in white biotechnology through fungi: Volume 1: Diversity and enzymes perspectives.* Switzerland: Springer Nature; 2019. p. 263-80. doi: 10.1007/978-3-030-10480-1_7
9. Bezerra JDP, Santos MGS, Svedese VM, Lima DMM, Fernandes MJS, Paiva LM, et al. Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. *World J Microbiol Biotechnol.* 2012;28:1989-95. doi: 10.1007/s11274-011-1001-2
10. Vázquez-Montoya EL, Castro-Ochoa LD, Maldonado-Mendoza IE, Luna-Suárez S, Castro-Martínez C. Moringa straw as cellulase production inducer and cellulolytic fungi source. *Rev Argent Microbiol.* 2020;52(1):4-12. doi: 10.1016/j.ram.2019.02.005
11. Mandal S, Banerjee D. Proteases from endophytic fungi with potential industrial applications. In: Yadav AN, Singh S, Mishra S, Gupta A, editors. *Recent advancement in white biotechnology through fungi: Volume 1: Diversity and enzymes perspectives.* Switzerland: Springer Nature; 2019. p. 319-59. doi:10.1007/978-3-030-10480-1_10
12. Ayala-Zermeño MA, Gallou A, Berlanga-Padilla AM, Andrade-Michel GY, Rodríguez-Rodríguez JC, Arredondo-Bernal HC, et al. Viability, purity, and genetic stability of entomopathogenic fungi species using different preservation methods. *Fungal Biol.* 2017;121(11):920-8. doi: 10.1016/j.funbio.2017.07.007
13. Araújo WL, Lacava PT, Marco J, Lima AODS, Sobral JK, Azevedo JLD, et al. Guia prático: Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos. Piracicaba (SP): Copiadora “Luiz de Queiroz”; 2010.
14. Shirling ET, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol.* 1966;16(3):313-40.
15. Barnett HL, Hunter BB. *Illustrated genera of imperfect fungi.* Minnesota (US): APS Press; 1998.
16. Meddeb-Mouelhi F, Moisan JK, Beauregard M. A comparison of plate assay methods for detecting extracellular cellulase and xylanase activity. *Enzyme Microb Technol.* 2014;66:16-9. doi: 10.1016/j.enzymictec.2014.07.004
17. Dingle J, Reid WW, Solomons GL. The enzymic degradation of pectin and other polysaccharides. II - Application of the ‘Cup-plate’ assay to the estimation of enzymes. *J Sci Food Agric.* 1953;4(3):149-55. doi: 10.1002/jsfa.2740040305

18. Sierra G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1957;23:15-22. doi: 10.1007/BF02545855
19. Hankin L, Anagnostakis SL. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* 1975;67(3):597-607. doi: 10.1080/00275514.1975.12019782
20. Silva RLDO, Luz JS, Silveira EBD, Cavalcante UMT. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). *Acta Bot Bras*. 2006;20(3):649-55. doi: 10.1590/S0102-33062006000300015
21. Diniz FV, Lima YDMM, Da Paz FS, Da Silva ALD, Gomes LC, Santos GS, et al. Atividade enzimática de fungos endofíticos de bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.). *Biota Amazônia*. 2020;10(3):7-11. doi: 10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v10n3p7-11
22. Bezerra VHS, Cardoso SL, Fonseca-Bazzo Y, Silveira D, Magalhães PO, Souza PM. Protease produced by endophytic fungi: a systematic review. *Molecules*. 2021;26(22):7062. doi: 10.3390/molecules26227062
23. Ayob FW, Simarani K. Endophytic filamentous fungi from a *Catharanthus roseus*: Identification and its hydrolytic enzymes. *Saudi Pharm J*. 2016;24(3):273-8. doi: 10.1016/j.jsps.2016.04.019
24. Tasia W, Melliawati R. Cellulase and xylanase production from three isolates of indigenous endophytic fungi. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2017;101(1):012035. doi: 10.1088/1755-1315/101/1/012035
25. Kango N, Jana UK, Choukade R. Fungal enzymes: sources and biotechnological applications. In: Satyanarayana T, Deshmukh SK, Deshpande, MV, editors. *Advancing frontiers in Mycology & Mycotechnology: Basic and applied aspects of fungi*. Singapore: Springer; 2019. p. 515-38. doi: 10.1007/978-981-13-9349-5
26. Amoah J, Ho SH, Hama S, Yoshida A, Nakanishi A, Hasunuma T, et al. Converting oils high in phospholipids to biodiesel using immobilized *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalysts expressing *Fusarium heterosporum* lipase. *Biochem Eng J*. 2016;105:10-5. doi: 10.1016/j.bej.2015.08.007
27. Mattoo AJ, Nonzom S. Endophytic fungi: Understanding complex cross-talks. *Symbiosis*. 2021;83(3):237-64. doi: 10.1007/s13199-020-00744-2
28. Falade AO, Adewole KE, Ekundayo TC. Aptitude of endophytic microbes for production of novel biocontrol agents and industrial enzymes towards agro-industrial sustainability. *Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci*. 2021;10(61):1-14. doi: 10.1186/s43088-021-00146-3