

REVISTA
DESAFIOS

ISSN: 2359-3652

V.11, n.5, jul/2024 – DOI: http://dx.doi.org/10.20873/2024_jul_16264

**FUNGOS ENDOFÍTICOS PRODUTORES DE L-
ASPARAGINASE ASSOCIADOS ÀS PLANTAS MEDICINAIS
AMAZÔNICAS *Himatanthus sucuuba* (Spruce ex Müll. Arg.)
Woodson E *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) K. Schum**

*ENDOPHYTIC FUNGI PRODUCING L-ASPARAGINASE ASSOCIATED
WITH AMAZONIAN MEDICINAL PLANTS *Himatanthus sucuuba*
(Spruce ex Müll. Arg.) Woodson E *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) K.
Schum*

*HONGOS ENDOFÍTICOS PRODUCTORES DE L-ASPARAGINASA
ASOCIADOS A PLANTAS MEDICINALES AMAZÓNICAS *Himatanthus
sucuuba* (Spruce ex Müll. Arg.) Woodson E *Calycophyllum spruceanum*
(Benth.) K. Schum*

Laryssa dos Santos Prado

Mestra em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia. Universidade Federal do Acre (UFAC). E-mail: laryssaprado348@gmail.com | orcid.org/0000-0003-2117-0802

Antonia Jerlene Martins de Lima

Mestra em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia. Universidade Federal do Acre (UFAC). E-mail: jerlenemartins@gmail.com | orcid.org/0000-0002-5885-1540

Valcirene Rodrigues Pereira

Mestra em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental. Universidade Federal do Acre (UFAC). E-mail: val2009ufac@gmail.com | orcid.org/0000-0003-4266-3980

Fernanda Viana Diniz

Doutora em Agronomia pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Produção Vegetal. Universidade Federal do Acre (UFAC). E-mail: fernanda.viana@sou.ufac.br | orcid.org/0000-0003-0441-4174

Clarice Maia Carvalho

Professora do Centro de Ciências Biológicas e da Natureza. Universidade Federal do Acre (UFAC). E-mail: claricemaicarvalho@gmail.com | orcid.org/0000-0003-1092-738X

Como citar este artigo:

dos Santos Prado, L., Martins de Lima, A. J., Rodrigues Pereira, V., Viana Diniz, F., & Maia Carvalho, C. FUNGOS ENDOFÍTICOS PRODUTORES DE L-ASPARAGINASE ASSOCIADOS ÀS PLANTAS MEDICINAIS AMAZÔNICAS *Himatanthus sucuuba* (Spruce ex Müll. Arg.) Woodson E *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) K. Schum. DESAFIOS - Revista Interdisciplinar Da Universidade Federal Do Tocantins, 11(5). https://doi.org/10.20873/2024_jul_16264.

RESUMO:

As enzimas de origem microbiana são compostos naturais de grande relevância para a indústria farmacêutica, sendo a L-asparaginase uma dessas por ser importante no tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LAA), sendo primordial encontrar novas fontes de L-asparaginase. Uma fonte em potencial de L-asparaginase são fungos endofíticos de plantas medicinais. Assim, este estudo teve como objetivo selecionar fungos endofíticos produtores de L-asparaginase associados às plantas medicinais amazônicas *Himatanthus sucuuba* e *Calycophyllum spruceanum*. Os fungos endofíticos foram reativados da coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia da UFAC em meio BDA e identificados por análise morfológica. Para o ensaio enzimático, os fungos foram crescidos em meio BDA por 7 dias à 28 °C, e três plugues de micélio fúngico inoculados em ágar modificado Czapek Dox-McDox e incubados a 28 °C por 7 dias. Após incubação, foi identificado como positivo a mudança de coloração do meio de cultura de amarelo para azul. Um total de 38 fungos endofíticos foram reativados e 34 isolados (89,47%) foram positivos para a produção da enzima L-asparaginase, com destaque para fungos dos gêneros *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Lasioidiplodia*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Trichoderma* e *Xylaria*. As plantas medicinais amazônicas *H. sucuuba* e *C. spruceanum* abrigam fungos endofíticos com potencial para a produção de L-asparaginase.

PALAVRAS-CHAVE: Agentes Antineoplásicos; Asparagina; Compostos Bioativos; Endofíticos; Amazônia.

ABSTRACT:

*Enzymes of microbial origin are natural compounds of great relevance to the pharmaceutical industry, L-asparaginase being one of these because it is important in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (AAL), and it is essential to find new sources of L-asparaginase. A potential source of L-asparaginase is endophytic fungi from medicinal plants. Thus, this study aimed to select L-asparaginase-producing endophytic fungi associated with the Amazonian medicinal plants *Himatanthus sucuuba* and *Calycophyllum spruceanum*. Endophytic fungi were reactivated from the collection of microorganisms from UFAC Microbiology Laboratory in PDA medium and identified by morphological analysis. For enzymatic assay, the fungi were grown in PDA medium for 7 days at 28 °C, and three plugs of fungal mycelium were inoculated in modified Czapek Dox-McDox agar and incubated at 28 °C for 7 days. After incubation, the color change of the culture medium from yellow to blue was identified as positive. A total of 38 endophytic fungi were reactivated and 34 isolates (89.47%) were positive for the production of the enzyme L-asparaginase, with emphasis on fungi of the genera *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Lasioidiplodia*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Trichoderma* and *Xylaria*. The Amazonian medicinal plants *H. sucuuba* and *C. spruceanum* harbor endophytic fungi with the potential for the production of L-asparaginase.*

KEYWORDS: Antineoplastic Agents; Asparagine; Bioactive Compounds; Endophytes; Amazon.

RESUMEN:

Las enzimas de origen microbiano son compuestos naturales de gran relevancia para la industria farmacéutica, siendo la L-asparaginasa uno de estos debido a que es importante en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda (LEA), siendo imprescindible encontrar nuevas fuentes de L-asparaginasa.

Una fuente potencial de L-asparaginasa son los hongos endófitos de plantas medicinales. Así, este estudio tuvo como objetivo seleccionar hongos endófitos productores de L-asparaginasa asociados con las plantas medicinales amazónicas Himatanthus sucuuba y Calycophyllum spruceanum. Los hongos endófitos fueron reactivados a partir de la colección de microorganismos del Laboratorio de Microbiología de la UFAC en medio PDA y identificados mediante análisis morfológico. Para el ensayo enzimático, los hongos se cultivaron en medio PDA durante 7 días a 28 °C, y se inocularon tres tapones de micelio fúngico en agar Czapek Dox-McDox modificado y se incubaron a 28 °C durante 7 días. Después de la incubación, se identificó como positivo el cambio de color del medio de cultivo de amarillo a azul. Un total de 38 hongos endófitos fueron reactivados y 34 aislados (89,47%) resultaron positivos a la producción de la enzima L-asparaginasa, con énfasis en hongos de los géneros Colletotrichum, Fusarium, Lasiodiplodia, Paecilomyces, Penicillium, Pestalotiopsis, Phomopsis, Trichoderma y Xilaria. Las plantas medicinales amazónicas H. sucuuba y C. spruceanum albergan hongos endófitos con potencial para la producción de L-asparaginasa.

Palabras clave: Agentes Antineoplásicos; Asparagina; Compuestos Bioactivos; Endófitos; Amazonas.

INTRODUÇÃO

Microrganismos endofíticos são organismos que passam a totalidade ou parte de seu ciclo de vida colonizando tecidos vegetais de forma inter e/ou intracelular sem apresentar sintomas aparentes na planta hospedeira (Rodriguez *et al.*, 2009; Hatamzadeh *et al.*, 2020; Yap *et al.*, 2021). Dentro da comunidade endofítica, têm-se os fungos que atualmente são considerados uma nova fonte de produtos naturais de importância medicinal, incluindo agentes anticancerígenos, anti-inflamatórios, antimicrobianos, antiparasitários e antioxidantes, se devendo a produção de moléculas como alcaloides, ácidos fenólicos, flavonoides, quinonas, taninos, terpenoides e xantonas (Bungihan *et al.*, 2011; Moreno *et al.*, 2011; Dhankhar *et al.* 2013; Sopalun *et al.*, 2020; Yap *et al.*, 2021; Baliza *et al.*, 2023).

A relação simbiótica existente entre fungos endofíticos e planta faz com que esses microrganismos sejam capazes de produzir metabólitos cuja produção é mantida pela planta hospedeira (Aly, Debbab e Proksch, 2011; Hatamzadeh *et al.*, 2020). Metabólitos produzidos por fungos endofíticos podem ser úteis no desenvolvimento de novas drogas em virtude da ampla gama de atividade biológicas que esses compostos bioativos apresentam (Guo *et al.*, 2008; Hatamzadeh *et al.*, 2020).

As enzimas de origem microbiana são compostos naturais de grande relevância para a indústria farmacêutica (Hatamzadeh *et al.*, 2020; El-Gendy *et al.*, 2021). A L-asparaginase é uma dessas enzimas cuja função é catalisar a hidrólise do aminoácido L-asparagina em ácido L-aspartico e amônia (Shrivastava *et al.*, 2016), sendo uma importante enzima terapêutica utilizada no tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LAA) (Mccredie e Ho, 1973; Patil, Patil e Mahjeshwari, 2012; Hatamzadeh *et al.*, 2020). Ela remove a L-asparagina requerida pelas células cancerígenas da leucemia necessárias ao seu crescimento, privando-as de adquirir L-asparagina (Chand *et al.*, 2020).

Atualmente, a L-asparaginase comercial é originada de fontes bacterianas, como *Escherichia coli* e *Erwinia* sp. (Batoool *et al.*, 2015; Hatamzadeh *et al.*, 2020; Yap *et al.*, 2021). Porém, os efeitos colaterais da enzima derivada de bactérias incluem efeitos colaterais tóxicos e fatais, como febre, falta de ar, inchaço dos lábios e cólicas abdominais (Verma *et al.*, 2007; Hosamani e Kaliwal, 2011). Tendo em vista a importância dessa enzima no tratamento da leucemia, é primordial encontrar novas fontes de L-asparaginase com efeitos colaterais mínimos (Muneer *et al.*, 2020).

A L-asparaginase derivada de eucariotos pode apresentar menor toxicidade e resposta imune reduzida (Prihanto *et al.*, 2019, Sreejai *et al.*, 2019). Fungos endofíticos apresentam a capacidade de produzir enzimas extracelulares em grandes quantidades, que são facilmente extraídas e purificadas, podendo ser fontes ideais de L-asparaginase (Hatamzadeh *et al.*, 2020). Além disso, espécies fúngicas podem produzir enzimas semelhantes às enzimas humanas devido à sua natureza eucariótica, podendo ter melhor sucesso no tratamento do câncer do que enzimas bacterianas (Serquis e Oliveira, 2004).

L-asparaginase de fungos endofíticos isolados de plantas medicinais tem sido relatada nos últimos anos (Theantana, Hyde e Lumyong, 2007). Foi relatado que os compostos produzidos por fungos endofíticos são semelhantes aos compostos produzidos pelas plantas hospedeiras devido à estreita relação entre planta e microrganismo (Chandra, 2012). Nos países asiáticos, foi descoberto que fungos endofíticos isolados de plantas medicinais produzem compostos bioativos com propriedades anticancerígenas, como espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (Chow e Ting, 2015; Chen *et al.*, 2016; Yap *et al.*, 2017).

Neste estudo, fungos endofíticos isolados de duas plantas medicinais nativas da Amazônia, *Himatanthus sucuuba* (Spruce ex Müll. Arg.) Woodson (sucuuba) e *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) K. Schum (mulateiro) foram testados quanto a produção da enzima L-asparaginase. Essas plantas são conhecidas por apresentarem propriedades medicinais (Peixoto *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2021). Muitas das indicações medicinais da sucuuba e do mulateiro são oriundos do conhecimento tradicional de populações indígenas nativas das florestas amazônicas (Wen *et al.*, 2011; Peixoto *et al.*, 2018).

A espécie *H. sucuuba*, pertencente à família Apocynaceae, é uma espécie arbórea de grande porte nativa da Amazônia, atingindo de 20 a 30 m de altura (Herrera-Calderón *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2021). Ela é conhecida popularmente na região norte do Brasil como sucuuba, janaguba ou sucuba, e seu valor é atribuído aos seus diferentes efeitos fitoterápicos (Silva *et al.*, 2021). O látex, cascas e folhas possuem ação antitumoral, o que justifica o uso popular da planta (Amaral *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2010). O látex da sucuuba é utilizado pelas populações tradicionais da Amazônia como anti-inflamatório, analgésico, no tratamento de tumores, úlcera, tuberculose, artrite, furúnculos e edema (Amaral *et al.*, 2007). Suas cascas são utilizadas para o tratamento de úlceras, como analgésico e antitussígeno (Silva *et al.*, 2010; Rebouças *et al.*, 2012; Herrera-Calderón *et al.*, 2021). Também foi reportada atividade sobre a pressão

sanguínea, musculatura lisa, permeabilidade capilar, cicatrizante e antileishmaniose (Castillo *et al.*, 2007).

A espécie *C. spruceanum* é uma espécie nativa da Amazônia pertencente à família Rubiaceae, podendo ser encontrada em países como Brasil, Bolívia, Equador e Peru (Peixoto *et al.*, 2018). No Brasil, a árvore é popularmente conhecida como mulateiro ou pau mulato (Tauchen *et al.*, 2011; Peixoto *et al.*, 2018). Na medicina tradicional, o mulateiro é conhecido por possuir diversas ações biológicas, dentre elas ação anti-inflamatória, antimicrobiana e antiparasitária (Zuleta *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2016). É utilizado como contraceptivo, chá para prevenção de envelhecimento, doenças gástricas e uterinas, distúrbios do aparelho geniturinário, colesterol alto, problemas de tireoide e para tratar diabetes (Caetano *et al.*, 2014). Sendo também amplamente apreciado por suas funções cosmetológicas, dentre elas, rejuvenescimento, hidratante curativo de rugas, cicatrizante, como protetor solar, no tratamento de manchas na pele, e como fortalecedor no controle de queda para os fios do couro cabeludo (Morais *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2016).

Embora a produção de L-asparaginase a partir dessas plantas não seja conhecida, é conhecido que fungos endofíticos produzem compostos bioativos semelhantes aos produzidos pela planta hospedeira, e o uso desses microrganismos ao invés da planta é interessante pois reduz o tempo, custo e área de produção, se tornando uma alternativa sustentável e economicamente viável de obtenção da L-asparaginase (Baliza *et al.*, 2023). Plantas medicinais nativas da Amazônia se constituem como detentoras de uma grande diversidade de microrganismos endofíticos ainda inexplorados. Apesar da importância medicinal, estudos com fungos endofíticos associados às plantas medicinais *H. sucuuba* e *C. spruceanum* produtores de L-asparaginase ainda não foram relatados.

Assim, este estudo teve como objetivo selecionar fungos endofíticos produtores de L-asparaginase associados às plantas medicinais amazônicas *H. sucuuba* e *C. spruceanum*.

METODOLOGIA

Reativação dos fungos endofíticos e estabelecimento de culturas puras

Os fungos endofíticos avaliados neste estudo foram isolados das espécies amazônicas *H. sucuuba* (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2022) e *C. spruceanum*, e culturas representativas foram depositadas na coleção de fungos do Laboratório de

Microbiologia da Universidade Federal do Acre (UFAC). As cepas fúngicas estavam armazenadas em água destilada à temperatura ambiente (Castellani, 1963).

A seleção dos fungos endofíticos foi baseada na diversidade dos morfotipos isolados. Para a reativação, os microrganismos foram cultivados em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar-BDA (200 g de batata, 20 g de dextrose e 15 g de ágar para 1 L de água destilada) por 7 dias à 28 °C. As colônias fúngicas foram posteriormente transferidas para tubos com meio BDA para o estabelecimento de culturas puras.

Identificação dos fungos endofíticos

Os isolados fúngicos foram analisados após 14 dias de cultivo em meio BDA à temperatura de 28 °C, e a identificação foi feita por métodos morfológicos. A identificação morfológica dos isolados foi realizada com base na morfologia das colônias fúngicas (cor e textura do micélio, formato da colônia e produção de pigmento) e estruturas reprodutivas (características das hifas e conídios). Um isolado representativo de cada morfoespécie foi selecionado e cultivado em meio BDA para identificação microscópica (Azevedo *et al.*, 2010). A análise micromorfológica foi realizada pela técnica de microcultivo, usando os meios BDA e Aveia (30 g de aveia e 15 g de ágar para 1 L de água destilada). As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 7 dias, e ao final do período as lamínulas foram coradas com o corante azul de lactofenol para visualização das estruturas reprodutivas e comparadas com literatura específica (Azevedo *et al.*, 2010; Barnett e Hunter, 1999).

Seleção *in vitro* de fungos endofíticos produtores de L-asparaginase

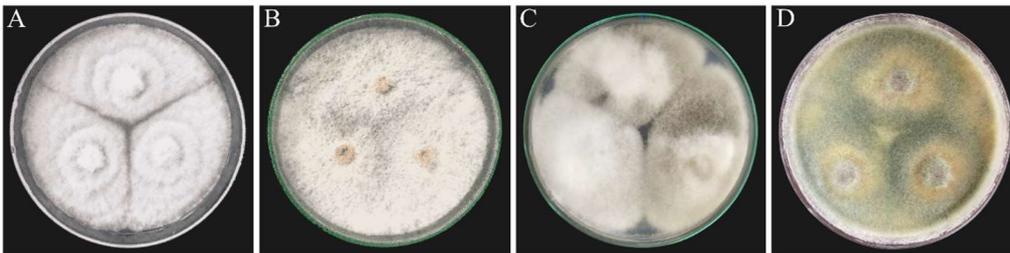
Os fungos endofíticos foram testados quanto à sua capacidade de produzir a enzima L-asparaginase. Para realização do ensaio, foram produzidas culturas puras dos isolados fúngicos. Os fungos foram crescidos em meio de cultura BDA por 7 dias à temperatura de 28 °C. Três plugues de micélio fúngico de 5 mm de diâmetro foram inoculados em ágar modificado Czapek Dox (McDox) (ágar 20,0 g, glicose 2,0 g, L-asparagina 10,0 g, KH₂PO₄ 1,52 g, KCl 0,52 g, MgSO₄.7H₂O 0,52 g, CuNO₃.3H₂O 0,001 g, ZnSO₄.7H₂O 0,001 g, e FeSO₄.7H₂O 0,001 g) suplementado com o indicador azul de bromotimol 0,009% (Kumar *et al.*, 2013; Chow e Ting, 2015). As placas foram incubadas à 28 °C por 7 dias, e após esse período, foi verificada a mudança de coloração do meio de cultura de amarelo para azul, indicando alcalinização do meio pela hidrólise da L-asparagina em ácido L-aspártico e liberação de NH₄⁺ pela enzima L-asparaginase. Foram feitas três repetições para cada isolado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Reativação e identificação dos fungos endofíticos

Um total de 38 fungos endofíticos associados às plantas medicinais *H. sucuuba* (23 isolados) e *C. spruceanum* (15 isolados) foram reativados (Tab. 1). Os endofíticos foram classificados à nível de gênero com base nas diferentes características morfológicas (Fig. 1). Vinte e quatro fungos endofíticos foram identificados como espécies pertencentes aos gêneros *Colletotrichum* (2), *Fusarium* (6), *Lasiodiplodia* (1), *Paecilomyces* (2), *Penicillium* (2), *Pestalotiopsis* (1), *Phomopsis* (8), *Trichoderma* (1) e *Xylaria* (1). Outros 14 isolados não foram identificados por não produzirem estruturas reprodutivas, sendo considerados Micélio Estéril.

Figura 1 – Análise macroscópica de fungos endofíticos isolados das plantas medicinais amazônicas *Himatanthus sucuuba* (A) *Pestalotiopsis* sp. 1 (2.2939) e (B) *Phomopsis* sp. 3 (2.2859), e *Calycophyllum spruceanum* (C) *Colletotrichum* sp. 1 (2.3366) e (D) *Trichoderma* sp. 1 (2.3025).



Fonte: elaboração do próprio autor.

Seleção *in vitro* de fungos endofíticos produtores de L-asparaginase

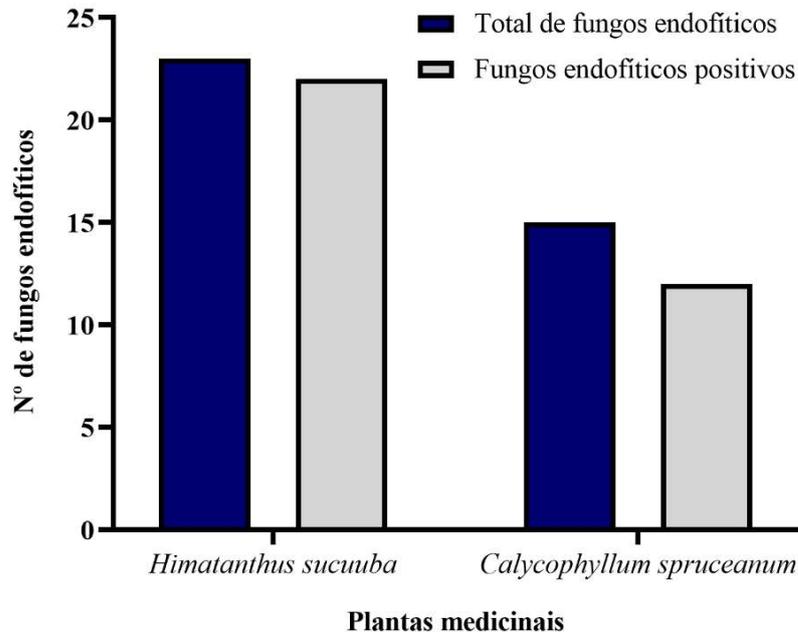
No ensaio enzimático, 38 fungos endofíticos isolados foram avaliados quanto à sua capacidade de produção da enzima L-asparaginase. Desse total, 34 isolados (89,47%) foram positivos para a produção extracelular da enzima na triagem preliminar (Tab. 1 e Fig. 2), onde a mudança de coloração do meio Czapek Dox (McDox) de amarelo para azul foi evidente, devido à mudança de pH ocasionado pela liberação de NH_4^+ (Fig. 3). Todas as espécies dos gêneros *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Lasiodiplodia*, *Trichoderma* e *Xylaria* das plantas medicinais avaliadas neste estudo podem produzir L-asparaginase, incluindo isolados não identificados. Enquanto isso, apenas quatro isolados fúngicos não produziram L-asparaginase, todos não identificados.

Tabela 1 – Fungos endofíticos isolados de plantas medicinais amazônicas e sua atividade de produção de L-asparaginase.

Código do isolado	Fungo	Planta hospedeira	Produção de L-asparaginase
2.3441	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	<i>Himatanthus sucuuba</i>	+
2.3366	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	<i>Calycophyllum spruceanum</i>	+
2.2853	<i>Fusarium</i> sp. 1	<i>H. sucuuba</i>	+
2.3445	<i>Fusarium</i> sp. 2	<i>H. sucuuba</i>	+
2.3499	<i>Fusarium</i> sp. 3	<i>H. sucuuba</i>	+
2.1518	<i>Fusarium</i> sp. 1	<i>C. spruceanum</i>	+
2.3096	<i>Fusarium</i> sp. 2	<i>C. spruceanum</i>	+
2.3341	<i>Fusarium</i> sp. 3	<i>C. spruceanum</i>	+
2.2540	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 1	<i>C. spruceanum</i>	+
2.3629	<i>Paecilomyces</i> sp. 1	<i>H. sucuuba</i>	+
2.2219	<i>Paecilomyces</i> sp. 2	<i>H. sucuuba</i>	+
2.3455	<i>Penicillium</i> sp. 1	<i>H. sucuuba</i>	+
2.2825	<i>Penicillium</i> sp. 2	<i>H. sucuuba</i>	+
2.2939	<i>Pestalotiopsis</i> sp. 1	<i>H. sucuuba</i>	+
2.3026	<i>Phomopsis</i> sp. 1	<i>H. sucuuba</i>	+
2.2838	<i>Phomopsis</i> sp. 2	<i>H. sucuuba</i>	+
2.2859	<i>Phomopsis</i> sp. 3	<i>H. sucuuba</i>	+
2.3043	<i>Phomopsis</i> sp. 1	<i>C. spruceanum</i>	+
2.3186	<i>Phomopsis</i> sp. 2	<i>C. spruceanum</i>	+
2.3228	<i>Phomopsis</i> sp. 3	<i>C. spruceanum</i>	+
2.3482	<i>Phomopsis</i> sp. 4	<i>C. spruceanum</i>	+
2.3076	<i>Phomopsis</i> sp. 5	<i>C. spruceanum</i>	+
2.3025	<i>Trichoderma</i> sp. 1	<i>C. spruceanum</i>	+
2.2546	<i>Xylaria</i> sp. 1	<i>C. spruceanum</i>	+
2.2910	Micélio estéril sp. 1	<i>H. sucuuba</i>	+
2.2932	Micélio estéril sp. 2	<i>H. sucuuba</i>	+
2.1773	Micélio estéril sp. 3	<i>H. sucuuba</i>	+
2.1694	Micélio estéril sp. 4	<i>H. sucuuba</i>	+
2.2365	Micélio estéril sp. 5	<i>H. sucuuba</i>	+
2.2216	Micélio estéril sp. 6	<i>H. sucuuba</i>	+
2.3397	Micélio estéril sp. 7	<i>H. sucuuba</i>	+
2.2858	Micélio estéril sp. 8	<i>H. sucuuba</i>	+
2.3539	Micélio estéril sp. 9	<i>H. sucuuba</i>	+
2.2405	Micélio estéril sp. 10	<i>H. sucuuba</i>	+
2.3504	Micélio estéril sp. 11	<i>H. sucuuba</i>	-
2.1654	Micélio estéril sp. 1	<i>C. spruceanum</i>	-
2.3304	Micélio estéril sp. 2	<i>C. spruceanum</i>	-
2.2417	Micélio estéril sp. 3	<i>C. spruceanum</i>	-
Total			38

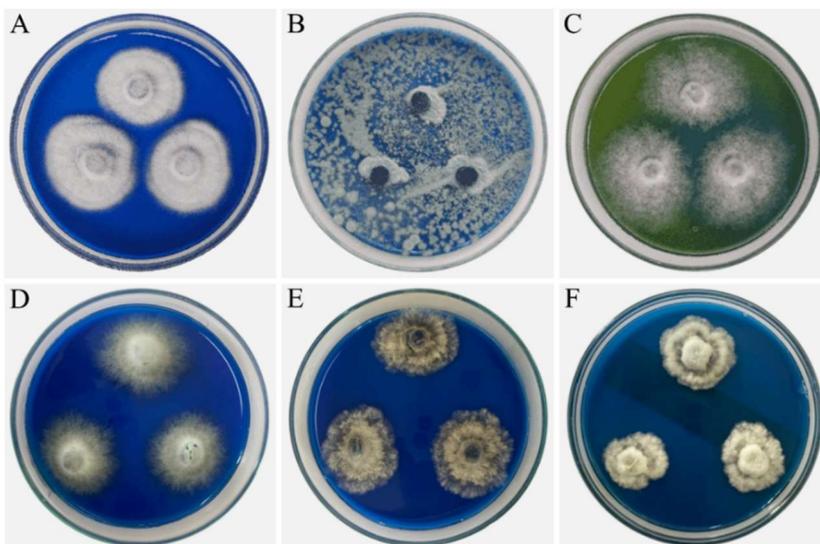
Fonte: Elaboração do próprio autor.

Figura 2 – Comparação entre o total de fungos endofíticos contra os isolados produtores de L-asparaginase de plantas medicinais amazônicas *Himatanthus sukuuba* e *Calycophyllum spruceanum*.



Fonte: elaboração do próprio autor.

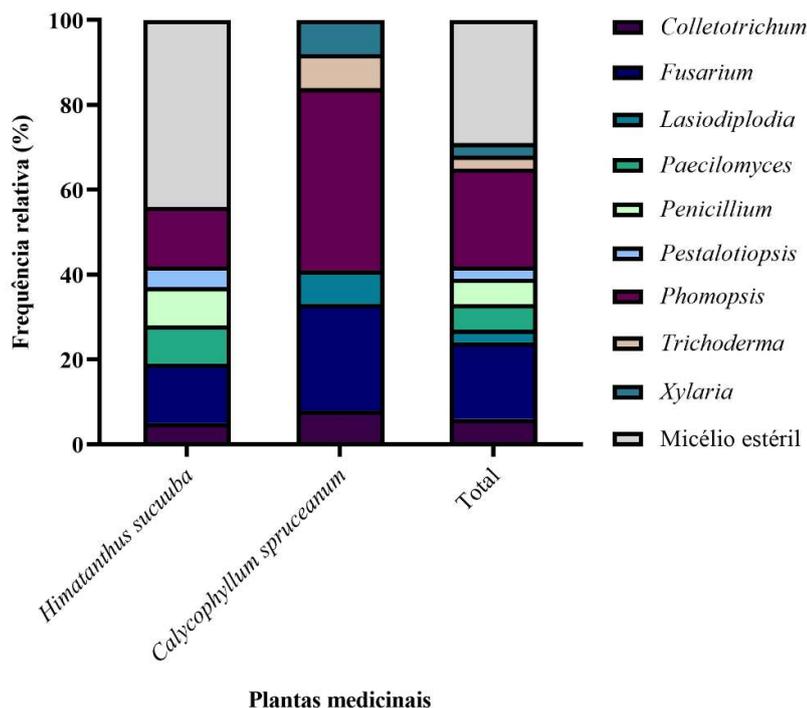
Figura 3 – Ensaio enzimático de L-asparaginase de fungos endofíticos das plantas medicinais amazônicas *Himatanthus sukuuba* (A) *Fusarium* sp. 1 (2.2853); (B) *Penicillium* sp. 2 (2.2825); e (C) *Phomopsis* sp. 3 (2.2859); e *Calycophyllum spruceanum* (D) *Fusarium* sp. 3 (2.3341); (E) *Phomopsis* sp. 1 (2.3043); e (F) *Xylaria* sp. 1 (2.2546).



Fonte: elaboração do próprio autor.

Do total de fungos endofíticos que apresentaram atividade enzimática, os isolados não identificados foram os mais representativos (29,41%), seguidos dos fungos pertencentes aos gêneros *Phomopsis* (23,53%) e *Fusarium* (17,65%) (Fig. 4).

Figura 4 – Frequência relativa de gêneros de fungos endofíticos isolados de plantas medicinais da Amazônia com atividade para a enzima L-asparaginase.



Fonte: elaboração do próprio autor.

A L-asparaginase é uma das enzimas terapêuticas mais eficientes no tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LAA) (Nakamura, Wilkinson e Woodruff, 1999). Plantas e microrganismos são capazes de produzir a enzima (Serquis e Oliveira, 2004). Microrganismos endofíticos, especialmente fungos, são fontes ricas de novos compostos bioativos (Hwang *et al.*, 2011). Alguns estudos já demonstraram a capacidade que fungos endofíticos têm de produzirem esta enzima (Silva *et al.*, 2018; Pádua *et al.*, 2019). Neste estudo, foram avaliadas a capacidade de fungos endofíticos associados às plantas medicinais Amazônicas de produzirem a enzima L-asparaginase. Um total de 38 fungos foram examinados quanto à atividade da L-asparaginase, onde 34 fungos (89,47%) demonstraram a capacidade de produzir a enzima extracelular.

Este é o primeiro relato da produção de L-asparaginase por fungos endofíticos associados às plantas medicinais Amazônicas *Himatanthus sucuba* e *Calycophyllum*

spruceanum. Os relatos sobre a produção da enzima L-asparaginase a partir de fungos são bastante escassos, particularmente no caso de fungos endofíticos, embora já seja comprovado os benefícios do uso desses microrganismos (Krishnapura *et al.*, 2015). Por serem eucarióticos e residirem no interior das plantas, é possível que a L-asparaginase secretada por fungos endofíticos possa ter baixa toxicidade para humanos (Strobel *et al.*, 2003).

Os fungos endofíticos positivos para a atividade da L-asparaginase pertenciam aos gêneros *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Trichoderma* e *Xylaria*. A enzima L-asparaginase pode ser produzida por muitas espécies de fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Penicillium* e *Phomopsis* (El-Gendy *et al.*, 2017, Prihanto *et al.*, 2019, Sreejai *et al.*, 2019).

Um estudo anterior relatou a atividade da L-asparaginase para espécies dos gêneros *Colletotrichum*, *Fusarium* e *Penicillium* (Chow e Ting, 2015). O gênero *Colletotrichum* abriga espécies que podem ser encontradas em uma diversidade de plantas, que incluem leguminosas, gramíneas e plantas medicinais (Chow e Ting, 2015). A espécie *Colletotrichum gloeosporioides* foi relatada como produtora de L-asparaginase, mostrando alta pureza e efeito anticancerígeno (Yap *et al.*, 2022).

De forma semelhante, espécies endofíticas de *Fusarium*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis* e *Xylaria* são amplamente distribuídos, tanto em climas tropicais quanto em climas temperados (Aweskamp *et al.*, 2009). Esses gêneros de fungos são conhecidos como produtores de uma variedade de compostos bioativos para aplicações agrícolas, médicas e ambientais (Gangadevi *et al.*, 2008; Yap *et al.*, 2021), como alcaloides e antibióticos (Kumara *et al.*, 2012), porém estudos com a L-asparaginase ainda é bastante escasso. O gênero *Fusarium* apresentou resultado positivo para produção de L-asparaginase, conforme observado em outros estudos (Thirunavukkarasu *et al.*, 2011; Chow e Ting, 2015).

A espécie *Fusarium proliferatum* (CCH) foi relatada como tendo alta atividade de L-asparaginase em avaliações qualitativas e quantitativas (Yap *et al.*, 2021), onde a produção de L-asparaginase foi afetada pela fonte de carbono. Nesse estudo, a produção de L-asparaginase pelo fungo endofítico *F. proliferatum* (CCH) diminuiu quando a concentração de glicose foi aumentada, porque a disponibilidade de glicose interfere na produção da enzima, uma vez que o fungo prefere utilizar uma fonte de carbono energeticamente eficiente (glicose) do que outras fontes de nitrogênio menos eficientes

para acompanhar as altas atividades metabólicas fúngicas (Adnan *et al.*, 2018; Yap *et al.*, 2021). Esse fato pode explicar o porquê de quatro isolados fúngicos avaliados no presente estudo não terem produzido a enzima L-asparaginase. A temperatura e o pH também são outras variáveis que podem afetar a produção da enzima extracelular (Meghavarnam e Janakiraman, 2017; Yap *et al.*, 2021).

A espécie *Phomopsis azadirachtae* foi avaliada quanto a produção de enzimas extracelulares, e além das enzimas avaliadas, a cepa também era capaz de produzir L-asparaginase (Vedashree *et al.*, 2013). O gênero *Lasiodiplodia* abriga espécies de fungos capazes de produzirem L-asparaginase. A enzima L-asparaginase produzida por *Lasiodiplodia theobromae* foi purificada e avaliada a atividade antileucêmica, apresentando atividade específica de 468,03 U/mg e atividade total de 84,4 U/mL (Moubasher *et al.*, 2022).

Vários trabalhos já demonstraram que fungos endofíticos dos gêneros *Penicillium* são fontes promissoras de L-asparaginase (Santos *et al.*, 2015, Silva *et al.*, 2018). Em um estudo com fungos endofíticos da espécie de planta *Cereus jamacaru*, de 33 isolados de *Penicillium*, quatro apresentaram a capacidade de produzir L-asparaginase (Santos *et al.*, 2015). Ao estudarem fungos endofíticos de plantas com propriedades anticancerígenas, Chow e Ting (2015) destacaram a espécie *Penicillium simplicissimum* como o terceiro maior produtor de L-asparaginase entre todos os isolados que apresentaram atividade enzimática.

A produção de metabólitos secundários por fungos endofíticos impacta fortemente os produtos farmacêuticos modernos, o que tem levado a exploração desse recurso biológico para tornar o processo mais vantajoso para uso humano (Banyal *et al.*, 2021). A importância industrial da L-asparaginase implica na busca por novas fontes de produção da enzima, contribuindo para aplicações biotecnológicas na indústria farmacêutica. Nossos resultados sugerem que espécies de plantas de importância medicinal são detentoras de uma diversidade de fungos endofíticos capazes de produzirem L-asparaginase, sendo necessários mais estudos voltados para a bioprospecção e caracterização da enzima produzida por esses microrganismos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As plantas medicinais amazônicas *Himatanthus sucuuba* e *Calycophyllum spruceanum* abrigam fungos endofíticos com potencial para a produção da enzima L-asparaginase, com destaque para as espécies dos gêneros *Colletotrichum*, *Fusarium*,

Lasiodiplodia, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Trichoderma* e *Xylaria* como os principais produtores.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Acre (UFAC) pelo apoio na realização da pesquisa.

Referências Bibliográficas

- ADNAN, M.; ZHENG, W.; ISLAM, W.; ARIF, M.; ABUBAKAR, Y.S.; WANG, Z.; LU, G. Carbon catabolite repression in filamentous fungi. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 48, p. 1-23, 2018.
- ALY, A.H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 1829-1845, 2011.
- AMARAL, A.C.F.; FERREIRA, J.L.P.; PINHEIRO, M.L.B.; SILVA, J.R.A. Monograph of *Himatanthus sucuuba*, a plant of Amazonian folk medicine. **Pharmacognosy Reviews**, v. 1, n. 2, p. 305-313, 2007.
- AWESKAMP M.M.; WOUDEBERG, J.H.C.; GRUYTER J.; TURCO, E.; GROENEWALD, J.Z., CROUS P.W. Development of taxon-specific sequence characterized amplified region (SCAR) markers based on actin sequences and DNA amplification fingerprinting (DAF): a case study in the *Phoma exigua* species complex. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, n. 3, p. 403-414, 2009.
- AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L.; LACAVALA, P.T.; MARCO, J.; LIMA, A.O.S.; SOBRAL, J.K.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Meios de cultura utilizados para o estudo de microrganismos, em: Pizzirani-Kleiner, A.A. et al. (Eds.), **Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. CALO, Piracicaba, p. 167, 2010.
- BALIZA, D.D.M.S.; SILVA, P.W.P.; LEÃO, G.M.A.; BASTOS, E.G.P.; SILVA, J.F.M.; PIMENTA, R.S. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados à mirindiba, *Buchenavia tomentosa* (Combretaceae). **Desafios**, v. 1, n. 1, p. 236-248, 2023.
- BANYAL, A.; THAKUR, V.; THAKUR, R.; KUMAR, P. Endophytic microbial diversity: a new hope for the production of novel anti-tumor and anti-HIV agents as future therapeutics. **Current Microbiology**, v. 78, n. 5, p. 1699-1717, 2021.
- BARNETT, H.; HUNTER, B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. St. Paul, MN, The American Phytopathological Society, p. 218, 1999.
- BATOOL, T.; MAKKY, E.A.; JALAL, M.; YUSOFF, M.M. A comprehensive review on L-asparaginase and its applications. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 178, n. 5, p. 900-923, 2015.
- BUNGIHAN, M.E.; TAN, M.A.; KITAJIMA, M.; KOGURE, N.; FRANZBLAU, S.G.; CRUZ, T.E.D; TAKAYAMA, H.; NONAT, M.G. Bioactive metabolites of *Diaporthe* sp. P133, an endophytic fungus isolated from *Pandanus amaryllifolius*. **Journal of Natural Medicine**, v. 65, n. 3-4, p. 606-609, 2011.

- CAETANO, R.S.; SOUZA, A.C.R.; FEITOZA, L.F. O uso de plantas medicinais utilizadas por frequentadores dos ambulatórios Santa Marcelina, Porto Velho - RO. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 7, n. 1, p. 55-63, 2014.
- CASTELLANI, A. The "water cultivation" of pathogenic fungi. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, p. 283-284, 1963.
- CASTILLO, D.; AREVALO, J.; HERRERA, F.; RUIZ, C.; ROJAS, R.; RENGIFO, E.; VAISBERG, A.; LOCK, O.; LEMESRE, J.L.; GORNITZKA, H.; SAUVAIN, M. Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 410-414, 2007.
- CHAND, S.; MAHAJAN, R.V.; PRASAD, J.P.; SAHOO, D.K.; MIHOOLIYA, K.N.; DHAR, M.S.; SHARMA, G. A comprehensive review on microbial L-asparaginase: bioprocessing, characterization, and industrial applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 67, p. 619-647, 2020.
- CHANDRA, S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, p. 47-59, 2012.
- CHEN, L.; ZHANG, Q.Y.; JIA, M.; MING, J.L.; YUE, W.; RAHMAN, K.; QIN, L.P.; HAN, T. Endophytic fungi with antitumor activities: their occurrence and anticancer compounds. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, p. 454-473, 2016.
- CHOW, Y.Y.; TING, A.S.Y. Endophytic L-asparaginase-producing fungi from plants associated with anticancer properties. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 6, p. 869-876, 2015.
- DHANKHAR, S.; DHANKHAR, S.; YADAV, J.P. Investigations towards new antidiabetic drugs from fungal endophytes associated with *Salvadora oleoides* Decne. **Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 4, p. 624-632, 2013.
- EL-GENDY, M.M.A.A.; AL-ZAHRANI, S.A.A.; EL-BONDKLY, A.M.A. Construction of potent recombinant strain through intergeneric protoplast fusion in endophytic fungi for anti-cancerous enzymes production using rice straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, n. 1, p. 30-50, 2017.
- EL-GENDY, M.M.A.A.; AWAD, M.F.; EL-SHENAWY, F.S.; EL-BONDKLY, A.M.A. Production, purification, characterization, antioxidant and antiproliferative activities of extracellular L-asparaginase produced by *Fusarium equiseti* AHMF4. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 4, p. 2540-2548, 2021.
- GANGADEVI V.; SETHUMEENAI S.; YOGESWARI S., RANI G. Triagem de fungos endofíticos isolados de uma planta medicinal, *Acalypha indica* L. para atividade antibacteriana. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 1, p. 1-6, 2008.
- GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008.
- HATAMZADEH, S.; RAHNAMA, K.; NASROLLAHNEJAD, S.; FOTOUHIFAR, K.B.; HEMMATI, K.; WHITE, J.F.; TALIEI, F. Isolation and identification of L-asparaginase-producing endophytic fungi from the Asteraceae family plant species of Iran. **PeerJ**, v. 8, e8309, 2020.
- HERRERA-CALDERÓN, O.; CALERO-ARMIJOS, L.L.; CARDONA-G, W.; HERRERA-R, A.; MORENO, G.; ALGARNI, M.A.; ALQARNI, M.; BATIHA, G.E.S. Phytochemical screening of *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson (Apocynaceae)

latex, *in vitro* cytotoxicity and incision wound repair in mice. **Plants (Basel)**, v. 10, n. 10, p. 1-23, 2021.

HOSAMANI, R.; KALIWAL, B.B. Isolation, molecular identification and optimization of fermentation parameters for the production of L-asparaginase, an anticancer agente by *Fusarium equisetii*. **International Journal of Microbiology Research**, v. 3, p. 108-119, 2011.

HWANG, J.S.; YOU, Y.H.; BAE, J.J.; KHAN, S.A.; KIM, J.G.; CHOO, Y.S. Effects of endophytic fungal secondary metabolites on the growth and physiological response of *Carex kobomugi*. **Coastal Journal of Coastal Research**, v. 27, p. 544-548. 2011.

KRISHNAPURA, PRAJNA RAO, PRASANNA D. Belur: isolation and screening of endophytes from the rhizomes of some Zingiberaceae plants for L-asparaginase production. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 46, n. 3, 2015.

KUMAR, N.S.M.; RAMASAMY, R.; MANONMANI, H.K. Production and optimization of L-asparaginase from *Cladosporium* sp. using agricultural residues in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 150-158, 2013.

KUMARA, P.M.; ZUEHLKE, S.; PRITI, V.; RAMESHA, B.T.; SHWETA, S.; RAVIKANTH, G.; VASUDEVA, R.; SANTHOSHKUMAR, T.R.; SPITELLER, M.; SHAANKER, R.M. *Fusarium proliferatum*, an endophytic fungus from *Dysoxylum binectariferum* Hook.f, produces rohitukine, a chromane alkaloid possessing anti-cancer activity. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, p. 323-329, 2012.

MCCREDIE, K.B.; HO, D.H.W. L-asparaginase for treatment of cancer. **Cancer Journal for Clinicians**, v. 23, p. 220-227, 1973.

MEGHAVARNAM, A.K.; JANAKIRAMAN, S. Solid state fermentation: an effective fermentation strategy for the production of L-asparaginase by *Fusarium culmorum* (ASP-87). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 124-130, 2017.

MORAIS, S.M.; CAVALCANTI, E.S.B.; COSTA, S.M.O.; AGUIAR, L.A. Açõo antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1, p. 315-320, 2009.

MORENO, E.; VARUGHESE, T.; SPADAFORA, C.; ARNOLD, A.E.; COLEY, P.D.; KURSAR, T.A.; GERWICK, W.H.; CUBILLA-RIOS, L. Chemical constituents of the new endophytic fungus *Mycosphaerella* sp. nov. and their anti-parasitic activity. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 6, p. 835-840, 2011.

MOUBASHER, H.A.; BASSEM, A.B.; YOSRA, A.H.; AMNAH, M.A.; AHMED, A.A.; DONIA, H.S.; AHMED, M.A.A. Insights into asparaginase from endophytic fungus *Lasiodiplodia theobromae*: purification, characterization and antileukemic activity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 2, p. 1-14, 2022.

MUNEER, F.; SIDDIQUE, M.H.; AZEEM, F.; RASUL, I.; MUZAMMIL, S.; ZUBAIR, M.; AFZAL, M.; NADEEM, H. Microbial L-asparaginase: purification, characterization and applications. **Archives of Microbiology**, v. 202, p. 967-981, 2020.

NAKAMURA, C.T.; WILKINSON, R.; WOODRUFF, K. Pancreatitis and perotitis following therapy with L-asparaginase. **International Journal of Pediatrics**, v. 14, p. 25-27, 1999.

PÁDUA, A.P.S.L.; FREIRE, K.T.L.S.; OLIVEIRA, T.G.L.; SILVA, L.F.; ARAÚJO-MAGALHÃES, G.R.; AGAMEZ-MONTALVO, G.S.; SILVA, I.R.; BEZERRA, J.D.P.; SOUZA-MOTTA, S.M. Fungal endophyte diversity in the leaves of the

- medicinal plant *Myracrodruon urundeuva* in a Brazilian dry tropical forest and their capacity to produce L-asparaginase. **Acta Botanica Brasilica**, v. 33, n.1, p. 39-49, 2019.
- PATIL, M. P., PATIL, R. H., MAHJESHWARI, V. L. A novel and sensitive agar plug assay for screening of asparagine-producing endophytic fungi from *Aegle marmelos*. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 56, p. 175-177, 2012.
- PEIXOTO, H., ROXO, M., KOOLEN, H., SILVA, F., SILVA, E., BRAUN, M. S., WANG, X., WINK, M. *Calycophyllum spruceanum* (Benth.), the Amazonian “Tree of Youth” Prolongs Longevity and Enhances Stress Resistance in *Caenorhabditis elegans*. **Molecules**, v. 23, n. 534, p. 1-15, 2018.
- PRIHANTO, A.A., I.O. CAISARIYO, K.A. PRADARAMESWARI. *Aspergillus* sp. as a potential producer for L-asparaginase from mangrove *Avicennia germinans*. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 230, n. 1, p. 1-7, 2019.
- REBOUÇAS, S.O.; SILVA, J.; GROFF, A.A.; NUNES, E.A.; IANISTCKI, M.; FERRAZ, A.B.F. The antigenotoxic activity of latex from *Himatanthus articulatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 2, p. 389-396, 2012.
- RIBEIRO-GOMES M. F. DINIZ, F. V.; ARAUJO, A. V.; PETERS, L. P.; CARVALHO, C. M. Diversity and antibacterial activity of endophytic fungi of the Amazonian medicinal plant sucuba [*Himatanthus sucuuba* (Spruce ex Müll. Arg.) Woodson]. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v. 46, n. 178, p. 217-232, 2022.
- RODRIGUEZ, R.J.; WHITE JR, J.F.; ARNOLD, A.E.; REDMAN, R.S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, v. 182, n. 2, p. 314-330, 2009.
- SANTOS, M.G.S.; BEZERRA, J.D.P.; SVEDESE, V.M.; SOUSA, M.A.; SILVA, D.C.V.; MACIEL, M.H.C.; PAIVA, L.M.; PORTO, A.L.F.; SOUZA-MOTTA, C.M. Screening of endophytic fungi from cactus of the Brazilian tropical dry forest according to their L-asparaginase activity. **Sydowia**, p. 147-156, 2015.
- SANTOS, A. B.; RIBEIRO-OLIVEIRA, J. P.; CARVALHO, C. M. Sobre a botânica, a etnofarmacologia e a química de *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex K. Schum. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 383-389, 2016.
- SERQUIS, M., OLIVEIRA, E. M. M. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 489-492, 2004.
- SHRIVASTAVA, A., A.A. KHAN, M. KHURSHID, M.A. KALAM, S.K. JAIN, P.K. SINGHAL Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agente. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 100, p. 1-10, 2016.
- SILVA, J.R.A.; REZENDE, C.M.; PINTO, A.C.; AMARAL, A.C.F. Cytotoxicity and antibacterial studies of iridoids and phenolic compounds isolated from the latex of *Himatanthus sucuuba*. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 43, p. 7357-7360, 2010.
- SILVA L. F.; FREIRE K. T. L. S.; ARAÚJO-MAGALHÃES G. R.; et al. *Penicillium* and *Talaromyces* endophytes from *Tillandsia catimbauensis*, a bromeliad endemic in the Brazilian tropical dry forest, and their potential for L-asparaginase production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, v. 162, p.1-12, 2018.
- SILVA, M.B.; SILVA, M.P.; JÚNIOR, J.D.D.R.; LIMA, C.A.C.; SOUZA, A.O. Therapeutics activities of Amazonian plant *Himatanthus sucuuba* (Spruce ex Müll. Arg.) Woodson (Apocynaceae): A Review. **Journal of Advances in Biology & Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 1-14, 2021.

SOPALUN, K.; IAMTHAM, S. Isolation and screening of extracellular enzymatic activity of endophytic fungi isolated from Thai orchids. **South African Journal of Botany**, v. 134, p. 273-279, 2020.

BENCHAMIN, D.; SREEJAI, R.; ATHIRA, L.; JENSY, R. F.; SUJITHA, S.; KURUP, B.S. Production and characterization of L-asparaginase isolated from *Aspergillus fumigatus*. **The Pharma Innovation Journal**, v. 8, n. 3, p. 220-223, 2019.

STROBEL, G; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

TAUCHEN, J.; LOJKA, B.; HLÁSNÁ-ČEPKOVÁ, P.; SVOBODOVÁ, E.; DVOŘÁKOVÁ, Z.; ROLLO, A. Morphological and genetic diversity of *Calycophyllum spruceanum* (Benth) k. Schum (Rubiaceae) in Peruvian amazon. **Agricultura Tropica et Subtropica**, v. 44, n. 4, p. 212-218, 2011.

THEANTANA, T.; HYDE, K.D.; LUMYONG, S. Asparaginase production by endophytic fungi isolated some Thai medicinal plants. **KMITL Science and Technology Journal**, v. 7, p. 13-18, 2007.

THIRUNAVUKKARASU, N.; SURYANARAYANAN, T.S.; MURALI, T.S.; RAVISHANKAR, J.P.; GUMMADI, S.N. L-asparaginase a partir de endófitos fúngicos derivados marinhos de algas marinhas. **Micosfera**, v. 2, p. 147-155, 2011.

VEDASHREE, S.; SATEESH, M.K.; LAKSHMEESHA, T.R.; MOHAMMED, S.S.; VEDAMURTHY, A.K. Screening and assay of extracellular enzymes in *Phomopsis azadirachtae* causing die-back disease of neem. **Journal of Agricultural Technology**, v. 9, n. 4, p. 915-927, 2013.

VERMA, V.C.; GOND, S.K.; KUMAR, A.; KHARWAR, R.N.; STROBEL, G.A. The endophytic mycoflora of bark, leaf, and stem tissues of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) from Varanasi (India). **Microbial Ecology**, v. 54, p. 119-125, 2007.

WEN, L.; HADDAD, M.; FERNÁNDEZ, I.; ESPINOZA, G.; RUIZ, C.; NEYRA, E.; BUSTAMANTE, B.; ROJAS, R. Actividad antifúngica de cuatro plantas usadas en la medicina tradicional peruana: Aislamiento de 3' - formil - 2',4',6' - trihidroxidihidrochalcona, principio activo de *Psidium acutangulum*. **Revista de la Sociedad Química del Perú**, v. 77, n. 3, p. 199-204, 2011.

YAP, L.S.; LEE, W.L.; TING, A.S.Y. Bioprocessing and purification of extracellular L-asparaginase produced by endophytic *Colletotrichum gloeosporioides* and its anticancer activity. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 22, p. 1-19, 2022.

YAP, L.S.; LEE, W.L.; TING, A.S.Y. Optimization of L-asparaginase production from endophytic *Fusarium proliferatum* using OFAT and RSM and its cytotoxic evaluation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 191, p. 106358, 2021.

YAP, L.-S.; LEE, W.-L.; TING, A.S. Endophytes from malaysian medicinal plants as sources for discovering anticancer agents, medicinal plants and fungi: recent advances in research and development. **Springer**, p. 313-335, 2017.

ZULETA, L.M.C; CAVALHEIRO, A.J.; SILVA, D.H.S.; FURLAN, M.; YOUNG, M.C.M.; ALBUQUERQUE, S.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V.S. Secoiridoids from *Calycophyllum spruceanum* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v. 64, n. 2, p. 549-553, 2003.