



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA - REDE BIONORTE



TIAGO CARNEVALLE ROMÃO

**FUNGOS FILAMENTOSOS ASSOCIADOS AO TRATO INTESTINAL  
DE INSETOS DETRITÍVOROS: UMA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL  
ENZIMÁTICO BIOTECNOLÓGICO**

Palmas-TO  
OUT/2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA - REDE BIONORTE



TIAGO CARNEVALLE ROMÃO

**Fungos filamentosos associados ao trato intestinal de insetos detritívoros:  
uma avaliação do potencial enzimático biotecnológico**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Tocantins, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Paula Benevides de Moraes

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Frederico de Souza Castro

Palmas-TO  
OUT/2022

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

R761f Romão, Tiago Carnevalle.  
Fungos filamentosos associados ao trato intestinal de insetos  
destrutivos: uma avaliação do potencial enzimático biotecnológico. / Tiago  
Carnevalle Romão. – Palmas, TO, 2022.  
74 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus  
Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em  
Biodiversidade e Biotecnologia, 2022.

Orientadora : Paula Benevides de Moraes  
Coorientador: Carlos Frederico de Souza Castro

1. Fungos. 2. Amilases. 3. Atividade antioxidante. 4. Bioetanol. I. Título

**CDD 660.6**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer  
forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte.  
A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184  
do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

## FOLHA DE APROVAÇÃO

TIAGO CARNEVALLE ROMÃO

### **Fungos filamentosos associados ao trato intestinal de insetos detritívoros: uma avaliação do potencial enzimático biotecnológico**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Tocantins, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em: 04/10/2022

**Banca examinadora**  
Documento assinado digitalmente  
**gov.br** PAULA BENEVIDES DE MORAIS  
Data: 18/10/2022 10:51:00-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Paula Benevides de Moraes**  
Universidade Federal do Tocantins

*Caio de Oliveira G. Silva*

---

**Prof. Dr. Caio de Oliveira Gorgulho Silva**  
Technical University of Denmark

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** EMERSON ADRIANO GUARDA  
Data: 18/10/2022 08:26:36-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

**Prof. Dr. Emerson Adriano Guarda**  
Universidade Federal do Tocantins

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** ELISANDRA SCAPIN  
Data: 14/10/2022 16:11:29-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

**Prof. Dr.<sup>a</sup> Elisandra Scapin**  
Universidade Federal do Tocantins

*Edson Luiz Souchie*

---

**Prof. Dr. Edson Luiz Souchie**  
Instituto Federal Goiano

Dedico aos meus pais, Maria de Fátima Carnevalle Romão e Dirço José Romão; e à minha esposa, Luciene Romão e aos meus filhos, Gabriel e Maria Teresa, por todo os cuidados, suporte e paciência.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela benção da vida e por permitir alcançar mais uma importante formação com equilíbrio e serenidade.

À minha orientadora prof. Dr.<sup>a</sup> Paula Benevides de Moraes por me acolher, orientar-me sabiamente e me confiar a elaboração deste estudo.

Ao prof. Dr. Carlos Frederico de Souza Castro pela habilidade em conduzir nossas conversas e encontrar soluções fundamentais na elaboração deste trabalho. Agradeço o apoio e dedicação em me coorientar.

Aos professores da banca examinadora por todas as considerações.

Ao Instituto Federal Goiano/ *campus* Rio Verde, ao Instituto Federal de São Paulo/*campus* Matão e ao Instituto Biológico, São Paulo-SP por contribuírem na realização dos ensaios necessários.

Aos amigos que me apoiaram direta ou indiretamente para que este trabalho alcançasse o fim.

Às instituições financiadoras: CNPq, CAPES, FAPTO, FAPEG, FAPESP fundamentais ao incentivo e ao fomento à pesquisa.

ROMÃO, Tiago Carnevalle. **Fungos filamentosos associados ao trato intestinal de insetos detritívoros: uma avaliação do potencial enzimático biotecnológico.** 2022. 74 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2022.

## RESUMO

Fungos são organismos versáteis, decompositores de matéria orgânica e capazes de transformar substâncias em nutrientes úteis para animais e plantas. O estudo das enzimas fúngicas chama a atenção de pesquisadores por sua aplicação potencial em material vegetal ricos em amido, celulose, lignocelulose que possam ser utilizados como fontes para produção de biocombustíveis. Além disso, os fungos são micro-organismos que produzem metabólitos com ação antioxidante úteis na prevenção de efeitos fisiológicos indesejáveis. O objetivo desse estudo foi identificar fungos associados ao trato digestório de inseto e avaliar o potencial amilolítico como possível fonte de aplicações biotecnológicas. As linhagens de fungos filamentosos foram inoculadas em solução mineral para produção de extrato enzimático. O extrato enzimático de cada linhagem foi analisado em teste colorimétrico para selecionar as linhagens melhores produtoras de enzimas de interesse. Foram selecionadas e identificadas quatro linhagens por sequenciamento genético: *Endomelanconiopsis endophytica* (CCR T2PB10), *Myxospora musae* (CCR T5PC4), *Neopestalotiopsis cubana* (CCR T6PC1) e *Fusarium pseudocircinatum* (CCR T6PA6). As linhagens CCR T2PB10, CCR T6PC1 e CCR T6PA6 foram submetidos a ensaios para atividade enzimática específica por método colorimétrico, caracterização de temperatura e pH ótimos e quantificação de bioetanol em ensaio cromatográfico a gás. Foi aplicado extrato enzimático de cada isolado sobre fécula da batata-doce para sacarificação e fermentação simultâneos e produção de bioetanol. 17,3 -88,1 % de bioetanol foram produzidos em relação ao rendimento teórico esperado. Adicionalmente, foram realizados ensaios de atividade antioxidante, análise de grupos químicos e morfologia para as linhagens CCR T2PB10, CCR T5PC4, CCR T6PC1 e CCR T6PA6. A morfologia foi realizada por microscopia óptica corada com Azul de Toluidina e a mensuração realizada no programa ImageJ. A atividade antioxidante realizada em CCD e por método quantitativo para os radicais DPPH e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Na CCD foi evidenciado várias manchas com fase móvel acetona/clorofórmio e reveladores UV 254 nm e vapor de I<sub>2</sub>. Os extratos fúngicos demonstram ação antioxidante para redução do radical livre DPPH e em especial para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acima de 50%, respectivamente, CCR T2PB10 - 91,6%, CCR T5PC4 - 87,8%, CCR T6PC1 - 89,5% e 92,3% para CCR T6PA6. Este estudo demonstrou que os fungos apresentaram eficientes produção de etanol e compostos químicos com atividade antioxidante. Assim, trabalhos futuros deverão ser realizados avaliando essas quatro linhagens para uso industrial.

**Palavras-chave:** Fungos; Amilases; Bioetanol; Atividade antioxidante; Biotecnologia.

ROMÃO, Tiago Carnevalle. **Filamentous fungi associated with the intestinal tract of detritivorous insects: an evaluation of biotechnological enzyme potential.** 2022. 74 f. Thesis (PhD in Biodiversity and Biotechnology) - Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2022.

### ABSTRACT

Fungi are versatile organisms, decomposers of organic matter and capable of transforming substances into useful nutrients for animals and plants. The study of enzymes draws the attention of researchers for their potential application in plant material rich in starch, cellulose, lignocellulose that can be used as sources for biofuel production. In addition, fungi are microorganisms that produce antioxidant metabolites useful in preventing undesirable physiological effects. The objective was to identify fungi associated with the insect digestive tract and to evaluate the amylolytic potential of fungi as a possible source of biotechnological applications. The filamentous fungal strains were inoculated in mineral solution for enzyme extract production. The enzyme extract of each strain was analyzed in a colorimetric test to select the best strains producing enzymes of interest. Four strains were selected and identified by genetical sequencing: *Endomelanconiopsis endophytica* (CRC T2PB10), *Myxospora musae* (CRC T5PC4), *Neopestalotiopsis cubana* (CRC T6PC1) e *Fusarium pseudocircinatum* (CRC T6PA6). The strains CRC T2PB10, CRC T6PC1 e CRC T6PA6 were submitted to assays for specific enzymatic activity by colorimetric method, characterization of optimal temperature and pH, and quantification of bioethanol in gas chromatographic assay. Enzyme extract of each isolate was applied on sweet potato starch for simultaneous saccharification and fermentation for bioethanol production. 17.3 - 88.1 % bioethanol was produced in relation to the theoretical expected yield. Additionally, antioxidant activity, chemical group analysis, and morphology assays were performed on the strains CRC T2PB10, CRC T5PC4, CRC T6PC1 e CRC T6PA6. Morphology was performed by optical microscopy stained with Toluidine Blue and measurement performed using the ImageJ software. . Antioxidant activity performed in TLC and by quantitative method for DPPH and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) radicals. The TLC showed several spots with acetone/chloroform mobile phase and UV 254 nm developers and I<sub>2</sub> vapor. Fungal extracts demonstrate antioxidant action to reduce the DPPH free radical and especially for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> above 50%, repectively, CRC T2PB10 – 91.6%, CRC T5PC4 – 87.8%, CRC T6PC1 – 89.5% and 92.3% for CRC T6PA6. This study demonstrated that the fungi showed efficient ethanol production and chemical compounds with antioxidant activity. Thus, work, should be carried out evaluating these four species for industrial use.

**Keywords:** Fungi; Amylases; Bioethanol; Antioxidant activity; Biotechnology.



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1. OBJETIVOS.....	10
1.2 Geral.....	10
1.3 Específicos.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 OS FUNGOS: OS CONHECIDOS, E NOVOS ALIADOS.....	11
2.2 OS FUNGOS E A BIOTECNOLOGIA.....	13
2.3 ENZIMAS E SUAS APLICAÇÕES.....	14
2.4 A HIDRÓLISE DE CELULOSE E AMIDO.....	17
2.5 O ETANOL E SUAS APLICAÇÕES.....	19
2.6 ENZIMAS MICROBIANAS E AÇÃO ANTIOXIDANTE.....	21
2.6.1 Estresse oxidativo.....	21
2.6.2 Compostos antioxidantes.....	23
2.6.3 Os fungos e a atividade antioxidante.....	25
3. CAPÍTULO I - Molecular and morphological diversity, qualitative chemical profile and antioxidant activity of filamentous fungi of the digestive tract of <i>Phylloicus</i> sp. (Trichoptera: Calamoceratidae).....	27
1. Introduction.....	28
2. Methodology.....	30
2.1 Fungal selection.....	30
2.2 Growth media.....	30
2.3 Phylogenetic determination.....	31
2.4 Extracts from cultures of filamentous fungi.....	31
2.5 Basic morphological characteristics.....	31
2.6 Thin-Layer Chromatographic (TLC).....	31
2.7 Antioxidant activity by qualitative assay.....	32
2.8 Quantitative assay of antioxidant activity (DPPH) and inhibition by hydrogen peroxide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	32
2.9 Statistical analysis.....	33
3. Results.....	33
4. Discussion.....	39
References.....	44
4. CAPÍTULO II - Fungal amylases applied to the sweet potato starch for bioethanol production.....	50
1. Introduction.....	51
2. Methodology.....	53
2.1 Fungal selection.....	53
2.2 Growth media.....	53
2.3 Fungal enzymatic biosynthesis.....	54
2.4 Amilolytic enzyme assay.....	54
2.5 Strain identity.....	54
2.6 Sweet potato starch.....	54
2.7 Enzyme characterization - pH and thermal stability.....	55
2.8 Simultaneous saccharification fermentation assay.....	55

2.9 Determination of ethanol concentration.....	55
2.10 Statistical analysis.....	56
<b>3. Results and Discussion.....</b>	<b>56</b>
3.1 Fungi identification.....	56
3.2 Activity enzyme.....	56
3.3 Temperature and pH.....	57
3.4 Bioethanol production.....	59
<b>4. Conclusion.....</b>	<b>61</b>
<b>References.....</b>	<b>63</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>67</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Uma das crescentes preocupações sociais é conciliar a progressiva demanda de combustíveis fósseis como fonte de energia e seus efeitos nocivos ao meio ambiente e desenvolvimento sustentável. Ademais, a qualidade nutricional, a busca e a segurança funcional de novos fármacos e o saneamento ambiental são buscas contínuas por consumidores que, paralelamente, preocupam-se com o destino de resíduos de processos produtivos e os impactos negativos que podem resultar (ASTOLFI, 2019).

Neste contexto, pesquisadores têm intensificado a busca de fontes alternativa de energia menos poluentes, como também buscam novas tecnologias que possam impulsionar a melhoria da qualidade de vida para humanos. Do ponto de vista biotecnológico, surge o conceito de biorrefinaria que se utilizam das biomassas vegetal renováveis, como por exemplo, cana de açúcar, milho, batata-doce ou outros resíduos vegetais ricos em carboidratos para produzir biocombustíveis como o etanol e, portanto, reduzir o consumo de combustíveis fósseis a base de petróleo, uma matriz energética não renovável e muito poluente (CHANDEL *et al.*, 2014)

Ainda na perspectiva biotecnológica, há evidências que o trato digestório (TD) de insetos pode ser uma fonte de micro-organismos, como os fungos filamentosos, capazes de produzir enzimas úteis na hidrólise de materiais lignocelulósicos com potencial uso na indústria de biocombustíveis (SHU *et al.*, 2013; SANTOS, 2018)

Ademais, os fungos filamentosos são utilizados na indústria de alimentos e bebidas alcoólicas, mantem o equilíbrio do meio ambiente, auxiliam na proteção e crescimento de plantas; atuam em processos de tratamento biológico e biodegradação de efluentes poluídos e na produção de enzimas de interesse industrial e de biotransformação. Além disso, os fungos também contribuem na indústria de fármacos (ABREU, 2015).

Muitos fungos têm ações biológicas, com alta atividade antioxidante, devido aos metabólitos fenólicos e outros produtos do seu metabolismo, como nas linhagens de *Chaetomium* sp. (HUANG *et al.*, 2007). Yang *et al.* (2020) estudaram metabólitos de *Aspergillus cristatus*, em que mostram potencial eficiência na redução das vias de formação de radicais livres por peroxidação lipídica, desoxirribose e peroxidases e, portanto, beneficiando vários processos biológicos.

Diante disso, o presente estudo focou em avaliar a atividade enzimática e o potencial biotecnológico de fungos filamentosos do trato digestório de insetos com potencial uso na produção de etanol a partir de resíduo de batata-doce e, secundariamente, na formação de metabólitos antioxidantes.

O capítulo I deste documento, cujo título é “**Molecular and morphological diversity, qualitative chemical profile and antioxidant activity of filamentous fungi of the digestive tract of *Phylloicus* sp. (Trichoptera: Calamoceratidae)**”, publicado na revista *Brazilian Journal of Biology* - ISSN: 1678-4375, é reportado o perfil químico, morfológico e molecular, além da ação antioxidante potencial de fungos filamentosos de TD de insetos.

O capítulo II desta tese é intitulado “**Fungal amylases applied to the sweet potato starch to verify of potential bioethanol production**”, publicado na revista *Research, Society and Development* - ISSN 2525-3409. Nele é relatada uma avaliação de amilases de fungos filamentosos sobre amido de batata-doce para produção de bioetanol em condições padronizadas.

## 1.1. OBJETIVOS

### 1.2 Geral:

Avaliar o potencial de fungos filamentosos provenientes do trato digestório de insetos fragmentadores de detritos foliares e com aplicação potencial em biotecnologia

### 1.3 Específicos:

1 - Identificar as linhagens fúngicas com melhores atividade enzimática amilolítica com potencial aplicação biotecnológica

2 - Quantificar a atividade enzimática amilolítica dos fungos filamentosos selecionados;

3 - Avaliar a produção de etanol em fécula de *Ipomoea batatas* (L.) (batata-doce) e

4 - Avaliar ação antioxidante potencial de metabólitos fúngicos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 OS FUNGOS: OS CONHECIDOS, E NOVOS ALIADOS

Os fungos são organismos eucariotos unicelulares ou multicelulares, sendo homo ou heterocarióticos, haploides, dicarióticos ou diploides. Possuem parede celular composta por glucanas e quitina. A reprodução pode ser sexual, parassexual e/ou assexual (MAIA e CARVALHO JUNIOR, 2010). São quimioheterotrófico, obtendo nutrientes por meio da absorção de compostos orgânicos como fontes de carbono e energia. São conhecidos vinte filos: *Aphelidiomycota*, *Ascomycota*, *Basidiobolomycota*, *Basidiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Calcarisporiellomycota*, *Caulochytriomycota*, *Chytridiomycota*, *Entomophthoromycota*, *Entorrhizomycota*, *Glomeromycota*, *Kickxellomycota*, *Monoblepharomycota*, *Mortierellomycota*, *Mucoromycota*, *Neocallimastigomycota*, *Olpidiomycota*, *Rozellomycota*, *Sanchytriomycota* e *Zoopagomycota* (WIJAYAWARDENE *et al.*, 2022). Segundo Aime e Brearley (2012), os fungos compõem uma ampla variedade de formas de vida, desde as leveduras microscópicas, cogumelos até trufas gigantes cobrindo grandes áreas de solo e os fungos estão em vários lugares nos ambientes tropicais e são agentes importantes nas diversas interações ecológicas.

Os fungos verdadeiros (Fungos) e organismos semelhantes a fungos (por exemplo, Mycetozoa, Oomycota) constituem o segundo maior grupo de organismos com base em estimativas de riqueza global, com cerca de 3 milhões de espécies previstas (LÜCKING *et al.*, 2020). São os principais decompositores em alguns ecossistemas e associados a uma ampla diversidade de seres vivos, além de também serem fonte de fármacos e enzimas, ainda são úteis como organismos experimentais (BLACKWELL, 2011). Não obstante, cerca de 150.000 espécies são conhecidas na literatura científica. Entre os habitats dos fungos estão a água, solo e outros organismos que podem hospedar um elevado número de fungos ainda desconhecidos (WIJAYAWARDENE *et al.*, 2022). Historicamente, o uso de fungos na alimentação remonta ao período Paleolítico em que pinturas rupestres retratavam eventos festivos, sugerindo que bebidas alcólicas fermentadas já eram consumidas (ALMEIDA, 2015). Estima-se que os processos fermentativos surgiram com a produção de queijos há mais de 8000 anos. Outros relatos indicam que a fermentação alcólica surgiu há mais de 4000 a.C, no antigo Egito (ROSS, MORGAN, HILL, 2002; TAKAHASHI *et al.*, 2017).

Hawksworth (2014) relata que há uma demanda de dados acerca de novas espécies em áreas tropicais, como também a estabelecer as relações fungos/plantas em escalas diferentes. Estudos em locais de clima temperado mostram que, gradativamente, o número de espécies de fungos tanto macroscópicos quanto microscópicos continuam a aumentar. No entanto, coletas

em regiões tropicais geram a expectativa de fornecer um aumento da proporção de novas espécies fúngicas. Ademais, embora tenham poucos estudos recentes publicados em que mostrem o total de espécies fúngicas descritas em cada micro-habitat, Maia *et al.* (2015) relatam as espécies fúngicas por fitodomínios e regiões brasileiros.

Nos ecossistemas aquáticos, o processamento de matéria orgânica alóctone, proveniente da vegetação adjacente é fundamental para a sustentabilidade destes ecossistemas, sendo os fungos filamentosos, levedura e bactérias agentes de degradação da celulose, ligninas, pectinas e hemicelulose provenientes do material vegetal decomposto (WRIGHT e COVICH, 2005). Entre os fungos responsáveis pela decomposição da matéria orgânica vegetal em ambientes aquáticos continentais encontram-se os fungos anamorfos pertencentes ao filo *Ascomycota* e algumas espécies de *Zygomycetes* e *Basidiomycota* (SHEARER *et al.* 2007). Os fungos anamórficos aquáticos destacam-se pela maior importância no processamento foliar em ecossistemas aquáticos lóticos. Estes fungos, ao colonizarem os detritos foliares, atacam os polissacarídeos estruturais e utilizam a energia liberada para aumentar sua biomassa tornando, assim, os detritos mais palatáveis aos invertebrados fragmentadores (BÄRLOCHER; GRAÇA, 2020).

Os fungos secretam uma ampla variedade de enzimas como celulases, amilases, lipases, pectinases, xilanases, proteases e outras. Algumas dessas enzimas possuem grande importância comercial, notadamente na indústria alimentícia, tais como carbohidrases, lipases, proteases ácidas e amilases (SOARES *et al.*, 2010). Neste contexto, os gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* e *Fusarium* sobressaem como um dos mais importantes produtores de enzimas para fim comercial (SCHUSTER *et al.*, 2002; AGUIAR NETO FILHO, 2017; MENDES *et al.*, 2019).

Assim, vários trabalhos têm sido realizados quanto a seleção e o papel auxiliar de fungos capazes de degradarem material vegetal e sua aplicação potencial em processos biotecnológicos, como o estudo de Queiroz e Souza (2020) que avaliaram fungos entomopatogênicos e verificaram a presença de enzimas proteolíticas; os estudos de enzimas celulolíticas de fungos filamentosos do trato digestório de insetos aquáticos da Amazônia (BELMONT-MONTEFUSCO *et al.*, 2020) e fungos filamentosos com potencial lipolítico com aplicação nos processos de produção de biodiesel (MENDES *et al.*, 2019), que são amplamente utilizadas em processos biotecnológicos como na indústria têxtil, alimentícia, de celuloses, sacarificação de carboidratos e biocombustíveis.

Ademais, isolados fúngicos do bagaço da cana-de-açúcar foram avaliados para produção de amilases e suas enzimas auxiliares celulases e endoglucanases para hidrólise do amido de mandioca e potencial produção de etanol. As linhagens apresentaram bom

rendimento na hidrólise do amido e produção de etanol (AGUIAR NETO FILHO, 2017). Portanto, verifica-se neste estudo, aplicação potencial de enzimas fúngicas na indústria de bebidas e biocombustíveis.

Do ponto de vista econômico, visando melhorar rendimento e reduzir custos de produção, essas diferentes linhagens fúngicas têm sido estudadas como importante fonte de genes e vias metabólicas potenciais para a síntese de produtos economicamente viáveis, incluindo peptídeos, vitaminas, enzimas, ácidos orgânicos, antibióticos, entre outros. Esses compostos, incluindo as enzimas, são amplamente utilizados em processos biotecnológicos nas indústrias têxteis, papel e celulose, couro, detergentes, bebidas destiladas, cervejas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, ração animal, indústria química e farmacêutica (MONTEIRO e SILVA, 2009; ORLANDELLI, 2012).

## 2.2 OS FUNGOS E A BIOTECNOLOGIA

Os micro-organismos simbióticos constituem fontes promissoras para potenciais aplicações em medicina, biorremediação, processos industriais e na agricultura. Assim como acontece com os micróbios de vida livre, a eficiência dos metabólitos e enzimas produzidos por simbioses tem sido otimizada há mais de milhões de anos por seleção natural. No entanto, diferentemente dos micro-organismos de vida livre, a eficácia dos produtos de origem simbiótica tem sido testada em hospedeiros eucariotos, aumentando as chances de usos bem-sucedido pelos humanos devido aos riscos de efeitos adversos reduzidos (BERASATEGUI *et al.*, 2016).

A utilização de fungos no âmbito tecnológico tem aumentado gradualmente nos últimos anos. A literatura mostra o uso de fungos como vetor para introdução de segmentos de DNA de interesse nas plantas (BERASATEGUI *et al.*, 2016), como agentes inibidores de pragas e patógenos e como fontes de metabólitos de interesse farmacológico (ABREU, ROVIDA, PAMPHILE, 2015). As biomoléculas de fungos presentes na atualidade são estruturalmente variadas, biologicamente ativas e inclui derivados terpenos, esteróides, alcalóides e isocumarinas (MA *et al.*, 2010).

Na perspectiva industrial, segundo Gandhi *et al.* (1997), as enzimas microbianas são de maior interesse, pois são mais facilmente produzidas em larga escala, via fermentação e manipuladas geneticamente, além de baixo custo de produção e sustentabilidade. É amplamente conhecido que cada substrato possui sua enzima específica para degradação. No caso do amido, o principal polissacarídeo de reserva dos vegetais, a amilase é a responsável



pela sua quebra. As enzimas amilolíticas quebram ligações glicosídicas da amilose e amilopectina (GUPTA, 2003).

As amilases estão entre as enzimas de destaque nas industriais, com importância biotecnológica. Entre suas aplicações estão produção de têxteis, cervejas, bebidas destiladas, panificação, cereais para alimentação, liquefação e sacarificação do amido, ração animal, produção de fármacos e indústria química. Há, grandes quantidades de amilases microbianas disponíveis comercialmente e têm aplicação quase completa na hidrólise do amido em indústrias de processamento do amido (PANDEY *et al.*, 2006). Dentre as principais fontes de micro-organismos produtores de amilases estão os fungos filamentosos que perfazem cerca de 60% (PANDEY *et al.*, 2000). Dentre eles destacam-se as espécies *Aspergillus* sp. (*Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*), além de outros fungos como, *Penicillium* sp. (*P. brunneum*, *P. fellutanum* e *P. expansum*) e bactérias *Streptomyces rimosus*, *Thermomyces lanuginosus* e *Cryptococcus flavus* (GUPTA, 2003; TUNGA e TUNGA, 2003; HUSSAIN, 2013).

Destarte, acreditamos que, apoiado na literatura científica, este estudo tem seu valor ao poder contribuir com o conhecimento potencial de produção de enzimas fúngicas de interesse para a indústria de biotecnologia, como por exemplo, as indústrias de fármacos, químicos e biocombustíveis.

### 2.3 ENZIMAS E SUAS APLICAÇÕES

As enzimas são em sua maioria proteínas que desempenham função importante como catalizadores de reações bioquímica, pois proporcionam um ambiente específico adequado para que o processo possa ocorrer rapidamente São capazes de degradar matéria orgânica complexa em fragmentos menores, como açúcares em monômeros de glicose ou ainda polimerizar cadeias peptídicas (NELSON e COX, 2014). As enzimas podem ser de origem animal, vegetal ou microbiana. As enzimas de origem microbiana são utilizadas nos processos biotecnológicos industriais diante sua produção em larga escala, baixo custo, fácil manipulação genética e grande variabilidade em processos catalíticos (PATEL, 2002).

As enzimas são divididas em seis classes e cada uma com subclasses classificadas conforme o tipo de reações que catalisam, de tal forma que cada enzima seja identificada inequivocamente (MARZZOCO e TORRES, 2011), como mostra a Tabela 1.

**Tabela 1** – Classificação Internacional de Enzimas

Classe nº	Nome da classe	Tipo de reação catalisada
1	Óxidorredutases	Transferência de elétrons (íons hidreto ou átomos de H)
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água)
4	Liasas	Adição de grupos a ligações duplas, ou formação de ligações duplas por remoção de grupos
5	Isomerasas	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula produzindo formas isoméricas
6	Ligases	Formação de ligações C–C, C–S, C–O e C–N por reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP ou cofatores similares

Fonte: Nelson e Cox, 2014

As enzimas possuem características que as tornam muito úteis como catalizadores de processos bioquímicos. São ativas, versáteis e catalisam reações bioquímicas de modo seletivo, em condições de temperaturas branda e pH não extremo, obedecendo a característica da espécie. Ademais, a ação enzimática pode ser regulada com alteração do pH, adição de moduladores alostéricos, como os cofatores, modificações covalentes reversíveis ou ligadas a proteínas regulatórias distintas (NELSON e COX, 2014). Em função de sua especificidade, as enzimas catalisam os processos moleculares sem a presença de reações adjacentes indesejáveis comum em outras reações. Com efeito, os processos biotecnológicos empregados por indústrias utilizando enzimas são de baixo custo e eficientes (PATEL, 2002).

Muitas enzimas foram denominadas aplicando-se o sufixo “ina” precedido do nome da fonte da enzima, como pepsina. Outras foram batizadas pelos seus descobridores pela adição do sufixo “ase” em função do seu substrato ou termo que descrevesse sua atividade. Assim, a urease catalisa a hidrólise da ureia, por exemplo. Atividade enzimática depende de suas conformações nativas. Se uma enzima for desnaturada ou degradada até os aminoácidos que a compõem, sua atividade catalítica é perdida (NELSON e COX, 2014).

A aplicação das enzimas tem sido explorada pela humanidade há anos. Pelo uso direto, utilizando preparados enzimáticos de origem animal ou vegetal; ou indiretamente, pelo aproveitamento de metabólitos enzimáticos provenientes do crescimento do micro-organismo sobre um determinado substrato (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). Entretanto, a utilização de enzimas de micro-organismos, de modo controlado, corresponde a maior área da indústria de biotecnologia (NEIDLEMAN, 1991).

As enzimas comerciais podem ser de origem microbiana, animal ou vegetal. As enzimas de origem microbiana de uso comercial são produtos, predominantemente, de enzimas extracelulares de bactérias e fungos da classe das hidrolases (OLSEN, WOESE, OVERBEEK, 1994) e muito utilizada na indústria de alimentos, tais como: as amilases, proteases e pectinases, além das lacases, peroxidases e xilanases utilizadas na indústria de papel e celulose; são aplicadas nos processos industriais devido a possibilidade da utilização de substratos baratos e o rendimento na produção poder ser elevado a partir da otimização das condições nos processos fermentativos por mutações ou a partir da tecnologia do DNA recombinante. Ademais, as possibilidades do uso industrial de enzimas podem ser ampliadas quando se trata de microrganismos extremofílicos do domínio Archea. Esses microrganismos habitam lugares atípicos com temperaturas, concentração salina e valores de pH extremos. Assim, extremozimas produzidas por esses microrganismos recebem atenção especial, pois essas proteínas apresentam potencial industrial considerável oferecendo melhores rendimentos sob condições operacionais extremas (MONTEIRO e SILVA, 2009).

Em um breve cenário das enzimas e sua aplicação biotecnológica, verifica-se que o crescente uso de enzimas a partir de micro-organismos nos âmbitos da pesquisa e da indústria biotecnológica, como indústrias têxteis, papel e celulose, detergentes, alimentação, biocombustíveis e indústria farmacêutica e química na produção de vitaminas e antibióticos, tem movimentado a economia e levam a busca e pedidos de registros de patentes (JEAN-BAPTISTE, 2020). Para o Instituto Nacional da Propriedade Intelectual [INPE] (2020), patente é um título de propriedade temporário sobre uma invenção ou modelo de utilidade, outorgado pelo Estado aos proprietários ou autores, seja pessoa física ou jurídica, detentores do direito de criação, visando proteger sua invenção como também facilitar a transferência de conhecimentos e tecnologias.

Entre os anos 2010 e 2019, 238.382 patentes foram registradas, sendo 99,94 % pelos escritórios norte-americano e europeu presentes no Espacenet Patent Search, enquanto 0,06 % pelo (INPE), sendo mais de 40 mil registros envolvendo amilases e outros mais de 100 mil registros sobre fungos. Ademais, a comercialização de enzimas foi avaliada em US\$ 10

bilhões e com perspectiva de alcançar um aumento de cerca de US\$ 14,5 bilhões até 2025 (JEAN-BAPTISTE, 2020).

## 2.4 A HIDRÓLISE DO AMIDO

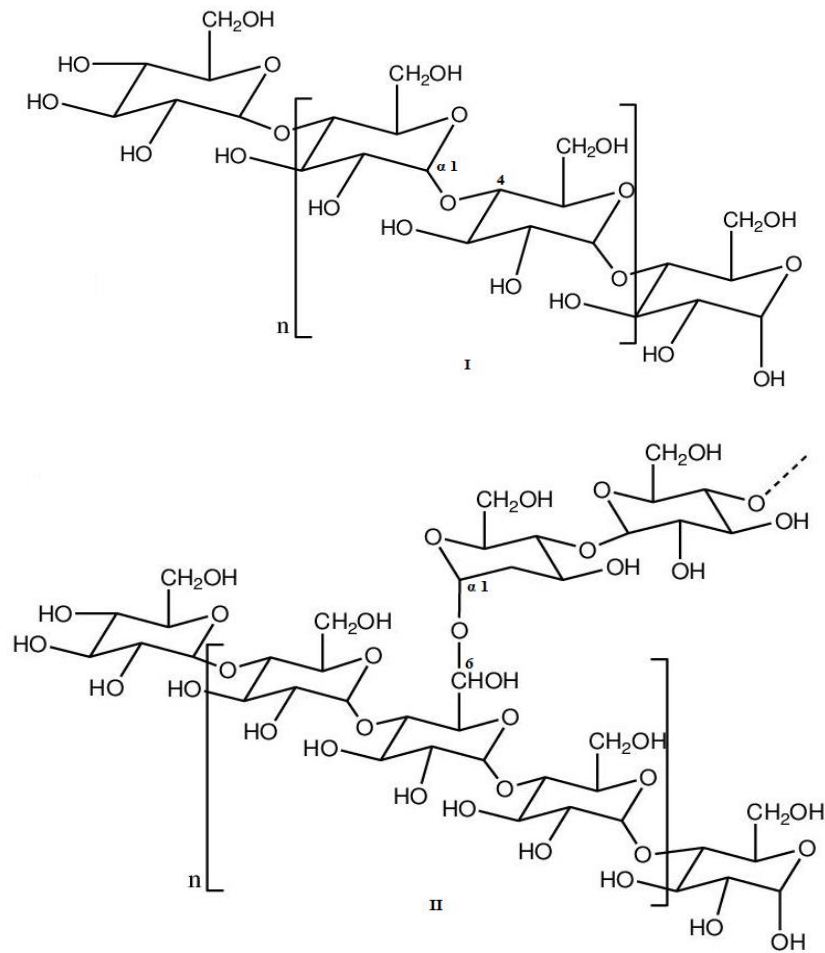
Há dois modos de converter amido em glicose: hidrólise química ou enzimática. A hidrólise química é realizada na presença de ácidos inorgânicos em condições de temperatura e pH extremos. Os produtos obtidos contêm os açúcares fermentáveis, como também substâncias tóxicas aos microrganismos participantes da fermentação, como o furfural. Entretanto, a hidrólise enzimática utiliza-se de condições brandas para hidrolisar o amido, ou seja, temperatura de 45 a 50° C e pH = 4,8. Além disso, devido sua especificidade, não gera sub-produtos (CHEN, 2015).

Porém, o elevado custo de produção das enzimas e a necessidade de dosagens elevadas das mesmas para a sacarificação da biomassa são obstáculos para a viabilidade econômica da produção de etanol lignocelulósico (MENON e RAO, 2012).

Diante disso, é justificável o interesse em pesquisas na busca por sistemas enzimáticos lignocelulolíticos eficientes para a hidrólise da biomassa, que levarão à inovação de processos economicamente viáveis em biorrefinarias (GLASER, 2015).

O amido, um polissacarídeo com função de reserva energética em plantas e utilizado como fonte de glicose para o metabolismo das células vegetais, é constituído por polímeros de amilose e amilopectina, que compreendem moléculas de glicose e maltose que são conectados por ligações glicosídicas. Ambos os polímeros têm diferentes estruturas e propriedades. A amilose tem no máximo de 6000 unidades de glicose conectadas por ligações  $\alpha$ -1,4 glicosídica linear enquanto a amilopectina é composta por ligações  $\alpha$ -1,4 glicosídicas de 10-60 unidades de glicose com ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,6 laterais interligadas de 15-45 unidades de glicose (Figura 1) (MOTTA, 2011; GOPINATH *et al.*, 2017). Segundo revelou Saboury (2002), as  $\alpha$ -amilases são enzimas que requerem íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) para manter sua estabilidade, atividade e confirmação estrutural. Embora as amilases estejam disponíveis de diferentes fontes, o foco tem sido apenas as amilases microbianas, devido às suas vantagens sobre as amilases vegetais e animais, tais como: isolamento mais fácil e em altas quantidades, produção a baixo custo em pouco tempo e estabilidade em várias condições extremas (GOPINATH *et al.*, 2017).

Com base nos alinhamentos sequenciais de  $\alpha$ -amilases, essas estruturas moleculares são quebradas por hidrólise ácida ou enzimática no processo denominado sacarificação (MACHADO e ABREU, 2006).



**Figura 1.** Estruturas da amilose (I) e amilopectina (II)

Fonte: Corradini *et al.* (2005); Adaptado.

As amilases agem sinergicamente para quebrar o amido (amilose de cadeia linear e amilopectina de cadeia ramificada) em glicose. O complexo enzimático é composto por endoamilases, exoamilases, e enzimas fragmentadoras. Endoamilases são enzimas compostas principalmente de  $\alpha$ -amilases (EC 3.2.1.1) que atacam as ligações  $\alpha$ -1,4 aleatoriamente e liberando oligossacarídeos de tamanhos variados. As exoamilases são compostas por glucoamilases (EC 3.2.1.3) que clivam as ligações  $\alpha$ -1,4 na porção terminal da cadeia e liberando glicose como o produto principal e maltose, no entanto, quebram ligações  $\alpha$ -1,6. Por sua vez, as enzimas fragmentadoras (pululanases, EC 3.2.1.41) cuja ação predominante é sobre as ligações  $\alpha$ -1,6 das ramificações da amilopectina (CASTRO *et al.*, 2010a).

As amilases microbianas obtidas a partir de bactérias, fungos e leveduras têm sido utilizadas predominantemente em setores industriais e científicos. O nível de produção de amilase varia de um micro-organismo para outro, mesmo entre o mesmo gênero, espécie e linhagem. Além disso, o nível de produção de amilase também difere de acordo com a origem do micróbio, onde as linhagens isoladas de ambientes ricos em amido ou amilose naturalmente produzem maiores quantidades de enzimas. Fatores como o pH, temperatura, e

as fontes de carbono e nitrogênio também desempenham um papel vital na taxa de produção de amilase, particularmente na fermentação (GOPINATH *et al.*, 2017).

Assim, para assegurar a viabilidade econômica do processo de produção do etanol é importante reduzir o custo das enzimas utilizadas na etapa de hidrólise do amido. Para isso, deve-se dispor de micro-organismos produtores das enzimas. Nesse sentido, o Brasil destaca-se em biodiversidade de micro-organismos que apresentam potencial características desejadas para tal aplicação (PIROTA *et al.*, 2015). Enzimas, como amilases, podem ser produzidas por fungos e bactérias. A vantagem de se utilizar fungos para produzir amilases é a sua facilidade de manuseio e a economia do processo. O potencial da utilização de fungos como fontes biotecnológicas de enzimas foi responsável por incentivar a renovação do interesse na exploração da atividade enzimática extracelular em vários microrganismos (SALEEM e EBRAHIM, 2014).

## 2.5 O ETANOL E SUAS APLICAÇÕES

Segundo Della-Bianca *et al.* (2013), os biocombustíveis mundialmente mais utilizados são o etanol e o biodiesel. Neste cenário, o Brasil destaca-se como o maior exportador e segundo maior produtor de etanol, seguindo os Estados Unidos -o maior produtor- juntos, são responsáveis por cerca de 94 % da produção mundial (RENEWABLE FUELS ASSOCIATION, 2019).

O Brasil iniciou sua produção de etanol em 1927. Porém, o alto custo de produção comparado à produção da gasolina, levou a produção de etanol a ser ignorada até a década de 70, período marcado pela crise do petróleo. Neste período, o custo de importação do petróleo para o Brasil triplicou em função dos embargos da região árabe. Ademais, contribuiu para o agravamento, a brusca queda do preço do açúcar no mercado mundial em 1974 (MUSSATO, 2010; BASSO; BASSO; ROCHA, 2011). Diante a esse cenário global, o Brasil criou em 1975 o Programa Nacional do Álcool (Proálcool) que redirecionou parte da produção de cana-de-açúcar para produção de etanol em substituição à gasolina. Reduzindo, portanto, a importação de petróleo no Brasil (CERQUEIRA-LEITE *et al.*, 2009).

Após a crise mundial do petróleo, a produção de etanol estimulou a indústria automobilística a produzir veículos movidos a etanol hidratado. Em 1980, o preço do petróleo decresceu novamente e, paralelamente, um período econômico desfavorável para a economia brasileira marcada pela alta inflação, o governo brasileiro removeu subsídios dados às destilarias encorajando várias delas a destinar a cana novamente para produção de açúcar (AMORIM *et al.*, 2011). A partir de 2003, no entanto, a introdução de veículos *flexfuel*, conjuntamente ao aumento gradativo da produção dessa tecnologia e a flexibilização da

regulamentação do setor de combustíveis (BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO e CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS, 2008), foi possível utilizar gasolina, etanol ou a mistura etanol e gasolina pelo consumidor e, portanto, estimulou novamente a produção de etanol. A partir de 2008, o consumo de etanol superou o consumo de gasolina no Brasil motivado pela popularização da tecnologia de combustíveis *flexfuel* nos veículos, ou seja, mais de 90 % de novos veículos vendidos eram *flexfuel*, e pelo incentivo do governo para a elevação da produção de veículos bicompostíveis (CHADDAD, 2010).

O etanol é uma molécula polar, sendo um líquido incolor de odor ardente, muito higroscópico e facilmente inflamável, de baixa peso molecular e miscível na maioria de substâncias polares. Entres as aplicações estão: uso como combustível, indústria de alimentos e bebidas alcólicas, produção de fármacos, solventes e utilizado como intermediário nas sínteses química.

Qualquer produto que contenha uma quantidade considerável de carboidratos constitui-se material para obtenção de etanol. Entretanto, para que seja viável economicamente, é necessário considerar o seu rendimento e o custo de fabricação. Em função do açúcar presente nas matérias-primas podem ser classificadas em três tipos descritos a seguir: amiláceos - carboidratos mais complexos como amido e inulina que podem ser quebrados em glicose pela hidrólise ácida ou ação de enzimas num processo denominado malteação ou sacarificação, Ex.: grãos, raízes e tubérculos; celulósico - constituídos de celulose, e, apesar de estarem disponíveis em grande quantidade, não oferecem, por enquanto, condições econômicas na produção de etanol, pois, para tornarem-se fermentescíveis, devem passar por um processo complexo de hidrólise ácida. Ex.: palha, madeira. E, materiais açucarados – são compostos por açúcares simples, monossacarídeos ou dissacarídeos, como glicose, frutose e maltose. Os monossacarídeos restringem-se aos sucos de frutas e são diretamente fermentescíveis. São utilizados na produção de bebidas alcólicas como vinho. Já os dissacarídeos são fermentados após uma hidrólise ocorrida pela ação da enzima invertase, produzida pelo próprio agente de fermentação. Ex.: cana-de-açúcar e frutas (MACHADO e ABREU, 2006)

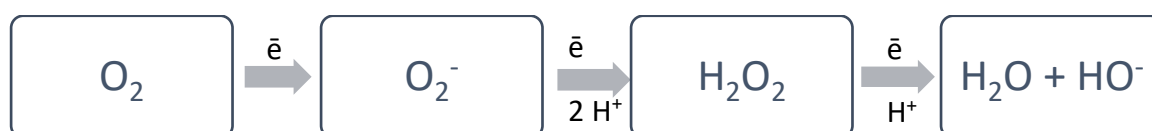
Fatores ambientais como a redução de reservas de petróleo e poluições pelo gases estufa liberados pela queimas de combustíveis fósseis, além das altas dos combustíveis derivados do petróleo, têm estimulado pesquisadores a buscarem alternativas menos poluentes e sustentáveis de fontes energéticas, como cana-de açúcar, mandioca, batata-doce ou mesmo resíduo de frutos, ricos em amido e celulose, que poder ser hidrolisado em glicose e, portanto, são favoráveis o uso dessas matérias vegetais para produção de etanol. (RIZZOLO, 2014).

## 2.6 ENZIMAS MICROBIANAS E AÇÃO ANTIOXIDANTE

### 2.6.1 Estresse oxidativo

As moléculas de oxigênio com elétrons desemparelhados são conhecidas como espécies reativas de oxigênio (EROs), cuja origem são fatores endógenos e exógenos, tais como: estresse oxidativo, processos metabólicos normais, exposição à radiação ultravioleta (UV) (SCHARFFETTER-KOCHANNEK *et al.*, 2000), além de exercícios físicos, dietas e condições ambientais inadequados (LIMA, 2017; GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2010).

A formação de compostos intermediários altamente reativos ocorre a partir de oxigênio molecular que recebe elétrons e, portanto, formam radicais superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (KVIECINSKI, 2007), como ilustrado pela Figura 2.



**Figura 2.** Reação simplificada da formação de EROs.

Fonte: Kviecinski, 2007, adaptado

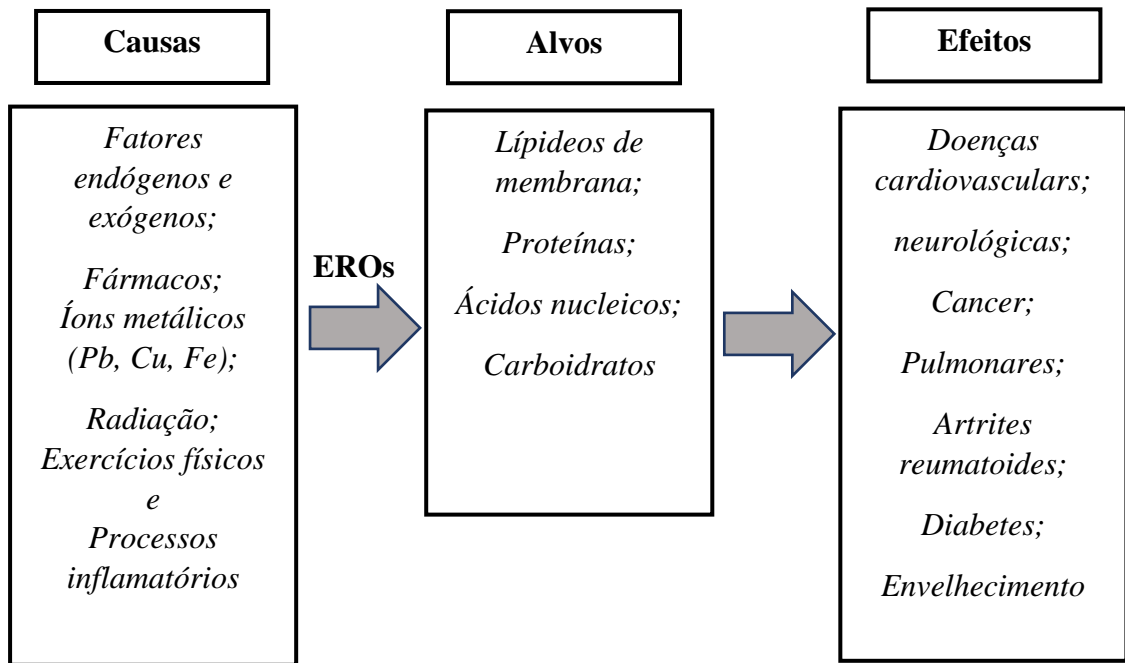
Os radicais livres, majoritariamente, são derivados do oxigênio, cuja importância no metabolismo celular está na obtenção de energia da adenosina trifosfato (ATP) na cadeia respiratória. Neste processo, o oxigênio atua como aceptor final de elétrons (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

O metabolismo celular por meio de diversas reações enzimáticas que ocorrem em estrutura como membrana plasmática, retículo endoplasmático, peroxissomos e, sobretudo, mitocôndrias são fontes endógenas de EROs (AYALA, MUÑOZ, ARGÜELLES, 2014; LIMAS, 2017).

Os EROs possuem ação fisiológica como na sinalização intracelular, atuação imune e regulação do crescimento celular. Entretanto, o excesso de EROs podem provocar danos fisiológicos e, com efeitos, manifestações de várias doenças (SÁ *et al.*, 2012).

O desequilíbrio dos sistemas pró-oxidativos e antioxidantes no metabolismo celular é denominado estresse oxidativo. Assim, a instabilidade entre moléculas oxidantes e a capacidade de antioxidante celular podem implicar em doenças agudas e crônicas, por exemplo, aterosclerose, doenças neurodegenerativas e câncer (LIMA, 2017) e importante atuação nas síndromes metabólicas (THANNICKAL e FARNBURG, 2000). A Figura 3 relaciona as causas do estresse oxidativo e algumas das doenças e seus efeitos.

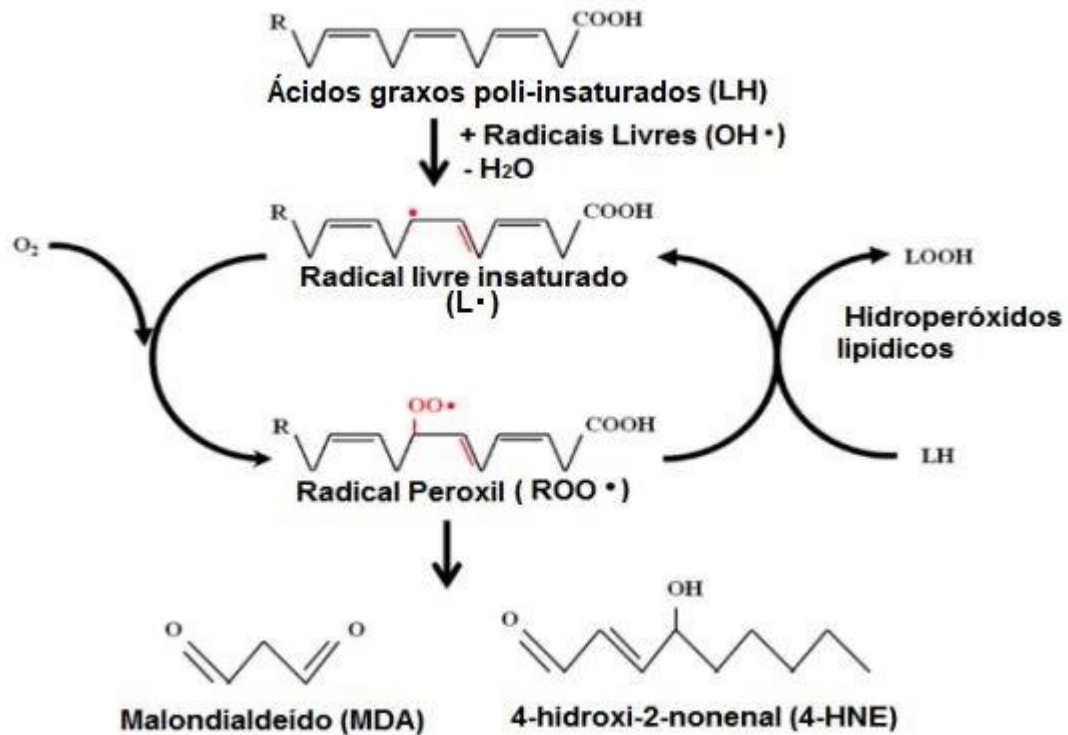




**Figura 3.** Principais causas de EROs e potenciais alvos e efeitos.  
 Fonte: Ferreira *et al.*, 2009. Adaptado.

Os processos oxidativos podem provocar modificações na estrutura lipídica das membranas celulares, alterando sua fluidez e, com efeito, alterando a permeabilidade seletiva de íons e sinalizadores transmembrana. Esse processo é conhecido como peroxidação lipídica (DELL'ANNA *et al.*, 2007; GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2010).

A peroxidação lipídica (Figura 4), maior fonte de substâncias citotóxicas, degrada os ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares e podem ser convertidas em peróxidos (BELLÓ, 2002). Durante a peroxidação lipídica e, a partir de uma ERO ( $\text{OH}^-$ ), ocorre a formação de moléculas intermediárias como o radical peroxila, que reagem com o ( $\text{H}^+$ ) retirado de moléculas de lípidos para formação do hidroperóxido lipídico (LOOH). O radical peroxila degrada os lípidos de membrana em alguns produtos como alcanos, alcenos, aldeídos e outros (LIMA, 2017). Como produto dessa quebra lipídica há formação de malondialdeído e 4-hidroxionenaldeído (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; BARRERA *et al.*, 2018). Esses aldeídos são potenciais modificadores de moléculas proteicas e interferem em variados processos fisiológicos, bioquímicos e celulares; e, conseqüentemente, podem levar a diversas doenças (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014; BARRERA *et al.*, 2018).



**Figura 4.** Processo de peroxidação lipídica.

Fonte: Barrera *et al.*, 2018. Adaptado

É importante que ocorra a inibição do processo de oxidação de moléculas biológicas induzido pela ação de EROs, visto que doenças do metabolismo, p.ex., inflamações, diabetes, hipertensão arterial, estão associadas com um aumento progressivo dos níveis de produtos da peroxidação e de proteínas modificadas durante processo (NIKI, 2012). Os processos oxidativos podem ser evitados por meio de alterações no meio ambiente ou pela utilização de compostos antioxidantes (LIMA, 2017).

### 2.6.2 Compostos antioxidantes

Diante a produção contínua de EROs durante os processos metabólicos, os organismos possuem mecanismos antioxidantes, limitando os níveis intracelulares das espécies reativas, como também contam com sistemas de reparação, que previnem o acúmulo de moléculas alteradas por oxidação e tentam controlar os danos (BARBOSA *et al.*, 2010).

O sistema antioxidante é formado por enzimas e compostos não enzimáticos, sendo a ação inicial realizada pelo sistema enzimático. Os compostos antioxidantes não enzimáticos possuem fonte alimentar, como vitaminas, compostos fenólicos presentes em produtos naturais e produtos sintéticos (COTINGUIBA *et al.*, 2013). A seguir, a Tabela 2 descreve alguns dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos

**Tabela 2.** Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos

<b>Antioxidantes Enzimáticos</b>	<b>Não Enzimáticos</b>
L-asparaginase*	Vitaminas A e E
Glutaciona peroxidase	Ácido ascórbico
Catalase	Flavonoides
Glutaciona redutase	Betacaroteno
Superóxido dismutase	

Nota: \*por Souza Silva *et al.*, 2022.

Fonte: Lima, 2017. Adaptado.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) têm sua ação inibida naturalmente no organismo. Controlar os níveis de enzimas antioxidantes são importantes para remover os EROs produzidos e, assim, proteger as células teciduais (COVARRUBIAS *et al.*, 2008). Ao ocorrer sobrecarga do sistema antioxidante, devido ao aumento de EROs, há a instalação do estresse oxidativo (ALVES *et al.*, 2010).

Entretanto, com o intuito de proteger os organismos contra os danos do processo oxidativo, faz-se necessário o consumo de substâncias antioxidantes (vitaminas, compostos fenólicos) contidos, muitas vezes, na dieta, capazes de atuar em diferentes mecanismos (VASCONCELOS *et al.*, 2014). Antioxidantes exógenos são considerados essenciais para prevenção e combate de doenças oriundas do estresse oxidativo (ZIMMERMANN e KIRSTEN, 2008).

Assim, atuando por diferentes mecanismos de ação para minimizar o estresse oxidativo, tais como supressão da formação de radicais reativos por meio de inibição de enzimas ou quelantes de íons metálicos produtores de EROs, busca-se aumentar as defesas antioxidantes naturais do organismo (PIETTA, 2000).

É relevante informa que ensaios qualitativos preliminares podem ser utilizados para rastrear potenciais compostos antioxidantes. Assim, a cromatografia líquida de camada delgada (TLC) é um dos ensaios úteis na busca por compostos antioxidantes. Para isso, alguns reveladores são utilizados, tais como: luz ultravioleta (UV) 254 e 365 nm identificam compostos aromáticos ou substâncias conjugadas por fluorescências, a solução de vanilina sulfúrica é usada para detecção de compostos terpenoides e álcoois; fenóis e taninos podem ser identificados com cloreto férrico (FeCl<sub>3</sub>), vapores de iodo (I<sub>2</sub>) ligam-se a alcaloides, esteroides, indoís e aminoácidos e o verde de bromocresol identificam ácidos orgânicos (Menezes-Filho *et al.*, 2020) e para compostos de difícil identificação, pode-se utilizar ácido crômico (SHERMA e FRIED, 2005; MORAIS *et al.*, 2019).

### 2.6.3 Os fungos e a atividade antioxidante

Os fungos são de grande interesse para a indústria farmacêutica, pois são capazes de produzir metabólitos com atividade antibacteriana, antifúngica e anticancerígena (GUNATILAKA, 2006), agentes redutores do colesterol, agentes imunossupressores (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000), ou ainda com atividades hormonais, citotóxicas (Silva, 2014), antivirais, antiparasitárias, inibidores enzimáticos, agentes estimulantes da mobilidade gástrica, inseticidas, entre outras (DEMAIN e SANCHEZ, 2009). O primeiro composto fúngico descrito com propriedades terapêuticas foi a penicilina isolada do gênero *Penicillium* (TAKAHASHI e LUCAS, 2008; CHAVES, 2017).

Os fungos com notável produção de compostos bioativos são do filo basidomicetos. Alguns fungos desse filo, como os fungos do gênero *Fomitopsis* possuem atividade antitumoral, antioxidante e anti-inflamatória, além de diversas enzimas de interesse biotecnológico. (PARK *et al.*, 2015; CHAVES, 2017). Outrossim, os fungos endofíticos, por exemplo, do gênero *Phomopsis* são capazes de produzir metabólitos com importante ação antioxidante, que incluem alcaloides, terpenos, esteroides, flavonoides, polifenóis e outros (LIU *et al.*, 2007).

Estudos envolvendo fungos têm mostrado importante ação antioxidante devido a produção de compostos fenólicos e outros grupos em seu metabolismo, como nas linhagens de *Chaetomium* sp. (HUANG *et al.*, 2007), em *Terfezia claveryi* e *Picoa juniperi* (MURCIA *et al.*, 2002) e, *Hericium andrinus*, *Boletus bicolor* e *Aspergillus cristatus* nos estudos de Yang *et al.* (2020).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários, divididos em flavonoides e não flavonoides, produzidos por fungos e plantas (NACZK e SHAHIDI, 2004; LIMA, 2017). Destacam-se pelo variado efeito biológico, tais como: quelantes de EROs, modulação da atividade enzimática, potencial ação antibiótica, anti-inflamatório e anti-histamínico (MANACH *et al.*, 2004). Entre os compostos fenólicos, destaca-se os flavonoides pela ação antitumoral, antimicrobiana, além da atividade antioxidante úteis no tratamento auxiliar de doenças (LIU *et al.*, 2007; NAZARI *et al.*, 2011).

A ação antioxidante dos flavonoides tem potencial para reduzir efeitos ocasionados pela peroxidação lipídica, além de atuar positivamente nos sistemas enzimáticos, incluindo ciclooxigenases e lipoxigenases e, minimizar danos na ação plaquetária. Os flavonoides conseguem atuar no estágio de iniciação da peroxidação lipídica, bem como interromper a reação em cadeia de radicais, terminando com a etapa de propagação (SILVA, 2013). Outrossim, atuam na redução da formação de EROs, a eliminação dos precursores dos

radicais, inibição da xantina oxidase e elevação dos níveis de antioxidantes endógenos (HARMAN, 2004; LIMA, 2017).

Assim, os compostos antioxidantes podem prevenir efeitos fisiológicos indesejáveis nos sistemas cardiovasculares, nos mecanismos de ação inflamatórios e na homeostasia da coagulação (SILVA, 2014), ou seja, previnem e reduzem os efeitos oxidativos nas células em vários órgãos e tecidos e, portanto, podem prevenir doenças que trazem danos à vida.

## CAPÍTULO I

### **Molecular and morphological diversity, qualitative chemical profile and antioxidant activity of filamentous fungi of the digestive tract of *Phylloicus* sp. (Trichoptera: Calamoceratidae)**

Diversidade molecular, morfológica, perfil químico qualitativo e atividade antioxidante de fungos filamentosos do trato digestivo de *Phylloicus* sp. (Trichoptera: Calamoceratidae)

Tiago Carnevalle Romão<sup>a\*</sup> <https://orcid.org/0000-0003-2821-779X>, Antonio Carlos Pereira de Menezes Filho<sup>b</sup> <https://orcid.org/0000-0003-3443-4205>, Ricardo Harakava<sup>c</sup>, <https://orcid.org/0000-0003-1431-2665>, Carlos Frederico de Souza Castro<sup>a</sup> <https://orcid.org/0000-0002-9273-7266>, Paula Benevides de Morais<sup>d</sup> <https://orcid.org/0000-0002-5050-5766>

<sup>a</sup>Instituto Federal Goiano, Departamento de Agroquímica, Rio Verde, Goiás, Brasil.

<sup>b</sup>Instituto Federal Goiano, Departamento de Ciências Agrárias, Rio Verde, Goiás, Brasil.

<sup>c</sup>Instituto Biológico, Unidade Laboratorial de Referência de Biologia Molecular Aplicada, São Paulo, Brasil.

<sup>d</sup>Universidade Federal do Tocantins, Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia, Palmas, Tocantins, Brasil.

\* Corresponding author: [tiago.romao@ifgoiano.edu.br](mailto:tiago.romao@ifgoiano.edu.br)

#### **Abstract**

This study aimed to identify by molecular analysis, morphology, chemistry and antioxidant extracts of filamentous fungi isolated from the digestive tract of *Phylloicus* sp, an aquatic insect that lives on leaf packages in tropical streams and participates together with fungi of the decomposition of plant substrates in aquatic habitats. Insect larvae of *Phylloicus* sp. were collected in streams in the state of Tocantins, Brazil. Fungi were isolated from the digestive tract of larvae after disinfection and dissection, then described and purified for identification purposes and testing for antioxidant activity. Molecular identity was performed of ITS1 and ITS4, TUB e TEF sequencing. Fungal extracts were produced in 70% ethanol solution and later lyophilized. For analysis of chemical groups of extracts, thin layer chromatography (TLC) was performed in two mobile phases and different developers. Morphology was performed by optical microscopy stained with Toluidine Blue and measurement performed using the ImageJ program. Antioxidant activity performed in TLC and by quantitative method for DPPH and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) radicals. Four fungi were identified: *Endomelanconiopsis endophytica*, *Myxospora musae*, *Neopestalotiopsis cubana* and *Fusarium pseudocircinatum*. The TLC showed several spots with acetone/chloroform mobile phase and UV 254 nm developers and I<sub>2</sub> vapor. Fungal extracts demonstrate antioxidant action to reduce the DPPH free radical and especially for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> above 50%, *E. endophytica* 91.6%, *M. musae* 87.8%, *N. cubana* 89.5% and 92.3% for *F. pseudocircinatum*. This study demonstrated that the molecular technique by PCR was satisfactory for identifying fungi, and extracts with numerous chemical groups and potent reducing agents. Thus future work, should be carried out evaluating these four species for industrial use.

**Keywords:** antioxidant activity, fungal metabolites, *E. endophytica*, *M. musae*, *N. cubana*, *F. pseudocircinatum*

## Resumo

Este estudo visou identificar por análises molecular, morfológica, química e por extrato antioxidante, fungos filamentosos isolados do trato digestivo de *Phylloicus* sp., um inseto aquático que vive entre folhagens em riachos tropicais, e participam junto com os fungos da decomposição de substratos vegetais em habitats aquáticos. Larvas de insetos de *Phylloicus* sp. foram coletadas em riachos no Estado do Tocantins, Brasil. Os fungos foram isolados a partir do trato digestivo das larvas após desinfecção e dissecação, depois descritos e purificados para fins de identificação e testes para atividade antioxidante. A identidade molecular foi realizada do sequenciamento ITS1 e ITS4, TUB e TEF. Os extratos fúngicos foram produzidos em solução etanólica 70% e posterior liofilização. Para análise de grupos químicos dos extratos, foi realizada cromatografia em camada delgada (CCD) em duas fases móveis e diferentes reveladores. A morfologia foi realizada por microscopia óptica corada com Azul de Toluidina e a mensuração realizada no programa ImageJ. A atividade antioxidante realizada em CCD e por método quantitativo para os radicais DPPH e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Foram identificados quatro fungos: *Endomelanconiopsis endophytica*, *Myxospora musae*, *Neopestalotiopsis cubana* e *Fusarium pseudocircinatum*. Na CCD foi evidenciado várias manchas com fase móvel acetona/clorofórmio e reveladores UV 254 nm e vapor de I<sub>2</sub>. Os extratos fúngicos demonstram ação antioxidante para redução do radical livre DPPH e em especial para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acima de 50%, *E. endophytica* 91.6%, *M. musae* 87.8%, *N. cubana* 89.5% e 92.3% para *F. pseudocircinatum*. Este estudo demonstrou que a técnica molecular por PCR foi satisfatória para identificação dos fungos, e os extratos com inúmeros grupos químicos e potentes agentes redutores. Com isso, trabalhos futuros deverão ser realizados avaliando essas quatro espécies para uso industrial.

**Palavras-chave:** atividade antioxidante, metabólitos fúngicos, *E. endophytica*, *M. musae*, *N. cubana*, *F. pseudocircinatum*.

## 1. Introduction

The Trichoptera were distributed even in the Triassic period where they share a common ancestor with Lepidoptera (Pes et al., 2005). These organisms, still in the larval form, present superior morphology with a sclerotized head, short antennae, developed mandibles, thorax with a sclerotized pronotum, membranous abdomen, which may present gills, and the IX segment presents a pair of anal pseudolegs with claws. These organisms present fresh, lotic and lentic life mainly in streams of Central Amazonia, and are rarely found in maritime areas (Reyes-Torres and Ramírez, 2018; Pimentel et al., 2020).

Calamoceratidae is composed of eight genera and 197 species, with the genus *Phylloicus* Müller 1880 being the most representative with a neotropical distribution with 60 described species. In addition to being distributed throughout the New World, it is, however, particularly diversified with the largest number of species described in Brazil, Peru and Venezuela (Souza-Holanda et al., 2020). In Brasil, it is the only known genus of the family, with 25 species mainly in the North region with records of seven species *P. amazonas* Prather 2003, *P. auratus* Prather 2003, *P. brevior* Banks 1915, *P. dumsi* Santos & Nessimian 2010, *P. elektoros* Prather 2003, *P. fenestratus* Flint 1974 and *P. flinti* Prather 2003 (Leite et al., 2016; Holzenthal and Calor, 2017; Prather, 2003; Santos and Nessimian, 2010).

The genus *Phylloicus* shares, among other groups of Trichoptera, the presence of a wide variety of fungal microorganisms (yeasts) in the digestive tract, although reports related to the different yeast strains associated with these aquatic insects are still little restricted in the literature (Santos et al., 2019). It is known that this beneficial interaction can occur throughout the insect's body, depending on the microorganism's needs to establish a full mutualistic colonization. In the interface of interaction between yeast and insects, yeast colonization are observed both on the external surface of the body, reproductive system, and in the digestive tract (DT) (Santos et al., 2019). Furthermore, insects are responsible for dispersing these microorganisms, acting as vectors in different natural environments (Christiaens et al., 2014).

In a study carried out by Santos et al. (2019) 20 yeast species of the genus *Candida*, *Papiliotrema*, *Rhodotorula* and *Issatchenkia* were described only in the digestive tract of *Phylloicus* larvae collected in an area of the Cerrado domain in Brasil. These yeasts play a role in increasing and maintaining health, favoring the antioxidant action and interacting with nutrition, thus providing supplements in the diet during the stages from larva to adult insect (Noda and Koizumi, 2003; Douglas, 2015; Stefani et al., 2016).

Several yeasts have important biological actions with high antioxidant activity, due to the contents of total phenolics and among other groups of compounds produced from their metabolism, such as in strains of *Chaetomium* sp., (Huang et al., 2007), in *Terfezia claveryi* and *Picoa juniperi* truffles, and raw mushrooms *Lepista nuda*, *Lentinus edodes*, *Agrocybe cylindracea*, *Cantharellus lutescens* and *Hydnum repandum* in the study by Murcia et al. (2002) and in *Ganoderma lucidum*, *Tremella fuciformis*, *Schizophyllum commune*, *Morchella esculenta*, *Flammulina velutipes*, *Agaricus bisporus*, *Dictyophora inausiata*, *Grifola frondosa*, *L. edodes*, *Coprinus comatus*, *Fermentum latissis*, *Hericium albumuceus*, *Hericium andrinus*, *Boletus bicolor* and *Aspergillus cristatus* in the study by Yang et al. (2020) where they showed, in studies, potential reducing efficiency over assays with free radicals by lipid peroxidation (LOO.), deoxyribose (OH.), peroxidase (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and in the reduction of free radicals DPPH, FRAP and ABTS+, these being some examples of yeasts involved in several processes that benefit both humans and animals.

Thus, it is known that many fungal species have important biological activities, favoring the well-being of various organisms, especially as an antioxidant agent, which is a feature in the reduction of different forms of free radicals capable of negatively interacting on biomolecules, producing failures in gene transcription on DNA and RNA strands, in addition to being involved in several types of cancers and premature aging. In addition, they may also be directly positively linked to the development of industrial bioprocesses capable of promoting increased productivity on an industrial scale in the food production chain,



agricultural bioactives and energy production (biofuels) (Otero-Colina et al., 2010; Sha et al., 2017; Yang et al., 2020; Sulphari et al., 2020).

Thus, it is necessary to know the genetic profile, morphological and biological activities, as a potential reducing action of oxidizing agents from mutualistic fungal species present in the digestive tract (DT) of *Phylloicus* larvae. The aim of this study was to describe the profile on molecular and morphological diversity, qualitative chemical, and antioxidant analysis of filamentous fungi associated with the digestive tract of aquatic crusher larvae of insects of the genus *Phylloicus* (Trichoptera: Calamoceratidae) in natural environments of the Brazilian Cerrado.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Fungal selection

Four fungal strains were randomly selected and provide from the Carlos Rosa Collection (CRC) of the Universidade Federal do Tocantins, Palmas, TO, Brasil, which were isolated from *Phylloicus* sp. (Trichoptera: Calamoceratidae) collected near the riverbanks of the Lajeado State Park, Tocantins, Brasil. Then, the strain were evaluated for potential antioxidante activity and identified.

### 2.2. Molecular identification, amplification and fungal sequencing

Each fungal sample was identified by the ribosomal DNA inner transcribed region (ITS) sequencing method. DNA extraction was performed as proposed by Doyle and Doyle (1987). The extracted DNA sample was subjected to polymerase chain reaction (PCR) for amplification of the ITS region of the rDNA of part of the  $\beta$ -tubulin and 1- $\alpha$  elongation factor genes. The ITS region oligonucleotide primers were: SR6R (5'-AAGWAAAAGTCGTAACAAGG-3') and LR1 (5'-GGTTGGTTTCTTTTCCT-3') as described by Vilgalys and Hester (1990).

For the  $\beta$ -tubulin gene, TUB2Fd (5'-GTBCACCTYCARACCGGYCARTG-3') and TUB4Rd (5'-CCRGAYTGRCCRAARACRAAGTTGTC-3') were used according to Aveskamp et al. (2009). For the elongation factor gene they were: EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTTCGAGAAGG-3') as described by Carbone and Kohn (1999) and EF2 (5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3') by O'Donnell et al. (1998). The solution for the PCR assay consisted of an aliquot containing 1  $\mu$ L of DNA, 1  $\mu$ L for each conc primer. 10  $\mu$ M, 10  $\mu$ L 5X PCR buffer, 1  $\mu$ L dNTPs conc. 10 mMol, 0.2  $\mu$ L of 5 U  $\mu$ L GoTaq DNA polymerase (Promega) and 35.8  $\mu$ L sterile ultra-distilled H<sub>2</sub>O, for a total final volume of 50  $\mu$ L.

The amplification program consisted of initial denaturation at 94 °C for 2 min., followed by 40 cycles of denaturation at 94 °C for 10 s, with annealing at 54 °C for 30 s, extension at 72 °C for 45 s, and final extension at 72 °C for 4 min. The verification of the amplified products was carried out using conc. agarose gel electrophoresis. 0.8% stained with ethidium bromide. The amplified products were purified by precipitation with polyethylene glycol (Schmitz and Riesner, 2006), followed by the sequencing reaction through the chain termination method, using Big Dye 3.1 reagent solution (Applied Biosystems). The analysis was performed in an automatic capillary sequencer (Applied Biosystems, Mod. 3500 xL).

### 2.3. Phylogenetic determination

After sequencing, the base pairs were analyzed using the GenBank database, allowing the identification of fungal isolates at the genus and species level, when it comes to the species already described, based on gene similarity. The phylogenetic tree was developed using the Neighbour-Joining method through the MEGA program (version 6.0, USA). The bootstrap was 2000 replications over the confidence level as described by Tamura et al. (2013), GenBank sequences were indicated by accession numbers.

### 2.4. Extracts from cultures of filamentous fungi

The filamentous fungal cultures were subjected to extraction process as described by Lim et al. (2021) modified. Briefly, the cultures were homogenized and extracted using (70%) hydroethanolic solution and ethyl acetate (5:2). The mixture was left to stir overnight at room temperature. The spatula full of sodium sulfate was added before filtering the using filter qualitative paper. The filtered was transferred into a Becker flask and dried to evaporation in 36 °C. The extract obtained was dissolved in DMSO and kept as stock solution conc. 100 mg mL<sup>-1</sup> at -12 °C until further analysis.

### 2.5. Basic morphological characteristics

Microscopy slides containing samples of the four fungi were prepared for light microscopy using Toluidine blue conc. 1% (w/v). Then, the slides were observed under an optical microscope (Olympus, Mod. BX61), with a digital camera attached (Olympus, Mod. DP73). The micrographs obtained from the 10, 20, 40 and 100x magnifications and their diameter expressed in micrometers (µm) were evaluated using ImageJ software (free version, 2019), where the diameter, length and shape of 50 viable fungal cells were determined.

### 2.6. Thin-Layer Chromatographic (TLC)

In silica gel chromatoplates F254, five (5) µL of the fungal extract was deposited in the baseline, after drying the solvent, the strips of chromatoplates (1 x 10 cm<sup>2</sup>) were

transferred to a chromatographic vat containing the following phases: acetone/chloroform (5:3), and acetone/petroleum ether (5:2). Following elution, separated compounds were visualised using UV 254 and 365 nm, iodine vapour, ferric chloride solution, sulfuric vanillin solution, green bromocresol solution and chromic acid solution. The retention factors (R<sub>f</sub>s) for each spot was calculated as the ratio of the distance (mm) that spot was eluted on a plate relative to the total distance (mm). Images of derivatised TLC were taken using a digital camera (Lim et al., 2021) modified.

### 2.7. Antioxidant activity by qualitative assay

On a silica gel chromatoplate, the evaluated fungal extracts were applied. After total evaporation of the sample solubilization vehicle, the chromatoplate was nebulized with conc. 0.2% (w/v). The antioxidant activity was evidenced by the presence of white or yellow spots resulting from the reduction of the DPPH free radical, against the background pink coloration, after 30 min at room temperature. As a positive standard, 5  $\mu\text{L}$  of stock solution at 1  $\text{mg mL}^{-1}$  of ascorbic acid equivalent to conc. 1.64  $\text{mMol}$  as described by Lim et al. (2021) modified. Antioxidants were visualized as bright zones against a purple background under white light.

### 2.8. Quantitative assay of antioxidant activity (DPPH) and inhibition by hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

Antioxidant activity was obtained in 96-well flat-bottom plates using a Biotek Elisa reader (model ELX 800 with Gen5 software V2.04.11). To evaluate the antioxidant activity, the test against the DPPH radical (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) was used by according Alves et al. (2020). In this test, the following solutions were used per well: 180  $\mu\text{L}$  of methanolic solution of DPPH conc. 0.2% (w/v), 20  $\mu\text{L}$  of the extract sample dissolved in methanol, at concentrations of 200-0.78  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Results were expressed as inhibition concentration  $\text{IC}_{50}$   $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As a positive control, a standard solution of ascorbic acid was used.

The ability of the four fungal extracts to inhibit hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) was estimated following the method of Ruch et al. (1989) and cited by Yadav et al. (2014). The solution of  $\text{H}_2\text{O}_2$  conc. 40  $\text{mMol L}^{-1}$  was prepared in phosphate buffer conc. 50  $\text{mMol L}^{-1}$  with pH 7.4. The concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$  was determined by UV-Vis spectrophotometry in absorption at 230 nm. Fungal extracts conc. 1  $\text{mg mL}^{-1}$  in distilled water was added to  $\text{H}_2\text{O}_2$  and the absorbance at 230 nm was determined after 10 min against a blank solution containing a phosphate buffer solution without  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The percentage of elimination of  $\text{H}_2\text{O}_2$  was calculated according to Equation 1.

$$\text{Scavenged H}_2\text{O}_2(\%) = \left[ \frac{A_i - A_t}{A_i} \right] 100 \quad (1)$$

Were:  $A_i$  is the absorbance of control and  $A_t$  is the absorbance of test samples.

### 2.9. Statistical analysis

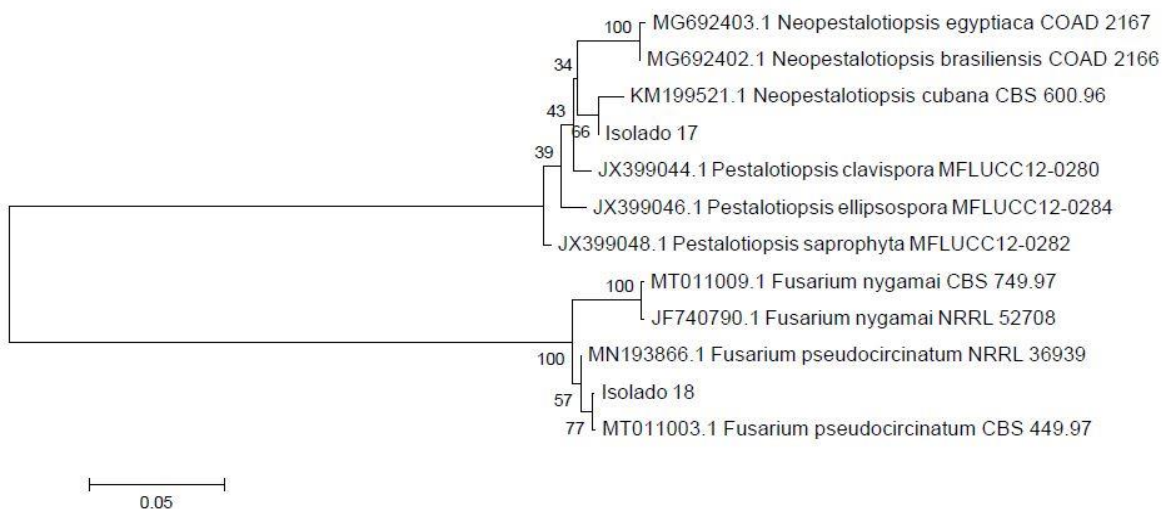
All tests were performed in triplicate, followed by  $\pm$  SD (standard deviation), when necessary. From the means, an analysis of variance (ANOVA) was adopted, followed by Duncan's test ( $p < 5\%$ ) for significance.

### 3. Results

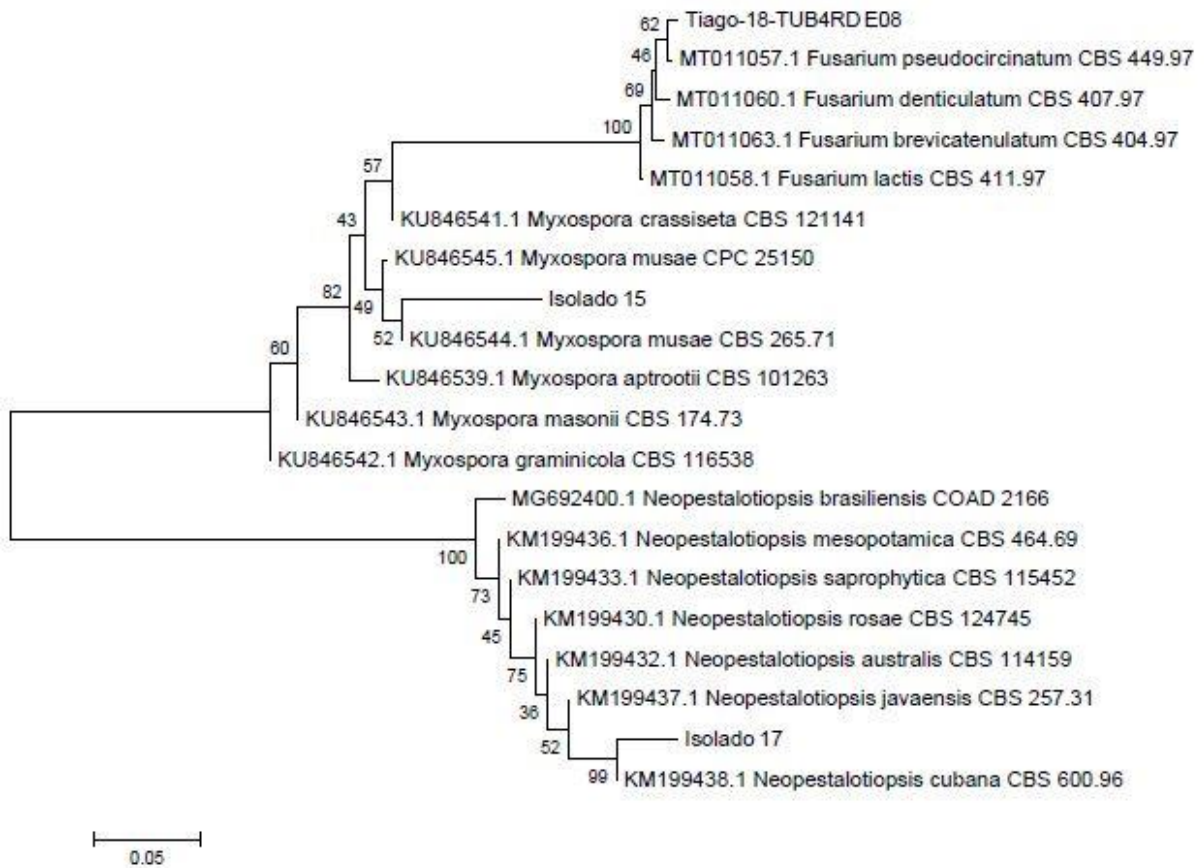
The four fungal strains were identified as *Endomelanconiopsis endophytica*, *Myxospora musae*, *Neopestalotiopsis cubana* e *Fusarium pseudocircinatum*. All isolated from DT of *Phylloicus* larvae

The phylogenetic relationship between fungal species is shown in Figures 1-3, in trate digestion of *Phylloicus* sp.

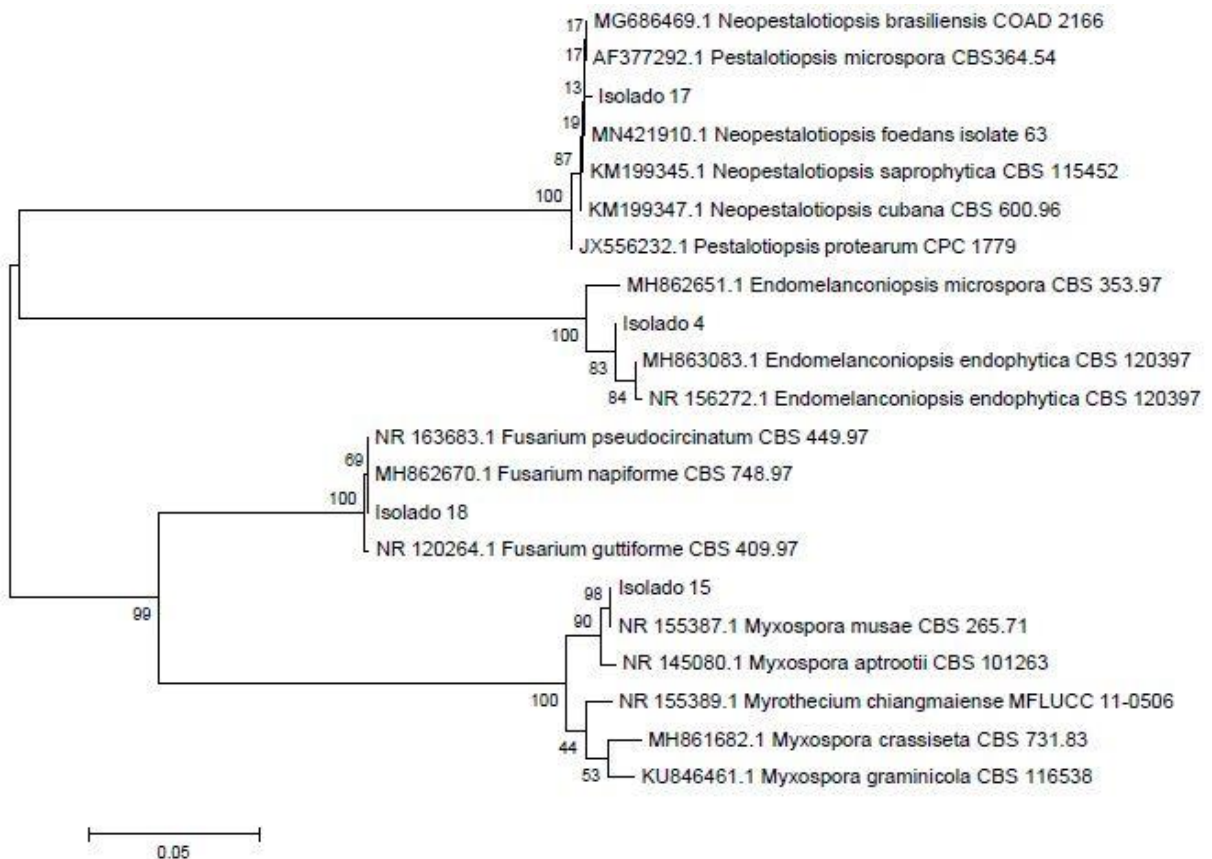
The genetic sequence of the four identified fungi is presented below: *Neopestalotiopsis cubana* CBS 600.96 (1), *Fusarium pseudocircinatum* CBS 449.97 (2), *Myxospora musae* CBS 265.71 (3) and *Endomelanconiopsis endophytica* CBS 120397 (4).



**Figure 1.** Phylogenetic relationship between fungal species for *Neopestalotiopsis cubana* and *Fusarium pseudocircinatum*. Source: Authors.



**Figure 2.** Phylogenetic relationship between fungal species for *Myxospora musae* and *Neopestalotiopsis cubana*. Source: Authors.



**Figure 3.** Phylogenetic relationship between fungal species for *Endomelanconiopsis endophytica* and *Myxospora musae*. Source: Authors.

(1): TEF

CATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTAGTCATCTATTGATTCCCATCATCATTCCCCTTC  
 ACTCCAGCGTCATTATTTTCAACCTACGCGTTGAAAATTATTTTCACTCCTTCCAC  
 ACTTTTTTCGCTGGTTACCCCGCCGCGAGGCACCCGACGACCCCGCGGTGCAAAC  
 GAAAAATTTCTTATCACAGCCCCACCTTTCACAAGCAACCATGCATTGCTCATGA  
 GACCCACTTTGAACAATTGCTAATGCCTTCATACAGGAAGCCGCCGAGCTCGGTA  
 AGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCG  
 TGGTATCACCATCGATATCGCTCTCTGGAAGTTCGAGACCAACGAGTACAATGTC  
 ACCGTCATTGGTTAGTACCCCTCCACCTATGCCATGTGCTGCTCCATAAGACACTT  
 GACTAACCTTGCTTCATAGACGCTCCCGGTCACCGTGATTTTCATCAAGAACATGA  
 TTACTIONGTTACT

(2): TEF

ATCGGCCACGTCGACTCTGGCAAGTCGACCACTGTGAGTACTACCCTCGACGATG  
 AGCTTATCTGCCATCATAATCCCGACCAAACCTGGCGGGGTATTTCTCAAAGC  
 CAACATGCTGACATTACTTCACAGACCGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTA  
 TCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTAGTCACTTTCCCTTCGATCG  
 CGCGTCCTTTATCCATCGATTTCCCCTACGACTCGAAACGTGCCCGCTACCCCGCT  
 CGAGTCCAAAATTTTTGCGATATGACCGTAATTTTTTTGGTGGGGCCTTTACCCCG  
 CCACTCGAGCGGGCGGTTTTTTGCCCTCTCTCATTCCACAACCTCACTGAGCGCATC  
 GTCACGTGTCAAGTAGTCACTAACCGTTCGACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGT  
 AAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGC  
 GTGGTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTCGAGACTCCTCGCTACTATGTC  
 ACCGTCATTGGTATGTTGCCGCTCATGCTTCATTCTACATCTCTTCTTACTAACAT  
 ATCGCTCAGACGCCCCCGGTCACCGTGATTTTCATCAAGAACATGATCA

(3): TUB

GTCAATGCGTAAGTGCTACCTACCACGATTCTTGCTTCAACCGCCGTCAGGCCAC  
 TCACGCGTTTTTCAGGGTAACCAAATTGGTGCTGCTTTCTGGCAGACCATCTCTGGC  
 GAGCACGGCCTCGACAGCAATGGTGTCTACAACGGAACCTCCGAGCTCCAGCTCG  
 AGCGCATGAACGTCTACTTCAACGAGGTACGCCTTGCCATTGTTTACTCGGCCTC  
 GGGCATCAAGCTAACCCTACTGGTCAACAGGGTAGCGGTAACAAGTACGTTCCCTCG  
 CGCCGTCCTCGTCGATCTCGAGCCCGGTACCATGGACGCTGTCCGTGCCG

(4): ITS

GCGGCCGCCCCCTAACCGGGGCTGGCCAGCGCCCGCCAGAGGACTACCAAACCT  
 CCAGTCAGTAAACGTAGCTGTCTGATCAAAAGTTTAATAAACTAAAACCTTCAAC  
 AACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA

ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCC  
 TTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCACTCAAGCTCTGCT  
 TGGTATTGGGCGCCGTCCTTACCCGGACGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGT  
 CTTGCCTCAAGCGTAGTAGAAAACACCTCGCTTTGGAGGACGGGACGTTCGCTCG  
 CCGGACGAACCTTCTGAATTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACC  
 CGCTGAA

Figure 4 shows the microscopic image of the fungi isolates *E. endophytica*, *M. musae*, *Neopestalotiopsis cubana* and *F. pseudocircinatum*. Hyphae diameters were observed in *E. endophytica* hyphae with  $11.23 \pm 2.61 \mu\text{m}$  (a), *M. musae* hyphae with  $3.41 \pm 0.43 \mu\text{m}$  (c), *N. cubana* hyphae with  $3.15 \pm 0.95 \mu\text{m}$  (d) and in *F. pseudocircinatum* hyphae with  $3.79 \pm 0.73 \mu\text{m}$  (b) where they presented statistical difference between species according to Duncan's test (Figures 4A, 4B, 4C and 4D). In *E. endophytica* intense activity of lateral shoots was observed in the developed hyphae (Figure 4A). A large amount of conidia was observed in *M. musae* with polar diameter measurements of  $4.59 \pm 0.61 \mu\text{m}$  (a), and equatorial diameter of  $2.71 \pm 0.51 \mu\text{m}$  (b), and *F. pseudocircinatum* with polar diameter of  $5.77 \pm 0.92 \mu\text{m}$  (a) and equatorial diameter of  $2.70 \pm 0.23 \mu\text{m}$  (b), demonstrating inductive activity of conidiophores and dispersion (Figures 4B and 4D). Statistically, there was no statistical difference between polar and equatorial diameters between fungi species according to Duncan's test.

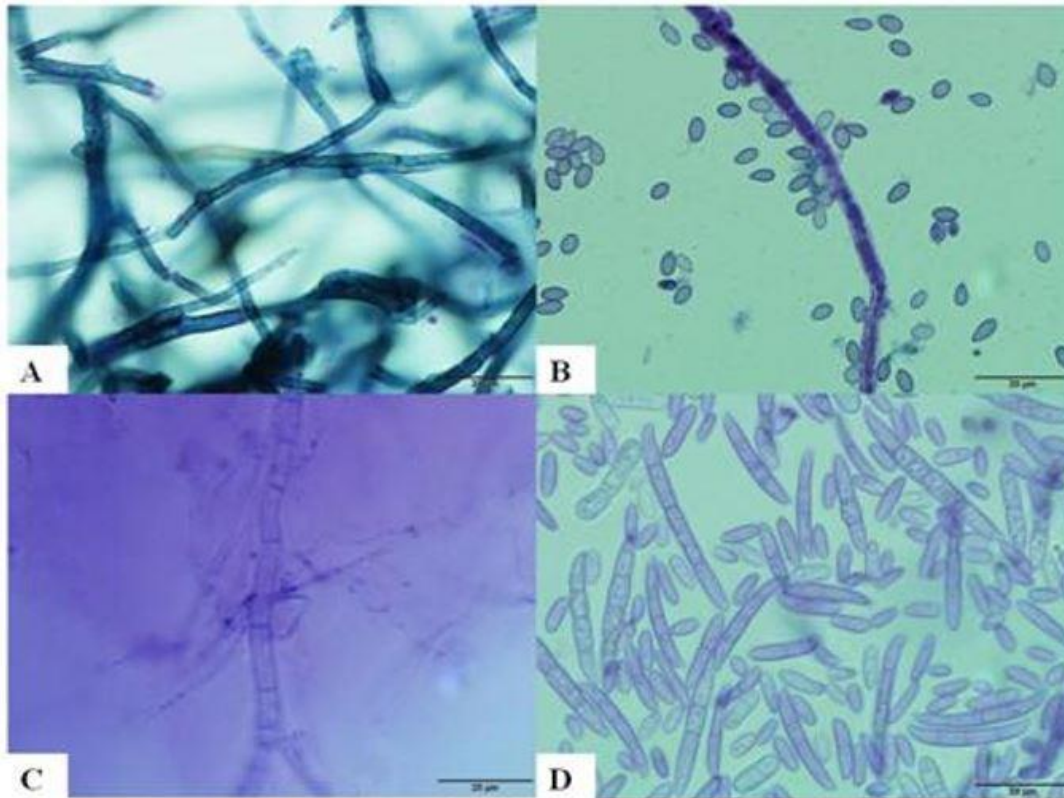
As for the TLC analysis, it was observed a large amount of spots with Rfs in the mobile phase acetone/chloroform and acetone/petroleum ether with 9 and 7 Rfs for *E. endophytica*, 6 and 7 Rfs for *M. musae*, 6 and 4 Rfs for *N. cubana* and 7 and 7 Rfs for *F. pseudocircinatum*, respectively. The best developers were UV light 254 nm and I<sub>2</sub> vapor (Table 1).

In the qualitative assay by TLC, all plates exhibited spots with a color change to yellow against a purple background suggesting antioxidant activity in reducing DPPH. Similar results were observed by the quantitative test in the reduction of DPPH through a standard curve. The intensity of yellow color indicates the antioxidant capacity. Further analysis of fungi active extracts was shown in (Figure 5).

All samples of fungal extracts demonstrated antioxidant activity in reducing the DPPH radical above  $60 \mu\text{L mL}^{-1}$ , although lower when compared to the standard antioxidant Ascorbic acid according to Duncan's test. The fungi *M. musae* and *N. cubana* did not show statistical difference according to Duncan's test (Figure 5).

In the reduction of hydrogen peroxide, the fungal extracts showed a reduction with values greater than 50%, *E. endophytica* 91.6%a, *M. musae* 87.8%b, *N. cubana* 89.5%a and 92.3%a for *F. pseudocircinatum*, respectively. It is observed that the fungi under study have

high reduction activity in the peroxide test. Statistical difference was observed only for the fungal extract of *M. musae* according to Duncan's test.



**Figure 4.** Morphology of hyphae and conidia of *Endomelanconiopsis endophytica* (A), *Myxospora musae* (B), *Neopestalotiopsis cubana* (C) and *Fusarium pseudocircinatum* (D). Source: Authors.

**Table 1.** Qualitative chromatographic profile by Thin-Layer Chromatographic, for the four fungi isolates *E. endophytica*, *M. musae*, *N. cubana* and *F. pseudocircinatum*.

Eluents	Revealing substances <i>E. endophytica</i>						
	1	2	3	4	5	6	7
Acetone/chloroform	0.15	-	0.16	0.44	-	-	0.71*
	0.40		0.22				
	0.78		0.31				
Acetone/petroleum ether	0.17	-	0.15	0.40	-	-	-
	0.37		0.22				
	0.44		0.31				
Eluents	Revealing substances <i>M. musae</i>						
	1	2	3	4	5	6	7
Acetone/chloroform	0.19	0.90	0.18	-	-	-	-
	0.33		0.45				
	0.69						
Acetone/petroleum ether	0.24	-	0.21	-	-	-	-
	0.37		0.30				
	0.77		0.38				



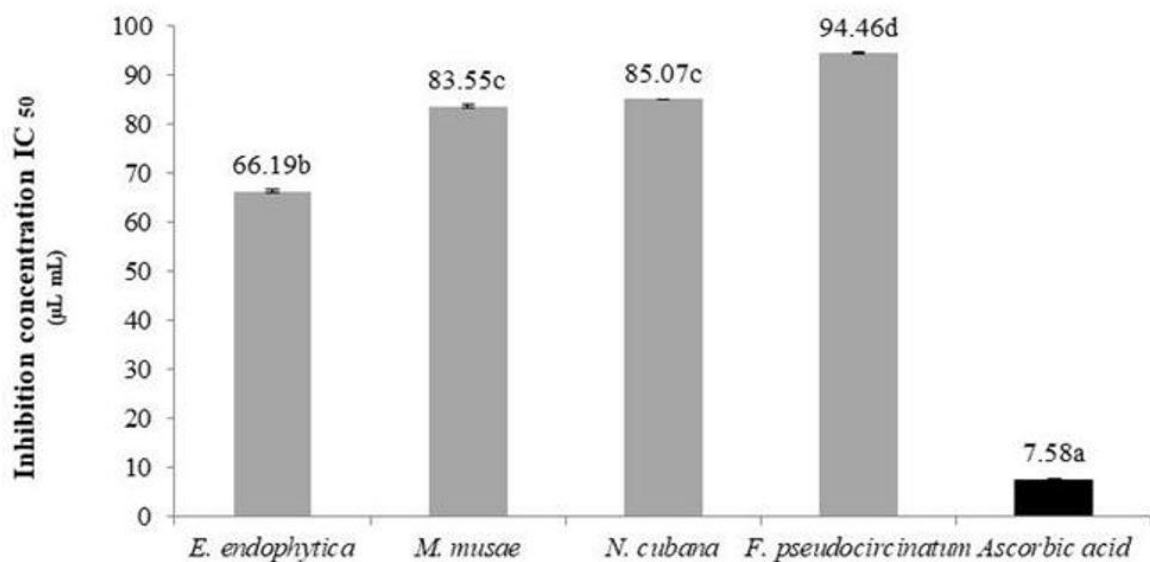
**Table 1.** Qualitative chromatographic profile by Thin-Layer Chromatographic, for the four fungi isolates *E. endophytica*, *M. musae*, *N. cubana* and *F. pseudocircinatum*. (continued)

Eluents	Revealing substances <i>N. cubana</i>						
	1	2	3	4	5	6	7
Acetone/chloroform	-	-	0.25 0.37 0.40 0.44 0.53	0.91*	-	-	-
Acetone/petroleum ether	-	-	0.28 0.38 0.45	0.93*	-	-	-

Eluents	Revealing substances <i>F. pseudocircinatum</i>						
	1	2	3	4	5	6	7
Acetone/chloroform	0.48	-	0.20 0.27 0.47 0.56	0.40	-	-	0.88*
Acetone/petroleum ether	0.48	-	0.21 0.26 0.47 0.55	0.44	-	-	0.86*

Note: UV 254 nm (1) and 365 nm (2), iodine vapour (3), ferric chloride solution (4), sulfuric vanillin solution (5), green bromocresol solution (6) and chromic acid solution (7). (-) Absent. \*Heating at 90 °C for 5 min. Results in millimeters (mm). Source: Authors.

**Figure 5.** Antioxidant activity in reducing DPPH on fungi extracts (*Endomelanconiopsis endophytica*, *Myxospora musae*, *Neopestalotiopsis cubana* e *Fusarium pseudocircinatum*). Different letters show statistical difference by Duncan's test ( $p < 5\%$ ). Source: Authors.

#### 4. Discussion

In this study, great richness of species of morphospecies isolated from the digestive tract of *Phylloicus* sp. show great apparent antioxidant potential. According to Suh et al. (2005), Tegtmeier et al. (2016) and Santos et al. (2018) the digestive tract of insects, mainly in its larval form, is known to harbor a great diversity, as well as a promising source of new fungal species that can be used in industrial bioprocesses, in agriculture, nutrition and as bioindicator agents. This is the first record of the occurrence of *E. endophytica*, *M. musae*, *N. cubana* and *F. pseudocircinatum* in association with the digestive tract of an aquatic insect of the genus *Phylloicus*. The molecular method was highly sensitive for TEF, TUB and ITS during the identification of fungi clades with 100% sensitivity. Similar results were also described by Lataeef et al. (2018) identifying by molecular techniques the diversity of *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis* and *Pseudopestalotiopsis* collected in Sarawak, on the island Borneo (Malaysia).

The preliminary identification based on molecular methods also allowed studies such as by Santos et al. (2018) the identification of four isolates, two identified as *Paraphaeosphaeria arecacearum*, one strain of *P. sclerotiorum* and one strain of *P. simplicissimum*, associated with the digestive tract of *Phylloicus* collected in Cerrado areas near the municipality of Santarém, Pará state, Brasil, where it was first isolated in soil under *Elaeis guianensis* Jacq. in Suriname described by Verkley et al. (2014).

Several microorganisms isolated from the digestive tract of insect and insect larvae have distinct enzymes that are naturally produced. Furthermore, certain fungal groups are found in plant species being characterized and classified as endophytic (Sun et al., 2016a, b). The *E. endophytica* isolate was studied by Sun et al. (2016a) harmonically inhabiting *Ficus hirta* roots, being classified as a symbiotic organism, where, in addition, this fungus produces several compounds, two chemical structures of great industrial importance being 2,3-dimethylcyclopent-2-en-1-one and 2-hydroxymethyl -3-methylcyclopent-2-enone (Ferreira et al., 2015).

In addition to this harmonic characteristic between fungus-plant (symbiosis), these microorganisms produce an important enzyme mixture being used in several industrial segments (Sun et al., 2016b). This characteristic has been described in *M. musae* where it has cellulolytic activity (Vieto et al., 2022) and also beneficial effects on the rhizosphere in various plant groups in nitrogen fixation (Liang et al., 2019; Adeyemi et al., 2020). Various organisms such as *Azospirillum* sp. and several mycorrhizal fungi, are used as inoculants in seeds and also directly in the leaf area, ensuring greater absorption of nutrients, increased productivity, leaf protection and less susceptibility to attacks by viruses, fungi and

phytopathogenic bacteria (Fukami et al., 2018). However, a large number of fungi genera are considered phytopathogenic such as *N. cubana*, where in the study Pornsuriya et al. (2020) the researchers recorded an association with defoliation in rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Thailand for the genus *Neopestalotiopsis*, and Gerardo-Lugo et al. (2020) with mango gray leaf spot disease in Mexico. Not limited to this group, several species of the *Fusarium* genus are also responsible for serious agricultural losses annually, *F. pseudocircinatum* is also included in the class of genera that cause plant diseases such as malformation of mango fruits in Mexico (Freeman et al., 2014), in *Acacia koa* (Shiraishi et al., 2012) and in *Tabebuia rosea* (Montoya-Martínez et al., 2021).

Fungi isolated in the digestive tract of *Phylloicus* by different researchers emphasize that the species *P. sclerotiorum* has xylanolytic activity and in *P. simplicissimum* the cellulase enzyme (Zeng et al., 2006; Knob and Carmona, 2010; Santos et al., 2018). Fungi species with characteristics of plant material degradation have a remarkable industrial use. Xylanase for example, has a notable industrial use in the production of feed and food, and cellulases that can also be obtained from strains of *Penicillium* spp. has potential use in industrial processes (Dutta et al., 2008; Knob and Carmona, 2010; Bomtempo et al., 2017).

As for morphological characteristics, *E. endophytica* in this study showed septate hyphae. Similar results were also observed by Parambayil et al. (2018) evaluating *E. endophytica* isolates collected in different regions of Kerala, although in this study the diameter of the hyphae was greater when compared to the aforementioned study, which had an average diameter of 6.3  $\mu\text{m}$ . Furthermore, *E. endophytica* was not observed in this study with conidiophores in culture medium. In younger cultures Rojas et al. (2008) analyzing species of the genus *Endomelanconiopsis* also did not observe the presence of conidia, only developing hyphae. Although in more established cultures, microconidia were observed with variable shapes, ellipsoidal to subcylindrical, hyaline and also with the appearance of phialidic conidiogenous cells.

In *M. musae* we noticed through microscopic observations the positive presence of both conidiophores and hyphae in a young established isolate. In the study by Liang et al. (2019) the group of researchers cites, through morphological characteristics, the standard mean value of conidia for *Myxospora* between 4-6  $\mu\text{m}$ , with the value of this study being similar to the work cited.

*N. cubana* presented in this study only the developmental phase with hyphae. Similar results were also described in the study by Pornsuriya et al. (2020) where they evaluated the association of *Neopestalotiopsis* hyphae in *H. brasiliensis*. In comparison with another phytopathological species of the *Neopestalotiopsis* genus, *N. clavispora*, Daengsuwan et al.

(2021) obtained in conidiophores cultures, where they determined the diameter of conidiomata between 150-250  $\mu\text{m}$ , conidia length between 18-26  $\mu\text{m}$  and conidia wide between 6.5-8.5  $\mu\text{m}$  using an isolate of *Anthurium andraeanum* in Thailand. Superior results in conidia diameter were found in *Neopestalotiopsis zimbabweana* with values between 20.1-25.0 x 5.2-7.3  $\mu\text{m}$  with fusiform to clavate, straight or erected, 5-cells morphology described by Hermawan et al. (2021) on *Xylaria* isolates.

In this work, *F. pseudocircinatum* presented aerial conidia with short clavate and zero-septate, fusiform, one- to three-septate aerial conidia without a foot-cell, and multiseptate sporodochial conidia with an acuminate apical beak-like cell and a distinct basal foot-like cell. Freeman et al. (2014) described characteristics for *F. pseudocircinatum* isolates in Mexico similar to those in this study. Isolates produced mostly 0-septate but occasionally 1-3 septate oval, obovoid, or elliptical aerial conidia (0 septate: 4 to 19 [avg. 8.7]  $\times$  1.5 to 4 [avg. 2.6]  $\mu\text{m}$ ) in Freeman et al. (2014) described characteristics for *F. pseudocircinatum* isolates in Mexico similar to those in this study. The authors describe the morphology of *F. pseudocircinatum* in false heads in the dark and in short false chains under black light, unbranched or sympodially branched prostrate aerial conidiophores producing mono- and polyphialides, and sporodochia with straight or falcate conidia that were mostly 3-5 septate, but sometimes up to 7 septate (3 septate: 25 to 58 [avg. 41]  $\times$  2 to 3.3 [avg. 2.9]  $\mu\text{m}$ ; 5 septate: 33.5 to 76.5 [avg. 56.7]  $\times$  2.5 to 6 [avg. 3.5]  $\mu\text{m}$ ) and circinate sterile hyphae were rarely formed.

TLC analysis was used to determine the count and types of different constituents present in the crude extract of the evaluated strains. In TLC, the acetone/chloroform mobile phase showed greater aptitude for stain separation, which is discussed by Cai (2014) regarding mixtures of different solvents and polarities. As for the developer, 254 nm UV light and  $\text{I}_2$  vapor revealed the greatest number of spots. It should also be emphasized that this is a qualitative analysis, which requires classical standards for comparison.

Although, it is a preliminary analysis to observe possible groups of molecules arising from special metabolism. It is possible to suggest that 254 nm UV light reveals phytochemicals that absorb ultraviolet light, where they quench the green fluorescence, producing dark purple or bluish patches on the plate. In addition, UV light usually reveals conjugated substances and aromatic systems;  $\text{I}_2$  shows structures of organic compounds, this thesis is also defended by Menezes Filho et al. (2021).

Frisvad et al. (1989) evaluated fungal extracts by TLC where they described the presence of basic mycotoxins, alkaloids, roquefortine C & D, atramentins, fumigaclavines, penitrems, paxilline and aflatrem using as revealers a solution of  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_4$  in  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc. 6N

(15%), methanolic solution of acetic acid and conc. 0.5% anisaldehyde (17:2:1), and acidic mycotoxins, viridicatumtoxin, ochratoxin A, citrinin, rugulosin, luteoskyrin peptide like mycotoxins with I<sub>2</sub> vapor or chlorine, followed by spraying with O-tolidine solution (cyclochlorotine, simatoxin) blue fast B salt followed by NH<sub>3</sub> vapors (kojic acid, 3-nitropropionic acid), among other groups of molecules from the special metabolism of various fungal extracts. Complementary studies by high-performance liquid chromatography (HPLC) should be carried out, evaluating the groups of compounds isolated from the most suitable mobile phase, and thus, elucidating the groups of biomolecules present in the four strains studied.

Still on the TLC analysis, the extracts of the four fungi isolated in this study demonstrate DPPH free radical reducing activity. This is proven through a rapid qualitative result that shows a degree of confidence, where the violet color of the DPPH radical in the presence of antioxidant agents in the case of fungal extracts, turns yellow, showing the reduction of the radical compared to the control (Praptiwi et al., 2018). Although the qualitative assay has demonstrated activity, it is necessary to quantify this activity, and as noted above, fungal extracts exhibit antioxidant activity, although lower than the standard ascorbic acid as a first-line antioxidant and also in the peroxidation assay demonstrating an effect with high reducing activity of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Quantitatively, the extracts exhibited activity in reducing the DPPH radical, although inferior to ascorbic acid, which is one of the main antioxidant agents found in fruits, vegetables, vegetables and among some restricted groups of algae (Njus et al., 2020). Studies have revealed that the use of extracts from fungal colonies, mainly of medicinal fungal species, has significant antioxidant activity. This corroborates our findings for the four species evaluated. Antioxidant activity values found by Caicedo et al. (2019) in *Fusarium oxysporum* culture showed DPPH radical scavenging activity of 51.5 and 26.5% evaluated in two types of culture media. Expressive free radical scavenging activities, were described by Cai et al. (2019) evaluating the content of total triterpenoids in *Sanghuangporus sanghuang* fungal mycelia were superior to our findings, with high activity in the reduction of free hydroxyl, superoxide anion, DPPH with a 6% reduction in conc. = 18.75 µg mL<sup>-1</sup> and 96% with conc. = 350 µg mL<sup>-1</sup>, and for 2,2'-Azino Bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) the reduction between concentrations 9.37-300 µg mL<sup>-1</sup> was between 20-96%. Superior antioxidant activity was also described by Zhou (2015) from *Ganoderma lucidum* extract in O<sub>2</sub> anion reduction between 30-90%, between 10-90% in hydroxyl free radical reduction and for DPPH between 10-70%.

The digestive tract of *Phylloicus* sp. larvae harboured *E. endophytica*, *M. musae*, *N. cubana* and *F. pseudocircinatum* and this is the first report on isolation of these fungi associated with *Phylloicus* sp.. The morphological structure also presented results similar to those in the cited literature, corroborating the molecular analysis, also suggesting that these fungi have a low evolution rate for different regions. All fungal extracts presented a high number of groups of separate compounds when acetone/chloroform were used as mobile phase and as main revealers UV light 254 nm and I<sub>2</sub> vapor, in addition to exhibiting potential reducing activity on DPPH free radical and hydrogen peroxide.

Future studies should proceed with investigations to characterize the endophytic potential and as an inoculant in biofactories and field, as well as to evaluate the cellulolytic and amylolytic enzymatic action already described in previous studies for the studied strains.

### **Acknowledgements**

We thank Edital 79/2013 from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the grant provided for the ecological studies and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for funding of maintenance costs of CRC.

We thank Neusa Hamada and the team from the Laboratory of Cytotaxonomy and Aquatic Insects at Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus – AM, Brasil, for the cooperation in collection and identification of insect larvae. In addition, we also thank Ricardo Harakava and the team at reference Laboratory in Applied Molecular Biology at Instituto Biológico, São Paulo – SP, Brasil, for the molecular identification, amplification and fungal sequencing.

We also thank the Instituto Federal Goiano, campus Rio Verde, Goiás – GO, Brasil, for their collaboration: The Agricultural Microbiology and Technological Chemistry Laboratories for performing the biological assays and the Plant Anatomy Laboratory for performing the microscopy.

## References

- ADEYEMI, N.O., ATAYESE, M.O., DARE, M. and OLUBODE, A. Effects of elevated carbon dioxide on arbuscular mycorrhizal fungi activities and soil microbial properties in soybean (*Glycine max* L. Merrill) rhizosphere. **Acta Fytotechnica et Zootechnica**, vol. 23, no. 3, pp. 109-116, 2020. <http://dx.doi.org/10.15414/afz.2020.23.03.109-116>
- ALVES, D.R., SILVA, W.M.B., SANTOS, D.L., FREIRE, F.C.O., VASCONCELOS, F.R. and MORAIS, S.M. Atividades antioxidante, anticolinesterásica e citotóxica de metabólitos de fungos endofíticos. **Brazilian Journal of Development**, vol. 6, no. 9, pp. 73684-73691, 2020. <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv6n9-721>
- AVESKAMP, M.M., VERKLEY, G.J.M., GRUYTER, J., MURACE, M.A., PERELLÓ, A., WOUDEBERG, J.H.C., GROENEWALD, J.Z. and CROUS, P.W. DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. **Mycologia**, vol. 101, no. 3, pp. 363-382, 2009. <http://dx.doi.org/10.3852/08-199>
- BOMTEMPO, F.V.S., SANTIN, F.M.M., PIMENTA, R.S., OLIVEIRA, D.P. and GUARDA, E.A. Production of cellulases by *Penicillium oxalicum* through solid state fermentation using agroindustrial substrates. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, vol. 39, no. 3, pp. 321-329, 2017. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciobiolsci.v39i3.32384>
- CAI, C., MA, J., HAN, C., JIN, Y., ZHAO, G. and HE, X. Extraction and antioxidant activity of total triterpenoids in the mycelium of a medicinal fungus, *Sanghuangporus sanghuang*. **Scientific Reports**, vol. 9, no. 1, p. 7418, 2019. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-43886-0>
- CAI, L., 2014. Thin layer chromatography. **Current Protocols Essential Laboratory Techniques**, vol. 8, no. 1. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470089941.et0603s08>.
- CAICEDO, N.H., DAVALOS, A.F., PUENTE, P.A., RODRÍGUEZ, A.Y. and CAICEDO, P.A. Antioxidant activity of exo-metabolites produced by *Fusarium oxysporum*: an endophytic fungus isolated from leaves of *Otoba gracilipes*. **Microbiology Open**, vol. 8, no. 10, p. e903, 2019. <http://dx.doi.org/10.1002/mbo3.903>
- CARBONE, I. and KOHN, L.M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, vol. 91, no. 3, pp. 553-556, 1999. <http://dx.doi.org/10.2307/3761358>
- CHRISTIAENS, J.F., FRANCO, L.M., COOLS, T.L., MEESTER, L., MICHIELS, J., WENSELEERS, T., HASSAN, B.A., YAKSI, E. and VERSTREPEN, K.J. The fungal aroma gene ATF1 promotes dispersal of yeast cells through insect vectors. **Cell Reports**, vol. 9, no. 2, pp. 425-432, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.009>
- DAENGSUWAN, W., WONGLOM, P., ARIKIT, S. and SUNPAPAO, A. Morphological and molecular identification of *Neopestalotiopsis clavisporea* causing flower blight on *Anthurium andraeanum* in Thailand. **Horticultural Plant Journal**, vol. 7, no. 6, pp. 573-578, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hpj.2020.10.004>
- DOUGLAS, A.E. Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. **Annual Review of Entomology**, vol. 60, no. 1, pp. 17-34, 2015. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020822>

DOYLE, J.J. and DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, vol. 19, no. 1, pp. 11-15, 1987.

DUTTA, T., SAHOO, R., SENGUPTA, R., RAY, S.S., BHATTACHARJEE, A. and GHOSH, S. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, vol. 35, no. 4, pp. 275-282, 2008. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-008-0304-2>

FERREIRA, M.C., VIEIRA, M.L.A., ZANI, C.L., ALVES, T.M.A., SALES JUNIOR, P.A., MURTA, S.M.F., ROMANHA, A.J., GIL, L.H.V.G., CARVALHO, A.G.O., ZILLI, J.E., VITAL, M.J.S., ROSA, C.A. and ROSA, L.H. Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, vol. 59, pp. 36-44, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2014.12.017>

FREEMAN, S., OTERO-COLINA, G., RODRÍGUEZ-ALVARADO, G., FERNÁNDEZ-PAVÍA, S., MAYMON, M., PLOETZ, R.C., AOKI, T. and O'DONNELL, K. First report of mango malformation disease caused by *Fusarium pseudocircinatum* in Mexico. **Plant Disease**, vol. 98, no. 11, p. 1583, 2014. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-14-0375-PDN>.

FRISVAD, J.C., FILTENBORG, O. and THRANE, U. Analysis and screening for mycotoxins and other secondary metabolites in fungal cultures by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, vol. 18, no. 3, pp. 331-335, 1989. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01062357>. [PMid:2730153](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2730153/).

FUKAMI, J., CEREZINI, P. and HUNGRIA, M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express**, vol. 8, no. 1, p. 73, 2018. <http://dx.doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>. [PMid:29728787](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29728787/).

GERARDO-LUGO, S.S., TOVAR-PEDRAZA, J.M., MAHARACHCHIKUMBURA, S.S.N., APODACA-SÁNCHEZ, M.A., CORREIA, K.C., SAUCEDA-ACOSTA, C.P., CAMACHO-TAPIA, M., HYDE, K.D., MARRAIKI, N., ELGORBAN, A.M. and BELTRÁN-PEÑA, H. Characterization of *Neopestalotiopsis* species associated with mango grey spot disease in Sinaloa, Mexico. **Pathogens**, vol. 9, no. 10, p. 788, 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens9100788>. [PMid:32992887](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32992887/).

HERMAWAN, R., SAFITRI, R.R. and SIDIQ, M.R. *Neopestalotiopsis zimbabweana* isolated from *Xylaria stromata*. **Biotropika Journal of Tropical Biology**, vol. 9, no. 3, pp. 203-209, 2021. <http://dx.doi.org/10.21776/ub.biotropika.2021.009.03.04>

HOLZENTHAL, R.W. and CALOR, A.R. Catalog of the Neotropical Trichoptera (caddisflies). **ZooKeys**, vol. 654, no. 654, pp. 1-566, 2017. <http://dx.doi.org/10.3897/zookeys.654.9516>. [PMid:28331396](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28331396/).

KNOB, A. and CARMONA, E.C. Purification and characterization of two extracellular xylanases from *Penicillium sclerotiorum*: a novel acidophilic xylanase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 162, no. 2, pp. 429-443, 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-009-8731-8>. [PMid:19680819](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19680819/).

LATAEEF, A.A., SEPIAH, M. and BOLHASSAN, M.H. Molecular identification and diversity of *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis* and *Pseudopestalotiopsis* species from four host



plants in Sarawak, Borneo Island (Malaysia). **Journal of Science and Technology**, vol. 10, no. 1, pp. 33-43, 2018.

LEITE, G.F.M., SILVA, F.T.C., NAVARRO, F.K.S.P., REZENDE, R.S. and GONÇALVES JÚNIOR, J.F. Leaf litter input and electrical conductivity may change density of *Phylloicus* sp. (Trichoptera: Calamoceratidae) in a Brazilian savannah stream. **Acta Limnologica Brasiliensia**, vol. 28, p. e12, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S2179-975X1516>

LIANG, J., LI, G., ZHOU, S., ZHAO, M. and CAI, L. Myrothecium-like new species from turfgrasses and associated rhizosphere. **MycoKeys**, vol. 51, pp. 29-53, 2019. <http://dx.doi.org/10.3897/mycokeys.51.31957>. PMID:31239822.

LIM, S.M., AGATONOVIC-KUSTRIN, S., LIM, F.T. and RAMASAMY, K. High-performance thin layer chromatography-based phytochemical and bioactivity characterisation of anticancer endophytic fungal extracts derived from marine plants. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 193, p. 113702, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113702>. PMID:33160220.

MENEZES FILHO, A.C.P., SANTOS, M.C. and CASTRO, C.F.S. Prospecção fitoquímica, físico-química e biológica do extrato hidroetanólico floral de [*Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl.]. **Biológicas & Saúde**, vol. 11, no. 36, pp. 1-25, 2021.

MURCIA, M.A., MARTÍNEZ-TOMÉ, M., JIMÉNEZ, A.M., VERA, A.M., HONRUBIA, M. and PARRAS, P. Antioxidant activity of edible fungi (truffles and mushrooms): losses during industrial processing. **Journal of Food Protection**, vol. 65, no. 10, pp. 1614-1622, 2002. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X-65.10.1614>. PMID:12380748.

NJUS, D., KELLEY, P.M., TU, Y.-J. and SCHLEGEL, H.B. Ascorbic acid: the chemistry underlying its antioxidant properties. **Free Radical Biology & Medicine**, vol. 159, pp. 37-43, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.013>. PMID:32738399.

NODA, H. and KOIZUMI, Y. Sterol biosynthesis by symbiotes: cytochrome P450 sterol C-22 desaturase genes from yeastlike symbiotes of rice planthoppers and anobiid beetles. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, vol. 33, no. 6, pp. 649-658, 2003. [http://dx.doi.org/10.1016/S0965-1748\(03\)00056-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0965-1748(03)00056-0)

O'DONNELL, K., KISTLER, H.C., CIGELNIK, E. and PLOETZ, R.C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 95, no. 5, pp. 2044-2049, 1998. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.5.2044>. PMID:9482835.

OTERO-COLINA, G., RODRÍGUEZ-ALVARADO, G., FERNÁNDEZ-PAVÍA, S., MAYMON, M., PLOETZ, R.C., AOKI, T., O'DONNELL, K. and FREEMAN, S. Identification and characterization of a novel etiological agent of mango malformation disease in Mexico, *Fusarium mexicanum* sp. nov. **Phytopathology**, vol. 100, no. 11, pp. 1176-1184, 2010. <http://dx.doi.org/10.1094/PHTO-01-10-0029>. PMID:20932166.

PARAMBAYIL, N., CHENTHAMARAKSHAN, A. and NAMBISAN, P. Screening of fungi isolated from different regions of Kerala for lignin peroxidase activity. **International Journal of Current Research in Life Sciences**, vol. 7, no. 4, pp. 1723-1728, 2018.

PES, A.M.O., HAMADA, N. and NESSIMIAN, J.L. Chaves de identificação de larvas para famílias e gêneros de trichoptera (Insecta) da Amazônia Central, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, vol. 49, no. 2, pp. 181-204, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S0085-56262005000200002>

PIMENTEL, D.R., COUCEIRO, S.R.M. and SALCEDO, A.K.M. Diet of *Phylloicus* (Trichoptera: Calamoceratidae) caddisfly larvae in forest streams of western Pará, central Brazilian Amazonia. **Acta Limnologica Brasiliensia**, vol. 32, p. e13, 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/s2179-975x0119>

PORNSURIYA, C., CHAIRIN, T., THAOCHAN, N. and SUNPAPAO, A. Identification and characterization of *Neopestalotiopsis* fungi associated with a novel leaf fall disease of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Thailand. **Journal of Phytopathology**, vol. 168, no. 7-8, pp. 416-427, 2020. <http://dx.doi.org/10.1111/jph.12906>.

PRAPTIWI, RAUNSAI, M., WULANSARI, D., FATHONI, A. and AGUSTA, A. Antibacterial and antioxidant activities of endophytic fungi extracts of medicinal plants from Central Sulawesi. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, vol. 8, no. 8, pp. 69-74, 2018.

PRATHER, A.L. **Revision of the Neotropical caddisfly genus *Phylloicus*** (Trichoptera: calamoceratidae). Auckland: Magnolia Press, vol. 275, 214 p, 2003. Zootaxa.

REYES-TORRES, L.J. and RAMÍREZ, A. Life history and phenology of *Phylloicus pulchrus* (Trichoptera: Calamoceratidae) in a tropical rainforest stream of Puerto Rico. **Revista de Biología Tropical**, vol. 66, no. 2, pp. 814-825, 2018. <http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v66i2.33411>

ROJAS, E.I., HERRE, E.A., MEJÍA, L.C., ARNOLD, A.E., CHAVERRI, P. and SAMUELS, G.J. *Endomelanconiopsis*, a new anamorph genus in the Botryosphaeriaceae. **Mycologia**, vol. 100, no. 5, pp. 760-775, 2008. <http://dx.doi.org/10.3852/07-207>. [PMid:18959162](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18959162/).

RUCH, R.J., CHENG, S.-J. and KLAUNING, J.E. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. **Carcinogenesis**, vol. 10, no. 6, pp. 1003-1008, 1989. <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/10.6.1003>. [PMid:2470525](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2470525/).

SANTOS, A.P.M. and NESSIMIAN, J.L. A remarkable new species of *Phylloicus* (Trichoptera: Calamoceratidae) from Central Amazonia, Brazil. **Aquatic Insects**, vol. 32, no. 4, pp. 321-326, 2010. <http://dx.doi.org/10.1080/01650424.2010.508046>

SANTOS, T.T., OLIVEIRA, D.P., CABETTE, H.S.R. and MORAIS, P.B. The digestive tract of *Phylloicus* (Trichoptera: Calamoceratidae) harbours different yeast taxa in Cerrado streams, Brazil. **Symbiosis**, vol. 77, no. 2, pp. 147-160, 2019. <http://dx.doi.org/10.1007/s13199-018-0577-9>

SANTOS, T.T., OLIVEIRA, K.A., VITAL, M.J.S., COUCEIRO, S.R.M. and MORAIS, P.B. Filamentous fungi in the digestive tract of *Phylloicus* larvae (Trichoptera: Calamoceratidae) in streams of the Brazilian Amazon. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais**, vol. 13, no. 3, pp. 317-325, 2018. <http://dx.doi.org/10.46357/bcnaturais.v13i3.340>

SCHMITZ, A. and RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical Biochemistry**, vol. 354, no. 2, pp. 311-313, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2006.03.014>. [PMid:16725102](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16725102/).

SHA, S.P., JANI, K., SHARMA, A., ANUPMA, A., PRADHAN, P., SHOUCHE, Y. and TAMANG, J.P. Analysis of bacterial and fungal communities in Marcha and Thiat, traditionally prepared amylolytic starters of India. **Scientific Reports**, vol. 7, no. 1, p. 10967, 2017. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-11609-y>. [PMid:28887544](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28887544/).

SOUZA-HOLANDA, P.M., PES, A.M. and HAMADA, N. Immature stages of three species and new records of five species of *Phylloicus* Müller (Trichoptera, Calamoceratidae) in the northern region of Brazil. **Zootaxa**, vol. 4851, no. 1, pp. 111-136, 2020. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.4851.1.4>. [PMid:33056739](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33056739/).

STEFANI, F.O.P., KLIMASZEWSKI, J., MORENCY, M.-J., BOURDON, C., LABRIE, P., BLAIS, M., VENIER, L. and SÉGUIN, A. Fungal community composition in the gut of rove beetles (Coleoptera: Staphylinidae) from the Canadian boreal forest reveals possible endosymbiotic interactions for dietary needs. **Fungal Ecology**, vol. 23, pp. 164-171, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2016.05.001>.

SUH, S.-O., MCHUGH, J.V., POLLOCK, D.D. and BLACKWELL, M. The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. **Mycological Research**, vol. 109, no. 3, pp. 261-265, 2005. <http://dx.doi.org/10.1017/S0953756205002388>. [PMid:15912941](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15912941/).

SULFAHRI, MUSHLIHAH, S., HUSAIN, D.R., LANGFORD, A. and TASSAKKA, A.C.M.A.R. Fungal pretreatment as a sustainable and low cost option for bioethanol production from marine algae. **Journal of Cleaner Production**, vol. 265, p. 121763, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121763>.

SUN, Z.-H., LI, H.-H., LIANG, F.-L., CHEN, Y.-C., LIU, H.-X., LI, S.-L., TAN, G.-H. and ZHANG, W.-M., Two new secondary metabolites from the endophytic fungus *Endomelanconiopsis endophytica*. **Molecules**, vol. 21, no. 7, p. 943, 2016b. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules21070943>. [PMid:27447605](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27447605/).

SUN, Z.-H., LIANG, F.-L., CHEN, Y.-C., LIU, H.-X., LI, H.-H. and ZHANG, W.-M. Two new xyloketal from the endophytic fungus *Endomelanconiopsis endophytica* derived from medicinal plant *Ficus hirta*. **Journal of Asian Natural Products Research**, vol. 18, no. 11, pp. 1036-1041, 2016a. <http://dx.doi.org/10.1080/10286020.2016.1188084>. [PMid:27244040](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27244040/).

TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A. and KUMAR, S. MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, vol. 30, no. 12, pp. 2725-2729, 2013. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>. [PMid:24132122](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24132122/).

TEGTMEIER, D., RIESE, C., GEISSINGER, O., RADEK, R. and BRUNE, A. *Breznakia blatticola* gen. nov. sp. nov. and *Breznakia pachnodae* sp. nov., two fermenting bacteria isolated from insect guts, and emended description of the family Erysipelotrichaceae. **Systematic and Applied Microbiology**, vol. 39, no. 5, pp. 319-329, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2016.05.003>. [PMid:27270136](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27270136/).

VERKLEY, G.J.M., DUKIK, K., RENFURM, R., GÖKER, M. and STIELOW, J.B. Novel genera and species of coniothyrium-like fungi in Montagnulaceae (Ascomycota). **Persoonia**,

vol. 32, no. 1, pp. 25-51, 2014. <http://dx.doi.org/10.3767/003158514X679191.PMid:25264382>.

VIETO, S., ESCUDERO-LEYVA, E., AVENDAÑO, R., RECHNITZER, N., BARRANTES-MADRIGAL, M.D., CONEJO-BARBOZA, G., HERRERA-SANCHO, O.A., CHAVERRI, P. and CHAVARRÍA, M. Biodeterioration and cellulolytic activity by fungi isolated from a nineteenth-century painting at the National Theatre of Costa Rica. **Fungal Biology**, vol. 126, no. 2, pp. 101-112, 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2021.11.001>

VILGALYS, R. and HESTER, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. **Journal of Bacteriology**, vol. 172, no. 8, pp. 4238-4246, 1990. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.172.8.4238-4246.1990>

YADAV, M., YADAV, A. and YADAV, J.P. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolan* Lam. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, vol. 7, suppl. 1, pp. S256-S262, 2014. [http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60242-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60242-X)

YANG, J., HUANG, Y., XU, H., GU, D., XU, F., TANG, J., FANG, C. and YANG, Y. Optimization of fungi co-fermentation for improving anthraquinone contents and antioxidant activity using artificial neural networks. **Food Chemistry**, vol. 313, p. 126138, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126138>

ZENG, G.M., SHI, J.-G., YUAN, X.-Z., LIU, J., ZHANG, Z.-B., HUANG, G.-H., LI, J.-B., XI, B.-D. and LIU, H.-L. Effects of Tween 80 and rhamnolipid on the extracellular enzymes of *Penicillium simplicissimum* isolated from compost. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 39, no. 7, pp. 1451-1456, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.03.035>.

ZHOU, X. **Study on extraction and antioxidation of triterpenoids from *Ganoderma lucidum***. 2015. Master's degree thesis - University of Technology, Jinan: Qilu,. 2015.

## CAPÍTULO II

### Fungal amylases applied to the sweet potato starch for bioethanol production

Amilases fúngicas aplicadas em fécula de batata-doce para produção de bioetanol

Amilasas fúngicas aplicadas al almidón de batata para la producción de bioetanol

Received: 07/06/2022 | Reviewed: 07/15/2022 | Accept: 07/17/2022 | Published: 07/25/2022

#### **Tiago Carnevalle Romão**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2821-779X>  
Instituto Federal Goiano, Rio Verde-GO, Brasil  
e-mail: [tiago.romao@ifgoiano.edu.br](mailto:tiago.romao@ifgoiano.edu.br)

#### **Antonio Carlos Pereira de Menezes Filho**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3443-4205>  
Instituto Federal Goiano, Rio Verde-GO, Brasil  
e-mail: [astronomoamadorgoias@gmail.com](mailto:astronomoamadorgoias@gmail.com)

#### **Aristeu Gomes Tininis**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1731-7149>  
Instituto Federal de São Paulo, Matão-SP, Brasil  
aristeu@ifsp.edu.br

#### **Marilene Silva Oliveira**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5801-2288>  
Instituto Federal Goiano, Rio Verde-GO, Brasil  
e-mail: [marilenes36@gmail.com](mailto:marilenes36@gmail.com)

#### **Lidiane Gaspareto Felipe**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3797-3677>  
Universidade Estadual Paulista, Araraquara-SP, Brasil  
e-mail: [lidiane.felippe@unesp.br](mailto:lidiane.felippe@unesp.br)

#### **Carlos Frederico de Souza Castro**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9273-7266>  
Instituto Federal Goiano, Rio Verde-GO, Brasil  
e-mail: [carlos.castro@ifgoiano.edu.br](mailto:carlos.castro@ifgoiano.edu.br)

#### **Paula Benevides de Moraes**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5050-5766>  
Universidade Federal do Tocantins, Palmas-TO, Brasil  
e-mail: [moraisspb@mail.uft.edu.br](mailto:moraisspb@mail.uft.edu.br)

### **Abstract**

Bioethanol is a sustainable energy source to help reducing the emission of pollutants into the global environment. In order to cope with that, the ethanol production technologies and use of efficient and low-cost substrates are developed. The objective of this research was to evaluate fungal amylases in sweet potato starch for bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in the laboratory. *Endomelanconiopsis endophytica* (1.40 U/mL), *Neopestalotiopsis cubana* (1.67 U/mL) and *Fusarium pseudocircinatum* (1.11 U/mL) with high enzymatic activities were selected and their amylases were tested for activity on sweet potato starch for bioethanol production. Simultaneous saccharification and fermentation was performed at 30° C and pH = 5.0. 17.3 - 88.1 (%) of bioethanol that was produced and compared to the expected theoretical yield. Therefore, amylases from these fungi simultaneously inserted on sweet potato starch and *S. cerevisiae* are potentially useful for bioethanol production.

**Keywords:** Amylases; Sweet potato; Bioethanol production; *E. endophytica*; *N. cubana*; *F. pseudocircinatum*.

### Resumo

O bioetanol é uma fonte energética sustentável para auxiliar a redução de emissão de poluentes no meio ambiente global. Para isso, tecnologias de produção de etanol e uso de substratos eficientes e de baixos custos são desenvolvidos. O objetivo desta pesquisa foi avaliar amilases fúngicas em fécula de batata-doce para produção de bioetanol pela *Saccharomyces cerevisiae* em laboratório. *Endomelanconiopsis endophytica* (1,40 U/mL), *Neopestalotiopsis cubana* (1,67 U/mL) e *Fusarium pseudocircinatum* (1,11 U/mL) com altas atividades enzimáticas foram selecionadas e suas amilases foram testadas para atividade em fécula de batata-doce para produção de bioetanol. A sacarificação e fermentação simultâneas foram realizadas a temperatura de 30 °C e pH = 5,0. 17,3 - 88,1 (%) de bioetanol foram produzidos em relação ao rendimento teórico esperado. Portanto, as amilases desses fungos inseridas simultaneamente sobre a fécula da batata-doce e *S. cerevisiae* são potencialmente úteis para a produção de bioetanol.

**Palavras-chave:** Amilases; Batata-doce; Produção de bioetanol; *E. endophytica*; *N. cubana*; *F. pseudocircinatum*.

### Resumen

El bioetanol es una fuente de energía sostenible que contribuye a reducir las emisiones contaminantes en el medio ambiente. Para ello, se desarrollan tecnologías para la producción de etanol y el uso de sustratos eficientes y de bajo coste. El objetivo de esta investigación fue evaluar las amilasas fúngicas en el almidón de batata para la producción de bioetanol por *Saccharomyces cerevisiae* en laboratorio. Se seleccionaron *Endomelanconiopsis endophytica* (1,40 U/mL), *Neopestalotiopsis cubana* (1,67 U/mL) y *Fusarium pseudocircinatum* (1,11 U/mL) con actividades enzimáticas altas y se probaron sus amilasas asociadas al almidón de batata para la producción de bioetanol. La sacarificación y la fermentación simultáneas se realizaron a 30° C y pH = 5,0. Se produjo un 17,3 - 88,1 (%) de bioetanol, en comparación con el rendimiento esperado. Por lo tanto, las amilasas de estos hongos insertadas simultáneamente en el almidón de la batata y en *S. cerevisiae* son potencialmente útiles para la producción de bioetanol.

**Palabras clave:** Amilasas; Batata; Producción de bioetanol; *E. endophytica*; *N. cubana*; *F. pseudocircinatum*.

## 1. Introduction

In the future, non-renewable energy sources such as crude oil and its derivatives, natural gas and coal, which together account for 81.1% of the world's energy demand (International Energy Agency, 2021) will be of little use. Thus, the global community aims to reduce the dependence on fossil fuels and to find sustainable forms of energy, such as biofuels (Aditiya et al., 2016).

In Brazil, the contribution of renewable energy matrices is among the largest in the world (48.4%), with 33.1% coming from biomass (Ministério das Minas e Energia, 2021). In 2020, the sectors that presented the highest use of renewable sources were industry and transportation. The industrial sector presented renewability of 63% of its energy matrix. The fraction of renewable energy used in Brazilian transportation is currently 25%, with ethanol accounting for about 19.3% of fuel consumption (Ministério das Minas e Energia, 2021).

These indices, which place Brasil in a prominent position on the world scene in the use of biomass as an alternative energy matrix with the use of fossil fuels, justify the need to seek the commercial use of bioproducts derived from plant material which are rich in carbohydrates for the production of biofuels. The Brazilian technology for producing bioethanol from sugarcane is one of the most successful and efficient worldwide. It's uses low-cost substrates, such as lignocellulosic material, which results in more competitive biofuels (Gonçalves et al., 2013). Second generation ethanol is derived from cellulosic or starchy biomass, rich in carbohydrates that can be hydrolyzed into glucose (Machado & Abreu, 2006), and it represents attractive renewable energy sources that can contribute widely to the implementation of sustainable and less polluting use of energy matrices.

In China, sweet potato (*Ipomea batatas* L.) was chosen as the main vegetable for bioethanol production, since the country produces about 92 million tons, i.e., more than 58% of the world's production. Asia with 66% of this total, followed by Africa (28.3%) and the Americas (4.6%). Brazil ranks 16th among the largest producers of sweet potato, with 805,4 tons (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária [Embrapa], 2021).

In this context, among biofuels, bioethanol is one of the sustainable alternatives for the global environmental issue. Besides being environmentally friendly, it can replace gasoline (Gronchi et al, 2019). Aiming to produce bioethanol on a laboratory or industrial scale, starch (dry) or even fresh sweet potato can be used by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) by *Saccharomyces cerevisiae*, however, this yeast is not able to degrade starch, so it is necessary to add enzymes wich are capable to hydrolyze starch in order to use this carbon source (Zhang et al., 2011).

Microorganisms producing  $\alpha$ -amylases are desirable sources and of a wide interest because these enzymes exhibit structural and functional stability (Kumar et al., 2016). Among different microbial organisms, such as fungi and bacteria, few are capable of producing  $\alpha$ -amylases, e.g., *Lipomyces konenkae*, *Streptomyces bovis*, and glucoamylases, e.g., *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus awamori*, and *Aspergillus tubingensis*, as well as they are efficient in degrading starch (Favaro et al., 2015). Among the micro-organisms, fungi are the most responsive to industrial demands (Beltagy et al., 2022).

Amylases are hydrolases that catalyze the hydrolysis of starch synergistically, producing dextrans and other smaller polysaccharides (Van Der Maarel et al., 2002). Thus,  $\alpha$ -amylase hydrolyzes internal  $\alpha$ -1,4 bonds of the polymer producing linear or branched oligosaccharides. In turn,  $\beta$ -amylases, glucoamylases break  $\alpha$ -1,4 or  $\alpha$ -1,6 bonds of non-reducing terminals of the amylose and the amylopectin chain; and de-ramifying enzymes

hydrolyze  $\alpha$ -1,6 bonds in the branches of the polysaccharide (Astolfi, 2019). Enzymatic hydrolysis of starch receives attention by researchers and the biofuels industry, as they can reduce energy consumption and simplify production (Favaro et al., 2015)

In this context, in order to produce ethanol at the laboratory, in a pilot or industrial scale from sweet potato, starch (dry) or even fresh sweet potato can be used by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) by *Saccharomyces cerevisiae* (Zhang et al., 2011). SSF is an operational process that, in a single step, combines saccharification and fermentation. In this assay, glucose monomers released by enzymatic hydrolysis of starch or lignocellulosic residues are rapidly converted into ethanol (Souza Filho et al., 2016; Schweinberger et al, 2016; Schweinberger, 2016). However, there are difficulties in optimizing the temperature and pH parameters for enzymes and microorganisms concomitantly (Schweinberger, 2016).

Aiming to try to circumvent these possible problems and to study the biotechnological potential of amylases from fungi in the digestive tract of plant material fragmenting insects, we tested three fungal strains: *Endomelanconiopsis endophytica*, *Neopestalotiopsis cubana* and *Fusarium pseudocircinatum* that produced the highest levels of amylases with potential to saccharify raw sweet potato starch. Thus, portions of raw starch were treated with enzymes from each of the selected fungi and *Saccharomyces cerevisiae* for efficient bioethanol production.

## 2. Methodology

### 2.1 Fungal selection

Thirty-six fungi from the Carlos Rosa Collection (CRC) of the Universidade Federal do Tocantins, Palmas-TO, Brasil, were evaluated for their potential to produce amylases. The three strains with higher amyolytic enzyme activity were selected and tested for bioethanol production.

### 2.2 Growth media

The selected fungi were reactivated in Petri plates containing microbiological medium Merck® potato-dextrose agar (PDA) prepared at 1% (w/v) concentration. The fungi were then incubated in biochemical oxygen demand (BOD) - TECNAL 371 adjusted at 26 °C for up to 10 days for growth. Subsequently, a disk of each fungal isolate, approximately 1 cm in diameter, was transferred to a 25 mL flask containing 3% malt extract solution on a rotary shaker (100 rpm) for 3 days at room temperature for mycelium growth, and then small aliquots of mycelium were stored in Eppendorf tubes (1.5 mL) and frozen at -20° C.



### 2.3 Fungal enzymatic biosynthesis

A mineral solution following that proposed by Papanikolaou and Aggelis, (2002) was prepared and enriched with sweet potato starch 1% (w/v). A disc of approximately 1 cm diameter was taken from the cultured microbiological medium (PDA) of each strain and inoculated into Erlenmeyer flasks (125 mL) containing enriched mineral solution. Then, the flasks were placed under agitation on SL-180/DT SOLAB® shaker table (100 rpm) for 5 days for biosynthesis of amylolytic enzyme extract. In this study, the amylolytic enzyme activity and characterization assays were performed in triplicate.

### 2.4 Amylolytic enzyme assay

The amylolytic enzymatic extracts of each strain were submitted to the enzymatic activity assay, proposed by Ghose, (1987) adapted, to choose three fungal strains with higher amylolytic enzymatic activities.

The amylolytic activities were determined by mixing 0.5 mL of amylases from each fungal strain with 0.5 mL of 1% (w/v) substrate solution (0.5 g of sweet potato starch mixed to 50 mL citrate buffer pH= 4.8). Then the solution was heated in a water bath at 50 °C for 30 min. The amount of reducing sugar released was measured using 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) reagent (Miller, 1959). The potential (volumetric) amylolytic enzyme activity was calculated as micromol per min ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ ) of reducing sugar in the enzyme solution (U/mL) according to equation 1 (Ghose, 1987).

$$[\textit{Activity}](U/mL) = [\textit{glucose}](mg/mL) 0,37 \quad \text{Eq. 1}$$

Where: 0.37= estimated glucose content released upon hydrolysis of 1 U.

Total protein concentration was determined by the ultraviolet absorbance assay (Layne, 1957; Aitken & Learmonth, 2001).

Equation 2 (Layne, 1957) for determining approximate total protein concentration using ultraviolet absorbance is as follows:

$$[\textit{protein}](mg/mL) = (A_{280}) 1,55 - (A_{260}) 0,76 \quad \text{Eq 2}$$

### 2.5 Strain identity

Mycelium samples from the 3 strains with best amylolytic enzyme activity were sent for molecular identification, amplification, and gene sequencing to the laboratory of Applied Molecular Biology at Instituto Biológico, São Paulo-SP, Brasil (Romão et al., 2024).

### 2.6 Sweet potato starch

The sweet potato starch was obtained by donation of a sealed 400 g package with nutritional label stating 85% starch, by a local merchant.

## 2.7 Enzyme characterization - pH and thermal stability

Portions of sweet potato starch were added to flasks containing citrate buffer at pH= 4.0; 4.5; 5.0; 5.5; 6.0; 6.5 to form 1% (w/v) substrate solutions. Then 0.5 mL of amylases from each of the fungi were added separately to 0.5 mL of substrate solution at each pH and the release of reducing sugars (Miller, 1959) was quantified at each pH for determination of amylolytic activity as a function of pH.

Thermal stability of the amylases was verified by standardized assay of enzyme activity at temperatures ranging from 20 °C to 90 °C. Samples (50 mL) of enzyme solution were incubated in an ultrathermostatic bath (SL 152 SOLAB®) for 1 hour (h) at temperatures of 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 and 90 °C, and aliquots (0.5 mL) were taken at each temperature to measure the amylolytic enzymatic activity as previously described according to Ghose (1987) and adapted from it.

## 2.8 Simultaneous saccharification fermentation assay

Triplicate solutions at 1% (w/v) were produced by mixing 0.5 g of sweet potato starch added to 50 mL of amylolytic solution in citrate buffer (pH = 5.0) from each of the three fungal strains and 0.5 g of FERME<sup>®</sup> *Saccharomyces cerevisiae* pellets, used in ethanol production industries, to perform the simultaneous saccharification and fermentation (SSF) assay. The bioreactors - Erlenmeyer flasks (125 mL) - were sealed with cotton stoppers and then incubated in an ultrathin bath (SL 152 SOLAB®) adjusted to 30°C for 48 hours (h).

The standardized assay to verify SSF and consequent potential bioethanol production was performed by withdrawing 1 mL aliquots from samples incubated at the following time intervals (t): 0, 1, 2, 4, 6, 12, 24, and 48 h. Then, verifying reducing sugars (Miller, 1959).

## 2.9 Determination of ethanol concentration

Triplicate aliquots (1 mL) of SSF solution from each sample were withdrawn at each time interval (t) and placed in Eppendorf tubes (1.5 mL), then frozen at (-20 °C) and sent to Instituto Federal de São Paulo, Matão, São Paulo, Brasil, for quantification of ethanol in Trace GC Ultra Thermo Scientific gas chromatography equipment with FID detector and TRIPLUS Headspace automatic injector, Agilent DB-5 column (30 mm 30.25 mm).

The assay was performed by injecting 1 µL of the sample, keeping the column at 35 °C for 7 minutes. Then a heating ramp of 15 °C/min was performed until 220° C was reached, and it was kept at 220° C for 1 minute. The injector temperature was maintained at 250 °C. After the gas chromatographic assay, the concentrations (% v/v) of bioethanol were determined using the standard calibration curve equation.

## 2.10 Statistical analysis and calculation

The results obtained were expressed as means and standard deviation, and the bioethanol means were compared by Tukey's test at 95% confidence level ( $p < 0.05$ ).

## 3. Results and Discussion

### 3.1 Fungi identification

The filamentous fungi identified and analyzed in this study are: *Endomelanconiopsis endophytica*, *Neopestalotiopsis cubana* and *Fusarium pseudocircinatum*. The molecular sequences and morphological structures were described by Romão et al. (2024).

Using the Web of Science™ and PubMed® databases, as well as using as keywords "fungal name" and "amylases" and "bioethanol", no scientific articles were found in the last 5 years that reported application of the fungi selected in this study for bioethanol production, which highlights the originality of this study.

However, studies reporting phytopathogenic action of the fungi *E. endophytica* (Douanla-Meli & Scharnhorst, 2021), *N. cubana* (Li, Li, & Yang, 2021), and *F. pseudocircinatum* (Santillán-Mendoza et al., 2018; Kee, Zakaria, & Mohd, 2020) were found. Furthermore, Ferreira et al. (2016) studied association of *E. endophytica* in medicinal plant from Amazon region with production of bioactive compounds against amastigotes forms of *Trypanosoma cruzi*.

### 3.2 Activity enzyme

The fungi *E. endophytica*, *N. cubana* and *F. pseudocircinatum* showed 1.40; 1.67 and 1.11 U/ mL as the best averages of amylolytic enzyme activity under the conditions of the present study, T= 50° C and pH= 4.8 (Ghose, 1987), respectively. However, Beltagy, Abouelwafa, & Barakat (2022), studying  $\alpha$ -amylases purified from *Aspergillus flavus*, observed amylolytic activities at T= 50° C (71.5 U/mL) and pH= 6.0 (65.17 U/mL)

Silva Santiago et al. (2022) when studying enzymatic activity of CMCases found that *F. pseudocircinatum* showed peak enzymatic activity of 0.309 U/mL. However, Aguiar (2017) and Almeida (2015) analyzed the amylase activity from filamentous fungi and they verified that the highest amylolytic activities were of *Aspergillus niger* (1.09 U/mL) and *Aspergillus brasiliensis* (3.8 U/mL), respectively.

The average amylolytic activity (U/mL), estimated total protein content (mg/mL), and average specific activity (U/mg) are described in Table 1.

**Table 1.** Enzyme activity, total protein content and specific activity of fungi.

Fungi	Activity (U/mL)	Proteins (mg/mL)	Specific activity (U/mg)
<i>E. endophytica</i>	1.40 ± 0.145	0.828	1.69 ± 0.175
<i>N. cubana</i>	1.67 ± 0.016	0.894	1.90 ± 0.018
<i>F. pseudocircinatum</i>	1.11 ± 0.037	0.865	1.28 ± 0.043

Source: Authors.

### 3.3 Temperature and pH

The influence of temperature and pH are determining factors in the enzymatic activity and, in effect, influence the release of glucose molecules useful for bioethanol production. Our study presented as optimal temperature (T) and pH points, respectively, T= 50° C (Figure 1) and pH= 5.0 (Figure 2).

We observed that at 60° C, the enzymatic activities remained between 48% and 60% of the maximum enzymatic activities and more than double the activity at the initial T (20° C). However, after 60° C there is a progressive loss of fungal enzymatic activities, *i.e.*, the losses of amylolytic activities (LAA), in relation to the activities at initial T, reach, 62.9%, 74.8%, and 51.8% at 90° C, as described in Table 2.

We further note, that small variations around the optimum pH value cause reduction or loss of amylolytic enzyme function (Figure. 2).

**Table 2.** Enzymatic activity (U/mL) as a function of temperature and loss of amylolytic activity.

Amylase/Fungi	20° C	30° C	40° C	50° C	60° C	70° C	80° C	90° C	LAA (%)
<i>E. endophytica</i>	0.332	0.385	0.578	1.500	0.724	0.466	0.280	0.123	62.9
<i>N. cubana</i>	0.354	0.592	0.706	1.603	0.975	0.620	0.252	0.089	74.8
<i>F. pseudocircinatum</i>	0.243	0.367	0.460	0.957	0.592	0.326	0.218	0.117	51.8

Note. LAA - relative loss of amylolytic activity by temperature variation 20 - 90° C.

Source: Authors.

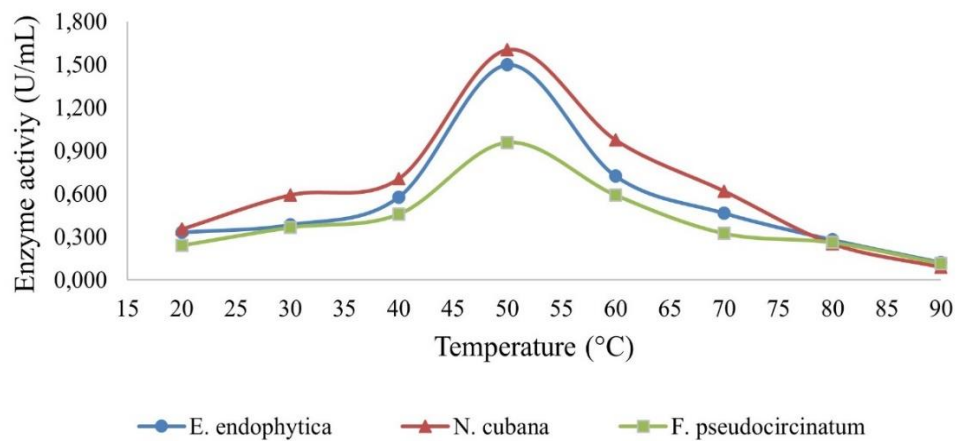
Beltagy et al. (2022) showed that  $\alpha$ -amylases expressed from *Aspergillus flavus* fungi had thermal stability at 50 °C where they still maintained about 96.1 % of the initial activity, and at temperatures of 60°C and 70 °C the  $\alpha$ -amylases still maintained more than 51.2 % of the initial activity.

Silva et al. (2018) when analyzing the thermal stability and pH of enzymes from *Trichoderma reesei* observed that temperatures around 55 °C and pH= 2 - 11 showed higher enzyme activities, but at temperatures above 60 °C the enzyme activity is strongly reduced, indicating thermal degradation of the enzymes. Marco et al. (2015) studied the characterization of the thermostability of  $\beta$ -mannanase from *Aspergillus foetidus* and

determined the optimal temperature and pH, respectively, 60° C and pH variable between 3.0 - 9.0.

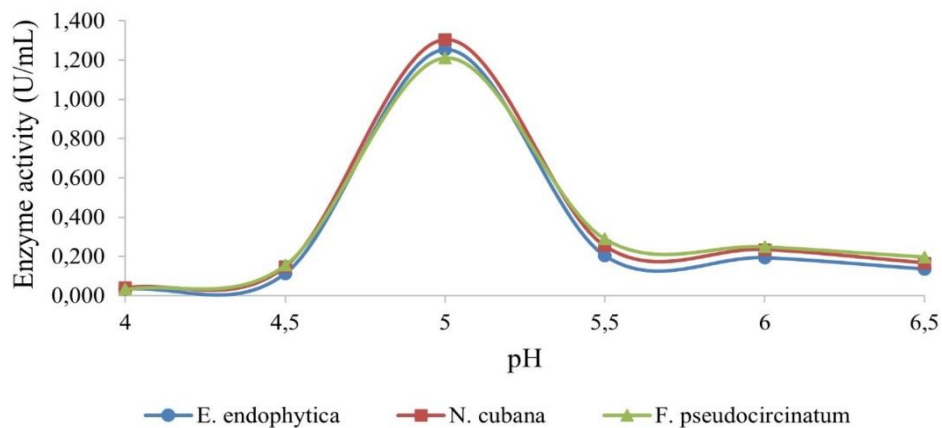
We found in our study that the combination of temperature 50 °C and pH = 5.0 showed the maximum for amyolytic enzyme activity and therefore favor the release of glucose in the bioreactor medium in SSF. Figures 1 and 2 show the behavior of the enzymatic activity of each fungus as a function of T and pH, respectively.

**Figure 1.** Optimal temperature as a function of amyolytic activity.



Note. peak enzyme activity: *E. endophytica* = 1.5, *N. cubana* = 1.6, e *F. pseudocircinatum* = 0.96.  
Source: Authors.

**Figure 2.** Optimum pH as a function of amyolytic activity.

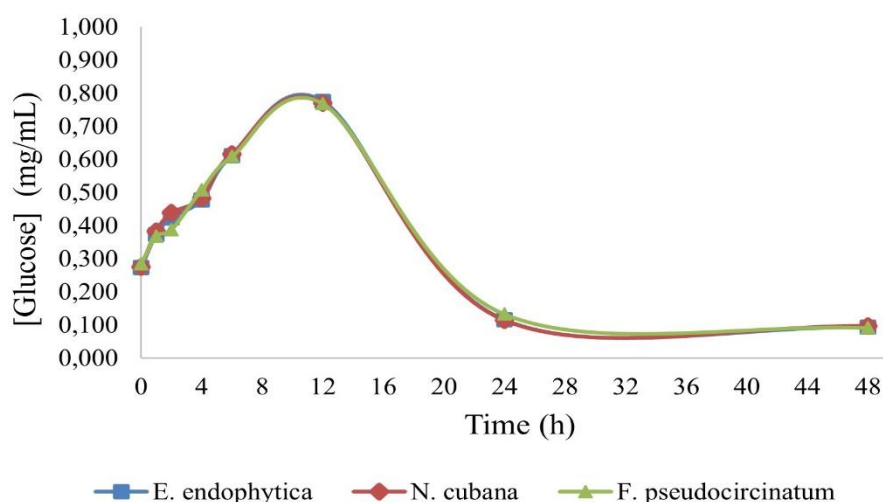


Note. peak enzyme activity: *E. endophytica* = 1.25, *N. cubana* = 1.3, e *F. pseudocircinatum* = 1.21.  
Source: Authors.

### 3.4 Bioethanol production

For SSF and thus bioethanol production, the temperature was kept at 30 °C for optimization of fermentation by *S. cerevisiae* as performed by Gronchi et al. (2019) and pH= 5.0 in the fermentation bioreactors. However, Zhang et al (2013) adjusted in the bioreactors pH= 4.0 and temperature at 30 °C for SSF assay for ethanol production from sweet potato root. Figure 3 shows the average determined concentration (mg/mL) of glucose throughout the SSF process.

**Figure 3.** Average concentration (mg/mL) of glucose released in SSF.



Note. [glucose] (12 h): *E. endophytica* = 0.768; *N. cubana* = 0.770; *F. pseudocircinatum* = 0.775.  
Source: Authors.

As seen in Table 3, the bioethanol production yield of the fermented samples analyzed within 48 h bring the the samples analyzed in this study showing yields of 17.3 - 88.1 (%) of the expected theoretical yield (4.125 g/g glucose/L), with the sample (*F. pseudocircinatum*) having the highest recorded yield, *i.e.*, 3.635 g/g glucose/L.

**Tabela 3.** Average concentrations and yields in bioethanol production (48 h).

Sample/fungi	Concentration (% v/v)	Actual yield (%)	Actual yield (g/g glucose/L)
<i>E. endophytica</i>	0.077	17.3	0.715
<i>N. cubana</i>	0.140	31.5	1.300
<i>F. pseudocircinatum</i>	0.392	88.1	3.635

Source: Authors.

Beltagy et al. (2022) produced bioethanol from free amylases from *Aspergillus flavus* and *S. cerevisiae* incubated simultaneously, whose actual yield achieved was 0.07 g/ g sugar/L. However, amylases from *Fusarium oxyparum* were used on starch-rich foods for

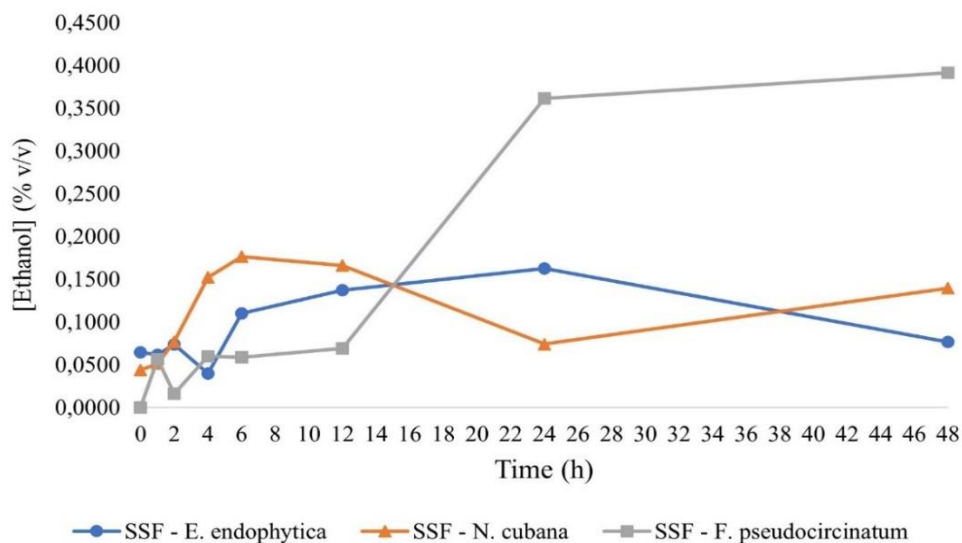
conversion into bioethanol with the help of *S. cerevisiae* and thus yield of 20.6 g/L performed in SSF (Prasoulas et al., 2020).

Furthermore, using factorial strategy to evaluate bioethanol production from *Solanum lycicarpum* fruit starch and *Saccharomyces bayanus* yeast, Morais et al. (2019) obtained the highest bioethanol production when 1 % glucose equivalent was fermented in 48 h. Under these conditions the production yield was 92.13 %.

Using optimized cultivation factors for *Candida albicans*, the conversion rate of sweet potato starch to bioethanol was 0.426 g/g, and of potato starch was 0.437 g/g (73 %) (Aruna et al., 2014). However, Zhang et al. (2013) produced ethanol from sweet potato starch incubated simultaneously with *A. niger* and *Zymomonas mobilis* yeast and then obtained from 14.4 g ethanol/100 g starch, *i.e.*, 87% of the theoretical yield.

The maximum ethanol concentrations determined from the samples analyzed during 48 h were: 0.163 (24 h; *E. endophytica*), 0.177 (6h; *N. cubana*), and 0.392 (48; *F. pseudocircinatum*) (% v/v), as presented in Figure 4.

**Figure 4.** Ethanol concentrations determined over 48 hours.



Note. [ethanol] (% v/v): *E. endophytica*; *N. cubana*, e *F. pseudocircinatum* = 0.137, 0.166, e 0.069 (12h); 0.163, 0.74, e 0.362 (24 h), e 0.77, 0.140, e 0.392 (48 h).

Source: Authors.

The lower concentrations of ethanol up to 12h of the samples (SSF - *F. pseudocircinatum*) may be due to the possible interference of other proteins in the bioreactor medium that delayed the amylytic action on starch and, therefore, the release of oligosaccharides and glucose; or by the inhibitory action of proteins on the fermentative metabolism of yeast *S. cerevisiae*. However, after overcoming these possible influences, an increasing increase in ethanol concentration was achieved up to 48 h.

The fungi *N. cubana* and *E. endophytica* showed similar amylolytic activities. However, it is verified that possible interferences previously commented, had little influence in the sample (SSF - *N. cubana*) until 6 h, because it may have occurred synergistic action of amylases that released glucose and then facilitated the fermentation by the yeast. Then, there is a reduction in ethanol concentrations possibly due to the rapid degradation of amylases or other chemical compounds that hindered the conversion of glucose into ethanol by the yeast

The samples (SSF - *E. endophytica*), in turn, presented lower variations in ethanol concentration during 48 h, which possibly demonstrates a stable amylolytic enzymatic action, therefore maintaining the fermentative process during this period. There was no statistically significant difference in bioethanol concentrations of the fungi in 48 hours, by Tukey test at 95% confidence level.

#### **4. Conclusion**

The amylases from the fungi *Endomelanconiopsis endophytica*, *Neopestalotiopsis cubana* and *Fusarium pseudocircinatum* are moderately tolerant to temperature variations and poorly tolerant to pH variations. However, this research showed that fungal amylases applied simultaneously with industrial *S. cerevisiae* on sweet potato starch showed performance in SSF and thus are potentially useful for ethanol production, as good yields could be obtained.

Further studies should be performed to evaluate other conditions as well as starch-rich substrates. It is suggested to perform enzyme purification studies and associate fermentative yeasts as well as thermophilic microorganisms simultaneously, or studies of immobilization of different amylases applied to SSF and comparative analysis of costs and energy yields in different conditions of fermentative processes for bioethanol production.

#### **Acknowledgements**

We thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the grant provided to support biotechnological research, and also Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the funding of maintenance costs of CRC. We are also grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) and Fundação de Apoio Científico e Tecnológico do Tocantins (FAPTO) for the research support.

We are grateful to Instituto Federal Goiano, *campus* Rio Verde, Brasil, for the support and for providing the Agricultural Microbiology and Technological Chemistry Laboratories and the Multi-User Analysis Center to perform the necessary assays. We are also grateful to



the Analytical Chemistry Laboratory of the Instituto Federal de São Paulo, *campus* Matão, for the support in the assay performed.

We thank the Environmental Microbiology and Biotechnology Laboratory of the Universidade Federal do Tocantins (UFT) and also the post-graduate program in Biotechnology and Biodiversity of the Rede BIONORTE for all the support for this work.

## References

- Aditiya, H. B., Mahlia, T.M.I., Chong, W. T., Nur, H., & Sebayang, A. H. (2016). Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 631–653. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.015>
- Aguiar Neto Filho, M. (2017). *Bioprospecção de fungos amilolíticos para produção de etanol*. [Unpublished master's dissertation, Instituto Federal Goiano].
- Aitken, A.; Learnmoth, M.P. (2002). Protein determination by UV absorption. In: Walker, J.M. (Ed.), *The protein protocols handbook* (2nd ed., pp. 3-6). Totowa: Human Presse Inc. <https://doi.org/10.1385/1-59259-169-8:3>
- Almeida, P. Z. (2015). *Diversidade do potencial amilolítico em fungos filamentosos: purificação e caracterização de uma glucoamilase de Aspergillus brasiliensis*. [Master's dissertation, Universidade de São Paulo]. <http://www.teses.usp>. <https://doi:10.11606/D.59.2015.tde-15052015-085904>
- Aruna, A., Nagavalli, M., Girijashankar, V., Ponamgi, S. P. D., Swathisree, V., & Rao, L.V. (2014). Direct bioethanol production by amylolytic yeast *Candida albicans*. *Letters in Applied Microbiology*, 60, 229–236. <https://doi.org/10.1111/lam.12348>
- Astolfi, A. L. (2019). *Sacarificação e fermentação simultânea de biomassa de alga e amido e uso de resíduo do processo de fermentação para obtenção de biopetíteo*. [Master's dissertation, Universidade de Passo Fundo]. <http://tede.upf.br/jspui/handle/tede/1796>
- Beltagy, E. A., Abouelwafa, A., & Barakat, K. M. (2022). Bioethanol production from immobilized amylase produced by marine *Aspergillus flavus* AUMC10636. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2022.02.003>
- Douanla-Meli, C., & Scharnhorst, A. (2021). Palm Foliage as Pathways of Pathogenic Botryosphaeriaceae Fungi and Host of New *Lasiodiplodia* Species from Mexico. *Pathogens*, 10(10), 1297. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101297>
- Favaro, L., Viktor, M. J., Rose, S. H., Viljoen-Bloom, M., ... & Casella, S. (2015). Consolidated bioprocessing of starchy substrates into ethanol by industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains secreting fungal amylases. *Biotechnology and bioengineering*, 112(9), 1751-1760. <https://doi.org/10.1002/bit.25591>
- Ferreira, M. C., Vieira, M. L. A., Zani, C. L., Alves, T. M. A., Sales Junior, P. A., Murta, S. M., ... & Rosa, L. H. (2016). Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (*Meliaceae*). *Biochemical Systematics and Ecology*, 59, 36-44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2014.12.017>
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of Cellulase Activities. *Pure & Applied Chemistry*., 59(2), 257-268. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>
- Gonçalves, D. B., Batista, A. F., Rodrigues, M. Q. R. B., Nogueira, K. M. V., & Santos, V. L. (2013). Ethanol production from macaúba (*Acrocomia aculeata*) presscake hemicellulosic hydrolysate by *Candida boidinii* UFMG14. *Bioresource. Technology*, 146, 261–266. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.075>

Gronchi, N., Favaro, L., Cagnin, L., Brojanigo, S., Pizzocchero, V., Basaglia, M., & Casella, S. (2019). Novel yeast strains for the efficient saccharification and fermentation of starchy by-products to bioethanol. *Energies*, 12(4), 714. <https://doi.org/10.3390/en12040714>

International Energy Agency. (2021). *World Energy Balances: Overview*. <https://www.iea.org/reports/world-energy-balances-overview>

Kee, Y. J., Zakaria, L., & Mohd, M. H. (2020). Morphology, phylogeny and pathogenicity of *Fusarium* species from *Sansevieria trifasciata* in Malaysia. *Plant Pathology*, 69, 442–454. <https://doi.org/10.1111/ppa.13138>

Kumar, S., Grewal, J., Sadaf, A., Hemamalini, R., & Khare, S. K. (2016). Halophiles as a source of polyextremophilic  $\alpha$ -amylase for industrial applications. *AIMS Microbiology*, 2 (1), 1-26. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2016.1.1>

Layne, E. (1957). Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods in Enzymology*, 3, 447-455. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(57\)03413-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(57)03413-8)

Li, L., Yang, Q., & Li, H. (2021). Morphology, Phylogeny, and Pathogenicity of Pestalotioid Species on *Camellia oleifera* in China. *Journal of Fungi* (Basel, Switzerland), 7(12), 1080. <https://doi.org/10.3390/jof7121080>

Machado, C.M.M., & Abreu, F.R. (2006). Produção de álcool a partir de carboidratos. *Revista de Política Agrícola*, 15 (3), 64-78. <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/121716>

Marco, J. da D. C. I. de., Souza Neto, G. P. de., Castro, C. F. de S., Michelin, M., Polizeli, M. L.T.M., & Filho, E. X. F. (2015). "Partial Purification and Characterization of a Thermostable  $\beta$ -Mannanase from *Aspergillus foetidus*" *Applied Sciences*. 5(4), 881-893. <https://doi.org/10.3390/app5040881>

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

Ministério das Minas e Energia, Governo Federal do Brasil. Balanço Energético Nacional – Ano base 2020. (2021). <https://www.epe.gov.br/pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/balanco-energetico-nacional-2021>. Access date: 15/08/2021.

Morais, R. R., Pascoal, A. M., Pereira-Júnior, M. A., Batista, K. A., Rodriguez, A. G., & Fernandes, K. F. (2019). Bioethanol production from *Solanum lycocarpum* starch: A sustainable non-food energy source for biofuels. *Renewable Energy*, 140, 361-366. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.02.056>

Papanikolaou, S.; Aggelis, G. 2002. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresource Technology*., 82(1), p. 43–49. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00149-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00149-3)

Prasoulas, G., Gentikis, A., Konti, A., Kalantzi, S., Kekos, D., & Mamma, D. (2020). Bioethanol production from food waste applying the multienzyme system produced on-site by *Fusarium oxysporum* F3 and mixed microbial cultures. *Fermentation*, 6 (2), 39. <https://doi.org/10.3390/fermentation6020039>

Romão, T. C., Menezes-Filho, A. C. P., Harakava, R., Castro, C. F. S., & Morais, P. B. (2024). Molecular and morphological diversity, qualitative chemical profile and antioxidant activity of filamentous fungi of the digestive tract of *Phylloicus* sp. (Trichoptera: Calamoceratidae). *Brazilian Journal of Biology*, 84, e259983. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.259983>

Santillán-Mendoza, R., Fernández-Pavía, S. P., O'Donnell, K., Ploetz, R. C., Ortega-Arreola, R., Vázquez-Marrufo, G., Benítez-Malvido, J., Montero-Castro, J. C., Soto-Plancarte, A., & Rodríguez-Alvarado, G. (2018). A Novel Disease of Big-Leaf Mahogany Caused by Two *Fusarium* Species in Mexico. *Plant Disease*, 102(10), 1965–1972. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-18-0060-RE>

Silva, F. L. da., Oliveira Campos, A. de., Santos, D. A. dos., Oliveira Júnior, S. D. de., Araújo Padilha, C. E. de., Sousa Junior, F. C. de., Macedo, G. R. de., & Santos, E. S. dos. (2018). Pretreatments of Carnauba (*Copernicia prunifera*) straw residue for production of cellulolytic enzymes by *Trichoderma reesei* CCT-2768 by solid state fermentation. *Renewable Energy*, 116, 299-308. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.09.064>

Schweinberger, C. M., Putti, T. R., Susin, G. B., Trierweiler, J. O., & Trierweiler, L. F. (2016). Ethanol production from sweet potato: The effect of ripening, comparison of two heating methods, and cost analysis. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 94(4), 716-724. <https://doi.org/10.1002/cjce.22441>

Schweinberger, C.M. (2016). *Inovação e otimização no processo de produção de etanol a partir de batata-doce*. [Doctoral thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul]. <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/143930>

Silva Santiago, S. R. S. da., Santiago, P. A. L., de Oliveira, M. R., Souza Rodrigues, R. de., Barbosa, A. N., Silva, G. F.da., ... & de Souza, A. Q. L. (2022). Evaluation of enzymatic production of hydrolases and oxyredutases by *Fusarium pseudocircinatum* and *Corynespora torulosa* isolated from caesarweed (*Urena lobata* L., 1753). *Research, Society and Development*, 11(2), e13211225325-e13211225325. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i2.25325>

Souza Filho, P. F. de., Ribeiro, V. T., Santos, E. S. dos., & de Macedo, G. R. (2016). Simultaneous saccharification and fermentation of cactus pear biomass—evaluation of using different pretreatments. *Industrial Crops and Products*, 89, 425-433. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.05.028>

Zhang, P., Chen, C., Shen, Y., Ding, T., Ma, D., Hua, Z., Sun, D. (2013). Starch saccharification and fermentation of uncooked sweet potato roots for fuel ethanol production. *Bioresource Technology*, 128, 835–838. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.166>

Zhang, L., Zhao, H., Gan, M., Jin, Y., Gao, X., Chen, Q., Guan, J., Wang, Z. (2011). Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales. *Bioresource. Technology*, 102(6), 4573–4579. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.115>

## 5. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que os fungos são importantes agentes transformadores e provocam, cada vez mais, o interesse na busca de micro-organismos que possam apresentar soluções de interesse para a indústria biotecnológica.

Os fungos filamentosos identificados e estudados são provenientes de trato digestório de *Phylloicus* sp e, em sua maioria, endofíticos, segundo a literatura. Apresentaram atividade amilolítica e mostraram ineditismo quanto a aplicação das enzimas para sacarificação e fermentação simultâneos e produção de etanol. Ademais, verificamos a produção de metabólitos secundários com relevante atividade antioxidante.

Portanto, o presente estudo demonstra que as linhagens fúngicas analisadas são capazes de produzir compostos bioativos de interesse na produção de fármacos e cosméticos, pigmentos e corantes e enzimas para a produção de biocombustíveis, aplicação nas indústrias têxtil e de alimentos. Destarte, conjuntamente à literatura prévia, contribui para a hipótese do complexo papel que os fungos podem exercer no meio ambiente e como perspectivas para a biotecnologia.

Novos estudos devem ser realizados para a prospecção de enzimas de interesse biotecnológico, como pectinases, lipases, celulases, xilanases, como também novos bioativos que possam ser produzidos por essas linhagens fúngicas, seja na interface de interação com hospedeiros vertebrados ou *in vitro*, que possam ser úteis aos seres vivos, tais como anti-inflamatórios, antibióticos, anti-helmínticos, antifúngicos e enzimas capazes de hidrolisar material vegetal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J.A.S; ROVIDA, A.F.S; PAMPHILE, J.A. Fungi of interest: biotechnological applications. **Revista Uningá**, v. 21, n. 1, p. 55-59, 2015. Disponível em <http://34.233.57.254/index.php/uningareviews/article/view/1613>

AIME, M.C; BREARLEY, F.Q. Tropical fungal diversity: closing the gap between species estimates and species Discovery. **Biodiversity and Conservation**. v.21, n.9, p. 2177 - 2180. 2012. <https://doi.org/10.1007/s10531-012-0338-7>

AGUIAR NETO FILHO, Manoel. A. **Bioprospecção de fungos amilolíticos para produção de etanol**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Instituto Federal Goiano, Rio Verde. 63p. 2017.

ALMEIDA, F. O. A arqueologia dos fermentados: a etílica história dos Tupi-Guarani. **Estudos avançados**, v. 29, n. 87, 2015. <https://doi.org/10.1590/S0103-40142015000100006>

ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, p. 2202-2210, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010001000033>

AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, J. V. C.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 91:1267-1275, 2011.

ASTOLFI, Angela Luiza. **Sacarificação e fermentação simultânea de biomassa algal e amido e uso do resíduo do processo de fermentação para obtenção de biopeptídios**. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, Porta Alegre – RS, 2019.

AYALA, A.; MUÑOZ, M.F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 201, p. 31, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>

BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO., CENTOR DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS (Brasil). **Cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**, Rio de Janeiro, p 316, 2008.

BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**., Campinas, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>

BÄRLOCHER, F., GRAÇA, M. A .S. Total phenolics. In: Barlocher, F., Gessner, M., Graça, M. A. S (Org.). **Methods to study litter decomposition: a practical guide**. Springer, p. 157-161, 2020. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-30515-4\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-030-30515-4_18)

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021>

BARRERA, G., PIZZIMENTI, S., DAGA, M., DIANZANI, C., et al. Lipid Peroxidation-Derived Aldehydes, 4-Hydroxynonenal and Malondialdehyde in Aging-Related Disorders. **Antioxidants**, v. 7, n. 8, 102. 2018. <https://doi.org/10.3390/antiox7080102>

BASSO, L. C.; BASSO, T.O.; ROCHA, S.N. Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. In: Bernardes, MAS (Ed). **Biofuel production-recent developments and prospects**. London: IntechOpen, p 85-100, 2011. <https://doi.org/10.5772/17047>

BELLÓ, A. Dano Oxidativo e Regulação Biológica pelos Radicais Livres. In: MARRONI, N. P. *et al.* **Estresse Oxidativo e Antioxidantes**. Porto Alegre: Editora Ulbra., p.15-19, 2002.

BELMONT-MONTEFUSCO et al. Isolation and enzymatic potential of fungi associated with the gut of *Stenochironomus Kieffer* larvae (Insecta: Diptera: Chironomidae). **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 5, p.28644-28651, may, 2020. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n5-347>

BERASATEGUI, A., SHANTANU, S., HASSAN, S., KALTENPOTH, M. Potential applications of insect symbionts in biotechnology. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 100. p.1567–1577, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7186-9>

BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **American Journal of Botany**. v.98, n.3, p.426-438. mar 2011. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000298>

CASTRO, A. M., ANDRÉA, T.V., CASTILHO L. R., FREIRE D.M. Use of mesophilic fungal amylases produced by solid-state fermentation in the cold hydrolysis of raw babassu cake starch. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 2010a, v. 162, n. 6, p. 1612- 1625. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-8942-z>

CHADDAD, F. R. UNICA: challenges to deliver sustainability in the Brazilian sugarcane industry. **International Food and Agribusiness Management Review**, v. 13, n. 4 p. 173–192, 2010

CHANDEL, A. K. *et al.* Multi-scale structural and chemical analysis of sugarcane bagasse in the process of sequential acid–base pretreatment and ethanol production by *Scheffersomyces shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1-17, 2014.

CHAVES, Jéssica Varela. **Atividade antimicrobiana e enzimática do fungo *Formitopsis* sp.** 2017. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais), Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2017. Disponível em: <http://repositorioinstitucional.uea.edu.br/handle/riuea/2346?locale=de>

CHEN, H. Lignocellulose biorefinery feedstock engineering, In:\_\_\_ **Lignocellulose Biorefinery Engineering**, Woodhead Publishing, 2015, p. 37-86, ISBN 9780081001356. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100135-6.00003-X>

CORRADINI, E. *et al.* Estudo comparativo de amidos termoplásticos derivados do milho com diferentes teores de amilose. **Polímeros**, v. 15, n. 4, p. 268-273, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282005000400011>

COTINGUIBA, G.G. *et al.* Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura Methods of the Antioxidant Defense: A Literature Review. **Journal of Health Sciences**, p. 231–238, 2013. <https://doi.org/10.17921/2447-8938.2013v15n3p%25p>

COVARRUBIAS, L. *et al.* Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active? **Developmental Biology**, v. 320, p. 1-11, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.04.041>

CROTTI, E., BALLOI, A., HAMDI, C. *et al.* Microbial symbionts: a resource for the management of insect-related problems. **Microbial Biotechnology**, v. 5, p.307–317. 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00312.x>

DELL'ANNA, M.L. *et al.* Membrane lipid alterations as a possible basis for melanocyte degeneration in vitiligo. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 5, p. 1226–33, 2007. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700700>

DELLA-BIANCA, B. E.; BASSO, T. O.; STAMBUK, B. U. *et al.* What do we know about the yeast stains from the Brazilian fuel ethanol industry? **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 979-991. 2013. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4631-x>

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of antibiotics**, v. 62, n. 1, p. 5-16, 2009. <https://doi.org/10.1038/ja.2008.16>

FERREIRA, I.C.F.R., BARROS L., ABREU, R.M.V. Antioxidants in wild mushrooms. **Current Medicinal Chemistry**, v.16, p. 1543-1560, 2009. <https://doi.org/10.2174/092986709787909587>

GUNATILAKA, A. A .L. Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. **Journal Natural Products**, v. 69, p. 509-526, 2006. <https://doi.org/10.1021/np058128n>

GANDHI M., SANGWAN, V., KAPOOR, K.K., DILBAGHI, N. Composting of household wastes with and without earthworms. **Environment and Ecology**. v.15. p.432–434. 1997.

GOPINATH, Subash CB *et al.* Biotechnological processes in microbial amylase production. **BioMed research international**, v. 2017, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1272193>

GUPTA, R. *et al.* Microbial  $\alpha$ -Amylases: Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1-18, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00053-0)

GUTTERIDGE, J.M; HALLIWELL B. Antioxidants:molecules, medicines, and myths. Biochemical and Biophysical **Research Communication**, v.394, n.4, p.561-564, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.071>

GLASER, R. Enzyme-based lignocellulose hydrolyzation-Sauter mean diameter of raw materials as a basis for cellulase performance characterization and yield prediction. **Journal of Biotechnology**, v. 214, p. 9–16, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.08.024>

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press: Oxford, v.4, 2007.



HARMAN, D. The free radical theory of aging. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 5, n. 5, p. 557-561, 2003. <https://doi.org/10.1089/152308603770310202>

HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Biodiversity and Conservation**. v. 21, p. 2425–2433. 2014. <https://doi.org/10.1017/S0953756201004725>

HUANG, W.Y. *et al.* Endophytic fungi from *Nerium oleander* L (Apocynaceae): main constituents and antioxidant activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 9, p. 1253-1263, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9357-z>

HUSSAIN, I., SIDDIQUE, F., MAHMOOD, M. S., *et al.* A Review of the Microbiological Aspect of  $\alpha$ -amylase Production. **International Journal of Agriculture & Biology**, 2013, vol. 15, no 5.

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INTELECTUAL (INPE). Ministério da Economia do Brasil. **Patentes**. Disponível em: <https://www.gov.br/inpi/pt-br/servicos/perguntas-frequentes/patentes#patente>. Acessado em: 07/08/2022.

JEAN-BATISTE, James. **Amilases e lipases produzidas por fungos de efluentes têxtil: levantamento científico e tecnológico**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia), Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Instituto Latinoamericano de Ciências da Vida e da Natureza. Foz do Iguaçu, 2020.

KVIECINSKI, M.R. Avaliação das atividades antioxidante, antiinflamatória e antitumoral do extrato bruto hidro-etanólico e frações de *Bidens pilosa* L. (Asteraceae). 2007. Dissertação (Mestrado em farmácia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/90326>

LIMA, Ana Carolina. **Avaliação da atividade antioxidante do extrato de fungos endofítico**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Gradação em Farmácia). Universidade de Brasília, Brasília. 2017. Disponível em: <https://bdm.unb.br/handle/10483/17802>

LIU, X. *et al.* Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 548-554, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.008>

LÜCKING, R., AIME, M.C., ROBBERTSE, B. *et al.* Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding? **IMA Fungus**, v. 11, n. 14, 2020. <https://doi.org/10.1186/s43008-020-00033-z>

MA, L; ZHAI, Y; FENG, D. *et al.* Identification of novel factors involved in or regulating initiation of DNA replication by a genome-wide phenotypic screen in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cell Cycle**. v. 9, n. 21, p. 4399-4410. 2010. <https://doi.org/10.4161/cc.9.21.13679>

MACHADO, C. M. M., ABREU, F. R. Produção de álcool combustível a partir de carboidratos. **Revista Política agrícola**, nº 3, jul./set. 2006. Disponível em <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/121716>

MAIA, L. C. *et al.* Menolli Junior N, Medeiros PS, Friedrich RCS, Chikowski RS, Pires RM, Melo RF, Silveira RMB, Urrea-Valencia S. Cortez VG, Silva VF. Diversity of Brazilian fungi. **Rodriguesia**, v. 66, p. 1033-45, 2015. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201566407>

MAIA, L. C.; CARVALHO JUNIOR, A. A. Introdução: os fungos do Brasil. In: FORZZA, R. C. (org) *et al.* **Catálogo de Planta e Fungos do Brasil** [on-line]. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio, v. 1, p.43-48, 2010. ISBN 978-85-8874-242-0

MANACH, C. *et al.* "Polyphenols: food sources and bioavailability". **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, p.727-47, 2004. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica básica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

MENDES, D.B *et al.* Lipolytic Enzymes with Hydrolytic and Esterification Activities Produced by Filamentous Fungi Isolated from Decomposition Leaves in an Aquatic Environment. **Enzyme Research**. 13 p, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8182425>

MENEZES FILHO, Antonio Carlos Pereira de; CHAVES, Mariana Santos; DE SOUZA CASTRO, Carlos Frederico. Estudo físico-químico e fitoquímico do extrato hidroetanólico da flor de *Salvertia convallariodora* A. St.-Hil.(Vochysiaceae). **Scientia Naturalis**, v. 2, n. 2, 2020. <http://revistas.ufac.br/revista/index.php/SciNat>

MENON, V., RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 522–550, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2012.02.002>

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, v.3, n.5, p.9-23, 2009. <https://doi.org/10.19142/rpq.v3i5.83>

MOTTA, V.T. **Bioquímica**. 2. ed. Medbook. 2011. ISBN: 9788599977668

MURCIA, M.A., MARTÍNEZ-TOMÉ, M., JIMÉNEZ, A.M., VERA, A.M., HONRUBIA, M. and PARRAS, P. Antioxidant activity of edible fungi (truffles and mushrooms): losses during industrial processing. **Journal of Food Protection**, vol. 65, no. 10, pp. 1614-1622, 2002. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X-65.10.1614>.

MUSSATO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P. M. R. *et al.* Technological trends, global market and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, v.28, p.817-830, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.07.001>

NACZK, M., SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.059>

NAZARI, M. *et al.* Inactivation of nuclear factor- $\kappa$ B by citrus flavanone hesperidin contributes to apoptosis and chemo-sensitizing effect in Ramos cells. **European journal of pharmacology**, v. 650, n. 2-3, p. 526-533, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.10.053>

NEIDLEMAN, S.L. Enzymes in the food industry: a backward glance. **Food Technology**, v. 45, n. 1, p. 88-91, 1991.

NELSON, D.L.; COX, M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6ª Ed, Porto Alegre: Artmed, 1220 p. 2014.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, v.17, p. 215-234, 2000. <https://doi.org/10.1039/A902202C>

NIKI, E. Do antioxidants impair signaling by reactive oxygen species and lipid oxidation products? **FEBS Letters**, v. 586, n. 21, p. 3767–3770, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.09.025>

OLSEN, G. J., WOESE, Carl R., OVERBEEK, R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 1, p. 1-6, 1994.

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

PANDEY, A. *et al.* (Org) **Enzyme Technology**. 1ª. ed. New Delhi: Springer, 2006. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-35141-4>

PANDEY, A. *et al.* Advances in microbial amylases. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. v. 31, n. 2, p. 135-152. 2000. <https://doi.org/10.1042/ba19990073>

PARK A.R., PARK J-H., AHN H-J., JANG J.Y., YU B.J, YOON B-Y.U, YOON J-J. Enhancement of  $\beta$ -Glucosidase Activity from a Brown Rot Fungus *Fomitopsis pinicola* KCTC 6208 by Medium Optimization. **Mycobiology**, v. 43, n. 1, p. 57-62. 2015. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.1.57>

PATEL, R. N. Microbial enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 804-826, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00186-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00186-2)

PIETTA, P.G. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 1 jul. 2000. <https://doi.org/10.1021/np9904509>

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. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20141241>

QUEIROZ, C.; DE SOUSA, A. C. B. Produção de enzimas hidrolíticas por fungos filamentosos em diferentes substratos sólidos. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 51849-51860, 2020. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n7-725>

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION (RFA). In: **Market & Statistics**. 2019. Acessado em 29/09/2020 às 22h:20. Disponível em: <https://ethanolrfa.org/statistics/annual-ethanol-production/>

RIZZOLO, J.A. **Estudos para o aproveitamento biotecnológico de variedades de batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] na fermentação alcoólica para a produção de etanol combustível e aguardente**. Tese de doutorado. Curitiba-PR, Universidade Federal do Paraná. 121p, 2014.

ROSS, R. P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, n (1-2), p. 3-16, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00174-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00174-5)

SÁ, S.G.P. *et al.* Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 4, p. 561–566, 2012. Disponível em: <http://rcfba.fcfar.unesp.br/index.php/ojs/article/view/260>

SABOURY, Ali Akbar. Stability, activity and binding properties study of  $\alpha$ -amylase upon interaction with  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$ . **Biologia Bratislava**, v. 57, n. 11, p. 221-228, 2002.

SALEEM, A.; EBRAHIM, M. K. H. Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia. **Journal of Taibah University for Science**. v. 8, n. 2, p. 90–97, abr. 2014.

SANTOS, Taídes Tavares dos. **Fungos Associados ao trato digestório de *Phylloicus* spp. (Trichoptera: Calamoceratidae) em riachos de baixa ordem na Amazônia brasileira**. 2018. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia), Universidade Federal do Tocantins, BIONORTE, Palmas, 2018.

SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K. *et al.* Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. **Experimental Gerontology**, v. 35, n. 3, p. 307–316, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(00\)00098-x](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(00)00098-x)

SCHUSTER *et al.* On the safety of *Aspergillus niger*: a review. *Applied Microbiology & Biotechnology*, Berlin, v.59, n.4-5, p.426-435, 2002. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1032-6>

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization and application of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001. [https://doi.org/10.1016/s0734-9750\(01\)00086-6](https://doi.org/10.1016/s0734-9750(01)00086-6)

SHEARER C.A., DESCALS, E., VOLKMANN-KOHLMEYER, B., KOHLMEYER, J. *et al.* Fungal biodiversity in aquatic habitats. **Biodiversity and Conservation**. v.16, p.49–67. 2007. <https://doi.org/10.1007/s10531-006-9120-z>

SHERMA, J.; FRIED, B. **Handbook of thin-layer chromatography**. 3th, Edition, Revised and Expanded. p. 1330, 2005.

SILVA, Cristiane Bezerra da. ***Asemeia extraaxillaris* (Chodat) JFB Pastore e JR Abbott (Polygalaceae) e *Microlobius foetidus* (subsp. Paraguensis (Benth.) M. Sousa et G. Andrade) (Fabaceae-Mimosoideae): Contribuição ao estudo fitoquímico e investigação das atividades biológicas (alelopática, antiploriferativa, antineoplásica, antimicrobiana, antioxidante, tóxica e larvicida)**. 2014. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014. Disponível em: <https://www.acervodigital.ufpr.br/handle/1884/35255>

SILVA, C. Lipid peroxidation and antioxidants. **Revista electrónica de Veterinaria**, v. 14, 2013. ISSN: 695-7504

SOARES, I. A. *et al.* Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 700-705, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000300021>

SUH, S. O. *et al.* *Scheffersomyces parashehatae* f.a., sp. nov., *Scheffersomyces xylofermentans* f.a., sp. nov., *Candida broadrunensis* sp. nov. and *Candida manassasensis* sp. nov., novel yeasts associated with wood-ingesting insects, and their ecological and biofuel implications. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 4330–4339, 2013.

TAKAHASHI, J. A.; LIMA, G. S.; dos SANTOS, G. F. *et al.* Fungos Filamentosos e Química: velhos conhecidos, novos aliados. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 6, 2017.

TAKAHASHI, J. A., LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, v. 31, p. 1807-1813, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000700036>

THANNICKAL, V.J.; FARNBURG, B.L. Reactive oxygen species in cell signaling. **American Journal Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 279, p. 1005–1028, 2000. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.279.6.L1005>

TUNGA, R.; TUNGA, B. S. **Extra-cellular Amylase Production by *Aspergillus oryzae* Under Solid State Fermentation**. Japan: International Center for Biotechnology, Osaka University, 12 p. 2003.

YANG, J., HUANG, Y., XU, H., GU, D., XU, F., TANG, J., FANG, C. and YANG, Y. Optimization of fungi co-fermentation for improving anthraquinone contents and antioxidant activity using artificial neural networks. **Food Chemistry**, vol. 313, p. 126138, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126138>.

WIJAYAWARDENE N. N. *et al.* Outline of Fungi and fungus-like taxa. **Mycosphere**, v. 11, n. 1, p. 1060–456. 2020. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/11/1/8>

WRIGHT, M. S., COVICH, A. P. The effect of macroinvertebrate exclusion on leaf breakdown rates in a tropical headwater stream. **Biotropica**. v. 37, n. 3, p.403-408. 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2005.00053.x>

ZIMMERMANN, Alice Mesquita; KIRSTEN, Vanessa Ramos. Alimentos com função antioxidante em doenças crônicas: uma abordagem clínica. **Disciplinarum Scientia**. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria, v. 9, n. 1, p. 51-68, 2008.