



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM REDE DE BIODIVERSIDADE E
BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL – BIONORTE



IRACIREMA DA SILVA SENA

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO AÇAIZEIRO
(*Euterpe oleracea* MART.) PRODUTORES DE LIPASES E AMILASES

MACAPÁ – AP
Dezembro/2022

IRACIREMA DA SILVA SENA

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO AÇAIZEIRO
(*Euterpe oleracea* MART.) PRODUTORES DE LIPASES E AMILASES

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, como requisito para a obtenção do Título de Doutor(a) em Biodiversidade e Biotecnologia.

MACAPÁ – AP
Dezembro/2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central/UNIFAP-Macapá-AP
Elaborado por Mário das Graças Carvalho Lima Júnior – CRB-2 / 1451

S474 Sena, Iracirema da Silva.
Isolamento e identificação de fungos endofíticos do açaizeiro (*Euterpe oleracea* MART.)
produtores de Lipases e Amilases / Iracirema da Silva Sena. - Macapá, 2022.
1 recurso eletrônico. 70 folhas.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em
Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, Macapá, 2022.
Orientador: Irlon Maciel Ferreira.

Modo de acesso: World Wide Web.
Formato de arquivo: Portable Document Format (PDF).

1. Enzimas. 2. Bioprospecção. 3. Açaí. I. Ferreira, Irlon Maciel, orientador. II. Universidade
Federal do Amapá. III. Título.

CDD 23. ed. – 540

SENA, Iracirema da Silva. **Isolamento e identificação de fungos endofíticos do açaizeiro (*Euterpe oleracea* MART.)
produtores de Lipases e Amilases.** Orientador: Irlon Maciel Ferreira. 2022. 70 f. Tese (Doutorado) - Programa de
Pós-Graduação em Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal. Universidade Federal do Amapá, Macapá,
2022.

IRACIREMA DA SILVA SENA

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO AÇAIZEIRO
(*Euterpe oleracea* MART.) PRODUTORES DE LIPASES E AMILASES

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, como requisito para a obtenção do Título de Doutor(a) em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em 12/12/2022

Banca examinadora

Prof. Dr. Irlon Maciel Ferreira (Orientador)
Universidade Federal do Amapá /UNIFAP

Documento assinado digitalmente
 ALEX BRUNO LOBATO RODRIGUES
Data: 06/02/2023 15:49:37-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Alex Bruno Rodrigues
Universidade Federal do Amapá /UNIFAP

Documento assinado digitalmente
 GISELE CUSTODIO DE SOUZA
Data: 06/02/2023 15:36:05-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof^a. Dra. Gisele Custodio de Souza
Governo do Estado do Amapá/GEA

Documento assinado digitalmente
 RAIMUNDO NONATO PICANCO SOUTO
Data: 08/02/2023 12:38:30-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto
Universidade Federal do Amapá /UNIFAP

Documento assinado digitalmente
 TIAGO MARCOLINO DE SOUZA
Data: 06/02/2023 16:35:27-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Tiago Marcolino de Souza
Universidade Estadual do Amapá/UEAP

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por sempre estar presente em minha vida agradeço especialmente à minha mãe Iracema e ao meu pai Braulino (*in memorian*) por serem os principais responsáveis por quem eu sou hoje, os meus irmãos, Gilson e Jose (*in memorian*), Iraciara e Iracimara, pelo amor, educação e apoio dedicados. Tudo isso e todos os momentos vividos nessa etapa da vida só fizeram sentido por causa da existência de vocês;

À minha querida amiga/irmã Adriana Maciel Ferreira, sempre esteve ao meu lado, é minha grande incentivadora! Obrigada por sempre ter uma palavra de carinho. Por sempre me ouvir e por sempre me dizer que eu conseguiria. Obrigada, de coração, por tudo! Esses agradecimentos vão muito além dos anos de doutorado, pois falam de momentos especiais cotidianos, que você compartilha comigo cada uma a seu modo. Com certeza a vida é mais leve;

Ao meu orientador de forma especial, Prof. Dr. Irlon Maciel Ferreira pela excelência profissional, pela contribuição, pelos ensinamentos, pela confiança depositada em mim na realização deste trabalho, pelo apoio, estando sempre disponíveis para me auxiliar em momentos adversos;

A família Maciel Ferreira gratidão Dona Fatima, Sr. Ismael, Thales, Sophia, Alexandro Florentino, Lidiery, Edi, Idelson, Ide, Ivan, Iran, Cecilia muito obrigado;

A Universidade Federal do Amapá UNIFAP e ao Programa de Pós-Graduação em Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, pelo ingresso no curso de doutorado, pela confiança, apoio e suporte;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amapá/FAPEAP, pelo financiamento desta pesquisa;

Ao Prof. Dr. José Carlos Tavares, pelo apoio institucional e transmitir o conhecimento em todos os momentos. Muito obrigado;

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária EMBRAPA/AP, ao Dr. Adilson Lopes Lima, pelas orientações e sugestões e pelo apoio institucional;

Aos amigos Victor, Swanny, Fabrício, Agerdânio, Koga pelo encorajamento, paciência, compreensão e disponibilidade demonstrados durante a realização deste trabalho. Muito obrigado;

Aos meus colegas do laboratório de Biocatálise e Síntese Orgânica Aplicada BIORG/UNIFAP, em especial Soninha, Bia, Dionísia, Fernando, Edmilson, Janaina, Inana, Barata. Obrigado pela ajuda, convívio e amizade A todos aqueles que participaram de alguma

forma para que eu chegasse até aqui e também aqueles que ainda estão participando desta trajetória. Muito obrigada pela amizade e companheirismo! A todos os professores, funcionários, técnicos, pelo apoio.

“Façamos agora o bem possível, que um dia colheremos. O que temos nós deixamos, o que somos nós levamos. Não basta saber, é indispensável ser. O amor que se faz apaga o mal que se fez. Vale a pena amar, o amor é alma da vida”

Divaldo Pereira Franco

SENA, Iracirema da Silva. Isolamento, identificação fungos endofíticos do açai (*Euterpe oleracea* Mart.) produtores de lipase e amilase. 2022. 65 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Universidade Federal de Amapá, Macapá, 2022.

RESUMO

Fungos endofíticos são micro-organismos que habitam o interior de planta hospedeira, sem causar danos aparentes ou apresentar estruturas externas visíveis. Vários desses fungos são importantes produtores de enzimas com interesse comercial, tais como, lipases e amilases. O açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é atualmente uma das espécies de palmeiras economicamente mais significativas da Amazônia brasileira e vários estudos estão direcionando suas atividades direta ou indiretamente para o açazeiro e seus derivados. Portanto, o objetivo deste trabalho foi isolar e identificar os principais fungos endofíticos presentes em *E. oleracea*, visando sua aplicação biotecnológica. Fragmentos de folhas, frutos e raízes foram devidamente higienizados e desinfetados para se obter os fungos endofíticos provenientes dessas partes do material botânico. Os fungos obtidos de *E. oleracea* foram cultivados em meios sólidos e líquidos, em diferentes faixas de temperatura e pH, e em diferentes dias. A triagem dos fungos endofíticos revelou os seguintes gêneros: *Pestalotiopsis* sp, *Neocosmospora* sp, *Colletotrichum* sp, *Fusarium* sp, *Penicillium* sp, *Aspergillus* sp, *Botryosphaeria* sp., com perfis de produção de lipase semelhantes. Para a avaliação da atividade enzimática amilolítica os fungos que apresentaram melhor índice enzimático foram os fungos *Aspergillus* sp. e o *Penicillium* sp. Diante disso, ressalta-se que o fungo endofíticos isolado de diversas partes do açazeiro podem ser potenciais candidatos para a produção de enzimas de interesse comercial global e de extrema importância biotecnológica, em razão de que esses micro-organismos são produtores de compostos biologicamente ativos, com indiscutível aproveitamento na indústria química e farmacêutica.

Palavras-chave: Enzimas; Bioprospecção; Açai.

SENA, Iracirema da Silva. Isolamento, identificação fungos endofíticos do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) produtores de lipase e amilase. 2022. 65 f Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Universidade Federal de Amapá, Macapá, 2022.

ABSTRACT

Endophytic fungi are microorganisms that inhabit the interior of the host plant, without causing apparent damage or presenting visible external structures. Several of these fungi are important producers of enzymes of commercial interest, such as lipases and amylases. The açaí tree (*Euterpe oleracea* Mart.) is currently one of the most economically significant palm species in the Brazilian Amazon and several studies are directing their activities directly or indirectly to the açaí palm and its derivatives. Therefore, the objective of this work was to isolate and identify the main endophytic fungi present in *E. oleracea*, aiming at their biotechnological application. Fragments of leaves, fruits and roots were properly sanitized and disinfected to obtain endophytic fungi from these parts of the botanical material. The fungi obtained from *E. oleracea* were cultivated in solid and liquid media, in different temperature and pH ranges, and on different days. The screening of endophytic fungi revealed the following genera: *Pestalotiopsis* sp, *Neocosmospora* sp, *Colletotrichum* sp, *Fusarium* sp, *Penicillium* sp, *Aspergillus* sp, *Botryosphaeria* sp., with similar lipase production profiles. For the evaluation of the amyolytic enzymatic activity, the fungi that presented the best enzymatic index were the *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. Therefore, it is emphasized that the endophytic fungus isolated from different parts of the açaí tree may be potential candidates for the production of enzymes of global commercial interest and of extreme biotechnological importance, because these microorganisms are producers of biologically active compounds, with indisputable use in the chemical and pharmaceutical industry.

Keywords: Enzymes; Bioprospecting; Açaí.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	11
OBJETIVOS.....	14
Objetivo geral.....	14
Objetivo específico.....	14
REFERENCIA.....	15
1. Fungos endofíticos produtores de enzimas lipases e amilases associados à espécie <i>Euterpe oleracea</i> Mart. da Amazônia Brasileira.....	17
1.1. Abstract.....	17
1.2. Introdução.....	18
1.2.1. Fungos endofíticos.....	19
1.2.2. Relação simbiótica entre fungos endofíticos e palmeiras amazônicas.....	19
1.2.3. Fungos endofíticos na família Arecaceae.....	20
1.2.4. Fungos endofíticos em <i>Euterpe</i> sp.....	20
1.2.5. Fungos endofíticos produtores de enzimas.....	21
1.2.6. Lipase produzidas por fungos endofíticos.....	22
1.2.7. Análise produzidas por fungos endofíticos.....	23
1.3. Conclusões.....	23
1.4. Referências.....	31
2. <i>Euterpe oleracea</i> Mart (Açaizeiro) from the Brazilian Amazon: A Novel Font of Fungi for Lipase Production.....	32
2.1. ABSTRACT.....	32
2.2. INTRODUÇÃO.....	33
2.3. Materials and Methods.....	33
2.3.1. Reagents and Solvents.....	33
2.3.2. Isolation and Identification of Endophytic Fungi from the Fruits of <i>E. oleracea</i> Mart.....	34
2.3.3. Identification and Conservation of Endophytic Fungi.....	34
2.3.4. Determining the Enzymatic Activity.....	34
2.3.5. Enzymatic Test for Lipase in a solid Environment.....	34
2.3.6. Lipase Production in a Liquid Environment.....	35
2.3.7. Quantification of Lipolytic Activity in a Liquid Medium.....	35
2.3.8. Statistical Analysis.....	35
2.3.9. Experimental Design and Statistical Model.....	35
2.4. Results and Discussion.....	36
2.4.1. Isolating and Purifying Endophytic Fungi.....	37
2.4.2 Screening of Lipase - Producing Endophytic Fungi.....	38
2.4.3. Experimental Design for Lipase with Endophytic Fungi <i>Pestalotiopsis</i> sp. (30) and <i>Aspergillus</i> sp. (24).....	42
2.5. Conclusions.....	43
2.6. References.....	47
3. Otimização da produção de amilase por fungos endofíticos isolados de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.....	48
3.1. ABSTRACT.....	48
3.2. INTRODUÇÃO.....	49
3.3. MATERIAIS E METODOS.....	50
3.3.1. Reagentes e solventes.....	50

3.3.2. Isolamento e identificação de fungos endofíticos da <i>Euterpe oleracea</i> Mart.....	50
3.3.3. Identificação e conservação dos fungos endofíticos.....	51
3.3.4. Análise microestrutural por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	51
3.3.5. Determinação da atividade enzimática.....	51
3.3.6. Teste enzimático para amilase em meio solido.....	51
3.3.7. Determinação da atividade enzimática.....	52
3.3.8. Dosagem da atividade enzimática.....	52
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
3.4.1. Desenho experimental e modelo estatístico.....	53
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
3.5.1. Isolamento, Identificação e seleção de fungos endofíticos.....	57
3.5.2. Planejamento experimental para produção relativa de amilase com os fungos endofíticos <i>Aspergillus</i> sp e <i>Penicillium</i> sp.....	61
3.5. CONCLUSÃO.....	62
3.6. REFERENCIA.....	65
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66

INTRODUÇÃO

Imersos à biodiversidade amazônica, a ocorrência de fungos endofíticos desempenha um importante papel simbiótico para as espécies, esses micro-organismos vivem em íntima associação com as plantas hospedeiras, colonizando os tecidos vegetais sem ocasionar danos ou sintomas, além de contribuir para o crescimento das espécies através da produção de fitorreguladores (PETRINI, 1991; ARNOLD et al., 2003; AFZAL; KHAN; SESSITSCH, 2014). Os fungos endofíticos destacam-se pela eficiente capacidade de produção de compostos microbianos, e principalmente no que tange a produção enzimática. As enzimas de origem microbiana, em específico, os endofíticos, apresentam elevada rentabilidade, baixo custo de produção, estabilidade em condições extremas e susceptibilidade genética para manipulação industrial (MURPHY; DOOHAN; HODKINSON, 2018).

A grande diversidade genética e a plasticidade fenotípica de micro-organismos existentes na natureza desempenham inúmeras funções nos mais variados processos dos ecossistemas, fazendo que a busca, a seleção e o melhoramento de produtos enzimáticos sejam inesgotáveis. É amplamente discutido que enzimas de origem microbiana despertam um grande interesse para vários setores industriais devido a sua grande diversidade bioquímica, a facilidade de manipulação genética e principalmente baixo custo de produção (ABREU et al., 2015). Além disso, as possibilidades de aplicação das enzimas são praticamente infindáveis, atuando desde processos simples, como na produção de detergentes, alimentos, biorremediação, recuperação de petróleo, entre outros (ORLANDELLI, 2012).

As enzimas de origem microbiana são exploradas comercialmente e utilizadas em escala industrial para catalisar diversos processos químicos, por serem menos dispendiosas e prejudiciais ao meio ambiente produtos químicos. Deste modo, a produção enzimática tornou-se hoje um negócio amplamente rentável, com rendimento anual de bilhões de dólares (MONTEIRO; SILVA, 2009). Assim, é grande o interesse e a necessidade na busca por conhecimento técnico-econômico da relação entre linhagem de micro-organismos, meio de produção, processo de fermentação, métodos de recuperação e demanda de mercado.

Nesse contexto, as enzimas secretadas por fungos endofíticos — lipases e amilases, despertam interesse em diferentes áreas industriais, como no desenvolvimento de insumos para biologia molecular; produção de bioetanol; tratamento de água residual e resíduos agroindustriais; processamento de bebidas, saborizantes, fabricação de detergentes e produtos farmacêuticos. (SRILAKSHMI et al., 2015; DABA et al., 2018; HYDE et al., 2019; RIGO et al., 2021). Em conjectura as usabilidades de enzimas, agregado a heterogeneidade de espécies de fungos endofíticos presentes da Amazônia brasileira, tem sido fonte de pesquisa e consequente obtenção de compostos naturais com atividade enzimática, imprescindíveis em

diversas áreas produtivas (CHOI et al., 2015; PIROTA et al., 2015).

Dado ao exposto, ressalta-se a espécie *Euterpe oleracea* Mart. popularmente conhecida como açazeiro, é uma das principais palmeiras de valor econômico da Região Norte. Dentre as inúmeras finalidades alimentícias, que a espécie fornece, destaca-se seu papel hospedeiro de uma micro diversidade de fungos endofíticos produtores de bioativos, como enzimas lipolíticas (DINIZ et al., 2020).

À vista da importância exposta, a exploração de enzimas, produzidas por espécies de fungos endofíticos isolados de *E. oleracea*, dentre elas as lipases, têm um amplo espectro de aplicação, as lipases por serem enzimas hidrossolúveis, atuam em substratos insolúveis e catalisam a hidrólise de triglicerídeos de cadeia longa (ácidos graxos livres e glicerol) (DOS SANTOS et al., 2021). As lipases despertam interesses econômicos e industriais, em razão de sua relativa facilidade de produção; enantiosseletividade e regiosseletividade; abundância de micro-organismo capazes de sintetizá-las; e por serem estáveis em solventes orgânicos e não necessitando de cofatores (RIGOLDI et al. 2018; TEIXEIRA; MILAGRE, 2020).

Somado a isso, há de se expor outras enzimas que também são produzidas a partir de espécies de fungos endofíticos isolados de *E. oleracea* e outras espécies vegetais as Amilases, um grupo de hidrolases que catalisam as ligações α -glicosídicas em amido. Ambas as enzimas, representam as enzimas de maior importância para a biotecnologia, devido à crescente demanda industrial de suas aplicações, bem como a facilidade em produção de larga escala industrial (KUMARI et al., 2019). São utilizadas na indústria alimentícia na produção de cervejas, geléias e obtenção de glucose livre para diversas aplicações. Além disso, estas enzimas são úteis na formulação de detergentes e nas indústrias de papel, farmacêutica, fermentação e têxtil (OLIVEIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2007).

Dada as circunstâncias, esta pesquisa apresenta as seguintes hipóteses de nulidade: (H0) Os fungos endofíticos isolados de *E. oleracea* nativa da Amazônia brasileira são efetivos produtores de enzimas, como lipases e amilases. E como hipótese alternativa (H1): Os fungos endofíticos de *E. oleracea* não são eficazes na produção de enzimas, como lipases e amilases. .

Dessa forma, no primeiro capítulo, expõe-se uma revisão bibliográfica de caráter analítico, associado a descritores booleanos, articulando os fungos endofíticos; espécies *E. oleracea* Mart. evidenciando a produção de enzimas com potencial biotecnológico.

No segundo capítulo, descreve-se *Euterpe oleracea* Mart (Açazeiro) da Amazônia brasileira: uma nova fonte de fungos para produção de lipase, é realizado taxonomia dos fungos endofíticos em níveis gêneros: *Pestalotiopsis* sp, *Neocosmospora* sp, *Colletotrichum* sp, *Fusarium* sp, *Penicillium* sp, *Aspergillus* sp, *Botryosphaeria* sp, *Mucor* sp, *Xylaria* sp, *Chaetomium* sp, *Trichoderma* sp e *Curvularia* sp.; ainda sendo demonstrado os principais os

fungos endofíticos, produtores da enzima lipase.

Outrossim, o terceiro capítulo, Otimização para produção de amilase por fungos endofíticos isolados de *E. oleracea*, o estudo aborda a realização do Screening dos fungos endofíticos, com perfis de produção de amilase, em seguimento ao estudo anterior, abrangendo a nível de gênero: *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Aspergillus* sp., *Botryosphaeria* sp., dos quais foi observado na cultura a formação de halo característico que evidencia a presença das enzimas testadas em análise, indicando a produção de amilase.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Isolar fungos endofíticos do açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart), produtores de lipases e amilases.

Objetivos específicos

- Coletar material botânico frutos, folhas e raízes de *E. oleracea*;
- Isolar os principais fungos endofíticos de *E. oleracea*;
- Identificar morfológicamente os principais fungos a nível de gênero e quanto ao potencial para atividade lipásica e amilolítica;
- Realizar um screening em cultivo meio sólido para selecionar os principais fungos produtores de enzimas;
- Otimizar as condições experimentais através da aplicação de planejamento fatorial;
- Avaliar a capacidade de produção enzimática (lipases e amilases) em meio líquido aplicando condições variáveis de temperatura, concentração de sais, pH e dias de fermentação.

A partir dos objetivos apresentados, foi estruturadas em três capítulos, nos quais são abordados os seguintes conteúdos:

* Capítulo 1: Fungos Endofíticos Produtores de Enzimas Lipases e Amilases Associados à Espécie *Euterpe oleracea* Mart. da Amazônia Brasileira.

* Capítulo 2: *Euterpe oleracea* Mart. (Açaizeiro) from the Brazilian Amazon: A Novel Font of Fungi for Lipase Production.

* Capítulo 3: Otimização da produção de amilase por fungos endofíticos isolados de *Euterpe oleracea* Mart.

REFERÊNCIAS

ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. *Revista Uningá Review*, v.2, n.1, p.55-59, 2015.

ARNOLD, A.E.; MEJIA, L.C.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 15649–15654.

AFZAL, MUHAMMAD; KHAN, QAISER M.; SESSITSCH, ANGELA. Endophytic bacteria: prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants. *Chemosphere*, v. 117, p. 232-242, 2014.

CHOI, J.-M.; HAN, S.-S.; KIM, H.-S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology advances*, 5 mar. 2015.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. *Revista Processos Químicos*, v.3, n.5, p.9-23, 2009.

MURPHY, B. R.; DOOHAN, F. M.; HODKINSON, T. R. From Concept to Commerce: Developing a Successful Fungal Endophyte Inoculant for Agricultural Crops. *Journal Fungi*, v. 4, p. 1-11, 2018.

DABA, G. M.; ELKHATEEB, W. A.; THOMAS, P. W. This era biotechnological tools: an insight into endophytic mycobiota. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, v.17, n.3, p.121-128, 2018.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. E CHAGAS-JUNIOR, A.F. Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, v.27, n.1, p. 61 – 66, 2007.

OLIVEIRA, A. C. D.; WATANABE, F.M.F.; RODRIGUES, M.L.F. Comparação entre fermentação no estado sólido e fermentação submersa para a produção de α -amilase por *Penicillium* sp. e caracterização da enzima. *Revista eletrônica. Biociências, Biotecnologia e Saúde*, v. 1, p. 822-831, 2011.

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

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. IN: Andrews.J, S. Hirano (EDS) *Microbial Ecology of Leaves*. Springer Verlag, Nova Iorque, 1991, p. 179-197.

HYDE, K. D.; XU, J.; RAPIOR, S. ET AL. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity*, v.97, n.1, p.1-136, 2019.

RIGO, D., GAYESKI, T. G, CAMERA F, ZENI J, VALDUGA E, CANSIAN R, BACKES G. Produção microbiológica de enzimas: Uma revisão. *Brazilian Journal of*

Development, v. 7, n. 1, p. 9232-9254, 2021.

SRILAKSHMI, J.; MADHAVI, J.; LAVANYA, S.; AMMANI, K. Commercial Potential of Fungal Protease: Past, Present and Future Prospects. Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences, v.2, n.4, p.218- 234, 2015.

PIROTA, R. D. P. B. ET AL. Caracterização de fungos isolados da região Amazônica quanto ao potencial para produção das enzimas envolvidas na conversão da biomassa vegetal. Ciência Rural, v. 45, n. 9, p. 1606–1612, set. 2015.

DINIZ, F.V. ET AL. Descrição de fungos endofíticos de bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.), sobre sua produção enzimática. Biota Amazônica., v. 10, n. 3, p. 7-11, 2020.

DOS SANTOS, C.I. A. ET AL. Lipases bacterianas: impactos na qualidade de produtos lácteos e potencial biotecnológico. Research, Society and Development, v. 10, n. 13, 2021.

RIGOLDI, F.; DONINI, S.; REDAELLI, A.; PARISINI, E.; GAUTIERI, A. Review: engineering of thermostable enzymes for industrial applications. Apl Bioengineering, v. 2, n. 1, p. 011501, mar. 2018.

TEIXEIRA, I. S.; MILAGRE, C. D. F. Evolução dirigida de enzimas: pequenas modificações, melhores biocatalisadores. Química Nova, v.46, n.6, p. 773-786, 2020.

KUMARI, N. ET AL., 2019. Microbial amylases: an overview on recent advancement. Journal of Entamology and Zoology Studies 7, 198-205, 2019.

*Artigo 1***CAPITULO 1 - Fungos Endofíticos Produtores de Enzimas Lipases e Amilases Associados à Espécie *Euterpe oleracea* Mart. da Amazônia Brasileira**

Endophytic Fungi Isolated from *Euterpe oleracea* Mart. from the Brazilian Amazon: Promising Producers of Lipase and Amylase Enzymes

Artigo foi submetido ao periódico Revista Virtual de Química (ONLINE) (ISSN 1984 - 6835), qualis B2 em biotecnologia, segundo a classificação do quadriênio 2017-2020 da plataforma Sucupira – CAPES.

Iracirema S. Sena,^{ab} Agerdania A. de Souza,^a Swany F. Borges,^a Adriana M. Ferreira,^{bc} Victor H. Marinho,^{ab} Rosemary de Carvalho R. Koga,^c Irlon M. Ferreira,^{ab*}

^a Grupo de Biocatálise e Síntese Orgânica Aplicada, Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal do Amapá, Rod. JK, KM 02, 68902-280, Macapá, Amapá, Brazil.

^b Programa de Pós-graduação em Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal,

^c Laboratório de Pesquisa em Fármacos, Universidade Federal do Amapá, Rod. JK, KM 02, 68902-280, Macapá, Amapá, Brazil.

*Corresponding author (e-mail): irlon.ferreira@gmail.com

1.1 Abstract

Symbiosis is caused by the invasion and colonization of plants by endophytic microorganisms without harming the host. As the Amazon Brazilian hosts, the greatest biodiversity in the world, its uniqueness in terms of temperature, humidity, different plant and animal species, and availability of organic matter regeneration is home to a large biodiversity of endophytic fungi, including the specie *Euterpe oleracea* mart. (Açaizeiro), belonging to the Arecaceae family, is a palm tree with a wide phytogeographical distribution and significant economic value. Endophytes not only found in Amazon palm trees are powerful producers of enzymes with added value in the chemical food and pharmaceutical industries, such as lipase and amylase. This is a systematic review of scientific articles reporting the biodiversity of endophytic fungi isolated from *E. oleracea* palms endemic to the eastern Amazon and demonstrating the potential and applicability of these microorganisms for enzyme production. Thus, studies of endophytic fungal enzyme diversity show that initial data from fungal species isolated in the genus *Euterpe* have been linked to fungal isolates in the species *E. oleracea* showing amylase and high enzymatic potential of lipase. This demonstrates the great potential and untapped enzymatic diversity of Amazonian endophytes.

Keywords: Microorganism; Amazonian biodiversity; hydrolytic enzymes.

1.2 Introdução

Microrganismos endofíticos de tecidos vegetais são endossimbiontes que colonizam os tecidos internos de uma espécie de planta sem causar danos ao hospedeiro.¹⁻⁵ O termo endofítico foi descrito pela primeira vez por De Bary em 1866. Dentre os microrganismos, os fungos representam uma gama de espécies que possuem relações simbióticas e benéficas com as plantas, além dos fatores bióticos e abióticos que permitem interações enzimáticas entre essas espécies.⁶⁻⁸

As enzimas são biocatalisadores responsáveis pela geração de novas ligações orgânicas, com alta especificidade molecular, regioseletividade, estereosseletividade e enantioseletividade, e participam de importantes reações químicas.⁹⁻¹⁰ Muitos gêneros de endófitos produzem compostos que também estão presentes em suas plantas hospedeiras.¹¹ Dentre as diferentes enzimas microbianas, destacam-se as proteases, celulases, tanases, fitases, amilases e lipases, amplamente utilizadas nas indústrias farmacéutica e biotecnológica.¹²⁻¹⁶

O potencial de sobrevivência dessas enzimas vem de seu uso sustentável e otimização para processos industriais. Portanto, a busca por fungos endofíticos que possam produzir certas enzimas altamente ativas tornou-se um campo de pesquisa promissor sob a perspectiva da química verde.¹⁷⁻¹⁸ Importantes endófitos da Amazônia brasileira, como endofíticos presentes em espécies de palmeiras, entre elas *Euterpe oleracea* Mart., popularmente conhecida como açazeiro, têm sido descritos como possuidores de alto potencial enzimático. Numerosas lipases fúngicas de *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Rhizopus* sp, *Mucor* sp e *Geotrichum* sp foram relatadas em vários estudos científicos e combinaram a empregabilidade industrial.¹⁹⁻²¹

Na família Arecaceae, enzimas amplamente disseminadas foram identificadas, incluindo amilases produzidas pelos fungos endofíticos *Penicillium* e *Aspergillus*,²² A Figura 1 mostra os principais gêneros fúngicos identificados nas espécies de *E. oleracea*.

Nesse sentido, uma revisão bibliográfica analítica de fungos endofíticos, produtores de amilases e lipases relacionados à família Arecaceae, demonstra aqueles encontrados na espécie *E. oleracea* na Amazônia brasileira

Portanto, esta revisão de literatura abrange espécies de fungos endofíticos isolados da espécie de palmeira *E. oleracea*, demonstra o potencial desta enzima para futuras pesquisas e aplicações biotecnológicas, e aborda a presença de fungos endofíticos na espécie examinada em questão. Estudos quantitativos a nível de gêneros e enzimas.

1.2.1 Fungos endofíticos

Os fungos endofíticos são microrganismos que estão presentes no interior das plantas, vivendo de forma simbiótica, sem causar prejuízos ou danos aparentes.³ O termo endofíticos, originalmente descrito por De Bary em 1866, refere-se a quaisquer microrganismos que vivem nos tecidos de plantas. Conceitualmente, são microrganismos que colonizam os tecidos internos das plantas sem causar prejuízos imediatos no hospedeiro. Embora esses microrganismos possam ser confundidos com patógenos, os endofíticos desempenham um papel importante para adaptação da planta ao meio.²⁴⁻²⁵ Alguns endofíticos produzem substâncias químicas, metabólitos primários e secundários.²⁶ Às vezes, eles podem produzir compostos bioativos semelhantes aos seus hospedeiros, e vários "metabólitos vegetais" podem realmente ser produtos biossintéticos de seus fungos endofíticos, e a recombinação genética de endofíticos e hospedeiros durante a evolução pode explicar ambas as semelhanças fitoquímicas entre as substâncias.²⁷

Atualmente sabe-se que os microrganismos endofíticos, contribuem para a planta em diversos aspectos, como defesa, competição com fitopatógenos, produção de metabólitos, indução de resistência sistêmica, e até mesmo crescimento vegetal por meio de regulação de substâncias de crescimento.²⁸ Os fungos endofíticos pertencem principalmente ao filo Ascomycota, incluindo várias espécies de Dothideomycetes e Sordariomycetes. Os gêneros mais encontrados são *Trichoderma*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Phoma*, *Xylaria*, *Alternaria* e *Botryosphaeria*.²⁹⁻³⁰ É importante salientar que, a maioria dos endofíticos ainda não foram devidamente caracterizados.³¹⁻³²

1.2.2 Relação simbiótica entre fungos endofíticos e palmeiras amazônicas

A biodiversidade na Amazônia tem sido estudada extensivamente ao longo dos anos, no entanto, poucos estudos têm focado nas comunidades de fungos endofíticos que colonizam a vegetação nativa.³³ Pesquisas científicas relacionadas a diversas espécies de fungos endofíticos colonizadores de palmeiras amazônicas, de interesse comercial, destacando-se estudos envolvendo *E. oleracea*, *E. precatoria*, *Attalea Kunth*, *Astrocaryum aculeatum*, e *Mauritia flexuosa* na região amazônica.³⁴⁻³⁶

Nesse sentido, em função indireta ao consumo humano, diversos fungos endofíticos têm sido relatados como agentes de proteção do ataque de insetos aos seus hospedeiros, como por exemplo *Acremonium loli*, *Balansia cyper*, *Cladosporium sphaerosperum*.³⁷⁻³⁹ Por outro lado, os fungos endofíticos se destacam pela síntese de metabólitos secundários semelhantes aos

produzidos por espécies vegetais colonizadas e, no mesmo sentido, as propriedades bioativas dos fungos podem surgir de interações fúngicas com espécies vegetais.^{9,40-41} Outros fatores, podem influenciar no processo de interação e no metabolismo dos fungos endofíticos, tais como, planta hospedeira, idade da planta, localização geográfica, condições geológicas e ecológicas, sazonalidade, altitude e níveis de precipitação, principalmente devido a ocorrência fitogeográfica das palmeiras dada a extensão da região Amazônica, pode ocorrer desde as florestas mais densas e úmidas até os cerrados.⁴²

1.2.3 Fungos endofíticos na família Arecaceae

As pesquisas com fungos endofíticos em espécies vegetais, concentram-se nas espécies pertencentes às regiões tropicais exemplo, os fungos endofíticos isolados das folhas *Licuala ramsayi* (Muell.), nativa da Austrália.⁴³ Na Amazônia Brasileira, foram isolados fungos endofíticos dos frutos de *E. oleracea*, ambas pertencentes à família Arecaceae.⁴⁴ Marcos históricos em pesquisas acerca de fungos em palmeiras datam de períodos entre 1880 a 1920, os quais incluem trabalhos de micologistas como P. Hennings, H. Rehm, O. Penzing, que demonstram a importância desses organismos para sociedade, como os relatos iniciais de Ascomycota, proveniente da família Arecaceae, com 592 espécies registradas; enquanto os micro-organismos das famílias Hyponectriaceae e Xylariaceae são relatados com maior representabilidade, perfazendo 77 espécies com 13 gêneros e 76 espécies com 13 gêneros, respectivamente, com identificações presentes na família Arecaceae,⁴⁵ todos com ocorrências em palmeiras amazônicas.

Pesquisas em palmeiras *Mauritia flexuosa* L. f. e *Mauritiella armata* Mart., encontradas no cerrado brasileiro, apontam 26 espécies de fungos colonizadores. O mesmo número de fungos foi registrado nos processos de decomposição das folhas de *Euterpe edulis* Mart. em experimentos realizados em reservas biológicas do Sudeste do Brasil.⁴⁶ Logo, diferentes espécies da família Arecaceae, apresentaram mapeamento diversificado para fungos endofíticos, que em geral concentrando-se nas espécies decorrentes das regiões temperadas e florestas tropicais.

1.2.4 Fungos endofíticos em *Euterpe* sp.

Com relação às palmeiras amazônicas, no gênero *Euterpe* sp., foram identificadas 57 espécies de fungos, evidenciando os ascomicetos e fungos conidiais. Quanto aos descritos na espécie *E. oleracea*, foram identificadas 21 espécies de fungos, com maior evidência de *Xilaria*

cubensis Mont, *Letendreaopsis palmarum*.⁴⁷ Na espécie *Euterpe precatória* Mart os fungos identificados foram *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Penicillium*, *Ulocladium*, *Fusarium* and *Aspergillus* sp.⁴⁸ Assim, estudos pioneiros de isolamento, foram feitos nas nervuras e/ou tecido foliar, entre as nervuras, ou no pecíolo, sendo possível a identificação em níveis de gêneros, de acordo com a Tabela 1.^{45,47,49}

Tabela 1. Gêneros de fungos identificados nas Espécies *E. oleracea* e *E. precatória* produtoras de enzimas lipase e amilase.

Gênero	Espécies	Enzima
<i>Xylaria</i> sp ^{1,2,47,50}	<i>Euterpe oleracea</i>	Amilase e Lipase
<i>Acremonium</i> sp ^{48,42}	<i>Euterpe precatória</i>	Amilase e Lipase
<i>Aspergillus</i> sp ^{48,51}	<i>Euterpe precatória</i>	Amilase e Lipase
<i>Penicillium</i> sp ^{48,52}	<i>Euterpe precatória</i>	Amilase e Lipase
<i>Curvularia</i> sp ^{48, 53,55}	<i>Euterpe oleracea</i>	Amilase e Lipase
<i>Phomopsis</i> sp ^{48,56}	<i>Euterpe oleracea</i>	Amilase e Lipase
<i>Fusarium</i> sp ^{48,57}	<i>Euterpe precatória</i>	Amilase e Lipase
<i>Colletotrichum</i> sp ^{49,57}	<i>Euterpe oleracea</i>	Amilase e Lipase
<i>Ulocladium</i> sp ^{48,57}	<i>Euterpe precatória</i>	Amilase e Lipase
<i>Guignardia</i> sp ^{48,57}	<i>Euterpe precatória</i>	Amilase e Lipase

1.2.5 Fungos endofíticos produtores de enzimas

O estudo de enzimas produzidas por fungos teve início no final do século XIX, quando Takamine⁵⁸ relatou a produção de enzimas amilolíticas pelo fungo *Aspergillus oryzae*. A seguir, apresentaremos algumas pesquisas e patentes sobre enzimas benéficas produzidas por fungos endofíticos como *Aspergillus* e *Penicillium*.

A maioria das enzimas comerciais são de origem microbiana, quando utilizado o processo de fermentação submersa, os metabólitos produzidos, têm sido empregados no desenvolvimento de biossensores, os quais são amplamente utilizados na descoberta e medição de contaminantes.^{42,60}

Os autores afirmam apenas que 80% dos fungos endofíticos produzem metabólitos

ativos que são influenciados por são afetados pelas condições de fermentação, mas a produção desses metabólitos secundários depende de uma variedade de fatores O ambiente e/ou interações simbióticas em que as plantas são colocadas ⁶¹. Substâncias biologicamente ativas, incluindo enzimas hidrolíticas ou hidrolises secretadas por fungos filamentosos⁶², são excelentes produtoras de enzimas e possibilidade de manipulação genética⁶³; entre outras enzimas, ações favorecem amilases e proteases respondem por 15% e 60% das necessidades da indústria de enzimas, respectivamente, e dentre estas, enzimas de fungos filamentosos como lipase, celulase, xilanase e fitase para fins industriais⁶⁴.

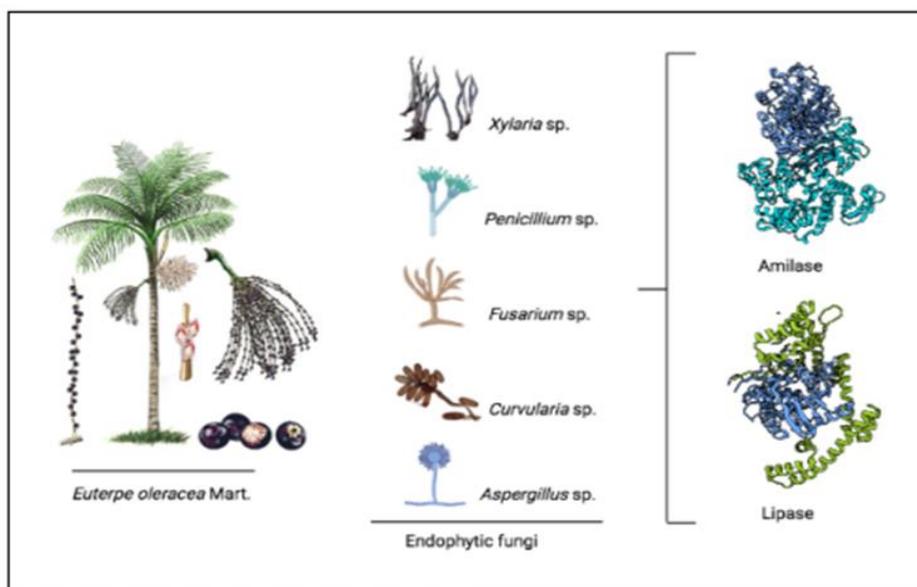
1.2.6 Lipase produzidas por fungos endofíticos

As Lipases, são enzimas pertencentes à classe das hidrolases, são responsáveis por catalisar reações hidrolíticas das ligações éster de triacilgliceróis em diacilgliceróis, monoacilgliceróis e ácidos graxos livres, estas reações de síntese podem ocorrer na ausência de água, sendo diretamente dependente do meio que são produzidas e tipo de substrato fornecido.^{60,65} Essas enzimas são bastante versáteis possuindo vantagens como: capacidade de atuar em diferentes faixas de pH (3-11), diferentes temperaturas (25, 30 e 35 °C), estabilidade frente a diversos solventes orgânicos, além de possuírem alta especificidade e seletividade.⁶⁶

Visto que essas enzimas vêm ganhando cada vez mais espaço no campo da pesquisa e desenvolvimento substanciando as vantagens ambientais de tecnologias verdes e princípios tecno-econômicos, substitua os catalisadores químicos tradicionais, fornecendo rendimentos mais altos e produtos mais seletivos⁶⁷. Essas atrações levaram ao interesse industrial na síntese de biodiesel e biolubrificantes, Síntese de detergentes, ésteres aromáticos e cosméticos, entre outras aplicações.⁶⁸⁻⁶⁹ A reação catalisada pelas lipases pode ser classificada como hidrólise,⁷⁰ que se subdivide em esterificação, transesterificação, alcoólise e finalmente acidólise.⁷¹

As lipases podem ser obtidas de vários organismos, todavia, os fungos endofíticos são um dos mais promissores para este fim, com destaque para os gêneros *Penicillium* sp., *Aspergillus. fumigatus*, *C. guillermondi*, *R. oryzae*, *Cercospora kikuchii*, *Lasiodiplodia theobromae*.⁷¹⁻⁷⁶

Figura 1. Gêneros de fungos identificados nas Espécies *E. oleracea* e *E. precatória* produtoras de enzimas lipases e amilases.⁷⁷



Fonte: Autora

1.2.7 Amilase produzidas por fungos endofíticos

As amilases estão dentre as mais importantes enzimas de aplicações industriais, que vem despertando o interesse de novos processos biotecnológicos.⁷⁸ Os espectros de aplicabilidades das amilases têm-se introduzido em áreas distintas, tais como clínica, farmacêutica, médica e químico-analítica. Multifuncionalidade que favorece o emprego dessa enzima, na sacarificação do amido e nas indústrias de alimentos, fermentação, papel e têxtil, além de serem usadas como aditivos em detergentes.⁷⁹ O uso da amilase está se tornando mais acessível, pois é potencializado devido à sua presença em animais, plantas e micro-organismos, no entanto, as amilases produzidas por fungos endofíticos dominam a maioria dos setores industriais com um enorme valor biotecnológico agregado, pois substituem produtos químicos usados para a hidrólise do amido,⁸⁰⁻⁸¹ prolongam a vida de prateleira dos produtos e também facilitam a aquisição de subprodutos intermediários, por exemplo, amilases capazes de reduzir a viscosidade de sucos de frutas, otimizando o processo de clarificação.⁸²⁻⁸³ As amilases mais utilizadas são as alfa-amilase, beta-amilase e glicoamilase.⁸⁴

1.3 Conclusões

Neste trabalho de revisão são descritos os fungos endofíticos presentes na espécie *E. oleracea* na Amazônia. Assinalou-se que apesar de mais de duas décadas de pesquisas,

principalmente por meio da produção compostos biologicamente ativos para fins terapêuticos, na área de produção enzimática, informações sobre contexto micro- e biotecnológico. No entanto, uma revisão da literatura científica indica que esses micro-organismos produzem enzimas, principalmente lipase e amilase. Como espécie *E. oleracea* cobijado e muito utilizado pela indústria alimentícia.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Amapá (FAPEAP, concessão nº 34568.515.22257.28052017) pelo apoio financeiro.

1.4 Referências bibliográficas

1. ARNOLD, A. E.; MEJIA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A.; Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003, 100, 15649.
2. AZEVEDO, J. A.; Em Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security; Kharwar, R. N.; Upadhyay, R.S.; Dubey, N. K.; Richa Raghuvanshi, R.; eds.; Springer: India, 2014. cap. 11.
3. DUTTA, D.; PUZARI, K. C.; GOGOI, R.; DUTTA, P.; Endophytes: exploitation as a tool in plant protection. Braz. arch. biol. Technol 2014, 57, 621.
4. TURIBIO, T. O.; FERREIRA, E. M. S.; SOUSA, F. M. P., SILVA J. F. M.; PIMENTA, R. S.; Verificação da produção de substâncias antimicrobianas por fungos endofíticos associados à Soja (*Glycin max* (L.) Merrill). Revista Cereus 2018 10, 92.
5. PETRINI, O.; Em Microbial Ecology of Leaves. Andrews, J. H.; Hirano, S. S. Eds.; Springer Verlag: Nova Iorque, 1991. cap. 9.
6. JIA, M.; CHEN, L.; XIN, H. L.; ZHENG, C. J.; RAHMAN, K.; HAN, T.; QIN, L. P. A. Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants. Journal Frontier's in Microbiology 2016, 7, 907.
7. SILVA, C. F.; Isolamento e seleção de micro-organismos produtores de enzimas de interesse comercial. Scientia Plena 2018, 14, 1.
8. XIAO, J.; ZHANG, Q.; GAO, Y-Q.; TANG, J-J.; ZHANG, A-L.; GAO, J-M.; Secondary Metabolites from the Endophytic *Botryosphaeria dothidea* of *Melia azedarach* and Their Antifungal, Antibacterial, Antioxidant, and Cytotoxic Activities. Journal of agriculture and Food Chemistry 2014, 62, 3584.

9. BOGAS, A. C.; CRUZ, F. P. N.; LACAVAL, P. T.; SOUSA, C. P.; Endophytic fungi: an overview on biotechnological and agronomic potential. *Brazilian Journal of Biology* 2022, 84, e258557.
10. SANTOS, V. H. P.; SILVA, E. O.; Endophytic Fungi from the Brazilian flora and their employment in biotransformation reactions. *Quim. Nova* 2019, 42, 784.
11. STROBEL, G.; Endophytes as sources of bioactive products. *Microb. Infect* 2003, 5, 535.
12. GURUNG, N.; RAY, S.; BOSE, S.; RAI, V.; A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *Biomed Res Int* 2013, 2013, 329121.
13. INTASIAN, P.; PRAKINEE, K.; PHINTHA, A.; TRISRIVIRAT, D.; WEERANOPANAT, N.; WONGNAT, T.; CHAYEN, P.; Enzymes, in vivo biocatalysis, and metabolic engineering for enabling a circular economy and sustainability. *Chem. Rev* 2021, 121, 10367.
14. RIGO, D.; GAYESKI, L.; TRES, G.; CAMERA, F.; ZENI, J.; VALDUGA, E.; CANSIAN, R.; BACKES, G.; Microbiological Production of Enzymes: a Review. *Brazilian Journal of Development* 2021, 7, 9232.
15. SALAZAR, L. N.; DAL MASO, S. S.; OGIMBOSVSKI, T. A.; DARONCHA, N. A.; ZENI, J.; VALDUGA, E.; BACKES, G. T.; CANSIAN, R. L.; Production, Partial Characterization and Application of Cellulases by Newly Isolated *Penicillium* sp. Using Agro-Industrial Substrate Solid State Fermentation. *Industrial Biotechnology* 2019, 15, 79.
16. SRIVASTAVA, N.; Production of Food-Processing Enzymes from Recombinant Microorganisms. *Enzymes in Food Biotechnology*. Department of Biotechnology: Cetiilm, Greater Noida, India, 2019
17. CHOUDHARY, M; GUPTA, S.; MANOJ K. DHAR, M. K.; KAUL, S.; Endophytic Fungi-Mediated Biocatalysis and Biotransformations Paving the Way Toward Green Chemistry. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2021, 16, 1.
18. PIROTA, R. D. P. B.; TONELOTTO, M.; DELABONA, P. S.; TREMACOLDI, C. R.; FARINAS, C. S.; Caracterização de fungos isolados da região Amazônica quanto ao potencial para produção das enzimas envolvidas na conversão da biomassa vegetal. *Ciência Rural* 2015, 45, 1606.
19. ANGAJALA, G.; PAVAN, P.; SUBASHINI, R. Lipases: An overview of its current challenges and prospective in the revolution of biocatalysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 2016, 7, 257.
20. BIROLI, W.; FERREIRA, I.; ALVARENGA, N.; SANTOS, D.; MATOS, I.; Biocatalysis and biotransformation in Brazil: An overview. *Biotechnology Advances* 2015, 33, 481.
21. LAGE, F. A. P.; BASSI, J. J.; CORRADINI, M. C. C.; TODERO, L. M.; LUIZ, J. H. H.;

- MENDES, A. A. Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. *Enzyme Microb. Technol* 2016, 84, 56.
22. DINIZ, F. V.; LIMA, Y. M. M.; PAZ, F. S.; SILVA, A. L. D.; GOMES, L. C.; SANTOS, G. S.; CARVALHO, C. M.; Atividade enzimática dos endofíticos de bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.). *Biota Amazônia* 2020, 10, 7.
23. DE SOUZA, A. A.; ORTÍZ, B. L. S.; CARVALHO, R. K. R.; SALES, P. F.; CUNHA, D. B.; GUERRA, A. L. M.; SOUZA, G. C.; CARVALHO, J. C. T.; Secondary Metabolites Found among the Species *Trattinnickia rhoifolia* Willd. *Molecules* 2021; 26, 7661.
24. RIBEIRO, A. DA S. PAMPHILE, J. A. Micro-organismos endofíticos e seu potencial biotecnológico. *Uningá Review* 2017. 29, 88.
25. WAGHUND, R. R.; SHELAK, R. M.; PRAMANIK, D.; SUTHAR, H.; PANDEY, P.; KIM, J-Y.; Application of cereal and vegetable endophytes in plant health management. *Microbiomes and plant health* 2021, 29.
26. SPECIAN, V.; ORLANDELLI, R. C.; FELBER, A. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Metabolitos Secundários de Interesse Farmacêuticos Produzidos por Fungos Endofíticos. *Unopar Cient, Cienc. Biol. Saúde*; 16 (4) 2014.
27. DA SILVA, S. G. M. 2022. Endophytic fungi: Benefits for plants and biotechnological potential. *Research, Society and Development* 2022, 11, e 9211427008.
28. POLLI, A.; FLORINDO DAS NEVES, A.; GALLO, F.; GAZARINI, J.; RHODEN; S. A.; ALENCAR PAMPHILE, J.; Aspectos da interação dos microrganismos endofíticos com plantas hospedeiras e sua aplicação no controle biológico de pragas na agricultura. *SaBios-Revista De Saúde E Biologia* 2012, 7, 82.
29. FONTANA, D. C.; DE PAULA S.; TORRES, A. G.; DE SOUZA, V. H. M; PASCHOLATI, S. F.; SCHMIDT, D.; DOURADO NETO, D; Endophytic Fungi: Biological Control and Induced Resistance to Phytopathogens and Abiotic Stresses. *Pathogens* 2021, 10, 570.
30. SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. *Mycological Research* 2005, 109, 661.
31. FADIJI, A. E.; BABALOLA, O. O.; Exploring the potentialities of beneficial endophytes for improved plant growth. *Saudi J Biol Sci.* 2020, 27, 3622.
32. RODRIGUEZ, R. J. ET AL. Fungal endophytes: diversity and functional roles: Tansley review. *New Phytologist* 2009, 182, 314.
33. CHAVERRI, P.; VÍLCHEZ, P.; Hypocrealean (Hypocreales, Ascomycota) Fungal Diversity in Different Stages of Tropical Forest Succession in Costa Rica. *Tropical Biology*

- and Conservation 2006, 38, 4 531.
34. CAVALLARI, M. M.; TOLEDO, M. M.; What is the name of the babassu? A note on the confusing use of scientific names for this important palm tree. *Rodriguésia* 2016, 67, 533.
 35. DIDONET, A. A.; FERRAZ, I. D. K.; O comércio de frutos de Tucumã (*Astrocaryum aculeatum* G. Mey. - Arecaceae) nas feiras de Manaus (Amazonas, Brasil). *Rev. Bras. Frutic* 2014, 36, 353.
 36. LIMA, J. M. E.; OLIVEIRA, A. J.; SMIDERLE, O. J.; LOUSADO, A. V. C.; CARVALHO, M. L. M. Physiological performance of açai seeds (*Euterpe oleracea* Mart.) stored with different moisture contents and treated with fungicide. *Journal of Seed Science* 2018, 40, 135.
 37. AMATUZZI, R. F.; CARDOSO, N.; POLTRONIERI, A. S.; POITEVIN, C. G.; DALZOTO, P.; ZAWADENEAK, M. A.; PIMENTEL, I. C.; Potential of endophytic fungi as biocontrol agents of *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera:Crambidae). *Braz. J. Biol.* 2018, 78, 429.
 38. AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR., W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W, L.; Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology* 2000, 3, 40.
 39. GÓMEZ-VIDAL, S.; LOPEZ-LLORCAH, V.; JANSSON, H-B.; SALINAS, J.; Endophytic colonization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) leaves by entomopathogenic fungi. *Micron* 2006, 37, 624.
 40. BILALI, L.; ASAF, S.; HAMAYUN, M.; GUL, H.; IQBAL, A.; ULLAH, I.; LEE, I.-J.; HUSSAIN, A.; Plant growth promoting endophytic fungi *Aspergillus fumigatus* TS1 and *Fusarium proliferatum* BRL1 produce gibberellins and regulates plant endogenous hormones. *Symbiosis* 2018, 76, 117.
 41. CARVALHO, C.R.; FERREIRA, D'S. A.; WEDGE, D.E.; CANTRELL, C.L.; ROSA, L.H.; Antifungal activities of cytochalasins produced by *Diaporthe miriciae*, an endophytic fungus associated with tropical medicinal plants. *Canadian Journal of Microbiology* 2018, 64, 835.
 42. ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A.C.; PAMPHILE, J. A.; Enzimas de Interesse Industrial: Produção por fungos e aplicações. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, 2012, 7, 97-109.
 43. FROSHLICH, J.; HYDE, K. D.; PETRINI, O.; Endophytic fungi associated with palms. *Mycol. Res.* 2000, 104, 1202.
 44. YANG, Y.; CHEN,J.; QI LIU, Q.; BEN, C.; TODD, C. D.; JISEN SHI,J.; YONGPING YANG, Y.; HU, X. Comparative Proteomic Analysis of the Thermotolerant Plant *Portulaca*

- oleracea* Acclimation to Combined High Temperature and Humidity Stress. J. Proteome Res 2012, 11, 3605.
45. FRÖHLICH, J.; HYDE, K. D.; Palm Microfungi. [Fungal Diversity Research Series 3]. Hong Kong: Fungal Diversity Press. 2000.
46. GRANDI, R. A. P.; Hifomicetos decompositores do folheto de *Euterpe edulis* Mart. Hoehnea 1999, 26: 87.
47. RODRIGUES, K. F. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. Mycologia 1994, 86, 376.
48. BATISTA, B. N.; RAPOSO, N. V. M.; SILVA, I. R.; Isolamento e avaliação da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos de açaizeiro. Fitos 2018, 12, 161.
49. TAYLOR, J. E.; HYDE, K. D.; JONES, E. B. G.; Endophytic fungi associated with the temperate palm *Trachycarpus fortunei* within and outside its natural geographic range. New Phytol 1999, 142, 335.
50. AMARAL, J F.; Resposta inflamatória do duodeno e íleo em camundongos BALB/c com mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil e tratados com açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Ouro Preto, 2022.
51. SUZUKI, S.; SHIMODA, M.; SHIMAZAKI, J.; OSHIRO, Y.; NISHIDA, K.; SHIIHARA, M.; IZUMO, W.; YAMAMOTO, M.; Drain Lipase Levels and Decreased Rate of Drain Amylase Levels as Independent Predictors of Pancreatic Fistula with Nomogram After Pancreaticoduodenectomy. World J Surg 2021 45, 1921.
52. FARHA, A. K.; HATHA, A. M.; Bioprospecting potential and secondary metabolite profile of a novel sediment-derived fungus *Penicillium* sp. ArCSPf from continental slope of Eastern Arabian Sea. Mycology 2019, 10, 109.
53. POONAM, P.; CAPOOR, M. R.; Em Ermatology: Fungal Infections of the Skin. Sarkar, R.; ed. Overseas Office, London, 2018. cap. 2.
54. CHUNG, SANG-JIN, 2016; Chung, Sang-Jin, Characterization of e fun *Alternaria alternata* α -Amylase, The Korean Journal of Mycology 1996, 24, 8
55. IFTIKHAR, T.; ABDULLAH, R.; IQTEDAR, M.; AFTAB, K.; AFTAB.; NIAZ, M.; SIDRA; BUSHRA TABASSUM, B.; MAJEED, H.; Production of lipases by *Alternaria* sp. (mbl 2810) through optimization of environmental conditions using submerged fermentation technique. International Journal of Biosciences 2015, 7, 178.
56. LAKSHMEESHA, T. R.; SATEESH, M. K.; VEDASHREE, S.; MOHAMMAD, S. S.; Antifungal activity of some medicinal plants on Soybean seed-borne *Macrophomina phaseolina*. Journal of Applied Pharmaceutical Science 2013, 3, 84.
57. MEZZOMO, R.; ROLIM, J. M.; SANTOS, A. F.; POLETTO, T.; WALKER, C.; MACIEL,

- C. G.; MUNIZ, M. F. B.; Aggressiveness of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* isolates to yerba-mate and production of extracellular enzymes. *Summa Phytopathol* 2019, 45, 141.
58. TAKAMINE, J.; Enzyme of *Aspergillus oryzae* and the Application of its Amylolytic Enzyme to the Fermentation Industry. *J. Ind. Eng. Chem* 1914, 6, 824.
59. BARBESGAARD, P.; HELDT-HANSEN, H. P.; DIDERICHSEN, B.; On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 1992, 36, 569.
60. CORTEZ, D. V.; CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S.; Potencial Catalítico de Lipases Ligadas ao Micélio de Fungos Filamentosos em Processos de Biotransformação. *Quim. Nova* 2017, 40, 85.
61. SPECIAN, V.; ORLANDELLI, R. C.; FELBER, A. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPIL, J. A.; Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. *UNOPAR Cient., Ciênc. Biol. Saúde* 2014, 16, 8.
62. HAMADA EL-GENDI, et al., 2022. A Comprehensive Insight into Fungal Enzymes: Structure, Classification, and Their Role in Mankind's Challenges. *J. Fungi* 2022, 8, 23.
63. SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O.; A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology* 2015, 46, 337.
64. HASAN, S. D. M. SANTOS, J. P.; ZEMPULSKI, D. A.; FIORESE, M. L.; GOMES, S. D.; LUCENA, S. L.; Otimização da Extração de Proteases Fúngicas Obtidas por Fermentação em Estado Sólido de Resíduos de Cervejaria. *Engevista* 2013, 16, 244.
65. HASAN, F.; ALI, S. A.; HAMEED, A.; Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 2006, 39, 235.
66. THAKUR, S.; Lipases, its sources, properties and applications: A review. *International Journal of Scientific and Engineering Research* 2012, 3, 7, 1.
67. YAZID, N. A.; BARRENA, R.; KOMILIS, D.; SÁNCHEZ, A.; Solid-state fermentation as a novel paradigm for organic waste valorization: A review. *Sustainability (Switzerland)* 2017, 9, 1.
68. SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C.; Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology advances* 2001, 19, 627.
69. GANDHI, N. N.; Applications of lipase. *Journal of American Oil Chemist's Society* 1997, 74, 621.
70. PATEL, A.; BRAHMKHATRI, V.; SINGH, N.; Biodiesel production by esterification of free fatty acid over sulfated zirconia. *Renewable Energy* 2013, 51, 227.
71. RODRIGUES, M. L. F.; SILVA, E. A.; BORBA, C. E.; OLIVEIRA, A. C. D.; KRUGER, C.; RAIMUNDO, R. W.; SILVA, L. P.; RODRIGUES, M. L. F.; STUANI, B. T. Produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo endofítico *Penicillium* sp. isolado das folhas de *Ricinus*

- communis* L. Revista Brasileira de Energias Renováveis 2015, 4, 129.
72. OLIVEIRA, A. C. D.; FRENCH, G.; MARQUES, F. A.; VARGAS, J. V. C.; RODRIGUES, M. L. F.; MARIANO, A. B.; Production of methyl oleate by direct addition of fermented solid *Penicillium sumatrense* and *Aspergillus fumigatus*. Renewable Energy, 2020, 162, 1132.
73. OLIVEIRA, A. C. D.; FRENCH, G.; MARQUES, F. A.; VARGAS, J. V. C.; RODRIGUES, M. L. F.; MARIANO, A. B.; Production of methyl oleate with a lipase from an endophytic yeast isolated from castor leaves. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2012, 1, 295.
74. TORRES, M.; DOLCET, M. M.; SALA, N.; CANELA, R.; Fungos endofíticos associados às plantas mediterrâneas como fonte de lipases ligados ao micélio. J Agric Food Chem 2003, 51, 3328.
75. COSTA-SILVA, T. A.; NOGUEIRA, M. A.; Produção de lipase por fungo endofíticos *Cercospora kikuchii*: estabilidade da atividade enzimática após secagem de spray na presença de carboidratos. Secagem Technol 2011, 29, 1112.
76. VENKATESAGOWDA, B.; PONUGUPATY, E.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. Diversidade de fungos associados a sementes de óleo vegetal isoladas de sete sementes portadoras de óleo e seu potencial para a produção de enzimas lipolíticas. World J Microbiol Biotechnol 2012, 28,71.
77. BATISTA, B. N.; MATIAS, R. R.; OLIVEIRA, R. L.; Albuquerque. Hydrolytic enzyme production from açai palm (*Euterpe precatoria*) endophytic fungi and characterization of the amylolytic and cellulolytic extracts. Word Journal of Microbiology and Biotechnology 2022, 38, 30.
78. PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. Bioresource Technol 2000, 74, 81.
79. OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS-JÚNIOR, A. F.; Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. Ciênc. Tecnol. Aliment 2007, 27, 61.
80. PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C. R.; SOCCOL, V. T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. Biotechnology and Applied Biochemistry 2000, 31, 135.
81. SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. Application of microbial α -amylase in Industry – A Review. Brazilian Journal of Microbiology 2010, 41, 850.
82. SANTOS, É. R.; TELES, Z. N. S.; CAMPOS, N. M.; SOUZA, D. A. J. BISPO, A. S. R.; RODRIGO PIRES DO NASCIMENTO, R. P.; Production of Amylase from *Streptomyces* sp. SLBA-08 Strain Using Agro-Industrial By-Products. Braz. Arch. Biol. Technol 2012,

55, 793.

83. SOUZA, J. B.; SILVA, S.; ANDRADE, A. M. F.; Atividade enzimática de fungos endofíticos isolados de plantas medicinais e aromáticas. *Rev. Bras. de Gestão Ambiental* 2019, 13, 5.
84. PANDEY, A.; WEBB, C.; FERNANDES, M.; LARROCHE, C.; *Enzyme Technology*. Springer-Verlag: New York, 2006.

Artigo 2 - *Euterpe oleracea* Mart (Açaizeiro) from the Brazilian Amazon: A Novel Font of Fungi for Lipase Production

Artigo aceito e publicado na Revista *Microorganisms*, qualis A3 em biotecnologia, segundo a classificação do quadriênio 2017-2020 da plataforma Sucupira – CAPES.

by Iracirema S. Sena¹, Adriana M. Ferreira^{1,2}, Victor H. Marinho¹, Fabrício H. e Holanda¹, Swanny F. Borges¹, Agerdania A. de Souza², Rosemary de Carvalho R. Koga², Adilson L. Lima³, Alexandro C. Florentino^{1,*} and Irlon M. Ferreira^{1,*}

¹Biocatalysis and Applied Organic Synthesis Group, Department of Exact Sciences, Federal University of Amapá, Josmar Chaves Pinto Highway, KM—02 Bairro Zerão, Macapá 68902-280, AP, Brazil.

²Pharmaco Research Laboratory, Federal University of Amapá, Josmar Chaves Pinto Highway, KM—02 Bairro Zerão, Macapá 68902-280, AP, Brazil.

³Biological Control Laboratory, Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa), Josmar Chaves Pinto Highway, KM—05 Bairro Zerão, Macapá 68903-419, AP, Brazil.

*

Authors to whom correspondence should be addressed.

Microorganisms **2022**, *10* (12), 2394; <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122394>

Received: 17 September 2022 / Revised: 15 November 2022 / Accepted: 18 November 2022 / Published: 2 December 2022.

2.1 Abstract

Lipases (EC 3.1.1.3) are hydrolases that catalyze triglycerides hydrolysis in free fatty acids and glycerol. Among the microorganisms that produce lipolytic enzymes, the endophytic fungi stand out. We evaluated 32 fungi of different genera, *Pestalotiopsis*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Chaetomium*, *Mucor*, *Botryodiplodia*, *Xylaria*, *Curvularia*, *Neocosmospora* and *Verticillium* isolated from *Euterpe oleracea* Mart. (Açaizeiro) from the Brazilian Amazon for lipase activity. The presence of lipase was evidenced by the deposition of calcium crystals. The endophytic *Pestalotiopsis* sp. (31) and *Aspergillus* sp. (24) with Pz 0.237 (++++) and 0.5 (++++), respectively, were the ones that showed the highest lipolytic activity in a solid medium. Lipase activity was rated in liquid medium, in a different range of temperatures (°C), pH and time (days). The values obtained in the production of lipase by the endophytic fungi were 94% for *Pestalotiopsis* sp. (31) and 93.87% for *Aspergillus* sp. (24). Therefore, it is emphasized that the endophytic fungus isolated the *E. oleracea* palm may be a potential candidate to produce enzymes of global commercial interest.

Keywords: Amazon fungi; hydrolases; açaí; microorganisms.

2.2. Introduction

Brazil has around 20% of the world's biodiversity [1], and the Amazon is majorly responsible for this biodiversity, due to the high specificity of the environment, which contributes to a diversified species of microorganisms; however, the microorganisms present and their interactions with other organisms are poorly understood [2,3,4].

Euterpe oleracea Mart. (Arecaceae), commonly known as açai, is a palm tree typically found in the Amazon region, naturally found in North Brazil, especially in the Pará, Amazonas and Amapá states, and which has great importance because of the economic value of its fruit pulp [5]. Numerous advances have been made in recent years to demonstrate the health benefits of açai pulp and seed from *E. oleracea* Mart [6]. Studies have confirmed it to be one of the most potent antioxidants [7] and anti-inflammatory food sources available, attributable to a class of flavones, as well as other polyphenols, lignans and saccharides [8].

Endophytic fungi are microorganisms that live inside the host plant tissues without causing diseases [2]. Some studies show that fungi endophytes are capable of producing a large number of important bioactive metabolites, for example, the taxol, an important anticancer drug, is produced by fungus endophytic *Taxomyces andreanese*, isolated from *Taxus brevifolia* bark [9]. The endophytic fungi can be also a source of different enzymes, such as, amylases, quietness, proteases, asparaginases, celluloses, laccase and lipases with biotechnological interest [10,11,12].

The first description of endophytic fungi from *E. oleracea* palm leaves, of the Amazon region, was performed by Rodrigues [13]. In opportunity, Rodrigues also described the occurrence of a new genus, such as, *Letendreaopsis palmarum*, and new species of the genus *Idrella* isolated from *E. oleracea* palm [14]. The enzymatic potential (cellulolytic and amylolytic) of endophytic fungi isolated from *Euterpe precatoria* Mart. was shown by Batista [15]; Recently, the extract with effect antimicrobial from endophytic fungi of *E. precatoria* against *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* human pathogens was examined [16]. In addition, endophytic fungi from *E. precatoria* were used as antagonistic agents towards *Colletotrichum gloeosporioides* in the control of anthracnose in açai leaflets [17]. McCulloch et al. [18] reported the genome, in a single chromosome, of *Lactococcus lactis* strain AI06, isolated from the mesocarp of the açai fruit (*Euterpe oleracea*) in eastern Amazonia, Brazil. This strain is an endophyte of the açai palm and also a component of the microbiota of the edible food product. However, studies about endophytic fungi from *E. oleracea* are scarce in the literature.

Lipases (EC 3.1.1.3) are catalytic enzyme of hydrolases reaction, on the carboxylic ester bond and catalyze the reaction of hydrolysis esterification and interesterifications of fats with excellent performance [19,20]. These enzymes correspond to the third biggest selling group in the world [21], your applications goes from the production of detergents, degreasers [22,23], textile products, to paper, [10,23]. Lipase can be produced by animals, plants and microorganisms, the enzymes produced by the last one being more stable when compared to other sources [19].

Some studies are being carried out to explore environments that have not been studied, especially located in the Amazon region. Therefore, this article aims to demonstrate the potential enzymatic (lipolytic) activity of endophytic fungi from the fruit of *Euterpe oleracea* Mart (açazeiro).

2.3 Materials and Methods

2.3.1. Reagents and Solvents

4-Nitrophenyl palmitate (99%) was obtained from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil). Isopropanol (98%) was obtained from Synth (São Paulo, Brazil). Agar and Malt extract were obtained from Kasvi (São Paulo, Brazil).

2.3.2 Isolation and Identification of Endophytic Fungi from the Fruits of *E. oleracea* Mart

The botanical material (fruits and leaves) of *E. oleracea* was collected and given by the Brazilian Agriculture and Livestock Research Company (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária—EMBRAPA/Amapá), from the coordinates (N 00°22' 55" e O 51°01'40") during the period of August 2018. The fungi used in this research were isolated from their fruits, roots and leaves and were stocked according to [24]. All microbiologic manipulation activity was conducted inside the laminar flow cabinets.

2.3.3 Identification and Conservation of Endophytic Fungi

The morphological identification was conducted at the genus level by macromorphological grouping, by observing the characteristics of each individual such as its appearance, form, color and the consistency of its colonies. In order to visualize the microscopical structures, specially designed coverslips were made in microcultures, using a blue pigment of lactophenol (0.5%) across the surface of the coverslips. An optical microscope (OLYMPUS® BX41) was used for capturing these images. The images were amplified by 200–400× and compared to the ones found in the specialized literature [13]. Thereafter, the macromorphological and micromorphological analysis identified the following genera: *Pestalotiopsis* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Mucor* sp., *Botryodiplodia* sp., *Xylaria* sp., *Neocosmospora* sp., and *Verticillium* sp.

2.3.4 Determining the Enzymatic Activity

The microorganisms were precisely inoculated in the center of the Petri dish (90 cm) and incubated in B.O.D in a regulated environment of 28 °C with a photoperiod of 12 h. The measurement of the colony and the halo diameter were expressed in centimeters (cm) and conducted once per 24 h for 5 consecutive days. All the testing was conducted in triplicate.

2.3.5 Enzymatic Test for Lipase in a Solid Environment

For its lipolytic activity, the fungi were cultivated in Peptone Agar (peptone, 8 g; sodium chloride, 4 g; calcium chloride, 0.08 g; agar, 16 g; distilled water, 800 mL and pH-6.0) Tween 20 was sterilized separately and supplemented at 1% (v/v) in the growth medium. The enzymatic reaction was considered a success once the formation of calcium salt crystals and lauric acid produced by the enzyme was confirmed. Lipolytic activity, the value of Pz (zone of precipitation), was calculated by using the following equation:

$$P_z = \frac{\text{Colony diameter}}{\text{Colony diameter} + \text{Zone of precipitation}}$$

The P_z value of the lipolytic activity was classified into 5 categories: $P_z = 1$ negative lipasic activity (-); $P_z < 0.90$ – 0.99 weak lipasic activity (+); $P_z < 0.80$ – 0.89 = poor lipasic

activity (++); $P_z < 0.70-0.79$ = moderate lipasic activity (+++); and $P_z < 0.70$ = intense lipasic activity (++++).

2.3.6. Lipase Production in a Liquid Environment

After the sorting with the ones that were isolated in a solid medium, we opted to optimize the lipase production in a liquid environment using only the fungi *Pestalotiopsis* sp. (31) and *Aspergillus* sp. (24). In order to cultivate those in a liquid medium, Erlenmeyer flasks (250 mL) were used, containing 25 mL of growth medium with 5 mycelial discs (8 mm of diameter) of the fungi *Pestalotiopsis* sp. (31) and *Aspergillus* sp. (24). After cultivating them, those fungi were incubated for different days (3, 6 and 9 days) under different temperatures (25, 30 and 35 °C) and different pH (5, 7 and 9) in an orbital shaker at 150 rpm. The fermented broth was vacuum-filtered with a filter paper of 80 g.m⁻². Its biomass was vacuum-drained until its weight reached a constant weight in an average of about 96 h. The filtered broth devoid of cells was used to determine the lipolytic activity; for this end, olive oil was used as the carbon font and inductor of the lipase production. the medium used possessed the following composition: 37g/L of peptone, 1.11 g/L of magnesium sulfate, 1.85 g/L of potassium phosphate, 1.85 g/L of sodium nitrate and 14 mL/L of olive oil. The experiments were realized in triplicate.

2.3.7. Quantification of Lipolytic Activity in a Liquid Medium

The lipolytic activity was measured according to the methodology described and adapted by Mayordomo et al. [25]. The lipolytic activity was conducted using 250 µL of a solution containing 200 mg Triton X-100, 50 mg of gum arabic and phosphate buffer (0.1 M) at pH = 7.5 for a final volume of 50 mL. Following this, 250 µL of the enzymatic broth was added to a 45 µL solution of palmitate of *p*-nitrophenol (*p*-NPP) diluted in isopropanol (10 mL); thereafter, the reaction was taken to a water bath at 40 °C at 30 min. Then, 0.5 mL of Trizma base 2% (*m/v*) was added. The quantification of the lipolytic activity was realized starting with the solution *p*-NPP that releases nitrophenol (NP), quantified by absorbance at 398 nm in a spectrophotometer (Perkinelmer-Lambda35). One unit of activity was defined as the amount of enzyme required to hydrolyze 1 µmol of *p*-NPP per minute under the conditions described.

2.3.8. Statistical Analysis

2.3.9 Experimental Design and Statistical Model

In this study, a three-level and three-variable *Box-Behnken* factorial design was applied to determine the best combination of variables for determination of lipase production using isolated endophytic fungi. The pH of the medium, time (days) and temperature (°C), which were identified to have strong effects on the response in preliminary one-factor-at-a-time experiments, were taken as the variables tested in a 15-run experiment to determine their optimum levels. Independent variables were designated as x_1 , x_2 and x_3 , and their level values are shown in Table 1. The polynomial equation used for the three variables is given below:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \times 1 + \beta_2 \times 2 + \beta_3 \times 3 + \beta_{11} \times 1^2 + \beta_{22} \times 2^2 + \beta_{33} \times 3^2 + \beta_{12} \times 1 \times 2 + \beta_{13} \times 1 \times 3 + \beta_{23} \times 2 \times 3$$

where Y is the predicted response; β_0 is model constant; β_1 , β_2 and β_3 are the linear coefficients; β_{11} , β_{22} and β_{33} are the quadratic coefficients; β_{12} , β_{13} and β_{23} are the interaction coefficients; and x_1 , x_2 and x_3 are independent variables.

Table 1. Three independent variables used in Box–Behnken factorial design.

Factor	Name	Levels		
		-1	0	+1
x_{11}	pH	5	7	9
x_{22}	Time (days)	3	6	9
x_{33}	Temperature (°C)	25	30	35

The optimal condition was determined considering the lipase production content (BD%) as the response. The software STATISTICA® (version 10, Statesoft—Inc., Tulsa, OK, USA, trial version, 2011) was used for experimental design, data analysis and determination of optimal conditions. ANOVA was used for the evaluation of the significance of independent variables' influence and interactions. Pareto charts were applied to obtain the significance of the impact of tested variables on mentioned responses.

2.4. Results and Discussion

2.4.1. Isolating and Purifying Endophytic Fungi

The strains of endophytic fungi were isolated from *E. oleracea* by making use of fragments of its plant tissue (fruits, roots and leaves), Figure 1. A total of 32 fungi of different morphological genera were isolated, including: *Pestalotiopsis* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Chaetomium* sp., *Mucor* sp., *Botryodiplodia* sp., *Xylaria* sp., *Curvularia* sp., *Neocosmospora* sp. and *Verticillium* sp. Figure 2 shows the endophytic fungi isolated and grown in Petri dishes after the process of purifying their lineages. Rodrigues [14] isolated endophytic fungi from *Euterpe oleracea*, obtaining 21–30% isolation rate, and Southee and Johnson [26] reported an isolation frequency of 20.3% in two species of palm (*Sabal bermudana* and *Livistona chinensis*). The taxon *Pestalotiopsis* is characterized by spores with pigmented median cells, divided by four eusepta (true septum), with 2–3 apical appendages resulting from tubular extensions of the apical cell and a central basal appendage [27]. However, the genus *Pestalotiopsis* is complex and can be difficult to classify at the species level, because characteristics such as fruiting structure, length and conidia morphology tend to vary within species and also with any change in the environment [28]. The colonies were characterized by having white coloration, vigorousness, cottony mycelium, formation of black masses of conidia and abundant sporulation.



Figure 1. *E. oleracea* palm tree (A) leaves, (B) fruits and (C) roots (D)

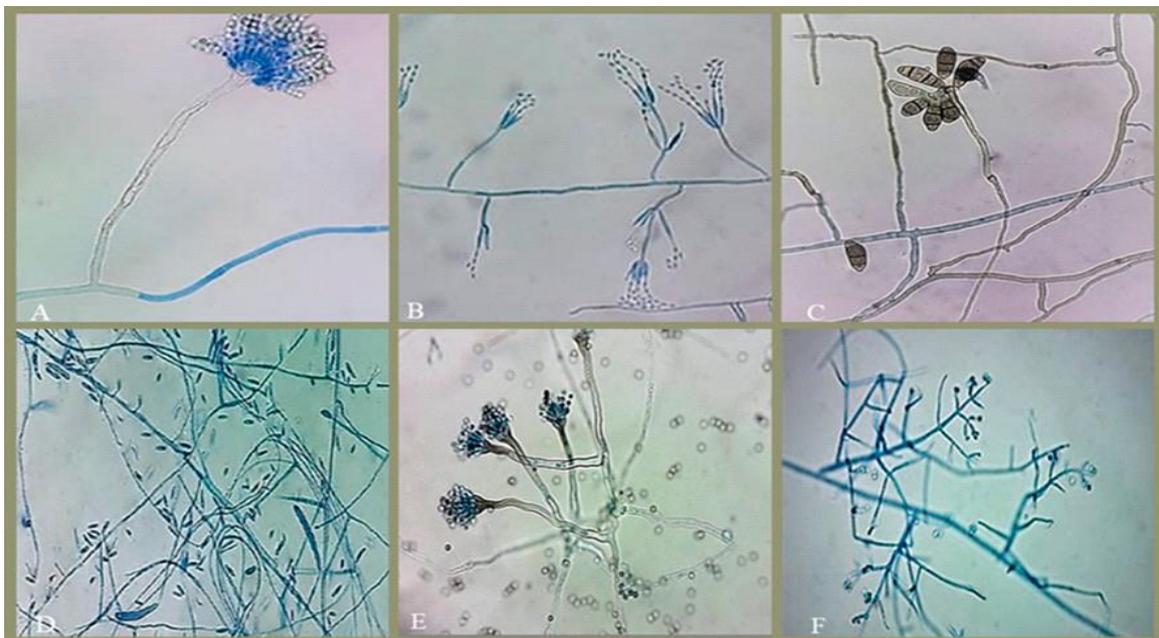


Figure 2. Fungi isolated from *E. oleracea* in solid medium morphological identification at the genus level in microculture observed by optical microscopy. (A) *Aspergillus* sp., (B) *Penicillium* sp., (C) *Pestalotiopsis* sp., *Fusarium* sp., (E) *Aspergillus* sp. and (F) *Trichoderma* sp.

Rodrigues [14] recorded the first occurrence of the genus *Pestalotiopsis* in the Amazon region as endophytic in açai leaves. Additionally, the identification of *Aspergillus* has traditionally been based on morphological characterization [29]. Macromorphological characteristics include colony color on various culture media, colony diameter, colony reverse color, production of exudates and soluble pigments. The micromorphological characterization mainly related to the form of serialization of the conidial head, the size of the vesicle, the morphology of conidia and the presence of cells [30].

The *Aspergillus* conidiophore is simple, usually aseptate and ends in a vesicle, where the phialides are inserted. Some species can produce Hülle cells or *sclerotia*. Many species of *Aspergillus* have teleomorphs and reproduce sexually [30].

2.4.2. Screening of Lipase-Producing Endophytic Fungi

The determinant factors that make the qualitative enzymatic test selection viable include the direct correlation between the halo size and the degradative capacity of the microorganisms. The Table 2 show the enzymatic activity of the isolated endophytic fungi from endophytic *E. oleracea* (açazeiro). The results from this selection allow to foresee the enzyme production yields, indicating the presence of a determined substance through the detection of some specific activity [31]. The isolated fungi with the largest activity halo were selected for the enzymatic activity determination step in a liquid environment.

Table 2. Enzymatic activity of the isolated endophytic fungi from *E. oleracea* (açazeiro), based on Pz calculations.

N°	Genus (Codig)	PZ *	N°	Genus (Codig)	PZ
1	<i>Botryodiplodia</i> sp. (30)	++++	17	<i>Aspergillus</i> sp. (26)	-
2	<i>Fusarium</i> sp. (2)	++++	18	<i>Aspergillus</i> sp. (11)	-
3	<i>Penicillium</i> sp. (5)	+++	19	<i>Penicillium</i> sp. (12)	-
4	<i>Penicillium</i> sp. (7)	++++	20	<i>Fusarium</i> sp. (13)	-
5	<i>Neocosmopora</i> sp. (9)	++++	21	<i>Mucor</i> sp. (14)	-
6	<i>Aspergillus</i> sp. (21)	++++	22	<i>Fusarium</i> sp.(15)	-
7	<i>Aspergillus</i> sp. (24)	++++	23	<i>Penicillium</i> sp. (16)	-
8	<i>Fusarium</i> sp. (27)	++++	24	<i>Trichoderma</i> sp. (17)	++++
9	<i>Colletotrichum</i> sp. (3)	++++	25	<i>Verticillium</i> sp. (18)	-
10	<i>Pestalotiopsis</i> sp. (31)	++++	26	<i>Penicillium</i> sp. (19)	-
11	<i>Chaetomium</i> sp. (35)	-	27	<i>Penicillium</i> sp. (20)	-
12	<i>Aspergillus</i> sp. (1)	-	28	<i>Penicillium</i> sp. (22)	-
13	<i>Xylaria</i> sp. (4)	-	29	<i>Penicillium</i> sp. (25)	-
14	<i>Penicillium</i> sp. (8)	-	30	<i>Penicillium</i> sp. (25)	-
15	<i>Penicillium</i> sp. (10)	-	31	<i>Aspergillus</i> sp. (29)	-
16	<i>Aspergillus</i> sp. (23)	-	32	<i>Fusarium</i> sp. (34)	-

* PZ = Zone of precipitation.

From the alignment of lipase production of endophytic fungi in Petri dishes, the isolated strains show the formation of calcium crystal halos around the colonies (Figure 3), indicating the production of lipase by these fungi.

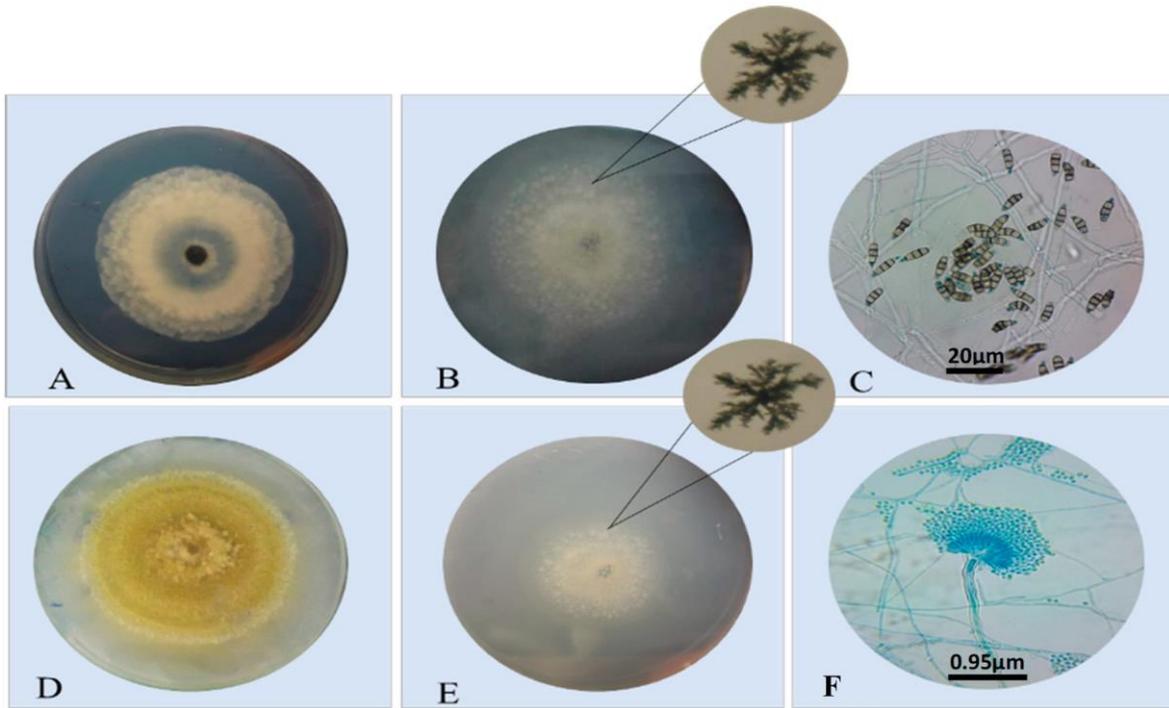


Figure 3. Mycelial growth of a *Pestalotiopsis* sp. (31) (A) and *Aspergillus* sp. (24) (D); semiquantitative test of enzyme production and the formation of crystal halos near the colony (B,E); morphology (C,F).

Based on the enzymatic determination index (Pz) obtained, it has been shown that not every endophytic fungus that were analyzed in this experiment exhibited lipolytic activity; out of the 32 fungi species, 11 have shown a strong enzymatic activity. Among these prominent species are: *Botryodiplodia* sp. (30) with a Pz value of 0.237 (++++), *Aspergillus* sp. (21) with a Pz value of 0.5 (++++), *Aspergillus* sp. (24) with a Pz value of 0.5 (++++), *Pestalotiopsis* sp. (31) with a Pz value of 0.4 (++++), *Neocosmospora* sp. (9) with a Pz value of 0.5 (++++), *Fusarium* sp. (2) with a Pz value of 0.5 (++++), *Fusarium* sp. (27) with a Pz value of 0.5 (++++), *Trichoderma* sp. (17) with a Pz value of 0.5 (++++), *Penicillium* sp. (5) with a Pz value of 0.7 (+++ moderate), *Penicillium* sp. (7) with a Pz value of 0.5 (++++), *Colletotrichum* sp. (3) with a Pz value of 0.5 (++++) and *Chaetomium* sp. (35) with a Pz value of 1, therefore without activity. The remaining 21 species were not able to be grown into a medium for lipolytic activity detection.

Most of the lipase-producing fungi are isolated from industrial or domestic oily leftovers, which have been contaminated with grease and oil and living and dead animals [32,33]. From this study, it is also possible to affirm that endophytic fungi can exhibit an interesting lipolytic activity. The lipasic activity is frequently measured by the release of either fatty acids or glycerol, and the use of a solid medium with inducing substrates such as vegetable oil, standard triglycerides, Tween 80 and coloring agents was already described in the literature, aiming at the pre-selection of lipase-producing microorganisms [34]. Many of these genera fungi were described in the literature as potential lipase producers, such as *Trichosporon*, *Botrytis*, *Pichia*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Tulopsis* and *Candida* [35].

Tarci et al. [30] isolated *Aspergillus* sp. DPUA 1727 from both the maize and soil and it studied in order to produce lipase using agro-industrial waste as an inductor. It was shown that agro-industrial waste can be used for this purpose mainly if it presents a higher percentage of fatty acid esters (>80%).

2.4.3. Experimental Design for Lipase with Endophytic Fungi *Pestalotiopsis* sp. (30) and *Aspergillus* sp. (24)

The lipase production by the endophytic fungi *Pestalotiopsis* sp. (30) and *Aspergillus* sp. (21) from different experimental assays of the experimental planning protocol [32] concluded that the factorial planning Box–Behnken Design (BBD) might be the ideal tool in order to optimize the experimental conditions for endophytic fungi. Moreover, another significant advantage of using BBD instead of other techniques is the budget, due to the fact that it demands a smaller number of experimental executions and less time and, consequently, a smaller use of supplies [36].

The values of the variables, the levels used in the experiments and the results obtained are shown in Table 3. The variation between the maximum and minimum values obtained was from 93.18 to 94% for *Pestalotiopsis* sp. (31) and from 93.12 to 93.87% for *Aspergillus* sp. (24), where the highest percentages represent the higher relative production of lipase by the endophytic fungi compared to the negative control group, with the best responses (greater amount of lipase) in assay 4 for *Pestalotiopsis* sp. (31) and *Aspergillus* sp. (24) (pH 5; temperature of 35 °C; and time of 6 days). The coefficients of determination of the models (R^2) were 0.82 for the tests of the endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. and 0.86 for the *Aspergillus* sp. (24). Model proficiency is demonstrated if R^2 is equal to 0.75 or greater than this value [37]. The values obtained for the relative production of lipase by the endophytic fungi were quantified from the equation $Y = 0.004489 * X + 0.1323$ generated by the standard curve (Figure 4).

Table 3. Experimental design matrix and responses to levels and variables.

Assay	Coded and Uncoded Levels and Variables						Lipase (%)	
	x1 (pH)	x2 (Temp.)	x3 (Time)			<i>Pestalotiopsis</i> sp. (30)	<i>Aspergillus</i> sp. (21)	
1	5	-1	25	-1	6	0	93.40	93.23
2	5	-1	30	0	3	-1	93.23	93.66
3	5	-1	30	0	9	1	93.84	93.49
4	5	-1	35	1	6	0	94.00	93.87
5	7	0	25	-1	3	-1	93.18	93.12
6	7	0	25	-1	9	1	93.22	93.28
7	7	0	35	1	3	-1	93.61	93.50
8	7	0	35	1	9	1	93.68	93.70
9	9	1	25	-1	6	0	93.34	93.29
10	9	1	30	0	3	-1	93.41	93.40
11	9	1	30	0	9	1	93.54	93.56
12	9	1	35	1	6	0	93.67	93.61
13	7	0	30	0	6	0	93.36	93.40
14	7	0	30	0	6	0	93.37	93.31
15	7	0	30	0	6	0	92.38	93.24

Pareto charts of the standardized effects were generated that reveal the significant effects of the medium pH, growth time (days) and temperature (°C), both linear and quadratic, with the endophytic fungi *Pestalotiopsis* sp. (31) and *Aspergillus* sp. (24), where the bar length represents the absolute importance of the effects estimated according to the values used in the tests. The vertical line represents the boundary between significant and insignificant effects with a 5% risk of error. The effects are significant at a 95% confidence level in the experimental domain studied ($p < 0.05$) as shown in Figure 5.

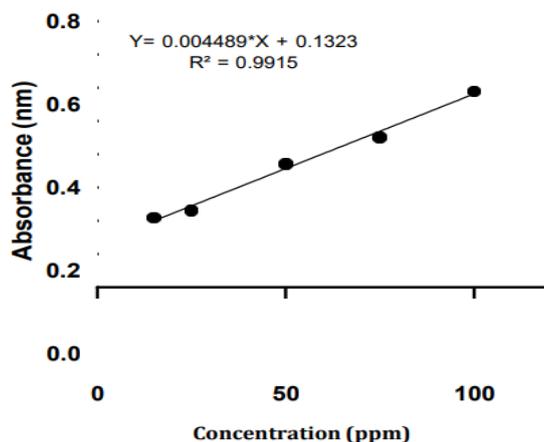


Figure 4. Standard curve used in the enzymatic determination lipolytic.

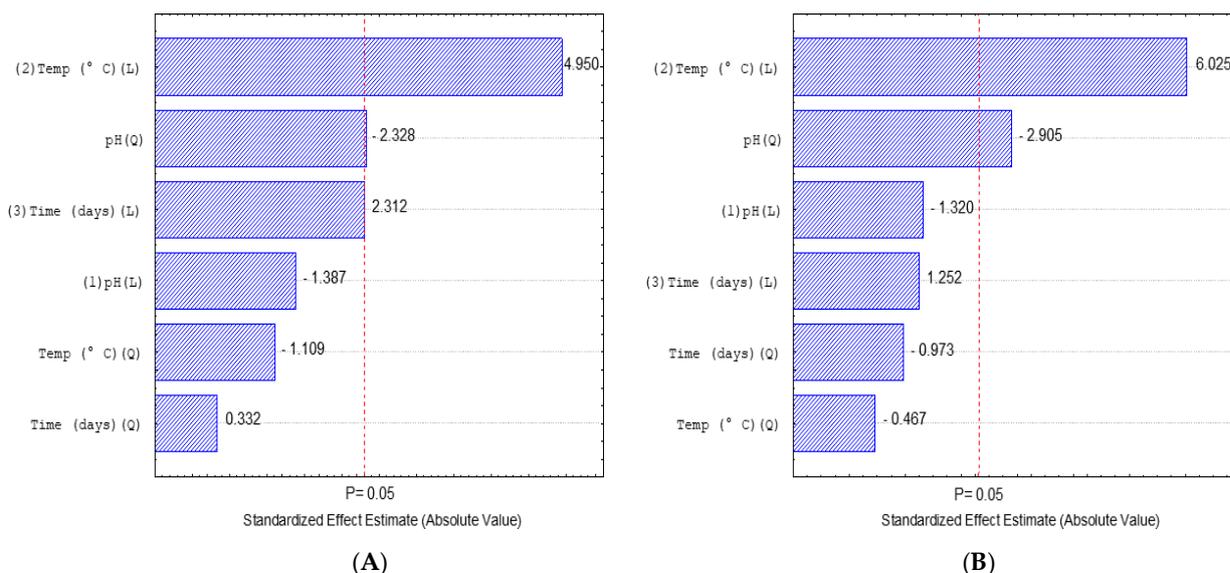


Figure 5. Pareto chart of effects for relative lipase production (%). **(A)** The endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. (31). **(B)** Endophytic fungus *Aspergillus* sp. (24).

As shown in Figure 5, three effects were statistically significant ($p < 0.05$) for relative lipase production with the endophytic fungus *Pestalotiopsis* (31) sp. For lipase activity from the endophytic *Aspergillus* sp. (24), evidently, the temperature variable (L) represents the most decisive factor for improving the production of lipase, and in these cases, as the values generated by the Pareto graph were positive (4.950 and 6.025), they show that the higher the temperature used in the reactions, the better. For the reaction conditions for the fungi, results can be observed in experiments 4, 8 and 12 of the experimental design matrix (Table 3).

The quadratic model correlating the factors utilized in the runs for lipase production by endophytic fungi allows the projection of three response surface graphics for the optimization of the results. The response surface graphic for the lipase production of the

endophytic fungi *Pestalotiopsis* sp. (31) (Figure 6) was generated to determine the crossing between two conditions and analyze its effects over the obtained results.

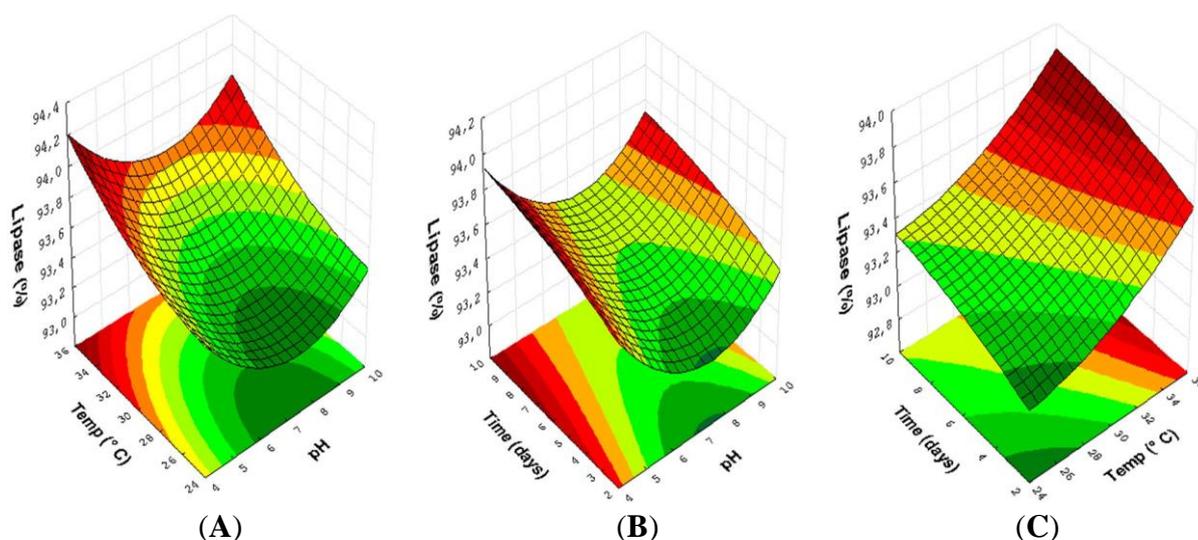


Figure 6. Response surface plots (3D) with the crossing of experimental conditions with the fungus *Pestalotiopsis* sp. (30): (A) the temperature ($^{\circ}\text{C}$) and pH of the medium; (B) reaction growth time (days) and pH of the medium; and (C) temperature ($^{\circ}\text{C}$) and reaction time (days).

The lipase production in response to the temperature and pH in the reactional medium (Figure 6A) reveals that a better production of this enzyme can be obtained due to the increase in temperature (from 30 to 35 $^{\circ}\text{C}$) combined with both pH 5.0 and pH 9.0. When crossing the growth time and the pH of the medium (Figure 6B), it is possible to observe that the increase in the time interval used generates a good influence on the responses, increasing from 3 to 9 days with pH 5.0 and 9.0. In Figure 6C, the interaction between temperature and growth time shows that increases in both time and temperature are important in the results of relative lipase production.

Likewise, three response surface plots were obtained to optimize the experimental conditions for the endophytic fungus *Aspergillus* sp. (24) (Figure 7). Lipase production in feed at the temperature used and the pH of the reactional medium (Figure 7A) show that the increase in temperature (>30 $^{\circ}\text{C}$) combined with pH 5 and 9 directly influences the response. In Figure 7B, the relationship between time, pH and reaction time shows that, for a greater production of lipase, it is necessary to increase the reaction days (>6.0) using pH 5 or 9. In the interaction between reaction and temperature (Figure 7C), the best conditions obtained were at temperatures of 30 and 35 $^{\circ}\text{C}$, mainly in the growth time of 9 days. It is important to highlight that the time and pH factors in the variables used in this experimental design were not statistically significant, making it evident that the temperature was the most relevant factor in this method.

Lipases are known for being efficient and stable catalyzers in many culture mediums and for acting in a diverse range of organic solvents. Many studies identified the production of enzymes by endophytic fungi in solids and liquids, just like the uses of those in transesterification reactions of many different lipidic biomasses [2,22,38].

In a study realized by Souza et al. 2018 [39] utilizing cotton oil as a substrate, the *Preussia africana* isolated from *Handroanthus impetiginosus* showed lipolytic activity with 5.9 U/mL. *Stemphylium lycopersic* isolated from *Humiria balsamifera* and *Sordaria* sp. isolated from *Tocoyena bullata* not only showed maximum activity for lipase production with 110 U/mL, but they also promoted the esterification reaction for the synthesis of ethyl oleate [2].

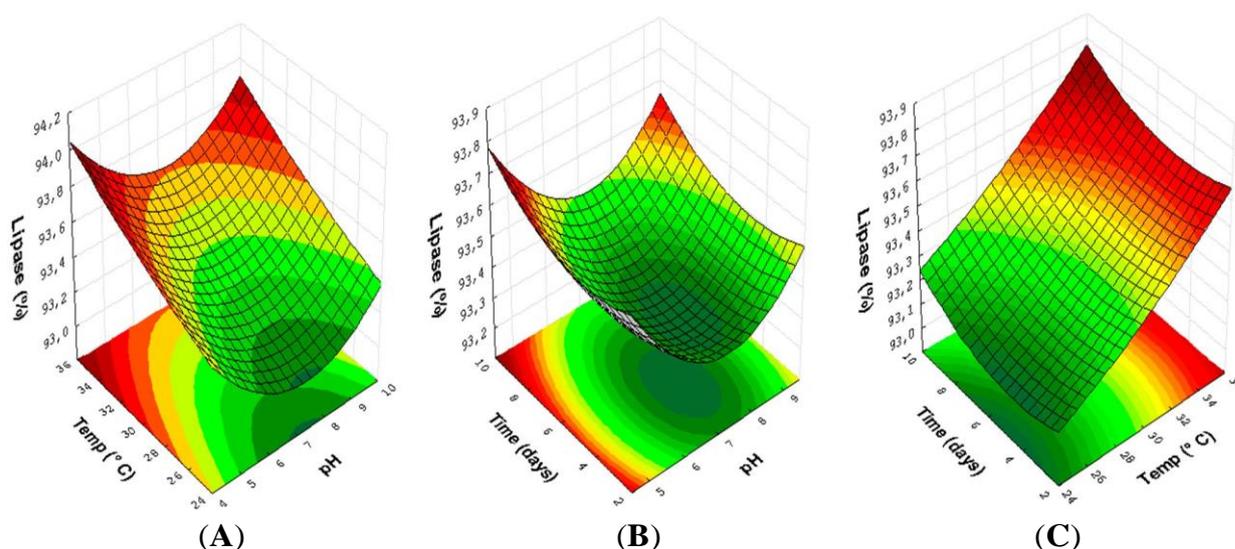


Figure 7. Response surface plots (3D) with the crossing of experimental conditions with the fungus *Aspergillus* sp. (24): (A) the temperature (°C) and pH of the medium; (B) growth time (days) and pH of the medium; and (C) temperature (°C) and growth time (days).

Between the factors that influenced the enzymatic activity, the medium's pH is among the most significant variables in this study. The pH has a vital role in manutention of metabolism of fungi, taking part in a diverse range of biological functions. In the enzymatic process, each enzyme shows maximum activity at specific pH values. Moreover, the applicability of those enzymes in the biotechnological field depends on its stability in different pH ranges. In this sense, several studies report that endophytic fungi are efficient producers of stable enzymes with variable pH (alkaline and acid), such as lipases.

The endophytic *Aspergillus sojae* isolated from the plant *Plectranthus amboinicus* produced stable lipases, with maximum activity at pH 6 under a temperature of 27 °C [40]. Rocha et al. (2020) [2] isolated the fungi *Stemphylium lycopersici* from the leaves of a *Humiria balsamifera* and noted that under a temperature of 30° C and pH 7 it was a great lipase producer. According to [41], the fungi *Preussia africana* isolated from *Handroanthus impetiginosus*, when cultivated under the conditions of pH 7 and a temperature of 37 °C, was an excellent lipase producer. Additionally, [42] optimized the lipase production process by making use of the fungi *Aspergillus niger* (MTCC 872) and observed that the maximum production of this enzyme was correlated to the temperature of 40 °C and pH 6.

The optimization of reaction conditions through experimental design has been a great tool for bioassays with fungi, as conducted in the production of lipase with three selected strains: *Candida guilliermondii*, *Penicillium sumatrense* and *Aspergillus fumigatus*. Enzymatic active were optimized through the experimental design, with excellent yield [43,44], by the endophytic fungus *Penicillium bilaiae*. Additionally, [45] applied a factorial experiment to optimize the production of extracellular enzymes by the endophytic fungus *Alternaria alternata*.

2.5. Conclusions

This study isolated 32 endophytic fungi from *Euterpe oleracea* (fruits, leaves and roots) from different genera. The isolated fungi of the endophytic *Pestalotiopsis* sp. (31) and *Aspergillus* sp. (24) were the ones that showed the highest lipolytic activity in a solid medium.

Through experimental planning, the isolated *Aspergillus* sp. (24) and *Pestalotiopsis* sp. (31) have shown how the variable of pH affects the lipolytic activity, with the medium containing pH 9 having the most significance. Therefore, this highlights that the endophytic fungi isolated from the palm tree *E. oleracea* might be potential candidates for enzyme production of global commercial interest.

Author Contributions: I.S.S., A.M.F., F.H.e.H., V.H.M. and I.M.F.: Conceptualization, Methodology, Validation, Software, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing—original draft. A.A.d.S., S.F.B., R.d.C.R.K. and A.L.L.: Methodology, Investigation, Writing—original draft, Writing—review and editing, Visualization. A.C.F. and I.M.F.: Conceptualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Amapá, Grant Number 459 34668.520.22257.08022018 and CAPES, Grant Number 88887.568501/2020-00.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data is provided in full in the results section of this paper.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have influenced the present study.

2.6 References

1. Lewinsohn, T.M.; Prado, P.I. How Many Species Are There in Brazil? *Conserv. Biol.* **2005**, *19*, 619–624. [[CrossRef](#)]
2. Rocha, K.S.C.; Queiroz, M.S.R.; Gomes, B.S.; Dallago, R.; de Souza, R.O.M.A.; Guimarães, D.O.; Itabaiana, I.; Leal, I.C.R. Lipases of Endophytic Fungi *Stemphylium lycopersici* and *Sordaria* Sp.: Application in the Synthesis of Solketal Derived Monoacylglycerols. *Enzym. Microb. Technol.* **2020**, *142*, 109664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Rovere-Querini, P.; De Lorenzo, R.; Conte, C.; Brioni, E.; Lanzani, C.; Yacoub, M.R.; Chionna, R.; Martinenghi, S.; Vitali, G.; Tresoldi, M.; et al. Post-COVID-19 follow-up clinic: Depicting chronicity of a new disease. *Acta Biomed.* **2020**, *91*, 22–28. [[PubMed](#)]
4. Lopes, E.; Soares-Filho, B.; Souza, F.; Rajão, R.; Merry, F.; Carvalho Ribeiro, S. Mapping the Socio-Ecology of Non Timber Forest Products (NTFP) Extraction in the Brazilian Amazon: The Case of Açai (*Euterpe precatoria* Mart) in Acre. *Landsc. Urban Plan.* **2019**, *188*, 110–117. [[CrossRef](#)]
5. De Souza, A.Q.L.; de Souza, A.D.L.; Filho, S.A.; Pinheiro, M.L.B.; Sarquis, M.I.D.M.; Pereira, J.O. Atividade Antimicrobiana de Fungos Endofíticos Isolados de Plantas Tóxicas Da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos Cogens* Benth. *Acta Amaz.* **2004**, *34*, 185–195. [[CrossRef](#)]
6. Bernstein, J.; Fishbane, P.M.; Gasiorowicz, S.G. Analysis of Physical Systems with Paraconsistent Annotated Logic: Introducing the Paraquantum Gamma Factor. *J. Mod. Phys.* **2000**, *12*, 624.
7. Martins, G.R.; do Amaral, F.R.L.; Brum, F.L.; Mohana-Borges, R.; de Moura, S.S.T.; Ferreira, F.A.; Sangenito, L.S.; Santos, A.L.S.; Figueiredo, N.G.; Silva, A.S.A. da Chemical Characterization, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Açai Seed (*Euterpe oleracea* Mart.) Extracts Containing A- and B-Type Procyanidins. *LWT* **2020**, *132*, 109830. [[CrossRef](#)]
8. de Souza, F.G.; de Araújo, F.F.; de Paulo Farias, D.; Zanotto, A.W.; Neri-Numa, I.A.; Pastore, G.M. Brazilian Fruits of Arecaceae Family: An Overview of Some Representatives with Promising Food, Therapeutic and Industrial Applications. *Food Res. Int.* **2020**, *138*, 109690. [[CrossRef](#)]
9. El-Sayed, A.S.A.; El Sayed, M.T.; Rady, A.; Zein, N.; Enan, G.; Shindia, A.; El-Hefnawy, S.; Sitohy, M.; Sitohy, B. Exploiting the Biosynthetic Potency of Taxol from Fungal Endophytes of Conifers Plants; Genome Mining and Metabolic Manipulation. *Molecules* **2020**, *25*, 3000. [[CrossRef](#)]
10. Jagannath, S.; Konappa, N.; Lokesh, A.; Bhuvaneshwari; Dasegowda, T.; Udayashankar, A.C.; Chowdappa, S.; Cheluviah, M.; Satapute, P.; Jogaiyah, S. Bioactive Compounds Guided Diversity of Endophytic Fungi from *Baliospermum montanum* and Their Potential Extracellular Enzymes. *Anal. Biochem.* **2021**, *614*, 114024. [[CrossRef](#)]
11. Khan, A.L.; Halo, B.A.; Elyassi, A.; Ali, S.; Al-Hosni, K.; Hussain, J.; Al-Harrasi, A.; Lee, I.J. Indole Acetic Acid and ACC Deaminase from Endophytic Bacteria Improves the Growth of *Solanum lycopersicum*. *Electron. J. Biotechnol.* **2016**, *21*, 58–64. [[CrossRef](#)]
12. Rana, K.L.; Kour, D.; Kaur, T.; Devi, R.; Yadav, A.N.; Yadav, N.; Dhaliwal, H.S.; Saxena, A.K. *Endophytic Microbes: Biodiversity, Plant Growth-Promoting Mechanisms and Potential Applications for Agricultural Sustainability*; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2020; Volume 113, ISBN 0123456789.
13. Rodrigues, K.F. *Endophytic Fungi in the Tropical Palm Euterpe oleracea Mart*; University Microfilms International: Ann Arbor, MI, USA, 1992; p. 24.
14. Rodrigues, K.F. The Foliar Fungal Endophytes of the Amazonian Palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia* **1994**, *86*, 376–385. [[CrossRef](#)]

15. Batista, B.N.; Raposo, N.V.D.M.; Da Silva, I.R. Isolamento e Avaliação Da Atividade Antimicrobiana de Fungos Endofíticos de Açazeiro. *Rev. Fitos* **2018**, *12*, 161–174. [[CrossRef](#)]
16. Peters, L.P.; Prado, L.S.; Silva, F.I.N.; Souza, F.S.C.; Carvalho, C.M. Selection of Endophytes as Antagonists of *Colletotrichum gloeosporioides* in Açai Palm. *Biol. Control* **2020**, *150*, 104350. [[CrossRef](#)]
17. McCulloch, J.A.; de Oliveira, V.M.; Pina, A.V.D.A.; Pérez-Chaparro, P.J.; de Almeida, L.M.; de Vasconcelos, J.M.; de Oliveira, L.F.; da Silva, D.E.A.; Rogez, H.; Cretenet, M.; et al. Complete Genome Sequence of *Lactococcus lactis* Strain AI06, an Endophyte of the Amazonian Açai Palm. *Genome Announc.* **2014**, *2*, 2649–2650. [[CrossRef](#)]
18. Colla, L.M.; Primaz, A.L.; Benedetti, S.; Loss, R.A.; de Lima, M.; Reinehr, C.O.; Bertolin, T.E.; Costa, J.A.V. Surface Response Methodology for the Optimization of Lipase Production under Submerged Fermentation by Filamentous Fungi. *Brazilian J. Microbiol.* **2016**, *47*, 461–467. [[CrossRef](#)]
19. Tacin, M.V.; Massi, F.P.; Fungaro, M.H.P.; Teixeira, M.F.S.; de Paula, A.V.; de Carvalho Santos-Ebinuma, V. Biotechnological Valorization of Oils from Agro-Industrial Wastes to Produce Lipase Using *Aspergillus sp.* from Amazon. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2019**, *17*, 369–378. [[CrossRef](#)]
20. Messias, J.M.; Da Costa, B.Z.; De Lima, V.M.G.; Giese, E.C.; Dekker, R.F.H.; Barbosa, A.D.M. Lipases Microbianas: Produção, Propriedades e Aplicações Biotecnológicas. *Semin. Ciências Exatas E Tecnológicas* **2011**, *32*, 213–234. [[CrossRef](#)]
21. Kourist, R.; Guterl, J.K.; Miyamoto, K.; Sieber, V. Enzymatic Decarboxylation-An Emerging Reaction for Chemicals Production from Renewable Resources. *ChemCatChem* **2014**, *6*, 689–701. [[CrossRef](#)]
22. Salihu, A.; Abbas, O.; Sallau, A.B.; Alam, M.Z. Agricultural Residues for Cellulolytic Enzyme Production by *Aspergillus niger*: Effects of Pretreatment. *3 Biotech* **2015**, *5*, 1101–1106. [[CrossRef](#)]
23. Filho, A.B.C.; Machado, B.Q.; Alves, A.U.; Pereira, B.d.J.; Guerra, N.M.; Neto, F.B. Bio-Agronomic Efficiency Indices of Eggplant and Tomato Intercropping. *Hortic. Bras.* **2022**, *40*, 181–189. [[CrossRef](#)]
24. de Melo, I.S.; Silva, C.M.M.S.; Fay, E.Y.; Monteiro, P.R.T.; Dentzien, A.F.M. Degradation of atrazine by filamentous fungi. In Proceedings of the International Mycological Congress, Jerusalem, Israel, 1998.
25. Mayordomo, I.; Randez-Gil, F.; Prieto, J.A. Isolation, Purification, and Characterization of a Cold-Active Lipase from *Aspergillus nidulans*. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 105–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Southcott, K.A.; Johnson, J.A. Isolation of Endophytes from Two Species of Palm, from Bermuda. *Can. J. Microbiol.* **1997**, *43*, 789–792. [[CrossRef](#)]
27. Jeewon, R.; Hyde, K.D. Establishing Species Boundaries and New Taxa among Fungi: Recommendations to Resolve Taxonomic Ambiguities. *Mycosphere* **2016**, *7*, 1669–1677. [[CrossRef](#)]
28. Karakaya, A. First Report of Infection of Kiwifruit by *Pestalotiopsis sp.* in Turkey. *Plant Dis.* **2001**, *85*, 3082–3091. [[CrossRef](#)]
29. Samson, R.A.; Noonim, P.; Meijer, M.; Houbraken, J.; Frisvad, J.C.; Varga, J. Diagnostic Tools to Identify Black *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* **2007**, *59*, 129–145. [[CrossRef](#)]
30. Klich, M.A. *Identification of Common Aspergillus Species*; Centraal Bureau voor Schim: Utrecht, The Netherlands, 2002; p. 116.
31. Zhang, H.W.; Song, Y.C.; Tan, R.X. Biology and Chemistry of Endophytes. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 753–771. [[CrossRef](#)]
32. Griebeler, N.; Polloni, A.E.; Remonato, D.; Arbter, F.; Vardanega, R.; Cechet, J.L.; Di Luccio, M.; de Oliveira, D.; Treichel, H.; Cansian, R.L.; et al. Isolation and Screening of Lipase-Producing Fungi with Hydrolytic Activity. *Food Bioprocess*

- Technol.* **2011**, *4*, 578–586. [[CrossRef](#)]
33. Turki, S. Towards the Development of Systems for High-Yield Production of Microbial Lipases. *Biotechnol. Lett.* **2013**, *35*, 1551–1560. [[CrossRef](#)]
 34. Sandoval, G.; Marty, A. Screening Methods for Synthetic Activity of Lipases. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 390–393. [[CrossRef](#)]
 35. Sarmah, N.; Rani, K.Y. Recent Advances on Sources and Industrial Applications of Lipases. *Biotechnol Prog.* **2018**, *34*, 5–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 36. Fabrício, H.; Birolli, W.G.; Morais, S.; Sena, I.S.; Ferreira, A.M.; Maria, S.; Faustino, M.; Grace, L.; Solon, S.; Porto, A.L.M.; et al. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Study of Biodegradation of Chloramphenicol by Endophytic Fungi Isolated from *Bertholletia excelsa* (Brazil Nuts). *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2019**, *20*, 101200. [[CrossRef](#)]
 37. Asghar, A.; Aziz, A.; Raman, A.; Mohd, W.; Wan, A. A Comparison of Central Composite Design and Taguchi Method for Optimizing Fenton Process. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, 869120. [[CrossRef](#)]
 38. Beg, S.; Ii, V.; Case, P. *Design of Experiments for Pharmaceutical Product Development*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2021; Volume II, ISBN 9789813343504.
 39. Reinehr, C.O.; Treichel, H. Production with Hydrolytic Activity by *Aspergillus* Using Agroindustrial Byproducts, Soy Oil and Glycerol. *RECEN-Rev. Ciências Exatas E Nat.* **2016**, *18*, 97–115.
 40. Souza, I.M.; Bassi, G.J.; Luiz, J.H.H.; Hirata, D.B. Isolation and Screening of Extracellular Lipase- Producing Endophytic Fungi from *Handroanthus Impetiginosus*. *Asian J. Biotechnol. Bioresour. Technol.* **2018**, *4*, 1–10. [[CrossRef](#)]
 41. Elango, D.; Manikandan, V.; Jayanthi, P.; Velmurugan, P.; Balamuralikrishnan, B.; Veera, A.; Subramaniam, M. Current Plant Biology Selection and Characterization of Extracellular Enzyme Production by an Endophytic *Fungi Aspergillus Sojae* and Its Bio-e Ffi Cacy Analysis against Cotton Leaf Worm, *Spodoptera Litura*. *Curr. Plant Biol.* **2020**, *23*, 100153. [[CrossRef](#)]
 42. Nema, A.; Patnala, S.H.; Mandari, V.; Kota, S.; Devarai, S.K. Production and Optimization of Lipase Using *Aspergillus Niger* MTCC 872 by Solid-State Fermentation. *Bull. Natl. Res. Cent.* **2019**, *43*, 82. [[CrossRef](#)]
 43. Oliveira, A.; Vargas, J.; Rodrigues, M.; Mariano, A.B. Utilização de Resíduos da Agroindústria para a Produção de Enzimas Lipolíticas por Fermentação Submersa. *Rev. Bras. de Prod. Agroindustriais* **2013**, *15*, 19–26. [[CrossRef](#)]
 44. Ben Mefteh, F.; Frikha, F.; Daoud, A.; Bouket, A.C.; Luptakova, L.; Alenezi, F.N.; Al-Anzi, B.S.; Oszako, T.; Gharsallah, N.; Belbahri, L. Response Surface Methodology Optimization of an Acidic Protease Produced by *Penicillium bilaiae* Isolate TDPEF30, a Newly Recovered Endophytic Fungus from *Healthy* Roots of Date Palm Trees (*Phoenix dactylifera* L.). *Microorganisms* **2019**, *7*, 74. [[CrossRef](#)]
 45. Abd-elaziz, A.M. Enhanced Production, Partial Purification, and Characterization of Alkaline Thermophilic Protease from the Endophytic Fungus *Aspergillus Ochraceus* BT21. *Egypt. Pharm. J.* **2021**, *19*, 338–349. [[CrossRef](#)]

Artigo 3 - Otimização da produção de amilase por fungos endofíticos isolados de *Euterpe oleracea* Mart.

Artigo será submetido na Tropical Plant Pathology *on-line* ISSN: 1983-2052, qualis A4 em biotecnologia, segundo a classificação do quadriênio 2017-2020 da plataforma Sucupira – CAPES

Iracirema S. Sena,^{ab} Agerdanio A. de Souza,^a Swany F. Borges,^a Adriana M. Ferreira,^{bc} Victor H. Marinho,^{ab} Rosemary de Carvalho R. Koga, José C. Tavares Carvalho,^c Irlon M. Ferreira,^{ab*}

^a Grupo de Biocatálise e Síntese Orgânica Aplicada, Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal do Amapá, Rod. JK, KM 02, 68902-280, Macapá, Amapá, Brazil.

^b Programa de Pós-graduação em Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal,

^c Laboratório de Pesquisa em Fármacos, Universidade Federal do Amapá, Rod. JK, KM 02, 68902-280, Macapá, Amapá, Brazil.

*Corresponding author (e-mail): irlon.ferreira@gmail.com

3.1 Abstract

Palm tree *Euterpe oleracea* Mart. (açazeiro), commonly found in the Brazilian Amazon, is a source of livelihood for traditional populations and has proven to have great economic and scientific potential. From it can be isolated countless species of endophytic fungi with biotechnological applicability from different organs (leaves, fruits, roots, seeds), among these activities, the production of amylase. In the present study, 32 *Euterpe oleracea* endophyte genera were isolated, purified, and morphologically characterized and screened for enzymatic index (Pz) in solid medium (PDA). Based on these results, two strains with high enzymatic index, the fungus *Aspergillus*, were selected. 21 and *Penicillium* sp. 20 was tested in a liquid medium assay using a three-level factorial design (Box-Behnken) to optimize conditions and increase the relative production of amylase. The results of the factorial design tests showed that, through a combination of factors, it was possible to achieve amylase production levels as high as 95.28%, with optimal conditions of 30 °C, pH 5.0, and a reaction time of 3 days. Therefore, it can be concluded from this study that endophytic fungi isolated from acai palm have great potential to produce amylases for various scientific, industrial and technical purposes.

Keywords: acai berry, endophytic microorganisms, amylolytic activity, biotechnology.

3.2. INTRODUÇÃO

A *Euterpe oleracea* Mart. (açazeiro) é uma palmeira de grande interesse econômico da região amazônica, é uma das espécies vegetais com atividades extrativistas mais importantes que não é destinada à produção madeireira (Steege et al., 2013; Martinot, Pereira e Silva (2017)). Ocorre no Brasil nos estados do Pará, Amazonas, Amapá no Maranhão no norte da América do Sul na Guina Francesa, Suriname, Panamá, Equador, Venezuela Trinidad e Colômbia (Henderson & Galeano, 1996; Henderson, 2000; Viana, 2020). O gênero *Euterpe* dispõe de 28 espécies distribuídas por toda a bacia amazônica, dentre essas espécies as que ocorrem com maior frequência são a *E. oleracea*, *E. precatória* e *E. edulis*. Dentre elas, a *E. oleracea* é o enfoque do estudo (Yamaguchi, Pereira, Lamarão & Lima, 2015). A espécie ainda é usada na medicina tradicional em diversas aplicações, suas raízes são usadas para aliviar dores musculares, problemas renais e úlceras de pele e malária (Yamaguchi et al., 2015). Diversas espécies vegetais (se não todas) possuem fungos endofíticos, que pertencem a um grupo muito diversificado de micro-organismos, que vivem em uma relação simbiótica com as plantas sem causar-lhes danos (Kogel, Franken & Hückelhoven, 2006). Esses micro-organismos apresentam um grande potencial de aplicação biotecnológica e comercial por serem capazes de produzir enzimas hidrolíticas, dentre essas as que mais se destacam são as amilases por possuir diversas propriedades e aplicabilidades (Cuzzi, Link, Vilani & Onofre, 2011; Orlandelli, Specian, Felber & Pamphile, 2012).

A espécies *E. oleracea*, poucos estudos relatados de fungos endofíticos, o primeiro relato *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phoma* sp, *Phomopsis* sp, *Xylaria orbuscula*, *Xylaria cubensis*, *Xylaria adscendens* (Rodrigues, 1994).

O uso de micro-organismos produtores de enzimas (macromoléculas catalisadoras de alta especificidade para seus substratos) tem sido cada vez mais utilizados por apresentarem propriedades únicas, como alta especificidade, ação rápida e biodegradabilidade, tais propriedades permitem que os processos industriais possam ser executados sob condições de reações mais brandas, com melhores rendimentos e redução na geração de resíduos (Adrio & Demain, 2014). Essas enzimas podem ser substitutas de várias substâncias químicas sintéticas, podendo contribuir para diversos processos de produção ou gerar benefícios para o meio ambiente, por meio da sua biodegradabilidade e por possuir menor consumo de energia (Wanderley, Neves & Andrade, 2011).

As amilases produzidas especificamente por fungos endofíticos têm sido muito utilizadas no setor industrial, possuindo diversas aplicações, como na fabricação de detergente, alimentos, produtos têxteis, produtos químicos, fabricação de papel, produtos farmacêuticos,

combustível, bem como em análises clínicas (Di Donato, Finore, Annarita, Nicolaus & Lama, 2019; Kumari, Sushil, Rani, Malik & Avtar, 2019). As amilases mais utilizadas industrialmente são as α -amilases, β -amilases e glucoamilases (Souza, Orsi, Gomes & Lunardi, 2019; Pandey, Webb, Fernandes & Larroche, 2006).

A atividade de bioprospecção visa extrair valor econômico da diversidade biológica, através da procura por organismos, genes, enzimas, compostos bioativos, processos e partes provenientes de seres vivos com alto potencial econômico e que podem levar ao desenvolvimento de um produto (Saccaro, 2012). Diante disso, levando-se em conta a grande quantidade de metabólitos desenvolvidos a partir de moléculas biológicas, torna-se evidente o papel da bioprospecção no desenvolvimento tecnológico (Berlinck, 2012).

Nesse contexto, o Brasil merece atenção por possuir a maior biodiversidade da Terra, habitando espécies existentes (Lewinsohn & Prado, 2005). Entendendo a biodiversidade como um patrimônio genético, diferentes direções de pesquisa buscam produtos que beneficiem diferentes áreas da sociedade e tenham valor econômico, como biotecnologia, agricultura, nutrição, indústria, biorremediação, biomonitoramento, saúde, produção de biocombustíveis e assim por diante (Saccaro, 2011).

À vista da importância do exposto, o presente estudo teve como finalidade explorar experimentalmente a produção da enzima amilase com potencial biotecnológico provenientes de fungos endofíticos de *E. oleracea* da Amazônia brasileira, utilizando a aplicação de modelos experimentais que visam a otimização das condições reacionais.

3.3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Reagentes e solventes

Tween 20®; Amido solúvel P.A; Iodeto de potássio P.A; Ácido cítrico anidro P.A; Carboximetilcelulose sal sódio P.A; Nitrato de sódio P.A adquirido (Synth - São Paulo). Acetato de sódio P.A; Cloreto de cálcio P.A; Cloreto de sódio P.A; Fosfato de sódio dibásico anidro P.A adquirido (Vetec - Rio de Janeiro). Gelatina comercial. Leite em pó desnatado. Malte extract; Agar de agar; Peptona adquirido (Kasvi - Paraná).

3.3.2. Isolamento e identificação de fungos endofíticos da *E. oleracea*

O material botânico (folhas, fruto e raiz) da *E. oleracea* foram coletados e cedidos pela

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária /EMBRAPA/Amapá, Brasil, na área de localização (N 00° 22' 55" e O 51° 01' 40") no período de agosto de 2018. Os fungos endofíticos utilizados neste trabalho foram isolados dos frutos, folhas e raiz armazenados conforme (Azevedo, Maccheroni, Pereira & Araújo, 2000; Araújo et al., 2002).

3.3.3. Identificação e conservação dos fungos endofíticos

A identificação morfológica conduziu-se a nível de gênero por agrupamento macromorfológico, da observação característica de cada indivíduo, tais como: aspecto, forma, coloração e consistência das colônias. Para visualização das estruturas microscópicas foram confeccionadas lamínulas em microcultivo, utilizando corante azul de lactofenol (blue cotton) de 0,1 a 0,5% sobre as lâminas de microscopia. Para a captura das imagens foi utilizado um microscópio óptico (OLYMPUS ® BX41), as imagens foram ampliadas de 200 a 400 vezes, e comparadas com as imagens de literaturas especializadas (Ellis, 1971.; Barnet, & Hunter, 1998). Após, as análises macromorfológica e micromorfológica identificou-se os seguintes fungos endofíticos: *Aspergillus* sp, *Botryodiplodia* sp, *Penicillium* sp, *Pestalotiopsis* sp.

3.3.4. Análise microestrutural por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para análise da microestrutura, fragmentos da amostra foram montados em fitas de carbono e visualizadas com um microscópio eletrônico de varredura modelo HITACHI – TM3030PLUS, pertencente ao Laboratório de Pesquisa em Fármaco do Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde – UNIFAP, em uma voltagem acelerada de 20 kv.

3.3.5. Determinação da atividade enzimática

Os micro-organismos foram pontualmente inoculados no centro da placa de Petri (90 cm), e incubados em B.O.D em condições controladas à 28°C com fotoperíodo de 12 horas. As medições do diâmetro do halo produzido e da colônia foram expressas em centímetros (cm) e determinadas a cada 24h por 5 dias consecutivos. Todos os testes foram realizados em triplicatas.

3.3.6. Teste enzimático para amilase em meio sólido

Para avaliação da atividade amilolítica, os fungos foram cultivados em Ágar Tampão

fosfato 0,1 M (fosfato dibásico de sódio anidro-7,0 g, ácido cítrico 5,7 g, agar-14,4 g, amido-8 g, água destilada-800 mL e pH-5,0). Após 4 dias de incubação, as placas foram reveladas com solução de iodo 1% em 2% de iodeto de potássio. A zona clara desenvolvida ao redor da colônia indica a atividade amilolítica.

3.3.7. Determinação da atividade enzimática

Para a cultura submersa, frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de meio de cultura foi inoculado com 5 discos de ágar micelial (8 mm de diâmetro) de cepa fúngica. O meio amido foi composto por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 7 g/L, KH_2PO_4 4,9 g/L, Na_2HPO_4 5,32 g/L, MgSO_4 0,7 g/L extrato de levedura 14 g/L e amido solúvel 28g/L. Os experimentos foram realizados em triplicata e o pH inicial do meio ajustado para 5. A produção de amilase foi estudada nas seguintes condições: pH 5, 7 e 9; temperatura de 25, 30 e 35°C e tempo 3, 6 e 9 dias, sob agitação de 150 rpm. Após o período de fermentação, os conteúdos dos frascos foram submetidos à filtração para obtenção do caldo enzimático.

3.3.8. Dosagem da atividade enzimática

A amilase foi quantificada através da adição de 0,5 mL de uma solução contendo 1,6% de amido solúvel em tampão acetato 2 M pH 4,3 e 0,5 mL do extrato enzimático em tubos de ensaio, que foram incubados por 15 min a 60°C. Os açúcares redutores produzidos foram quantificados pela técnica do ácido dinitrosalicílico (DNS), em que 2 mL desse reagente foram adicionados a 0,5 mL do caldo enzimático e deixado em fervura por 5 min. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima capaz de liberar 0,1 µg de açúcar redutor por minuto.

$$Pz = \frac{\text{Diâmetro da colônia}}{\text{Diâmetro da colônia} + \text{Zona de precipitação}}$$

Atividade amilolítica, ou seja, o valor de Pz foi calculado aplicando a seguinte equação:
 $Pz = \text{diâmetro da colônia} / \text{diâmetro da colônia} + \text{diâmetro do halo}$.

Com base no valor de Pz, a atividade lipolítica foi classificada em 5 tipos: $Pz = 1$ atividade amilolítica negativa (-); $Pz < 0,90-0,99$ = atividade amilolítica fraca (+); $Pz < 0,80-0,89$ = atividade amilolítica pobre (++); $Pz < 0,70-0,79$ = atividade amilolítica moderada (+++)

e $P_z < 0,70$ = atividade amilolítica intensa (++++).

3.4. Análise estatística

3.4.1. Desenho experimental e modelo estatístico

Neste estudo, um planejamento fatorial Box-Behnken de três níveis e três variáveis foi aplicado para determinar a melhor combinação de variáveis para determinação da produção de amilase usando fungos endofíticos isolados. pH do meio, tempo (dias) e temperatura (°C) que foram identificados como tendo fortes efeitos sobre a resposta em experimentos preliminares de um fator de cada vez, foram tomados como as variáveis testadas em um experimento de 15 corridas para determinar seus níveis ótimos. As variáveis independentes foram designadas como x_1 , x_2 e x_3 , e seus valores de níveis estão apresentados na Tabela 01. A equação polinomial utilizada para as três variáveis é apresentada a seguir (Equação 1):

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 \text{ [Eq.1]}$$

Onde: Y é a resposta prevista; β_0 é a constante do modelo; β_1 , β_2 e β_3 são os coeficientes lineares; β_{11} , β_{22} e β_{33} são os coeficientes quadráticos; β_{12} , β_{13} e β_{23} são os coeficientes de interação; e x_1 , x_2 e x_3 são variáveis independentes.

Tabela 1. Três variáveis independentes utilizadas no planejamento fatorial Box-Behnken.

Fator	Nome	Níveis		
		-1	0	+1
X_1	pH	5	7	9
X_2	Tempo (dias)	3	6	9
X_3	Temperatura (°C)	25	30	35

A condição ótima foi determinada considerando o teor de produção de amilase (%) com resposta. O software STATISTICA® (versão10, Statesoft – Inc., Tulsa, EUA, versão experimental, 2011) foi utilizado para o desempenho experimental, análise dos dados e

determinação das condições ótimas. A NOVA foi utilizada para avaliação da significância da influência e interação das variáveis independentes. Gráficos de Pareto foram aplicados para obter a significância do impacto das variáveis testadas nas respostas mencionadas.

3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1. Isolamento, identificação e seleção de fungos endofíticos

As cepas de fungos endofíticos foram isoladas de *E. oleracea* utilizando fragmentos de cada tecido vegetal (folhas, raízes e frutos) conforme a Figura 1. No total, foram identificados 32 fungos endofíticos a partir dos fragmentos coletados. Os meios para o cultivo e replicação dos fungos utilizados foram o BDA (Batata, Dextrose e Ágar) e o Extrato de Malte. Sendo assim, 32 cepas de fungos endofíticos isolados foram utilizados no screening para selecionar as linhagens com maior potencial para a produção de enzimas. Durante Screening, procurou-se isolar fungos de diferentes grupos morfológicos. Os principais gêneros de fungos endofíticos identificados morfolologicamente foram *Botryodiplodia* sp (30), *Penicillium* sp (20, 32), *Aspergillus* sp (1, 21, 24) e *Pestalotiopsis* sp. (31). A Figura 2 mostra as espécies de fungos endofíticos isolados e cultivados em placas de Petri, após todo o processo de purificação e identificação morfológica das linhagens.

Diversos estudos de isolamento e identificação de fungos endofíticos de *E. oleracea* da Amazônia brasileira já foram realizados, dentre as cepas encontradas com maior incidência isoladas de diferentes órgãos da palmeira podemos destacar os gêneros *Xylaria*, *Lasiodiplodia*, *Curvularia*, *Letendraeopsis*, *Nigrospora*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Daldinia*, *Idriella*, *Oxydothis*, *Leiosphaerella*, *Phomopsis*, entre outros (Rodrigues, 1994), não sendo comum em pesquisas recentes o isolamento e identificação de fungos endofíticos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* em *E. oleracea* na Amazônia.



Figura 1. Planta da espécie *Euterpe oleracea* (A) frutos (B) folhas (C) raiz (D).

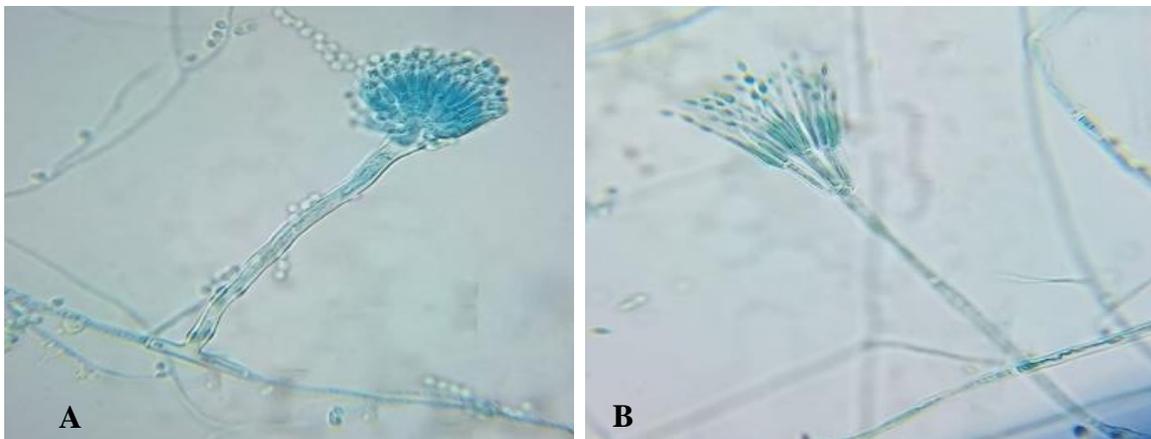


Figura 2. Isolados da *E. oleracea*, (A) identificação morfológica a nível de gênero em microcultura observado por microscopia óptica: (A) *Aspergillus* sp (B) *Penicillium* sp.

As linhagens de fungos endofíticos isoladas e identificadas foram testadas para produção enzimática amilolítica após 4 dias de incubação em meio sólido, as cepas isoladas apresentaram formação de halo ao redor da colônia como mostrado na Figura 3, indicando a produção de amilase pelos fungos. Segundo Silva (2016), a capacidade amilolítica de microorganismos cultivados em meio sólido, caracteriza-se pela presença de halos de degradação nas placas de Petri com tamanhos variados de acordo com o potencial de produção da cepa.

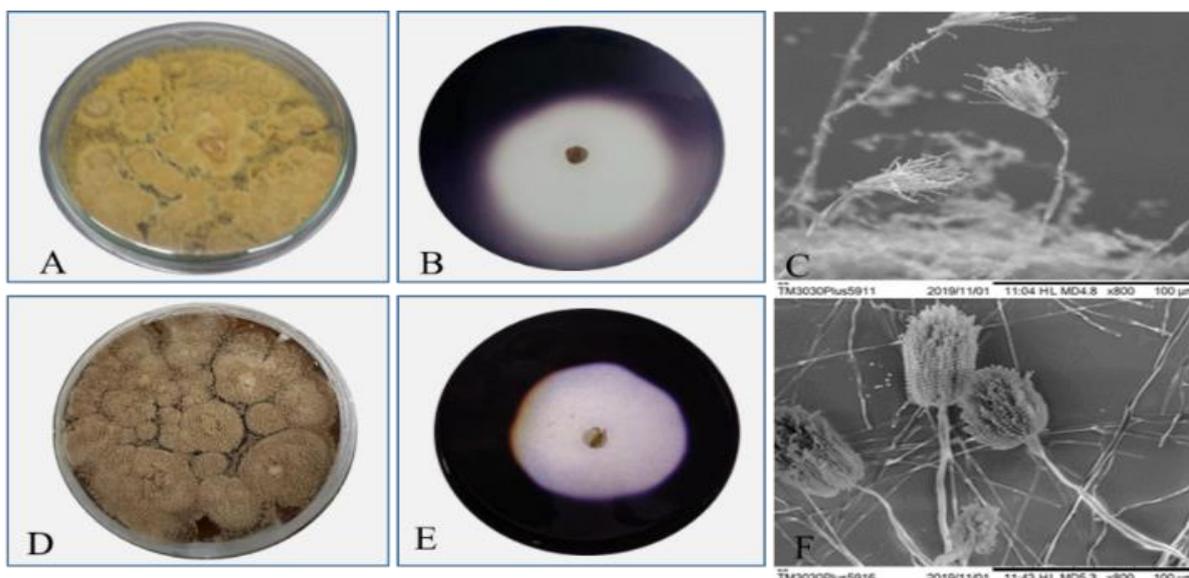


Figura 3. Crescimento micelial do fungo *Penicillium* sp (A) *Aspergillus* sp (D) e teste semiquantitativo de produção da enzima e formação de cristais de cálcio ao redor da colônia (B e E), morfologia do fungo visualizada por Microscópio Eletrônico de Varredura na intensidade de 800x (C e F).

Com base nos índices enzimáticos calculados (Pz), observou-se que nem todos fungos endofíticos isolados de *E. oleracea* analisados neste experimento exibiram atividade amilolítica, das 32 espécies fúngicas, 7 cepas destacaram-se por apresentarem alta atividade enzimática (Tabela 2) como os fungos *Botryodiplodia* sp. (30) valor de Pz 0.237 (+++), *Penicillium* sp. (20, 32) valor de Pz 0.5 (++++), *Aspergillus* sp. (21, 24) valor de Pz 0.5 (++++), *Pestalotiopsis* sp. (31) valor de Pz 0.5 (++++), valor de Pz 1, portanto sem atividade. As espécies não foram capazes de crescer no meio para detecção da atividade amilolítica. Após esse estudo em meio sólido, duas cepas foram selecionadas para aplicação de um planejamento experimental (fatorial) de otimização de produção relativa de amilase em meio líquido, os fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.

Tabela 2. Dos 7 gêneros que apresentou atividade enzimática, isolados de fungos endofíticos da *E. oleracea* (açaizeiro), baseados no cálculo Pz. Os fungos *Aspergillus* sp. 21 e *Penicillium* sp. 20 foram selecionados para os ensaios em meio líquido.

Nº	Gênero (código)	PZ
1	<i>Aspergillus</i> (1)	+++
2	<i>Aspergillus</i> (21)	++++
3	<i>Aspergillus</i> (24)	++++
4	<i>Botryodiplodia</i> (30)	+++
5	<i>Penicillium</i> (20)	++++
6	<i>Penicillium</i> (32)	++++
7	<i>Pestalotiopsis</i> (31)	++++

Griffin (1994) descreve que produção de amilase por fungos filamentosos varia de

acordo com gênero e espécie. Outros autores estudaram fungos das espécies *Syncephalastrum racemosum*, *Macrophomina phaseolina*, *Penicillium chrysogenum*, *Nectria haematococca*, *Metarhizium anisopliae* (Fernandes, Ulhoa, Asquiere & Monteiro, 2007; Guandalini, 2007; Freitas, Martins & Ferreira, 2014; Saleem & Ebrahim, 2014). Embora outras espécies de fungos apareceram sendo estudados como alternativas de produção de α amilase, Pandey et al. (2006) já indicavam que as espécies *Aspergillus* e *Rhizopus* tinham mais potencial para a produção de enzimas amilolíticas.

Batista, Matias, Oliveira e Albuquerque (2022) avaliaram a produção de amilase por fungos endofíticos *Penicillium* sp, *Aspergillus* sp, *Colletotrichum* sp, e *Guignardia* sp isolados de *Euterpe precatória*, que apresentaram alta atividade amilolítica em meio de cultura sólido e líquido, se mostrando promissores como fonte de amilases para aplicação em produtos com potencial biotecnológicos. Segundo Selvam et al. (2016), as amilases são umas das mais importantes enzimas em processos biotecnológicos e industriais, sendo principalmente produzidos por microrganismos. Dentre os fungos filamentosos com grande potencial para produção são citados como produtores de amilase estão os dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Trichoderma*. As espécies *R. oligosporus* e *T. reesei* também são citados como produtores de amilase (Cavka & Jonsson, 2014).

3.5.2 Planejamento experimental para produção relativa de amilase com os fungos endofíticos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.

As duas linhagens selecionadas foram utilizadas em ensaios de planejamento fatorial Box-Behnken para otimizar as condições de produção relativa de amilase (%) em meio líquido, os fungos endofíticos *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp. foram utilizados em diferentes ensaios do protocolo de planejamento experimental. Holanda et al. (2019) concluíram que o planejamento fatorial Box-Behnken Design (BBD) é ferramenta ideal para otimizar condições experimentais com fungos endofíticos. Além disso, uma significativa vantagem no uso do BBD em relação a outras técnicas é a economia, pois demanda um menor número de execuções experimentais e menos tempo e conseqüentemente um menor uso de insumos (Asghar, Abdul-Raman & Daud, 2014).

Os valores das variáveis, os níveis utilizados nos experimentos e os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 3. A variação entre os valores máximos e mínimos de produção relativa de amilase obtidos foram de 30,93 a 95,28 % para o fungo *Aspergillus* sp, e de 38,18 a 68,32 % para o *Penicillium* sp, onde os maiores percentuais representam uma maior produção da enzima pelos fungos endofíticos em comparação ao grupo controle. Os coeficientes de determinação dos modelos gerados (R^2) foram de 0,75 para os ensaios do fungo endofítico

Aspergillus sp e de 0,87 para o *Penicillium* sp. A proficiência do modelo é demonstrada se R^2 for igual a 0,75 ou superior a este valor (Haaland, 1989). Os valores obtidos de produção relativa de amilase pelos fungos endofíticos foram quantificados a partir da equação $Y = 0,6559*X + 0,1083$ (R^2 0,9987) gerada pela curva padrão analítica (Figura 4).

Tabela 3. Matriz do planejamento experimental e respostas para os níveis e variáveis.

Run	Níveis e variáveis codificados e não codificados						Amilase (%)	Amilase (%)
	$x1$ (pH)		$x2$ (Temp.)		$x3$ (Days)		<i>Aspergillus</i> sp (21)	<i>Penicillium</i> sp (20)
1	5	-1	25	-1	6	0	30,53	68,32
2	5	-1	30	0	3	-1	95,28	61,44
3	5	-1	30	0	9	1	76,20	54,89
4	5	-1	35	1	6	0	64,50	48,07
5	7	0	25	-1	3	-1	82,79	60,53
6	7	0	25	-1	9	1	41,96	60,17
7	7	0	35	1	3	-1	64,49	38,18
8	7	0	35	1	9	1	57,50	44,74
9	9	1	25	-1	6	0	33,46	61,13
10	9	1	30	0	3	-1	84,77	52,47
11	9	1	30	0	9	1	82,92	52,33
12	9	1	35	1	6	0	79,18	51,35
13	7	0	30	0	6	0	76,46	58,81
14	7	0	30	0	6	0	74,77	52,92
15	7	0	30	0	6	0	69,58	55,71

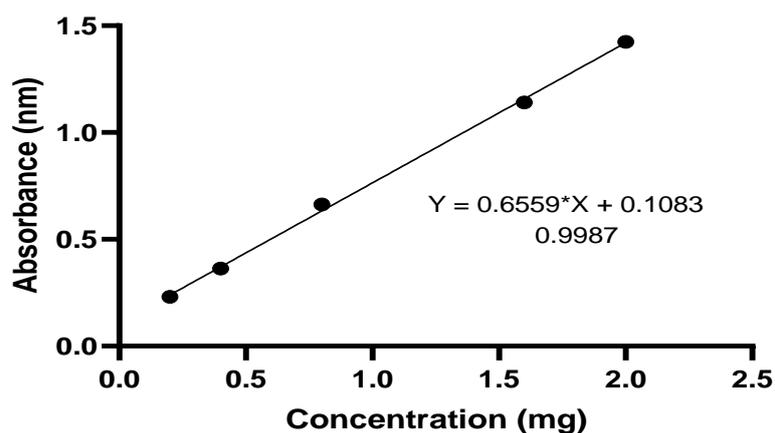


Figura 4. Curva analítica com equação da reta

Planejamentos experimentais são aplicados em diversos estudos para otimizar condições para produção de enzimas em microrganismos endofíticos. Hu et al. (2022) desenvolveram condições de fermentação otimizadas para aumentar o rendimento de produção de amilase por bactérias endofíticas, chegando a índices ótimo de temperatura (60°C) e pH (8,0) para melhor

produção de amilase. Sunitha, Ramesha, Savitha e Srinivas (2012) selecionaram e avaliaram linhagens de fungos endofíticos isolados da planta *Alpinia calcarata* (Haw.) Roscoe quanto a atividade amilolítica, concluindo que fatores como a temperatura e pH devem ser estudados para melhorar a produção relativa de tal enzimas, e aplicando uma otimização experimental chegaram a valores ótimos de 30 °C para temperatura e 7,0 para o pH. De maneira semelhante, Unakal, Sadashiv, Bhairappanavar e Sindagi (2014) selecionaram o fungo endofítico *Aspergillus* spp. e otimizou condições experimentais para a produção de amilase, entre outros fatores, utilizando uma larga faixa de pH, com rendimento ótimo em pH 7,0, verificou-se que esta cepa produziu amilase com atividade enzimática de $4,17\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ e o teor de proteína foi de 32,7 $\mu\text{g/ml}$.

A partir da análise estatística deste estudo foi gerado um Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados que revelam os efeitos significativos do pH do meio, do tempo de reação (dias) e temperatura (°C) lineares e quadráticos, com os fungos endofíticos *Penicillium* (20) e *Aspergillus* (21), onde o comprimento da barra representa a importância absoluta dos efeitos estimados de acordo com os valores utilizados nos ensaios. A linha vertical representa o limite entre os efeitos significativos e insignificantes com 5% de risco de erro. Os efeitos são significativos a um nível de confiança de 95% no domínio experimental estudado ($p < 0,05$) como apresentados na Figura 5.

De acordo com o modelo de regressão aplicado, como mostrado na Figura 5 A e B, verificou-se que um fator foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$) para produção relativa de amilase, tanto para o fungo *Aspergillus*, quanto para o *Penicillium*. Quando utilizado o fungo endofítico *Aspergillus* o fator temperatura (Q), sendo um modelo quadrático, os melhores percentuais ocorreram tanto com o aumento ou diminuição da temperatura, com observados nas corridas 2 (95,28% com 30 °C), corrida 5 (82,79% com 25 °C), corrida 10 (84,77% com 30 °C) e 12 (79,18 com 35 °C), na Tabela 3 pode-se observar (Figura 5 B), nos ensaios com o fungo *Penicillium* que a temperatura (L) foi o fator que mais influenciou a produção de amilase, reduzindo-a, o que fica demonstrado na Tabela 3 (corridas 1, 5, 6 e 9), onde os maiores percentuais (68,32, 60,53, 60,17, e 61,13), foram alcançados com a menor temperatura (25 °C) aplicada no protocolo. Evidentemente a variável temperatura representa o fator mais determinante para melhoria da produção de amilase pelos fungos.

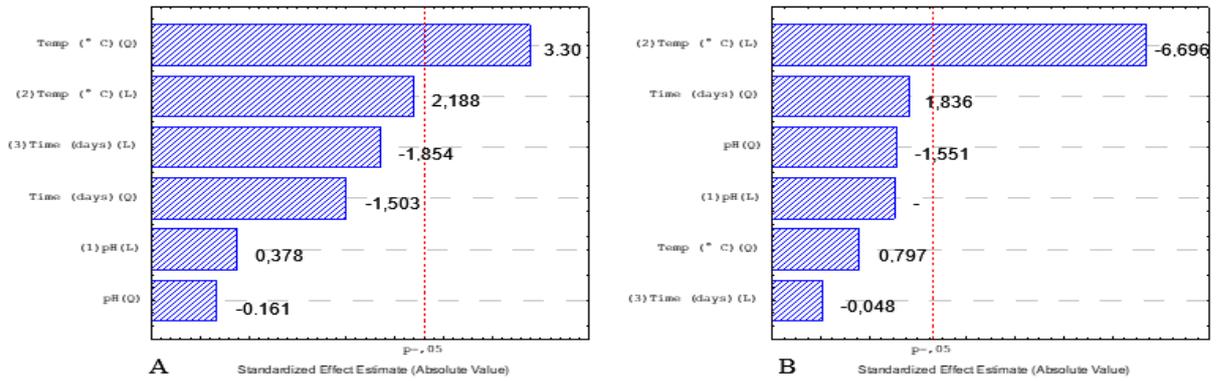


Figura 5. Gráfico de Pareto de efeitos para a produção relativa de amilase (%). **A** fungo endofítico *Aspergillus* sp; **B** fungo endofítico *Penicillium* sp.

O modelo quadrático correlacionando os fatores utilizados nos experimentos na produção de lipase pelos fungos endofíticos permitiu projetar três gráficos de superfície de resposta para otimização dos resultados. O gráfico de superfície de resposta da produção de amilase do fungo endofíticos *Aspergillus* (21) (Figura 6) foi gerado para determinar o cruzamento de duas condições e avaliar o seu efeito sobre a resposta obtida.

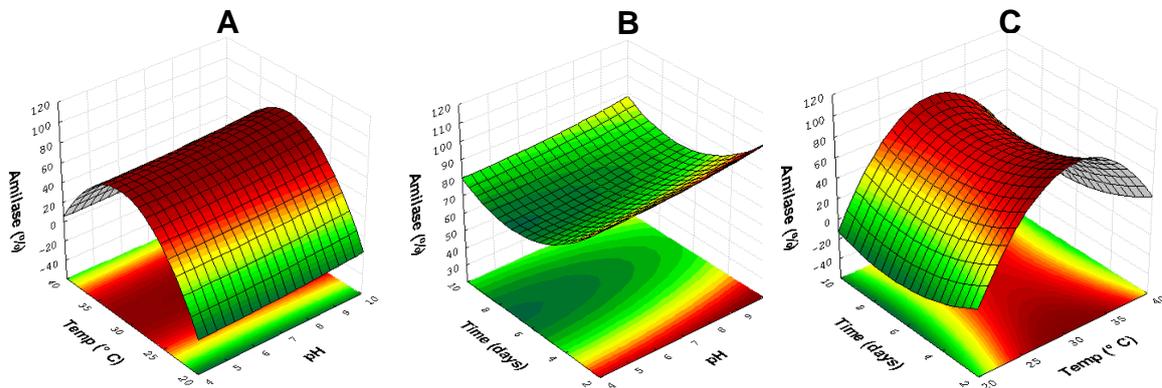


Figura 6. Gráficos de superfície de resposta (3D) com o cruzamento das condições experimentais para produção relativa de amilase com o fungo *Aspergillus* (21). **A** temperatura (°C) e pH do meio; **B** tempo de reação (dias) e pH do meio; e **C** temperatura (°C) e tempo de reação (dias).

A produção relativa de amilase em função da temperatura e do pH do meio reacional (Figura 6 A) revela que uma melhor produção dessa enzima pode ser obtida em qualquer faixa de temperatura usada no protocolo (25, 30 e 35 °C) com o intervalado dos valores de pH utilizados. No cruzamento entre o tempo de reação e pH do meio (Figura 6 B) é possível observar que uma resposta positiva na produção de amilase pode ser obtida em qualquer valor de pH utilizado combinado com o menor tempo de reação (3 dias). Na Figura 6 C a interação entre temperatura e tempo da reação mostra uma alta produção de amilase com o intervalo de temperatura usado para qualquer tempo aplicado, em especial os maiores e menores níveis (3 e 9 dias).

Da mesma forma, três gráficos de superfície de resposta foram obtidos para otimização das condições experimentais para o fungo endófito *Penicillium* (20) (Figura 7). A produção de amilase em razão da temperatura utilizada e do pH do meio racional (Figura 7 A) mostra que a diminuição da temperatura (<30°C) combinado com o intervalo de pH utilizado, influencia diretamente no aumento da produção de amilase. Já na Figura 7 B a relação entre o tempo o pH e o tempo de reação, demonstra que para uma maior produção de amilase é necessário utilizar a um pH < 5,0 ou > 9,0 para todo intervalo de tempo utilizado. Na interação entre tempo de reação e temperatura (Figura 7 C) as melhores condições obtidas foram com a redução da temperatura (<30°C) para toda a faixa de tempo aplicada nos ensaios.

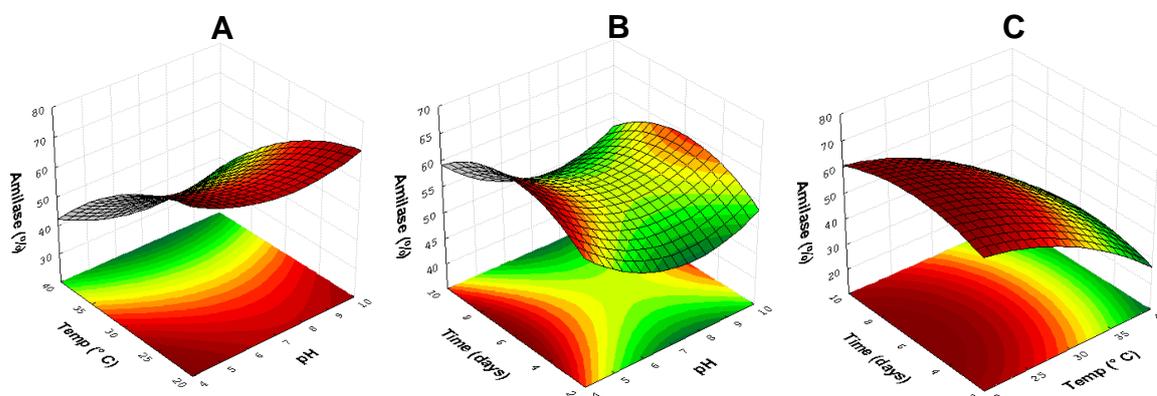


Figura 7. Gráficos de superfície de resposta (3D) com o cruzamento das condições experimentais para produção relativa de amilase com o fungo *Penicillium* (20). **A** temperatura (°C) e pH do meio; **B** tempo de reação (dias) e pH do meio; e **C** temperatura (°C) e tempo de reação (dias).

Foi possível observar através dos resultados obtidos e pelo gráfico de Pareto gerado, que a temperatura durante a reação para a atividade amilolítica foi o fator estatisticamente mais significativo ($p < 0,05$). A temperatura exerce importante papel na hidrólise do amido por microrganismos, diversos estudos já destacaram a relevância desse fator, como Carvalho, Corrêa, Silva, Viana & Martins, (2008), que destacaram o uso de temperaturas acima de 50 °C para a produção máxima enzimática. Outros estudos mostram que uma maior variação de 60 a 90°C também promovem a hidrólise de grânulos de amido, indicando a natureza termoestável dessa enzima (Goyal, Gupta & Soni, 2005). No entanto, este estudo mostra que é possível preservar a atividade amilolítica com temperaturas menores e mais seguras experimentalmente.

Os fungos produtores de enzima amilase exercem uma função importante na diminuição de energia, redução de estímulo e no aceleração de inúmeras reações biológicas que são fundamentais para sustentar a vida sem transformações constantes. Essas enzimas encontram-se bastantes divididas em todos os aspectos de organismos existentes envolvendo origem microbianas, vegetais e animais.

3.5. CONCLUSÃO

Os fungos endofíticos do açazeiro (*E. oleracea*) apresentaram alta capacidade de atividade amilolítica, que através de uma triagem inicial em meio sólido foi possível selecionar duas linhagens que se destacaram, o *Aspergillus* (21) e o *Penicillium* (20), que obtiveram índice enzimático (Pz) intenso. A partir da aplicação de um planejamento fatorial Box-Behnken Design com três fatores (temperatura, pH e tempo de reação) e três níveis foi possível otimizar e potencializar a produção relativa da enzima amilase com o índice máximo de 95,28% com o fungo endofítico *Aspergillus* (21), tendo como condições ótimas, a temperatura de 30 °C, pH 5,0 e tempo de reação de 3 dias. Neste estudo, a produção de amilase pelos fungos isolados do açazeiro parece ser muito promissora, principalmente com o uso de otimização experimental, sendo necessário mais estudos para aplicação biotecnológica da amilase e o provável potencial na produção de outras enzimas hidrolases.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Amapá (FAPEAP, concessão nº 34568.515.22257.28052017) pelo apoio financeiro. WGB agradece à Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, bolsa nº 2017/19721-0) pela bolsa de doutorado.

3.6. REFERÊNCIAS

- Adrio, JL & Demain, AL (2014). Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4, 117-139.
- Araújo LW; Lima, AOS; Azevedo, JL; Marconi, J; Sobral, JK. & Lacava, PT (2002). *Manual: isolamento de microrganismos endofíticos*. EDUSP.
- Asghar, A; Abdul Raman, AA & Daud, W (2014). A comparison of central composite design and Taguchi method for optimizing Fenton process. *The Scientific World Journal*, 2014, 1-14.
- Azevedo, JL; Maccheroni, W, Jr; Pereira, JO & Araújo, WL (2000). Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *EJB: Elect. J. Biotechnol.* 3(1), 3-4.
- Barnett, HL & Hunter, BB (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4th Edition. APS Press
- Batista, BN; Matias, RR; Oliveira, RL; Albuquerque, PM (2022). Hydrolytic enzyme production from açai palm (*Euterpe precatoria*) endophytic fungi and characterization of the amylolytic and celulolytic extracts. *Word Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(2), 30.
- Berlinck, RGS (2012). Bioprospecção no Brasil: um breve histórico. *Ciência e Cultura*, 64(3),

27-30.

Carvalho, RVD; Corrêa, TLR; Silva, JCMD; Viana, AP & Martins, MLL (2008). Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. *Food Science and Technology*, 28, 380-386.

Cavka, A & Jonsson, LJ (2014). Comparison of the growth of filamentous fungi and yeasts in lignocellulose-derived media. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), 197–204.

Cuzzi, C; Link, S; Vilani, A & Onofre, SB (2011). Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis dracunculifolia* DC (ASTERAECEAE). *Global Science and Technology*, 4(2), 47-57.

Di Donato, P; Finore, I; Annarita PA; Nicolaus, B & Lama, L (2019). The production of second-generation bioethanol: The biotechnology potential of thermophilic bacteria. *Journal of Cleaner Production*, 233, 1410-1417.

Ellis, MB (1971). *Dematiaceous hyphomycetes*. Great Britain: Commonwealth Mycological Institute.

Fernandes, LP; Ulhoa, SJ; Asquieri, ERA & Monteiro, VN (2007). Produção de amilases pelo fungo *Macrophomina phaseolina*. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 4(1), 43-51.

Freitas, LS; Martins, ES & Ferreira, OE (2014). Produção e caracterização parcial de α -amilase de *Syncephalastrum racemosum*. *Revista Brasileira de Biociências*, 12(4), 26-232.

Goyal, N; Gupta, JK & Soni, SK (2005). A novel raw starch digesting thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(7), 723-734.

Griffin, DH (1994). *Fungal Physiology*. 2th New York: Wiley-Liss.

Guandalini, NC (2007). *Estudo da produção de enzimas amilolíticas pelo fungo *Metarhizium anisopliae* utilizando amiláceos como substrato*. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, Brasil.

Haaland, PD (1989). Statistical problem solving. In: Haaland, PD (Ed.). *Experimental Design in Biotechnology*. New York: Marcel Dekker Inc.

Henderson, A (2000). The genus *Euterpe* in Brazil. *Sellowia*, 49-52, 1-22.

Henderson, A., Galeano, G (1996). *Euterpe*, *Prestoea*, and *Neonicholsonia* (Palmae: Euterpeinae). *Flora Neotropica*, 72, 1-89.

Holanda, FHE; Birolli, WG; Morais, EDS; Sena, IS; Ferreira, AM; Faustino, SMM & Ferreira, IM (2019). Study of biodegradation of chloramphenicol by endophytic fungi isolated from *Bertholletia excelsa* (Brazil nuts). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20, 101200.

Hu, Q; Wu, Q; Dai, B; Cui, J; Khalid, A; Li, Y & Wang, Z (2022). Fermentation optimization and amylase activity of endophytic *Bacillus velezensis* D1 isolated from corn seeds. *Journal of Applied Microbiology*, 132(5), 3640-3649.

- Kogel, KH; Franken, P; Hückelhoven, R (2006). Endophyte or parasite – what decides. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(4), 358-363.
- Kumari, N; Sushil; Rani, B; S. B., Malik, K; & Avtar, R (2019), Microbial amylases: An overview on recent advancement. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 7(1), 198-205.
- Lewinsohn, TM & Prado, PI (2005). How many species are there in Brazil? *Conservation Biology*, 19(3):619-624.
- Martinot, JF; Pereira, HS; Silva, SCP (2017). Coletar ou Cultivar: as escolhas dos produtores de açaí-da-mata (*Euterpe precatoria*) do Amazonas. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, 55(4), 751-766.
- Orlandelli, RC; Specian, V; Felber, AC & Pamphile, JA (2012). Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, 7(3), 97-109.
- Pandey, A; Webb, C; Fernandes, M & Larroche, C (2006). *Enzyme Technology*. New York: Spinger-Verlag.
- Rodrigues, KF (1994). The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia*, 86(3), 376-385.
- Saccaro, NLS., Jr. (2012). Bioprospecção e desenvolvimento sustentável. IPEA *Desafios do Desenvolvimento*, 9(73),87.
- Saleem, A & Ebrahim, MKH (2014). Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia. *Journal of Taibah University for Science*, 8(2), 90–97.
- Selvam, K.; Selvankumar, T.; Rajiniganth, R.; Srinivasan, P.; Sudhakar, C.; Senthilkumara, S & Govarthananb, M (2016). Enhanced production of amylase from *Bacillus* sp. using groundnut shell and cassava waste as a substrate under process optimization: Waste to wealth approach. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, 250–256.
- Silva, MCA (2016). *Caracterização morfológica, atividade enzimática e processo inicial de colonização de Colletotrichum guaranicola patogênico e endofítico*. Tese de doutorado em Agronomia Tropical. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil.
- Souza, IA; Orsi, DC; Gomes, AJ & Lunardi, CN (2019). Enzymatic hydrolysis of starch into sugars is influenced by microgel assembly. *Biotechnology Reports*, 22, e00342.
- Steege, HT; Pitman, N; Sabatier, D; Baraloto, C; Salomão, R; Guevara Andino, J; Phillips, O; Castilho, C; Magnusson, W; Molino, J-F; Monteagudo, A; Vargas, P; Montero, J; Feldpausch, T; Honorio Coronado, E; Killeen, T; Mostacedo, B; Vásquez Martínez, R; Assis, R & Silman, M (2013). Hyperdominance in the Amazonian Tree Flora. *Science*, 342(6156):1243092.
- Sunitha, VH; Ramesha, A; Savitha, J & Srinivas, C (2012). Amylase production by endophytic fungi *Cylindrocephalum* sp. isolated from medicinal plant *Alpinia calcarata* (Haw.) Roscoe. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 1213-1221.
- Unakal, C; Sadashiv SO; Bhairappanavar, S & Sindagi, A (2014). Screening of Endophytic

Fungus *Aspergillus* sp. for Amylase Production. *International Journal of Pharmaceuticals and Health care Resaerch*, 2(2), 40-45.

Vianna, SA (2020). *Euterpe in Flora do Brasil 2020*. Rio De Janeiro, Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

Wanderley, MD; Neves, E & Andrade, CJ (2011). Aspecto da produção industrial de enzimas. *Revista Citino (Hestia)*, 1(1), 30-36.

Yamaguchi, KKL; Pereira, LFR; Lamarão, CV & Lima, ES (2015). Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. *Food Chemistry*, 179, 137-151.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os fungos endofíticos do açazeiro (*E. oleracea*) apresentaram alta capacidade de atividade amilolítica, que através de uma triagem inicial em meio sólido foi possível selecionar duas linhagens que se destacaram, o *Aspergillus* (21) e o *Penicillium* (20), que obtiveram índice enzimático (Pz) intenso.

A partir da aplicação de um planejamento fatorial Box-Behnken Design com três fatores (temperatura, pH e tempo de reação) e três níveis foi possível otimizar e potencializar a produção relativa da enzima amilase com o índice máximo de 95,28% com o fungo endofítico *Aspergillus* (21), tendo como condições ótimas, a temperatura de 30 °C, pH 5,0 e tempo de reação de 3 dias.

Neste estudo, a produção de amilase pelos fungos isolados do açazeiro mostra-se ser muito promissora, principalmente com o uso de otimização experimental, sendo necessário mais estudos para aplicação biotecnológica da amilase e o provável potencial na produção de outras enzimas hidrolases.

Como perspectivas futura, constam avaliações e dados de Screening de fungos endofíticos em andamento e teste de potencialidade enzimática para outros fungos isolados da *Euterpe oleracea* Mart. e também, de premiações que os resultados – em estágios parcial e avançado do produto – puderam alcançar, bem como, a possibilidade de adequação, e, enfim, possibilidades de estudos adicionais e aprofundados que se podem realizar sobre o produto.