

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**  
**CENTRO DE CIÊNCIA EXATAS E TECNOLOGIAS**  
**CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO**

DAVID NUNES OLIVEIRA LIRA

**PRODUÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO DO FUNGO *ASPERGILLUS***  
***FLAVUS* COM ATIVIDADE AMIOLÍTICA**

SÃO LUIS – MA

2022

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**  
**CENTRO DE CIÊNCIA EXATAS E TECNOLOGIAS**  
**CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO**

DAVID NUNES OLIVEIRA LIRA

**PRODUÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO DO FUNGO *ASPERGILLUS***  
***FLAVUS* COM ATIVIDADE AMIOLÍTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Química Bacharelado da Universidade Federal do Maranhão como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador (a); Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gilza Maria Piedade Prazeres

SÃO LUIS – MA

2022

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Oliveira Lira, David Nunes.

Produção de Extrato Enzimático do Fungo *Aspergillus flavus* com Atividade Amilolítica / David Nunes Oliveira Lira. - 2022.

46 p.

Orientador(a): Gilza Maria Piedade Prazeres.

Monografia (Graduação) - Curso de Química, Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2022.

1. *Aspergillus*. 2. Enzimas. 3. Fermentação em estado sólido. 4. Fungos. I. Piedade Prazeres, Gilza Maria. II. Título.

DAVID NUNES OLIVEIRA LIRA

**PRODUÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO DO FUNGO *ASPERGILLUS FLAVUS*  
COM ATIVIDADE AMIOLÍTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Curso de Química Bacharelado da Universidade  
Federal do Maranhão como requisito para a  
obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador (a); Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gilza Maria Piedade  
Prazeres

Data de aprovação: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gilza Maria Piedade Prazeres (Orientadora)

Universidade Federal do Maranhão

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Caritas de Jesus Silva Mendonça

Programa de Pós-Graduação em Energia e Ambiente PPGA- UFMA.

---

Allysson Kayron de Carvalho Silva

Universidade Federal do Maranhão - Agência de Inovação, Empreendedorismo, Pesquisa,  
Pós-Graduação e Internacionalização - Mestrado acadêmico Saúde do Adulto AGEUFMA



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir chegar até o fim do curso de graduação em química.

Agradeço a minha mãe Maria Laura e ao meu irmão Danilo por me apoiarem desde o início do curso, por nunca deixarem de acreditar em mim e por todas as palavras de apoio e incentivo.

Agradeço a minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gilza Prazeres por estar comigo desde o início da pesquisa, por todas as orientações, por todos os conselhos, por todo o suporte e palavras de apoio e incentivo, por tudo que me ensinou durante a minha graduação como professora e como pessoa.

Agradeço as minhas duas melhores amigas Kassia Lays e Layana de Sousa, que entraram na graduação junto comigo e com as quais eu tive o privilégio de viver essa jornada. Por me apoiarem durante as provações do curso e por tornar essa jornada memorável.

Agradeço ao Núcleo de Combustível Catálise e Ambiental (NCCA) por ser a porta de entrada para pesquisa científica para mim.

Agradeço a toda a equipe do Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Maranhão (NIBA) por nos receber no laboratório e dar todo o suporte necessário para realização da pesquisa que resultou no meu trabalho de conclusão de curso, em especial a professora Katia Borges e a técnica de laboratório Rita

Agradeço aos mestrandos Allysson e Fernanda pelo auxílio nos procedimentos experimentais de fermentação e pela companhia no laboratório.

Agradeço ao LEFISIO-UFMA por disponibilizar equipamento necessário para serem realizadas as análises das amostras.

Agradeço novamente a Deus por permitir passar pela pandemia de Covid-19 e conseguir completar a minha graduação.

*"Quando você quer alguma coisa, todo o universo  
conspira para que você realize o seu desejo"*

*Paulo Coelho*

## RESUMO

No Maranhão produz-se uma aguardente artesanal a partir da mandioca, a tiquira. Para converter o amido da mandioca em glicose, a mandioca é triturada seguida da sua secagem, a massa da mandioca é assada (beiju) e depois exposta ao ar para a proliferação de fungos silvestres. Os beijus embolorados são misturados com água e depois o mosto é destilado. O processo de produção apresenta baixo gasto energético visto que o crescimento dos fungos e o processo fermentativo acontece em temperatura ambiente através das enzimas produzidas pelos fungos. O presente trabalho teve por objetivo obter extratos enzimáticos capazes de degradar biomassas que contenham amido a partir do fungo *Aspergillus flavus* isolado de beijus de mandioca embolorados. A metodologia utilizada consta de: 1) obtenção de beijus de mandioca com produtores artesanais de tiquira; 2) isolamento e identificação de fungos presentes nos beijus; 3) avaliação da capacidade de produção de enzimas extracelulares com atividade amilolítica; 4) Produção de extrato enzimático rico em amilases. A partir dos beijus embolorados foi possível isolar cinco linhagens de fungos: três foram identificados como *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Rhizopus oryzae*, e dois como pertencentes aos gêneros *Penicillium* sp e *Scopulariopsis* sp. O ensaio para avaliar a capacidade de produção de enzimas amilolíticas mostrou que todas as linhagens de fungos isoladas foram capazes de degradar amido, mas a linhagem de *Aspergillus flavus* apresentou a maior capacidade de degradação do meio de cultura Agar-amido corado com Lugol. Extratos enzimáticos de *Aspergillus flavus* obtidos em diferentes condições mostram que a fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato com 50% de umidade e solução salina composta por Sulfato de Amônio 9,3%, Hidrogenofosfato de Potássio 4,75% e Uréia 2,3%, em tampão Citrato/Fosfato pH 5, a temperatura ambiente é o método mais rentável para produção de extrato enzimático, dado que o mesmo apresentou atividade enzimática de 238,68 U/g e concentração de proteínas totais igual a 0,432 mg/ml.

**Palavras chaves:** Enzimas, fungo, *Aspergillus*, fermentação em estado sólido.

## ABSTRACT

In Maranhão, an artisanal brandy is produced from cassava, the tiquira. To convert cassava starch into glucose, cassava is ground followed by drying. The cassava dough is roasted (beiju) and then exposed to the air for the proliferation of wild fungi. The moldy beijus is mixed with water and then the wort is distilled. The production process has low energy expenditure since the growth of fungi and the fermentation process takes place at room temperature through the enzymes produced by the fungi. The present work aimed to obtain enzymatic extracts capable of degrading biomass containing starch from the fungus *Aspergillus flavus* isolated from moldy cassava beijus. The methodology used consists of: 1) obtaining cassava beijus from artisanal tiquira producers; 2) isolation and identification of fungi present in beijus; 3) assessment of the ability to produce extracellular enzymes with amylolytic activity; 4) Production of amylase-rich enzymatic extract. From the moldy beijus it was possible to isolate five strains of fungi: three were identified as *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* and *Rhizopus oryzae*, and two as belonging to the genera *Penicillium* sp and *Scopulariopsis* sp. The assay to evaluate the ability to produce amylolytic enzymes showed that all strains of fungi isolated were capable of degrading starch, but the strain of *Aspergillus flavus* showed the highest degradation capacity of the culture medium Agar-starch stained with Lugol. Enzymatic extracts of *Aspergillus flavus* obtained under different conditions show that solid state fermentation using wheat bran as substrate with 50% moisture and saline solution composed of Ammonium Sulfate 9.3%, Potassium Hydrogen Phosphate 4.75% and Urea 2.3%, in Citrate/Phosphate buffer pH 5, room temperature is the most profitable method for the production of enzymatic extract, given that it presented enzymatic activity of 238.68 U/g and total protein concentration equal to 0,432 mg/ml.

**Keywords:** Enzymes, fungus, *Aspergillus*, solid state fermentation

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Esquema geral de uma reação enzimática .....	14
<b>Figura 2</b> - Diluição seriada do beiju embolorado .....	23
<b>Figura 3</b> - Kit de microcultivo .....	24

<b>Figura 4</b> - Corante BG-250 interagindo com macromoléculas de proteínas .....	28
<b>Figura 5</b> - Reação de DNS com açúcar reduto (Glicose) .....	29
<b>Figura 6</b> - Espécies fúngicas isoladas 1 (a) e 2 (b) .....	30
<b>Figura 7</b> - Espécies fúngicas isoladas 3 (a) e 4 (b) .....	31
<b>Figura 8</b> - Espécies fúngicas isoladas 5 .....	31
<b>Figura 9</b> - Imagens dos fungos (a) <i>Aspergillus niger</i> , (b) <i>Aspergillus flavus</i> e (c) <i>Rhizopus oryzae</i> por microcultivo em meio de cultura ABD. Magnificação 100 vezes.....	32
<b>Figura 10</b> - Fungo dos gêneros <i>Scopulariopsis</i> sp (a) e <i>Penicillium</i> sp (b) por microcultivo em meio de cultura ABD. Magnificação 40 vezes .....	32
<b>Figura 11</b> - Ensaio de degradação do amido por enzimas amilolíticas produzidas pelo fungo <i>Aspergillus flavus</i> : (a) 5 dias e (b) 6 dias, (c) 7 dias, (d) 10 dias, (e) 14 dias e (f) 20 dias .....	33
<b>Figura 12</b> - Colônia de <i>A. flavus</i> em meio (a) ASD (b) ABD (c) AC.....	34
<b>Figura 13</b> - Beijus com pH 6,5 (a), pH 4,9 (b) e pH 4,6 (c) .....	35
<b>Figura 14</b> - Beijus de mandioca (a) e batata doce (b).....	36
<b>Figura 15</b> - Métodos de produção de enzimas: FS (a), FES-SM (b) e FES-FT (c).....	37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Classificação internacional das enzimas .....	15
<b>Tabela 2</b> - Determinação da concentração de açúcares redutores e atividade enzimática.....	38

<b>Tabela 3</b> - Dosagem de proteínas e Atividade enzimática dos extratos obtidos com variação de parâmetros da FES-FT .....	40
---	----

### LISTA DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1</b> - Reação enzimática geral .....	14
<b>Equação 2</b> - Unidade de atividade enzimática.....	30

<b>Equação 3</b> - Equação da reta padrão de proteína.....	37
<b>Equação 4</b> - Equação da reta padrão de glicose .....	38

## SUMÁRIO

<b>1</b> <b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b> <b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>13</b>
2.1    Enzima .....	13
2.2    Fungos filamentosos .....	16

2.3	<i>Aspergillus flavus</i> .....	18
2.4	Amilases.....	19
2.5	Fermentação.....	20
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS GERAIS.....</b>	<b>22</b>
3.1	Objetivos específicos.....	22
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E METODOS.....</b>	<b>22</b>
4.1	Reagentes e equipamentos.....	22
4.2	Coleta de beijus de mandioca.....	23
4.3	Cultivo dos fungos.....	23
4.4	Semeio dos fungos.....	24
4.5	Identificação dos fungos.....	24
4.6	Desenvolvimento da cepa <i>A. flavus</i> em diferentes meios de cultura.....	25
4.7	Capacidade de produzir enzimas amilolíticas.....	25
4.8	Desenvolvimento do <i>A. flavus</i> em substrato sólido.....	25
4.9	Produção de extrato enzimático bruto.....	26
4.9.1	Fermentação em estado sólido (FES) com sabugo de milho como suporte e amido de milho como substrato (FES-SB).....	26
4.9.2	Fermentação em estado sólido (FES) com farelo de trigo como substrato (FES-FT). 27	27
4.9.3	Fermentação submersa (FS) com amido de milho como substrato líquido (FS-AM) 27	27
4.9.4	Variação dos parâmetros pH e temperatura da FES-FT.....	27
4.10	Dosagem de proteínas totais.....	28
4.11	Determinação da atividade enzimática e concentração de açúcares redutores. ....	28
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>30</b>
5.1	Cultivo de fungos.....	30
5.2	Identificação os fungos.....	31
5.3	Capacidade de produzir enzimas amilolíticas.....	33
5.4	Desenvolvimento do <i>A. flavus</i> em diferentes meios de cultura.....	34
5.5	Desenvolvimento do <i>A. flavus</i> em substrato sólido.....	35
5.6	Produção de extrato enzimático bruto.....	36
5.7	Dosagem de proteínas totais dos extratos obtidos pela FES-FT.....	37
5.8	Determinação da atividade enzimática e concentração de açúcares redutores do extrato obtido pela FES-FT.....	38
5.9	Variação dos parâmetros pH e temperatura de FES-FT.....	39



<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>42</b>

## 1 INTRODUÇÃO

No interior do Maranhão se produz uma bebida alcoólica, a partir da fermentação de raízes de mandioca, denominada tiquira. A produção artesanal de tiquira envolve: coleta das raízes de mandioca; lavagem e trituração das raízes; ralação e prensagem para obtenção da massa de mandioca; preparação de beijus com a massa de mandioca; exposição dos bijus ao ar para emboloramento; fermentação e destilação do fermentado (CEREDA, M.P. BRITO, V. H. S, 2015).

A etapa fundamental do processo de produção da tiquira é o emboloramento dos beijus. Fungos presentes no ambiente formam colônias na superfície dos beijus e produzem enzimas que convertem o amido presente nas raízes de mandioca em etanol. As enzimas produzidas pelos fungos silvestres degradam as cadeias do amido em açúcares. Leveduras que crescem nos beijus de mandioca expostos ao ar livre convertem os açúcares redutores em etanol em etanol (RIBEIRO, 2019).

Enzimas são proteínas que catalisam as reações que acontecem nas células. A ação das enzimas permite que as reações celulares aconteçam no meio aquoso e em condições brandas: pressão atmosférica, pH e temperatura fisiológicos (TEXEIRA; MILAGRE, 2020). Embora processos enzimáticos façam parte da história da Humanidade, o estudo do papel biológico das enzimas só iniciou no século XIX. Em 1822, médico William Beaumont estudou o efeito da secreção gástrica na digestão da carne. Na década de 1850, Pasteur mostrou que as leveduras eram responsáveis pela fermentação e em 1897, Büchner mostrou fermentação não era dependente de células vivas, mas que ocorria com a adição de extratos de leveduras (MARQUES, 2014).

A produção de enzimas a partir de microrganismos possui extensa aplicação na indústria alimentícia buscando a melhoria do processo de produção, e outros componentes relacionados, como sabor, aroma, cor, textura, aparência, vida de prateleira, valor nutritivo. (SRIVASTAVA, 2019). O mercado global de enzimas foi avaliado em US\$ 7,1 bilhões em 2017 e deverá chegar a US\$ 10,5 bilhões em 2024, com uma taxa de crescimento anual de 5,7% de 2018 a 2024, sendo que a Europa foi responsável por 1/3 de produção global de enzimas em 2017 e no mesmo ano, estimou-se que cerca de 70% da quota de mercado de enzimas era produzida por microrganismos (PAPADAKI et al, 2020).

Historicamente as enzimas mais estudadas eram as de origem animal ou vegetal, contudo as enzimas de origens microbianas apresentam grande potencial para a aplicação industrial, já que podem ser facilmente produzidas em larga escala, via fermentação. São também facilmente expressas em organismos de cultivo já estabelecidos e não estão sujeitas às limitações de produção ou suprimento (ORLANDELI, 2012), porém o uso de enzimas pela indústria ainda esbarra no custo financeiro.

O Brasil conta com uma vasta diversidade ecológica e, conseqüentemente, abriga diferentes microrganismos capazes de produzir complexos enzimáticos de grande interesse e potencial biotecnológico (FERNANDES, 2021).

Neste trabalho, fungos isolados de beijos de mandioca obtidos em um alambique de produção de tiquira, foram utilizados para obtenção de um extrato enzimático bruto com capacidade para degradar amido. Como a mandioca é um material extremamente heterogêneo composto por celulose, hemicelulose, lignina, pectina, proteínas e amido, diversos tipos de fungos silvestres crescem nos beijos.

## **2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

O processo evolucionário dos seres vivos, ao longo de bilhões de anos, consolidou rotas metabólicas eficientes e seguras que são responsáveis pelos processos de síntese e degradação dos nutrientes na célula e constituem a base da vida. As reações metabólicas utilizam substratos naturais, ocorrem em condições fisiológicas e são facilitadas por enzimas.

### **2.1 Enzima**

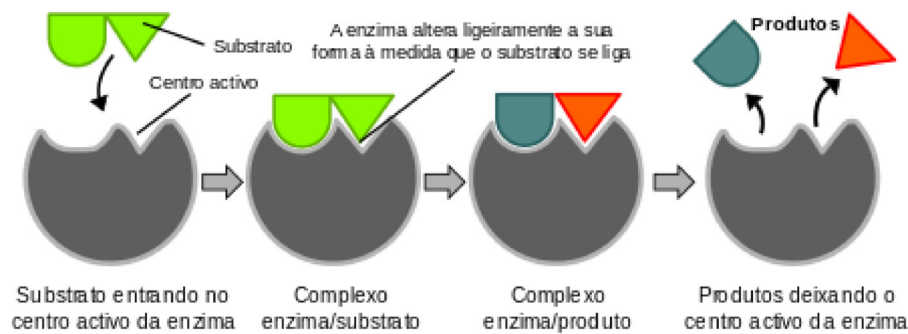
Enzimas são biomoléculas que funcionam como catalisadores das reações químicas que ocorrem nos organismos vivos. Praticamente todos os processos biológicos acontecem pela ação de uma enzima que realiza transformações químicas complexas e específicas em ambiente aquoso, a pressão atmosférica, temperatura e pH fisiológicos (POIAN et al, 2010).

Com exceção das ribozimas, que são moléculas de ácido ribonucleico com função catalítica (SOARES e LINS, 1995), todas as outras enzimas são proteínas globulares e, portanto, são formadas por longas cadeias polipeptídicas cuja composição de aminoácidos vai definir seu nível de estrutura tridimensional. Geralmente, as enzimas apresentam estrutura terciária ou quaternária.

A estrutura tridimensional da enzima é fundamental para a ação enzimática. Embora a cadeia polipeptídica das enzimas seja formada por centenas de aminoácidos, a catálise envolve uma pequena região específica da cadeia denominada sítio ativo. Geralmente, o sítio ativo apresenta o formato de uma fenda ou de um bolso e as cadeias laterais de aminoácidos envolvidos nas reações criam uma superfície tridimensional complementar ou ajustável ao substrato (Figura 1). A acomodação do substrato na fenda catalítica permite que sejam formadas ligações específicas entre enzima e o substrato, originando o complexo enzima-substrato (MAARZZOCO, 2015; MARQUES, 2014).

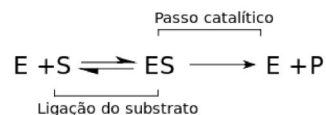
Todas as etapas da reação (quebra e formação de ligações) ocorrem enquanto o substrato está preso ao sítio ativo (Figura 1) e o complexo é, então, convertido no complexo enzima-produto. O complexo se dissocia, liberando a enzima e o produto. A enzima livre retorna para o início do processo (Equação 1) (MARQUES, 2014).

**Figura 1-** Esquema geral de uma reação enzimática



Fonte: Domínio Público

**Equação 1-** Reação enzimática geral



As enzimas aumentam a velocidade da reação reduzindo a energia de ativação requerida para formar o complexo de transição ativado e aceleram a reação por um fator de  $10^8$  a  $10^{10}$  em baixa concentração. A ligação do substrato no sítio ativo requer grupos químicos que permitam a interação entre o substrato e o sítio ativo da enzima. Esses grupos que interagem com o substrato correspondem a átomos presentes nos radicais dos aminoácidos e, muitas vezes no cofator ligado à enzima. O complexo de transição ativado, por sua vez, que dará origem ao produto (MARZZOCO, 2015).

O mecanismo de ligação entre o substrato e enzima é conhecido como mecanismo de ajuste induzido. Inicialmente, a forma e tamanho do sítio ativo da enzima não é exatamente correspondente ao substrato, porém, a partir do momento que algum ponto da molécula do substrato interage com um local específico do sítio catalítico, há uma mudança conformacional (ajuste) do sítio ativo para que o substrato possa “encaixar” perfeitamente neste local da enzima e, desta forma, possibilitar a catálise (MARZZOCO, 2015).

A principal vantagem das reações enzimáticas, se deve a elevada especificidade (regio, quimio e enantiosseletividade) dos substratos utilizados e produtos gerados. Em relação aos catalisadores inorgânicos as enzimas apresentam baixa formação de produtos secundários, alta sensibilidade à temperatura e pH, alto custo, natureza complexa e principalmente alta eficiência.

Atualmente são conhecidas mais de 2.000 enzimas, e cada uma atua em uma reação específica. As enzimas são internacionalmente classificadas em 7 grupos principais, de acordo com o tipo de reação que catalisam (Tabela 1).

**Tabela 1-** Classificação internacional das enzimas

Classe	Nome	Reação
1	Oxidoredutases	$AH_2 + B \rightarrow A + BH_2$
2	Transferases	$AX + B \rightarrow BX + A$
3	Hidrolases	$A-B + H_2O \rightarrow AH + BOH$
4	Liasas	$A = B + X-Y \rightarrow Y-A-B-X$
5	Isomerases	$X-A-B-Y \rightarrow Y-A-B-X$
6	Ligases	$A + B + NTP \rightarrow A-B + NDP$
7	Translocases	$AX + B \quad   \quad   \rightarrow A + X + \quad   \quad   B$ (Lado 1)      (Lado 2)

Fonte: BENOIRE, 2019

Vários ramos de indústrias utilizam enzimas em seus processamentos. A indústria têxtil utiliza enzimas que são capazes de melhorar a qualidade dos tecidos; na indústria de celulose e papel, xilanases e celulasas fazem o despolpamento biomecânico e agem no branqueamento do papel; na indústria de alimentos são utilizadas no processo de fermentação para a produção de pão e bebidas como o vinho e a cerveja; na indústria de detergentes têm ação de limpeza superior, aumentam o brilho e removem sujeiras; na produção de bioetanol, as enzimas são

responsáveis pela produção dos açúcares fermentescíveis e pela conversão dos açúcares em etanol e gás carbônico; enzimas também são utilizadas na produção de cosméticos, de ração animal, na agricultura, entre outras indústrias (ORLANDELLI et al, 2012; WANDERLEY et al, 2011; CUZZIL,2011).

Acredita-se que, em 2020 tenham sido movimentados no mercado global de enzimas, cerca de US\$ 5,4 bilhões, sendo a indústria de detergentes a que mais consome esta matéria-prima, seguida pelas indústrias de alimentos, bebidas, agroenergia, farmacêutica, rações. Pesquisas indicam que até 2024 o mercado global de enzimas chegue a gerar US\$10,52 bilhões, o que implica em uma taxa de crescimento de 5,7% ao ano. Outras pesquisas apontam para um aumento no mercado enzimático de UR\$ de 7,10 até 2027, a partir de alimentos processados, clarificação de sucos, produção de cervejas, fabricação de queijos, amaciamento de carne, bem como no processamento de papel e biocombustíveis, sendo que este último está em ascensão especialmente no norte do Mato Grosso, abrangendo enzimas de diversas especificidades (BAZZO et al., 2022).

Embora todos os seres vivos produzam enzimas, existem células de diversos organismos que produzem quantidades expressivas de uma determinada enzima. Estas fontes de enzimas podem ser células vegetais, células animais e células de origem microbiana. As células microbianas apresentam algumas vantagens sobre as demais, tais como: alta especificidade, possível facilidade de purificação (extracelular), produção concomitante, independência da sazonalidade.

## **2.2 Fungos filamentosos**

Os fungos filamentosos são organismos heterotróficos que se alimentam de matéria orgânica inanimada ou atuam como parasitas de organismos vivos. Os fungos são fundamentais para o funcionamento dos ecossistemas, sendo decompositores primários da matéria orgânica e responsáveis pela reciclagem de nutrientes, decompõem resíduos complexos de plantas e animais em substâncias químicas mais simples que retornam ao solo e, através da absorção nos vegetais, favorecem a fertilidade no solo (dos SANTOS, 2015). Para decompor resíduos, os fungos produzem enzimas extracelulares.

Alguns gêneros de fungos têm grande importância econômica. O *Penicillium* é um gênero de fungo que cresce em ambientes diversos, principalmente em ambientes escuros e arejados, em alimentos (como pão, biscoitos e laranjas) levando a produção de mofo e em

matéria orgânica biodegradável, podendo causar infecções chamadas Peniciloses e intoxicações em animais e seres humanos. Este tipo de fungo apresenta mais de 1000 espécies, algumas diferentes e outras mais semelhantes entre si, além de alguns delas serem capazes de produzir antibióticos como penicilina e griseofulvina, que são favoráveis a eles, pois servem como fator de virulência (LACAZ, 2002).

Fungos do gênero *Rhizopus* pertencem ao filo Eumycophyta e são considerados fungos verdadeiros. O corpo desses fungos é formado por numerosos filamentos denominados hifas, formando um emaranhado que se chama micélio. O *Rhizopus* spp. pertence ao grupo dos fícomicetos, desenvolvem-se sobre matéria orgânica úmida, constituindo o bolor com coloração preta. Apresentam micélio ramificado e desorganizado (USA, 2004).

Os fungos do gênero *Rhizopus* possuem destaque por serem bons produtores de amilases e possuem a capacidade de metabolizar misturas complexas de compostos orgânicos presentes na maioria dos resíduos agroindustriais. Além disso, espécies desse gênero já foram empregadas com eficiência na diminuição dos níveis de contaminação pelas micotoxinas aflatoxina B1 e ocratoxina A (ESCARAMBONI, 2014).

O gênero *Aspergillus* é um gênero de fungos anamórficos que se reproduzem pela produção de fialoconídios. Possuem grande versatilidade metabólica e habilidade para dispersar seus conídios no ambiente. Podem manter-se em desenvolvimento sob condições adversas, tais como baixa umidade e atividade de água. Espécies do gênero *Aspergillus* são encontradas em todos locais da Terra, mas predominam em áreas mais quentes e são mais comuns nos trópicos (BORGES et al., 2012).

Cerca de 20 espécies de *Aspergillus* podem infectar o homem causando aspergilose, sendo as mais comuns *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger*. As manifestações clínicas vão desde reações de hipersensibilidade (aspergilose alérgica) até formas pulmonares e cerebrais.

A espécie *Aspergillus niger* é bastante utilizada na indústria farmacêutica e com muita importância a nível biotecnológico. Tem a capacidade de produzir compostos a nível industrial, como: ácido cítrico, ácido glucônico, ácido málico, várias enzimas e vitamina C, através de processos fermentativos (AFONSO, 2015). Esta espécie consegue crescer em locais secos e quentes, pois a temperatura ótima de crescimento é 35-37°C. Consegue ainda multiplicar-se dentro de uma gama de temperaturas entre os 6°C e os 47°C. O pH ótimo de crescimento é 6,

mas pode encontrar-se entre valores de pH compreendidos entre 1.5 e 9.8 (KRIJGSHELD *et al.*, 2013).

O gênero *Aspergillus*, em particular, tem sido utilizado com muito sucesso para a produção de proteínas recombinantes, tanto de origem fúngica como de outras fontes. Alguns exemplos são glicoamilase, quimosina bovina, lactoferrina humana, interleucina-6 humana e Taumatina (ABREU; ROVIDA; PAMPHILE, 2014).

### 2.3 *Aspergillus flavus*

A espécie *Aspergillus flavus* é uma espécie de fungo imperfeito que cresce em amendoins e outras plantas, e produz a substância carcinogênica aflatoxina, também é utilizada na produção do antibiótico flavicina (CAIXETA, 2010; KLINCH, 2007). Os trópicos estão situados na parte do globo entre as latitudes de aproximadamente 23° norte e 23° sul. Nem todas as áreas compreendidas nessa faixa são quentes e úmidas, mas em sua maioria as condições atmosféricas são muito favoráveis (70 a 100% de umidade e mais de 25 °C) para rápida proliferação dos fungos (PEREIRA, 2002)

*A. flavus* ocorre como saprófita em solos em todo o mundo e causa doenças em várias culturas agrícolas importantes, como milho (podridão da espiga), amendoim (mofo amarelo), e caroço de algodão, antes e depois da colheita (AMAIKE *et al.*, 2011). O fungo também causa doenças em animais e doenças em humanas, seja pelo consumo de alimentos contaminados (causando aflatoxicose e/ou câncer de fígado) ou através do crescimento invasivo (causando aspergilose), que muitas vezes é fatal em humanos que são imunocomprometidos (HEDAYATI *et al.*, 2007).

As espécies de *Aspergillus flavus* continuarão a ocupar uma ampla variedade de habitats humanos. Muitas das espécies de *A. flavus* que são contaminantes frequentes de alimentos e commodities agrícolas também são capazes de produzir micotoxinas, que são altamente tóxico para humanos e animais. O crescimento de o grupo de espécies *A. flavus* e a produção de aflatoxinas dependem de vários fatores: substratos, temperatura, pH, ambiente, umidade relativa e presença de microflora competidora. (GOURAMA *et al.*, 1995)



## 2.4 Amilases

As amilases formam o principal grupo de enzimas utilizado na indústria de alimentos, principalmente em panificação e biscoitaria. As amilases hidrolisam os amidos e são classificadas em várias formas, dependendo de como atuam sobre as moléculas de amido (GRIEBELER et al., 2015).

As amilases são capazes de hidrolisar as ligações O-glicosídicas do amido, sendo classificadas em dois grandes grupos, de acordo com seu mecanismo de ação: as endoamilases, hidrolisam o amido no interior da molécula, rompendo ligações do tipo  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6, resultando, assim, em oligossacarídeos de diversos comprimentos, e, as exoamilases, atuam nas ligações mais externas do substrato, a partir da extremidade não redutora, formando produtos de baixa massa molecular. Ressalta-se que, dentre as amilases de origem microbiana, principalmente, as  $\alpha$ -amilases possuem importante participação na hidrólise do amido encontrado em abundância na natureza. A produção dessas enzimas, por fungos filamentosos, varia de acordo com o gênero e a espécie envolvida (MACHADO BENASSI, V.; ALMEIDA, A., 2020).

A escolha dos fungos filamentosos para a produção de amilases deve-se ao fato destes estarem diretamente ligados com a decomposição de matéria orgânica, pois geralmente, secretam uma diversidade de enzimas extracelulares, como resultado de incentivos ambientais, que ocasionam a expressão de genes relacionados. Essa peculiaridade permite aos fungos habitar um imenso espaço de tecidos vivos, seja em plantas, animais, insetos, madeira, papel ou solos, desde que haja material em decomposição (BAZZO et al., 2022).

As enzimas comumente encontradas em microrganismos lignocelulolíticos dividem-se em enzimas hidrolíticas e ligninolíticas. As celulases, hemicelulases, pectinases, quitanases, amilases, proteases, estereases e mananases são classificadas como enzimas hidrolíticas, enquanto, peroxidases e oxidades são classificadas como enzimas ligninolíticas (FERNANDES, 2021).

Muitas espécies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Lipomyces*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Rhizome* expressam genes de  $\alpha$ -amilase e glucoamilases. Entretanto, vale citar que, a maioria dos estudos sobre fungos, que produzem  $\alpha$ -amilase, são limitados a algumas espécies mesofílicas (MACHADO BENASSI, V.; ALMEIDA, A., 2020).

## 2.5 Fermentação

A fermentação é um processo pelo qual a matéria orgânica é parcialmente degradada e a energia química nela armazenada é liberada e utilizada na produção de moléculas de ATP (adenosina trifosfato), em que ficará armazenada para ser utilizada posteriormente em diversas reações do organismo. Esse processo é realizado por algumas espécies de fungos, bactérias, protistas, bem como por alguns tecidos animais e vegetais (NETO, 2022). Industrialmente, os processos de fermentação utilizam microrganismos adequados como leveduras e bactérias para iniciar o processo. Além disso, é preciso haver um controle cuidadoso da concentração do substrato, da umidade e da temperatura, entre outros parâmetros importantes nesse tipo de reação bioquímica (MOREIRA, 2018).

Industrialmente existem duas formas de fermentação: a fermentação submersa (FS) e a fermentação em estado sólido (FES). Os processos biológicos realizados na fermentação em cultura submersa têm vantagens notáveis em relação à instrumentação e controle da fermentação (monitoramento de pH, oxigênio dissolvido, temperatura, concentração de moléculas solúveis em água), também quanto à separação da biomassa após a fermentação, mistura, aeração e dimensionamento, quando comparados com a fermentação em estado sólido (FARINAS, 2015).

A fermentação em estado sólido é definida como o crescimento de micro-organismos em substratos sólidos, na ausência de água livre. Esta técnica tem se mostrado vantajosa, pois, além de simular o habitat natural de fungos selvagens, apresenta maior produtividade dos extratos enzimáticos, menor susceptibilidade à inibição e maior estabilidade das enzimas às variações de temperatura e pH. Entretanto, a FES também requer, como qualquer processo biotecnológico, controles sobre o crescimento microbiano e condições de cultivo. Algumas condições biológicas, físico-químicas e ambientais podem afetar diretamente o processo de FES e isso também vai depender do tipo de substrato e micro-organismo utilizados. Tempo de fermentação, temperatura, pH, umidade, atividade de água, substratos e fatores nutricionais são algumas das condições envolvidas nesse processo e determinantes para alcançar uma boa produção de enzimas (LEAL et al., 2018).

Há maior quantidade de artigos encontrados para fermentação em estado sólido, frente a submersa, pode estar associado ao fato que na FS há melhor controle de fatores ambientais como temperatura, gradiente de nutrientes e pH, sendo tradicionalmente utilizada para produzir

enzimas em escalas industriais. Controlar esses parâmetros ainda é considerado um desafio da FES, embora tenha um bom rendimento enzimático, e forneça um ambiente de crescimento em condições adequadas para que os microrganismos se desenvolvam naturalmente, portanto, mais estudos são conduzidos com este modo de cultivo a fim de contribuir com novas estratégias para produção enzimática (SILVA,2021)

A utilização de resíduos de agroindústrias como biomassa para produção de enzimas pode contribuir para a redução dos custos de produção das enzimas e a adequada destinação de resíduos de biomassa produzidos pelas agroindústrias.

Farelo de trigo e outros resíduos agroindustriais de baixo custo tem sido utilizados em sistemas de FES como substratos e indutores para secreção de amilases fúngicas e obtenção dos níveis máximos de produção enzimática. Isto demonstra que o farelo de trigo empregado com a tecnologia de FES constitui um processo adequado para aplicações biotecnológicas economicamente viáveis (ESCARAMBONI, 2014).

A palha e o sabugo do milho são matérias-primas lignocelulósicas. Esse tipo de matéria-prima possui em sua constituição um teor elevado de carboidratos, que se encontram em cadeias poliméricas e podem ser sacarificados e fermentados para a obtenção de bioetanol, também chamado etanol de segunda geração. O principal obstáculo para essa conversão é conseguir desmontar a resistente estrutura da biomassa lignocelulósica, e conseguir liberar os açúcares suscetíveis à fermentação de forma eficaz e que se apresenta economicamente viável (SANTOS et al., 2012).

Amido é o maior constituinte de batatas, ervilhas, feijões, arroz, milho e farinha. O amido é composto por amilose é formada por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas  $\alpha(1\rightarrow4)$ , originando uma cadeia linear. Embora a amilose seja definida como linear, atualmente se admite que algumas de suas moléculas possuem ramificações, semelhantes à amilopectina (QUIROGA, 2015). A amilopectina forma os 70 a 80% restantes do amido, que consiste em longas cadeias de unidades de D-glicose unidas entre a ligação  $\alpha-1,4'$ -glicosídica, ela é uma molécula ramificada, com ligações cruzadas entre o carbono número 1 de uma unidade de glicose e o carbono número 6 de outra unidade, ocorrendo a cada 20 a 25 unidades de glicose (LEAL et al,2013).

### 3 OBJETIVOS GERAIS

- Produzir um extrato enzimático rico em amilase capaz de degradar biomassas amiláceas.

#### 3.1 Objetivos específicos.

- Estudar o efeito do substrato sólido sobre a produção de enzimas fúngicas;
- Otimizar parâmetros de pH e temperatura, que afetam a produção de enzimas dos fungos isolados;
- Determinar um meio fermentativo capaz de produzir extrato enzimático rico em amilase com baixo consumo de energia.

### 4 MATERIAIS E METODOS

#### 4.1 Reagentes e equipamentos

Neste trabalho foram usados os meios de cultura.

- Ágar Sabouraud Dextrose, KASVI composição: Hidrolisado pancreático de caseína 5,0 g/l, hidrolisado péptico de tecido animal 5,0 g/l, dextrose 40,0 g/l e ágar base 16,0 g/l.
- Ágar Batata Dextrose, KASVI, composição: Infusão de amido de batata 4,0 g/l, dextrose 20,0 g/l e ágar base 15,0 g/l.
- Ágar Czapek, KASVI composição: Nitrato de sódio 2,0 g/l, sulfato de magnésio 0,5 g/l, cloreto de potássio 0,5 g/l, sulfato ferroso 0,01 g/l, fosfato dipotássico 1,0 g/l, sacarose 30,0 g/l e ágar base 15,0 g/l.

Equipamentos

- Agitador magnético MACRO com aquecimento, modelo 0261-22, QUIMIS 80 8001;
- Estufa Incubadora QUIMIS@;
- Mesa agitadora GEHAKA AO-370;
- Microscópio Óptico BIOPTIKA;
- Micropipetas BIOSYSTEMS de 0,5 a 10 µl, 10 a 100 µl e 100 a 1000 µl;
- Leitor de Placa Biotek Synergy H1;
- Placa de 96 poços;
- Triturador Trapp Trf 400 super.

## 4.2 Coleta de beijos de mandioca.

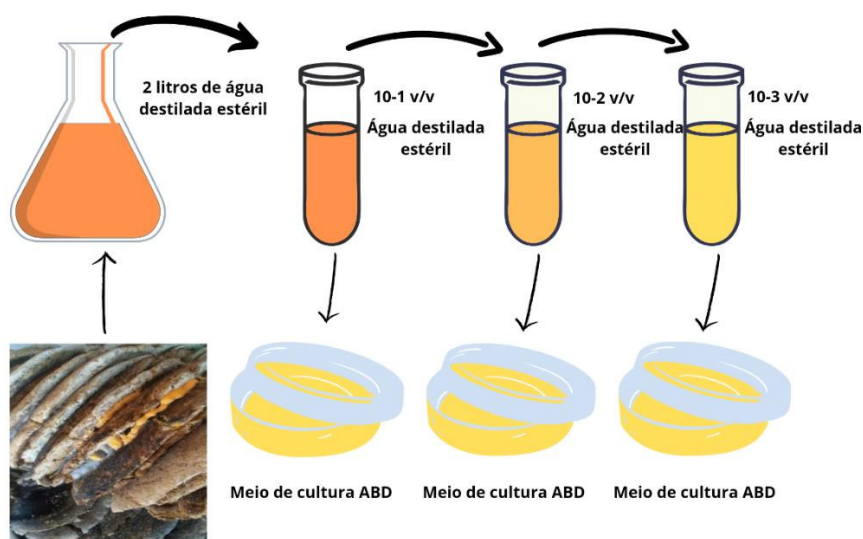
Os beijos de mandioca embolorados utilizados neste trabalho foram coletados de um Alambique de tiquira no povoado de Cajueiro, do município de Urbano Santos, Maranhão, no mês outubro de 2019.

## 4.3 Cultivo dos fungos

Os fungos presentes nos beijos foram isolados utilizando-se a técnica de suspensão seriada (CLARCK, 1965). Inicialmente, os beijos foram suspensos em 1 litro de água estéril e deixados em repouso por 24 horas. Decorrido o tempo, foi adicionado mais 1 litro de água estéril à suspensão e mantido o repouso por mais duas horas. Em seguida, a suspensão foi filtrada com o uso de uma peneira. O resíduo sólido foi descartado e o filtrado líquido (extrato fúngico) foi reservado para as etapas seguintes.

O extrato obtido foi agitado por 5 minutos em uma mesa agitadora e em seguida, iniciou-se a diluição seriada: 1 mL do extrato foi transferido para um tubo de ensaio (A) contendo 9 mL de água destilada estéril, gerando uma suspensão do extrato com concentração de  $10^{-1}$  v/v. Em seguida, 1 mL do extrato  $10^{-1}$  v/v foi transferido para o tubo de ensaio (B) contendo 9 mL de água destilada estéril, diluindo o extrato de beiju para a concentração de  $10^{-2}$  v/v. Finalmente, 1 mL do extrato  $10^{-2}$  v/v foi transferido para outro tubo de ensaio (C) contendo 9 mL de água destilada estéril, diluindo o extrato de beiju a uma concentração de  $10^{-3}$  v/v (Figura 2).

Figura 2 - Diluição seriada do beiju embolorado



Fonte: Próprio autor, 2022

#### 4.4 Semeio dos fungos

Amostras do extrato dos beijos foram distribuídas em três placas de Petri contendo meio de cultura Ágar batata. As placas de Petri foram armazenadas em uma caixa de isopor esterilizada e deixadas em repouso por 24 horas para o crescimento dos fungos.

Após 24h, as placas foram observadas. Caso fosse verificado o crescimento de uma colônia, a mesma seria semeada a um tubo de ensaio contendo meio de cultura Ágar batata. O mesmo procedimento foi repetido a cada 24h, durante 5 dias.

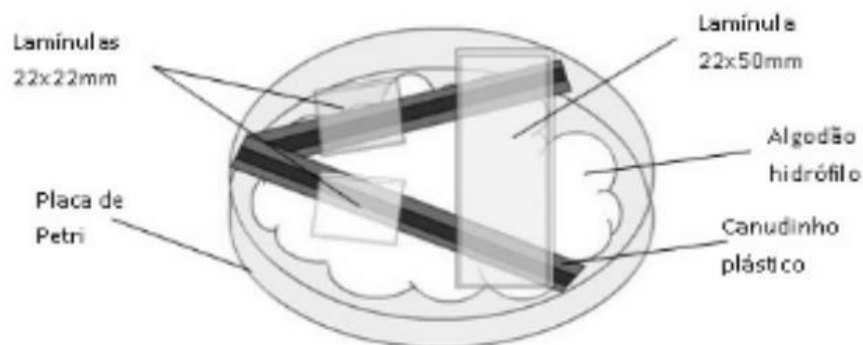
#### 4.5 Identificação dos fungos

Os fungos isolados foram identificados por análise macroscópica e microscópica. A análise macroscópica consistiu na observação das características macroscópicas da colônia, tais como cor, textura e forma, durante o cultivo em uma placa de Petri.

A análise microscópica permite o estudo das características microscópicas do fungo em seu estado de crescimento. Foram analisados o tipo de micélio e as estruturas de reprodução utilizando um kit de microcultivo (Figura 3), composto por uma placa de Petri, uma lamínula 22X50mm, um canudo de plástico, algodão e duas lamínulas 22X22mm, previamente esterilizado.

Um cubo do meio de cultura Ágar batata é adicionado sobre uma lamínula 22x50mm, e semeado com o fungo em análise. Uma lamínula é posta sobre o cubo, e após 5 dias de incubação, a lamínula é coletada e colocada sobre uma lâmina com corante azul de algodão e levada a microscópio óptico para análise das microestruturas do fungo.

**Figura 3 - Kit de microcultivo**



**Fonte:** RIBEIRO, 2011

#### 4.6 Desenvolvimento da cepa *A. flavus* em diferentes meios de cultura

O fungo selecionado foi semeado nos meios de cultura, Ágar Batata (ABD), Ágar Sabouraud (ASD) e Ágar Czapeck (AC), para observar como a composição do meio afeta o crescimento do fungo.

#### 4.7 Capacidade de produzir enzimas amilolíticas

Preparou-se uma solução de ágar puro 6% (m/v) e uma solução de amido 7,2% (m/v) ambas em tampão Citrato/Fosfato de pH 5. As duas soluções foram aquecidas, homogeneizadas e em seguida misturadas para gerar o meio de cultura Ágar-amido. O meio de cultura tamponado foi esterilizado e distribuído em placas de Petri. Depois de 24 horas, os fungos isolados foram semeados nas placas de Petri e após crescimento da colônia adicionou-se Lugol como indicador da degradação do amido. A cada 24 horas, as placas de Petri foram observadas. O desenvolvimento de um halo de descoloramento em torno das colônias indica a degradação do amido e a presença de enzima amilolítica na placa.

Lugol é uma solução de Iodo/Iodeto de Potássio, que é utilizada porque o iodo complexar com amilose e amilopectina formando complexos azul e vermelho-violáceo respectivamente. Como a molécula de amilopectina apresenta ramificações, a interação com o iodo será menor, diferente das moléculas de amilose que por possuírem conformação helicoidal resulta em maior interação com iodo, tornando o complexo resultante azul escuro, logo onde ocorrer degradação de amido haverá descoloração do mesmo (VALLADÃO, 2012).

#### 4.8 Desenvolvimento do *A. flavus* em substrato sólido

A capacidade do fungo isolado de se desenvolver sobre os substratos sólidos foi avaliada utilizando beijus de mandioca e beijus de batata doce preparados no laboratório. O preparo dos beijus constou de: 1) trituração das raízes de mandioca ou de batata doce; 2) redução do teor de líquidos; 3) moldagem dos beijus; 4) cozimento do beiju em chapa de aquecimento; 5) inoculação da cepa *A. flavus* e 6) período de incubação de 240 horas.

Os beijus foram preparados em três momentos diferentes: 1) logo após a trituração, 2) 24 horas após a trituração e 3) 48 horas após a trituração das raízes de mandioca.

Após resfriamento, o beiju foi inoculado com esporos de *Aspergillus flavus* e o crescimento das colônias foi observado. A melhor condição de crescimento observado foi utilizada para testar o crescimento da cepa sobre beijus de batata doce.

O tubérculo foi selecionado para esse experimento devido a suas semelhanças a mandioca e pela grande quantidade de amido em sua composição, já que os principais componentes da batata-doce são carboidratos complexos chamados amidos, que compõem 53% do conteúdo de carboidratos que compõem 20,1% da massa total. Batata-doce também é muito rica em fibras, vitamina C, potássio, manganês, vitamina B6, entre outras substâncias.

#### **4.9 Produção de extrato enzimático bruto**

Para produção do extrato enzimático bruto foram utilizados dois métodos de fermentação em estado sólido (FES) e um método de fermentação submersa (FS). Uma FES com sabugo de milho como suporte e amido de milho como substrato, sendo este o método que estava sendo desenvolvido no laboratório Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Maranhão (NIBA), e um método otimizado por Escaramboni (2014), que utiliza farelo de trigo como substrato sólido.

A FS foi realizada adaptando-se o método desenvolvido por Ribeiro (2011), utilizando amido de milho como substrato.

##### **4.9.1 Fermentação em estado sólido (FES) com sabugo de milho como suporte e amido de milho como substrato (FES-SB)**

A fermentação foi feita na proporção de 1:2 de sabugo de milho e amido. O sabugo fora seco e triturado previamente. A solução salina foi preparada com de Sulfato de Amônia ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 16,6% (m/v), Sulfato de Magnésio (MgSO<sub>4</sub>) 0,05% (m/v) e Hidrogenofosfato de Potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0,3% (m/v) em tampão Citrato/Fosfato pH 5. Para cada grama de amido adicionar 1 ml de solução salina. A solução salina, o substrato e o suporte foram misturados em um erlenmeyer e esterilizados a 120 °C por 15 minutos. Após o resfriamento meio, os esporos dos fungos foram inoculados e deixados em incubação à temperatura ambiente por 120 horas.

Passado o período de incubação, adicionou-se 1 mL de água destilada estéril para cada grama de substrato fermentado. Agitou-se por 15 minutos em mesa agitadora, em seguida o material foi filtrado e centrifugado a 1500 rpm por 20 minutos. O extrato enzimático bruto (sobrenadante) foi armazenado sob refrigeração.



#### 4.9.2 Fermentação em estado sólido (FES) com farelo de trigo como substrato (FES-FT).

Seguindo Escaramboni (2014), a fermentação foi realizada em um erlenmeyer contendo 10 g de farelo de trigo e 5 mL de solução salina, composta por Sulfato de Amônio 9,3% (m/v), Hidrogenofosfato de Potássio 4,75% (m/v) e de Uréia 2,3% (m/v), em tampão Citrato/Fosfato pH 5. O meio fermentativo foi esterilizado por 15 minutos a 121 °C. Após resfriamento, foram inoculados esporos do fungo em estudo e incubados por 120 horas a temperatura ambiente

O extrato enzimático bruto foi obtido com 10 mL de água destilada para cada grama de substrato. O meio fermentativo foi agitado por 30 minutos, em mesa agitadora, e em seguida filtrado, por fim centrifugado a 1500 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o extrato bruto foi armazenado sob refrigeração.

#### 4.9.3 Fermentação submersa (FS) com amido de milho como substrato líquido (FS-AM)

A fermentação foi preparada com 5% (m/v) de amido de milho em tampão Citrato/Fosfato pH 5 e solução de Nitrato de Potássio 0,5% (m/v). O meio foi aquecido e homogeneizado, por fim, foi esterilizado em autoclave a 120 °C por 15 minutos. Após resfriamento do meio fermentativo, os esporos da cepa *A. flavus* foram inoculados no meio e incubados a temperatura ambiente por 120 horas.

Passado período de fermentação foi adicionado 10 mL de água destilada para cada grama de amido de milho utilizada e foi levado a agitação em mesa agitadora por 15 minutos. Em seguida o material foi filtrado e centrifugado a 3000 rpm por 20 minutos, descartou-se o sobrenadante para se obter o extrato enzimático bruto que foi armazenado em sobre refrigeração.

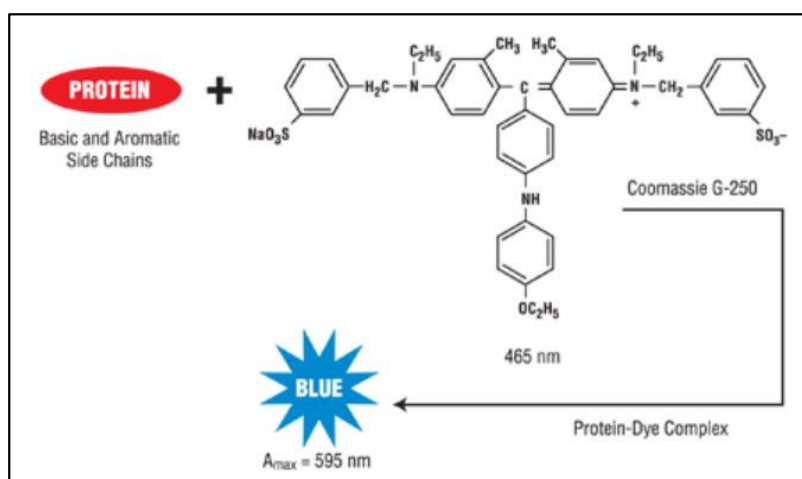
#### 4.9.4 Variação dos parâmetros pH e temperatura da FES-FT

Para otimizar as condições de produção de extrato enzimático foram variados o pH e a temperatura de FES-FT e mantidos a concentração dos sais e tempo de incubação. O pH variou de 4, 5 e 6, com solução tampão de Citrato/Fosfato. A temperatura de incubação foi variada entre a temperatura ambiente, em caixa de isopor para manter a temperatura estável, e 37 °C, em estufa incubadora. Foi utilizado apenas 5 g de substrato e 2,5 mL de solução salina para FES-FT

#### 4.10 Dosagem de proteínas totais

A dosagem de proteínas totais foi realizada utilizando o reagente de Bradford a temperatura ambiente. Este método é baseado na interação entre o corante Coomassie Brillante Blue (BG-250) e macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, formando um composto de cor azul (Figura 4) que absorve fortemente a luz em 595 nm (ZAIA *et al*, 1998).

**Figura 4** - Corante BG-250 interagindo com macromoléculas de proteínas



Fonte: Domínio público, 2022

Foram utilizados 5 µl dos extratos enzimáticos brutos como amostras, a análise foi feita em triplicata, para cada amostra foram utilizados 250 µl de reagente de Bradford e foram incubados por 10 minutos para ação colorante do reagente. O branco foi constituído de 5 µl de água destilada e 250 µl de reagente. Após período de incubação as amostras foram levadas para análise em espectrofotômetro UV-Vis, a leitura foi realizada por absorbância em 595 nm.

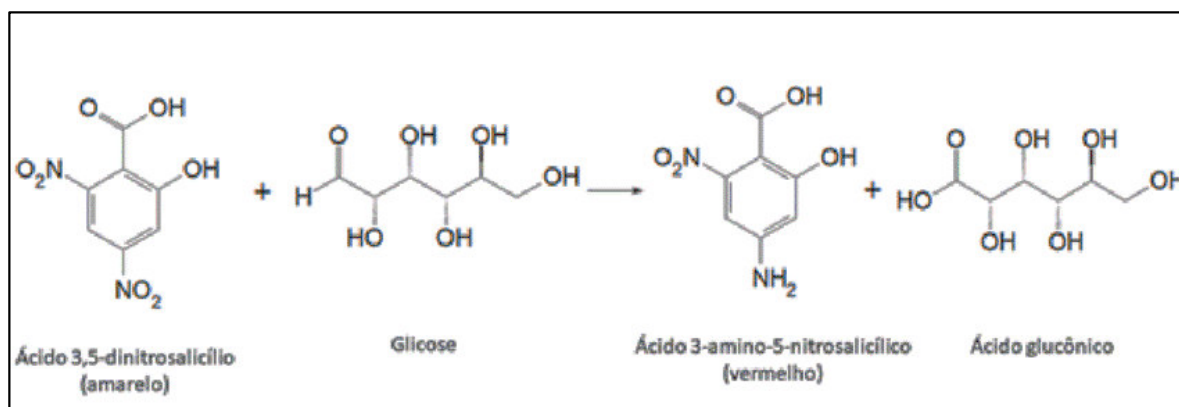
Os resultados obtidos foram utilizados para determinar a concentração de proteínas totais em µg/µl em cada amostra partindo da equação da reta de uma curva padrão de proteínas, foi utilizada proteína Albumina de soro bovino como padrão, nas concentrações de 0,1, 0,3, 0,5, 0,8 e 1 µg/µl.

#### 4.11 Determinação da atividade enzimática e concentração de açúcares redutores.

A dosagem de açúcares redutores produzidos durante a reação enzimática foi realizada pelo método do DNS desenvolvido por Miller em 1959. O teste de DNS (ácido dinitrosalicílico)

baseia-se na reação entre o açúcar redutor e o ácido 3,5-dinitrosalicílico (cor amarelo), que é reduzido a um composto colorido avermelhado, o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, oxidando o monossacarídeo redutor (Figura 5) (MALDONADE *et al.*, 2013).

**Figura 5** - Reação de DNS com açúcar reduto (Glicose)



Fonte: Domínio público, 2022

Foi preparado um reagente corante com Ácido 3,5-dinitrossalicílico 1%. O ensaio enzimático foi realizado com de solução de amido a 2%, preparado em solução tampão Citrato/Fosfato pH 5, a solução foi aquecida a 50°C, sem gelatinizar. Em um tubo de ensaio A adicionou-se 125 µl do tampão, 125 µl da solução de amido e 20 µl do extrato bruto, que foi aquecido em banho Maria a 37 °C por 10 minutos, o branco foi preparado com 145 µl da solução tampão e 125 µl da solução de amido. Passado tratamento térmico foi transferido 90 µl do tubo de ensaio A para um tubo de ensaio B e adicionou se 900 µl de DNS, em seguida foi levado a 100 °C, em banho Maria, por 10 minutos e depois a banho de gelo por 10 minutos. Por fim foram transferidos 200 µl de amostra do tubo B para a placa de 96 poços e mediu-se absorbâncias em 540 nm em espectrofotômetro UV-Vis. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas.

O valor obtido na leitura foi utilizado no cálculo para determinação da concentração de açúcares redutores partindo de uma curva padrão de glicose preparada juntamente com a análise da amostra com concentrações de glicose de 0,1 g/L a 1 g/L. Utilizando os valores obtidos foi determinada uma unidade de atividade enzimática como sendo a quantidade de enzimas que liberam 1 µmol de açúcares redutores por minuto de reação expressa em U/g de substrato seco como mostra a Equação 2 (ESCARAMBONI, 2014).

**Equação 2** - Unidade de atividade enzimática

$$U/g = \frac{\mu\text{mols de açúcares redutores}}{\text{tempo de reação (min)}}$$

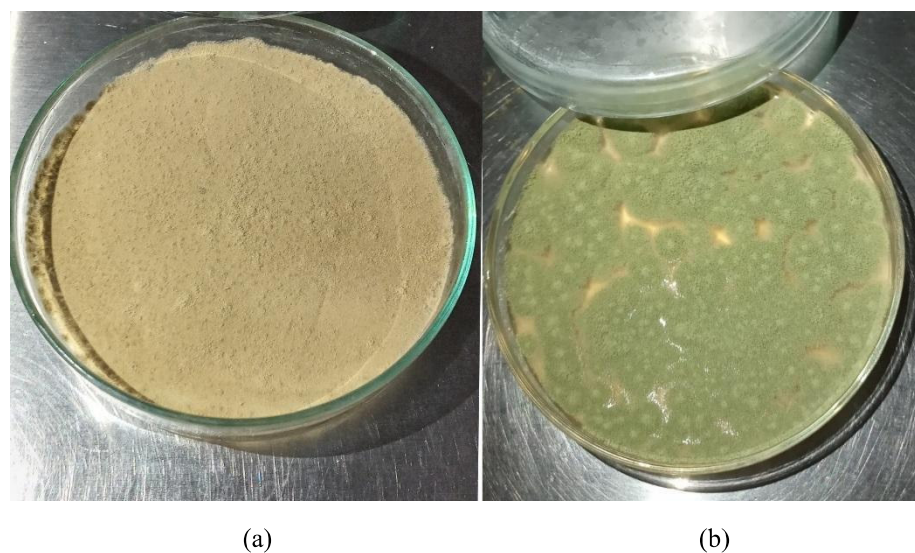
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Cultivo de fungos

Os beijos embolorados obtidos em alambique artesanal foram trazidas para o laboratório devidamente embaladas em sacos plásticos esterilizados. No mesmo dia foi iniciado o processamento dos beijos com a adição de água destilada estéril para produzir o extrato de beijos.

Foram isoladas cinco cepas em placas de Petri. Cada cepa apresentou características físicas distintas. Por serem amostras ainda não identificadas foram nomeados de 1 a 5. A espécie 1 apresenta cor amarelo queimado e textura arenosa, cobrindo totalmente a superfície da placa. O espécime 2 possui cor verde musgo e na superfície do meio de cultura formou várias colônias com textura rugosa, como mostra a Figura 6.

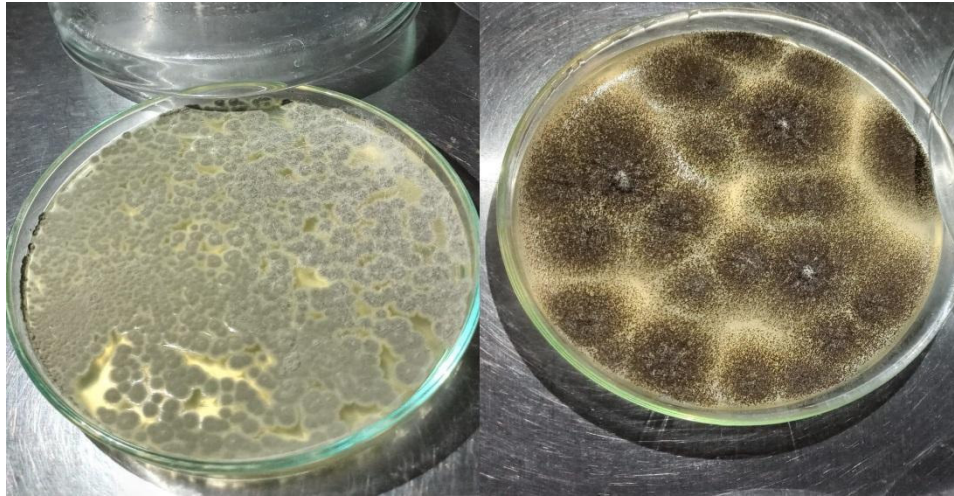
**Figura 6** - Espécies fúngicas isoladas 1 (a) e 2 (b)



**Fonte:** Próprio autor, 2020.

A cultura 3 dispõe de cor azul caribe e formação de múltiplas colônias dispersas pela superfície do meio de cultura, o espécime 4 apresenta cor preta e textura levemente espumosa, espalhando-se por toda a superfície da placa de Petri como mostra a Figura 7.

**Figura 7** - Espécies fúngicas isoladas 3 (a) e 4 (b)



(a)

(b)

**Fonte:** Próprio autor, 2022

A espécie 5 possui cor branca com presença de esporos pretos nas extremidades, textura algodonosa e grande presença de micélio aéreo ocupando todo espaço no interior da placa de Petri como mostra a Figura 8.

**Figura 8** - Espécies fúngicas isoladas 5



**Fonte:** Próprio autor, 2022

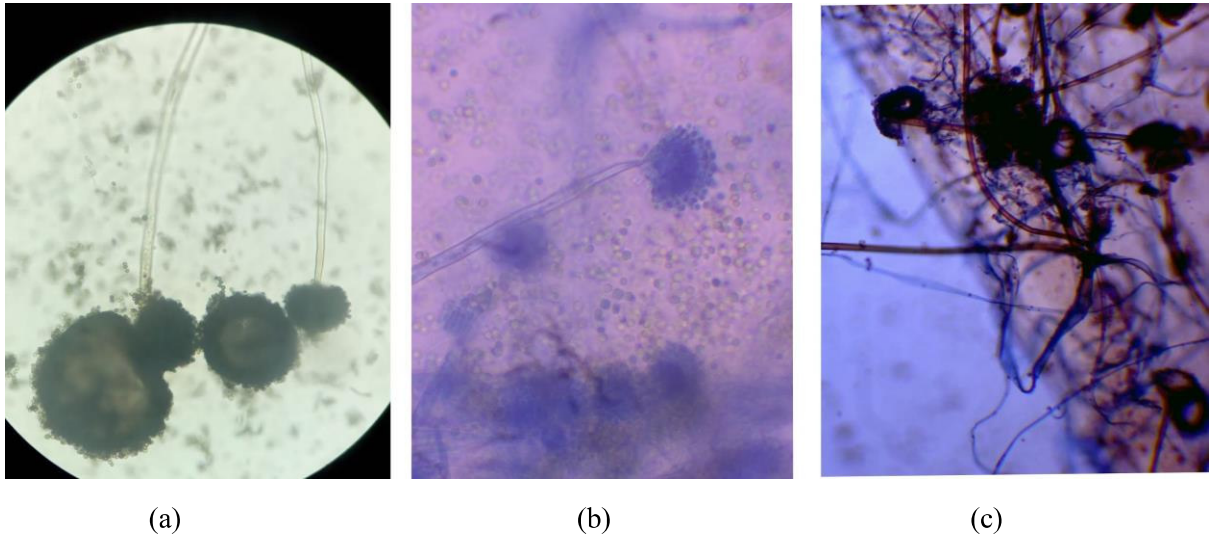
## 5.2 Identificação os fungos

Com os fungos isolados foram realizadas as análises macroscópica e microscópica padrões, para a identificação das espécies. Foram comparadas as estruturas observa com as apresentadas por Figueiras et al. (2000) e Fischer e Cook (2001) permitiu a identificação de três



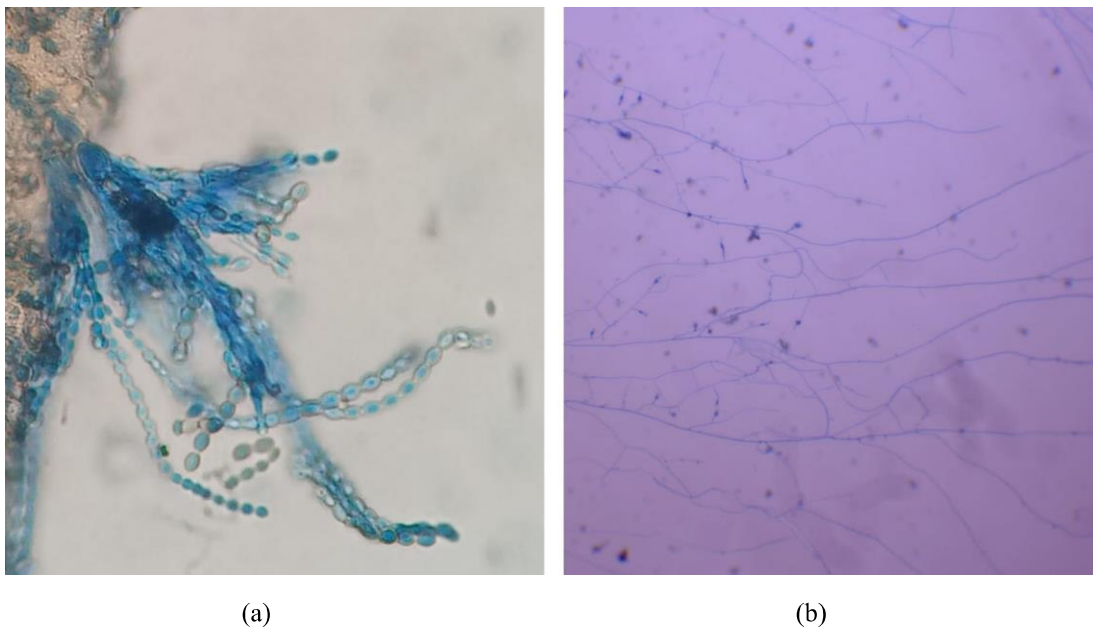
espécies fúngicas, *Aspergillus niger* (4), *Aspergillus flavus* (2), *Rhizopus oryzae* (5), como mostra a Figura 9 e os gêneros das duas espécies restantes como sendo *Penicillium* sp (3) e *Scopulariopsis* sp (1) como mostra a Figura 10.

**Figura 9** - Imagens dos fungos (a) *Aspergillus niger*, (b) *Aspergillus flavus* e (c) *Rhizopus oryzae* por microcultivo em meio de cultura ABD. Magnificação 100 vezes



**Fonte:** Próprio autor, 2022.

**Figura 10** - Fungo dos gêneros *Scopulariopsis* sp (a) e *Penicillium* sp (b) por microcultivo em meio de cultura ABD. Magnificação 40 vezes



**Fonte:** Próprio autor, 2022.

Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores. Park *et al.* (1982 *apud* RIBEIRO, 2011), estudando a flora natural de beijos coletados em três diferentes unidades de fabricação de tiquira no Maranhão, encontraram *Aspergillus niger* e *Paecilomyces* sp. como

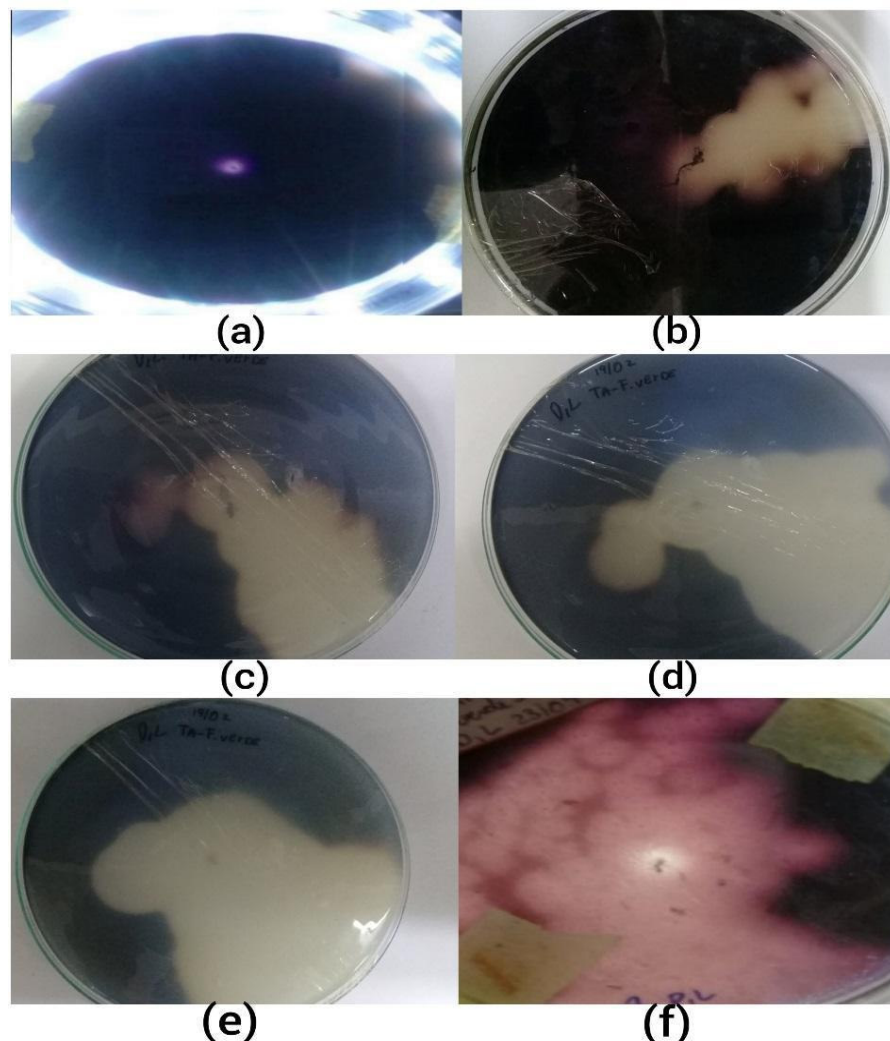
espécies predominantes, sendo também encontrada quantidade moderada de *Rhizopus* sp. e *Neurospora*. Ribeiro *et al.* (2019) relataram que isolaram *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Rhizopus oryzae* a partir de beijos obtidos de alambiques localizados no município de Humberto de Campos, Maranhão.

### 5.3 Capacidade de produzir enzimas amilolíticas

Os fungos isolados foram submetidos a ensaios para avaliar a sua capacidade de produzir enzimas amilolíticas.

Todos os fungos isolados apresentaram atividade amilásica. Dentre eles o fungo *Aspergillus flavus* apresentou degradação de amido maior que os outros. A Figura 11 apresenta a descoloração do meio de cultura indicando a degradação do amido.

**Figura 11** - Ensaio de degradação do amido por enzimas amilolíticas produzidas pelo fungo *Aspergillus flavus*: (a) 5 dias e (b) 6 dias, (c) 7 dias, (d) 10 dias, (e) 14 dias e (f) 20 dias



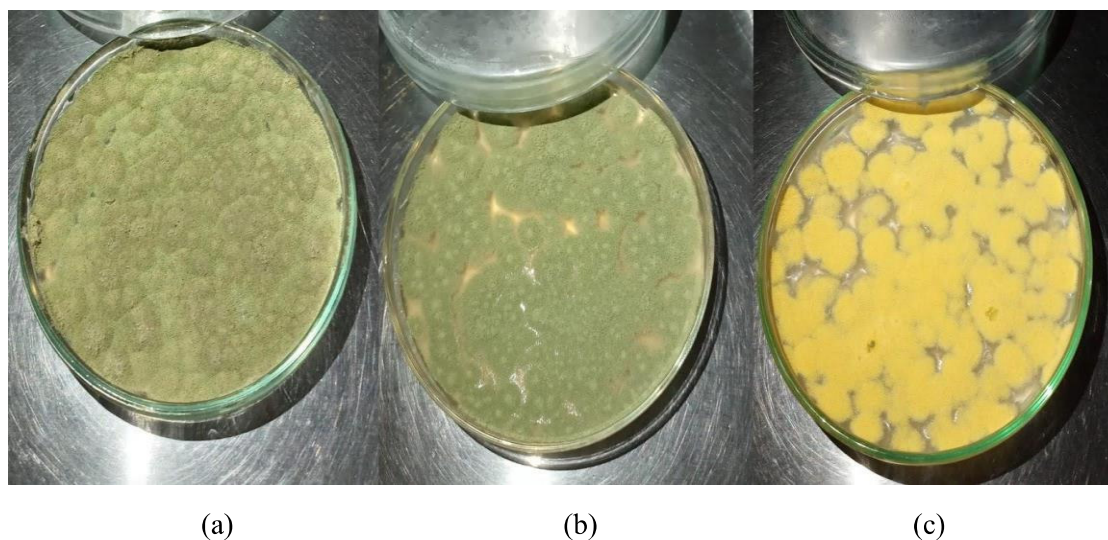
Fonte: Próprio autor, 2022

Devido possuir o melhor desempenho no teste enzimático de amilase em comparação com as demais espécies isoladas, o mesmo foi selecionado como foco do estudo direcionado para produção e obtenção de um extrato enzimático bruto.

#### 5.4 Desenvolvimento do *A. flavus* em diferentes meios de cultura

O fungo foi semeado nos meios de cultura ASD, ABD e AC como mostra a Figura 12, apresentando o aspecto das culturas após 5 dias de cultivo.

**Figura 12** - Colônia de *A. flavus* em meio (a) ASD (b) ABD (c) AC



**Fonte:** Próprio autor, 2022.

A cepa de *Aspergillus flavus* apresentou crescimento e desenvolvimento distintos nos meios de cultura. No meio ASD, as colônias apresentaram a cor verde musgo e maior esporulação em comparação aos demais, ao ponto de preencher toda a superfície da placa de Petri. O meio ASD é propício para esporulação de fungos filamentosos como o *Aspergillus flavus*, por apresentar um pH levemente ácido que inibe o desenvolvimento de bactérias contaminantes e pela alta concentração de dextrose que favorece o desenvolvimento de fungos estáveis por osmose (LABORCLIN, 2019).

O meio ABD é composto por infusão de batata desidratada e dextrose que estimulam o crescimento de fungos exuberantes (SPLABOR, 2022). Entretanto por apresentar menor quantidade de dextrose que o meio ASD, o fungo *A. flavus* apresentou menos esporulação.

O meio AC é propício para o crescimento de fungos capazes de consumir nitrogênio inorgânico pois utiliza de Nitrato de sódio como fonte de nitrogênio (HEXASYSTEMS GROUP, 2022). No meio de cultura AC, *A. flavus* apresentou cor amarela que segundo Fischer



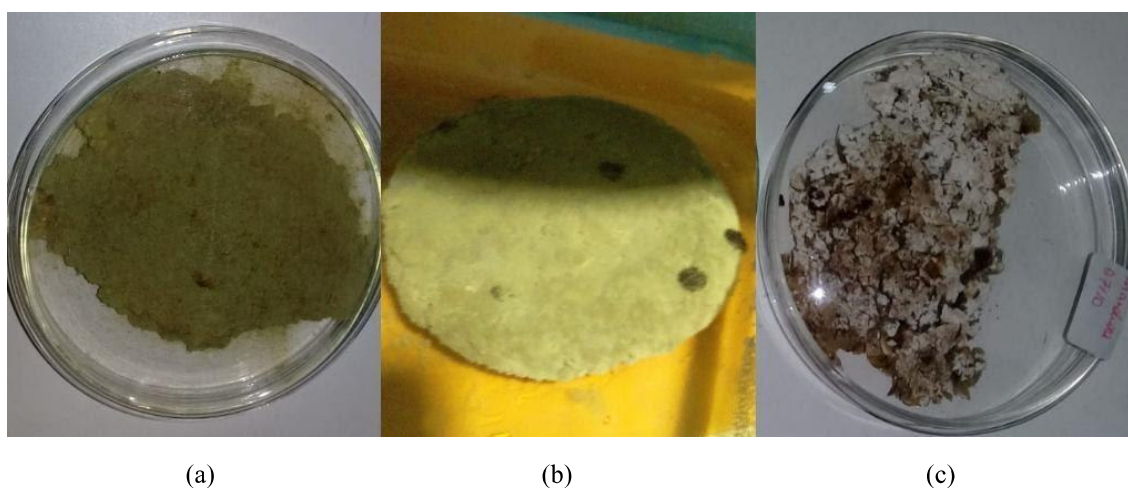
e Cook (2001) a sua cor verdadeira, que pode ter sido acentuada pela presença de nitrogênio inorgânico do meio.

### 5.5 Desenvolvimento do *A. flavus* em substrato sólido

Foram produzidos beijos de mandioca em três condições diferentes. Na primeira condição, o beiju foi preparado e assado logo após a ralação da mandioca. O extrato líquido da massa de mandioca apresentou pH 6,5. Na segunda condição, obteve-se o beiju 24 horas após ralação da mandioca e extrato líquido da massa de mandioca apresentou pH 4,9. Na terceira condição, preparou-se o beiju 48 horas após a ralação da mandioca e pH do líquido obtido com a prensagem da massa de mandioca foi 4,6.

O crescimento da cepa de *A. flavus* nas três condições de preparo do beiju após as 240 horas de incubação é mostrado na Figura 13.

**Figura 13** - Beijos com pH 6,5 (a), pH 4,9 (b) e pH 4,6 (c)



Fonte: Próprio autor, 2020.

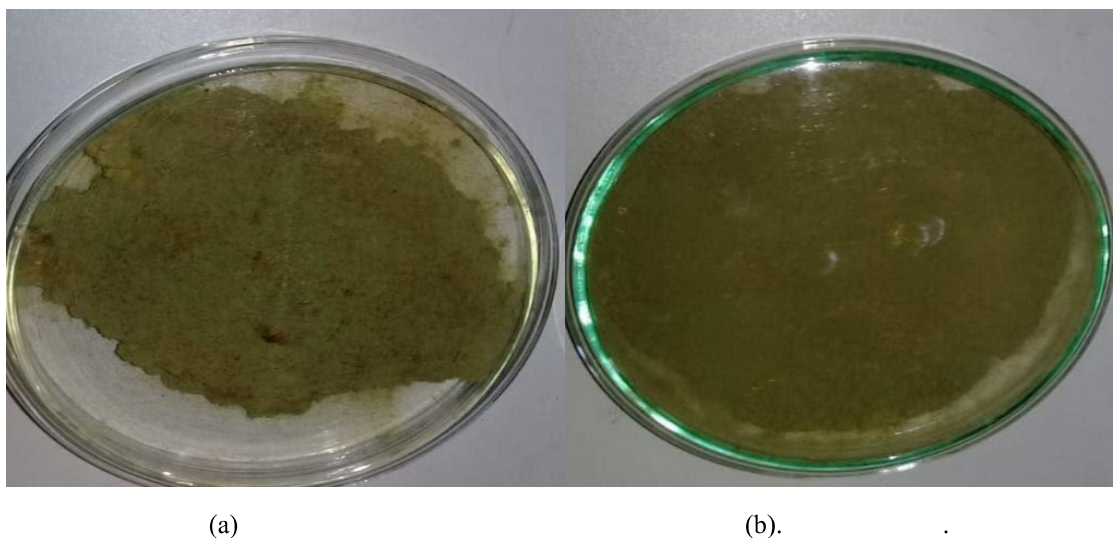
No Beiju preparado com pH 6,5 houve maior produção de esporos da cepa, no substrato preparado com pH 4,9 o fungo se desenvolveu bastante, já no beiju preparado com pH 4,6 o desenvolvimento do fungo foi altamente inibido. Essa diferença de pH entre os extratos acarretou alterações no crescimento dos fungos, apontando um intervalo de pH em que o fungo em estudo se desenvolve mais facilmente, como mostra após dez dias de inoculação, onde pode-se ver que o beiju que teve o extrato mais ácido não houve crescimento do fungo.

Considerando esse pH de trabalho, o beiju de batata doce foi feito sem período de repouso, tendo o pH de seu extrato líquido igual a 6,5, próximo ao do extrato de mandioca feito

no mesmo período, apontando que o substrato de batata doce também é útil para o crescimento e proliferação.

Após dez dias de inoculação, tanto o beiju de mandioca como o beiju de batata doce apresentaram a superfície coberta pelo fungo (Figura 14). Entretanto, no beiju de batata doce o fungo apresentou maior esporulação.

**Figura 14** - Beijus de mandioca (a) e batata doce (b).



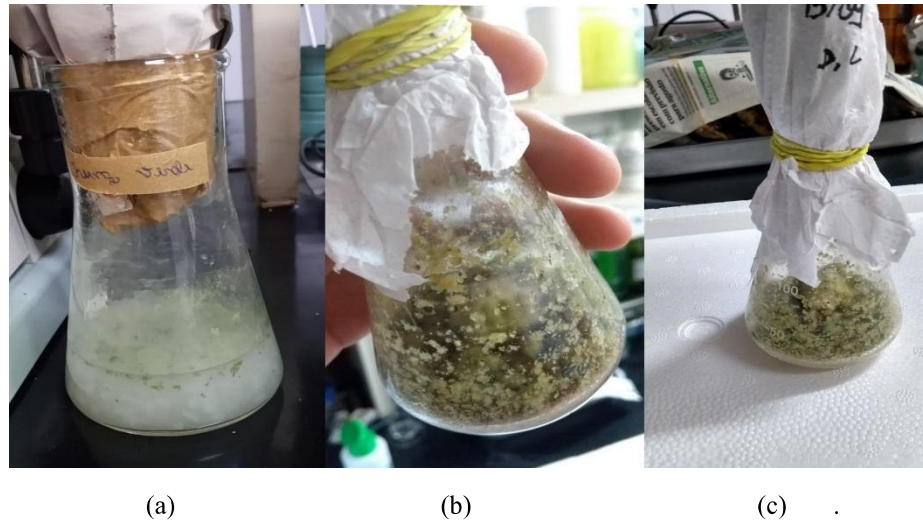
**Fonte:** Próprio autor, 2020.

Através dos resultados obtidos é possível afirmar que o fungo *Aspergillus flavus* se desenvolve bem em suportes sólidos com pHs entre 6,5 e 4,9 este resultado estar em concordância com os obtidos por Ritter (2007) que constatou maior desenvolvimento de cepas de *A. flavus* em meios com pH 4,0 e 5,2, Wheeler *et al* (1991) testaram cepas de *A. flavus* e *A. parasiticus* em diferentes faixas de pHs e observaram que a melhor faixa de pH para o crescimento destes encontram-se entre 4,0 e 6,0. Baseado nesses resultados e em dados apresentados por Escaramboni (2014) e Ribeiro (2011) as fermentações realizadas para produção de extrato enzimático bruto foram em pH 5.

### **5.6 Produção de extrato enzimático bruto**

Através dos três métodos de produção foram obtidos três extratos enzimáticos brutos, já que nas três técnicas foi possível observar o desenvolvimento do fungo em estudo como mostra a Figura 15.

**Figura 15** - Métodos de produção de enzimas: FS (a), FES-SM (b) e FES-FT (c).



Fonte: Próprio Autor (2022)

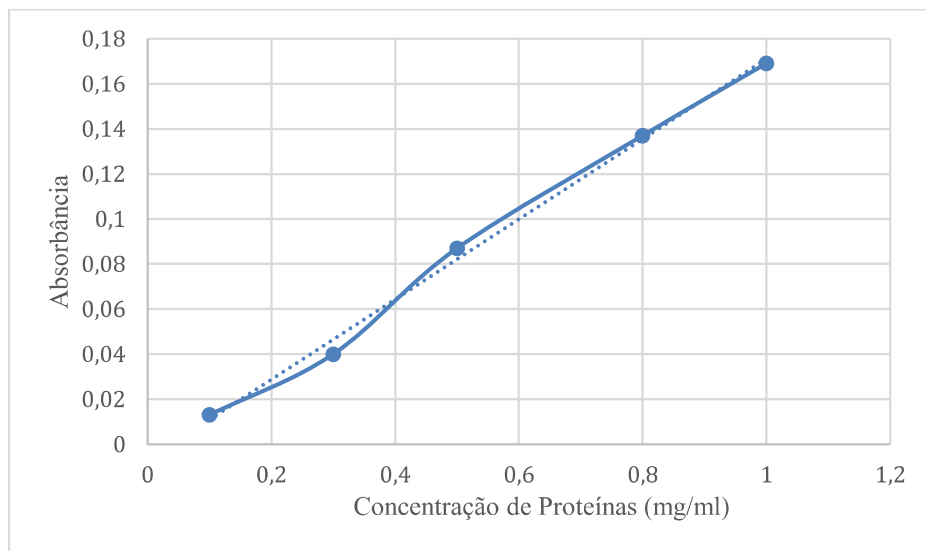
### 5.7 Dosagem de proteínas totais dos extratos obtidos pela FES-FT

A curva padrão de proteína BSA utilizada possui coeficiente de determinação igual a 0,9954, possuindo 5 pontos na curva como mostra o Figure 1 e equação da reta igual a Equação 3.

**Equação 3** - Equação da reta padrão de proteína

$$Y = 0,1777X - 0,0068$$

**Figure 1** - Curva padrão de proteína



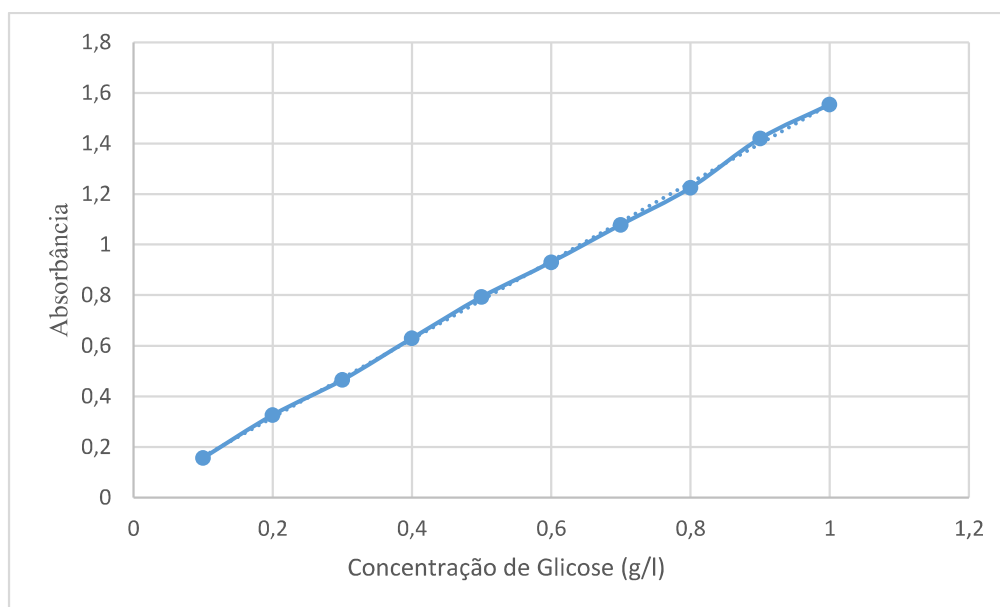
Fonte: Próprio autor, 2022

A absorvância medida a 595 nm para o extrato enzimático de *Aspergillus flavus* na FES-FT foi 0,076. Com base na equação da reta obtida pela curva padrão de proteína foi possível determinar que a concentração de proteínas totais presentes no extrato obtido pelo fungo *Aspergillus flavus* é de 0,466 mg/mL.

### 5.8 Determinação da atividade enzimática e concentração de açúcares redutores do extrato obtido pela FES-FT

As absorvâncias obtidas em cada extrato foram aplicadas a Equação 4 que relaciona absorvância com concentração em gramas por litros que foi obtida através de uma curva padrão de glicose com coeficiente de determinação igual a 0,9993, como mostra a Figure 2, dessa forma foi possível montar a Tabela 2.

Figure 2 - Curva padrão de glicose



Fonte: Próprio autor, 2022

Equação 4 - Equação da reta padrão de glicose

$$Y = 1,546X + 0,0078$$

Tabela 2 - Determinação da concentração de açúcares redutores e atividade enzimática

	FS	FES-SM	FES-FT
<b>Absorvância (nm)</b>	0,120	0,085	0,936
<b>Açúcares redutores (g/ml)</b>	0,07	0,049	0,6
<b>Atividade enzimática (U/g)</b>	38,86	27,20	333,03

**Fonte:** Próprio auto, 2022

O método FES-FT apresentou maior atividade enzimática, de acordo com Silva (2021) era de se esperar que a fermentação em estado sólido apresentasse melhor desempenho do que a fermentação submersa, devido a menor quantidade de água presente no meio e pelas condições do substrato estarem mais próximas das naturais assim como o próprio agente fúngico está mais adaptado para degradar a matéria orgânica.

A FES-FT apresenta maior atividade devido a composição dos substratos como afirma Escaramboni (2014) o farelo de trigo é comprovado como melhor substrato e indutor para secreção de amilases fúngicas apresentando níveis máximos de produção enzimática. A atividade enzimática obtida por esse meio fermentativo foi semelhante ao alcançado por Escaramboni (2014) que obteve atividade de 361,6 U/g com fungo *Rhizopus oligosporus*. Hashemi *et al* (2010) utilizando FES com farelo de trigo como substrato para produção de amilases com *Bacillus* obtiveram atividade  $\alpha$ -amilolítica de 197,27 U/g com temperatura de fermentação de 64 °C. confirmando a eficácia do método e a eficiência do agente fúngico.

### **5.9 Variação dos parâmetros pH e temperatura de FES-FT**

Considerando que pH e temperatura são determinantes para os processos biológicos, extratos de *A. flavus* obtidos por FES-FT foram utilizados para avaliar os efeitos do pH e da temperatura sobre a atividade enzimática.

Após a obtenção dos extratos em diferentes pH e temperatura de incubação, determinou-se concentração de proteínas totais e atividade enzimática. A maior concentração de proteínas totais e menor atividade enzimática foi obtida no meio fermentativo 6 que possui pH do meio foi 6 e a FES-FT foi realizada na caixa de isopor fechada, através desses resultados pode-se inferir que sobre essas condições o fungo *A. flavus* produz grande quantidade de proteínas, entretanto as mesmas não se encontram ativas nessas condições ou que o percentual de enzimas amilolíticas produzidas é relativamente baixo quanto aos demais extratos obtidos. Os resultados estão expressos na Tabela 3.

**Tabela 3** - Dosagem de proteínas e Atividade enzimática dos extratos obtidos com variação de parâmetros da FES-FT

n°	Parâmetros variados	Proteínas totais (mg/ml)	Atividade enzimática (U/l)
1	pH 4, 37 °C	0,218	194,28
2	pH 5, 37 °C	0,173	177,62
3	pH 6, 37 °C	0,173	210,93
4	pH 4	0,41	216,48
5	pH 5	0,432	238,68
6	pH 6	0,685	105,46

Fonte: Próprio autor, 2022

Pode-se observar que os extratos obtidos pela FES-FT a 37 °C possuem baixas concentrações de proteínas totais, todavia esses extratos apresentam atividades enzimáticas relativamente consideráveis, logo esses meios fermentativos apresentam baixa produção enzimática, entretanto as enzimas por eles produzidas dispõe de boas capacidades de degradação de biomassas amiláceas. Esse baixo rendimento de produção pode ser agregado a temperatura superior de fermentação, geralmente aumentar a temperatura acelera uma reação, e diminuir a temperatura desacelera uma reação. No entanto, temperaturas altas podem fazer com que uma enzima perca sua forma (se desnature) e pare de funcionar (KHAN ACADEMY, 2022)

Em todas as condições estudadas, o fungo produz enzimas capazes de degradar o amido. Entretanto, os resultados apresentados na Tabela 3 mostram que o melhor pH e a melhor temperatura para produção de extrato enzimático bruto com fungo *Aspergillus flavus* é o pH 5 e temperatura da caixa de isopor fechada. O extrato enzimático obtido nessa condição apresenta a segunda maior concentração de proteínas totais e maior atividade enzimática, indicando que as proteínas presentes no extrato são altamente capazes de degradar amido.

Pode se afirmar que o melhor pH e temperatura para produção de extrato enzimático bruto com fungo *Aspergillus flavus* é o pH 5 e temperatura ambiente,

## 6 CONCLUSÃO

Foram isoladas cinco linhagens fúngicas e que foram identificadas como *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium* sp e *Scopulariopsis* sp. Todas as linhagens foram capazes de produzir enzimas que degradam amido. A linhagem de *Aspergillus flavus* apresentou maior capacidade amilolítica em meio de cultura ágar-amido.

A linhagem de *Aspergillus flavus* isolada se desenvolve em diversas condições de incubação (substrato, temperatura e pH) e produz extratos enzimáticos ricos em enzimas amilolíticas.

O extrato enzimático mais eficiente para produzir enzimas capazes de degradar o amido foi obtido por fermentação em estado sólido com farelo de trigo como substrato sólido, em temperatura ambiente e pH 5. Esse extrato apresentou uma concentração de proteínas de 0,432 mg/mL e atividade enzimática de 238,68 U/L.

Levando em consideração o atual cenário econômico que busca por um método eficiente para a produção de enzimas de origem microbiana, os resultados apresentados por este trabalho possuem relevância por ter produzido um extrato enzimático capaz de degradar material amiláceo via fermentação em estado sólido utilizando um fungo presente na flora brasileira, o *Aspergillus flavus*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, J. A.; ROVIDA, A. F.; PAMPHILE, J. A.. Fungos de Interesse: Aplicações Biotecnológicas. **UNINGÁ**, [s. l.], v. 21, ed. 1, p. 55-59. out. 2014. Disponível em: <http://34.233.57.254/index.php/uningareviews/article/view/1613/1224>. Acesso em: 22 mar. 2022.
- AFONSO, S. de O. M. *Aspergillus niger*: sua utilização na indústria farmacêutica. Dissertação. Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. Instituto Superior em Ciências da Saúde Egas Moniz. Out. 2015.
- AMAIKE, Saori; KELLER, Nancy P. *Aspergillus flavus*. **Annual review of phytopathology**, v. 49, n. 1, p. 107-133, 2011. Disponível em: [https://scholar.archive.org/work/p2ni2od4ejerneuxwevjdfmae4/access/wayback/https://www.researchgate.net/profile/Nancy\\_Keller/publication/51070539\\_Aspergillus\\_flavus/links/09e4150f597d450ff9000000.pdf](https://scholar.archive.org/work/p2ni2od4ejerneuxwevjdfmae4/access/wayback/https://www.researchgate.net/profile/Nancy_Keller/publication/51070539_Aspergillus_flavus/links/09e4150f597d450ff9000000.pdf). Acesso em: 11 ago. 22.
- BAZZO, V. et al. Bioprospecção e caracterização da atividade amilolítica de fungos filamentosos. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 8, n. 5, p. 33314-33330, abr. 2022. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/47425/pdf>. Acesso em: 10 maio 2022.
- BENORE, M. A. What is in a name? (or a number?): The updated enzyme classifications. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 47(4):481-483, 2019.
- BORGES, V. B. *et al.* Estudo macroestrutural em cepas de referência de *Aspergillus flavus* em grãos de amendoim i. **Arca: Repositório institucional da Fiocruz**, [s. l.], v. 26, n. 214, p. 163 - 169, nov. 2012. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/15021>. Acesso em: 27 jul. 2022.
- CAIXETA, A. A. **Estudos em Doenças de Plantas .Aspectos Gerais E Morfologicos Do Fungo *Aspergillus flavus***. Goiania. 2010. Disponível em: [https://fitopatologia1.blogspot.com/2010/04/aspectos-gerais-e-morfologicos-do-fungo\\_22.html](https://fitopatologia1.blogspot.com/2010/04/aspectos-gerais-e-morfologicos-do-fungo_22.html). Acesso em: 27 jul. 2022.
- CEREDA, M.P. BRITO, V. H. S. Tiquira. ResearchGate. **Bebidas Alcoólicas**. 2015. p. 469-487
- CLARK, F.E. Agar-plate method for total microbial count. In **Methods of soil analysis**, Part 2. Chemical and microbiological properties. (C.A. Blanc, D. Evans, J.L. White, L.E. Ensminger, F.E. Clark & R.C. Dinauer, eds.). Madson Inc., New York, p.1460-1466. 1965.
- COOK, B. N.; FISCHER, F. **Micologia: Fundamentos e diagnóstico**. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.
- CUZZIL, C., LINK, S., VILANI, A., ONOFRE, S. (2015). Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). **Gl. Sci. Technol.**, v. 04, n. 02, p.47 – 57, mai/ago. 2011.
- Dos SANTOS, E.R.D. **Material Complementar ao livro Sistemática Vegetal I: Fungos**. UFSC, 2015. p. 3-4. Disponível em: <https://uab.ufsc.br/biologia/files/2020/08/Fungos.pdf>. Acesso em 25. Jun.2022.



ESCARAMONI, Bruna. **Produção de amilases pelo cultivo em estado sólido de *rhizopus microsporus var. oligosporus* e sua utilização na obtenção de xarope de glicose**. 2014. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 2014.

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 52, p. 179-188, 2015.

FERNANDES, Ana Letícia. **ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS E SEU POTENCIAL PARA TRATAMENTO DE BIOMASSA: UMA REVISÃO**. 2021. TCC (Bacharel em Tecnologia) - Universidade Federal de Integração Latino Americana, Foz do Iguaçu, 2021. DOI <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170538>. Disponível em: <https://dspace.unila.edu.br/handle/123456789/6334>. Acesso em: 18 maio 2022

FIGUEIRAS, M.J.; GENÉ, J.; GUARDO, J.; HOOG, G. S. **Atlas Of Clinical Fungi**. 2ª ed., CBS, Utrecht, Holanda, 2000.

GOURAMA, Hassan; BULLERMAN, Lloyd B. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: A review. **Journal of Food protection**, v. 58, n. 12, p. 1395-1404, 1995

GRIEBELER, N. et al. Seleção de fungos filamentosos produtores de amilases, proteases, celulasas e pectinases. **Revista acadêmica de ciência animal**, Erichim, v. 13, p. 13-22, 2015. Disponível em: <https://periodicos.pucpr.br/cienciaanimal/article/view/11174/10511>. Acesso em: 10 maio 2022.

HASHEIMI, M.; RAZAVI, S. H.; SHOJAOSADATI, S. A.; MOUSAVI, S.M.; KHAJEH, K; SAFARI, M. Development of a SSF process for production of an alpha amylase with potentially interesting properties. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, p. 333-337, 2010.

HEDAYATI, M.T, PASQUALOTTO, A.C., WARN, P.A., BOWYER, P., DENNING, D.W. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**, 2007, 153:1677–92

HEXASYSTEMS GROUP. **Descrição de produto Agar Czapek Dox: Frasco 500g**, [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.hexasystems.com.br/produto/agar-czapek-dox-frasco-500g.aspx>. Acesso em: 24 jul. 2022.

KHAN ACADEMY. **Metabolismo: Revisão sobre enzimas**. Khan Academy. 2022. Disponível em:

<https://pt.khanacademy.org/science/biology/x324d1dcc:metabolism/x324d1dcc:untitled-932/a/hs-enzymes-review#:~:text=Fatores%20que%20afetam%20a%20atividade,se%20ligar%20a%20um%20substrato>. Acesso em: 27, jul. 2022.

KLICH, M.A. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. **Molecular Plant Pathology** (2007) 8(6), 713–722.

KRIJGSHELD, P., BLEICHRODT, R., VELUW, G. J. van, WANG, F., MÜLLER, W. H., DIJKSTERHUIS, J. e WÖSTEN, H. A. B. (2013). Development in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, 74(1), 1–29. doi: 10.3114/sim0006

LABORCLIM. **Potato dextrose agar**, Paraná, 2019. Disponível em: <https://www.laborclin.com.br/agar-sabouraud-seletividade-e-facilidade-no-cultivo-de-fungos/>. Acesso em: 24 jul. 2022.

LACAZ, Carlos da Silva, et al. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 730 p.

LEAL, P. L. et al. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences – JCEC**, Vitória da Conquista - BA, v. 4, ed. 2, 23 ago. 2018. DOI <https://doi.org/10.18540/jcecv14iss2pp0181-0188>. Disponível em: <https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&url=https://periodicos.ufv.br/jcec/article/download/2489/1043/11670&ved=2ahUKEwj3ronCsob5AhUuspUCHR5xBG0QFnoECAQQAQ&usg=AOvVaw3tWeIULRlq71ianundjylj>. Acesso em: 19 jul. 2022.

LEAL, Régis. NETO, José. Amido: Entre a ciência e a cultura. **Química Nova Escola**. Vol. 35, Nº 2, 75-78. 2013.

MACHADO BENASSI, V.; ALMEIDA, A. Prospecção de fungos filamentosos termotolerantes e termofílicos de distintos materiais coletados no estado de Minas Gerais e análise de potenciais produtores de amilases. **Revista Unimontes Científica**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 150–169, 2020. Disponível em: <https://www.periodicos.unimontes.br/index.php/unicientifica/article/view/834>. Acesso em: 23 de mai 2022

MALDONADE, I. R.; CARVALHO, P. G. B.; FERREIRA, N. A. **Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS**. Comunicado Técnico, Embrapa, 2013.

MARQUES, M. R. F. **Bioquímica**. 1. ed revisada, Florianópolis; BIOLOGIA/EAD/UFSC, 2014.

MARZZOCO, A. e BAYARDO B. T. **Bioquímica Básica**. 4. ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2015.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426, 1959.

MOREIRA, L. H. **BioBlog ESEM**. A importância da fermentação na indústria alimentícia. In: [S. l.], 21 jun. 2018. Disponível em: <https://medium.com/bioblog-esem/a-import%C3%A2ncia-da-fermenta%C3%A7%C3%A3o-na-ind%C3%BAstria-aliment%C3%ADcia-21afc4e06ae0>. Acesso em: 19 jul. 2022.

NETO, U. F. Reações de fermentação: aquilo que vale a pena saber a respeito delas. **IGRASTOPED**. 2022. Disponível em: <https://www.igastroped.com.br/reacoes-de-fermentacao-aquilo-que-vale-a-pena-saber-a-respeito-delas/>. Acesso em: 30 jul. 2022

ORLANDELLI, R.C., SPENCIAN, V., FELBER, A.C., PHAMPHILE, J.A. Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações. **Rev. Saúde e Biol.**, v.7, n.3, p.102,2012

PAPADAKI, E.; KONTOGIANNOPOULOS, N. K.; ASSIMOPOULOU, A. N.; MANTZOURIDOU, F. T. Feasibility of multi-hydrolytic enzymes production from optimized grape pomace residues and wheat bran mixture using *Aspergillus niger* in an integrated citric

acid-enzymes production process. **Bioresource Technology**. 2020, v. 309. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123317>. Acesso em: 10 ago. 22

PEREIRA, M. M. G. et al. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 1, 2002.

POIAN, A. et al. **Bioquímica I**. 5º Ed. Rio de Janeiro. Fundação CECIERJ. 2010.

QUIROGA, A. L. **AMIDOS**. Vogler ingredientes Ltda: Food Ingredients Brasil. Disponível em: [www.revista-fi.com](http://www.revista-fi.com). Ano 25, v. 35, n. 1, 1 ed. P. 41-66, 2015. Vogler, 2015.

RIBEIRO, D.M.L, MOREIRA, L.R.M.O, MONTEIRO, C.A, BEZERRA, C.W.B. Identificação e a atividade sacrificante da flora microbiana selvagem empregada na fabricação de tiquira. **Revista Virtual de Química**, v.11, n.6, 2019, Disponível em: <http://rvq.s bq.org.br>. Acesso em 12 set. 2020.

RIBEIRO, Diogo Marcelo Lima. **Caracterização e comportamento sacrificante da flora microbiana empregada na fabricação de aguardente de mandioca (tiquira)**. Orientador: Prof Dr Cícero W. B. Bezerra. 2011. Dissertação (Mestre em Química Analítica) - Universidade Federal do Maranhão, Maranhão, 2011.

RITTER, Ana Carolina. **Potencial toxigênico de *Aspergillus flavus* testado em diferentes meios de condições**. Orientadora: Isa Beatriz Noll. 2007. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, ênfase em Microbiologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2007.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, p 1-7, 2012;

SILVA, A. B. Mandioca: Análise Mensal. **Conab**. 2021. Disponível em: [https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&url=https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuaria-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-mandioca/item/download/37177\\_406cddb9db971ac376768e737104b85%23;~:text=3DAssim%252C%2520os%2520pre%2520C%2520A7os%2520da%2520raiz,%2524%2520458%252C23%2520Ft.&ved=2ahUKewjR9arW5575AhULFbkGHD-sAdoQFnoECBAQBg&usq=AOvVaw1MHbWnfz2KkgOFKQZ2W98x](https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&url=https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuaria-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-mandioca/item/download/37177_406cddb9db971ac376768e737104b85%23;~:text=3DAssim%252C%2520os%2520pre%2520C%2520A7os%2520da%2520raiz,%2524%2520458%252C23%2520Ft.&ved=2ahUKewjR9arW5575AhULFbkGHD-sAdoQFnoECBAQBg&usq=AOvVaw1MHbWnfz2KkgOFKQZ2W98x). acesso em 27 de julho de 2022

SOARES, T.A. e LINS, R.D. Ribozimas: Nem Toda Enzima é uma Proteína. **Química Nova** 18(4): 375-378, 1995.

SPLABOR. **Agar batata dextrose**: Guia do comprador. 20 jan. 2022. SPLABOR: Equipamentos para laboratório. Disponível em: [https://www.splabor.com.br/blog/meio-de-cultura-2/agar-batata-dextrose-guia-do-comprador/?\\_gl=1\\*1vmpi6t\\*\\_ga\\*YW1wLUdQMFVxMmQ0dGVpTUpsQU1LMUNmVHV DYUVmLXZBVXgxOWhFVTQxZjZlUR1dGQ0UndHa1JtRm9oQzIxLVpJNG8.#comme ntform](https://www.splabor.com.br/blog/meio-de-cultura-2/agar-batata-dextrose-guia-do-comprador/?_gl=1*1vmpi6t*_ga*YW1wLUdQMFVxMmQ0dGVpTUpsQU1LMUNmVHV DYUVmLXZBVXgxOWhFVTQxZjZlUR1dGQ0UndHa1JtRm9oQzIxLVpJNG8.#comme ntform). Acesso em: 24 jul. 2022.

SRIVASTAVA, N. Production of Food-Processing Enzymes from Recombinant Microorganisms. **Enzymes in Food Biotechnology**. Department of Biotechnology, CET-

IILM, Greater Noida, India, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00043-8> Acesso em: 10 ago. 22

TEIXEIRA, I.S.; MILAGRE, C.D.F. Evolução dirigida de enzimas: pequenas modificações, melhores biocatalisadores. **Química Nova**, v. 43, p. 773-786, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170538>. Acesso em: 30 mar. 2022.

USA (2004). *Rhizopus sp. Doctor fungos*. Disponível em: <http://www.doctorfungus.com/thefungi/rhizopus.htm> Acesso em: 27 de jul. 2022

VALLADÃO, Sara Araújo. **Avaliação do método oficial in 68/2006 para análise de amido em iogurte**. 2012. Dissertação ( Mestre em Ciência de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.

WANDERLEY, M.D., NEVES, E., ANDRADE, C.J. de. Aspectos da produção industrial de enzimas. **CITINO**. Vol. 1, No. 1, p. 44-50. Out.-Dez., 201.

WEELER, K.A. et al. Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.12, p.141-150, 1991.

ZAIA, Dimas AM; ZAIA, Cássia Thaïs BV; LICHTIG, Jaim. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química nova**, v. 21, p. 787-793, 1998. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/pnCxFMPPrQkjW5vj38BT5kbG/?lang=pt>. Acesso em: 10 ago. 22.