



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA – UFOB
Centro Multidisciplinar de Luís Eduardo Magalhães – CMLEM
Graduação em Engenharia de Biotecnologia

ANTONIA FÁBIA DO NASCIMENTO FREIRE

**PROSPECÇÃO CIENTÍFICA, TECNOLÓGICA E TRIAGEM DE LEVEDURAS
AMBIENTAIS QUANTO À PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE
INTERESSE BIOTECNOLÓGICO**

Luís Eduardo Magalhães, BA

2023

ANTONIA FÁBIA DO NASCIMENTO FREIRE

**PROSPECÇÃO CIENTÍFICA, TECNOLÓGICA E TRIAGEM DE LEVEDURAS
AMBIENTAIS QUANTO À PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE
INTERESSE BIOTECNOLÓGICO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal do Oeste da Bahia, Centro Multidisciplinar de Luís Eduardo Magalhães, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Taides Tavares dos Santos
Coorientador: Prof.^a Dr.^a Dannuza Dias Cavalcante

Luís Eduardo Magalhães, BA

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

F866 Freire, Antonia Fábria do Nascimento.

Prospecção científica, tecnológica e triagem de leveduras ambientais quanto à produção de enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico / Antonia Fábria do Nascimento Freire. – 2023.

61 f.; il. color.

Orientador: Prof. Dr. Taidés Tavares dos Santos.

Coorientador: Profa Dra. Dannuza Dias Cavalcante

Trabalho de Conclusão de Curso: (graduação em Engenharia de Biotecnologia) – Universidade Federal do Oeste da Bahia. Centro Multidisciplinar de Luís Eduardo Magalhães, Luís Eduardo Magalhães, BA, 2023.

1. Biotecnologia – aplicação industrial. 2. Leveduras - Prospecção tecnológica. 3. Biomas do Cerrado - Bahia, região oeste da.

I. Santos, Taidés Tavares dos. II. Cavalcante, Dannuza Dias. III. Universidade Federal do Oeste da Bahia – Centro Multidisciplinar de Luís Eduardo Magalhães. IV. Título.

CDD: 660.6

BIBLIOTECAS UFOB - Biblioteca Universitária de Luís Eduardo Magalhães

ANTONIA FÁBIA DO NASCIMENTO FREIRE

**PROSPECÇÃO CIENTÍFICA, TECNOLÓGICA E TRIAGEM DE LEVEDURAS
AMBIENTAIS QUANTO À PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE
INTERESSE BIOTECNOLÓGICO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal do Oeste da Bahia, como
requisito para obtenção do título de Bacharel em
Engenharia de Biotecnologia.

Luís Eduardo Magalhães-BA, 15 de maio de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente



TAIDES TAVARES DOS SANTOS

Data: 31/05/2023 11:07:33-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Taidés Tavares dos Santos
Universidade Federal do Oeste da Bahia

Documento assinado digitalmente



JAMILLY RIBEIRO LOPES

Data: 31/05/2023 08:50:04-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Jamilly Ribeiro Lopes
Universidade Federal do Oeste da Bahia

Documento assinado digitalmente



MAYKON JHULY MARTINS DE PAIVA

Data: 01/06/2023 10:49:37-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Me. Maykon Jhuly Martins De Paiva
Universidade Federal de Gurupi

(A versão assinada deste documento encontra-se na Coordenação do Curso)

AGRADECIMENTOS

A Deus sempre! meu Aba pai, que está acima de tudo, pelo sonho plantado em meu coração e pela força e perseverança que em mim gerou para chegar até aqui.

A minha mãe Maria por ser sempre um exemplo de força e fé, por ser minha base sólida, minha rainha.

A minha irmã Fernanda, por acreditar mais em mim que eu mesmo, por seus incentivos e conselhos e por seu amor incondicional.

A o meu irmão Kleiton por ser exemplo, por ter sido pai, irmão e amigo nos momentos que mais precisei, por ter me aturado quando nem eu mais me aturava.

A o meu esposo Damião, por seu apoio incondicional, por cada palavra de ânimo, por cada oração, e pelas noites que dormiu sozinho enquanto eu dormiu com meu computador.

Ao meu pai Arquileu e meu irmão Agnaldo, por serem sempre exemplos de caráter, por cada lição dada e cada palavra de sabedoria semeada em minha vida.

As minhas amadas sobrinhas Emilly e Valentina, por serem os verdadeiros motivos que me fazem desejar evoluir como pessoa.

A todos os meus amigos e colegas, particularmente Caássia, Eduarda, Luís e Renata. Meus sinceros agradecimentos. Vocês desempenharam um papel significativo na conquista deste sonho.

Agradeço também à Universidade Federal do Oeste da Bahia - UFOB, e a todos os professores do meu curso pela elevada qualidade do ensino oferecido, pela dedicação e compromisso em compartilhar conhecimento, em especial aos professores Alexandro Zimmer, Jamilly Ribeiro, Dannuza Cavalcanti e Felipe Ferreira.

Dedico também a servidora Anizia Pereja (*in memoriam*), por todo seu apoio emocional, sua leveza nas palavras e firmeza nos conselhos. Por seu exemplo de força e perseverança.

E por último mas não menos importante, agradeço ao meu orientador Dr. Taidés, por sempre estar presente orientando, compartilhando conhecimento e desenvolvendo ideias, e a minha co-orientadora professora Dr.^a Dannuza Dias, pelas valiosas contribuições dadas durante todo o processo de realização deste trabalho. Obrigado por me manterem motivada durante todo o processo!

EPÍGRAFE

“Prefiram a minha instrução à prata, e o conhecimento ao ouro puro, pois a sabedoria é mais preciosa do que rubis; nada do que vocês possam desejar compara-se a ela”
(Provérbios 8:10-11).

RESUMO

O Cerrado brasileiro é o segundo maior bioma do Brasil e a savana mais rica em diversidade vegetal, animal e microbiana do mundo. Micro-organismos desse bioma representam uma fonte rica de bioinsumos com importantes aplicações biotecnológicas. Fungos ambientais leveduriformes produzem enzimas hidrolíticas, as quais contribuem para o crescimento e adaptação desses organismos a diferentes substratos e condições ambientais, além de apresentarem potencial emprego biotecnológico no desenvolvimento de produtos e otimização de bioprocessos industriais. Os objetivos deste trabalho foram isolar fungos leveduriformes de frutos da lobeira (*Solanum lycocarpum*) e do maracujá do cerrado (*Passiflora cincinnata*), analisar, por meio de uma triagem, leveduras ambientais quanto à produção de enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico e, realizar sua prospecção científica e tecnológica. Para isso, leveduras endofíticas associadas a frutos e pseudofrutos de caju (6 isolados) e fruto do pequi (um isolado), associadas à superfície corpórea de *Spodoptera frugiperda* (6 isolados) e saprófitas de grãos de milho (2 isolados) foram reativadas (Batata Dextrose Ágar - BDA, $25 \pm 3^\circ\text{C}$, 48 h). Foram utilizados, também, três isolados advindos de partes internas de frutos de lobeira. Todas as leveduras foram triadas quanto à capacidade de produção de amilases, celulases, pectinases e proteases em meio sólido e foram calculados índices de atividade enzimática (IAE). Com relação à prospecção científica e tecnológica, realizou-se um levantamento bibliográfico nas bases de dados MEDLINE/PubMed, *World Wide Science*, *Scientific Electronic Library Online* (SCIELO) e Catálogo de teses dissertações da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). A prospecção tecnológica foi realizada nos bancos de dados do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), *European Patent Office* (EPO) e *The United States Patent and Trademark Office* (USPTO). Observou-se, a partir da triagem de atividade enzimática que, do total de isolados testados (18), 44,4% demonstraram atividade celulolítica, 27,8% demonstraram atividade amiloítica e 22,2% apresentaram atividade pectinolítica. Nenhum isolado apresentou atividade proteolítica. Os isolados LC2, LC1 e P2L1 se destacam por apresentar atividade para três (celulase, amilase e pectinase) das quatro enzimas testadas. Os melhores IAEs foram observados para o isolado LC2, atingindo melhor IEA para atividade celulítica em pH ácido. No que diz respeito à prospecção científica e tecnológica, foram identificados um total 91.873 artigos científicos e 445.453

depósitos de patentes. Das patentes depositadas, o maior volume corresponde à enzima protease, que possui vasta aplicação industrial, principalmente como constituinte de detergentes. No INPI, foram analisados o número de patentes por país, demonstrado que os EUA foi o país que mais realizou depósito de patentes. O ano de 2015 se destacou como o com maior quantidade de publicações. Quanto à classificação internacional de patentes (IPC), houve destaque para para produção de álcool combustível com quatro publicações no total. Concluiu-se, por meio deste estudo, que há diversas perspectivas de aplicação tecnológica e inovação com enzimas hidrolíticas advindas de leveduras. Além disso, leveduras com potencial biotecnológico, como os isolados LC2, LC1 e P2L1, podem ser obtidas a partir de substratos ambientais. Esforços incrementais devem ser empreendidos visando caracterizar taxonomicamente as leveduras utilizadas neste estudo, bem como as atividades enzimáticas desempenhadas por elas a fim de gerar novos produtos e/ou processos biotecnológicos.

Palavras-chave: Cerrado, Enzimas, Leveduras, Inovação, Patentes, Produção Científica.

ABSTRACT

The Brazilian Cerrado is the second largest biome in Brazil and the richest savannah in plant, animal and microbial diversity in the world. Microorganisms from this biome represent a rich source of bioinputs with important biotechnological applications. Environmental yeasts produce hydrolytic enzymes, which contribute to the growth and adaptation of these organisms to different substrates and environmental conditions, in addition to presenting potential biotechnological use in the development of products and optimization of industrial bioprocesses. The objectives of this work were to isolate yeast-like fungi from lobeira (*Solanum lycocarpum*) and cerrado passion fruit (*Passiflora cincinnata*) fruits, to analyze, through screening, environmental yeasts regarding the production of hydrolytic enzymes of biotechnological interest, and to carry out their prospection scientific and technological. For this purpose, endophytic yeasts associated with cashew fruits and pseudofruits (6 isolates) and pequi fruit (one isolate), associated with the body surface of *Spodoptera frugiperda* (6 isolates) and corn grain saprophytes (2 isolates) were reactivated (Potato Dextrose Agar - PDA, $25 \pm 3^\circ\text{C}$, 48 h). Three isolates from the internal parts of lobeira fruits were also used. All yeasts were screened for their ability to produce amylases, cellulases, pectinases and proteases in solid medium and enzymatic activity indices (IAE) were calculated. With regard to scientific and technological prospecting, a bibliographic survey was carried out in the databases MEDLINE/PubMed, World Wide Science, Scientific Electronic Library Online (SCIELO) and Catalog of theses and dissertations from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). The technological prospecting was carried out in the databases of the National Institute of Industrial Property (INPI), European Patent Office (EPO) and The United States Patent and Trademark Office (USPTO). From the screening of enzymatic activity, it was observed that, of the total number of isolates tested (18), 44.4% showed cellulolytic activity, 27.8% showed amylolytic activity and 22.2% showed pectinolytic activity. None of the isolates showed proteolytic activity. The LC2, LC1 and P2L1 isolates stand out for showing activity for three (cellulase, amylase and pectinase) of the four tested enzymes. The best IAEs were observed for the LC2 isolate, reaching the best IEA for cellulolytic activity at acidic pH. With regard to scientific and technological prospecting, a total of 91,873 scientific articles and 445,453 patent deposits were identified. Of the deposited

patents, the largest volume corresponds to the protease enzyme, which has wide industrial application, mainly as a constituent of detergents. At the INPI, the number of patents per country was analyzed, demonstrating that the USA was the country that deposited the most patents. The year 2015 stood out as the year with the highest number of publications. As for the international patent classification (IPC), the production of fuel alcohol stood out with four publications in total. It was concluded, through this study, that there are several perspectives for technological application and innovation with hydrolytic enzymes derived from yeast. Furthermore, yeasts with biotechnological potential, such as LC2, LC1 and P2L1 isolates, can be obtained from environmental substrates. Incremental efforts must be undertaken in order to taxonomically characterize the yeasts used in this study, as well as the enzymatic activities performed by them in order to generate new products and/or biotechnological processes.

Keywords: Cerrado, Enzymes, Yeasts, Innovation, Patents, Scientific Production.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 - Halo (zona clara ao redor da colônia de fungos) indicando atividade enzimática positiva na triagem dos microrganismos na produção (A) amilase, (B) celulase e (C) Pectinase e atividade enzimática negativa para as respectivas enzimas (D),(E), (F).....	35
Figura 02 - Análise das médias de atividade enzimática de amilases.....	37
Figura 03 - Análise das atividades enzimáticas de celulase de leveduras com variação de pH.....	40
Figura 04 - Análise das médias de atividade enzimática de pectina.....	41
Figura 05- Países com maior número de publicações sobre enzimas Amilase, celulase, pectina e protease de leveduras.....	44
Figura 06 - Quantidade de patentes por palavras-chave para todos os bancos de depósito de patentes analisados.....	46
Figura 07 - Quantidade de patentes depositadas no INPI por país de origem.....	47
Figura 08 - Número de patentes depositadas nos últimos 10 anos para as palavras-chaves pré definidas.....	47
Figura 09 - Diagrama com as patentes com mais de uma enzima dentre as estudadas.....	48
Figura 10 - Classificação IPC das patentes encontradas para todas as palavras-chaves.....	49

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 01 - Espécies ou morfoespécies de leveduras utilizadas por códigos e a fonte de obtenção.....	30
TABELA 01 - Porcentagem de leveduras positivas para atividade enzimática testada.....	36
TABELA 02 - Índices de atividade enzimática (IEA) de celulase, amilase e pectinase de isolados de leveduras testadas.....	36
TABELA 03 - Médias dos IEAs de atividade celulolítica (com e sem variação de pH).....	39
TABELA 04 - Número de dissertações, teses, artigos científicos publicados nos últimos 10 anos, obtidas a partir da busca com as palavras-chave selecionadas.....	43
TABELA 05 - Número de patentes por bases de dados utilizadas para a pesquisa.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA- Potato dextrose Agar

BRICS - Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul

CIP - Classificação Internacional de Patentes

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

EDTA - Ácido Tetracético Etileno Diamino

EPO - *European Patent Office*

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IEA - Índice de Atividade Enzimático

INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial

MU - Patente de Modelo de Utilidade

NC-IUBMB- *Nomenclatures Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*

NDSAP - Política Nacional de Compartilhamento e Acessibilidade de Dados

OCTI - Observatório de Ciência, Tecnologia e Inovação

PI - Patente de Invenção

SciELO - *Scientific Electronic Library Online*

USPTO - *The United States Patent and Trademark Office*

µm - micrómetro,

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. JUSTIFICATIVA	15
4. REFERENCIAL TEÓRICO	16
4.1 Vegetação Brasileira	16
4.2 Cerrado Brasileiro	17
4.3 Frutos do Cerrado	17
4.4 Leveduras	18
4.5 Enzimas	20
4.6 Enzimas Hidrolíticas	21
4.6.1 Amilase	23
4.6.2 Celulase	24
4.6.3 Pectinase	25
4.6.4 Protease	26
4.7 Prospecção científica e tecnológica	28
5. METODOLOGIA	30
5.1 Reativação e aferição da caracterização morfológica de leveduras ambientais	30
5.2 Isolamento e análise morfológica de leveduras de lobeira (<i>Solanum lycocarpum</i> St. Hil) e maracujá-do-mato (<i>Passiflora cincinnata</i> Mast.).	31
5.3 Avaliação de atividade amilolítica	31
5.4 Avaliação de Atividade Celulolítica	32
5.5 Avaliação de atividade pectinolíticas	33
5.6 Avaliação de atividade proteolítica	33
5.7 Prospecção científica e tecnológica	34
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
6.1 Análise do ensaio de atividade amilolítica	37
6.2 Análise do ensaio de atividade celulolítica	38
6.3 Análise do ensaio de atividade pectinolíticas	40
6.4 Análise do ensaio de atividade proteolítica	41
6.5 Prospecção científica e tecnológica	42
8. CONCLUSÃO	50
9. REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é reconhecido como o país com a maior diversidade biológica do mundo, possuindo grande variedade de espécies vegetais. (PEIXOTO *et al.*, 2016). A biodiversidade do Brasil constitui uma fonte de substâncias biologicamente ativas com enorme potencial para o desenvolvimento de novos produtos provenientes de fontes naturais (BARREIRO *et al.*, 2009). Estudos com espécies vegetais nativas no cerrado brasileiros têm demonstrado que estas são ricas fonte de leveduras endofíticas (MOREIRA, 2016). As leveduras, por sua vez, possuem a capacidade de produzir várias enzimas, dentre as quais amilases, celulasas, pectinase e protease (FARIAS, 2008).

As enzimas são proteínas complexas especializadas na catálise de reações biológicas, que ocorrem no interior das células animais e vegetais e dos microrganismos, facilitando e acelerando a maior parte das reações bioquímicas que ocorrem nas mesmas. Por possuírem sítio ativo, apresentam especificidade tanto por seus substratos como para o tipo de reação efetuada sobre o substrato. Por apresentarem tais características, as enzimas são catalisadores muito utilizados em diversos segmentos industriais e em métodos de análises químicas e diagnósticos, entre outras (FARINAS, 2011).

Muito embora há um número considerável de estudos sobre enzimas naturais obtidas a partir de leveduras isoladas de plantas do bioma cerrado, o número de produtos patenteados é muito inferior. Desta forma, estudos de prospecção são importantes, por constituir um meio sistemático de mapear desenvolvimentos científicos e tecnológicos capazes de influenciar a economia, o setor industrial, o meio ambiente e a sociedade como um todo (QUINTELLA, 2011). Este tipo de estudo visa agregar valor às informações sobre um recurso com potencial inovador, identificando oportunidades de aplicações e minimizando incertezas e riscos futuros, sendo uma ferramenta analítica que lida com o cenário de constantes transformações e rápida evolução do conhecimento. Contribui também para um entendimento do que é necessário ser realizado no presente para orientar melhores escolhas no futuro (DA SILVA *et al.*, 2021).

Tendo em vista o que foi supramencionado, este trabalho busca o levantamento de dados para a prospecção científica e tecnológica de emprego de enzimas obtidas a partir de leveduras ambientais. Visa também, verificar atividades enzimáticas em leveduras endofíticas, leveduras associadas a insetos e de grãos de milho de armazém.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar, por meio de uma triagem, leveduras ambientais quanto à produção de enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico e, realizar uma prospecção científica e tecnológica sobre enzimas hidrolíticas de leveduras.

2.2 Objetivos específicos

- Reativar e aferir a caracterização morfológica de leveduras ambientais (endofíticas, associadas a insetos e a grãos de milho) da coleção de culturas microbianas do Laboratório 4 da UFOB/CMLEM;
- Isolar e caracterizar morfológicamente leveduras associadas a frutos de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hill) e de maracujá-do-mato (*Passiflora cincinnata* Mast.);
- Investigar a produção e enzimas hidrolíticas: amilase, celulase, pectinase e protease por leveduras ambientais;
- Prospectar científico e tecnologicamente enzimas hidrolíticas obtidas de leveduras com potencial emprego biotecnológico.

3. JUSTIFICATIVA

Um campo promissor dentro da Biotecnologia Vegetal e Industrial é a prospecção de agentes produtores de enzimas, visto que estas possuem uma ampla aplicação comercial e industrial. Diversos elementos da natureza, tem demonstrado ser boas fontes de produtores de enzimas. A produção de enzimas, por sua vez, é uma forma eficiente de aplicações de recursos naturais por agregar valor a estes elementos ampliando suas aplicações bem como possibilitando a destinação correta aos resíduos naturais (MACHADO, 2015).

As enzimas desempenham um importante papel como biocatalisadores em todos os estágios de reações químicas e metabólicas nos organismos vivos. Atualmente, cerca de 200 tipos de enzimas de origem microbiológicas são empregadas comercialmente para diversas aplicações, porém, somente 20 enzimas naturais são produzidas em escala industrial (BERNAL, 2020). Nos processos industriais, as enzimas hidrolíticas são empregadas quase sempre para a degradação de diferentes substâncias naturais (OLIVEIRA, 2017).

Uma média percentual de 50% das enzimas comerciais são de origem fúngica. As enzimas amilases, celulasas, pectinase e proteases, podem ser produzidas por diferentes gêneros de fungos de origens diversas, entre eles, os fungos endofíticos que são fungos que vivem em associações simbióticas com a planta hospedeira por pelo menos uma fase de vida, sendo estes fungos filamentosos e leveduriformes (ALVES, 2020).

Estudos para obtenção de enzimas a partir de fungos endofíticos têm demonstrado que estas são boas fontes de enzimas com potencial aplicação comercial e industrial (SANTOS *et al.*, 2020; FERREIRA, 2022). Estudos com leveduras naturais obtiveram resultados promissores. Entretanto, as principais preparações enzimáticas utilizadas pela indústria são de origem de fungos filamentosos (MENESES, 2007; MACHADO, 2015; BARBOSA *et al.*, 2020; EL-CORAB, 2022).

Este trabalho objetivou avaliar a produção de enzimas (amilase, celulase, pectinase e protease), obtidas a partir de leveduras naturais de diferentes fontes de substrato originárias do bioma cerrado, com a perspectiva do emprego industrial. Objetivou também, fazer o levantamento nas bases de dados nacionais e internacionais sobre patentes de enzimas hidrolíticas obtidas a partir de leveduras naturais e de publicação de artigos científicos a fim de aferir o status e a direção dos avanços científico-tecnológica da área, bem como as lacunas a serem preenchidas.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Vegetação Brasileira

A vegetação de um determinado bioma é constituída por um conjunto de espécies vegetais agrupadas com características adaptativas e fitossomas (formas de vegetação) semelhantes. A fitofisionomia por sua vez, depende das características de crescimento das plantas, diferenciando-se entre árvores, arbustos, palmeiras, lianas, entre outras (COUTINHO, 2016).

O Brasil é composto por seis biomas: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal. Cada um destes biomas se diferenciam por possuírem características distintas e por abrigarem espécies animais e vegetais endêmicas (BRASIL, 2023). Estes biomas também vivenciam diferentes desafios ligados ao uso equilibrado de seus recursos naturais e manutenção do patrimônio ambiental e cultural do país (SALCEDO, 2008).

Algumas plantas brasileiras possuem diversas aplicações com valor econômico e social agregado. Por exemplo, árvores nativas da caatinga são muito apreciadas para obtenção de madeiras para uso nobre, lenha e carvão (DRUMOND, 2013), plantas nativas da Amazônia, do Cerrado e dos Pampas são empregadas para fins terapêuticos e medicinais pela população local (STASI, 1989; SANTOS, 2000; MENEZES, 2016; FERREIRA, 2022; SILVA, 2022).

Diversas árvores frutíferas encontradas na Mata Atlântica, no Cerrado e no Pantanal, são utilizadas como alimento para algumas populações nativas, além de serem a base para desenvolver compotas, doces e geleias comercializados na região, gerando renda às comunidades locais (POTT *et al.*, 1994; CARVALHO *et al.*, 2021; DA SILVA, 2022; DA HORA CARRIÇO *et al.*, 2023).

Espécies vegetais nativas do Brasil também têm demonstrado serem boas fontes de agentes biológicos com diversas aplicações dentro da biotecnologia. Fungos endofíticos e outros fungos ambientais, por exemplo, apresentam diversas aplicações como biocontroladores podendo atuar como inseticidas, acaricidas, nematocidas e fungicidas, representando 15% do mercado mundial de bioinsumos (FELIX, 2019; DINI, 2022). São também boas fontes de leveduras com capacidade de produzir enzimas de interesse industrial (DA SILVA *et al.*, 2013; MACHADO, 2015).

4.2 Cerrado Brasileiro

O termo Cerrado é comumente utilizado para designar o conjunto de ecossistemas que ocorrem no Brasil Central (KLINK, 2005). Ocupa uma área de 2.036.448 km², que equivale a aproximadamente 22% do território nacional. O Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul e abrange os estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, Paraná, São Paulo e Distrito Federal (BRASIL, 2023).

Quanto à fitofisionomia, que é a designação do tipo de vegetação baseado-se em suas características físicas e sua aparência geral, o cerrado é formado por onze tipos principais de vegetação para o Bioma, que são: formações florestais (Mata Ciliar, Mata de Galeria, Mata Seca e Cerradão), formações savânicas (Cerrado sentido restrito, Parque de Cerrado, Palmeiral e Vereda) e formações campestres (Campo Sujo, Campo Limpo e Campo Rupestre). Considerando também os subtipos neste sistema, são reconhecidas 25 fitofisionomias (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Considerado a savana (vegetação formado por gramíneas, árvores pequenas e arbustos) mais rica do mundo, o bioma cerrado abriga 11.627 espécies de plantas nativas já catalogadas, o que corresponde a mais de 12% de toda biota vegetal brasileira (BRASIL, 2023). Entre essas espécies vegetais, inclui diversas árvores frutíferas com grande potencial de aplicação industrial, por conter sais minerais, proteínas, açúcares, ácidos graxos, vitaminas e carotenóides (SILVA *et al.*, 2001).

4.3 Frutos do Cerrado

Dentro da variedade de espécies vegetais nativas do cerrado, encontram-se as espécies produtoras de frutos comestíveis e não comestíveis. As espécies comestíveis apresentam elevado valor nutricional, econômico e social devido ao fato de serem muito apreciadas pela população local, por apresentarem, em sua maioria, atributos sensoriais atrativos (CORRÊA *et al.*, 2008; MACHADO, 2015).

Fonte natural de proteínas, vitaminas, minerais e fibras, algumas frutas nativas do cerrado também apresentam elevados teores de açúcares, o que o tornam atrativo para consumo *in natura* ou no preparo de alguns alimentos (CAMPOS *et al.*, 2012). Os extratos

também possuem elevado potencial antioxidante (ROESLER, 2007). A casca, a polpa e sementes de alguns frutos do cerrado contém compostos bioativos e biopolímeros que podem ser empregados como matéria-prima no desenvolvimento de novos produtos e materiais com valor comercial, contribuindo para a economia da região (ROMANI *et al.*, 2021).

As espécies frutíferas de maior importância social e comercial para a região são pequi (*Caryocar spp.*), mangaba (*Hancornia spp.*), araticum (*Annona crassiflora*), caju do cerrado (*Anacardium spp.*), maracujá-do-mato (*Passiflora cincinnata* Mast), baru (*Dipterix alata*), cagaita (*Eugenia dysenterica*) (JUNQUEIRA *et al.*, 2012; DO NASCIMENTO *et al.*, 2015). Outra espécie igualmente importante é a lobeira (*Solanum lycocarpum*), este fruto nativo do cerrado possui propriedades terapêuticas, sendo utilizado pela população como calmante, sedativo, antiepilético, antiespasmódico e antiinflamatório. É empregado também no tratamento do Diabetes Mellitus e da obesidade, além de ser empregado na culinária para produção de doces e geleias (ROCHA, 2006; YOSHIKAWA *et al.*, 2007).

4.4 Leveduras

Leveduras são microrganismos unicelulares, divididos em dois filos: *Ascomycota* e *Basidiomycota* com diâmetro que pode variar de 1 a 5 μm (MOREIRA *et al.*, 2006). São células eucarióticas e heterotróficas, possuem uma parede rígida e se reproduzem sexuada ou assexuadamente (PEIXOTO, 2006). As leveduras compõem um grupo de fungos heterogêneos com características muito semelhantes, sendo a identificação desses fungos baseada nas características bioquímicas e morfológicas, sendo a morfologia utilizada para determinar o gênero e as bioquímicas usadas para diferenciar as várias espécies (MOLINARO, 2009).

Com variada distribuição no ecossistema, as leveduras diferenciam-se dos bolores por se apresentarem quase sempre sob forma unicelular e possuem reprodução mais rápida, além de serem mais eficientes na realização de alterações químicas. São capazes de crescer dentro de amplos intervalos de pH ácido e em concentrações de etanol de até 18%. Algumas leveduras crescem em concentrações de sacarose de 55-60% e produzem pigmentos, cuja cor varia do amarelo claro, rosa claro e vermelho (PEIXOTO, 2006)

Durante muito tempo, bebidas como cerveja e vinho foram produzidas pelo homem sem que se tivesse o conhecimento de que o processo fermentativo ocorria devido à presença

natural de leveduras contidas na casca das uvas e de outras frutas e grãos. Essa descoberta foi realizada por Louis Pasteur. Atualmente, sabe-se que as leveduras são encontradas no solo, na água e na casca de muitas frutas e vegetais. A *Saccharomyces cerevisiae* também conhecida como “levedura do pão” é a levedura mais conhecida e com grande aplicabilidade na indústria alimentícia, devido ao fato de que essa levedura fermenta o açúcar em álcool em condições anaeróbicas, e em condições aeróbicas, ela decompõe açúcares simples em dióxido de carbono e água. Embora algumas espécies de leveduras sejam patogênicas para o homem, como *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, outras podem atuar como produtoras de muitas vitaminas e proteínas, sendo uma boa fonte de nutrientes para os seres humanos ou como degradadoras de produtos naturais, tendo assim vasta aplicabilidade industrial para desenvolvimentos de diversos produtos (ENGELKIRK *et al.*, 2000).

Conhecidas como catalisadores biológicos, leveduras de diferentes espécies têm sido objeto de estudos por apresentar altas especificidades e eficiência catalítica, características que a tornam biotecnologicamente atrativa. A descoberta da diversidade de leveduras em plantas têm ganhado notoriedade pelo reconhecimento de sua capacidade em desempenhar como endófitos, funções relevantes para saúde vegetal (BONFIM, 2014).

Os microrganismos que vivem no interior de plantas, são denominados de endofíticos. Estes microrganismos habitam em diferentes partes da planta como folhas e caule, em associação simbiótica com o hospedeiro. Os microrganismos endofíticos foram estudados no início do século XIX por Bary que os definiu como sendo assintomáticos. Estudos sobre a importância e possível aplicação destes microrganismos foram iniciadas somente nos anos 70. Atualmente, temos o conhecimento de que os microrganismos endofíticos, sejam eles fungos ou bactérias, são capazes de produzir antibióticos, toxinas e outros compostos com potencial interesse biotecnológico (BORGES, 2008). Leveduras endofíticas são encontradas em grande volume e de forma diversificada em tecidos de plantas onde vivem sem causar dano algum ao tecido vegetal, sendo que pelo menos um é específico ao hospedeiro. Podem ocorrer em diferentes ecossistemas do território terrestre sob diferentes condições climáticas. São encontrados tanto em plantas vasculares como em algas marinhas, musgos e samambaias (CHAPLA *et al.*, 2013).

Algumas espécies de leveduras vivem em associações simbióticas com insetos como cupins, abelhas, lagartas e formigas, normalmente em colônias na cutícula externa ou no intestino do hospedeiro fornecendo a este proteção contra patógenos, parasitóides e outros

parasitas através da síntese de toxinas específicas ou a partir da modificação do sistema imunológico do hospedeiro (MELO *et al.*, 2019). Além da proteção, estes microrganismos são capazes contribuir para a nutrição do seu hospedeiro através do fornecimento de aminoácidos essenciais, vitaminas B e no caso de parceiros fúngicos, produzindo esteróides. Esta relação simbiótica constitui um modelo biológico do uso de antibióticos na natureza e tem sido objeto de estudo para possíveis aplicações biotecnológicas (GUIMARÃES, 2010). Portanto, considerando o potencial de emprego biotecnológico de leveduras e outros microrganismos associados a insetos, cabe a realização de mais estudos sobre os sistemas simbiotes envolvendo microrganismos e insetos com o objetivo avaliar os mecanismos moleculares envolvidos nestas interações (MELO *et al.*, 2019).

4.5 Enzimas

A descoberta de que extratos de leveduras poderiam fermentar açúcar em álcool, através de moléculas que continuavam ativas mesmo a remoção das células, realizada por Eduard Buchner, marcaram o fim das ideias do vitalismo e fez nascer a ciência bioquímica. Tempos mais tarde, Frederick W. Kühne nomeou as moléculas descobertas por Buchner como enzimas (do grego, *enzymos*, “leve-dado”) (LEHNINGER, 2019). Atualmente sabemos que as enzimas mediam a grande maioria das reações bioquímicas que constituem a vida (VOET, 2013).

Com a exceção de poucos RNA catalíticos, todas as enzimas são proteínas, encontradas em diferentes tamanhos, sendo as menores constituídas por menos de 150 aminoácidos. Se consideramos cada espécie de enzima separadamente, chegaremos a um número de enzimas na casa de bilhões, de modo que, por exemplo, a enzima amilase do malte de cevada, são considerada diferente das enzimas amilases encontrada em outros cereais. Porém, se considerarmos apenas as diferentes atividades enzimáticas conhecidas na natureza, existem cerca de 3.200 enzimas diferentes (ROWN, 2018).

As enzimas são classificadas segundo o tipo de reação que catalisam, e o seu peso molecular pode variar entre cerca de 12.000 e mais de um milhão. Algumas enzimas não necessitam de outros grupos químicos além dos próprios resíduos de aminoácidos. Outras necessitam de um componente químico adicional, denominado cofator (LEHNINGER, 2019).

Atualmente, as enzimas constituem o mais importante grupo de produtos biológicos de

necessidade humana, ficando atrás somente dos antibióticos (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Diversas indústrias, fazem uso de enzimas em seus processos, sobretudo nas áreas da biotecnologia industrial, ambiental e de alimentos, em sua maioria como biocatalisadores. A maioria destes processos industriais ocorrem em condições específicas de operação, como altas temperaturas e presença de solventes orgânicos, inativando algumas enzimas. desta forma, a descoberta de enzimas com diferentes características e resistentes a situações extremas, como a capacidade de atuar em valores extremos de pH, em altas temperaturas, em soluções com elevadas pressões osmóticas ou na presença de solventes orgânicos, bem como estereosseletividade e alta especificidade, são de interesse para o setor industrial (ALVES, 2017).

Considerada uma área da biotecnologia em expansão, a produção de enzimas movimentam bilhões de dólares por ano. A integração de várias áreas como Microbiologia, Bioquímica, Química e Engenharia Bioquímica, tem levado à descoberta de novas enzimas bem como novas aplicabilidades para as enzimas já descobertas. O aumento no número de trabalhos e pesquisa, além de contribuir para o aumento do conhecimento sobre essas proteínas, têm contribuído para a redução do custo de enzimas industriais, o que colabora para o aumento de sua aplicação (ORLANDELLI, 2012).

4.6 Enzimas Hidrolíticas

As enzimas são classificadas e codificadas pelo *Nomenclatures Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB) de acordo com suas propriedades catalíticas. Anteriormente, eram divididas em seis grupos (classes): Oxirredutases, Transferases, Liases, Isomerases, Ligases e Hidrolases (MACHADO, 2015). Recentemente, foi reconhecido um sétimo grupo de enzimas, que engloba as Translocases (SAMI *et al.*, 2021). As enzimas hidrolases reconhecem uma região específica de determinada molécula e, na presença de água quebram essas moléculas em moléculas menores e catalisam reações de hidrólise de ligação covalente (MACHADO, 2015).

As enzimas hidrolíticas são muito empregadas em processos industriais principalmente na degradação de substâncias naturais. Na indústria têxtil, as enzimas mais utilizadas são amilase, celulase, pectinase, oxidorredutase. Nas indústrias de produção de substâncias detergentes são empregadas quase sempre as enzimas celulase, lipase, protease,

oxidorreductase. Já na indústria alimentícia, habitualmente usa-se celulase, lactase, lipase, pectinase, protease, oxidorreductase, enquanto que nas indústrias de papel e de couro são empregadas lipase, oxidorreductase, xilanase e protease (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

O bioma Cerrado possui uma rica variedade de espécies, sendo em sua maioria endêmicas, ou seja, são encontradas somente neste bioma. Essa diversidade biológica é constituída não somente por espécies vegetais e animais, mas também, pela presença de microrganismos com características morfológicas, fisiológicas e ecológicas distintas. Estes microrganismos possuem uma variada aplicabilidade biotecnológica entre elas, são capazes de produzir enzimas de interesse comercial e industrial (DA SILVA *et al.*, 2020).

O interesse em avaliar a produção de enzimas hidrolíticas por leveduras tem aumentado nos últimos tempos, devido à crescente demanda por enzimas de interesse industrial. Alguns estudos com leveduras isoladas a partir de espécies vegetais do bioma cerrado, têm demonstrado bons resultados. Oliveira (2015), avaliou a ocorrência de leveduras em 13 frutos do cerrado (pequi (*Caryocar brasiliense*), mangaba (*Hancornia speciosa*), caju do cerrado (*Anacardium occidentale*), cagaita (*Stenocalyx dysentericus*), pitomba (*Talisia esculenta*), coco guariroba (*Syagrus oleracea*), araçá (*Psidium cattleianum*), jatobá do cerrado (*Hymenaea courbaril*), maracujá do cerrado (*Passiflora cincinnata*), lobeira (*Solanum lycocarpum*), buriti (*Mauritia flexuosa*), araticum (*Annona montana*) e coquinho azedo (*Butia capitata*)), obtendo 85 isolados de leveduras de 14 gêneros. 25 dos isolados de leveduras obtidas demonstram atividade enzimática para amilase, celulase, pectinase e protease e o restante dos isolados apresentaram atividade para pelo menos uma enzima sendo a maioria produtoras de protease.

Paludo (2015) avaliou o potencial de leveduras isoladas do cerrado Tocantinense para a produção de amilases, celulasas, xilanasas e lipases por meio de *screening* e fermentação submersa, os resultados obtidos demonstraram a presença de atividade amilolítica, celulítica, xilanolítica e lipásica. El-Corab Neto *et al.* (2022) estudou a capacidade de leveduras obtidas de caldo de plantas de sorgo sacarino cultivadas em solo de Cerrado e pertencentes à Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo, na produção de enzimas hidrolíticas, amilase e celulase. Das 24 linhagens testadas, 10 apresentaram capacidade de produzir várias enzimas. Esses estudos mostram que a produção de enzimas por leveduras deve ser explorada dado a importância econômica das enzimas e os bons resultados obtidos experimentalmente.

4.6.1 Amilase

O amido, principal polissacarídeo de reserva dos vegetais, constitui-se numa importante reserva de nutrição de todas as plantas superiores, armazenado nos amiloplastos das células das angiospermas e das gimnospermas. Depois da celulose, o amido é considerado o componente processado pelas células vegetais mais abundante (PEIXOTO, 2006). A estrutura do amido é constituída de dois polissacarídeos, amilose e amilopectina (JACQUES, 2021).

A amilose é formada de monômeros de glicose conectados entre si por ligações glicosídicas do tipo α -1,4 (ALVES, 2017). Possui estrutura helicoidal dentro da qual podem alojar moléculas de iodo, formando um composto de coloração azul, que é o indicativo da presença de amido (JACQUES, 2021). Quanto ao mecanismo de ação nas cadeias polissacarídicas, as amilases são classificadas como exoamilases ou endoamilases. As β -amilases e glucoamilases são exemplos de exoamilases, elas clivam as ligações das extremidades não redutoras das cadeias de α -glucanos, liberando glicose ou maltose. Um exemplo de endoamilase é a α -amilase, visto que esta enzima quebra as ligações no interior da cadeia, liberando oligossacarídeos (LOPES, 2022).

Muitos microrganismos secretam enzimas durante o seu crescimento. A capacidade de produção da enzima amilases já foi observada em fungos filamentosos, bactérias e leveduras (BATISTA *et al.*, 2018; COELHO, 2020; BAZZO 2022; LOPES, 2022), porém, os fungos filamentosos são os que possuem maior potencial de produção de amilase por possuírem sistema de produção superior aos de bactérias e leveduras (MARCIANO, 2023). Adaptações no de cultivo pode auxiliar na maior atividade enzimática por leveduras, como realizar a variação de parâmetros como pH e temperatura (LANDELL *et al.*, 2009; COSTA, 2011),

Considerada um dos mais importantes grupos de enzimas com aplicações biotecnológica, as amilases são utilizadas em diversos segmentos industriais, incluindo a sua utilização na sacarificação do amido para produção de etanol e nas indústrias de alimentos, fermentação, papel e têxtil, além de serem usadas como aditivos em detergentes. Atualmente, o uso de amilases têm se expandido também para as áreas clínicas no diagnóstico de doenças como pancreatite e nas áreas farmacêutica e médica em terapia enzimática (ALVES, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

4.6.2 Celulase

A celulose é o principal constituinte vegetal, sendo portanto, a matéria orgânica mais abundante na terra, e que compreende cerca de 35 a 50% do peso seco das espécies vegetais. É formada de uma cadeia de glicose (ligações β 1,4) e devido ao seu tamanho, não pode ser transportada para dentro das células, havendo assim a necessidade inicial de que seja fragmentada em unidades de glicose para ser absorvida. Esta atividade é realizada por enzimas hidrolíticas, denominadas de celulases (BEHERA *et al.*, 2017).

As enzimas celulolíticas foram estudadas inicialmente durante a Segunda Guerra Mundial, após a observação de que fardas, barracas, bolsas e demais objetos fabricados a partir do algodão sofriam degradação muito rápida. Após a detecção dos organismos agentes das deteriorações, foram realizadas pesquisas que contactou uma linhagem, codificada como QM6a, de um fungo filamentosos, identificado posteriormente como *Trichoderma viride*, e a esta foi atribuída a característica de excretar enzimas capazes de degradar celulose. Até 1953, o pesquisador Dr. Reese e seu grupo de trabalho já haviam determinado que as celulases constituem complexos de diversas moléculas com distintas habilidades na degradação do substrato (CASTRO, 2010).

Essas enzimas, quase sempre são encontradas associadas a outros biopolímeros como hemicelulose e lignina, que conferem resistência ao ataque enzimático e reduzem a velocidade e extensão da reação de hidrólise (ALVES, 2017). Constitui um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise e atuam também como biocatalisadores altamente específicos que operam em combinação para a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (CASTRO, 2010).

As enzimas celulolíticas podem ser obtidas de diferentes fontes. A diferença nas formas de cultivo levam a obtenção de celulases com diferentes características dependendo da composição de aminoácidos (SULYMAN *et al.*, 2020). Os fatores que influenciam na atividade de celulases são: pH, tempo de cultivo, tipo de substrato, concentração de substrato e linhagem utilizada, podendo estes aumentar ou diminuir a velocidade das reações catalisadas (SALES *et al.*, 2010). Estudos mostram que em temperatura ambiente, o pH ótimo da atividade da celulase é de 5,5. Com temperatura mais elevada (35°C) observou-se que pH ótimo fica em torno de 4 em condições submersas (DENG *et al.*, 1994; SOHAIL *et al.*, 2009).

A produção de celulase por linhagens de leveduras demonstram que o pH ótimo varia de 4 a 6 e a faixa de temperatura ótima foi de 35 a 58°C. Em temperaturas inferiores, o pH ótimo varia de 5,0 a 6,0 (SANTOS, 2017; LOPES, 2020).

Industrialmente, as enzimas celulolíticas são empregada principalmente na produção de biocombustíveis, mas também são aplicadas em outros setores como no processamento de amido, produção de ração animal, na indústria têxtil, fabricação de cerveja e vinho, extração e processamento de sucos de frutas e vegetais. É empregado também na indústria de papel e celulose, controle de patógenos de plantas e doenças na agricultura, bem como em detergentes domésticos (BEHERA *et al.*, 2017).

Tendo em vista a vasta aplicabilidade industrial das enzimas celulolíticas, que atualmente corresponde 20% do mercado mundial de enzimas, sendo a terceira classe de enzima mais comercializada a nível global com demanda crescente no mercado, tem-se crescido a busca por agentes biológicos produtores de enzimas celulolíticas e por uma melhor compreensão de seus mecanismos. Observa-se também, um aumento no número de registro de patentes, sobretudo de empresas privadas estrangeiras (DA SILVA *et al.*, 2021).

4.6.3 Pectinase

Substâncias pécticas são compostos hidrolisados pela pectina ou pectinas encontrados na parede de células vegetais de diversas espécies plantas. São classificados como polissacarídeos naturais, sendo composto por até 17 monossacarídeos diferentes e cerca de sete polissacarídeos estruturais heterogêneos, além de açúcares, ácidos de alto peso molecular. É considerado como heteropolissacarídeos, devido ao seu grau de complexidade (ALVES, 2017; HAILE *et al.*, 2022). São formadas predominantemente por monômeros de ácido D-galacturônico conectados por ligações glicídicas do tipo α -1,4, sendo encontradas também em sedimentos de L-ramnose como cadeias laterais (SHARMA *et al.* 2013). A densidade e distribuição de cargas, tamanho e grau de substituição das moléculas de pectina podem ser alterados biologicamente ou quimicamente (SAKAI *et al.*, 1993).

A pectina é uma das biomacromoléculas mais complexas da natureza. Substâncias pécticas já foram detectadas em frutas e vegetais como maçã e beterraba, estando envolvidas nos metabolismos das paredes celulares, associadas ao crescimento, amadurecimento e senescência dos mesmos (SHARMA *et al.*, 2013; HAILE *et al.*, 2022).

Desde a década de 1970, a maioria das enzimas pécnicas comercializadas, são obtidas por fungos (HAILE *et al.*, 2022). Assim como as demais enzimas microbianas, a produção de pectinase por microrganismos depende de fatores como temperatura, concentração e pH entre outros, de acordo com seus fatores físicos e químicos (SHARMA *et al.*, 2013). A produção de pectina é formada principalmente por uma etapa de extração ácida, seguida de purificação parcial do extrato, podendo eventualmente passar por processos de precipitação e secagem (SAKAI *et al.*, 1993).

As pectinases são empregadas industrialmente em diversas áreas. No setor alimentício, é utilizada no processamento de macerados e extratos de frutas e vegetais para reduzir a viscosidade, facilitando a filtração e aumentando o rendimento e nos processos de clarificação de sucos. São utilizadas também no processamento de uvas para fabricação de vinhos, auxiliando nas etapas de extração e filtração, além de serem empregados para intensificar a cor e o sabor de vinhos (ALVES, 2017; MELO, 2021).

4.6.4 Protease

Proteases são enzimas encontradas em todos os organismos vivos. Essas enzimas possuem importante papel na manutenção do ciclo de vida por atuarem em inúmeras funções fisiológicas. Em animais, por exemplo, elas atuam nos processos digestivos, sistema imunológico, crescimento celular, morfogenia e desenvolvimento, ativação de zimogênios e pró-hormônios, entre outros (DORNELLES, 2017). As enzimas proteolíticas catalisam seletivamente a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas e peptídeos resultado em aminoácidos livres ou peptídeos menores (ALVES, 2017).

As proteases também podem provocar danos para o ambiente protéico de um organismo vivo ou de uma célula, por essa razão, suas atividades necessitam de controle considerando que a hidrólise de uma ligação peptídica é um evento irreversível. Processos patológicos como enfisema pulmonar, epilepsia, síndrome de Netherton, doenças hepáticas, cânceres, doenças reumáticas, doenças degenerativas, doenças auto-imunes, dentre outras, podem ser geradas em um organismo quando uma atividade proteolítica é realizada de maneira inapropriada ou quando ocorre o descontrole de alguma atuação realizada por essa enzima (SILVA-LOPEZ, 2009).

As proteases são classificadas como subgrupo das hidrolases. A nomenclatura é

determinada de acordo com a natureza química, sua estrutura e o tipo de reação catalisada. Desta forma, subdividem-se em exopeptidases (clivam as ligações peptídicas presentes nos terminais amino ou carboxi) e endopeptidases (clivam as ligações peptídicas presentes no interior da molécula). Quanto à terminologia, o termo protease é sinônimo de peptídeo hidrolase e engloba todas as enzimas que clivam peptídeos e o termo proteinase é sinônimo para o grupo das endopeptidases. A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, reconhece quatro classes de enzimas proteolíticas que formam seis famílias. As famílias, por sua vez, possuem um grupo característico de resíduos de aminoácidos funcionais, agrupados em uma configuração particular para formar o sítio ativo e cada membro descende evolutivamente de um ancestral comum (TURK, 2006; TREMACOLDI, 2009).

Outra classificação das proteases baseia-se no pH ótimo de atuação, sendo ácidas (pH 2,0 – 6,0), neutras (pH 6,0 – 8,0) e alcalinas (pH 8,0 – 13,0). As proteases ácidas são ativas na presença de agentes sulfidrílicos, agentes quelantes, metais pesados e do agente organofosfórico DFP (Diisopropilfosfogluoridrato). As próteses neutras são denominadas metaloproteinases, pois trata-se de enzimas que necessitam de íons (Zn e Ca) para estabilidade e são inibidas por agentes quelantes como o EDTA (ácido tetracético etileno diamino) (SIQUEIRA, 2004; MATIAS, 2021).

As proteases possuem uma grande importância industrial e comercial, sendo muito aplicada em indústria de produtos alimentícios em processo de hidrolização proteica, redução de turbidez de sucos e licores, modificação do glúten em produtos de panificação, atuação na precipitação da caseína na fabricação de queijos, entre outros. Na indústria de detergente, são empregadas como aditivos em produtos para remoção de manchas de origem proteica (ALVES, 2017). São empregadas também, no tratamento de couro por ser menos tóxico e menos poluente, em indústria de tecido melhorando as propriedades das fibras têxteis, em tratamento de resíduos e efluentes, além de outras aplicações (MATIAS, 2021).

As enzimas proteolíticas obtidas a partir de microrganismos são apreciadas pela indústria devido a sua fácil manipulação, o que viabiliza seu cultivo em alto escala em grandes concentrações. Além disso, as etapas de *downstream* (etapa de purificação) do processamento são facilitadas devido ao fato de esses microrganismos lançarem suas enzimas extracelulares diretamente no meio de fermentação. Entre os microrganismos utilizados para a obtenção de protease, os fungos destacam-se por possuírem em sua maioria boa capacidade de adaptação fisiológica, alta produtividade de biocompostos extracelulares, poucas exigências

quanto a condições ambientais e geográficas, além de possuírem gasto reduzido no uso de matérias-primas (MAGALHÃES *et al.*, 2019; MATIAS, 2021).

A indústria de enzima tem demonstrado crescimento significativo com perspectivas ainda melhores para o futuro. O desenvolvimento de novas tecnologias de obtenção e produção enzimática, podem ser fatores determinantes para manter as vantagens competitivas dentro deste mercado. A prospecção tecnológica, por sua vez, pode auxiliar no levantamento de informações tecnológicas relacionadas a este segmento, auxiliando empresas e centros de pesquisas na identificação de tendências de mercado e oportunidades de negócio vinculado a esse mercado.

4.7 Prospecção científica e tecnológica

As técnicas de prospecção objetiva desenvolver, investigar e avaliar cenários futuros que possam auxiliar na tomada de decisões. A pesquisa pode ser direcionada para questões de diferentes escalas, diferentes idiomas, diferentes áreas bem como diferentes intervalos de tempo. Pode também projetar condições possíveis ou desejáveis (REIS, 2017). Considerado uma importante ferramenta de apoio à ciência, os estudos de prospecção são ferramentas que permitem o avanço científico por possuir a capacidade de prever os limites da tecnologia e possíveis novas aplicações para as tecnologias existentes (DE SIQUEIRA *et al.*).

O termo prospecção tecnológica é dado à atividade investigativa e sistemática dos fatores e dos autores envolvidos nos processos de inovação, assim como a interrelação entre eles, objetivando prever a capacidade de contribuir para a evolução tecnológica (TIGRE, 2006). Pode ainda ser definida como mapeamento sistemático do desenvolvimento científico e tecnológico por vir, que demonstre capacidade de influenciar de forma significativa os setores industriais, econômicos e sociais (TEIXEIRA, 2013). Os dados para a realização do monitoramento tecnológico podem ser obtidos em diferentes fontes, nacionais e internacionais, como banco de patentes, plataformas de artigos científicos, entre outros (FIGUEIREDO *et al.*, 2017).

Patente, por sua vez, pode ser definida como título de direito que dá ao inventor o uso exclusivo de um novo processo produtivo ou a fabricação de um produto novo vigente por um determinado prazo. Tem como base os princípios do 'Contrato Social', ou seja, como um acordo entre o inventor e a sociedade. O uso exclusivo da invenção por parte do inventor é

concedida pelo estado, em troca do monopólio, o detentor da patente deve divulgar a sua invenção, permitindo à sociedade o livre acesso ao conhecimento da natureza da patente (MACEDO *et al.*, 2000). O tempo médio de validade patente varia, no Brasil, se for concedida pelo INPI é de 20 anos se for considerada uma Patente de Invenção (PI) e de 15 anos se for Patente de Modelo de Utilidade (MU) (INPI, 2023). Após o vencimento do prazo de exclusividade, a patente cai em domínio público, podendo assim ser usada por toda a sociedade (MACEDO *et al.*, 2000).

O INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial) foi criado em 1970. Trata-se de uma autarquia federal vinculada ao Ministério do Desenvolvimento, Indústria, Comércio e Serviços (MDIC). A principal finalidade do órgão no âmbito nacional é que executar as normas que regulam a propriedade industrial e articular quanto à conveniência de assinatura, ratificação e denúncia de convenções, tratados, convênios e acordos sobre propriedade industrial", nos termos do art. 2º da Lei nº 5.648, de 11 de dezembro de 1970. Em síntese, o instituto presta serviços de registro de ativos de propriedade intelectual (INPI, 2023).

Outro importante órgão de regulamentação de patentes é o European Patent Office (EPO), que é o banco europeu de busca e exame de pedidos e concessão de patentes, fundado em 1973. Atualmente, atua em 44 países, permitindo que inventores, pesquisadores e empresas de todo o mundo obtenham proteção para suas invenções (EPO, 2023). As patentes depositadas no EPO podem ser encontradas no *Espacenet*, que é uma rede especial de pesquisa de patentes de acesso gratuito, que possui mais de 140 milhões de documentos de patentes (ESPACENET, 2023).

A agência federal para concessão de patentes e registro de marcas nos Estados Unidos é a USPTO (*The United States Patent and Trademark Office*). Este órgão promove a proteção de propriedades intelectuais para inovadores e empreendedores tanto dos EUA quanto de outros países (USPTO, 2023).

Os estudos científicos também são uma importante ferramenta que norteia o futuro das ciências e tecnologias. A divulgação científica contribui para o desenvolvimento científico e tecnológico por fornecer conhecimento sobre resultados de pesquisas sendo uma fonte de informações científicas que auxiliam no desenvolvimento de bens e serviços. Além disso, a divulgação científica elucida o estágio de desenvolvimento de tecnologias permitindo que a ciência avance à medida que novos estudos sejam realizados a partir do término de outras divulgações da mesma linha de pesquisa (FIGUEIREDO *et al.*, 2017).

5. METODOLOGIA

5.1 Reativação e aferição da caracterização morfológica de leveduras ambientais

Leveduras da coleção de culturas microbianas do Laboratório 4 da UFOB/CMLEM (Quadro 01) foram reativadas e tiveram sua caracterização morfológica conferida com os respectivos registros para, então, serem empregadas nos ensaios de triagem enzimática deste estudo, conforme descrito a seguir. A reativação ocorreu em meio Batata Dextrose Ágar (BDA), com incubação a $25 \pm 3^\circ\text{C}$ por 48 h.

Quadro 01 - Espécies ou morfoespécies de leveduras utilizadas por códigos e a fonte de obtenção.

Origem das leveduras	Quantidade de isolados e códigos de coleção
Endofíticas de frutos e pseudofrutos de caju (<i>Anacardium occidentale</i> L.)	02 isolados de frutos: C5L2 e C5L1. 04 isolados de pseudofrutos: P2L1, P3L1, P4L1 e P7L1.
Endofíticas de fruto do pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Cambess)	01 isolado: P1L1.
Superfície corpórea de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	06 isolados: L1L1, L1L2, L1L10, L5L2, L5L3, L10L2.
Grãos de milho (<i>Zea mays</i> L.)	02 isolados: M316 e M217.
Total de isolados	15

Fonte: Elaborada pela autora desta monografia.

As leveduras obtidas de caju (*A. occidentale*) e de pequi (*C. brasiliense*) foram isoladas como endofíticas em estudos anteriores, realizados por pesquisadores do grupo de pesquisa “Engenharia de Biotecnologia” da UFOB, no bioma Cerrado, no Oeste da Bahia. Esses microrganismos foram caracterizados morfológicamente e conservados em meio GYP (2% de glicose, 1% de extrato de levedura e 0,5% de peptona) acrescido de Glicerol (15%) (SPENCER; SPENCER, 1996).

As leveduras da superfície corpórea de *S. frugiperda* foram isoladas, caracterizadas e conservadas por Silva (2021) como descrito acima.

As leveduras de grãos de milho (*Zea mays*) foram isoladas por pesquisadores do

mesmo grupo de pesquisa supramencionado. Os grãos de milho utilizados como substratos foram obtidos em um mercado local, em Luís Eduardo Magalhães, BA. Estes também encontram-se preservados segundo método proposto por Spencer (1996).

5.2 Isolamento e análise morfológica de leveduras de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil) e maracujá-do-mato (*Passiflora cincinnata* Mast.).

Para obtenção das leveduras a partir de frutos de lobeira (*S. lycocarpum*) e de maracujá-do-mato (*P. cincinnata*), os frutos foram coletados diretamente das plantas, em março de 2023, no Parque Vida Cerrado, localizado no município de Luís Eduardo Magalhães-BA, nas coordenadas 22°14'16" S e 54°48'02" W. Para este estudo, foram utilizados 2 (dois) frutos maduros de duas diferentes plantas de lobeira e dois maracujás-do-mato da mesma árvore.

No laboratório, os frutos foram lavados com água destilada e hipoclorito de sódio a 2%, ficando imersa no meio por 15 minutos. Em seguida, com auxílio de faca esterilizada, partes internas da casca e da polpa foram raspadas e transferidas para placas de Petri com meio BDA com antibiótico (enrofloxacino 0,1µg/mL). Com auxílio de alça Drigalski as raspas do fruto foram espalhadas homoganeamente na superfície do meio, sendo cada parte da fruta cultivada separadamente. As placas foram incubadas por sete dias a 28±3 °C. Após este período, as colônias que assemelhavam a leveduras, foram isoladas e foram cultivadas em meio BDA por três dias.

Após este tempo de cultivo, foi possível realizar a identificação fenotípica, com base nas características macroscópicas, observada em microscópio óptico a 1000x, como proposto por Kurtzman *et al.* (1998). Os caracteres observados foram elevação, aspecto, cor, forma, tamanho, superfície e tipo de borda. As leveduras identificadas foram purificadas e cultivadas em meio BDA por três dias para posterior análise de suas capacidades enzimáticas.

5.3 Avaliação de atividade amilolítica

A capacidade das leveduras em degradar amido solúvel como única fonte de carbono foi realizada segundo o método proposto por Stanford (1998) com algumas modificações. Para isso, foi preparado um meio de cultura composto por 2,0 g de amido de milho, 1,0 g de

extrato de levedura, 1,0 g de peptona e 1,5 g de agar. As leveduras foram inoculadas em placas de Petri, sendo dispostas seis leveduras por placas. As placas foram incubadas a $28 \pm 3^\circ$ C por 96 h. O teste foi realizado em duplicata.

Transcorrido o tempo de incubação, foram transferidas 10 mL de solução de lugol por placas e mantido por 30 minutos. Foi observado em torno das colônias onde havia atividade amilolítica um halo descolorido devido à ausência do amido original. Com auxílio de um paquímetro, foi realizada a medição do diâmetro dos halos em três dimensões distintas tanto da colônia crescida quanto do halo formado. A atividade enzimática foi determinada segundo Agnostakis *et al.* (1975) onde a partir da relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia, foi possível determinar a atividade enzimática, expresso como Índice de Atividade Enzimático (IEA) dada pela equação abaixo.

$$IEA = \frac{\text{diâmetro do halo descolorido (cm)}}{\text{diâmetro da colônia (cm)}} \quad [1]$$

Os resultados foram dados a partir da média dos resultados obtidos, visto que os testes foram realizados em duplicatas.

5.4 Avaliação de Atividade Celulolítica

A capacidade das leveduras estudadas de degradar polímeros de celulose foi testada de acordo com a metodologia proposta por Strauss *et al.* (2001) e Buzzini & Martini (2002) em duplicata, com algumas modificações. As leveduras reativadas e as leveduras purificadas foram inoculadas com placas de Petri contendo meio YP-CMC (5,0 g de extrato de levedura, 10,0 g de peptona, 2,0 g de CMC, 10,0 g de agar e 500,0 mL de água destilada) e incubadas a $25 \pm 3^\circ$ C por 120 horas. Os halos de hidrólise foram revelados de acordo com Maijala, *et al.*, (1991), para isso, as placas foram cobertas com 10 mL de solução aquosa de 0,3 g/L de vermelho do Congo por 30 min e posteriormente foram descoradas com 5 mL de solução de NaCl 1,0 M por 15 min. A identificação de estirpes produtoras de enzimas celulolíticas foi realizada pela presença de um halo translúcido ao redor da colônia, em contraste com a coloração vermelha mais intensa do restante do meio.

A atividade celulítica também foi avaliada mediante variação de pH, considerando

que as reações enzimáticas são afetadas por alterações neste parâmetro que influenciam diretamente na velocidade das reações catalisadas (BORZANI *et al.*, 2001). Para isso, foram preparados três meios com a mesma composição do meio descrito acima, e a um foi adicionado solução ácida (HCL 0,01 mol/L), ajustando o pH do meio para 4,0 e no outro meio foi adicionado solução básica (NaOH 0,01 mol/L), ajustando o pH para 8,4 e ao terceiro nada foi adicionada, mantendo o pH neutro de 6,23.

A determinação da atividade enzimática foi realizada segundo a metodologia proposta por Agnostakis *et al.* (1975), através da relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia, expressa como IEA, determinada por meio da Equação 01. Os testes foram realizados em duplicata, os resultados foram dados através da média dos resultados obtidos.

5.5 Avaliação de atividade pectinolíticas

A produção de enzimas pectinolíticas foi testada de acordo com Cattelan (1999) e revelada de acordo com Raju *et al.*, (2013), com algumas adaptações. Os isolados foram cultivados em meio de cultura sólido composto por 0,18 g de Extrato de levedura, 0,075 g de NaCl, 0,03 g de sacarose, 2,25 g de ágar, 0,09 g de Na₂HPO₄, 0,45 g de KH₂PO₄, 0,6 g de Pectina, 150 mL de água destilada, 0,15 mL de solução de NH₄Cl, 1,5 mL de solução de CaCl₂.2H₂O a 0,01 mol e 0,15 mL de MgSO₄.7H₂O a 1 mol. O meio e as soluções foram autoclavadas separadamente a 100°C por 15 min. Após a autoclavagem, as soluções foram misturadas ao meio e posteriormente foram vertidas em placas de petri, onde as leveduras foram inoculadas no meio e incubados a 28 ± 3°C durante 72 h, em duplicata.

Após o período de incubação, as placas de Petri foram cobertas com solução de lugol, que reage com a pectina e forma um complexo de coloração amarronzada, por 15 minutos. Os isolados que apresentaram halo claro amarelado ao redor das colônias foram considerados produtores de pectinases.

5.6 Avaliação de atividade proteolítica

A capacidade das leveduras estudadas em desenvolver atividade proteolítica foi realizada utilizando a metodologia proposta por Ribeiro Júnior (2015). Para isso, foi

preparado o meio de cultura BDA suplementado (9:1) com solução estéril de leite em pó desnatado reconstituído (10,0%), posteriormente, o meio foi disposto em placa de petri onde um representante de cada morfoespécie foi inoculado. As placas foram incubadas a $25 \pm 3^\circ\text{C}$ durante cinco dias. Para verificar o efeito da temperatura sobre a atividade enzimática, as placas também foram incubadas em duas temperaturas: $28 \pm 3^\circ\text{C}$ e $-4 \pm 3^\circ\text{C}$ por cinco dias. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas. Após o término do tempo de incubação, a atividade proteolítica foi analisada através presença de um halo translúcido demonstraria que o fungo era proteolítico e, na sua ausência, negativo para atividade proteolítica.

5.7 Prospecção científica e tecnológica

A prospecção científica e tecnológica trata-se de uma pesquisa de caráter exploratório e quali-quantitativa. O levantamento dos dados foi realizado entre os dias 11 de Abril a 01 de Maio de 2023. Foi feito um levantamento de dados bibliográficos e cienciométrico nas plataformas Scientific Electronic Library Online (SciELO), Catálogo de teses dissertações da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e WORLD WIDE SCIENCE, buscando-se artigos científicos (originais, revisões e/ou relatos de caso). Fez-o o uso das seguintes palavras-chave: Enzima (amilase, protease, celulase e pectinase) + levedura e Enzima (amilase, protease, celulase e pectinase) + levedura + cerrado. Na plataforma CAPES, além das palavras-chave já mencionadas, foram aplicados filtros para grandes áreas (ciências agrárias e biológicas).

A prospecção tecnológica, foi realizada uma busca sistemática por patentes no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) (<https://busca.inpi.gov.br/pePI/>), no banco de dados Europeu European Patent Office (EPO), por meio do Espacenet (<https://worldwide.espacenet.com/>) e na plataforma dos EUA, The United States Patent and Trademark Office (USPTO) (<https://www.uspto.gov/patents>). Como filtro, foram utilizados as palavras-chave: Enzyme (amylase, protease, cellulase and pectinase) + yeast, e, onde foi permitido utilizar mais de duas palavras-chaves, foram utilizados também as combinações: Enzyme (amylase, protease, cellulase and pectinase) + yeast+cerrado. No INPI, além das palavras-chave descritas anteriormente, foi realizado o filtro por título e resumo e por período de tempo. Foi possível também determinar o número de patentes depositadas por países.

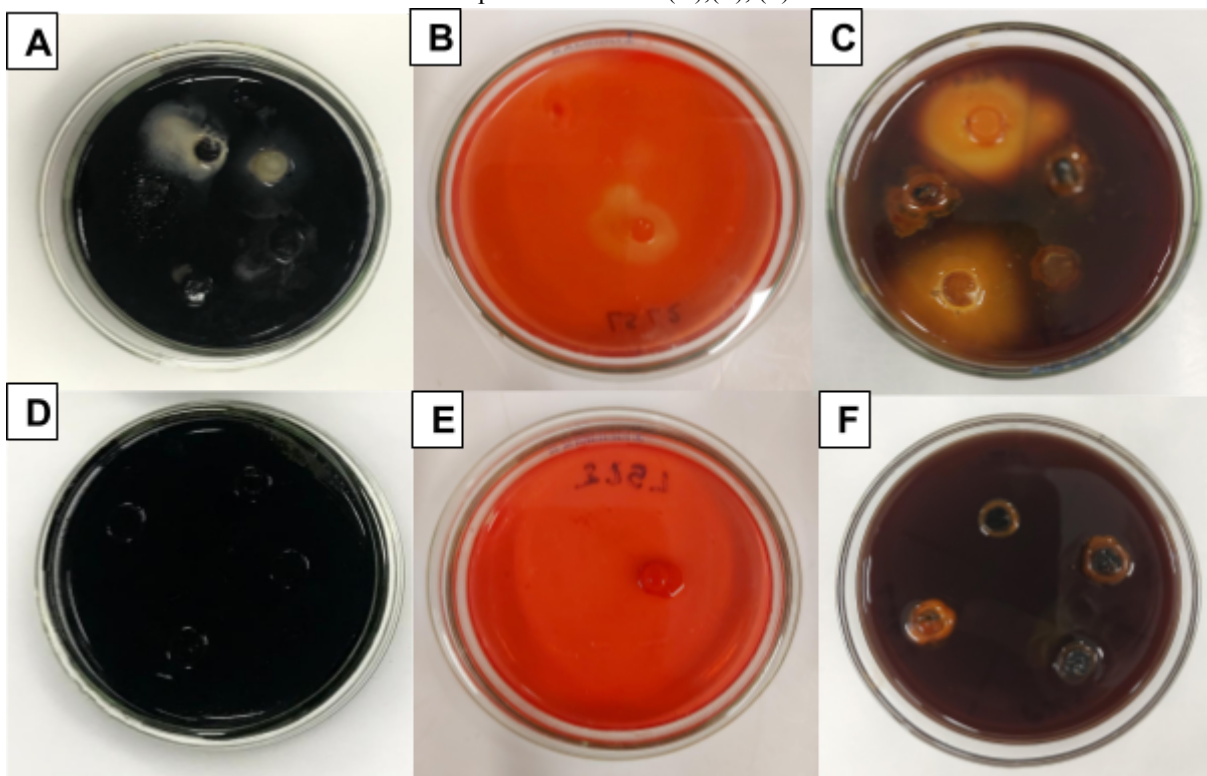
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total, foram isoladas três leveduras de lobeira (*S. lycocarpum*), nomeados como LC1, LC2 e LP1. Não foram obtidas leveduras de maracujá-do-mato (*P. cincinnata*)

No total, foram utilizadas 18 estirpes de leveduras nos ensaios de triagem de atividade enzimática (15 mencionadas no Quadro 1 e três mencionadas acima).

As atividades enzimáticas foram detectadas a partir da observação das placas de petri mediante a formação de halos, bem como a aferição do cálculo das médias dos índices de atividade enzimática (IEA). A Figura 01 demonstra placas com resultados positivos e negativos das enzimas testadas.

Figura 01 - Halo (zona clara ao redor da colônia de fungos) indicando atividade enzimática positiva na triagem dos microrganismos na produção (A) amilase, (B) celulase e (C) Pectinase e atividade enzimática negativa para as respectivas enzimas (D),(E), (F).



Fonte: Elaborada pelo autor a partir de dados obtidos experimentalmente (2023).

Na Tabela 01 estão dispostas as porcentagens de leveduras produtoras de celulase, amilases, protease e pectinase, entre as 18 estirpes testadas.

Tabela 01 - Porcentagem de leveduras positivas para atividade enzimática testada.

Teste realizado	Método de visualização	n° de leveduras positivas/total de leveduras testadas	% do total
Celulase	Coloração com solução vermelho do Congo	8/18	44,44
Amilase	Coloração com solução lugol	5/18	27,77
Protease	Visualização a olho nu	0/18	0.00
Pectinase	Coloração com solução lugol	4/18	22.22

Fonte: Montada pelo autor a partir dos resultados obtidos na triagem.

Os resultados dos cálculos dos IEA da atividade enzimática para atividade amilolítica, celulolítica, e pectinases estão apresentados na Tabela 02. Não foi observado atividade proteolítica por nenhuma das leveduras testadas.

Tabela 02 - Índices de atividade enzimática (IEA) de amilase, celulase e pectinase de isolados de leveduras.

Isolados	IEA (mm)		
	Amilase	Celulase	Pectinase
LC1	1,38	1,00	1,89
LC2	2,42	1,01	1,33
LP1	1,43	1,20	0
C5L1	1,18	0	0
P1L1	0	1,28	0
P2L1	1,0	1,68	1,36
P3L1	0	1,74	0
P4L1	0	0,99	0
L1L10	0	1,03	0
M217	0	0	1,38

Fonte: Elaborada pela autora a partir de dados obtidos experimentalmente.

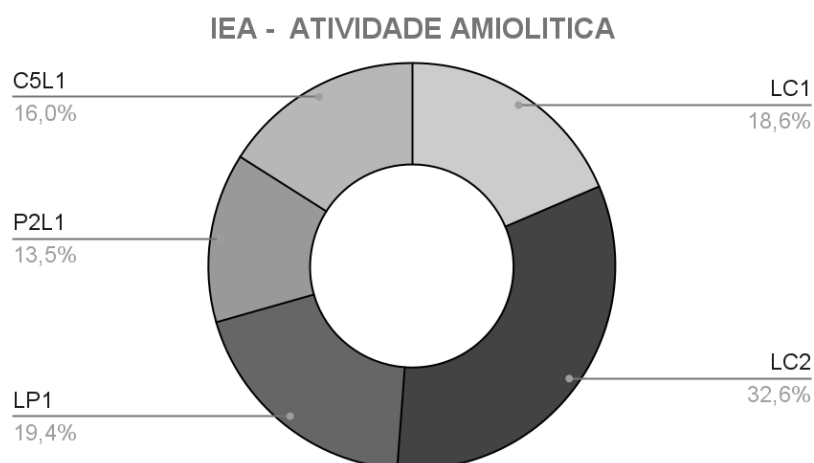
Na literatura, a maioria dos autores recomendam que sejam considerados produtores de enzimas em meio sólido os microrganismos que apresentem $IEA \geq 2,0$ (CESKA, 1971; LIN *et al.*, 1991). De acordo com os dados da Tabela 02, apenas o isolado LC2 apresentou atividade amiloítica superior a 2 ($IE = 2,42$). Observou-se que 55,55 % das linhagens foram capazes de produzir pelo menos uma das três enzimas avaliadas, porém, em valores inferiores a dois. Os isolados LC1, LC2 e P2L1 se destacaram por produzirem três das quatro enzimas testadas, certificando o potencial destes microrganismos para a produção desta enzima de interesse, mesmo que os valores de IEA estejam abaixo da faixa recomendada.

6.1 Análise do ensaio de atividade amilolítica

A determinação quantitativa de uma determinada enzima presente em um meio é complexa, visto que algumas partes da enzima pode está inativa ou apenas parcialmente ativa. desta forma, a verificação da atividade enzimática acaba se tornando o parâmetro mais importante a ser considerado na quantificação de uma enzima (CHAPLIN *et al.*, 1992).

A partir da determinação do IEA, conforme dados da Tabela 02, foi possível observar que a levedura LC2 se destacou na produção de amilase, como ilustrado na Figura 02.

Figura 02 - Análise das médias de atividade enzimática de amilases.



Fonte: Elaborada pela autora a partir de dados obtidos experimentalmente (2023).

Quando se tratar de atividade amilolítica por leveduras, os valores de IEA encontrados estão numa faixa menor em comparação com as produzidas por fungos filamentosos, mesmo

com as mesmas condições de cultivo (meio, temperatura em pH), o que demonstra diferenças entre a atividade de fungos filamentosos e leveduras (ALVES, 2017; PEIXOTO, 2006). Os fatores que influenciam na baixa atividade amilolítica são a fonte de carbono, fonte de nitrogênio, fosfato, o pH e a temperatura do meio. Estudos mostram que quando é realizada a suplementação do meio com maltose além do amido, ocorre um aumento significativo na atividade enzimática (SPIER, 2005). A produção de amilase por leveduras demonstra melhorias significativas quando se adiciona como fonte de nitrogênio sais inorgânicos como sulfato de amônio e nitrato de amônio (GUPTA *et al*, 2003). Já o pH e a temperatura são parâmetros determinantes em todos os processos de produção enzimática, muito embora em processos com fungos, alguns constituintes tamponantes do meio desprezam a necessidade de controle de pH. A temperatura utilizada, por sua vez, está dentro da faixa ótima para produção de amilases, que é em torno de 25 a 37°C.

A levedura LC2 obtido da casca do fruto da lobeira, expressou 32,6% de atividade enzimática, o melhor índice obtido no estudo. Cabe futuramente dar sequência aos estudos de otimização das condições físicas e químicas para melhorar a produção da enzima estudada bem como a realização de estudos de extração, dosagem, caracterização e precipitação do extrato enzimático obtido.

6.2 Análise do ensaio de atividade celulolítica

As leveduras foram testadas em diferentes faixas de pH, em temperatura fixa (25±30 °C). Como resultado, obteve-se que 44,44% das leveduras demonstraram atividade em meio pH alcalino, 27,77 % em meio básico, e 22,22% em meio ácido. Os resultados de IEA obtidos em cada variação de pH encontram-se na Tabela 03. Verifica-se que o IEA em meio ácido foi muito superior em comparação aos obtidos para as demais escalas de pH, confirmando assim a influência do pH na detecção de atividade celulolítica.

Tabela 03 - Médias dos IEAs de atividade celulolítica (com e sem variação de pH).

Leveduras positivas para celulase	Origem	IEA Neutro (mm)	IEA Básico (mm)	IEA Ácido (mm)
LP1	<i>S. lycocarpum</i>	1,20	1,17	0
LC1	<i>S. lycocarpum</i>	0,98	1,5	3,37
LC2	<i>S. lycocarpum</i>	1,01	1,4	3,48
L5L2	<i>S. frugiperda</i>	1,22	0	0
P2L1	<i>A. occidentale</i>	1,68	1,35	2,05
P1L1	<i>C. brasiliense</i>	1,28	0	0
P3L1	<i>A. occidentale</i>	1,74	0	0
L1L10	<i>S. frugiperda</i>	1,03	0,75	0
P4L1	<i>A. occidentale</i>	0,99	0	0
C5L1	<i>A. occidentale</i>	0	1,62	3,0
M316	<i>Zea mays</i>	0	0,66	0

Fonte: Elaborada pelo autor a partir dos resultados obtidos na triagem.

A partir da análise dos dados coletados, foi possível observar uma maior atividade celulolítica, com IEA ≥ 2 , foi das leveduras LC1, LC2, P2L1 e C5L1 em meio ácido. Nos outros meios testados não houve diferença significativa entre as médias, conforme ilustrado no Gráfico da Figura 03.

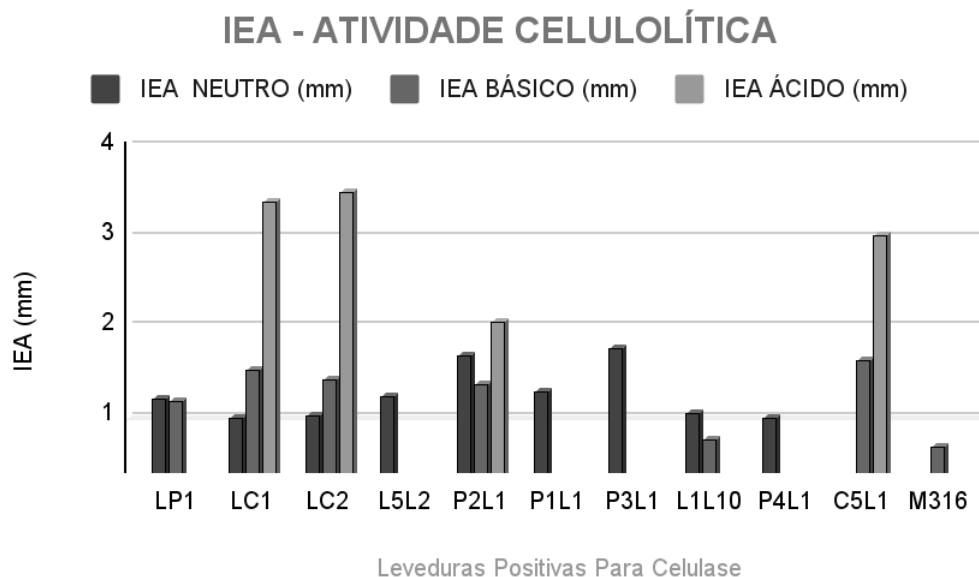
Os isolados de leveduras M316, P4L1, L1L10, P3L1, P1L1, L5L2 e LP1 não demonstram atividade para celulase em meios com teor de pH ácido. O isolado M316 demonstrou atividade positiva apenas em meio básico, mesmo que insignificante.

Esse resultado permite inferir que o pH de maior produção da enzima celulase nas condições estudadas está em torno de 4,00 para as cepas LC1, LC2 e C5L1. Para as demais, nada se pode dizer, embora o aumento pH provoque aumento da atividade enzimática.

Uma das características apreciáveis das leveduras é a sua capacidade de crescer em um amplo intervalo de pH ácido (JAY, 1992). As amilases possuem resistência moderada a pH alcalino porém, conseguem atuar em uma ampla faixa de temperatura (PEIXOTO, 2006). Estudos mostram que a amilase apresenta atividade ótima entre as faixas de pH 4,4 a 5,5 com

temperaturas de até 60 ° C. Em pH maiores que 7,5 a atividade desta enzima é pouca ou nenhuma dentro da mesma faixa de temperatura (WANDERLEY *et al.* 2004; STAMFORD *et al.* 1998; CORDEIRO *et al.* 2002).

Figura 03 - Análise das atividades enzimáticas de celulase de leveduras com variação de pH.



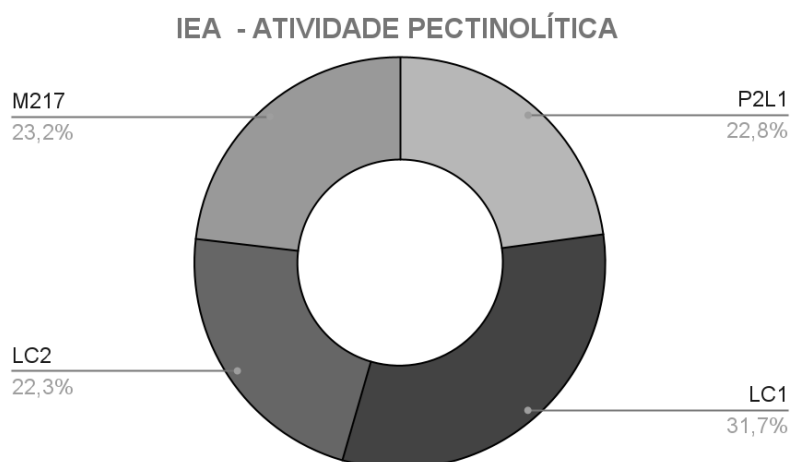
Fonte: Elaborada pela autora a partir de dados obtidos experimentalmente (2023).

Diante do exposto, o resultado para a triagem de leveduras produtoras de celulase está dentro do esperado. Porém, estudos mais detalhados com relação à composição dos meios de cultura bem como parâmetros como temperatura, aeração, dentre outros, devem ser realizados para a otimização da produção de enzima pelas leveduras que demonstraram uma melhor atividade na enzima testada.

6.3 Análise do ensaio de atividade pectinolíticas

Dos isolados de leveduras ambientais testadas, 22,22% formaram halo de degradação no meio de cultura indicando que estas linhagens foram capazes de produzir pectinas. O isolado LC1 apresentou a maior média de IEA certificando, embora tenha sido inferior a 2 (IEA = 1,89), conforme ilustrado na Figura 04.

Figura 04 - Análise das médias de atividade enzimática de pectina.



Fonte: Elaborada pela autora a partir de dados obtidos experimentalmente (2023).

COUTO, 2008, realizou estudo com leveduras obtidas de resíduos agroindustriais quando a produção de pectinase, verificando que a maioria das espécies de leveduras testadas produziram diferentes quantidades de pectinases o que corrobora com o presente estudo. Alves (2017), testou o potencial biotecnológico de bactérias e leveduras isoladas da casca do coco verde (*cocos nucifera*) em fermentação. O resultado para testes de atividades enzimáticas demonstrou que uma bactéria dentre as testadas possuía capacidade de produção de pectina, e 22 leveduras testadas degradam pectina com IEA em torno de 2,26.

De modo geral, frutas e vegetais são ricas em substâncias pécnicas, que aferem funções biológicas como sinalização celular, adesão, proliferação e força e flexibilidade à parede celular, entre outros (ALVES, 2027). Desta forma, esperava-se um melhor resultado para produção de pectinas a partir das leveduras testadas.

6.4 Análise do ensaio de atividade proteolítica

Nos testes realizados para verificação de atividade proteolítica, todas as leveduras testadas foram negativas, mesmo com a variação de temperatura de incubação. Muito embora a produção de protease por leveduras vem sendo objeto de estudo a muito tempo, poucos trabalhos demonstram boa atividade proteolítica por leveduras. Rodarte (2005), testou 38 leveduras quanto a produção de protease, obtendo resultado positivo para apenas um dos

isolados testados.

Na área médica, as proteases são estudadas principalmente em leveduras patogênicas como por exemplo, *Cândida albicans*, isso porque esta levedura tem a capacidade de secretar uma aspártico-protease extracelular importante na sua natureza patogênica. Desta forma, o desenvolvimento de estudos de enzimas proteolíticas desenvolvida por *Cândida albicans* pode ser empregada para desenvolvimento de fármacos para o tratamento de candidíase (Koelsch *et al.*, 2000). Estudos com leveduras de diferentes espécies cândida também foram desenvolvidos objetivando sua aplicação industrial, demonstrando resultados positivos na hidrólise de caseína (RODARTE, 2005).

Muito embora a atividade proteolítica por leveduras não tenha demonstrado resultados positivos, este fator não é um impedimento para a realização de novos trabalhos dada a importância comercial, médica e industrial desta enzima. A mudança de técnicas ou busca por novas fontes de insumos podem ser o fator crucial na descoberta de novos isolados com novas características de interesse para utilização biotecnológica.

6.5 Prospecção científica e tecnológica

Os resultados da pesquisa de caráter bibliográfico científico estão disponíveis na Tabela 04.

A combinação das palavras-chave “Enzima +Levedura +Cerrado” foi a que forneceu um maior número de trabalhos nas plataformas CAPES e WORLD WIDE SCIENCE. A base de dados CAPES foi a que remeteu o maior número de trabalhos com todas as palavras-chave, enquanto que a plataforma SCIELO foi a que remeteu ao menor número de trabalhos com todas as palavras-chave utilizadas.

Com base nos dados obtidos, o maior volume de publicações foram para a Enzima Protease para as duas combinações de palavras-chave. A Protease é utilizada como biocatalisador nas indústrias de fármacos, de alimentos, de cosméticos e de produtos de limpeza. Em razão da sua importância industrial, houve um aumento significativo na demanda industrial por esse biocatalizador, que atualmente corresponde a 70% do mercado de enzimas a nível global (SANTANA *et al.*, 2022). Desta forma, a busca por novas fontes de obtenção bem como o desenvolvimento de novas metodologias de extração e de produção desta enzima tem sido objeto de estudo tanto no setor público quanto privado.

Tabela 04- Número de dissertações, teses, artigos científicos publicados nos últimos 10 anos, obtidos a partir da busca com as palavras-chave selecionadas.

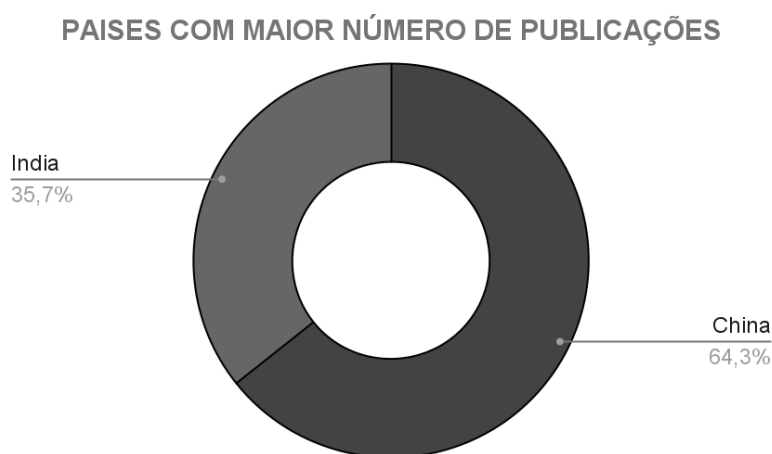
Plataformas			
PALAVRA-CHAVE	CAPES	SCIELO	WORLD WIDE SCIENCE
Amilase + Levedura	3660	0	121
Celulase + Levedura	4482	0	78
Pectinase + Levedura	4462	0	91
Protease + Levedura	4724	0	138
Amilase+Levedura +Cerrado	14661	1	79
Celulase +Levedura +Cerrado	19853	1	65
Pectinase+Levedura +Cerrado	19617	1	65
Protease +Levedura +Cerrado	19700	8	66

Fonte: CAPES, SCIELO e WORLD WIDE SCIENCE, 2023.

Pela plataforma WORLD WIDE SCIENCE, foi realizada a verificação dos países que mais publicaram. Os resultados mostraram que a China é o país que mais publicou sobre as enzimas estudadas obtidas a partir de leveduras nos últimos 10 anos. Estes resultados estão de acordo com o esperado, visto que, embora os EUA sempre tenha ocupado o primeiro lugar no ranque mundial de publicações de artigos científicos de diversas áreas, nos últimos anos a China tem ocupado este lugar. Segundo O Globo, em 2019 a China publicou 407.181 enquanto que os Estados Unidos publicou 293.434. Ainda de acordo com O Globo, os artigos publicados pela China possuem melhor qualidade, considerando que as pesquisas científicas Chinesas são mais citadas bibliograficamente (NIKKEI, 2022).

Em 2020, a China continuou a ocupar o primeiro lugar no ranking mundial. De acordo com o Jornal Folha de São Paulo, no ano supramencionado, a China publicou 788 mil artigos científicos, enquanto que os EUA publicaram 767 mil artigos científicos (RIGHETTI, 2021). A representação percentual dos países que mais publicaram sobre atividade amilolítica, celulolítica, pectinolítica e proteolítica está ilustrada na Figura 05.

Figura 05- Países com maior número de publicações sobre enzimas Amilase, celulas, pectina e protease de leveduras.



Fonte: Elaborada a partir de dados obtidos no WORLD WIDE SCIENCE, (2023).

Outro país que tem aumentado significativamente o número de publicações é a Índia. Em 2018, chegou a ocupar o 3º lugar no ranque mundial com 135.788 publicações. Em 2019, a Índia publicou 542.576 artigos de carácter científico (PRÍNCIPE, 2020). O aumento da participação da Índia na pesquisa científica, é resultado da da implantação Política Nacional de Compartilhamento e Acessibilidade de Dados (NDSAP) que facilitou o acesso de dados para fins científicos e socioeconômicos. Se deve também ao apoio do Departamento de Pesquisa Científica e Industrial (DSIR) entre outros incentivos e investimentos governamentais (IEDI, 2018).

O BRICS é formado pelos países emergentes (Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul) que têm como característica comum o crescimento econômico nas últimas décadas. A maioria desses países tem demonstrado aumento significativo no número e na qualidade de trabalhos científicos, com destaque para a China e que em 2019, cresceu 193% em relação aos demais países BRICS refletindo o investimento e incentivos do governo Chines realizados nas duas últimas décadas (PRÍNCIPE, 2020).

No WORLD WIDE SCIENCE, não foram encontradas nenhuma publicação brasileira nos últimos 10 anos com as combinações de palavras-chave utilizadas. Apesar desse dado negativo para este estudo, segundo o Observatório de Ciência, Tecnologia e Inovação (OCTI), de 2015 a março de 2020, o Brasil teve participação em 320.861 publicações de artigos científicos (OCTI, 2023). De acordo com dados do *Web of Science*, em 2020, o

crescimento da produção científica no Brasil foi de 32,2%, em relação a 2015, bem à frente do crescimento mundial que ficou em torno de 27,1% . Entre 2015 e 2020, o maior volume de produção científica brasileira foi nas áreas da Engenharia (1º lugar), Química (2º lugar) e Agricultura (1º lugar). Em quarto lugar estão as publicações das áreas de Ciências ambientais e ecologia, com o volume de 5,39% do total (OCTI, 2021).

A prospecção tecnológica foi realizada utilizando as mesmas combinações de palavras-chave, porém, somente na Plataforma INPI foram utilizados filtros de data, idioma e país de origem. Para a combinação de palavras-chave Enzima (Amilase, celulase, pectinase e protease)+levedura+cerrado, somente ESPACENET foram encontrados publicações (Quadro 06).

Tabela 05 - Número de patentes por bases de dados utilizadas para a pesquisa.

Palavras-Chave	INPI	ESPACENET	USPTO
Amilase+levedura	10	56.793	50811
Celulase+levedura	4	31.699	17499
Pectinase+levedura	3	15.776	5456
Protease+levedura	13	124.755	142584
Amilase+levedura +cerrado	0	14	-
Celulase+levedura cerrado	0	6	-
Pectinase levedura+cerrado	0	4	-
Protease+levedura+cerrad o	0	24	-

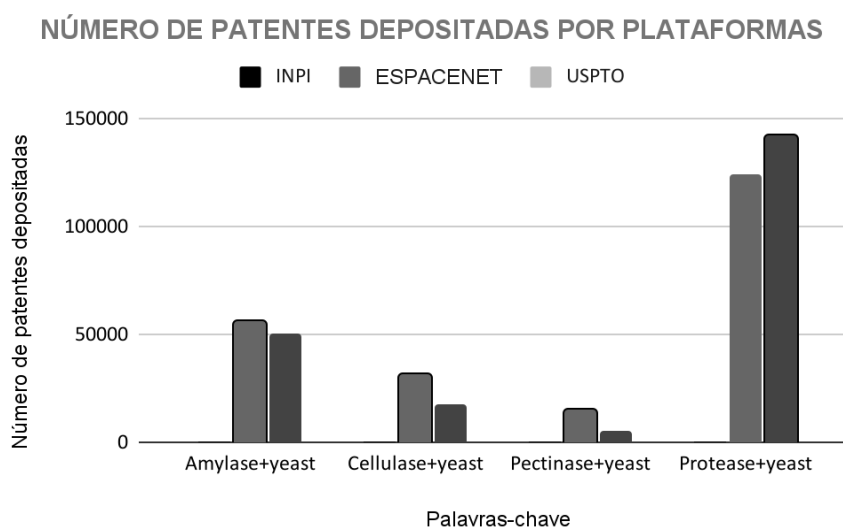
Fonte: Elaborada pelo autor a partir dos dados obtidos nas plataformas: INPI, EPO e USPTO.

Do volume total de patentes depositadas em todos os tempos, para amilase + levedura foram contabilizadas 107615, para celulase+levedura foram encontrados 49202, para pectinase + levedura foram contabilizadas 21235. Para as combinações de palavra-chave enzima+levedura+cerrado foram encontrados 14 para amilase, 6 para celulase e 4 para pectinase, e 24 para protease, sendo todos encontrados no ESPACENET.

Quando analisados os resultados encontrados com as palavras-chaves citadas anteriormente na análise dos bancos de patentes nacionais e internacionais, observa-se que há

um número maior relacionado com “Protease+levedura” em todas as plataformas analisadas. O mesmo resultado foi observado na análise dos resultados da prospecção científica. Isso se deve, como já discorrido anteriormente, a grande importância desta enzima para diversos segmentos industriais. A Figura 06 demonstra a análise gráfica dos resultados disponíveis na Tabela 05.

Figura 06 - Quantidade de patentes por palavras-chave para todos os bancos de depósito de patentes analisados.



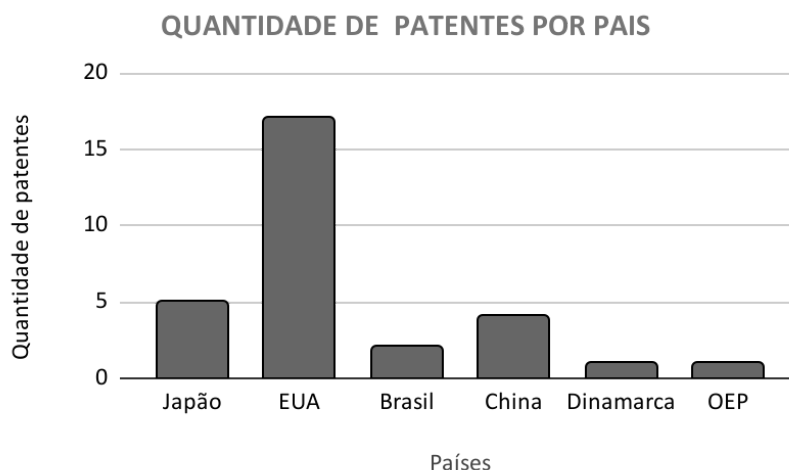
Fonte: Elaborada pela autora a partir de dados obtidos nas plataformas: INPI, ESPACENRT e USPTO.

No banco de dados de patentes do Brasil, foi possível aplicar mais de um filtro sem necessidade de técnicas robustas para filtrar os dados. Além das palavras-chave (enzima+levedura), foi possível separar por título e resumo e por país de origem. A partir da análise dos dados obtidos, foi possível também traçar uma linha do tempo e quantificar o número de patentes depositadas nos últimos dez anos. Foram encontradas 30 patentes, sendo 2 por título e 28 por resumo. Destes, o país que mais depositou patentes foi o Estados Unidos (16), seguido pelo Japão (6), conforme ilustrado no gráfico da Figura 07. Este resultado está dentro do esperado, visto que os EUA e o Japão são líderes mundiais em depósito de patentes em todas as plataformas disponíveis.

Segundo dados do INPI, em 2022 a origem dos depositantes de patentes de invenção no Brasil foi dos Estados Unidos(32%) Brasil (17%), Alemanha e china (7% cada) Japão (6%), Suíça (5%), Reino Unido e França (4% cada). Ainda segundo dados do INPI, No período acumulado janeiro-fevereiro de 2023 foram depositados 3.815 pedidos de patentes,

sendo 3.520 de patentes de invenção, 283 de modelos de utilidade e 12 de certificados de adição. Dos 50 países que solicitaram proteção de patentes, novamente os Estados Unidos se destacam com 34% do volume de depósitos, seguido pelo Brasil com 16%, China e Alemanha com 6% cada e Suíça e Japão com 5% cada (INPI, 2022; INPI, 2023).

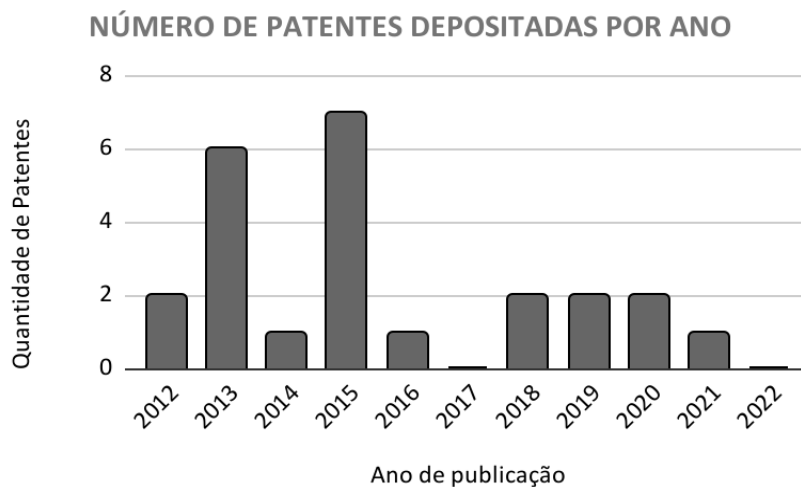
Figura 07 - Quantidade de patentes depositadas no INPI por país de origem.



Fonte: Elaborada pela autora a partir de dados obtidos na plataforma INPI 2023.

Quanto ao número de patentes depositadas nos últimos dez anos com as palavras-chave utilizadas, foi observado que em 2015 se destacou com o maior número de publicação, conforme ilustrado no gráfico da Figura 07.

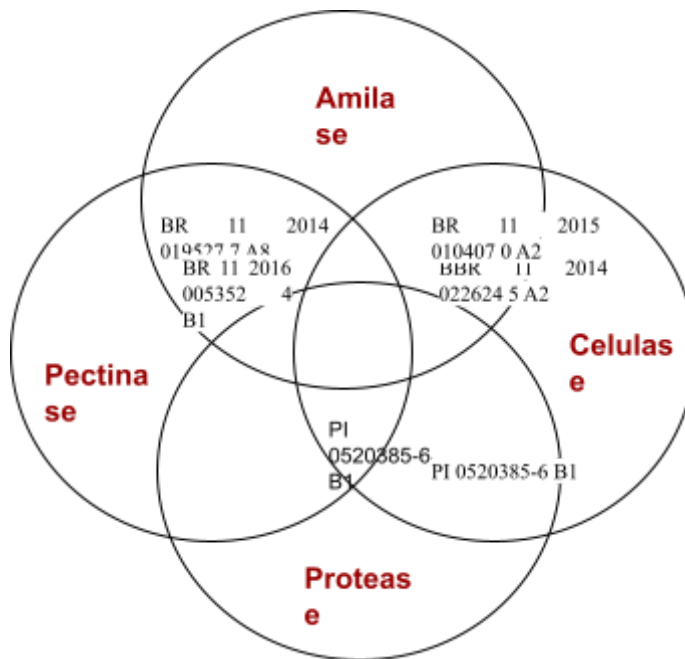
Figura 08- Número de patentes depositadas nos últimos 10 anos para as palavras-chaves pré definidas.



Fonte: Elaborada pela autora a partir de dados obtidos na plataforma INPI, 2023.

Ao analisar as patentes depositadas no INPI, dentro dos parâmetros investigados, foi verificado que algumas patentes estavam vinculadas a mais de uma enzima estudada, conforme ilustrado o diagrama de Venn.

Figura 09 - Diagrama com as patentes com mais de uma enzima dentre as estudadas.

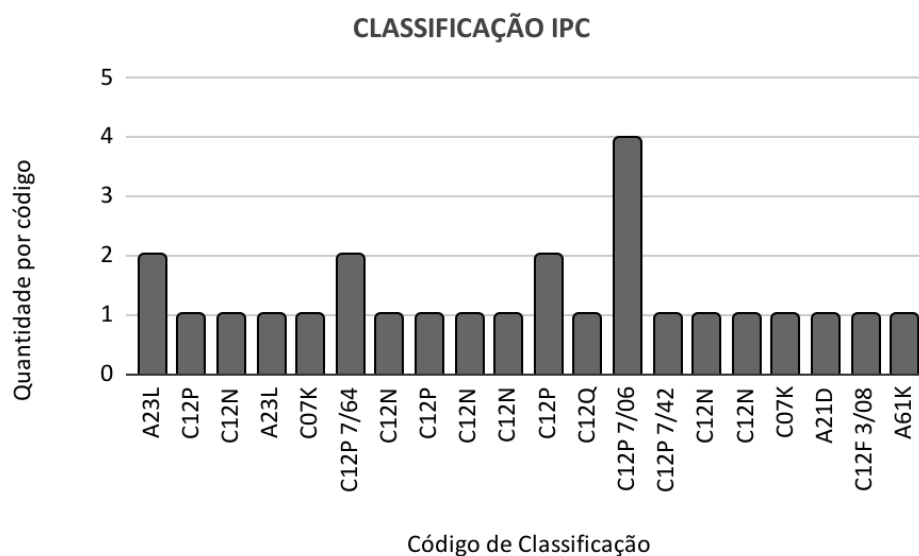


Fonte: Elaborada pela autora a partir de dados obtidos na plataforma INPI, 2023.

Este resultado demonstra que a mesma fonte de substrato e/o mesmo método de obtenção pode ser utilizado para mais de uma enzima.

Para se ter uma visão mais ampla sobre as áreas de pesquisa, aplicação e interesse das enzimas estudadas, foi realizado uma análise dos dados utilizando os códigos da classificação internacional de patentes (CIP) dos dados coletados na base de dados da INPI. A classificação internacional de patentes (CIP) é o sistema de classificação internacional, criado a partir do Acordo de Estrasburgo (1971), que dispõe de uma classificação comum para patentes de invenção. Tem como objetivo principal uniformizar internacionalmente os documentos de patentes facilitando assim a busca destes documentos por usuários, escritórios de propriedade intelectual, entre outros. Na internet, o site da OMPI IPC contém texto completo de classificação nos idiomas Inglês e Francês, tanto da versão em vigor quanto das versões anteriores (WIPO, 2023). O gráfico da Figura 09 demonstra os resultados obtidos para as quatro enzimas estudadas com as duas combinações de palavras-chaves.

Figura 10: Classificação IPC das patentes encontradas para todas as palavras-chaves.



Fonte: Elaborada pelo autor a partir de dados fornecidos pelo INPI, em 2023.

O código C12P7/06 aparece com 4 registros de patentes, sendo um para pectina e três para amilase. Este código, caracteriza processo de preparação de compostos orgânicos contendo oxigênio, um grupo hidroxila ou acíclicos.

As amilases constituem um dos mais importantes grupos de glicídios hidrolisados. São comumente empregadas na indústria de açúcar e etanol na hidrólise do amido (BASSO, 2020). O bioetanol pode ser produzido a partir de matérias prima sacarinas, amilácea e lignocelulósica e de acordo com a matéria prima o bioetanol pode ser classificado como de primeira, segunda, terceira ou quarta geração. A Produção de etanol à base de amido tem demonstrado bons resultados apresentando-se economicamente viável (GRIZAFIS, 2020). Neste sentido, o volume de patentes depositadas apresentando linhagens de leveduras eficientes e métodos de produção de enzimas amilase na produção de álcool combustível demonstra que esse mercado tem se mostrado de fato promissor.

Quanto ao uso de pectinas na indústria alcooleira, poucos relatos são encontrados na literatura, visto que essa enzima possui aplicação comum na indústria de alimentos como geleificante, espessante, texturizante, emulsificante e estabilizante (FANI, 2014).

8. CONCLUSÃO

A partir da realização da triagem de fungos leveduriformes de substratos naturais, quanto a capacidade de produção de amilases, celulase, pectinases e proteases em meio sólido, três isolados (LC1, LC2 e P2L1) demonstraram a capacidade de produzir três (celulase, amilases e pectinases) das quatro enzimas testadas. Os melhores IAE foram observados no isolado LC2, atingindo melhor IEA para atividade celulítica em pH ácido. Cabe, futuramente, caracterizar estas leveduras taxonomicamente e realizar testes com as estirpes de leveduras da cultura estoque para produção de outros insumos de interesse como lipases, glicose-oxidase, dentre outros.

Muito embora a riqueza microbiológica do cerrado seja conhecida, ainda há uma lacuna entre o que é estudado e o que se torna produto com valor econômico e social agregado. Há um longo caminho entre pesquisa científica e mercado que precisa ser superado. Muitas pesquisas promissoras acabam não saindo da fase experimental, quase sempre os motivos são custo, falta de infraestrutura laboral, escassez de recursos, falta de conhecimento de mercado, distanciamento entre universidade e indústria, entre outros. O número de patentes de produtos ou de metodologias para obtenção de enzimas hidrolíticas a partir de leveduras é muito inferior aos estudos acadêmicos e científicos.

O estudo de prospecção tecnológica e científica, demonstrou que há um grande interesse na indústria de enzima, principalmente na enzima protease, que se destacou pelo relevante número de dissertações, teses e artigos científicos publicados. As patentes seguem a tendência dos artigos, sendo focadas principalmente na produção de álcool combustível, evidenciando a relevância da busca por fontes alternativas de geração de combustíveis de fontes renováveis.

Os dados também demonstram que o país que mais deposita patentes sobre as enzimas estudadas é o EUA, seguido do Japão e China. O número de patentes depositadas pelo Brasil é baixo, considerando o volume de artigos científicos que estão disponíveis nas plataformas analisadas. Portanto, apesar de haver muitos estudos sobre o emprego de enzimas obtidas por leveduras selvagens de espécies nativas do cerrado, há um número inferior de patentes depositadas de produtos ou de processos industriais.

Os estudos de Prospecção Tecnológica constitui uma importante ferramenta de orientação para o desenvolvimento de novas tecnologias. Além disso, contribui fortemente na

ampliação da capacidade de antecipação e organização dos sistemas de inovação acadêmico e comercial, visto que as informações tecnológicas extraídas dos documentos de patentes são importantes indicadores das atividades relacionadas à Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PD&I) e aos avanços tecnológicos na área da ciência e tecnologia tão importante para a o desenvolvimento social e econômico de um país. Desta forma, espera-se que este trabalho contribua para o ensino da Prospecção Tecnológica nas Universidades estreitando os caminhos entre ciência e educação, sendo este um fator crucial para o desenvolvimento social, científico e tecnológico do país.

9. REFERÊNCIAS

- ANAGNOSTAKIS, S. L.; HANKIN, L. Use of selective media to detect enzyme production by microorganisms in food products. **Journal of Milk and Food Technology**. 38 (10): 570-572, 1975.
- ALVES, M. F., VIEIRA, M. P. TEIXEIRA, J. M., MOTA, K. I. A. e CARVALHO, S. A. (2020). Produção de enzimas por fungos filamentosos. **Fundamentos e atualidades em tecnologia e inspeção de alimentos**.
- ALVES, M. M. D. S. (2017). Potencial biotecnológico de bactérias e leveduras isoladas da casca do Coco-verde (Cocos Nucifera) em fermentação. **Repositório UFAL**.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. da S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química nova**, v. 32, p. 679-688, 2009.
- BARBOSA, P. M. G., SANTOS, M. D. S. M., DOS SANTOS, E. G., BATISTOTE, M., & LEITE, R. S. R. (2020). Leveduras selvagens isoladas do caldo de cana com perfil para a produção de enzimas. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, 17(2).
- BATISTA, E., WATANABE, J. Y. M., OLIVEIRA, V. M. D., & PASSARINI, M. R. Z. (2018). Avaliação da Produção de Amilase e Protease por bactérias da Antártica. **Revista UNINGÁ Review**, v. 21, n. 1, 2016.
- BAZZO, V., PARDO, S. N. F., HOFFMANN, E. C., de LIMA, G., e RIBEIRO, R. V. (2022). Bioprospecção e caracterização da atividade amilolítica de fungos filamentosos Bioprospection and characterization of the amylolytic activity of filamentous fungi. **Brazilian Journal of Development**, 8(5), 33314-33330.
- BERNAL, S. P. F. Avaliação do potencial Biotecnológico de bactérias e fungos isolados de uma estação de tratamento de Indústria Têxtil. 2020. Dissertação de Mestrado.
- BEHERA, BC, SETHI, BK, MISHRA, RR, DUTTA, SK E THATOI, HN (2017). Celulases microbianas – Diversidade e biotecnologia com referência ao ambiente de mangue: uma revisão. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 15 (1), 197-210.
- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. Biotecnologia Industrial. 1. ed. v. 1/2. São Paulo: **Editora Edgard Blücher LTDA**, 2001.
- BORGES, W. D. S. (2008). Estudo de fungos endofíticos associados a plantas da família Asteraceae como fontes de metabólitos secundários e em processos de biotransformações **Doctoral dissertation**, Universidade de São Paulo.
- BOMFIM, F. S. Diversidade de leveduras endofíticas em plantas medicinais. 2014. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- BASSO, R. (2020). Avaliação da aplicação de preparado enzimático comercial em mosto de cana-de-açúcar para maximizar a oferta de substratos fermentescíveis em processos de produção de etanol em escala industrial: [S.N], 2020, 133 f.:il.
- BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like

strains isolated from tropical environments. **J Appl Microbiol**, 93, n. 6, p. 1020-1025, 2002.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. O Bioma Cerrado. Brasil. Portal Brasil. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>. Acesso em: 20 Maio 2023.

CARVALHO, F. V. D. B., SANTOS, C. A. F. D., LIMA, N. S., VIEIRA, T. A. D. S., MOREIRA, T. M. D. O., MOREIRA, e D. O., MELO, J. O. F. (2021). Árvores frutíferas do cerrado: importância educacional, econômica, social e cultural. **Ciências agrárias: o avanço da ciência no brasil**, volume 1, 1(1), 17-34.

CAMPOS, R. P. HIANE, P. A. RAMOS, M. I. L. RAMOS FILHO, M. M. MACEDO, M. L. R. Conservação pós-colheita de guavira (*Campomanesia* sp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal. p. 41-49. 2012.

CASTRO, A. M. D., & PEREIRA JR, N. (2010). Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, 33, 181-188.

CATTELAN, A. J. Métodos quantitativos para a determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal. Londrina: Embrapa, 1999.

CHAPLIN, M.F.; BUCKE, C. Enzyme Technology. New York: Cambridge University Press, 1992. 264p.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAÚJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, p. 421-437, 2013.

CESKA, M. Enzyme catalysis of solidified media. *Eur. J. Biochem.*, v. 22, n. 2, p. 186-192, 1971.

CORDEIRO, C. A. M.; MARTINS, M. L. L. LUCIANO, A B, (2002). Produção e propriedades da alfa-amilase do termofílico *Bacillus* sp. *Revista Brasileira de Microbiologia*, 33, 57-61.

COSTA, S. T. C., ABREU-LIMA, T. L., E CARREIRO, S. C. (2011). Atividade amilolítica de leveduras isoladas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). **Revista Biociências**, 17(2).

COELHO, A. L. S., SCARIOT, F. O., de ABREU-LIMA, T. L., & CARREIRO, S. C. (2020). Produção de amilases por levedura selvagem em resposta às diferentes condições de cultivo. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, 8(3), 179-186.

COUTINHO, LEOPOLDO. Biomas brasileiros. Oficina de Textos, 2016.

CÔRREA, G. C; NAVES, R. V; ROCHA, M. R; CHAVES, L. J; BORGES, J. D. Determinações físicas em frutos e sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.), cajuzinho (*Anacardium othonianum* Rizz.) e pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), visando melhoramento genético. **Bioscience Journal**. v.24, n.4, p.42-47, 2008.

DA HORA CARRIÇO, DE ABREU I. G., PEDRA, K. M. Etnobotânica de plantas

alimentícias não convencionais (panc) como mecanismo para a soberania alimentar por meio de circuitos curtos de comercialização. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 17, n. 4, p. 268-286, 2022.

DA SILVA, M. H. R. Isolamento de linhagens de levedura de folhas de espécies arbóreas da biodiversidade do cerrado produtoras de amilases. Encontro de Ensino, Pesquisa e Extensão, Presidente Prudente, 21 a 24 de outubro de 2013.

DA SILVA, G. A., Santos, M. D. S. M., dos Santos, E. G., Leite, R. S. R., e Batiostote, M. (2020). Fungo do cerrado com potencial para produção de enzima celulase. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, 17(2).

DA SILVA, W. B. DE OLIVEIRA, R. L., PORTO, T. S. (2021). Monitoramento tecnológico da aplicação de enzimas celulolíticas: panorama mundial e brasileiro. **Revista Geama**, 7(2), 48-58.

DENG, S. P.; TABATABAI, M. A. Cellulase activity of soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, n. 10, p. 1347-1354, 1994.

DE SIQUEIRA, J. I. B. PEREIRA, T. M. A. DA SILVA NASCIMENTO, L., BATISTA, V. F., MORENO, A. DIAS, L. E DO VALE BASTOS, V. H. (2021). Prospecção científica e tecnológica de softwares de tarefas de memória de trabalho visuoespacial. **Research, Society and Development**, 10(15), e101101522397-e101101522397.

DINI, F. A. Controle Biológico de Pragas e Doenças. Grupo de extensão em microbiologia do solo. GMICS. **ESALQ-USP** 2022. Disponível em: <<http://gmicsesalq.com.br/wp-content/uploads/2022/02/Cartilha-Control-Biologico-de-Pragas-e-Doencas-GMicS-2.pdf>>. Acesso: 04 de Novembro de 2022.

DORNELLES, L. P. (2017). Purificação, caracterização e utilização de protease de *Mytella charruana* (Bivalvia: Mytilidae) na obtenção de peptídeos antimicrobianos. Master's thesis, Universidade Federal de Pernambuco.

DO NASCIMENTO, V. T., *et al.* Plantas alimentícias espontâneas conhecidas pelos moradores do Vau da Boa Esperança, município de Barreiras, oeste da Bahia, nordeste do Brasil. 2015. **Revista Ouricuri**, 5(1), 086-109.

DRUMOND, M. A. Potencialidades de algumas espécies arbóreas madeireiras do Bioma Caatinga. 2013. Alice CNPTIA, Embrapa.

EL-CORAB NETO, J. I., e M. I. E. (2022). Seleção de leveduras endofíticas do sorgo sacarino produtoras de enzimas hidrolíticas para produção de etanol e xilitol. Sete Lagoas: **Associação Brasileira de Milho e Sorgo**, 2022.

ENGELKIRK, P. G.; ENGELKIRK, J. D. **Burton, microbiologia para as ciências da saúde**. Grupo Gen-Guanabara Koogan, 2000.

EPO (European Patent Office). [Base de dados – Internet]. 2023. Disponível em: <<https://www.epo.org/about-us/at-a-glance.html>>. Acesso em: 01 de maio de 2023.

FARIAS, M. V. Produção de enzimas hidrolíticas por leveduras isoladas de solos de áreas

preservadas em Roraima, Brasil. 2008. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Roraima; Programa de Recursos Naturais-PRONAT; UFRR; BR.

FARINAS, C. S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. São Carlos: **Embrapa Instrumentação**, 2011.

13 p. – (Embrapa Instrumentação. Documentos, ISSN: 1518-7179; 54).

FELIX, T. *et al.* Fungos endofíticos em espécies agrícolas de importância econômica. 2019. **Repositório Institucional Universidade Federal de Minas Gerais**.

FERREIRA, Caroline *et al.* Fungos Endofíticos de Musgos Antárticos Que Produzem Enzima Antileucêmica. *Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão*, v. 2, n. 14, 2022.

FERREIRA, L. K. N. *et al.* Plantas Medicinais do Cerrado dos Campos Gerais. **Biodiversidade Brasileira-BioBrasil**, v. 12, n. 1, p. 309-317, 2022.

FIGUEIREDO, L. H. M., S. A.; VASCONCELLOS, A. G. (2017). Monitoramento tecnológico de uma importante espécie do Cerrado: *Caryocar brasiliense*. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, 34(1), 11-35.

GRIZAFIS, V. K. D. M. (2020). Potencial amilásico de fungos filamentosos isolados da polpa de batata-doce (*Ipomoea batatas*).

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. da S; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, p. 667-679, 2010.

GUPTA, Rani *et al.* Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1599-1616, 2003.

HAILE, Setegn; AYELE, Abate. Pectinase de microrganismos e suas aplicações industriais. *The Scientific World Journal*, v. 2022, 2022.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2023. Conheça o Brasil - Território FLORA BRASILEIRA. E-mail: ibge.educa@ibge.gov.br. Disponível em: <<https://educa.ibge.gov.br/jovens/conheca-o-brasil/territorio/18311-flora-brasileira.html>>. Acesso em: 20 de Março de 2023.

IEDI. Instituto de Estudos para o Desenvolvimento Industrial. Carta IEDI ed. 849. Indústria 4.0: o programa Make in India e outras iniciativas do governo indiano. Disponível em <https://www.iedi.org.br/cartas/carta_iedi_n_849.html>. Acesso em 03 de maio de 2023.

INPI- Boletim mensal de propriedade industrial: estatísticas preliminares. / Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI). Presidência. Diretoria Executiva. Assessoria de Assuntos Econômicos (AECON) - -Vol. 1, n.1 (2016) - Rio de Janeiro: INPI, 2021.

INPI - INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL. [Base de dados – Internet]. 2023. Disponível em: <<https://www.gov.br/inpi/pt-br/central-de-conteudo/identidade-institucional>>. Acesso em: 24 de abril de 2023.

INPI- Boletim mensal de propriedade industrial: estatísticas preliminares. / Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI). Presidência. Diretoria Executiva. Assessoria de Assuntos Econômicos (AECON) - -Vol. 1, n.1 (2016) - - Rio de Janeiro: INPI, 2023.

JAY, J. M. Microbiologia moderna dos alimentos. 3ª ed. **Editora Acribia**, 804 p., 1992.

JUNQUEIRA, N. T. V. JUNQUEIRA, K. P., PEREIRA, A., PEREIRA, E., BRAGA, M., CONCEIÇÃO, L. D., & FALEIRO, F. (2012). Frutíferas nativas do cerrado: o extrativismo e a busca da domesticação. In: Congresso Brasileiro De Fruticultura, 22., 2012, Bento Gonçalves. Anais Bento Gonçalves: SBF, 2012.

KLINK, Carlos A.; MACHADO, Ricardo B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.

KOELSCH, G.; TANG, J.; LOY, J. A.; MONOD, M.; JACKSON, K.;

FANI, Márcia. Pectinas Propriedades e Aplicações. **Food Ingredients Brasil**. Barueri, SP. Nº 29 - 2014.

FOUNDLING, X. L. Enzymic characteristics of secreted aspartic proteases of *Candida albicans*. **Biochimica et Biophysica Acta, Paris**, v. 1480, n. 1/2, p. 117-131, July 2000.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. (Eds). The yeasts: a taxonomic study. **Fourth Revised and Enlarged Edition**. Elsevier, Amsterdam. 1998.

LANDELL, M. F., J., F. A., VAINSTEIN, M. H, e VALENTE, P. (2009). *Cryptococcus bromelii* sp. nov., uma levedura basidiomiceto de coloração alaranjada isolada de bromélias no Brasil. **Jornal internacional de microbiologia sistemática e evolutiva**, 59 (4), 910-913.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica. São Paulo: Sarvier. Grupo A, 2019. E-book. ISBN 9788582715345. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582715345/>. Acesso em: 23 mar. 2023.

LIN, J. E.; CHANG, D. C. N.; SHEN, G. J. Correlations among several screening methods used for identifying wood-decay fungi that can degrade toxic chemicals. **Biotechnol. tech.**, v. 5, n. 5, p. 275-280, 1991.

LOPES, J. G. (2020). Otimização da produção de celulases por *Yarrowia divulgata* isolada de coco tucum. **Repositório UFT**. Palmas- TO.

LOPES, P. H. S. (2022). Otimização da produção de amilases por *Rhizopus arrhizus* I 1.2. 1 e hidrólise do amido dos grãos de milho. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2022.

MACEDO, M. F. G.; BARBOSA, A. L. **Patentes, pesquisa & desenvolvimento: um manual de propriedade intelectual**. Editora Fiocruz, 2000.

MACHADO, M. A de A., (2015). 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-MS.

MAGALHÃES, S.A. A. *et al.*, (2019). Produção e caracterização de enzimas proteolíticas de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693 do bioma amazônico (Polyporaceae). **Boletim Do Museu Paraense Emílio Goeldi-Ciências Naturais**, 14(3), 453-462.

MARCIANO, C. L. Produção e Caracterização Bioquímica do complexo amilolítico de *Humicola brevis* var. *thermoidea* e sua aplicação na sacarificação do amido, 2023. Dissertação de mestrado. Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

MATIAS, B. F. . Mapeamentos tecnológico e filogenético direcionados para obtenção de hidrolisados proteicos de *spirulina maxima*. TCC (Graduação)-Curso de Engenharia Química, 2021. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MAIJALA, P. *et al.* Detection of extracellular cellulolytic and proteolytic activity in ectomycorrhizal fungi and *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. **New Phytologist**, 117, n. 4, p. 643-648, 2022/03/08 1991.

MELO, W. G. P. *et al.* Interações simbióticas entre microrganismos e insetos. *Revista RG News* 5 (1): 48-56, 2019 - **Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos**.

MELO, N. E. T. Desenvolvimento e aplicações de pectinases como "ferramentas" biotecnológicas. Patos de Minas – MG, 2021. Trabalho de conclusão de curso, **Repositório Institucional** - Universidade Federal de Uberlândia.

MENEZES, A. P. S., *et al.* . Utilização de plantas medicinais em um município inserido no bioma pampa brasileiro, 2016. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, 14(2), 206-219.

MENESES, A. G. Produção de enzimas pectinolíticas e seletividade de produtos fitossanitários sobre o agente biológico "G088". 2007.

MOREIRA, F. M. de S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo** 2. ed. atual. e ampl. Lavras: UFLA. 729p, 2006.

MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**, v. 4. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC, 2009.

NIKKEI, A. Valor. **O Globo**. Tóquio-JP, 2022.. Disponível em: <<https://valor.globo.com/mundo/noticia/2022/08/10/china-supera-os-eua-em-quantidade-e-qualidade-de-artigos-cientificos-diz-pesquisa.ghtml>>. Acesso em: 02 de Maio de 2023.

NCSES- Science and Engineering Indicators. National Science Foundation. Centro Nacional de Estatísticas de Ciência e Engenharia. Alexandria, Virgínia. Produção de publicações, por região, país ou economia. Disponível em: <<https://nces.nsf.gov/pubs/nsb20206/publication-output-by-region-country-or-economy>>. Acesso em: 02 de Maio de 2023.

OCTI- (Observatório de Ciência, Tecnologia e Inovação). Número de publicações com participação do Brasil Disponível em: <<https://octi.cgee.org.br/>> Acesso em: 03 de maio de

2023.

CGEE-Centro De Gestão E Estudos Estratégicos. (2021). Panorama da ciência brasileira: 2015-2020. Boletim anual OCTI, Brasília, v.1, jun. 2021, 196 P; il.

OLIVEIRA, A. N. D. *et al.*, . Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil, 2006. **Food Science and Technology**, 26, 853-860.

OLIVEIRA, J. C. M. D. Potencial Biotecnológico De Actinomicetos Para Produção De Enzimas Hidrolíticas E Biocontrole *In Vitro* De *Pantoea Ananatis*, Agente Causal da mancha branca do milho. Sete Lagoas- MG, 2017. Dissertação de mestrado. 97 pg.

OLIVEIRA A. N. D., *et al.* Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato, 2027. **Food Science and Technology**, 27, 61-66.

OLIVEIRA, M. Ocorrência, diversidade e caracterização enzimática de leveduras isoladas de frutos do cerrado. 2015. Dissertação (Mestrado em Biologia Microbiana) -Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

OLIVEIRA B. C., *et al.*, Contaminantes Fúngicos Associados À Castanha-Do-Brasil (*Bertholletia Excelsa* Humb. & Bompl.) Comercializada em um município do interior do estado do Pará, 2016. **Revista Cereus**, 8(3), 19-31.

OLIVEIRA, R. M. de. Produção de hidrolases por leveduras isoladas do trato digestório de insetos aquáticos. Monografia (Graduação) Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2019.

ORLANDELLI, R. C. *et al.* Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações, 2012. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, 7º ed. V.03.

PEIXOTO, A. B. (2006). Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões do Brasil. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

PEIXOTO, A. L. *et al.* Conhecendo a biodiversidade. 2016.repositorio.mcti.gov.br.

POTT, A., e Pott, V. J. (1994). Plantas do Pantanal. Brasília: **Embrapa-Spi**, 1994.

POZA, M. *et al.* Characterization of a broad pH range protease of *Candida caseinolytica*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 5, p. 916-921, Nov. 2001.

PRÍNCIPE, E. Um breve olhar na produção científica dos países brics: dados preliminares. Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia (Ibict). E-mail: principe@ibict.br. disponível em: <<https://brapci.inf.br/index.php/res/download/149098>>. Acesso em 03 de Maio de 2023.

RAJU, E. V. N.; DIVAKAR, G. Screening and Isolation of Pectinase producing. Bacteria from Various Regions in Bangalore. International Journal of Research in. **Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v.4, n.1, 151-154, 2013.

REIS, C. D. S. (2017). Fungos associados ao besouro da ambrosia, *Euplatypus parallelus*.

Repositório Institucional UNESP.

RIBEIRO, J. F. *et al.* As Principais Fitofisionomias do Bioma Cerrado. Cerrado: ecologia e flora v. 2. Brasília: **Embrapa-CerradoS**, 2008. 876 p.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C. Isolamento e identificação da microbiota esporulada e fúngica associada à deterioração do leite. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2015.

RIGHETTI, S. *et al.* Empresa Folha da Manhã S.A Grupo Folha - Copyright Folha de S.Paulo (1921 - 2023). Disponível em:<<https://www1.folha.uol.com.br/ciencia/2021/12/china-passa-eua-e-lidera-producao-de-ciencia-mundial-pela-primeira-vez.shtml>>. Acesso em: 02 de Maio de 2023.

ROESLER, R., *et al.* Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Food Science and Technology*, 27, 53-60.

RODARTE, M. P. (2005). Atividade proteolítica de bactérias, leveduras e fungos isolados dos frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.). Universidade Federal de Lavras - Dissertações.

ROMANI, V. P., *et al.* Potencial de frutos do cerrado brasileiro como matérias-primas de filmes flexíveis para embalagens de alimentos—uma revisão, 2021. **Brazilian Journal of Food Research**, 12(3), 26-41.

ROWN, T. A. Bioquímica . **Editora Guanabara Koogan Ltda**: Rio de Janeiro – RJ. Grupo GEN, 2018. E-book. ISBN 9788527733038. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527733038/>. Acesso em: 23 mar. 2023.

SALES, M. R.; *et al.* Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus*, 2010. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 45(Pesq. agropec. bras., 2010 45(11)), 1290–1296.

SANTANA, da S. , R., *et al.* Produção e caracterização de enzimas proteolíticas do cogumelo Ostra-Rei por fermentação submersa, 2022. **Concilium**, 22(6), 987-995.

SANTOS, F. S. D. dos. (2000) Tradições populares de uso de plantas medicinais na Amazônia. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 6, p. 919-939.

SANTOS, L. D. A. Avaliação da produção de celulases por duas linhagens de leveduras isoladas de frutos de palmeiras.017.51f. Dissertação (Mestrado em Agroenergia) – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Agroenergia, Palmas, 2017.

SANTOS, K. S. *et al.* Fungos endofíticos isolados do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* arruda câmara): fontes alternativas potenciais para a produção de enzimas e pigmentos naturais. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 12, p. 103761-103774, 2020.

SHARMA, A. D. *et al.* Enhancement in inulinase production by mutagenesis in *Penicillium purpurogenum*. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 270–274, 2002.

SHARMA, N., R. . Pectinase microbiana: fontes, caracterização e aplicações, 2013. **Reviews**

in **Environmental Science and Bio/Technology**, 12 (1), 45-60.

SAKAI, T., *et al.*. Pectina, Pectinase e Protopectinase: Produção, Propriedades e Aplicações. 1993. **Avanços em microbiologia aplicada**, 39 , 213-294.

SAMI, A. A. S., *et al.* Decifrando o papel das helicases e translocases: uma família de genes multifuncionais protegendo as plantas de diversas adversidades ambientais. **Current Plant Biology**, 2021. 26 , 100204.

SILVA-LOPEZ, R. E. D. Inibidores de Proteases Oriundas de Plantas: Uma Abordagem Útil para o Desenvolvimento de Novos Fármacos, 2009. Arca - **Repositório Institucional**, Fundação Oswaldo Cruz.

SILVA, M. dos S. *et al.* Atividade enzimática extracelular de leveduras isoladas da fermentação do cacau. 2011. Dissertação de mestrado. Repositório UEFS.

SILVA, Z. G. D. *et al.* Conhecimento etnobotânico sobre plantas medicinais utilizadas por moradores de um município ribeirinho no interior do estado do Amazonas, em 2022. Brasil. Arq. **Ciências saúde UNIPAR**, 1-12.

SILVA, M. R. *et al.* Caracterização química de frutos nativos do cerrado. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1790-1793, 2001.

SIQUEIRA, A. A. D. (2004). Proteases de leveduras para aplicação médica.

SOHAIL, M., S. R., *et al.* Produção de celulase de *Aspergillus niger* MS82: efeito da temperatura e do pH. *New Biotechnology*, 2009. 25 (6), 437-441.)

SPIER, M. R. (2005). Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no (Doctoral dissertation, Universidade Federal do Paraná).

STASI, D. Plantas medicinais na Amazônia. In: **Plantas medicinais na Amazônia**. 1989. p. 194-194.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 18 n. 4 Campinas, 1998.

STRAUSS, M. L. A.; JOLLY, N.; LAMBRECHTS, M.; RENSBURG, P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. **Journal of applied microbiology**, 91, p. 182-190, 2001.

SULYMAN, A. O. *et al.* Isolamento, purificação e caracterização de celulase produzidas por *Aspergillus niger* cultivada em cascas de *Arachis hypogaea*. **Heliyon**, 2020. 6 (12), e 05668.

PALUDO, G. B.. Produção de enzimas por leveduras isoladas do cerrado tocantinense. 2015. Repositório UFT.

PEIXOTO, A. B. Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões do Brasil. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2006.

POTT, A. e POTT, V. J. Plantas do Pantanal. Brasília: **Embrapa-SP I**, 1994.

TEIXEIRA, Luciene Pires. Prospecção tecnológica: importância, métodos e experiências da **Embrapa Cerrados**. 2013.

TIGRE, P. Gestão do conhecimento: O grande desafio empresarial. São Paulo. Ed. **Negócio**, 2000.

TREMACOLDI, C. R. Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas, 2009. Embrapa Amazônia Oriental.

USPTO (The United States Patent and Trademark Office). [Base de dados – Internet]. 2023. Disponível em: <<https://www.uspto.gov/>>. Acesso em: 01 de maio de 2023.

VOET, D.; VOET, J. G. Bioquímica. **Editora Artmed**, 4ª edição. Grupo A, 2013. E-book. ISBN 9788582710050. Disponível em: <<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582710050/>>. Acesso em: 23 mar. 2023.

WANDERLEY, K. J. *et al.* Caracterização bioquímica da α -amilase da levedura *Cryptococcus flavus*. **Cartas de microbiologia FEMS**. v. 231, p.165-169, 2004

YOSHIKAWA, M., N. *et al.* Estruturas de alcaloides esteróides oligoglicosídeos, robeneosídeos A e B e constituintes antidiabetogênicos da planta medicinal brasileira *Solanum lycocarpum*, 2007. **Journal of Natural Products**, 70 (2), 210-214.