



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ANTONIO DHEYSON DA SILVA OLIVEIRA

**ISOLAMENTO E *SCREENING* DE FUNGOS PRODUTORES  
DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE BACUPARI (*Garcinia  
gardneriana*) EM FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA**

PALMAS – TO  
2022

ANTONIO DHEYSON DA SILVA OLIVEIRA

**ISOLAMENTO E *SCREENING* DE FUNGOS PRODUTORES  
DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE BACUPARI (*Garcinia  
gardneriana*) EM FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA**

Elaboração de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

**Linha de pesquisa do PPGCTA:** Biotecnologia aplicada à indústria de alimentos.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Claudia Cristina Auler do Amaral Santos.

**Coorientador:** Dr. Fabrício Coutinho de Paula Elias.

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

---

O48i Oliveira, Antonio Dheyson da Silva.

Isolamento e screening de fungos produtores de enzimas hidrolíticas de bacupari (*Garcinia gardneriana*) em fermentação espontânea. / Antonio Dheyson da Silva Oliveira. – Palmas, TO, 2022.

67 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2022.

Orientador: Claudia Cristina Auler do Amaral Santos

Coorientador: Fabrício Coutinho de Paula Elias

1. Bacupari. 2. Fungos. 3. Microrganismos. 4. Enzimas. I. Título

**CDD 664**

---

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).**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ANTONIO DHEYSON DA SILVA OLIVEIRA

**ISOLAMENTO E SCREENING DE FUNGOS PRODUTORES DE ENZIMAS  
HIDROLÍTICAS DE BACUPARI (*Garcinia gardneriana*) EM FERMENTAÇÃO  
ESPONTÂNEA**

Dissertação DEFENDIDA e APROVADA em 03 de fevereiro de 2022, pela Banca  
Examinadora constituída pelos membros:



---

Prof. Dr. Willian James Nogueira Lima/UFGM



---

Prof. Dr. Raphael Sanzio Pimenta - PPGCTA/UFT



---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Claudia Cristina Auler do Amaral Santos - PPGCTA/UFT

À Deus e aos meus pais,  
Maria Zuleide e Deusimar,  
Dedico.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado vida, graça e sabedoria para lutar todos os dias contra as adversidades e batalhas cotidianas. Só consigo expressar amor e gratidão.

A minha família, minha base e fortaleza, que esteve todos esses anos me apoiando e dando forças para continuar até o fim, sem eles não conseguiria nada. Minha mãe, meu pai, minhas irmãs Geisa, Dieila, Dheyslla, meus sobrinhos Bianca e Miguel, meu cachorro Frederico, que sempre me recebe com muita alegria e aos meus tios, primos e cunhados que estiveram presentes nesta minha jornada, a vocês dou meus sinceros agradecimentos. Obrigado por tudo.

Aos meus amigos que tive o privilégio que conviver durante o mestrado. Jessica, muito obrigado por tudo, pela paciência, pela ajuda, por me aguentar, tivemos muitos momentos memoráveis no laboratório, muito obrigado por sua amizade. Rose, companheira do laboratório, das madrugadas escrevendo, de muitas risadas e estresses, muito obrigado. Fabriele, esteve me ajudando bastante, que também compartilhou das alegrias e humilhações da universidade, muito perrengue nos laboratórios, meus sinceros agradecimentos.

Aos meus amigos, Athos Cristofolini e Gilberto Mascarenhas (OS DE VERDADE), obrigado por estarem ao meu lado sempre, me apoiando e suportando cada momento de estresse e ansiedade. Obrigado por cada oração, cada palavra de conforto, cada mensagem de preocupação. Amigos, os quais, Deus me deu, que compartilham dos mesmos sonhos e estão sempre dispostos a ajudar. Muito, muito obrigado!!

Ao meu grupo, AMIGOS DO ROLÊ, que é formado por pessoas incríveis. Agradeço por cada momento que tivemos juntos, por serem o refúgio nos dias de aperto. Por aguentar cada reclamação, por cada oração e palavras de incentivos. Acsa, Athos, Bia, Dheyslla, Gilberto, Juliana, Looh, Matheus. Meu muito obrigado!!

A minha orientadora Claudia Auler, obrigado por acreditar em mim, por cada ensinamento e pelos votos de confianças que me deu. Sou grato por cada bronca, conselhos, sei que isso fez e fará de mim uma pessoa com melhores perspectivas.

Por fim, a Universidade Federal do Tocantins juntamente com o Laboratório de Microbiologia de Alimentos, agradeço pelo espaço cedido para realizar esta conquista.

*“Sonhos determinam o que você quer.  
Ação determina o que você conquista.”*

ALDO NOVAK

## RESUMO

Ainda hoje existem poucos estudos analisando a biodiversidade microbiana da Amazônia. Os frutos amazônicos podem apresentar-se como habitats primários e fonte de energia no ciclo de vida de muitos fungos, e estes microrganismos são reconhecidamente potenciais fontes de enzimas hidrolíticas. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a microbiota fúngica autóctone, bem como isolar e selecionar fungos filamentosos e leveduras do fruto amazônico bacupari (*Garcinia gardneriana*) em fermentação espontânea, de acordo com seu potencial de produção das enzimas pectinase, invertase e lipase. Os frutos de bacupari integrais (casca, polpa e semente) foram macerados em sacos plásticos esterilizados e deixados para fermentar durante 15 dias a 30 °C. Amostras para o acompanhamento das alterações físico-químicas e as análises microbiológicas foram coletadas nos dias 0, 3, 6, 9, 12 e 15 de fermentação. A acidez titulável do fruto *in natura* era de 1,24 (g/100g ácido cítrico), durante a fermentação a acidez titulável diminuiu, de 1,3 no tempo 3 para 0,5 g de ácido láctico/100 g do fruto no tempo 15, o pH oscilou ligeiramente, atingindo 6,61 no dia 15, próximo ao encontrado no início da fermentação. A umidade, os teores de fibra bruta e de cinzas, apresentaram ligeira redução, enquanto os lipídeos e proteínas aumentaram durante o processo fermentativo do fruto. Os açúcares redutores totais foram parcialmente consumidos (72,7% ou 1,7g/100g), o que era esperado devido ao seu consumo pelos microrganismos. Na identificação da comunidade fúngica obteve-se um total de 59.988 de sequências e 19 espécies fúngicas diferentes, sendo o tempo 6 com a maior abundância. A população de fungos variou de  $5,30 \times 10^5$  UFC/g a  $8,41 \times 10^5$  UFC/g, durante a fermentação espontânea do bacupari, sendo 106 leveduras e 22 fungos filamentosos isolados. As colônias de leveduras apresentaram-se majoritariamente circulares, brancas, com margens inteiras, opacas e planas. As células leveduriformes eram predominantemente ovoidais. Os fungos filamentosos apresentaram-se comumente de forma hifosa, margem filamentosa, cor roxa, sem elevação. Na seleção de linhagens em placas, 106 isolados (100%) produziram invertase, 23 isolados (21,69%) secretaram lipase e nenhum produziu pectinase. Em avaliação quantitativa 4 fungos filamentosos demonstraram potencial de produção das enzimas hidrolíticas, sendo o BCF 5.5, o melhor produtor de invertase (1,0 U/mL) e o BCF 23.2, se destacou na produção de lipase (0,05 U/mL). Dentre as leveduras, os isolados BCL 5.1 e BCL 18.3 produziram 0,8 U/mL de invertase e a BCL 29.4 produziu 0,07 U/mL de lipases.

**Palavras-chave:** Bacupari; Fungos; Microrganismos; Isolados; Enzimas



## ABSTRACT

Even today there are few studies analyzing the microbial biodiversity of the Amazon. Amazonian fruits can be the primary habitat and source of energy in the life cycle of many fungi, and these microorganisms are recognized as potential sources of hydrolytic enzymes. In this sense, the objective of this work was to characterize the autochthonous fungal microbiota, as well as to isolate and select filamentous fungi and yeasts from the Amazonian bacupari fruit (*Garcinia gardneriana*) in spontaneous fermentation, according to their potential for the production of pectinase, invertase and lipase enzymes. Whole bacupari fruits (peel, pulp and seed) were macerated in sterilized plastic bags and left to ferment for 15 days at 30 °C. Samples for monitoring the physicochemical changes and microbiological analyzes were collected on days 0, 3, 6, 9, 12 and 15 of fermentation. The titratable acidity of the fresh fruit was 1.24 (g/100g citric acid), during fermentation the titratable acidity decreased from 1.3 at time 3 to 0.5 g lactic acid/100 g fruit at time 15, the pH fluctuated slightly, reaching 6.61 on day 15, close to that found at the beginning of fermentation. Moisture, crude fiber and ash contents showed a slight reduction, while lipids and proteins increased during the fermentation process of the fruit. Total reducing sugars were partially consumed (72.7% or 1.7g/100g), which was expected due to their consumption by microorganisms. In the identification of the fungal community, a total of 59,988 sequences and 19 different fungal species were obtained, being time 6 with the highest abundance. The fungal population ranged from  $5.30 \times 10^5$  CFU/g to  $8.41 \times 10^5$  CFU/g, during the spontaneous fermentation of bacupari, with 106 yeasts and 22 filamentous fungi isolated. The yeast colonies were mostly circular, white, with entire, opaque and flat margins. Yeast cells were predominantly ovoid. The filamentous fungi were commonly presented as hyphae, filamentous margin, purple in color, without elevation. In the selection of strains on plates, 106 isolates (100%) produced invertase, 23 isolates (21.69%) secreted lipase and none produced pectinase. In a quantitative evaluation, 4 filamentous fungi showed potential for the production of hydrolytic enzymes, with BCF 5.5, the best producer of invertase (1.0 U/mL) and BCF 23.2, standing out in the production of lipase (0.05 U/mL). Among yeasts, isolates BCL 5.1 and BCL 18.3 produced 0.8 U/mL of invertase and BCL 29.4 produced 0.07 U/mL of lipases.

**Keywords:** Bacupari; Fungi; Microorganisms; Isolates; Enzymes

## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. (a) Bacuparizeiro (b) Frutos maduros.....	17
Figura 2. Esquema de reação catalisada pela invertase.....	22
Figura 3. Reações catalisadas por lipases.....	24
Figura 4. Reações catalisadas pela pectinase.....	25
Figura 5. Frutos de bacupari após a remoção das sujidades.....	27
Figura 6. Amostras do bacupari com maior abundância microbológica fúngica.....	41
Figura 7. Amostras do bacupari com maior diversidade microbológica fúngica.....	42
Figura 8. Proporção, quantidade e diversidade das espécies do bacupari em fermentação espontânea.....	42
Figura 9. População de fungos durante fermentação espontânea do fruto integral de bacupari.....	45
Figura 10. Formação de halos de hidrólise em fungos filamentosos e leveduras produtoras de invertase e lipase.....	50

## LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Alterações físico-químicas do Bacupari integral durante a fermentação espontânea.....	38
Tabela 2. Consumo de açúcares e produção de etanol durante os tempos fermentação espontânea do bacupari.....	40
Tabela 3. Identificação da comunidade de fungos filamentosos e leveduras no bacupari durante fermentação espontânea.....	44
Tabela 4. Características micromorfológicas dos fungos filamentosos isolados do Bacupari e sua prevalência nos diferentes tempos de fermentação espontânea.....	46
Tabela 5. Características micromorfológicas das leveduras isoladas do Bacupari e sua prevalência nos diferentes tempos de fermentação espontânea.....	47
Tabela 6. Características micromorfológicas das leveduras isoladas do Bacupari e sua prevalência nos diferentes tempos de fermentação espontânea.....	48
Tabela 7. Análise qualitativa de fungos filamentosos e de leveduras quanto ao seu potencial de produção de invertase, lipase e pectinase em placas.....	49
Tabela 8. Índice Enzimático de produção de lipase dos fungos filamentosos e leveduras isolados de bacupari em fermentação espontânea.....	51
Tabela 9. Atividade enzimática de invertase e lipase dos fungos filamentosos e leveduras isoladas do bacupari em fermentação espontânea.....	53

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
2.1. Objetivo geral .....	16
2.2. Objetivos específicos .....	16
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
3.1. Biodiversidade Amazônica.....	16
3.2. Bacupari.....	17
3.3. Os Fungos.....	18
3.3.1. Fungos Filamentosos.....	19
3.3.2. Leveduras.....	20
3.4. Enzimas: Invertase, Lipase e Pectinase.....	21
3.4.1. Invertase.....	22
3.4.2. Lipase.....	23
3.4.3. Pectinase.....	25
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
4.1. Limpeza e sanitização do fruto .....	27
4.2. Fermentação espontânea dos frutos .....	27
4.3. Caracterização físico-química dos frutos em fermentação espontânea .....	28
4.3.1. Acidez .....	28
4.3.2. pH.....	28
4.3.3. Teor de umidade.....	28
4.3.4. Lipídeos.....	29
4.3.5. Proteínas .....	29
4.3.6. Cinzas.....	30
4.3.7. Fibra bruta .....	30
4.3.8. Açúcares redutores totais .....	30
4.4. Determinação de carboidratos e etanol.....	31
4.5. Identificação molecular da comunidade fúngica do fruto de Bacupari durante a fermentação espontânea.....	31
4.6. Isolamento dos fungos.....	31
4.7. Caracterização morfológica e isolamento .....	33

<b>4.8. Preservação dos fungos.....</b>	<b>34</b>
<b>4.9. Seleção das linhagens em placas do potencial enzimático dos fungos isolados a partir de meios de cultivo seletivos e diferenciais.....</b>	<b>34</b>
4.9.1. Seleção de fungos produtores invertase .....	34
4.9.2 Seleção de fungos produtores de lipase .....	34
4.9.3. Seleção de fungos produtores de pectinase.....	35
<b>4.10. Índice enzimático.....</b>	<b>35</b>
<b>4.11. Seleção de linhagens de fungos filamentosos e leveduras produtores de invertase e lipase a partir de cultivos submersos.....</b>	<b>36</b>
4.11.1. Determinação da atividade de invertase.....	37
4.11.2. Determinação da atividade de lipase.....	37
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>5.1. Caracterização físico-química do fruto em fermentação espontânea .....</b>	<b>38</b>
<b>5.2. Determinação de carboidratos e etanol.....</b>	<b>40</b>
<b>5.3. Quantificação e isolamento dos fungos .....</b>	<b>45</b>
<b>5.4. Caracterização morfológica dos isolados .....</b>	<b>46</b>
<b>5.5. Seleção de fungos produtores de pectinase, lipase e invertase. ....</b>	<b>48</b>
<b>5.6. Índice enzimático - IE .....</b>	<b>51</b>
<b>5.7. Determinação da atividade enzimática de invertase e lipase dos fungos filamentosos e leveduras.....</b>	<b>53</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>55</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Floresta Amazônica é a maior floresta tropical do mundo, possui uma área que cobre 4,1 milhões de quilômetros quadrados. Apesar da diversidade estudada em plantas, existem poucos estudos analisando a biodiversidade microbiana da Amazônia. No Brasil a biodiversidade amazônica é um dos recursos mais valiosos para região, para o país e o mundo, e demonstra um grande potencial para o desenvolvimento de novas tecnologias e bioprodutos. No entanto, é necessário o uso sustentável desta biodiversidade, pois esse patrimônio é uma reserva de valor pelos seus possíveis usos, além dos benefícios econômicos e sociais que pode trazer. Alguns exemplos da demanda por biodiversidade e bioprodutos estão nas indústrias fitoterápica e farmacêutica, de cosméticos, de enzimas, além da indústria de alimentos e bebidas (FONSECA *et al.*, 2018; COSTA E ALVES, 2018; ZIMMER *et al.*, 2020).

*Garcinia gardneriana* é popularmente conhecida como “bacupari”, “bacopari”, “bacopari-miúdo” ou “mangostão-amarelo”. O fruto é amarelo, contendo uma substância branca, mucilaginosa, doce e comestível. Os frutos do bacupari são importantes na alimentação de populações locais, que os consomem *in natura* e na forma de sucos. Por outro lado, esta espécie apresenta variada composição química com atividades biológicas distintas, e vem ganhando bastante destaque devido ao seu potencial medicinal. Investigações farmacológicas mostraram atividades antianafilática, antimicrobiana, antiparasitária e antioxidante. O bacupari tem sido usado na medicina tradicional brasileira para tratamento de tumores, inflamação do trato urinário, artrite e alívio da dor (GUIMARÃES *et al.*, 2004; PEIXOTO *et al.*, 2005; PESCE, 2011; SANTA-CECÍLIA *et al.*, 2013; CORRÊA *et al.*, 2010).

Os frutos servem como habitats de muitos microrganismos que colonizam a superfície (epifíticos) ou que vivem dentro de seus tecidos (endofíticos), estando intimamente associados ao desenvolvimento, preservação pós-colheita e controle de qualidade destes frutos. Os frutos amazônicos representam um habitat primário e fonte de energia no ciclo de vida de muitos fungos, alguns dos quais são específicos do hospedeiro e cuja sobrevivência depende da presença no hospedeiro (ABDELFAHATTAH *et al.*, 2016; SHEN *et al.*, 2018).

A produção enzimática por fungos endofíticos é variável, estando relacionada à especificidade entre o fruto hospedeiro e o fungo. Nos fungos endofíticos estão envolvidas enzimas hidrolíticas como pectinases e lipases, para facilitar a entrada dos endófitos no tecido vegetal por aberturas naturais. Essas enzimas funcionam também como um mecanismo de resistência para superar as defesas do hospedeiro contra invasão microbiana e/ou para obter

nutrientes do hospedeiro (TAN E ZOU, 2001; POLIZELI, *et al.*, 1991).

As enzimas aceleram a velocidade de reações bioquímicas, sendo catalisadoras. Não são consumidas durante todo o processo bioquímico e assim geram benefícios, não apenas em processos naturais, mas também para a biotecnologia industrial, como exemplos a invertase, lipase e pectinase. A invertase é uma enzima comercialmente importante usada para a hidrólise da sacarose, é amplamente utilizada nas indústrias de alimentos e bebidas, assim como nas indústrias cosmética e farmacêutica. As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise da ligação éster de substratos lipídicos formando ácidos graxos e glicerol. Bem como, as lipases podem catalisar reações em meio não aquoso como: esterificação, interesterificação e transesterificação. As pectinases podem ser aplicadas nas indústrias de alimentos e bebidas em vários processos como clarificação de suco, produção de vinho e extração de óleo vegetal (MOREIRA, 2020; SINGH, KUMAR, 2018; MURUGAN *et al.*, 2020).

O estudo do processo fermentativo espontâneo de frutos é um método que possibilita a seleção e identificação de novas linhagens da biodiversidade brasileira, e conseqüentemente, permite explorar de forma biotecnológica o potencial desses microrganismos para a produção de enzimas. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar a microbiota fúngica, bem como isolar e selecionar fungos filamentosos e leveduras selvagens do bacupari em fermentação espontânea, de acordo com seu potencial de produção lipase, pectinase e invertase.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Conhecer a comunidade fúngica autóctone do fruto amazônico bacupari (*Garcinia gardneriana*) em fermentação espontânea, bem como isolar e selecionar fungos filamentosos e leveduras selvagens, de acordo com seu potencial de produção de enzimas hidrolíticas: lipase, pectinase e invertase.

### 2.2. Objetivos específicos

- Realizar o processo de fermentação espontânea do bacupari;
- Determinar alterações físico-químicas durante a fermentação espontânea do fruto bacupari: Acidez titulável total, pH, Umidade, Fibra bruta, Teor de cinzas, Lipídeos, Proteína e Açúcares redutores totais do fruto em fermentação espontânea;
- Determinar carboidratos (glicose e frutose) e etanol através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC);
- Caracterizar a comunidade fúngica presente no fruto durante a fermentação espontânea pela análise genômica;
- Isolar os fungos filamentosos e as leveduras endofíticas durante o processo fermentativo do bacupari;
- Realizar a seleção das linhagens mais promissoras quanto à produção das enzimas pectinase, lipase e invertase;



### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Biodiversidade Amazônica

A Amazônia brasileira abriga um terço das florestas tropicais do mundo. Essas florestas representam uma fonte extraordinária de recursos para a população brasileira e um bem incalculável para a população mundial, com árvores e rios, elas abrigam uma das maiores biodiversidades do planeta, fazendo deste bioma um grande prestador de serviços ecossistêmicos (COSTA E ALVES, 2018 ; AZEVEDO-SANTOS *et al.*, 2017; VILLÉN-PÉREZ *et al.*, 2017; CASTRO E SANTOS, 2016)

O bioma Amazônia ocupa cerca de 49,29% do território brasileiro, abrangendo os estados do Pará, Amazonas, Amapá, Acre, Rondônia, Tocantins, Roraima, Mato Grosso e Maranhão, considerado assim, o maior bioma do Brasil. Dentro desse bioma podemos destacar vários ecossistemas como: florestas densas e terra firme, florestas de igapó, várzea, savana, refúgios montanhosos e formações pioneiras (SOUZA; LIMA, 2019).

A biodiversidade do Brasil é considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas e sua preservação é fundamental tanto pelo valor intrínseco dessa imensa riqueza biológica quanto pelo seu enorme potencial como fonte de novos produtos, a exemplo dos fármacos, alimentos, cosméticos, entre outros. O estudo da biodiversidade da vegetação amazônica tem despertado interesse dos pesquisadores, visando o manejo adequado e o melhor aproveitamento das espécies frutíferas na alimentação humana. Além disso, existe o interesse dos pesquisadores na identificação de novas fontes de matéria-prima de baixo custo, com disponibilidade de óleo e proteína e com elevado potencial industrial (DINIZ e DINIZ, 2018; SINGH, 2015).

O Brasil é um dos grandes produtores mundiais de frutas, nesse contexto, a região Amazônica destaca-se pela quantidade de frutas exóticas consideradas ricas em substâncias bioativas, como os fenólicos e os flavonoides, que estão sendo associados a benefícios para a saúde. A caracterização de tais produtos, tanto o fruto como o resíduo, tornam-se importante para a constatação da presença de compostos bioativos, além de gerar benefícios socioeconômicos para a população amazônica, através da geração de renda pelo aumento no consumo do produto como um todo, e na saúde, pelo potencial nutracêutico (HASSIMOTTO *et al.*, 2005; KUSKOSKI *et al.*, 2005; ROESLER *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007; PAZ *et al.*, 2015, RABELO, 2012; BARRETO *et al.*, 2009).

### 3.2 Bacupari

O bacupari é uma frutífera pertencente à família Clusiaceae. O fruto é muito apreciado pela maioria da população da Amazônica e consumido em seu estado natural, é carnudo e contém até quatro sementes envolvidas por uma polpa branca, mucilaginosa e às vezes bastante ácida. O período de floração ocorre entre junho e novembro, e frutifica entre os meses de dezembro a abril do ano subsequente. É usado na medicina popular para o tratamento de doenças como feridas, úlceras pépticas e tumores (OLIVEIRA; ANDRADE; MARTINS, 2006; LORENZI 2008).

A descrição botânica da planta é: árvore com 5 m a 10 m de altura, tronco com casca rugosa; folhas simples, pecioladas, opostas, bordos inteiros, com 6 cm a 15 cm de comprimento; flores esbranquiçadas, pequenas, reunidas em conjunto na axila das folhas, flores masculinas e femininas em números semelhantes no mesmo conjunto; frutos com casca macia, amarelo-alaranjada, polpa suculenta e doce; sementes grandes e de cor castanha (Figura 1) (FERNANDEZ *et al.*, 2021; CAMILLO, 2016).

**Figura 1:** Bacupari (*Garcinia gardneriana*)



(a) Bacuparizeiro (b) Frutos maduros. Fonte: ALVES, 2021.

O gênero *Garcinia* demonstrou por estudos fitoquímicos possuir uma grande diversidade de compostos bioativos, como benzofenonas, xantonas e flavonoides, como 7-Epiclusianona e moreloflavona que mostram ser eficazes contra doenças como úlcera péptica, infecções do trato urinário e tumores. Na folha e no fruto de bacupari encontram-se flavonoides com ação anti-inflamatória e a resina é utilizada para o tratamento de feridas,

inflamação, neuralgia, reumatismo e úlcera gástrica, podendo ressaltar ainda que esta espécie vem garantindo seu espaço no âmbito científico, o que poderá ser reconhecida como importante anti-inflamatório (MOREIRA *et al.*, 2017; MARTINS *et al.*, 2008; ROCHA, 2015).

### 3.3 Os fungos

Assim como possui uma grande diversidade vegetal, a Floresta Amazônica traz consigo uma vasta diversidade microbiana, dentre os microrganismos presentes nos tecidos vegetais, destacam-se os fungos endofíticos e epifíticos. Os microrganismos endofíticos são caracterizados pela capacidade de habitar o interior das plantas colonizando os tecidos saudáveis. Isto pode ocorrer apenas durante uma parte de seu ciclo de vida, como em sua totalidade. O que diferencia os endófitos dos demais seres é a sua capacidade de colonizar as plantas sem lhes causar danos. Já os microrganismos epifíticos são definidos como seres de “vida livre” que habitam a superfície do vegetal, excluindo-se os patogênicos (fitopatógenos), colonizando a superfície da raiz (rizoplano), a superfície do caule (cauliplano) e a superfície da folha (filoplano) (SOUZA *et al.*, 2004; THAPA *et al.*, 2017).

O Reino Fungi, composto por leveduras, organismos predominantemente unicelulares, e por fungos filamentosos (cogumelos e bolores), organismos multicelulares, eucariotos com histórias de vida notavelmente diversas, que fazem contribuições essenciais para a biosfera, indústria humana, medicina e pesquisa. Eles existem amplamente em diferentes ambientes, como solo, resíduos biológicos e plantas. Alguns deles têm sido utilizados por humanos há mais de mil anos (TAKAHASHI, 2017; STAJICH, 2009).

Os fungos são microrganismos de grande interesse biotecnológico, sendo utilizados na produção de alimentos, como os produtos fermentados e bebidas alcoólicas, contribuem na indústria farmacêutica, estão presentes no processo de biodegradação e tratamento biológico de efluentes, são aplicados na produção de enzimas de interesse industrial e na biotransformação. Eles também são de grande importância agrícola e ecológica, pois mantêm o equilíbrio do ambiente, decompondo restos vegetais, degradando substâncias tóxicas, auxiliando as plantas a crescerem e se protegerem contra inimigos, como microrganismos fitopatogênicos (HUANG, 2007; ABREU, 2015).

### 3.3.1 Fungos Filamentosos

Fungos filamentosos têm sido utilizados para a produção de medicamentos e alimentos, processos fermentativos e degradação natural de resíduos ambientais há tempos. Os processos químicos associados a estes usos são bem conhecidos e a importância industrial e ecológica dos fungos é inegável. Também são utilizados nos processos de biorremediação e biocontrole, na fertilização do solo e na produção de enzimas de interesse comercial. Algumas das enzimas produzidas pelos fungos são as pectinases, proteases, lipases e amilases (TAKAHASHI, 2017; ELIZEI *et al.*, 2014; WARD, 2011).

Os fungos filamentosos formam massas visíveis a olho nu chamadas de micélio, compostas de longos filamentos chamados de hifas que se ramificam e se entrelaçam. Dentre os fungos filamentosos, encontram-se também os cogumelos, que possuem corpos de frutificação. Seu modo de crescimento filamentoso permite a colonização eficaz de substratos e fornece uma grande proporção entre a superfície e o volume, facilitando a absorção de nutrientes (TAKAHASHI, 2017; LIAUD *et al.*, 2014).

A identificação dos fungos filamentosos é realizada principalmente por taxonomia clássica e por biologia molecular. No caso da taxonomia clássica, utilizam-se características morfológicas macroscópicas, superfície e o reverso da colônia, aspecto da borda, diâmetro, cor dos conídios e micélio, textura e pigmentos solúveis, velocidade de crescimento e microscópicas, que são a forma e cor da hifa, presença ou não de septos, tipo e arranjo de esporos. A identificação por biologia molecular é uma forma mais moderna que consiste das seguintes etapas: i) extração do DNA, a partir do rompimento da parede celular e de membranas; remoção de impurezas e obtenção do DNA nuclear; ii) utilização da técnica de PCR, para amplificação da sequência de DNA. As sequências da região ITS são as mais utilizadas para a identificação dos fungos, sendo consideradas o segmento universal para este grupo; iii) visualização do segmento de DNA que foi amplificado usando eletroforese; iv) purificação do segmento de DNA, para eliminação dos reagentes utilizados na PCR; v) sequenciamento, que identifica a ordem dos nucleotídeos adenina, citosina, guanina e timina em um fragmento de DNA; vi) análises em programas computacionais, para encontrar similaridades entre as sequências dos organismos alvos com sequências depositadas em um banco de dados (KURTZMAN *et al.*, 2011; ABRÃO *et al.*, 2014; SILVA-HUGHES *et al.*, 2015).

### 3.3.2 Leveduras

As leveduras são importantes na produção de diversos tipos de bebidas alcoólicas e pães. Embora as leveduras sejam fungos unicelulares não visíveis ao olho humano, sua descoberta se deu de uma forma indireta, através de uma ação borbulhante na fermentação de líquidos e o crescimento de massa fermentada no pão (KATZ, 2012). Existe uma grande diversidade de células de levedura, podendo ser esféricas, ovais ou cilíndricas, apresentam também diferentes tamanhos, formas e cores. A identificação taxonômica de leveduras é realizada avaliando-se características morfológicas, fisiológicas e moleculares. Mais de 149 gêneros e 1500 espécies de levedura estão descritos na literatura. A classificação diz respeito ao agrupamento de organismos em táxons baseada nas similaridades ou relações ancestrais comuns, enquanto a identificação incorpora a ideia de comparar organismos desconhecidos a espécies classificadas baseada em características similares. O tamanho das células das leveduras é influenciado por sua espécie e condição de crescimento. Esses fungos microscópicos têm geralmente cerca de 3-4  $\mu\text{m}$  de tamanho, têm uma membrana nuclear e paredes celulares (KURTZMAN *et al.*, 2011; TAKAHASHI, 2017).

A observação de características morfológicas é parte de um conjunto de métodos, através dos quais se pode identificar uma espécie. As colônias de leveduras podem apresentar aparência cremosa ou seca, rugosa ou lisa, bordas regulares ou irregulares com coloração creme, branca, salmão, amarela, vermelha entre outras (SOUZA, 2021; LACAZ *et al.*, 2002).

Fisiologicamente, as leveduras são caracterizadas como heterotróficas, as quais dependem de matéria orgânica viva e morta como fontes de energia e nutrientes. As leveduras são consideradas anaeróbios facultativos, o que significa que podem sobreviver e crescer na presença ou ausência de oxigênio. A identificação taxonômica de leveduras é realizada avaliando-se características fisiológicas, utilizando como critérios, por exemplo, a assimilação de fontes de carbono e nitrogênio e resistência/sensibilidade a agentes antifúngicos (PHAFF E STARMER, 1987; BENNETT, 1998; STONE, 2006; KURTZMAN *et al.*, 2011).

Espécies novas de leveduras ainda não estudadas e/ou descritas podem ser isoladas na natureza, com chances de ser encontradas cepas com grande potencial biotecnológico. O pouco conhecimento relativo a esses microrganismos encontrados em determinados ambientes justifica a importância de estudos que venham contribuir para ampliação de informações acerca de leveduras (KURTZMAN *et al.*, 2011).

### 3.4 Enzimas: Invertase, Lipase e Pectinase

As enzimas são proteínas encontradas em células vivas, que agem como um biocatalisador, facilitando as reações metabólicas em um organismo. As enzimas são catalisadoras naturais, notavelmente eficazes, responsáveis por milhares de reações químicas coordenadas, envolvidas nos processos biológicos dos sistemas vivos e podem agir *in vitro*. Essas moléculas são capazes de aumentar a velocidade de reação e não serem consumidas durante o processo de conversão do substrato em produtos. Para tanto, para que o aproveitamento das reações enzimáticas ocorra eficientemente, é necessário considerar alguns aspectos importantes como o pH do meio reacional, a temperatura da reação, a concentração do substrato e a presença de inibidores. Tais condições atuam diretamente na velocidade da reação e na formação do complexo enzima-substrato. As enzimas são obtidas a partir de diferentes fontes vegetais, animais e microbianas. No entanto, a obtenção de enzimas de origem microbiana é preferível devido à possibilidade de produção por processos fermentativos em grande escala com regularidade e requerimentos nutricionais bastante simples (BORRISS, 1987; KAUSHIK, 2014; LEITE *et al.*, 2020; BON, 2008).

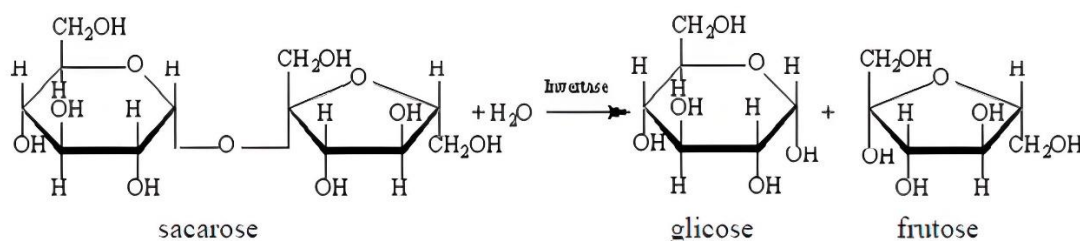
Microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais para a sustentação de ecossistemas. Uma dessas funções é a produção de enzimas extracelulares que ajudam na mineralização da matéria orgânica, propiciando a liberação de carbono e nutrientes na medida em que são assimilados. Justamente por esses importantes fatores, é que cada vez mais aumenta a busca por enzimas que possam ser utilizadas nos diversos setores industriais com maior aproveitamento e baixo custo. Nesse sentido, o isolamento e seleção de microrganismos pode facilitar a descoberta de novas enzimas com características desejáveis (estabilidade a altas temperaturas e amplas faixas de pH). Além disso, pode abrir promissoras perspectivas científicas e comerciais (ALVES *et al.*, 2012; DAMASO *et al.*, 2012).

O mercado global de enzimas foi avaliado em US \$ 7,1 bilhões em 2017 e deverá chegar a US\$ 10,5 bilhões em 2024, com uma taxa de crescimento anual de 5,7% de 2018 a 2024, sendo que a Europa foi responsável por 1/3 de produção global de enzimas em 2017 e no mesmo ano, estimou-se que cerca de 70% da quota de mercado de enzimas era produzida por microrganismos. A produção de enzimas fúngicas possui extensa aplicação na indústria alimentícia buscando a melhoria do processo de produção, e outros componentes relacionados, como sabor, aroma, cor, textura, aparência, vida de prateleira e valor nutritivo,

como exemplos a invertase que é usada na indústria de alimentos e bebidas. A lipase que atua em vários ésteres que produzem ácidos e álcoois. Os ácidos graxos liberados a partir da hidrólise de lipídios durante o processamento de alimentos são utilizados para intensificar sabores e gerar aromas em carnes, sucos de frutas, bebidas alcoólicas, cereais, entre outros. A pectinase tem como sua maior aplicação a clarificação de sucos de frutas e de vinhos (PAPADAKI *et al.*, 2020; SRIVASTAVA, 2019; GOULART *et al.*, 2003; SAE-LEAW *et al.*, 2018; MERÍN *et al.*, 2015).

### 3.4.1 Invertase

A invertase é amplamente distribuída pela biosfera sendo encontrada principalmente em plantas e microrganismos. O nome oficial desta enzima é  $\beta$ -fructofuranosidase (EC 3.2.1.26). A invertase hidrolisa a ligação osídica tipo  $\alpha$ - $\beta$ , de carboidratos possuidores de um radical  $\beta$ -fructofuranosil não substituído, sendo a sacarose o substrato preferencial (ROMERO-GOMEZ, 2000; NADEEM, 2015; ROCHA, 2010). Na Figura 2 é mostrado o esquema da reação catalisada pela invertase.



Fonte: (RUSTIGUEL, 2009).

Esta reação catalítica, geralmente ocorre em pH entre 4,6 e 5,0 e temperatura entre 35°C e 50°C, com concentração de substrato da ordem de 120 g/L. Acima desta concentração a solução de sacarose tem a viscosidade aumentada reduzindo a atividade enzimática na presença de água (VITOLLO *et al.*, 2004).

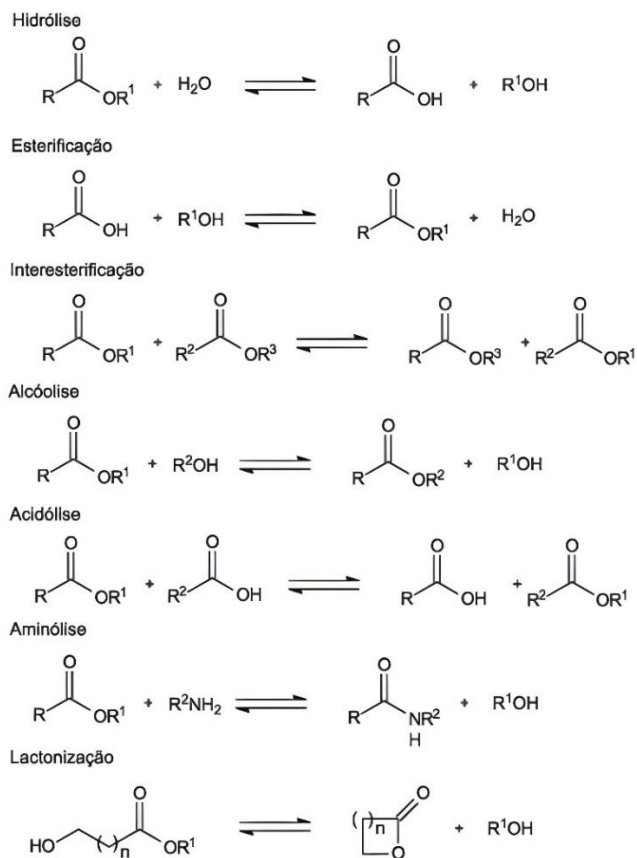
A hidrólise da sacarose que produz uma mistura equimolar de glicose e frutose (açúcar invertido) é mais doce do que a sacarose devido ao alto grau de doçura da frutose. Conseqüentemente, o teor de açúcar pode ser aumentado consideravelmente sem

cristalização do material. Portanto, uma das aplicações importantes da invertase está na produção de xarope de açúcar não cristalizável a partir da sacarose. A invertase também é usada sempre que substratos contendo sacarose são submetidos à fermentação visando a produção de bebidas alcoólicas, ácido lático, glicerol etc. (KOTWAL, 2009).

### 3.4.2 Lipase

As lipases (triacilglicerol acilidrolases EC 3.1.1.3) são uma classe de enzimas hidrolíticas que catalisam a hidrólise de triacilglicerol em glicerol e ácidos graxos livres. São capazes de modificar as propriedades de lipídios, produzir sabor e aroma modificando a estrutura por inter ou transesterificação, obtendo produtos de maior valor nutricional, facilitando a remoção de gordura de produtos de carne e peixe, entre outros. Algumas reações orgânicas das lipases incluem acidólise, hidrólise, epoxidação, esterificação, alcoólise, aminação e transesterificação (GUPTA *et al.*, 2004; MEHTA *et al.*, 2021; QUAYSON *et al.*, 2020). Na Figura 3 observa-se as reações catalisadas pelas lipases.



**Figura 3.** Reações catalisadas por lipases.

Fonte: GUPTA *et al.*, 2004

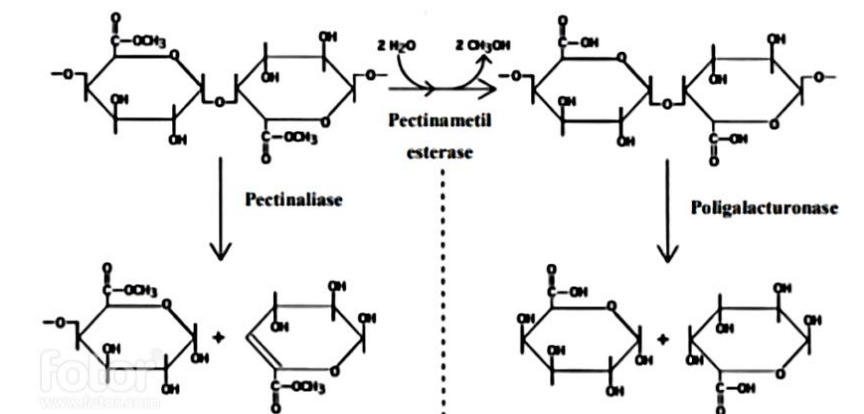
As lipases estão entre os biocatalisadores mais valorizados no campo da biotecnologia e podem ser utilizadas em indústrias de alimentos, detergentes, têxteis, farmacêuticos, energia e cosméticos. A necessidade constante de lipase nos processos industriais a torna o terceiro maior grupo de enzimas com base no valor de mercado, depois das proteases e carboidrases (PHUKON *et al.*, 2020).

As lipases produzidas por microrganismos têm ganhado um grande interesse industrial devido à sua versatilidade, maior rendimento, bem como à produção independente da estação do ano em comparação com as produções animais e vegetais. Além disso, a produção de lipases microbianas é fácil e econômica trazendo benefícios adicionais (PATEL *et al.*, 2020). As tecnologias avançadas permitem que os genomas de microrganismos sejam sequenciados de maneira muito eficiente e permite que muitas novas sequências de genes que codificam variantes de enzimas sejam também identificadas (SRIVASTAVA, 2019).

### 3.4.3 Pectinase

As pectinases são um grupo de enzimas que degradam a substância pectica e são classificadas de acordo com seu mecanismo de ação. As poligalacturonases catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas de forma aleatória (endopoligalacturonase) ou da extremidade não redutora de homogalacturonana, liberando resíduos de ácido galacturônico ou digalacturônico (Figura 4) (CORNUAULT, 2018; PEDROLLI, 2009).

**Figura 4.** Reação de catalisadas pela pectinase.



Fonte: DIANO *et al.*, 2008.

A pectinase, uma das enzimas mais produzidas comercialmente no setor biotecnológico, ocupa uma posição de liderança com 25% de participação no mercado global de enzimas de alimentos e bebidas. Essas enzimas são úteis para extração de suco de fruta e clarificação de vinho, pois reduzem drasticamente o grau de polimerização da pectina e consequentemente contribuem para redução da viscosidade; concentração e fermentação de chá, cacau e café; extração de óleo vegetal; preparação de compotas e geleias; e decapagem, favorecendo o processamento industrial desses produtos (AMIN *et al.*, 2019; BARMAN, 2015; KUBRA, 2018).

Apesar das potencialidades dessas enzimas, alguns problemas como a baixa estabilidade enzimática estrutural e o elevado custo de produção dificultam o emprego desses biocatalisadores em ampla escala, estimulando a busca por microrganismos com potencial para produção enzimática em meios de cultivo de baixo valor agregado (VIDEIRA, 2021).

Estudos relataram que 50% das pectinases são produzidas a partir de fungos e leveduras, 35% de bactérias e os 15% restantes são de origem vegetal ou animal. Entre elas, as pectinases microbianas apresentam uma ampla especificidade de substrato, versatilidade e capacidade de atuar em uma variedade de substâncias pectinas, o que as torna valiosos biocatalisadores em inúmeros processos industriais (BIJESH *et al.*, 2018).

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os frutos do bacupari (*Garcinia gardneriana*) maduros e sadios foram coletados na cidade de Aurora do Tocantins no estado do Tocantins, no mês de novembro de 2019. Os frutos, foram armazenados em caixas isotérmicas sanitizadas, e foram transportados para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos na Universidade Federal do Tocantins, sendo mantidos em temperatura ambiente, com objetivo de manter a microbiota presente inalterada até o momento das análises.

##### 4.1. Limpeza e sanitização do fruto

Fez-se a remoção de sujidades do fruto por meio de sanitização, utilizando solução de hipoclorito de sódio 50 ppm, por 15 minutos. Em seguida, os frutos foram lavados duas vezes com água destilada. A Figura 5 mostra os frutos após a limpeza e sanitização.

**Figura 5.** Frutos de bacupari após a remoção das sujidades.



Fonte: Autor, 2022.

##### 4.2. Fermentação espontânea dos frutos

Após a lavagem, 100 g dos frutos foram colocados em sacos plásticos esterilizados, de polisulfona, (150 x 200 mm), sendo um saco para cada tempo amostrado. Em seguida, os

frutos foram macerados e submetidos à fermentação espontânea durante um período de 15 dias a 30 °C. A cada 3 dias (0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias) foram retiradas amostras para realizar o isolamento de linhagens de fúngicas, análises físico-químicas, determinação de carboidratos e etanol através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e análises moleculares.

### **4.3. Caracterização físico-química dos frutos em fermentação espontânea**

O fruto integral (casca, polpa e semente) foi utilizado para determinação dos valores de açúcares redutores totais, acidez, pH, teor de umidade, lipídeos, proteínas, cinzas e fibra bruta. As análises foram realizadas nos tempos 0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias, a fim de avaliar as mudanças físico-químicas durante o processo fermentativo e relacionar essas mudanças com o desenvolvimento dos microrganismos.

#### **4.3.1. Acidez**

Um g do fruto integral foi adicionado em 25 mL de água destilada. A acidez foi determinada por titulometria com solução de NaOH 0,1 M, utilizou-se como indicador a fenolftaleína 1% (m/v). O resultado foi expresso em % ácido láctico durante a fermentação. A acidez foi mensurada em duplicata (PEREIRA *et al.*, 2001).

#### **4.3.2. Potencial Hidrogeniônico - pH**

Um g do fruto integral foi adicionado em 25 mL de água destilada. O pH foi determinado inserindo-se o eletrodo do pHmetro, modelo MB-10 da marca Marte, na solução. Análise foi realizada à 28°C, em duplicata (PEREIRA *et al.*, 2001).

#### **4.3.3. Teor de umidade**

Para a determinação do teor de umidade foi adotada metodologia proposta pela *Association of Official Analytical Chemists-AOAC* (2000), método gravimétrico de secagem em estufa. Amostras do fruto integral foram pesadas em placas e acondicionadas em estufa a 75°C, até peso constante. Os valores de percentual de umidade das amostras foram calculados conforme a equação 1.

$$U(\%) = \frac{100 * (P_i - P_f)}{\text{amostra}} \quad (\text{Eq. 1})$$

Sendo que:  $P_i$  = massa da placa + massa da amostra;

$P_f$  = massa da placa + massa da amostra seca;

amostra = massa inicial da amostra;

#### 4.3.4. Lipídeos

Para a determinação de lipídeos, o fruto integral foi pesado em papel filtro. As amostras foram secas em estufa de esterilização e maceradas. Então, cada amostra foi inserida dentro de um cartucho no interior do aparelho Soxhlet, previamente desengordurado e seco. Hexano foi colocado dentro do *reboiler* até cobrir o cartucho, utilizando um extrator de óleos e graxas, modelo MA 044/8/50, a 105°C por 4 horas. Secou-se os *reboilers* em estufa modelo 420-4D a 105°C até atingir peso constante, o teor de lipídeo foi calculado através da equação 2 (AOAC, 1995).

$$\text{Teor de Lipídeos (\%)} = \frac{N}{\text{amostra}} * 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Sendo que:  $N$  = (massa do *reboiler* + amostra) - massa do *reboiler*;

amostra = massa inicial da amostra;

#### 4.3.5. Proteínas

A determinação de proteína foi realizada pelo método Kjeldahl. Utilizou-se em cada amostra 1,5 g da mistura catalítica de sulfato de zinco e sulfato de cobre na proporção de 1/1 (m/m). Adicionou-se 10 mL de  $H_2SO_4$  37% (v/v) em um bloco digestor modelo MA-541, a 420°C por 4 horas. Após a digestão, adicionou-se 40 mL de água destilada em um digestor de nitrogênio modelo MA-036, seguido da adição de 25 mL de NaOH 40% (m/v). Acoplado ao digestor foi colocado um Erlenmeyer de 250 mL contendo 15 mL de ácido bórico 4% (m/v) e 3 gotas do indicador Tashiro. Titulou-se com solução de HCl 0,1 M, e utilizou-se o fator de correção 6,25 para o cálculo de proteína. Calculou-se o teor de proteínas através da equação 3 (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

$$\text{Nitrogênio total (\%)} = \frac{V \cdot M \cdot f \cdot 0,014 \cdot 100}{P} \quad (\text{Eq. 3})$$

Sendo que: V = volume de solução de HCL (mL);

M = concentração molar teórica da solução de ácido utilizado;

f = fator de correção da solução de ácido utilizado;

P = massa da amostra úmida (g).

#### 4.3.6. Cinzas

Para a análise de cinzas, a massa da amostra do fruto integral foi determinada em cadinho de porcelana. A determinação foi realizada pelo método de incineração em mufla a 550 °C, até peso constante, com a destruição da matéria orgânica, conforme a metodologia recomendada pela AOAC (2000).

#### 4.3.7. Fibra bruta

Para o teor de fibra bruta, determinou-se a massa das amostras secas e desengorduradas, em seguida, sendo acondicionadas em sacos de Tecido Não Tecido (TNT). Cada amostra foi então digerida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,25% (v/v) e com NaOH 1,25% (m/v), utilizando o digestor de fibras modelo MA-444/CI a 90°C. Após, as amostras foram secas em estufa a 105°C, por 12 horas, até que foram determinados valores constantes de massa. Os cálculos para determinação do percentual de fibra bruta foram realizados através da Equação 4 (AOAC, 1995).

$$\text{Fibra bruta (\%)} = \frac{(A-B)}{C} * 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

Sendo que: A = massa do cadinho + resíduo (g);

B = massa do cadinho = cinza (g);

f = fator de correção da solução de ácido utilizado;

P = massa da amostra úmida (g).

#### 4.3.8. Açúcares redutores totais

A determinação dos açúcares redutores totais se deu pelo método que utiliza ácido 3,5

dinitrosalicílico (DNS). Primeiro realizou-se a hidrólise da amostra, pipetando-se 2,0 mL da amostra em um tubo de ensaio, adicionando-se 2,0 mL de HCl 2 mol/L. Homogeneizou-se e aqueceu-se em banho-maria à 100°C, por 5 minutos. Resfriou-se o tubo em banho de gelo por 5 minutos e adicionou-se 2,0 mL de NaOH 2 mol/L. Em seguida pipetou-se 200 µL da amostra em um tubo de ensaio e foram adicionados 200 µL do reagente DNS. O tubo foi homogeneizado e procedeu-se com o aquecimento a 100 °C durante 5 minutos. Após o resfriamento dos tubos contendo DNS e amostras, foram adicionados 2 mL de água destilada. A leitura da absorbância em espectrofotômetro foi realizada à 540 nm, após calibrar o aparelho com a solução de referência, a qual consistiu em substituir o volume de amostra por água destilada (200µL) (MILLER, 1959).

#### **4.4. Determinação de carboidratos e etanol**

A determinação de carboidratos e etanol foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando-se o cromatógrafo líquido de alta eficiência marca Shimadzu (LC-10 Series Avp; equipado com desgaseificador: DGU-14A, integrador: CLASS LC-10) e detector de índice de refração RID-10 (Shimadzu, Japão). e detector de índice de refração RID-10A(Shimadzu, Japão). A coluna Rezex ROA-OrganicAcid H+ (300 x 7,8 mm; Phenomenex, EUA) foi utilizada para a determinação de etanol, glicose e frutose. As condições empregadas para análise foram eluição isocrática, pelo bombeamento (LC-10AD) de uma fase móvel composta de de 5mM de ácido sulfúrico em água ultrapura (destilada e deionizada). O fluxo do eluente foi de 0,6 mL/min, a 60°C (forno de coluna CTO-10A), com corrida de tempo total de 25 minutos. Uma alíquota de 20,0 µl da amostra foi injetada manualmente (injetor Rheodyne) e permeada por uma coluna Phenomenex Rezex ROA-OrganicAcid H+ (300 x 7,8 mm) com conexão direta a Cartucho de segurança Phenomenex Carbo-H (4 x 3 mm) preenchida com material semelhante ao da coluna principal.

#### **4.5. Identificação molecular da comunidade fúngica do fruto de Bacupari durante a fermentação espontânea**

As amostras retiradas no início (T0), após 6 dias (T6) e ao final da fermentação (T15) dos frutos foram coletadas e mantidas sob congelamento (-20°C) até análise molecular. A



análise molecular foi realizada pela Neopropecta Microbiome Technologies, empresa de biotecnologia, em Florianópolis/Santa Catarina/Brasil. A identificação de fungos foi realizada utilizando-se o sequenciamento de alto desempenho da região ITS1. O preparo das bibliotecas seguiu um protocolo proprietário (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). Foi realizada a amplificação com primers para a região ITS1, primer, ITS1 5' - GAACCGCGGARGGATCA-3', (SCHMIDT *et al.*, 2013) e primer, ITS2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC (WHITE *et al.*, 1990).

As bibliotecas foram sequenciadas utilizando-se o equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA). O sequenciamento *single-end*, o kit V2 com 300 ciclos foi utilizado. As sequências foram analisadas por meio do *pipeline* Sentinel. No *pipeline* Sentinel os arquivos fastq foram avaliados quanto a qualidade Phred (QP) usando o programa FastQC v.0.11.8 (ANDREWS, 2010). A seguir, os arquivos fastq foram submetidos à trimagem de primers e sequências com baixa qualidade (Phred < 20). O software proprietário utilizado para tal finalidade foi construído em Python v.3.6, sendo este inspirado nas funcionalidades do projeto BioPython (COCK *et al.* 2009). Clusters com abundância menor do que 2, foram removidos das análises, pois tais estruturas normalmente são relacionadas a sequências quimeras (SMYTH *et al.*, 2010).

As identificações taxonômicas foram realizadas com blastn v.2.6.0+ (ALTSCHUL *et al.*, 1990), usando como referência um banco de dados proprietário. Quanto a definição de uma espécie, dentre os 20 hits retornados para cada cluster, uma instrução em Python avalia se um dos três quesitos seriam atendidos pelos hits: 1) maior bit-score; 2) menor e- value; e 3) taxonomias com maior representação. Os hits que atenderam um dos itens anteriores, foram escolhidos como espécie representante, essas análises foram realizadas na plataforma computacional da Amazon, onde a estrutura de bioinformática da Neopropecta está hospedada.

#### **4.6. Isolamento dos fungos**

O isolamento foi realizado seguindo a metodologia proposta por Santos *et al.* (2012). A coleta dos frutos em fermentação espontânea (10 g de amostra) foi realizada de forma asséptica e a amostra foi transferida para frascos de 125 mL, contendo 90 mL de solução salina peptonada estéril [9 g/L de cloreto de sódio e 1 g/L de peptona bacteriológica]. Posteriormente, sucessivas diluições seriadas foram realizadas e 100 µL das amostras foram

inoculados por espalhamento em superfície em placas de Petri contendo diferentes meios de cultura. Os meios de cultivo para o isolamento de fungos filamentosos foram: *Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar* (DRBC) [31.5g de pó em 1 L de água purificada] devido ao composto *Dichloran* com a finalidade de reduzir os diâmetros das colônias que se desenvolvem; ágar extrato de malte (MEA) pH 6,0 [30 g/L extrato de malte (Merck); 20 g/L ágar (Merck)], para crescimento de fungos filamentosos; *Yeast Extract Peptone Glucose* (YEPG) [10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona bacteriológica, 20 g/L de glicose, 15 g/L de ágar bacteriológico, 15], acrescido de antibiótico cloranfenicol 0,2 g/L, com pH corrigido para 4,5, foi utilizado para crescimento de leveduras.

As placas foram incubadas a 25°C em estufa bacteriológica por 5 dias. Os resultados do plaqueamento foram expressos em contagem total das colônias observadas, identificando o fruto e a diluição, sendo então calculado as Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g de fruto), de acordo com a equação 5.

$$UFC / g = n^{\circ} \text{ de colônias} * fd * 10 \quad (\text{Eq. 5})$$

Sendo que: fd = fator de diluição

#### 4.7. Caracterização morfológica e isolamento

Após o período de incubação, as colônias obtidas em placas foram caracterizadas de acordo com sua morfologia, seguindo metodologia de Barnett & Barry (1986) para fungos filamentosos, observando o formato celular, margem, elevação, cor e tamanho; e a caracterização morfológica de leveduras foi realizada através da observação do tamanho, elevação, bordas, cor e aspecto das colônias, seguindo a metodologia de Kurtzman *et al.*, (2006); Barnett *et al.*, (2000).

Em todos os meios utilizados (MEA, YEPG e DRBC) foi realizada a contagem total para se expressar a população dos fungos, mas também se procedeu a contagem diferencial, separando os microrganismos presentes em leveduras e fungos filamentosos, e em diferentes morfotipos presentes, a fim de se realizar o isolamento de quantidade representativa de todos os morfotipos, visando abranger toda diversidade fúngica das amostras. O isolamento foi realizado em intervalos de 0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias de fermentação. Segundo Santos *et al.* (2012), para cada tipo de colônia (morfotipo), um número correspondente à raiz quadrada do número total foi semeado e purificado pela técnica do esgotamento em placas de Petri,

contendo Agar YEPG para obter culturas puras para leveduras. Os fungos filamentosos foram repicados consecutivamente em Ágar Batata Dextrose (BDA) com incubação a 30 °C por 5 dias até obtenção da cultura pura.

#### **4.8. Preservação dos microrganismos**

As leveduras foram transferidas para tubos contendo meio YEPG inclinado e foram cobertas com óleo mineral estéril seguindo metodologia de Rhodes (1957). Os fungos filamentosos foram preservados seguindo o método de Castellani (1967). Todos os tubos foram mantidos a 4° C e sua viabilidade e pureza das colônias foram monitoradas a cada seis meses durante o período de desenvolvimento do projeto.

#### **4.9. Seleção das linhagens em placas do potencial enzimático dos fungos isolados a partir de meios de cultivo seletivos e diferenciais**

Os ensaios de avaliação qualitativa em meio sólido para seleção de fungos produtores de enzimas foram realizados em placas contendo meio de cultura e indutor. Os isolados dos fungos filamentosos foram reativados através da transferência de discos miceliais para o centro de placa de Petri contendo meio de cultivo Ágar Batata Dextrose (BDA), após a inoculação as placas foram mantidas sob incubação a 30 °C, por 5 dias. Após o crescimento, os fungos filamentosos foram repicados em placas contendo o meio de cultivo sólido específico para cada enzima.

As leveduras foram reativadas pela técnica de estrias compostas em placas contendo o meio YEPG, sendo mantidas incubadas a 30°C, por 2 dias. Após o crescimento de colônias isoladas, as leveduras foram repicadas em placas em meios seletivos e diferenciais para a detecção de potenciais produtores de invertase, lipase e pectinase.

##### **4.9.1. Seleção de linhagens de fungos produtores invertase**

A seleção de fungos produtores de invertase foi realizada em meio mineral para produção de  $\beta$ -fructofuranosidase composto por 0,5 g/L de  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ , 3g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,5/L g de  $\text{NaNO}_3$ , 0,02 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2g/L de sacarose e 20g/L de ágar, sendo o pH ajustado para 7,0. As leveduras e fungos filamentosos foram incubados neste meio por 2 e 5 dias a 30

°C, respectivamente. Após este período, os isolados que apresentaram crescimento em sacarose, como única fonte de carbono, foram corados por uma solução de cloreto de trifeniltetrazólio 0,1 g/L em NaOH 0,5 M. As linhagens microbianas cujas colônias apresentaram coloração vermelha foram consideradas potenciais produtoras de invertase, devido à redução do corante a formazana na presença de açúcares redutores (REDDY *et al.*, 2010).

#### **4.9.2. Seleção de linhagens de fungos produtores de lipase**

A seleção dos fungos produtores de lipases foi realizada a partir da transferência dos microrganismos isolados para meios de cultivo sólido contendo 10 g/L de peptona, 5 g/L de NaCl, 0,1 g/L de CaCl<sub>2</sub>. H<sub>2</sub>O, 10 g/L (v/v) de Tween 20 e 20 g/L de ágar, com o pH ajustado para 7,0. Os fungos que apresentaram halos ao redor das colônias, provenientes da precipitação de cristais de cálcio complexados com ácido láurico liberado por enzimas lipolíticas, foram considerados potenciais produtores de lipase (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975).

#### **4.9.3. Seleção de linhagens de fungos produtores de pectinase**

A avaliação quanto ao potencial de produção de pectinase foi determinada através da transferência dos isolados para meio de cultivo sólido, contendo pectina 1% (m/v), 1,4 g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g/L de MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O e solução de micronutrientes 0,1% (v/v) (5 mg/L de FeSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O, 1,6 mg/L de MnSO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O, 1,4 mg/L de ZnSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O e 2 mg/L de CoCl<sub>2</sub>), 20 g/L de ágar. O pH final do meio de cultivo foi ajustado para 7,0. Os isolados das leveduras e fungos filamentosos foram incubados neste meio por 2 e 5 dias a 30 °C, respectivamente. Após este período de incubação, as colônias foram submetidas à coloração com uma solução contendo 1 g de iodina e 5 g de iodeto de potássio em 330 mL de água. Os isolados apresentando zonas claras ao redor das colônias foram considerados potenciais produtores de pectinase (SOARES *et al.*, 1999).

#### 4.10. Índice enzimático - IE

O diâmetro dos halos de hidrólise e das colônias foi aferido com auxílio de paquímetro, sendo os resultados expressos como o Índice Enzimático (IE), na equação 6, representado pela relação entre a média de diâmetro dos halos de degradação pela média de diâmetro da colônia (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1977).

$$IE = \frac{\text{diâmetro do halo}}{\text{diâmetro da colônia}} \quad (\text{Eq. 6})$$

#### 4.11. Seleção de linhagens de fungos filamentosos e leveduras produtores de invertase e lipase a partir de cultivos submersos

Os cultivos submersos foram preparados em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 20 mL de meio líquido de Vogel (VOGEL, 1956), suplementando com 1% (m/v) das fontes de carbono específicas para a produção de cada enzima, sendo sacarose (invertase) e azeite de oliva extra virgem (lipase). Os cultivos foram inoculados com 1 mL de uma suspensão de  $10^7$  esporos (fungos filamentosos) ou células/mL (leveduras). A contagem de esporos e células foi realizada na câmara de Neubauer. O cálculo para a estimativa de células por mL de solução foi realizado conforme descrito por Lagranha (2008), mostrado na Equação 7.

$$N = \frac{\sum Nt}{Q} \quad (\text{Eq. 7})$$

Sendo que: N - Número de células por mL;

Nt - número total de células contadas;

Q - Número de quadrantes contados.

Após a contagem, os cultivos foram incubados por 2 e 5 dias para leveduras e fungos filamentosos, respectivamente, a 150 rpm, 30 °C. Os extratos proteicos oriundos do cultivo de fungos filamentosos foram filtrados em banho de gelo e congelados para

avaliação da atividade enzimática. Os extratos proteicos das leveduras foram centrifugados e congelados para avaliação da atividade enzimática. Todos os cultivos e ensaios foram realizados em duplicata.

#### 4.11.1. Determinação da atividade de invertase

A determinação da atividade de invertase foi obtida a partir da produção de açúcares redutores pelo método de Miller (1959). A atividade enzimática de invertase foi realizada adicionando-se 800  $\mu\text{L}$  de uma solução de sacarose 2% (m/v) em tampão McIlvaine, pH 5,0, em tubos de ensaio. Os tubos foram mantidos a 50 °C por 5 minutos. Em diferentes intervalos de tempo (0 e 5 min) foram retirados 200  $\mu\text{L}$  da reação e adicionados em tubos contendo 200  $\mu\text{L}$  de DNS. Os tubos de reação foram levados para fervura em banho maria a 100°C, onde permaneceram por 5 minutos. Após o resfriamento das amostras foram adicionados 2 ml de água destilada em cada tubo. As leituras foram feitas a 540 nm, no espectrofotômetro. Controles foram preparados sem a adição de enzima. Uma unidade de atividade invertase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu\text{mol}$  de frutose, por mL, por minuto.

#### 4.11.2. Determinação da atividade de lipase

A atividade lipolítica foi determinada com *p*-nitrofenil palmitato (*p*NPP) como substrato. O *p*NPP foi solubilizado em 0,5 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) e diluído a 0,5 mM com tampão McIlvaine pH 7,0, contendo 0,5% de Triton X-100. A hidrólise do *p*NPP foi determinada descontinuamente a 40 °C pela liberação do *p*-nitrofenol. Após a pré-incubação do substrato em banho-maria por 5 min, a reação foi iniciada pela adição de 0,1 mL da amostra devidamente diluída. A reação foi interrompida em diferentes intervalos (0 e 1 min) com choque térmico (100 °C, 1 min), seguido da adição de 1 mL de solução saturada de tetraborato de sódio. A leitura da absorbância foi realizada a 410 nm, no espectrofotômetro. Controles foram preparados sem a adição de enzima. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de *p*NP por mL, por minuto (ALMEIDA *et al.*, 2012).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterização físico-química do fruto em fermentação espontânea

As alterações físico-químicas do bacupari durante a fermentação espontânea, a saber: acidez titulável, pH, umidade, fibra bruta, teor de cinzas, lipídeos e proteína estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Alterações físico-químicas do Bacupari integral durante a fermentação espontânea.

<b>TF</b>	<b>ATT (%)*</b>	<b>pH</b>	<b>U (%)</b>	<b>FB (%)</b>	<b>TC (%)</b>	<b>L %</b>	<b>P%</b>
<b>T0</b>	-	6,7 ± 0,1	73,6	1,7 ± 0,3	1,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1	2,2 ± 0,2
<b>T3</b>	1,3 ± 0,1	5,1 ± 0,1	73,6	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,0	0,2 ± 0,0	2,5 ± 0,0
<b>T6</b>	0,9 ± 0,0	5,6 ± 0,2	72,4	1,6 ± 0,8	1,0 ± 0,0	0,2 ± 0,0	2,3 ± 0,4
<b>T9</b>	0,7 ± 0,2	5,5 ± 0,0	72,1	0,9 ± 0,4	0,6 ± 0,1	0,1 ± 0,0	2,1 ± 0,1
<b>T12</b>	0,7 ± 0,5	5,9 ± 0,2	71,7	2,1 ± 1,4	0,9 ± 0,0	0,2 ± 0,1	2,6 ± 0,0
<b>T15</b>	0,5 ± 0,3	6,6 ± 0,1	72,8	1,4 ± 1,1	0,8 ± 0,0	0,3 ± 0,0	2,5 ± 0,0

TF, tempo de fermentação; ATT, acidez titulável total; pH, potencial hidrogeniônico; U, umidade; FB, fibra bruta; TC, teor de cinzas; L, teor de lipídeos; P, teor de proteínas.

\*Do T3 a T15 a acidez titulável foi expressa em % ácido láctico.

Dados expressos com média de duplicata ± desvio padrão.

A acidez titulável do fruto apresentou o valor de 1,2% (ácido cítrico), realizado no tempo 0. Rufino (2008) em seu estudo, cita que o bacuri, também pertencente à família Clusiaceae, apresentou valores médios de 1,6% de acidez titulável, em ácido cítrico. Os valores da acidez titulável total fazem com que o fruto seja caracterizado como de acidez moderada, e conseqüentemente bem aceito para o consumo como fruta fresca, haja vista que, segundo Sacramento *et al.* (2007) frutas que apresentam teores de ácido cítrico entre 0,08 e 1,9% são agradáveis ao paladar. No tempo 3 foi de 1,3% em ácido láctico, durante a fermentação foi decrescendo até 0,5% no tempo 15.

O pH do fruto *in natura* integral (no tempo 0) foi de 6,7 e ao decorrer da fermentação os valores sofreram ligeiras variações, chegando ao fim da fermentação a 6,6. Portanto, o fruto manteve-se com pH próximo a neutralidade. Gondim *et al.*, (2013) relatam que para o mercado de frutas frescas há uma preferência por parte do consumidor para frutos com pH mais elevados. Para Alcântara e Menezes (2017) a variação de pH em frutos está relacionada a liberação de ácidos orgânicos pelos fungos, durante a fermentação, causando sua variação. Porém, após o esgotamento dos açúcares, há o consumo dos ácidos presentes no fruto, levando ao aumento do pH novamente. Segundo Dantas e Silva (2017), a diferença de pH durante a fermentação pode estar atrelada a composição química de cada matéria prima, principalmente aos tipos de ácidos presentes em cada fruta.

Os valores de umidade variaram entre 73,6% e 71,7%, com ligeira tendência a queda no decorrer da fermentação. Santos (2016) analisou o teor de umidade nas sementes do bacupari e obteve o valor de 40,82%, já Paglarini (2012) realizou as análises da polpa do fruto e encontrou o valor de umidade de 74,22%, próximo ao encontrado no fruto *in natura* integral (73,6%) no presente trabalho.

O teor de fibra bruta variou de 1,4 a 1,7%, Schneider (2021) fez análises da polpa *in natura* do Bacupari, encontrando valor de 0,35%, valor próximo ao encontrado no tempo 3. Com isso, considera-se que o fruto não é uma fonte de fibras, pois segundo Uchoa (2008) um alimento com teor de 2 a 3% pode ser considerado uma boa fonte de fibra alimentar, e o teor encontrado está abaixo. O regulamento técnico, referente à informação nutricional complementar (Portaria nº 27), o alimento pode ser considerado fonte de fibra alimentar quando apresenta, no produto acabado, 3g/100g (base integral) para alimentos sólidos e 1,5g/100ml (base integral) para líquidos (BRASIL, 1998).

O teor de cinzas variou de 1,08% no início da fermentação até 0,80% no final da fermentação. Para Chaves *et al.*, 2004, as cinzas em alimentos se referem ao resíduo inorgânico remanescente da queima da matéria orgânica, sem resíduo de carvão. A



determinação do teor de cinzas em um alimento é importante por ser um indicativo de algumas propriedades funcionais, por exemplo, em algumas geleias e doces o conteúdo de cinzas é utilizado para indicar a quantidade de fruta presente no produto.

O teor de lipídios oscilou durante a fermentação com valores entre 0,1 e 0,3 %, o que também ocorreu com o teor de proteína manteve-se praticamente constante, oscilando entre 2,1 e 2,6%. Monteiro *et al.* (2020) estudaram a polpa liofilizada de bacupari e encontraram teor de 0,32%, valor abaixo do encontrado neste trabalho. Essas pequenas variações podem ser decorrentes de diferentes proporções das frações casca, polpa e semente coletadas durante a fermentação do fruto, assim não houve muitas alterações no teor de lipídeos no bacupari durante os tempos de fermentação.

## 5.2. Determinação de carboidratos e etanol

A tabela 2 apresenta os valores da produção de etanol e do consumo de glicose e frutose e açúcares redutores do bacupari durante a fermentação espontânea.

**Tabela 2.** Consumo de açúcares e produção de etanol durante os tempos fermentação espontânea do bacupari.

Tempo	Etanol %	ART %	Glicose g/L	Frutose g/L
0	0,01	2,2 ± 0,2	12,67	17,67421
3	0,02	1,9 ± 0,1	1,37	0,97406
6	0,12	1,5 ± 0,0	0,24	1,29696
9	0,20	1,4 ± 0,1	1,24	0,6149
12	0,26	0,6 ± 0,0	0,06797	0,1047
15	0,36	0,6 ± 0,0	0,04995	0,10586

ART, açúcares redutores totais.

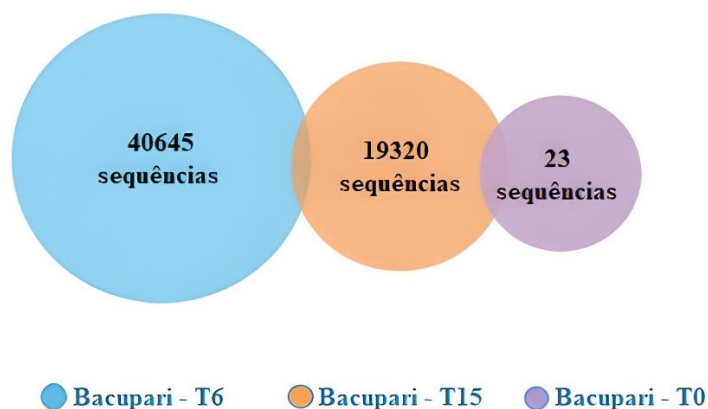
Os açúcares redutores totais do Bacupari decresceram de 2,2% para 0,6%, correspondendo a uma taxa de 72,7% de consumo dos carboidratos presentes. A diminuição dos açúcares durante a fermentação pode ocorrer pelo fato de que açúcares simples, como glicose e frutose, são os primeiros substratos consumidos durante o processo de fermentação espontânea (AGUIAR, 2013). Ao longo da fermentação, os microrganismos metabolizam os açúcares e nutrientes presentes nos substratos para obter energia e aumentar a sua população. Este período é altamente influenciado pela temperatura, oxigênio e pela concentração de

nutrientes no meio (JACKSON, 2008; ZAMORA, 2009).

Os valores de glicose e frutose, quantificados através da cromatografia líquida, decresceram, o que está compatível com o determinado pelo método de ART. O teor de etanol mostrou elevação durante a fermentação, o que denota que processo fermentativo alcoólico ocorreu em virtude da presença de leveduras e bactérias, principalmente as lácticas, também podem estar relacionadas à presença de etanol nas amostras fermentadas. A amostra com maior abundância microbiológica de fungos filamentosos e leveduras foi a coletada no sexto dia de fermentação (T6) com 40.645 sequências (Figura 6), o que foi condizente com os resultados de quantificação de população fúngica através do método dependente de cultivo (plaqueamento), na qual se encontrou população de 6,89 log UFC/g. A amostra coletada no 15º dia de fermentação apresentou a segunda maior abundância com 19.320 sequências, indicando que o processo fermentativo desencadeou um aumento da população fúngica no bacupari.

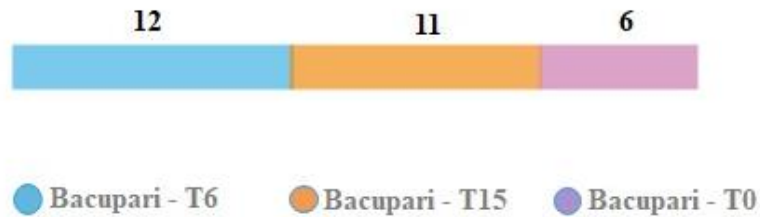
Nas Figuras 6 e 7 observa-se a abundância e diversidade fúngica das amostras de bacupari em fermentação espontânea, respectivamente

**Figura 6.** Amostras do bacupari com maior abundância microbiológica fúngica.



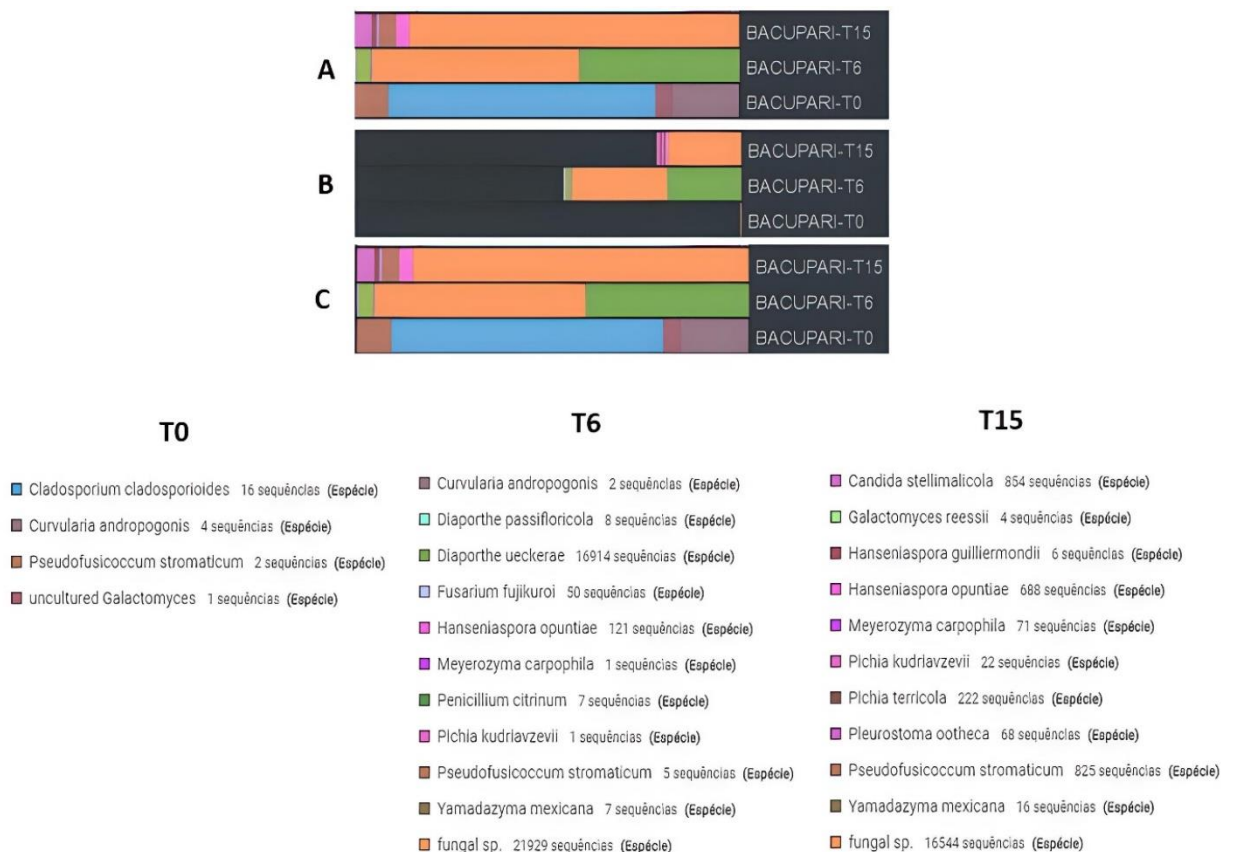
Em relação a diversidade microbiológica no bacupari, após 6 dias de fermentação foi detectado o maior número de espécies fúngicas (12), seguido pela amostra T15, sendo o tempo 0, o que apresentou menor número de espécies, o que também está compatível com os dados de abundância microbiológica.

**Figura 7.** Amostras do bacupari com maior diversidade microbológica fúngica.



A identificação da comunidade de fungos filamentosos e de leveduras nas amostras de frutos bacupari antes da fermentação espontânea (T0) e após 6 (T6) e 15 dias (T15) da fermentação espontânea está mostrada na Figura 8. A Figura 8 ainda mostra a proporção, a quantidade e a diversidade de espécies fúngicas no fruto de bacupari durante a fermentação espontânea. Foram identificadas um total de 59988 de sequências.

**Figura 8.** Proporção, quantidade e diversidade das espécies do bacupari em fermentação espontânea.



- A) Proporção de espécies no fruto de bacupari nos tempos 0, 6 e 15 dias de fermentação espontânea;
- B) Quantidade de espécies no fruto de bacupari nos tempos 0, 6 e 15 dias de fermentação espontânea;
- C) Diversidade de espécies no fruto de bacupari nos tempos 0, 6 e 15 dias de fermentação espontânea.

Foram identificadas 19 espécies de leveduras e fungos filamentosos nas três amostras analisadas. No tempo 0 foram identificadas 4 espécies (*Cladosporium cladosporioides*, *Curvularia andropogonis*, *Pseudofusicoccum stromaticum* e *Galactomyce* não cultivável), estes fungos pertencentes a 4 gêneros, 4 famílias, 4 ordens, 2 classes e 1 filo. Os gêneros mais abundantes foram *Cladosporium* spp. e *Curvularia* spp.

*Cladosporium* spp. manifesta-se em todos os órgãos dos frutos, principalmente em tecidos em fase de crescimento. As lesões são superficiais e não afetam a qualidade da polpa dos frutos, mas podem causar sua queda (SUSSEL, 2015; JUNQUEIRA *et al.*, 2016). Já o fungo *Curvularia* spp. é relatado como patógeno causador de manchas foliares em mudas e plantas adultas. No estado do Amazonas, o patógeno foi registrado causando antracnose em folhas, frutos e em mudas no Pará (FLORES *et al.*, 2019).

As 12 espécies detectadas no sexto dia de fermentação (T6) foram identificadas como pertencentes a 10 gêneros, 9 famílias, 7 ordens, 5 classes e 2 filos. Os gêneros mais abundantes identificados foram *Diaporthe* spp. e *Aspergillus* spp. e as espécies mais abundantes foram *Diaporthe ueckerae* e *Aspergillus japonicus*.

*Diaporthe* spp. é um endófito comum em vários hospedeiros de plantas, mas também pode ser patógeno de plantas comuns. Sua presença ocorre em uma ampla gama de hospedeiros, causando podridão de frutos, manchas foliares, ferrugem, cancos, morte e murcha (SEBASTIANES *et al.*, 2012).

*Aspergillus* spp. são fungos aeróbios, cosmopolitas e estão abundantemente distribuídos na natureza, sendo encontrados em solos, plantas e em algumas variedades de alimentos, principalmente onde há presença de matéria orgânica e materiais em decomposição, com maior abundância nas regiões de clima tropical e subtropical. *Aspergillus* também pode ser responsável pela ocorrência de infecções respiratórias, conhecidas como aspergiloses. A toxinfecção (doença transmitida por alimentos) por sua vez ocorre quando há o consumo de um alimento contaminado por microrganismos patogênicos que produzem e liberam toxinas no organismo humano (FORSYTHE, 2013; GUERRA, 2017; MONTEIRO, 2012).

Ao final da fermentação espontânea (T15) foram identificadas 11 espécies pertencentes a 9 gêneros, 8 famílias, 4 ordens, 4 classes e 2 filos (Figura 6). Os gêneros mais abundantes foram *Candida* e *Pseudofusicoccum* spp. e as espécies mais abundantes foram

*Candida stellimalicola* e *Pseudofusicoccum stromaticum*. A *Candida* sp., possui uma boa capacidade fermentativa de açúcares redutores como glicose, frutose e galactose, apresentando resultado contrário para sacarose, rafinose, lactose e maltose. Ela é classificada como levedura produtora de *flavor* (sabor e aroma), especialmente ésteres, além disso, contribui estabilizando a cor dos vinhos (COIMBRA, 2020; JOLLY, VARELA E PRETORIUS, 2014).

O gênero *Pseudofusicoccum* spp. foi descrito como produtor de compostos antimicrobianos, antifitopatogênicos, antiproliferativos e enzimáticos (GUBIANI, 2015; TORRES, 2018; MONFARDINI, 2020).

A tabela 3 apresenta o total de sequências encontradas e identificadas nas amostras de bacupari em fermentação espontânea analisadas.

**Tabela 3.** Identificação da comunidade de fungos filamentosos e leveduras e quantidade de sequências encontradas no bacupari durante fermentação espontânea.

Nome da amostra	Total de sequências da taxonomia	Bacupari-T0	Bacupari-T6	Bacupari-T15
<b>Total de sequências da amostra</b>	<b>59988</b>	<b>23</b>	<b>40645</b>	<b>19320</b>
<i>Aspergillus japonicus</i>	1600	0	1600	0
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	16	16	0	0
<i>Curvularia andropogonis</i>	6	4	2	0
<i>Diaporthe passifloricola</i>	8	0	8	0
<i>Diaporthe ueckerae</i>	16914	0	16914	0
<i>Fusarium fujikuroi</i>	50	0	50	0
<i>Galactomyces reessii</i>	4	0	0	4
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	6	0	0	6
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	809	0	121	688
<i>Meyerozyma carpophila</i>	72	0	1	71
<i>Penicillium citrinum</i>	7	0	7	0
<i>Pichia kudriavzevii</i>	23	0	1	22
<i>Pichia terricola</i>	222	0	0	222
<i>Pleurostoma ootheca</i>	68	0	0	68
<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	832	2	5	825

<i>Yamadazyma mexicana</i>	23	0	7	16
[ <i>Candida</i> ] <i>stellimalicola</i>	854	0	0	854
<i>fungus sp.</i>	38473	0	21929	16544
<i>uncultured Galactomyces</i>	1	1	0	0

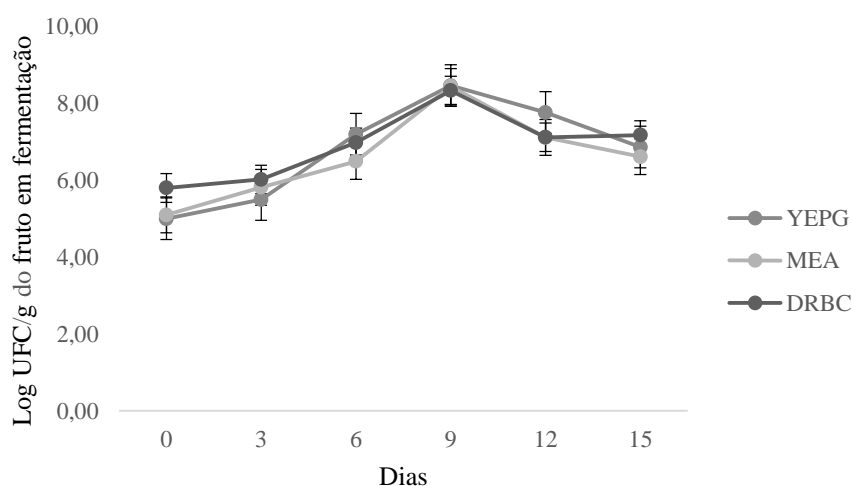
Um total de 1, 21.929 e 16.544 sequências não foram identificadas no banco de dados nos tempos T0, T6 e T15 da fermentação espontânea dos frutos do bacupari, respectivamente.

### 5.3. Quantificação e isolamento dos fungos

No presente trabalho a população de fungos no bacupari, era de  $5,30 \times 10^5$  UFC/g no início da fermentação e, após o 9º dia, essa população aumentou para 8,41 log UFC/g, apresentando leve redução a partir do 12º dia. Observa-se que o resultado, mostrado na Figura 9, está de acordo com os resultados encontrados nas análises moleculares sendo T6>T15>T0.

A quantificação foi realizada nos meios de YEPG, MEA e DRBC. Os três meios possibilitaram contagens próximas na mesma amostra, indicando que sua utilização apresenta viabilidade e sensibilidade para a detecção de leveduras e fungos filamentosos.

**Figura 9.** População de fungos durante fermentação espontânea do fruto integral de bacupari.



Os frutos possuem uma microbiota natural e diversos fatores contribuem para a permanência de microrganismos, como temperatura, pH, umidade e alta concentração de

açúcares (SPROCATI, 2014; MAMBUSCAY, 2013). Os fatores que selecionam a população de fungos em um fruto são, primeiramente, a oferta de carboidratos, proteínas e lipídios e, conseqüentemente, as enzimas microbianas produzidas capazes de degradar estes substratos para convertê-los em energia (TRINDADE, 2001).

#### 5.4. Caracterização morfológica dos isolados

Nos 6 diferentes tempos amostrados durante a fermentação espontânea do bacupari, 128 morfotipos de fungos filamentosos e leveduras foram isolados e avaliados quanto as suas características macro e micro morfológicas. Nas Tabelas 4, 5 e 6 são apresentados os resultados da caracterização morfológica dos fungos. Segundo Oliveira (2015), a caracterização morfológica ajuda na identificação dos isolados e é um dos passos para o descobrimento de novas espécies, porém não são deve ser utilizada isoladamente, pois sofre interferências do ambiente, como pH, temperatura e substrato energético, que podem modificar a morfologia das colônias e alterar os resultados.

**Tabela 4.** Características macromorfológicas dos fungos filamentosos isolados do Bacupari e sua prevalência nos diferentes tempos de fermentação espontânea.

Características Macroscópicas	Tempo (dia)						Total
	0	3	6	9	12	15	
<b>Forma</b>							
Arenosa	(0/0)*	(0/0)	(5/15)	(2/5)	(0/1)	(0/1)	(7/22)
Hifoso	(0/0)	(0/0)	(10/15)	(1/5)	(0/1)	(0/1)	(11/22)
Globonosa e alogodonasas	(0/0)	(0/0)	(0/15)	(2/5)	(0/1)	(0/1)	(2/22)
Penungente	(0/0)	(0/0)	(0/15)	(0/5)	(0/1)	(1/1)	(1/22)
Furfurácea	(0/0)	(0/0)	(0/15)	(0/5)	(1/1)	(0/1)	(1/22)
<b>Margem</b>							
Filamentosa	(0/0)	(0/0)	(10/15)	(3/5)	(1/1)	(1/1)	(15/22)
Inteira	(0/0)	(0/0)	(5/15)	(2/5)	(0/1)	(0/1)	(7/22)
<b>Elevação</b>							
Plano	(0/0)	(0/0)	(15/15)	(4/5)	(1/1)	(1/1)	(21/22)
Micélio	(0/0)	(0/0)	(0/15)	(1/5)	(0/1)	(0/1)	(1/22)
<b>Cor</b>							
Branco	(0/0)	(0/0)	(3/15)	(0/5)	(0/1)	(0/1)	(3/22)
Roxa	(0/0)	(0/0)	(10/15)	(0/5)	(0/1)	(0/1)	(10/22)
Amarelo	(0/0)	(0/0)	(0/15)	(0/5)	(0/1)	(1/1)	(1/22)
Preto	(0/0)	(0/0)	(2/15)	(5/5)	(1/1)	(0/1)	(8/22)
<b>Tamanho</b>							
0,2 - 0,5cm	(0/0)	(0/0)	(2/15)	(2/5)	(0/1)	(0/1)	(4/22)
≥ 0,5 cm	(0/0)	(0/0)	(13/15)	(3/5)	(0/1)	(0/1)	(16/22)
≤ 0,1 cm	(0/0)	(0/0)	(0/15)	(0/5)	(1/1)	(1/1)	(2/22)

<b>Característica microscópica</b>							
<b>Formato Celular</b>							
Hifa cenocítica	(0/0)*	(0/0)	(15/15)	(5/5)	(1/1)	(1/1)	(22/22)

\* (quantidade de isolados com a característica macroscópica observada / quantidade total de isolados)

As colônias de fungos filamentosos apresentaram-se mais comumente com formas hifosas (50%), com margens filamentosas (68,18%) e eram planas (95,45%). As cores predominantes foram as roxas (45,45%) e o diâmetro das colônias eram maiores que 0,5 cm (72,72%).

**Tabela 5.** Características macromorfológicas das leveduras isoladas do Bacupari e sua prevalência nos diferentes tempos de fermentação espontânea.

<b>Características Macroscópicas</b>	<b>Tempo (dia)</b>						<b>Total</b>
	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>15</b>	
<b>Forma</b>							
Circular	(2/3)*	(5/7)	(9/19)	(13/16)	(18/34)	(11/27)	(58/106)
Filamentosa	(1/3)	(0/7)	(4/19)	(1/16)	(2/34)	(6/27)	(14/106)
Rizoide	(0/3)	(1/7)	(3/19)	(1/16)	(8/34)	(8/27)	(21/106)
Irregular	(0/3)	(1/7)	(3/19)	(1/16)	(6/34)	(2/27)	(13/106)
<b>Margem</b>							
Inteira	(2/3)	(5/7)	(10/19)	(18/16)	(14/34)	(13/27)	(62/106)
Filamentoso	(1/3)	(0/7)	(2/19)	(1/16)	(2/34)	(2/27)	(8/106)
Encaracolada	(0/3)	(1/7)	(0/19)	(0/16)	(6/34)	(1/27)	(8/106)
Ondulada	(0/3)	(1/7)	(0/19)	(2/16)	(6/34)	(9/27)	(18/106)
Lobada	(0/3)	(0/7)	(7/19)	(1/16)	(0/34)	(2/27)	(10/106)
<b>Elevação</b>							
Convexa	(1/3)	(0/7)	(3/19)	(0/16)	(1/34)	(4/27)	(9/106)
Elevada	(2/3)	(2/7)	(4/19)	(4/16)	(10/34)	(9/27)	(31/106)
Plana	(0/3)	(0/7)	(11/19)	(8/16)	(20/34)	(14/27)	(53/106)
Papilada	(0/3)	(5/7)	(1/19)	(4/16)	(3/34)	(0/27)	(13/106)
<b>Cor</b>							
Bege	(3/3)	(6/7)	(11/19)	(9/16)	(14/34)	(6/27)	(49/106)
Branca	(0/3)	(1/7)	(2/19)	(5/16)	(6/34)	(12/27)	(26/106)
Rosa	(0/3)	(0/7)	(2/19)	(2/16)	(9/34)	(7/27)	(20/106)
Branca e Rosa	(0/3)	(0/7)	(4/19)	(0/16)	(5/34)	(2/27)	(11/106)
<b>Aspecto</b>							
Opaco	(2/3)	(5/7)	(16/19)	(14/16)	(23/34)	(20/27)	(80/106)
Brilhante	(1/3)	(2/7)	(3/19)	(2/16)	(11/34)	(7/27)	(26/106)
<b>Tamanho</b>							
0,2 - 0,5cm	(2/3)	(6/7)	(15/19)	(4/16)	(28/34)	(15/27)	(70/106)
≥ 0,5 cm	(1/3)	(1/7)	(1/19)	(5/16)	(0/34)	(10/27)	(18/106)
≤ 0,1 cm	(0/3)	(0/7)	(3/19)	(7/16)	(6/34)	(2/27)	(18/106)

\* (quantidade de isolados com a característica macroscópica observada / quantidade total de isolados)



O maior número de isolados de leveduras, em relação a diversidade morfológica, foi obtido no meio (*Yeast Extract-Peptide-Glucose*) YEPG. Segundo Casal (2004), o meio YEPG é o meio rico mais utilizado para o crescimento de fungos e em particular para leveduras, sempre que não são necessárias condições especiais para o seu cultivo. Fornece carbono e nitrogênio, assim como aminoácidos, precursores de nucleotídeos, vitaminas e metabólitos essenciais para um ótimo crescimento celular das leveduras.

Os dados constantes na tabela 6 mostraram a diversidade morfológica das colônias de leveduras. As colônias apresentaram, majoritariamente, as seguintes características macroscópicas: forma circular (54,28%), com margens inteiras (58,09%), eram planas (49,52%), a coloração branca foi a mais comum (42,85%), com aspecto opaco (76,63%) e tamanho da colônia variando entre 0,2 e 0,5 cm (73,33%). A coloração das colônias foi predominantemente branca, sendo a ausência de pigmentação a característica dominante entre os isolados obtidos. As características micromorfológicas mais comuns foram: forma esferoidal (31,13%) e presença de brotamento em 23,58% dos isolados (tabela 6).

**Tabela 6.** Características micromorfológicas das leveduras isoladas do Bacupari e sua prevalência nos diferentes tempos de fermentação espontânea.

Características Microscópicas	Tempo (dia)						Total
	0	3	6	9	12	15	
<b>Formato Celular</b>							
Ovoidal	(1/3)*	(0/7)	(6/19)	(8/16)	(8/34)	(3/27)	(26/106)
Ovoidal por brotamento	(0/3)	(1/7)	(0/19)	(0/16)	(5/34)	(3/27)	(9/106)
Ogival	(1/3)	(0/7)	(5/19)	(0/16)	(8/34)	(3/27)	(17/106)
Ogival por brotamento	(1/3)	(0/7)	(2/19)	(5/16)	(4/34)	(2/27)	(14/106)
Cilindroidal	(0/3)	(4/7)	(0/19)	(0/16)	(1/34)	(0/27)	(5/106)
Cilindroidal por brotamento	(0/3)	(1/7)	(0/19)	(0/16)	(0/34)	(0/27)	(1/106)
Esferoidal	(0/3)	(1/7)	(6/19)	(0/16)	(0/34)	(0/27)	(33/106)
Esferoidal por brotamento	(0/3)	(0/7)	(0/19)	(0/16)	(0/34)	(1/27)	(1/106)

\* (quantidade de isolados com a característica macroscópica observada / quantidade total de isolados)

### 5.5. Seleção de fungos produtores de invertase, lipase e pectinase

A Tabela 7 apresenta o total de isolados de fungos filamentosos e leveduras avaliados quanto sua capacidade de produção das enzimas invertase, lipase e pectinase. Dentre os 128 isolados, 22 fungos filamentosos (100%) e 106 leveduras (100%) apresentaram potencial de produção de invertase, 10 fungos filamentosos (45,4%) e 23 leveduras (21,7%) mostraram-se produtores de lipase. Não foram encontrados fungos filamentosos e leveduras produtoras de pectinase. Segundo Mambuscay (2013) e Araújo (2015), as enzimas têm um importante papel no estabelecimento e manutenção da comunidade de fungos durante a colonização dos frutos, esses fatores podem conferir vantagens adaptativas para algumas espécies.

**Tabela 7.** Análise qualitativa fungos filamentosos e de leveduras quanto ao seu potencial de produção de invertase, lipase e pectinase em placas.

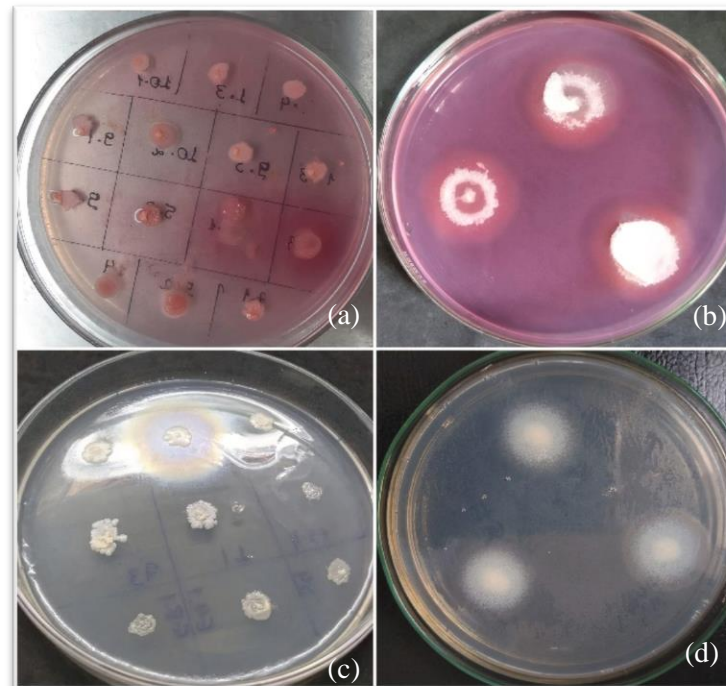
POSITIVOS		
Enzima	Fungos Filamentosos	Leveduras
Invertase	22 (100%)*	106 (100%)
Lipase	10 (45,4%)	23 (21,7%)
Pectinase	0 (0%)	0 (0%)

\*Porcentagem dos isolados produtores de enzimas.

A ausência da produção de pectinase pode ser atribuídas a fatores como condições de ambiente de crescimento, composição do meio de cultivo, bem como a incapacidade dos microrganismos em produzirem a enzima (RUEGGER E TAUKE-TORNISIELO, 2004).

Na Figura 10 é mostrada a formação de halos de hidrólise ou alteração da cor das colônias, indicando quais fungos eram potenciais produtores das enzimas avaliadas.

**Figura 10.** Formação de halos de hidrólise e alteração da cor das colônias em fungos filamentosos e leveduras produtoras de invertase e lipase.



(a) Leveduras produtoras de invertase; (b) Fungo filamentosso produtor de invertase; (c) Levedura produtora de lipase; (d) Fungo filamentosso produtor de lipase.

A placa de Petri contendo meio sólido foi indicada como um método direto para identificar o crescimento de fungos, e um método indireto para identificar a capacidade de produzir enzimas extracelulares. Além disso, é um método rápido e útil para avaliar fungos individuais de variantes genéticas quanto à presença ou ausência de enzimas. A sensibilidade do método da placa de ágar para identificar as enzimas depende de vários fatores, por exemplo, crescimento do microrganismo, produção e difusão das enzimas, atividade e especificidade da enzima ao substrato e concentração da enzima. Outros fatores também podem influenciar a formação do halo, como a composição do meio, a temperatura de crescimento e o ambiente químico e biológico (GEOFFRY, 2018; BENTUBO, 2014; SADATI, 2015).

### 5.6. Índice Enzimático - IE

Existem várias metodologias para se avaliar a habilidade dos microrganismos produzirem enzimas extracelulares em meio sólido. Entre os métodos mais utilizados de seleção microbiana para se avaliar a habilidade de produção de enzimas, está o índice

enzimático (IE), que relaciona diretamente o tamanho do halo da colônia e o halo de hidrólise da enzima. Segundo Barbosa (2019) e Lealem (1994), os microrganismos são considerados bons produtores de enzimas extracelulares, em meio sólido, quando o IE é maior ou igual a dois.

No presente trabalho, 10 fungos filamentosos e 25 leveduras apresentaram valores de IE que variaram entre 0,1 e 1,9 para a produção de lipase, conforme observado na Tabela 7. Goldbeck e Filho (2013) avaliaram o potencial de produção de lipase em placa de 372 leveduras isoladas de flores, frutos e solo de diversos biomas brasileiros. Dentre estas, 80 isolados foram da região Amazônica e apenas 16 desses isolados apresentaram atividade lipolítica. Dos 16 isolados positivos, 11 apresentaram IE maiores que 2, e 5 isolados apresentaram IE menores que 2.

**Tabela 7.** Índice Enzimático de produção de lipase dos fungos filamentosos e leveduras isolados de bacupari em fermentação espontânea.

<b>ÍNDICE ENZIMÁTICO (IE)</b>			
<b>FUNGOS FILAMENTOSOS</b>			
<b>Código*</b>	<b>IE</b>	<b>Código</b>	<b>IE</b>
BCF 5.1	1,5 ± 0,1	BCF 23.1	0,8 ± 0,1
BCF 5.2	1,0 ± 0,1	BCF 23.2	1,1 ± 0,1
BCF 5.3	1,1 ± 0,1	BCF 34.1	1,2 ± 0,1
BCF 5.4	1,0 ± 0,1	BCF 34.2	1,1 ± 0,2
BCF 5.5	1,1 ± 0,1	BCF 34.3	1,0 ± 0,1
<b>LEVEDURAS</b>			
<b>Código</b>	<b>IE</b>	<b>Código</b>	<b>IE</b>
BCL 20.1	1,7 ± 0,2	BCL 78.3	1,0 ± 0,0
BCL 20.2	1,9 ± 0,2	BCL 78.4	1,2 ± 0,6
BCL 20.3	1,7 ± 0,0	BCL 80.1	1,1 ± 0,1
BCL 20.4	1,7 ± 0,6	BCL 80.2	1,1 ± 0,2
BCL 29.1	1,2 ± 0,3	BCL 82.1	1,1 ± 0,2
BCL 29.3	1,6 ± 0,5	BCL 82.2	1,3 ± 0,0
BCL 29.4	1,3 ± 0,2	BCL 84.1	1,1 ± 0,0
BCL 44.1	1,8 ± 0,2	BCL 84.2	1,3 ± 0,2
BCL 44.2	1,6 ± 0,2	BCL 84.3	1,2 ± 0,3

BCL 75.1	1,2 ± 0,1	BCL 84.4	1,1 ± 0,2
BCL 75.2	1,4 ± 0,6	BCL 202	1,7 ± 0,4
BCL 78.1	1,1 ± 0,0	-	-

\*BCF – Código de identificação dos isolados de fungos filamentosos;

BCL – Código de identificação para os isolados de leveduras.

Para a enzima invertase foi observado a mudança de cor em todos os isolados, como visto na Figura 10-a e 10-b, com isso não foi possível realizar os cálculos do IE, porém todos os isolados que mudaram de cor foram considerados positivos para produção de invertase. Essa alteração de coloração se dá pela redução do corante formazona na presença dos açúcares redutores.

Nenhum dos isolados testados no presente trabalho apresentou habilidade de produção de pectinase, não sendo observados halos de hidrólise ao redor das colônias. A ausência da produção e secreção de enzimas em meio sólido pode ser atribuída a diversos fatores, como as condições do ambiente de crescimento, a composição do meio de cultivo, as técnicas utilizadas, a concentração da enzima no meio, bem como a própria incapacidade dos microrganismos em produzirem a enzima de interesse (VASCONCELOS et al., 2003; RUEGGER e TAUKE- 19 TORNISIELO, 2004).

### **5.7. Determinação da atividade enzimática de invertase e lipase dos fungos filamentosos e leveduras**

Os isolados de leveduras que apresentaram habilidade em produzir invertase e lipase na avaliação qualitativa foram submetidos a análise de Atividade Enzimática (U/mL) quantitativa, independentemente de seu IE. Segundo Johnson (2013); Yalçın e Çorbac (2013) e Carreiro (2019) as leveduras possuem vantagens diante dos fungos filamentosos em relação a produção enzimática, como a obtenção de altas concentrações de enzimas por meio da manipulação genética, crescimento rápido em meios simples e de baixo custo, atingimento de alta densidade celular, além de apresentarem um reduzido ciclo de fermentação e uma variedade de enzimas catalisadoras da mesma reação, o que viabiliza a versatilidade nas condições de aplicação.

Na Tabela 8 estão dispostos os valores de atividade enzimática de invertase e lipase, respectivamente, dos fungos filamentosos isolados do bacupari em fermentação espontânea.

Para os fungos filamentosos, foram testados 22 isolados para invertase e 10 isolados para lipase, sendo que 4 isolados de invertase e 4 de lipase apresentaram atividades enzimáticas. Os valores de atividade enzimática de invertase e lipase, respectivamente, das leveduras isoladas do bacupari em fermentação espontânea. Nas leveduras 106 isolados de invertase e 23 de lipase foram testados e apenas 13 isolados de invertase e 5 lipase apresentaram atividades enzimáticas.

**Tabela 8.** Atividade enzimática de invertase e lipase dos fungos filamentosos e leveduras isolados do bacupari em fermentação espontânea.

ENZIMAS					
INVERTASE				LIPASE	
Código*	U/mL	Código	U/mL	Código	U/mL
BCF 3.1	0,5 ± 0,1	BCL 13.3	0,3 ± 0,0	BCF 5.1	0,03 ± 0,1
BCF 5.3	0,7 ± 0,1	BCL 18.3	0,8 ± 0,0	BCF 23.2	0,05 ± 0,1
BCF 5.5	1,0 ± 0,2	BCL 39	0,2 ± 0,0	BCF 34.1	0,03 ± 0,1
BCF 8.1	0,6 ± 0,1	BCL 89.1	0,2 ± 0,0	BCF 34.3	0,02 ± 0,1
BCL 5.1	0,8 ± 0,0	BCL 162.2	0,4 ± 0,0	BCL 14	0,03 ± 0,0
BCL 10.2	0,2 ± 0,0	BCL 188.1	0,5 ± 0,1	BCL 20.4	0,03 ± 0,0
BCL 11.3	0,2 ± 0,0	BCL 192	0,6 ± 0,1	BCL 29.4	0,07 ± 0,1
BCL 11.4	0,2 ± 0,0	BCL 203	0,3 ± 0,0	BCL 44.1	0,04 ± 0,0
BCL 13.1	0,5 ± 0,0	-	-	BCL 44.2	0,05 ± 0,0

\*BCF – Código de identificação dos isolados de fungos filamentosos;

BCL – Código de identificação para os isolados de leveduras.

Os fungos filamentosos isolados do bacupari em fermentação espontânea que apresentaram maiores atividades enzimáticas foram BCF 5.5, com 1,0 U/mL e BCF 23.2 com 0,05 U/mL para invertase e lipase, respectivamente. As leveduras isoladas do bacupari em fermentação espontânea que apresentaram maiores atividades enzimáticas foram dos isolados BCL 5.1 e BCL 18.3 com 0,8 U/mL para invertase e BCL 29,4 com 0,07 U/mL para lipase.

Em comparação ao valor da atividade enzimática de invertase, observa-se que a atividade da lipase é menor. Ribas (2012) realizou um trabalho de produção e caracterização de lipase e afirmou que leveduras selvagens apresentaram atividade lipolítica baixa.

A descoberta de novas linhagens com potencial enzimático, oriundas de frutos

amazônicos, ainda permanece pouco estudado. Por outro lado, os estudos desenvolvidos nesta área revelam um grande reservatório de linhagens promissoras para diversas áreas do conhecimento (LIMA *et al.*, 2020).

## 6. CONCLUSÕES

As análises físico-químicas realizadas nos tempos 0, 3, 6, 9, 12 e 15 no fruto que foi usado de forma integral (casca, polpa e semente), em fermentação espontânea, apresentaram alterações devido à presença de microrganismos

Durante a fermentação a glicose e frutose foram os primeiros substratos a serem consumidos, os açúcares redutores totais tiveram uma taxa de 77,3% de consumo de carboidratos. O teor de etanol aumentou durante o processo fermentativo devido a leveduras presentes.

A identificação da comunidade fúngica demonstrou um total de 59.988 de sequências e 19 espécies fúngicas diferentes. A *Diaporthe ueckerae*, encontrada no tempo 6, foi a espécie mais abundante.

Ao total, foram isolados 22 fungos filamentosos sendo os isolados com maior atividade o BCF 5.5 com 1,0 U/mL e BCF 23.2 com 0,05 U/mL para invertase e lipase, respectivamente. Dentre as leveduras foram 106 isolados, a maior atividade foi observada para BCL 5.1 e BCL 18.3 com 0,8 U/mL para invertase e BCL 29,4 com 0,07 U/mL para lipase.

Os fungos filamentosos e as leveduras isolados do fruto bacupari em fermentação espontânea se mostraram promissoras para a produção das enzimas invertase e lipase. Na comunidade fúngica há um grande potencial de microrganismos com capacidade de atividades enzimáticas, porém eles precisam ser otimizados.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.A.C. (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY), 2000. Official Methods of Analysis, 17th ed, Washington, D.C. USA., 2000.

A.O.A.C. (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). Methods of analysis of the Association of official Analytical Chemists.12 ed., Washington. 1995. p.1994.1094.

ABDELFATTAH, A.; WINSNIEWSKI, DROBY, S.; SCHENA, L. Spatial and composition variation in fungal communities of organic and conventionally cultivated apples at consumer point of sale, 2016.

ABRÃO, F. O.; DUARTE, E. R.; FREITAS, C. E. S.; VIEIRA, E. A.; GERASEEV, L. C., DA SILVA-HUGHES, A. F., ROSA, C. A.; RODRIGUES, N. M. Characterization of fungi from ruminal fluid of beef cattle with different ages and raised in tropical lignified pastures. *CurrenT microbiology* 2014, 69, 649.

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

AGUIAR, F.; MENEZES, V.; ROGEZ, H. Spontaneous postharvest fermentation of açai (*Euterpe oleracea*) fruit, *Postharvest Biology and Technology*, v. 86, p. 294-299, 2013.

ALCÂNTARA, V. C.; MENEZES, E. G. T. Vinho de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck): Um estudo com diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, v. 3, n. 6, p. 780-785, 2017.

ALMEIDA, A.F.; TAULK-TORNISIELO, S.M.; CARMONA, E.C. Influence of carbon and nitrogen sources on lipase production by a newly isolated *Candida viswanathii* strain. *Annals of Microbiology*, v. 63, p. 1225-1234, 2012.

ALTSCHUL et al. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ALVES, L. M. C.; SCHUCH, V.; SOUZA, J. A. M.; LEMOS, E. G. M. Metagenoma e a desconstrução da biomassa. In: LEMOS, E. G. M.; STRADIOTTO, N. R. *Bioenergia: desenvolvimento, pesquisa e inovação*. São Paulo-SP: Cultura Acadêmica, 2012. p. 83-111.

AMIN, F.; BHATTI, H. N.; BILAL, M. Recent advances in the production strategies of microbial pectinases—a review. *Int. J. Biol. Macromol.*, 122 (2019), pp. 1017102610.1016/j.ijbiomac.2018.09.048.

ANDREWS, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.

ARAÚJO, M. A. M. Isolamento E Seleção De Leveduras Para Produção De Enzimas De Interesse Industrial A Partir De Frutos Do Cerrado. Dissertação – Mestrado em Biotecnologia.

Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2015.

AZEVEDO-SANTOS, V.; FEARNSIDE, P.; OLIVEIRA, C.; PADIAL, A.; PELICICE, F.; LIMA, D.; SIMBERLOFF, D.; LOVEJOY, T.; MAGALHÃES, A.; ORSI, M.; AGOSTINHO, A.; ESTEVES, F.; POMPEU, P.; LAURANCE, W.; PETRERE, M.; MORMUL, R.; VITULE, J. (2017) Removing the abyss between conservation science and policy decisions in Brazil. *Biodiversity and Conservation*; in press. <http://dx.doi.org/10.1007/s10531-017-1316-x>.

BARBOSA, I. T., ABRÃO, F. O., FERNANDES DA SILVA, T. P. G., SILVA, T. D., E SILVA, D. R., PESSOA, M. S. (2021). Atividade Enzimática de Fungos Presentes em Caules de Árvores Frutíferas do Cerrado Goiano. *Revista Brasileira Multidisciplinar*, 24(2), 101-111. <https://doi.org/10.25061/2527-2675/ReBraM/2021.v24i2.808>.

BARMAN, S.; SIT, N.; BADWAIK, L.S.; DEKA, S.C. Pectinase production by *Aspergillus niger* using banana (*Musa balbisiana*) peel as substrate and its effect on clarification of banana juice. *J. Food Sci. Technol.* 2015, 52, 3579–3589.

BARNETT, H. L.; BARRY, B. H. Illustrated genera of imperfect fungi. 4. ed. New York: Macmillan Company, 1986. 218p.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. Yeasts: characteristics and identification. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 790 p.

BARRETO, G. P. M.; BENASSI, M. T.; MERCADANTE, A. Z. Bioactive compounds from several tropical fruits and correlation by multivariate analysis to free radical scavenger activity. *Journal Brazilian Chemical Society*, vol.20, pp. 1856-1861, 2009.

BENNETT., J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *J. Biotechnol.*, 66 (1998), pp. 101-107.

BENTUBO, H. D. L; GOMPERTZ, O. F. “Efeitos da temperatura e tempo de incubação na expressão in vitro de proteases, fosfolipases, lipases e DNases por diferentes espécies de *Trichosporon*”, *SpringerPlus*, vol. 3, não. 1, pp. 1–10, 2014.

BIJESH, K.; SEBASTIAN, D. (2018). Review on bacterial production of alkaline pectinase with special emphasis on *Bacillus* species. *Bioscience Biotechnology Research Communications*. 11. 10.21786/bbrc/11.1/4.

BRASIL. Ministério da Saúde - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 27 de 13/01/1998 – Regulamento Técnico Referente à Informação Nutricional Complementar.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M L. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência; 506 p. 2008.

BORRIS, R. Em *Biotechnology volume 7a: Enzyme Technology*; Rehm, H.-J.; Reed, G., eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 1987, cap. 2.

CAMILLO, J. Bacupari (*Garcinia gardneriana* (Planch. & Triana) Zappi). 2016. Disponível em: <https://www.aplantadavez.com.br/2016/12/bacupari-garcinia-gardneriana-planch.html>.

Acesso em: 05 jan. 2022.

CARREIRO, S. C., GUEDES, E. H. S; ALMEIDA, D. T., ABREU-LIMA, T. L. Atividade celulolítica de leveduras isoladas de frutos de palmeiras. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos. 2019.

CASAL, M.; SCHULLER, C.; RODRIGUES, G.; PAIS, C. Microbiologia e genética molecular microbiana : manual de laboratório”. [S.l.]: Copissaurio, 2004.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further research. J. trop Med. Hyg., 70: 181-184, 1967.

CASTRO, A. S.; SANTOS, D. C. O custo econômico do desmatamento da Floresta Amazônica brasileira (1988-2014). Perspectiva Econômica, 12(1):1-15, 2016. Doi: 10.4013/pe.2016.121.01.

CHAVES, M.C.V.; GOUVEIA, J.P.G.; ALMEIDA, F.A.C. Caracterização físico-química do suco de acerola. Revista de biologia e ciências da terra, v. 4, nº 2, UEPA, 2004.

COCK, P. J. A et al. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. Bioinformatics, v. 25, n. 11, p. 1422–1423, 2009.

COIMBRA, V. A.; SERRA, J. L.; MOUCHRECK, A. N.; ROCHA, L. M. N.; OLIVEIRA, R. W. S.; CARVALHO, A. S. S; TELES, A. M. Potencial Tecnológico Dos Frutos De Acerola (*Malpighia* Sp.) Para Elaboração De Fermentados Alcoólicos Utilizando Cepas De *Candida* Sp. E *Pichia* Sp. 416. ed. São Luís - MA: Ciências Agrárias: Conhecimentos Científicos e Técnicos e Difusão de Tecnologias, 2020. Cap. 16. p. 158-201. DOI: 10.22533/at.ed.88620150716.

CORRÊA, R. S. et al. Lupeol. Acta Crystallographica Section C. 65: 97-99 p. 2008.

COSTA, J.; ALVES, N. Os recursos estratégicos da Amazônia brasileira e a cobiça internacional. Rev Perspect Porto Alegre 11 (20): 65-86, 2018.

DAMASO, M. C. T.; TERZI, S. C.; FARIAS, A. X.; OLIVEIRA, A. C. P.; FRAGA, M. E.; COURI, S. Selection of Cellulolytic Fungi Isolated from Diverse Substrates. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2012; 55(4):513-520. doi:10.1590/ S1516-89132012000400005.

DANTAS, C. E. A.; SILVA, J. L. A. Fermentado alcoólico de umbu: Produção, Cinética de fermentação, e caracterização físico-química. HOLOS. Currais Novos- RN, v. 02, 2017.

DIANO, N., GRIMALDI, T., BIANCO, M., ROSSI, S. Apple juice clarification by immobilized pectolytic enzymes in packed or fluidized bed reactors. Journal of Agricultural and Food Chemistry, (56), 11471-11477, 2008.

DINIZ, M. B.; DINIZ, M. J. T.; SILVA, A. L. F.; BARRIOS, M. L. C.; LIMA, E. B. F. Região amazônica: biodiversidade e possibilidades de transformação industrial. Centro de Pesquisa Econômica, v. 6, n. 5, 2017.

ELIZEI, V. G. Imobilização de fungos filamentosos com potencial para uso agroindustrial. Arquivos do Instituto Biológico [online]. 2014, v. 81, n. 02, pp. 165-172. DOI: <https://doi.org/10.1590/1808-1657001032012>.

FERNANDEZ, C. M. M., F. B. LORENZETTI, C. C. IWANAGA, K. ZANOLI, L. P. S. BERNUCI, J. P. P. ANDRADE, B. P. DIAS. 2021. Chemical composition and seasonal variation of the essential oils of leaves of *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi (Clusiaceae). *Australian Journal of Crop Science* 15 (1):1-8. doi: 10.21475/ajcs.21.15.01.1800.

FLORES, W. B. C.; SILVA, W. D. P.; SANTOS, J. G.; ALFAIA, S. S. A Cultura da Pupunha: Cultivo e Beneficiamento. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. 1ª Edição. Manaus, 2019.

FONSECA et al. Contrasting the microbiomes from forest rhizosphere and deeper bulk soil from an Amazon rainforest reserve, *Gene*, v. 642, p. 389-397, 2018.

FORSYTHE, S. J. Microbiologia da segurança dos alimentos. 2a ed. Porto Alegre: Artmed; 2013.

GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. "Triagem e produção de lipase de organismos fúngicos", *Biocatálise e Biotecnologia Agrícola*, vol. 14, pp. 241-253, 2018.

GOLDBECK, R.; FILHO, F.M. Screening, characterization, and biocatalytic capacity of lipases producing wild yeasts from Brazil biomes. *Food Science and Biotechnology*, Namgu, Coreia do Sul, v. 22, n. 1, p. 79-87, 2013.

GONDIM, J. A. M. Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 4, p. 825-827, 2005.

GOULART, A. J.; ADALBERTO, P. R.; MONTI, R. Purificação parcial de invertase a partir de *Rhizopus* sp em fermentação semi-sólida. *Alim. Nutr.*, Araraquara/SP. 2003; (v.14):199-203.

GUBIANI, J. R. Bioprospecção de fungos endofíticos *Camarops* sp., *Periconia atropurpurea* e *Pseudofusicoccum stromaticum* e avaliação epigenética de *Phoma* sp. Tese de doutorado, Unesp, 2015.

GUPTA, A.K.; BATRA, R.; BLUHM, R.; BOEKHOUT, T.; DAWSON, T.L. Skin diseases associated with *Malassezia* species. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v. 51, p. 785-798, 2004.

GUERRA, A. F. Microbiologia Geral: Bacteriologia. 1a ed. Valença: 2017.

GUIMARÃES, C.L.; OTUKI, M.F.; BEIRITH, A.; CABRINI, D.A.A. review on the therapeutic potential of *Garcinia gardneriana*. *Dynamis* 2004, 12, 6-12.

HANKIN, L. ANAGNOSTAKIS, S. G. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycology*, v. 67, p. 597-607, 1975.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect cellulase activity of micro-organisms. *Journal of General Microbiology*, v. 98, n. 1,

p. 109–115, 1977.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n.8, p. 2928 - 2935, 2005.

HUANG, Y. Transformation in filamentous fungi mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Biotechnol Bull.* 2007;17:111–4.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3ª ed. V.1. São Paulo. 1985.

JACKSON, R. S. Fermentation. In *Wine Science* (pp. 332–417). Academic Press. 2008.

JOHNSON, E. A. Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts – the Ascomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 97, p. 503-517, 2013.

JOLLY, N. P.; VARELA, C.; PRETORIUS, I. S. Not your ordinary yeast: non-Saccharomyces yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research*, 2014.

JUNQUEIRA, N. T. V.; SUSSEL, A. A. B.; JUNQUEIRA, K. P.; ZACARONI, A. B.; BRAGA, M. F. Doenças. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. (Ed.). *Maracujá: O produtor pergunta, a Embrapa responde*. Brasília, DF: Embrapa Cerrados, 2016. p. 169- 180.

KATZ, S.E. *The art of Fermentation*. Chelsea Green Publishing, 2012. 130p.

KAUSHIK, N.; BISWAS, S.; SINGH, J.; *The Scitech Journal*, 2014, 1, 15.

KOTWAL, S. M.; SHANKAR, V. Immobilized invertase, *Biotechnology Advances*, Volume 27, Issue 4, 2009, p. 311-322, ISSN 0734-9750, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.009>.

KUBRA, K.T.; ALI, S.; WALAIT, M.; SUNDUS, H. Potential applications of pectinases in food, agricultural and environmental sectors. *J. Pharm. Chem. Biol. Sci.* 2018, 6, 23–34.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; ROSA, C. A.; PETER, G. Yeast systematics and phylogeny - implications of molecular identification methods for studies in ecology. *The Yeast Handbook*. Germany: Springer-Verlag, Berlin-Herdelberg, pp. 11-30, 2006.

KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. *The Yeasts: A Taxonomic Study*, 5a. ed., Elsevier Science: Oxford, 2011.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n.4, p. 726–732, 2005.

LACAZ, C. S.; PORTO E.; MARTINS, J. E. C.; VACCARI EMH, MELO NT. *Tratado de micologia médica*; Prefácio: Bertrand Dupont. 9. Ed. São Paulo, Sarvier, p. 1014, 2002.

LAGRANHA, V. L. Correção in vitro da deficiência de arilsulfatase A em

fibroblastos em pacientes com leucotistrofia metacromática através do uso de células recombinantes micro- encapsuladas. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

LEALEM, F.; GASHE, B.A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef. (*Eraglostis tef.*). *J. Appl. Bacteriol.*,77:348-352, 1994.

LIAUD, N.; GINIÉS, C; NAVARRO, D.; FABRE, N.; CRAPART, S.; HERPOËL-GIMBERT, I.; LEVASSEUR A.; RAOUCHE S.; SIGOILLOT, J. C. Exploring fungal biodiversity: Organic acid production by 66 strains of filamentous fungi. *Fungal Biol.Biotechnol.* 2014.

LIMA, J. M. Fungos Produtores De Enzimas Associados À Macrófitas Aquáticas Do Rio Negro, Manaus. *Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)*, [S.l.], v. 10, n. 3, p. 52-57, dez. 2020. ISSN 2179-5746. Disponível em: <<https://periodicos.unifap.br/index.php/biota/article/view/5392>>. Acesso em: 18 jan. 2022. doi:<http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v10n3p52-57>.

LIMA, A. C. M.; SANTOS, I. A.; BASTOS, L. T. A.; ELIAS, F. C. P; ALMEIDA. A. F. Potencial de frutos amazônicos para a produção de enzimas microbianas. Palmas: Eduft, 2020. Cap. 4. p. 48-63.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Embrapa Florestas, v. 1, 5 ed., 384 p, 2008.

MAMBUSCAY, M. L. A.; LÓPEZ, A. W. A.; CUERVO, M. R. A.; ARGOTE, V. F. E.; CAVADID, E. O. Identificación de las levaduras nativas presents en zumos de piña, mora y uva. *Biotechnology en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. Ed. Especial. n 2*, p. 136-144, 2013.

MEHTA, A.; GULERIA, S.; SHARMA, R.; GUPTA, R. (2021). The lipases and their applications with emphasis on food industry. *Microbial Biotechnology in Food and Health*, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819813-1.00006-2>.

MERÍN, M. G.; MARTÍN, M. C.; RANTSIOU, K.; COCOLIN, L.; DE AMBROSINI, V. I. M. Characterization of pectinase activity for enology from yeasts occurring in Argentine Bonarda grape. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 46, n. 3, p. 815-823, 2015.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicy acid reagent for determinations of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426 -428, 1959.

MONFARDINI, J. D. Modulação da produção metabólica de *Botryosphaeria parva* utilizando a abordagem OSMAC , e sua co-cultura com o endófito *Pseudofusicoccum stromaticum*. Tese de doutorado, Unesp, 2020.

MONTERO, I.F.; SARAVIA, S.A.M.; SANTOS, R.A.; MARCIA, J.A.F.; SILVA, S.M.; CHAGAS, E.A. Use of Amazon Fruits Barks as Source of Nutrients. *Journal of Agricultural Science*, 2020.

MONTEIRO, M. C. P. Identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em

solos preservados do cerrado [dissertação]. [Lavras]: Universidade Federal de Lavras; 2012.

MOREIRA, P. L. L. Hidrólise Química e Enzimática da Sacarose. 2020. Tese de Doutorado.

MOREIRA, M. E. C.; NATAL, D. I. G.; TOLEDO, R. C. L.; RAMIREZ, N. M.; RIBEIRO, S. R. M.; BENJAMIN, L. A.; VELOSO, M. P. S.; MARTINO, H. S.D. Extratos de casca de bacupari (*Garcinia brasiliensis*) reduzem a obesidade induzida por dieta rica em gordura em rato (INGLÊS). *Journal of Functional Foods*, 29 (2017), pp. 143 – 153.

MURUGAN, T.; DEEPIKA, P.; KOWSALYA, A.; SIVASUBRAMANIAN, K.; REJISHA, R. P.; M. MURUGAN, M.; WINS, J. A. (2020). Production and characterization of extracellular pectinase from a newly isolated *Bacillus* species from fruit waste soil. *Materials Today: Proceedings*, <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.09.607>.

NADEEM, H.; RASHID, M. H.; SIDDIQUE, M. H.; AZEEM, F.; MUZAMMIL, S.; JAVED, M. R.; ALI, M. A.; RASUL, I.; RIAZ, M. Microbial invertases: A review on kinetics, thermodynamics, physicochemical properties. *Process Biochemistry*, 50: 1202-1210, 2015.

OLIVEIRA, M. Ocorrência, diversidade e caracterização enzimática de leveduras isoladas de frutos do cerrado. Mestrado acadêmico em Biologia Microbiana do Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana. 2015.

OLIVEIRA, M.; ANDRADE, I. V.; MARTINS, R. A.; GERALDO, A. B. INFLUÊNCIA DO TAMANHO-PESO DA SEMENTE NA PRECOCIDADE DE EMERGÊNCIA DE BACURIPARI (*Rheedia gardneriana*) *Revista Caatinga*, vol. 19, núm. 4, Universidade Federal Rural do Semi-Árido Mossoró, Brasil, pp. 387-390, 2006.

PAGLARINI, C.S.; PINTO, E. G.; SILVA, F. S.; PORTO, A. G.; LEITE, A. L. M. P. Análise Físico-Química E Comportamento Reológico Da Polpa De Bacupari (*Rheedia Gardneriana* Tr. & Planch.). *Enciclopédia Biosfera*. Goiânia – GO, 2012. v. 8, n. 14; p 1821-1829.

PAPADAKI, E.; KONTOGIANNOPOULOS, N. K.; ASSIMOPOULOU, A. N.; MANTZOURIDOU, F. T. (2020). Feasibility of multi-hydrolytic enzymes production from optimize d grape pomace residues and wheat bran mixture using *Aspergillus niger* in an integrated citric acid enzymes production process. *Bioresource Technology*, v. 309, 123317, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123317>.

PATEL, H.; RAY, S.; PATEL, A.; PATEL, K.; TRIVEDI, U. (2020). Enhanced lipase production from organic solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* UKHL1 and its application in oily waste-water treatment. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 28, 101731, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101731>.

PAZ, M.; GULLON, P.; BARROSO, M. F.; CARVALHO, A.P.; DOMINGUES, V. F.; GOMES, A. M.; BECKER, H.; LONGHINOTTI, E.; DELERUE-MATOS, C. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. *Food Chemistry*, Vol 172, Pp. 462-468, 2015.

PEDROLI, D. B., MONTEIRO, A. C., GOMES, E. CARMONA, E. C., Pectin and

Pectinases: production. Characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. *The Open Biotechnology Journal*, v. 3, p. 9 -18, 2009.

PEIXOTO, N. et al. Efeito de substrato na germinação e desenvolvimento inicial de mudas de mangostão amarelo. 5p. 2005.

PEREIRA, D. B. C.; SILVA, P. H. F.; OLIVEIRA, L. L. Físico-química do leite e derivados: métodos analíticos. 2. ed. Juiz de Fora: EPAMIG, 234p., 2001.

PESCE, L. C. Levantamento etnobotânico de plantas nativas e espontâneas no RS: conhecimento dos agricultores das feiras ecológicas de Porto Alegre. 2011. 51f. Monografia (Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2011.

PHAFF, H. J., STARMER, W. T. Yeasts associated with plants, insects and soil. *The Yeasts Biology*, Academic Press, London (1987), pp. 123-180.

PHUKON, L. C.; CHOURASIAA, R.; KUMARI, M.; GODAN, T. K.; SAHOO, D.; PARAMESWARAN, B.; RAI, A. K. (2020). Production and characterisation of lipase for application in detergent industry from a novel *Pseudomonas helmanticensis* HS6. *Bioresource Technology*, v. 309, 123352, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123352>.

POLIZELI, M. L. T. M.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F. Pectinase production by *Neurospora crassa*: purification and biochemical characterization of extracellular polygalacturonase activity. *Journal of General Microbiology*, London, v. 137, n. 8, p. 1815-1823. 1991.

QUAYSON, E.; AMOAH, J.; HAMA, S.; AKIHIKO KONDO, A.; OGINO, C. (2020). Immobilized lipases for biodiesel production: Current and future greening opportunities. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 134, 110355, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110355>.

RABELO, A.; Frutos nativos da Amazônia: comercialização nas feiras de Manaus-AM. INPA, 2012.

RAVEENDRAN, S.; PARAMESWARAN, B.; UMMALYMA S. B.; ABRAHAM, A.; MATHEW, A. K.; MADHAVAN. A.; REBELLO; S. Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. *Food Techonoly and Biotechnology*, v. 56, nº 1, 2018.

REDDY, P. P.; REDDY, G. S. N; SULOCHANA, M. B. Praveen et al. Screening of  $\beta$ -fructofuranosidase producers with high transfructosylation activity and its 32 experimental run studies on reaction rate of enzyme. *J Biol Sci*, v. 10, n. 3, p. 237-241, 2010.

RHODES, M. E. The preservation of *Pseudomonas* under mineral oil. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 20, n. 1, p.108–118, apr. 1957.

RIBAS, R. K. C. Produção e caracterização de uma lipase alcalina secretada por um isolado de *Candida parapsilosis*. Dissertação de mestrado – Pós-Graduação em Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 93, 2012.



ROCHA, A. P. Tecnologia de sementes e mudas de *Garcinia gardneriana* (PLANCH. & TRIANA) ZAPPI. 2015. Tese de Doutorado - (Doutorado em Ciências Florestais), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2015.

ROCHA, C. P. Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido. 2010. 161 f. Dissertação (Mestrado em Engenharias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; PASTORE, G. Evaluation of the antioxidant properties of the brazilian cerrado fruit *Annona crassiflora* (araticum). *Journal of Food Science*, v. 71, n.2, C102–C107, 2006.

ROMERO-GOMEZ, S.; AUGUR, C.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnol Lett.* 22:1255 e 1258 2000.

RUEGGER, M.J.S.; TAUKE-TORNISIELO, S.M. Cellulase activity of fungi isolated from soil of the Ecological Station of Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Rev. bras. Bot.*, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.

RUFINO, M. S. M. Propriedades funcionais de frutas tropicais brasileiras não convencionais. 2008. 237f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró (RN). 2008.

RUSTIGUEL, B. C. Produção e Caracterização Bioquímica das Invertases do Fungo Filamentoso *Aspergillus phoenicis*. Dissertação – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, Ribeirão Preto – SP. 2009.

SAE-LEAW, T.; BENJAKUL, S. Sea bass liver lipase (*Lates calcarifer*): Features and use for degreasing fish skin. *Food Chemistry*, v. 240, p. 9-15 2018.

SACRAMENTO, C. K. do; MATOS, C. B.; SOUZA, C. N.; BARRETTO, W. S.; FARIA, J. C. Características físicas, físico-químicas e químicas de cajás oriundos de diversos municípios da região sul da Bahia. *Magistra*, v.19, p.283-289, 2007.

SADATI, R.; BARGHI, A.; LARKI, R. "Isolamento e triagem de fungos lipolíticos de águas costeiras do Mar Cáspio do Sul (Norte do Irã)", *Jundishapur Journal of Microbiology*, vol. 8, não. 4, 2015.

SANTA-CECÍLIA, F. V.; VILELA, F. C.; DA ROCHA, C. Q.; DIAS, D. F.; CAVALCANTE, G. P.; FREITAS, L. A.; DOS SANTOS, M. H.; GIUSTI-PAIVA, A. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Garcinia brasiliensis*. *J. Ethnopharmacol.* 2011, 133, 467–473.

SANTOS, J. N.; PASSOS, J. K. F.; MENEZES, D. B.; MACEDO, M. L. H.; DINIZ, L. E. C. Isolamento e Identificação de Microrganismos Produtores de Enzimas para Aplicação Industrial. Semana de Pesquisa da Universidade Tiradentes, 2016.

SANTOS, Q. O. D. Extração E Propriedades Físico-Químicas De Amido De Frutos Nativos Da Região Amazônica. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos). Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Rondônia – UNIR.

Rondônia, 2016.

SCHMIDT, P.-A., BÁLINT, M., GRESHAKE, B., BANDOW, C., RÖMBKE, J., & SCHMITT, I. (2013). *Illumina metabarcoding of a soil fungal community*. *Soil Biology and Biochemistry*, 65, 128–132. doi:10.1016/j.soilbio.2013.05.014.

SCHNEIDER, L. C.; LEÃO, K. V.; MACHADO L. L.; GUIMARÃES, A. R. D. Caracterização física e química de frutos de bacupari, *Salacia Crassifolia* (Mart. ex Schult.) G. Don, provenientes do município de Barreiras –BA. *Braz. J. of Develop.*, Curitiba, v. 6, n 3,p 13942-13953, 2020.

SEBASTIANES, F. L., LACAVA, P. T., FÁVARO, L. C., RODRIGUES, M. B., ARAÚJO, W. L., AZEVEDO, J. L., & PIZZIRANI-KLEINER, A. A. (2012). Genetic transformation of *Diaporthe phaseolorum*, an endophytic fungus found in mangrove forests, mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Current Genetics*, 58(1), 21–33.

SERRA, J.; RODRIGUES, A. F.; RILTON, M.; ANTONIO, D.; MILTON S. S. (2018). Alternative sources of oils and fats from Amazonian plants: Fatty acids, methyl tocopherols, total carotenoids and chemical composition. *Food Research International*. 116. 12-19. 10.1016/j.foodres.2018.12.028.

SHEN, Y.; NIE, J.; LI, Z.; LI, H.; WU, Y.; DONG, Y.; ZHANG, J. Differentiated surface fungal communities the apple fruit harvesting point of rural and peri-urban orchards. *Sci Rep*, 2018.

SILVA, E. M.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H.; REES, J. F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*, v. 101, n. 3, p. 1012–1018, 2007.

SILVA-HUGHES, A. F.; WEDGE, D. E.; CANTRELL, C. L.; CARVALHO, C. R.; PAN, Z.; MORAES, R. M.; MADDOXX, V. L.; ROSA, L. H. Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associated with the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) from the United States. *Microbiological research* 2015, 175, 67

SINGH, T. C. Avaliação dos parâmetros físico-químicos e estabilidade de compostos bioativos em óleos de polpa e amêndoa de frutos amazônicos. 2015. 158 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2015.

SINGH, P.; KUMAR, S. Microbial enzyme in food biotechnology. In: *Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects*. India: Elsevier Inc., 2018. p. 19– 28.

SMYTH, R. P. et al. Reducing chimera formation during PCR amplification to ensure accurate genotyping. *Gene*, v. 469, p. 45–51, 2010.

SOARES, M. M. C. N.; SILVA, R.; GOMES, E. Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Revista de Microbiologia*, v. 5, p. 299–303, 1999.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; FILHO, A. S.; PINHEIRO, M. L.B.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta amazônica*, 34:185-195. 2004.

SOUZA, F.G.; LIMA, R.A. A importância da família *Arecaceae* para a região Norte. *Revista Educamazônia*, v.23, n.2, p.100-110, 2019.

SOUZA, N. M; SERPA, M. N.; SILVA, M. C. O.; SILVA, R. O.; Aspectos morfológicos de leveduras isoladas de frutas e flores. *Brazilian Journal of Development*, Curitiba, v.7, n.4, p. 40309-40319, 2021.

SPROCATI, A. R. et al. Bioprospecting at former mining sites across Europe: microbial and functional diversity in soils. *Environmental Science Pollution Research*, Rome, v. 21, p. 6824–6835, 2014.

SRIVASTAVA, N. Production of Food Processing Enzymes from Recombinant Microorganisms. *Enzymes in Food Biotechnology*. Department of Biotechnology, CETIILM, Greater Noida, India, <https://doi.org/10.1016/B9780128132807.00043-8>. 2019.

STAJICH, J. R; BERBEE, M. L.; BLACKWELL, M.; HIBBETT, D. S.; JAMES, T. S.; SPATAFORA, J. W.; TAYLOR, J. W. The Fungi, *Current Biology*, Volume 19, Issue 18, 2009, Pages R840-R845, ISSN 0960-9822, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.07.004>.

STONE, C.W. Yeast products in the feed industry: a practical guide for feed professionals. <https://en.engormix.com/feed-machinery/articles/yeast-products-in-feed-industry-t33489.htm>. 2006.

SUSSEL, A. A. B. Estudo da Epidemiologia da Verrugose-do-Maracujazeiro. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2015. 33 p.

TAKAHASHI, J. A.; LIMA, G. S.; LYRA, F. H.; SILVA-HUGHES, A. F.; GONÇALVES, F. A. G. Fungos Filamentosos e Química: Velhos Conhecidos, Novos Aliados. *Revista Virtual de Química*, Minas Gerais, p. 2351-2382. 2017.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Products Reports*, Cambridge, v. 18, p. 448-459, ago. 2001.

THAPA, S.; PRASANNA, R.; RANJAN, K.; VELMOUROUGANE, K.; RAMAKRISHNAN, B. Nutrients and host attributes modulate the abundance and functional traits of phyllosphere microbiome in rice. *Microbiology Research*, v. 204, p. 55–64, 2017.

TORRES, F. L. Isolamento, caracterização e potencial biotecnológico de fungos endofíticos associados à plantas do cerrado. Dissertação de mestrado, UFSCar, 2018.

TRINDADE, R.C. Biodiversidade de leveduras associadas a polpas de frutas da região nordeste do Brasil. Belo Horizonte, 2001. 87 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. 2001.

VASCONCELOS, W.E. RIOS, M.S. SOUSA, A.H. MEDEIROS, E.V. SILVA, G.M.C. MARACAJÁ, P.B. Caracterização bioquímica e enzimática de *Cunninghamella* isoladas de manguezal. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v.3, 2003.

VIDEIRA, T. C. Produção de pectinases por cultivo em estado sólido do fungo *Pycnoporus sanguineus* em resíduos agroindustriais. 2021. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Meio Ambiente) – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2021.

VILLÉN-PÉREZ, S.; MENDES, P.; NÓBREGA, C.; GOMES, L.; DE MARCO JÚNIOR, P. (2017) Mining code changes undermine biodiversity conservation in Brazil. *Environ Conserv.* <https://doi.org/10.1017/S0376892917000376>.

VITOLO, M. Tópicos de Enzimologia Industrial. In: *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Said, S e Pietro, R. C. L. R. Eds, Ed. Legis Summa. Ribeirão Preto, 2004.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). *Microbiology Genetics Bulletin*, vol. 13, p. 42–43, 1956.

WARD, O. P. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*, 2011.

WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., & TAYLOR, J. (1990). AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. *PCR Protocols*, 315–322. doi:10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1.

YALÇIN, H. T.; ÇORBAC, C. Isolation and characterization of amylase producing yeasts and improvement of amylase production. *Turkish Journal of Biochemistry*, Ankara, Turquia, v. 38, p. 101-108, 2013.

ZAMORA, F. (2009). Biochemistry of alcoholic fermentation. In *Wine Chemistry and Biochemistry* (pp. 3–26). New York, NY: Springer New York.

ZIMMER, F. M. A. L.; FERRAZ, F. S.; SANTOS, C. C. A. A. Diversidade De Frutos Amazônicos E Seu Uso Sustentável. Palmas: Eduft, 2020. Cap. 6. p. 75-87.