

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

PROSPECÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS A PARTIR DE FUNGOS
FILAMENTOSOS ISOLADOS DO ALIMENTO LARVAL DE ABELHAS SEM
FERRÃO NATIVAS DO BRASIL

ANA LETICIA GALANTE MARINHO

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

UBERLÂNDIA-MG
Junho - 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

PROSPECÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS A PARTIR DE FUNGOS
FILAMENTOSOS ISOLADOS DO ALIMENTO LARVAL DE ABELHAS SEM
FERRÃO NATIVAS DO BRASIL

ANA LETICIA GALANTE MARINHO

DRA. RAQUEL CRISTINA CAVALCANTI DANTAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

UBERLÂNDIA – MG
Junho – 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

PROSPECÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS A PARTIR DE FUNGOS
FILAMENTOSOS ISOLADOS DO ALIMENTO LARVAL DE ABELHAS SEM
FERRÃO NATIVAS DO BRASIL

ANA LETICIA GALANTE MARINHO

DRA. RAQUEL CRISTINA CAVALCANTI DANTAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

Homologado pela coordenação do Curso de
Biotecnologia em ___/___/___.

DR. NILSON NICOLAU JÚNIOR
UBERLÂNDIA – MG

Junho – 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

PROSPECÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS A PARTIR DE FUNGOS
FILAMENTOSOS ISOLADOS DO ALIMENTO LARVAL DE ABELHAS SEM
FERRÃO NATIVAS DO BRASIL

ANA LETICIA GALANTE MARINHO

Aprovado pela Banca Examinadora em: 28 / 06 / 2023 Nota: 98

Profa. Dra. Raquel Cristina Cavalcanti Dantas

Uberlândia, ____ de _____ de ____

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus e àqueles que me acompanham, por me levantar e me dar forças todos os dias até mesmo naqueles que nem eu achei que seria possível.

Agradeço à minha orientadora por todo auxílio, ensinamentos, parceria e confiança durante a execução deste trabalho. Agradeço, também, à banca examinadora, Iara Rossi Gonçalves e Ana Carolina Costa Santos, por aceitarem meu convite para participar deste momento importante da minha graduação e por todas as contribuições.

Agradeço ao Laboratório de Processos Biotecnológicos (LABBIO) e à equipe da Faculdade de Engenharia Química (FEQUI) pelo espaço e infraestrutura concedidos para que fosse possível a realização deste trabalho, bem como todo o apoio e conhecimentos repassados.

Agradeço aos professores do Instituto de Biotecnologia (IBTEC) que estiveram presentes na minha formação para que fosse possível os conhecimentos adquiridos para a realização deste trabalho.

Agradeço à minha família, especialmente minha mãe Raquel Galante que sempre acreditou e confiou nas minhas escolhas, minha avó Maria Olimpia e tia avó Maria Anésia por estarem sempre presente e dando todo suporte necessário, sempre apostando no meu potencial.

Agradeço aos meus amigos, que sempre estiveram presentes dando apoio emocional diário, formando minha família em Uberlândia e sempre incentivando para o meu melhor desempenho em todas as áreas, principalmente, durante este trabalho.

RESUMO

As amilases são enzimas que hidrolisam moléculas de amido liberando glicose e dextrinas, possuindo caráter muito importante em diversos setores industriais. As amilases de origem microbiana se destacam no mercado de enzimas devido possibilidade de produção em grande quantidade por processos fermentativos. Com isso, pesquisas têm buscado pela bioprospecção de novas amilases com menor custo de produção e características como termoestabilidade e estabilidade ao pH. O presente trabalho teve como objetivo prospectar o potencial biotecnológico para produção de novas enzimas amilolíticas a partir de fungos filamentosos isolados de alimento larval de abelhas sem ferrão, pertencentes a Coleção de Micro-organismos Isolados de Abelhas sem Ferrão (CoMISBee) da Universidade Federal de Uberlândia. Para isto, foi realizado um *screening* primário em 8 fungos, a partir de testes em placa e determinação do Índice Enzimático (IE), para seleção do melhor fungo produtor de amilase. O fungo MS30B apresentou o maior IE e foi classificado como fortemente produtor da enzima. A fermentação em estado sólido em farelo de arroz foi conduzida para produção do extrato enzimático bruto utilizando o fungo MS30B, e a atividade enzimática das amilases contidas no extrato foi avaliada a partir do teste de liberação de açúcares redutores pela hidrólise do amido, utilizando o reagente DNS (ácido dinitrosalicílico). Após diversas análises, pode-se observar uma atividade máxima da enzima em 3 minutos antes da sua fase estacionária, obtendo resultados significativos quanto a sua atividade. Ademais, devido ao seu alto desempenho na atividade qualitativa, há necessidade de estudos futuros a fim de visualizar o padrão ótimo de condições físicas destas amilases fúngicas.

Palavras-chave: amilase, fungo filamentoso, abelhas sem ferrão

Sumário

1. INTRODUÇÃO	9
2. JUSTIFICATIVA	11
3. OBJETIVO	12
3.1. Objetivo geral	12
3.2. Objetivos específicos	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.1. Micro-organismos	13
4.2. Análise qualitativa da produção de amilase	13
4.3. Produção do extrato enzimático por Fermentação em Estado Sólido (FES)	14
4.4. Avaliação da atividade enzimática por quantificação dos açúcares redutores utilizando reagente DNS (Ácido dinitrosalicílico)	15
4.4.1. Preparo do reagente dinitrosalicílico (DNS)	16
4.4.2. Curva padrão analítica de açúcares redutores	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5.1. Cultivo do micro-organismo e análise macro e microscópica	18
5.2. Nível de produção de amilase em função do Índice Enzimático	21
5.3. Avaliação da atividade enzimática pela quantificação de açúcares redutores	25
5.3.1. Fermentação em Estado Sólido (FES) em farelo de arroz	25
5.3.2. Obtenção da curva padrão de glicose por método DNS (Ácido dinitrosalicílico)	26
5.3.3. Atividade enzimática do fungo MS30B	28
6. CONCLUSÃO	31
7. REFERÊNCIAS	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Codificação dos fungos filamentosos da Coleção de Micro-organismos Isolados de Abelhas sem ferrão do CoMISBee e suas respectivas abelhas sem ferrão.....	10
Tabela 2: Nível de produção de amilase pelos fungos filamentosos isolados de abelhas sem ferrão em função no Índice Enzimático	14

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Curva padrão de glicose (Concentração de açúcares redutores versus absorvância).....8
- Figura 2:** Concentrações crescentes de glicose em reação com DNS; coloração variando do menos concentrado, mais claro, para maior concentração de glicose, coloração acentuada 9
- Figura 3:** Fungos filamentosos cultivados em meio BDA e microscopia com corante azul de metileno. 11
- Figura 4:** Fermentação em Estado Sólido para produção do extrato enzimático em duas situações..... 17
- Figura 5:** Atividade amilolítica do extrato enzimático bruto produzido por Fermentação em Estado Sólido a partir do fungo MS30B (Tempo versus Concentração de Açúcares Redutores)..... 19

LISTA DE ABREVIACÕES

CoMISBee: Coleção de Micro-organismos Isolados de Abelha sem Ferrão do Laboratório de Genética;

LABBIO: Laboratório de Processos Biotecnológicos;

BDA: Batata Dextrose Ágar;

DNS: Ácido dinitrosalicílico

IE: Índice enzimático;

DH: Diâmetro do halo;

DC: Diâmetro da colônia;

FES: Fermentação em estado sólido

g: Gramas;

L: Litro;

rpm: Rotações por minuto

mL: Mililitro

h: Hora

µmol: micromol

min: minuto

nm: Nanômetro

R²: Coeficiente angular de correlação

ABS: Absorbância

AR: Açúcar redutor

U: Unidade internacional de atividade enzimática

1. INTRODUÇÃO

O maior grupo de abelhas sem ferrão do mundo são denominadas como melíponas. Dentre os 29 gêneros diferentes de abelhas sem ferrão conhecidos no Brasil, os que compreendem maior número de espécies são *Melipona*, *Plebeia*, *Scaptotrigona*, *Trigona* e *Trigonisca*. Destes, sabe-se que as melíponas são o maior grupo que assistem as flores de diversas plantas em ecossistemas naturais e/ou agrícolas nas regiões tropicais (CARVALHO et al., 2018). Mais de 200 espécies de *Melipona* spp. já foram descritas no Brasil (LAVINAS et al., 2019) e cerca de vinte por cento das abelhas sem ferrão, compreendidas na região tropical do planeta, são endêmicas no país (DOS SANTOS et al., 2021).

As melíponas são as principais abelhas polinizadoras de ambientes tropicais, com destaque para o bioma amazônico (KERR et al., 1996), revelando importância ecológica em relação a polinização de plantas nativas, garantindo um equilíbrio biológico terrestre (FELIPE NETO, 2015). Além da polinização, o impacto socioeconômico dessas abelhas se dá devido aos diversos produtos obtidos a partir da meliponicultura, como mel, geoprópolis e cera (MARÇAL, 2017).

Assim como na maioria dos organismos vivos, as melíponas possuem interações simbióticas e mutualísticas com diversos micro-organismos, que influenciam principalmente na digestão e saúde do inseto (MARÇAL, 2017). A microbiota associada às abelhas sem ferrão inclui bactérias, leveduras e fungos filamentosos em simbiose com a colônia. Esses micro-organismos contribuem com a fermentação do néctar e maturação do pólen, além da produção de substâncias nutritivas e antimicrobianas para as abelhas (SANTOS, 2022).

Neste sentido, dado à alta relevância destas abelhas do ponto de vista ecológico, muitas pesquisas lhes foram direcionadas ao longo dos anos, o que permitiu também

novas descobertas sob a perspectiva biotecnológica, com destaque para o potencial dos fungos filamentosos na produção de enzimas com aplicação industrial (BUDHIRAJA et al., 2013). Estes fungos, associados às abelhas sem ferrão, normalmente são caracterizados como saprófitos, no entanto, também já foram relatados como patógenos oportunistas em diversas abelhas (De PAULA et al., 2021).

Do ponto de vista biotecnológico, a característica heterotrófica e nutrição por absorção dos fungos filamentosos os tornam agentes com grande destaque para a produção de enzimas extracelulares (ALVES et al., 2020). As enzimas de origem microbiana encontram grande demanda industrial em detrimento daquelas oriundas de plantas e animais, por sua produção ser menos dispendiosa e menos prejudicial ao meio ambiente, além de sua atividade ser facilmente regulada, como nível de concentração, pH e temperatura (ALVES-CAMPOS et al., 2017). Hoje, diversas enzimas microbianas estão disponíveis comercialmente, tendo ampla variedade de aplicação industrial (DE SOUZA OLIVEIRA, 2019). Dentre estas, as amilases são amplamente estudadas devido a sua importância na hidrólise do amido encontrado em sementes de cereais, como milho, trigo, arroz, e em tubérculos ou raízes, como batata e mandioca. São consideradas as enzimas mais importantes na hidrólise de glicídios, quebrando as ligações glicosídicas presentes nas cadeias de amilose e amilopectina (JOHN, 2017). Com isso, as amilases possuem aplicação principalmente na indústria alimentícia, para produção de ração animal, cervejas, bebidas destiladas, panificação, cereais, entre outros produtos (KAN et al., 2019; PELLEGRINI et al., 2020).

Adicionalmente, as amilases são amplamente úteis às indústrias de papel e celulose, têxtil, química, farmacêutica e de biocombustíveis (BAZZO et al., 2022). Nestes setores, as amilases são aplicadas em formulações de detergentes, nos quais desempenham função de remoção de manchas causadas por amido e para trazer suavidade ao produto têxtil. Já no segmento de combustíveis, são essenciais para liquefação e sacarificação do amido

utilizado no mosto (KIRK, BORCHERT e FUGLSANG, 2002; JEAN-BAPTISTE et al.,2020).

De acordo com Alves e colaboradores (2020), as enzimas amilolíticas mais utilizadas são aquelas produzidas por fungos filamentosos, com destaque para α -amilase, β -amilase, amiloglicosidase e dextrinase. No entanto, embora as amilases microbianas sejam essenciais à diversos setores industriais, sua comercialização ainda apresenta certas limitações, como baixa termoestabilidade, faixa estreita de pH, atividade catalítica lenta, entre diversas outras limitações que elevam o custo final do produto e demandam maior tempo de processo em escala industrial (MIHAJLOVSKI et al., 2016; NETO FILHO 2017).

Neste contexto, este trabalho visa prospectar o potencial biotecnológico na produção de novas enzimas amilolíticas a partir de fungos filamentosos isolados de alimento larval de abelhas sem ferrão, um microambiente com grande diversidade microbiana ainda pouco explorada.

2. JUSTIFICATIVA

O mercado mundial de enzimas foi avaliado em US\$ 10,6 bilhões em 2020 e deverá chegar a US\$ 14,9 bilhões em 2027. Atualmente, 70% dessa quota global se refere à produção, comercialização e aplicação de enzimas de origem microbiana. No entanto, o mercado de enzimas no Brasil é essencialmente importador, apesar do seu grande potencial para a produção, tendo em vista a abundância de matéria orgânica e diversidade biológica do país. Com isso, considerando o avanço industrial global de amilases e a demanda por fontes de produção de qualidade e de baixo custo, a investigação de fungos filamentosos utilizados para o bioprocessamento de produção dessas enzimas se faz necessária e relevante ao desenvolvimento e expansão de produtos biotecnológicos, além de contribuir para a autonomia do Brasil no mercado de enzimas.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do alimento larval de abelhas sem ferrão quanto à produção de amilases.

3.2. Objetivos específicos

- Analisar as características microscópicas e macroscópicas de 8 espécies de fungos filamentosos isolados do alimento larval de abelhas sem ferrão;
- Avaliar a capacidade de produção de amilase pelos fungos filamentosos por meio de análise qualitativa em placa;
- Produzir amilase a partir do método Sacarificação Simultânea à Fermentação (SSF) utilizando o fungo com melhor desempenho pelo teste qualitativo;
- Determinar a atividade da amilase a partir do extrato enzimático bruto produzido em fermentação, por meio do método de quantificação de glicose liberada com a hidrólise do amido.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Micro-organismos

Oito fungos filamentosos foram selecionados, de forma aleatória, da Coleção de Micro-organismos Isolados de Abelha sem Ferrão do Laboratório de Genética (CoMISBee) da Universidade Federal de Uberlândia, onde encontram-se preservados em Ultra freezer a -80°C. Estes micro-organismos foram reativados no Laboratório de Processos Biotecnológicos (LABBIO) da UFU, onde foram conduzidos os testes posteriores. Parareativação, os fungos foram descongelados e inoculados em meio Batata Dextrose Ágar (BDA), composto por batata (200g/L), glicose (20g/L) e ágar (20g/L); e incubados à temperatura ambiente durante 120 horas. Após isso, foram mantidos em placa a 4°C e subcultivados a cada 15 dias para manutenção das culturas.

4.2. Análise qualitativa da produção de amilase

Placas de Petri contendo Ágar Amido Caseína (extrato de levedura 10g/L, peptona de caseína 20g/L, amido solúvel 10g/L, ágar 20g/L, pH 6,5) foram inoculados blocos de gelose, retirados das placas com meio BDA, com os fungos filamentosos incubados a 30°C por cinco dias. Após o período de incubação, as placas foram reveladas com lugol e os halos de hidrólise foram medidos com auxílio de um paquímetro. O diâmetro do halo (DH) e da colônia (DC) foram mensurados para o cálculo do Índice Enzimático (IE) de acordo com a equação: **Índice enzimático (IE) = Diâmetro do halo (DH) / Diâmetro da colônia (DC)** (BAZZO et al., 2022). O teste foi conduzido em triplicata e o isolado com maior nível de produção de amilase em função do Índice Enzimático foi selecionado para a produção do extrato enzimático bruto.

No presente trabalho, seguiu-se a escala do índice enzimático estabelecido por Silvae colaboradores (2015) e os fungos filamentosos foram classificados, quanto à intensidade de produção de amilase, em isolados: fracamente produtores ($1,0 \leq IE < 1,5$), moderadamente produtores ($1,5 \leq IE < 2,0$), fortemente produtores ($IE \geq 2$) e não produtores ($IE = 0$).

4.3. Microscopia dos fungos filamentosos

Para a microscopia, fez-se a raspagem das células fúngicas crescidas em meio BDA seguida de transferência para a lâmina de visualização. As células foram coradas com uma gota de corante azul de metileno e foram lamínulas foram sobrepostas sobre essas lâminas com as células. A visualização no microscópio foi conduzida em lentes de 4x, 10x, 40x e 100x, sendo as imagens retiradas a partir da lente de 100x.

4.4. Produção do extrato enzimático por Fermentação em Estado Sólido (FES)

A produção da enzima foi feita por FES. Previamente, um pré-inóculo foi produzido a partir dos micro-organismos obtido em meio sólido (BDA), os quais foram inoculados em Erlenmeyers de 250mL contendo 100mL de meio czapek (sacarose 30g/L, nitrato de sódio 2g/L, fosfato dipotássico 1g/L, sulfato de magnésio 0,5g/L, cloreto de potássio 0,5g/L e sulfato ferroso 0,010g/L), por um período de 48 horas a 100rpm e temperatura ambiente. Prontamente, as células fúngicas foram separadas do meio líquido com auxílio de uma peneira e ressuspensas em 100mL de água ultrapura previamente esterilizada em autoclave.

Para a FES e produção do extrato bruto enzimático, 10mL das células fúngicas ressuspensas foram inoculados em Erlenmeyer de 250mL contendo 10 gramas de farelo

de arroz esterilizado por autoclave. O tempo de incubação foi de 72 h à temperatura ambiente. Para recuperação do extrato enzimático, foram adicionados 50mL de água destilada, e após mistura manual com auxílio de um bastão de vidro, os frascos foram agitados a 110rpm por 1 hora. O extrato enzimático foi recuperado por meio de filtração em peneira e centrifugação a 8000 x g por 10 minutos.

4.5. Avaliação da atividade enzimática por quantificação dos açúcares redutores utilizando reagente DNS (Ácido dinitrosalicílico)

A reação baseia-se na atividade sacarificante das amilases por quantificação dos açúcares redutores liberados pela hidrólise do amido, utilizando o reagente DNS. Para isso, a atividade amilolítica foi quantificada através da adição de 0,5mL de uma solução contendo 1,6% de amido solúvel em tampão acetato 2N pH 4,3 em 0,5mL do extrato enzimático, seguido de incubação à 60°C por 3, 6, 9, 12 e 15 minutos. A leitura da absorbância foi conduzida a 540nm e os resultados foram analisados segundo a curva padrão de glicose (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de açúcar redutor por minuto (EISENTHAL e DANSON, 2002).

4.4.1 Preparo do reagente dinitrosalicílico (DNS)

Para o preparo do reagente DNS, 10g de ácido 3,5-dinitrosalicílico foram dissolvidos em 200mL de hidróxido de sódio 2M (NaOH), caracterizando a solução “A”. Outra solução (B) foi preparada dissolvendo-se 300g de tartarato de sódio e potássio (Sal de Rochelle) em 500mL de água destilada, sob aquecimento e agitação constante. Seguindo essas condições, adicionou-se a solução A sobre a B até a dissolução completa do DNS. Por fim, após resfriamento, a mistura teve o volume final completado para 1000mL com água destilada (VASCONCELOS, PINTO e DE ARAGÃO, 2013).

4.4.2. Curva padrão analítica de açúcares redutores

A montagem da curva para padronizar a metodologia em relação à quantidade de açúcares redutores presentes na amostra (Figura 1) foi realizada a partir do método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) descrito na literatura como padronizado, adequado e que apresenta sensibilidade de detecção de 1 a 20 μ mol de glicose (MILLER, 1959). Neste trabalho, as concentrações de glicose utilizadas para calibrar a curva foram de 0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0g/L (Figura 2).

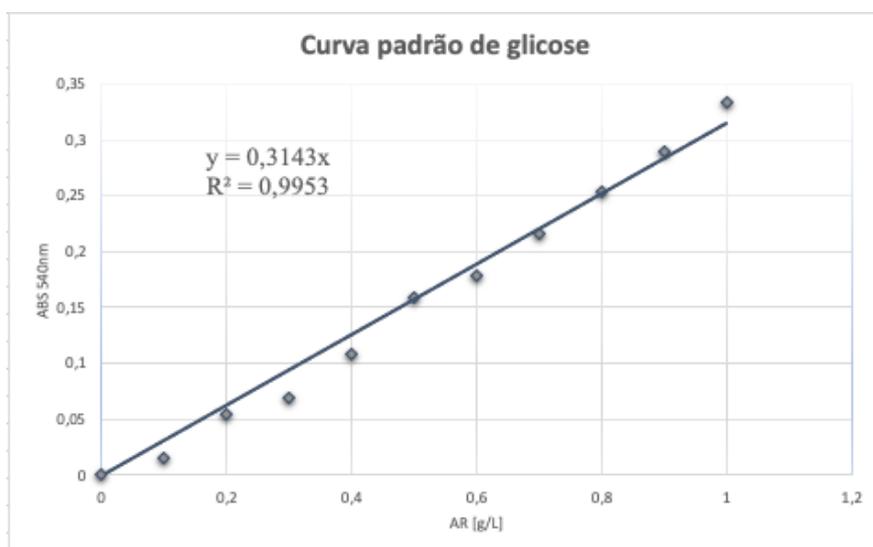


Figura 1. Curva padrão de glicose (Concentração de açúcares redutores versus absorvância). Fonte: Autoria própria.

A correlação foi feita considerando o eixo das ordenadas “y” como a absorbância em 540nm obtidas pela reação com DNS e o eixo das abcissas “x” como a concentração de glicose (g/L) a partir da solução padrão de glicose a 1,0g/L (INFORSATO e PORTO, 2016; MILLER, 1959).

Sendo assim, através do gráfico da figura 3, foi obtida a seguinte equação:

$$y = 0,3143x \text{ (Equação 1);}$$

ou melhor, $ABS = 0,3143 * AR$, onde AR corresponde aos açúcares redutores e ABS a absorbância observada. O R^2 obtido foi de 0,9953, considerado bom, confiável e de acordo com a literatura. Segundo Martins (2014), um R^2 considerado relevantemente bom é o mais próximo de 1, sendo assim, o coeficiente angular encontrado neste estudo de 0,9953 pode ser considerado um resultado válido. Ademais, é defendido por Callegari-Jacques (2003) que valores entre 0,9 e 1 de coeficiente de correlação apresentam forte assimilação entre as variáveis.



Figura 2. Concentrações crescentes de glicose em reação com DNS; coloração variando do menos concentrado, mais claro, para maior concentração de glicose, coloração acentuada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cultivo do micro-organismo e análise macro e microscópica

Oito fungos filamentosos isolados de diferentes espécies de abelhas sem ferrão foram selecionados da CoMISBee, conforme demonstrado na Tabela 1, sendo reativados para o crescimento micelial em meio BDA conforme demonstrado na figura 4.

Tabela 1. Codificação dos fungos filamentosos da Coleção de Micro-organismos Isolados de Abelhas sem ferrão do CoMISBee e suas respectivas abelhas sem ferrão

Abelhas sem ferrão	Código do fungo filamentoso
<i>Frieseomelitta varia</i>	Fv-Sab 01; Fv-Sab 02; Fv-Sab 05; Fv-Sab 10
<i>Melipona scutellaris</i>	Ms30B; Ms13B
<i>Tetragonisca angustla</i>	Fungo 26; Fungo 21

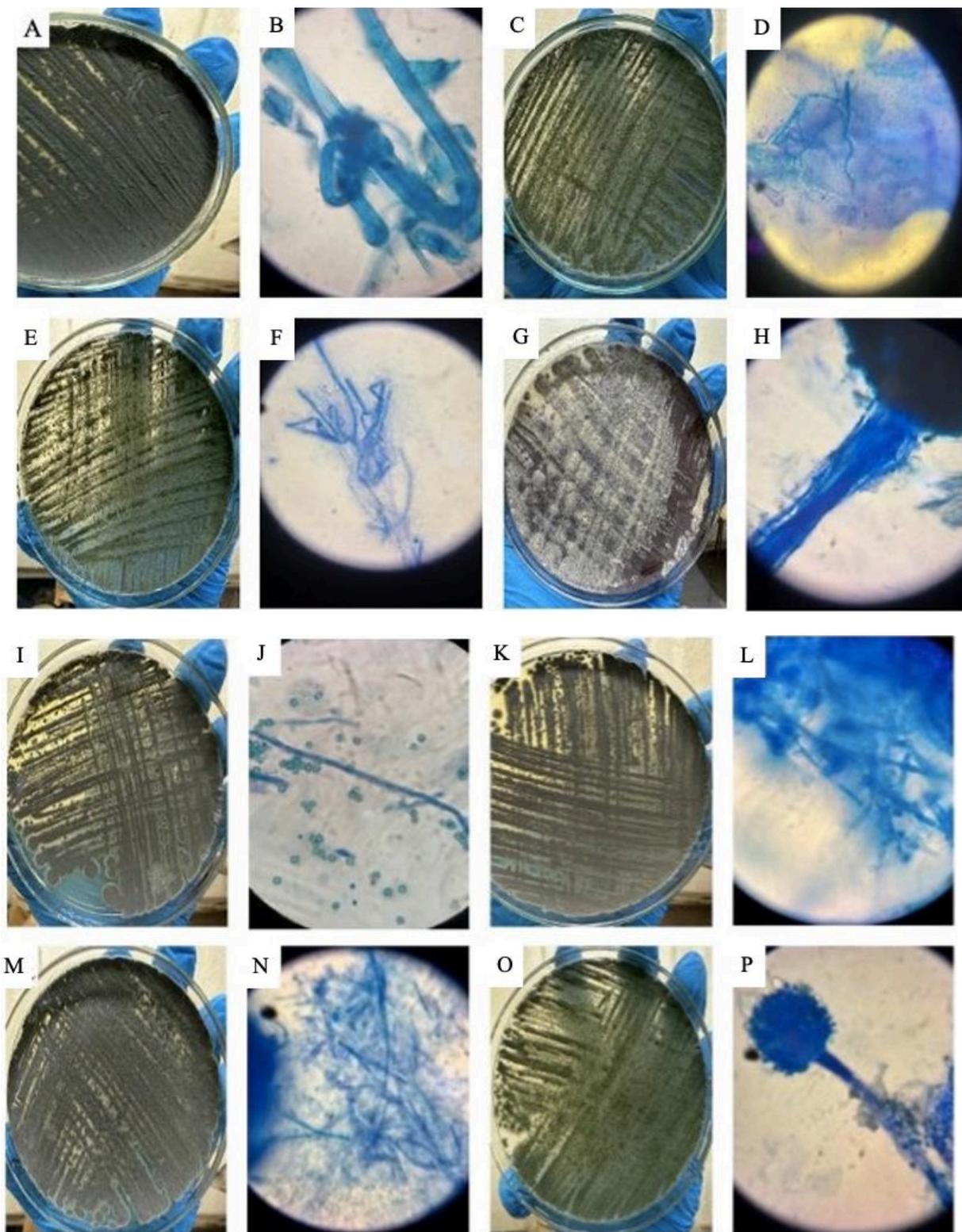


Figura 3. Fungos filamentosos cultivados em meio BDA e microscopia com corante azul de metileno. (A-B) Fungo MS30B; (C-D) Fungo MS13B; (E-F) Fungo 26; (G-H) Fungo 21; (I-J) Fungo Fv-Sab 01; (K-L) Fungo Fv-Sab 02; (M-N) Fungo Fv-Sab 05 e (O-P) Fungo Fv-Sab 10. Fonte: Autoria própria.

Com base nas imagens capturadas em laboratório durante os experimentos, os fungos filamentosos isolados do alimento larval de abelhas sem ferrão apresentaram semelhanças macroscópicas entre os fungos MS13B, 26 e Fv-Sab 10, como a coloração branca e à medida que esporulam admitem a cor verde, possuem uma superfície peluda e o tom reverso branco-amarelado, o que sugere uma possível igualdade de gênero. Paralelamente mesmo ocorreu em questão de semelhança de características entre os fungos MS30B, Fv-Sab 01, Fv-Sab 02 e Fv-Sab 03, possuindo uma coloração de verde mais intenso após a esporulação, superfície aveludada e bordas brancas com um reverso branco-amarelado. Já o fungo “21”, apresenta uma característica única quando comparado com os outros fungos utilizados neste trabalho, possuindo coloração mais amarronzada e a formação de micélios com coloração mais clara e o reverso branco.

Em relação a microscopia dos fungos, em dois deles – fungo 21 e Fv-Sab 10 – foi possível a visualização dos conídios íntegros, enquanto nas outras microscopias apenas hifas/micélios e esporos isolados foram visualizados. Considerando as características macro e microscópicas analisadas neste trabalho, sugere-se que os fungos apresentados seriam principalmente pertencentes ao filo Ascomycota.

Estudos recentes relatam a importância da diversidade microbiana associada às abelhas sem ferrão nativas do Brasil e suas colmeias, demonstrando que existe uma forte relação de dependência entre eles (De PAULA et al., 2021). Em *M. scutellaris* já foram encontrados os gêneros *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. (GOIS et al., 2010), em *F. varia* foi identificado a espécie *Cladosporium exasperatum*, além das leveduras do gênero *Saccharomyces* e *Wickerhamiella*; e em *T. angustula* foram detectados gêneros de fungos como *Cladosporium* sp., *Erysiphe* sp., e *Penicillium* sp. (SANTOS et al., 2023). Barbosa e colaboradores (2017) registraram a presença de cinco espécies de *Monascus* sp. em mel, pólen e superfície da colmeia de *M. scutellaris*, relataram três espécies novas, sendo elas

M. flavipigmentosus, *M. mellicola* e *M. recifensis*. Noutro estudo, evidenciaram uma diversidade de espécies de *Penicillium* sp. e *Talaromyces* sp., reportando 27 espécies, sendo sete novas (BARBOSA, 2018).

5.2. Nível de produção de amilase em função do Índice Enzimático

A bioprospecção enzimática de origem fúngica é considerada uma opção mais rentável em comparação com a bacteriana, pois os fungos filamentosos produzem enzimas extracelulares com alto teor de pureza e em altas concentrações (SANCHEZ; DEMAIN, 2017). Diversos estudos realizam um *screening* primário para selecionar os micro-organismos potencialmente produtores da enzima, a partir da inoculação do fungo filamentoso em meio sólido contendo o substrato enzimático (OLIVEIRA, FERREIRA e DA SILVA BENTES, 2022; PERAZA-JEMÉNEZ et al., 2021; SANTOS e SILVA, 2020).

Neste estudo, o teste qualitativo avaliou o nível de produção de amilase em função do Índice Enzimático (IE), muito utilizado em diversos estudos como metodologia de seleção primária que economiza tempo e custos para a busca de novas enzimas com potencial biotecnológico (SANTOS et al., 2020; ZHANG et al., 2006; CHIMATA, CHETTY e SURESH, 2011; FARIAS 2008). Os resultados do IE e as classificações dos micro-organismos quanto a produção de amilase, encontram-se na tabela 2.

A microbiota presente nas abelhas sem ferrão é de grande importância para manutenção de suas colmeias, existindo forte relação de dependência entre as abelhas e os micro-organismos associados (SOUZA et al., 2021). Estes micro-organismos fornecem suprimentos alimentares; protegem as colônias do ataque por patógenos, pela produção

de substâncias antimicrobianas; e auxiliam na digestão de alimentos de difícil degradação a partir da produção de diferentes enzimas hidrolíticas (De PAULA et al., 2021). Apesar da literatura demonstrar que há grande diversidade microbiana associada às colônias de abelhas sem ferrão, a maioria das pesquisas têm focado em estudos taxonômicos, filogenéticos e de composição da comunidade microbiana, e o grande potencial biotecnológico desses micro-organismos, como a produção de enzimas, permanece pouco elucidado (De PAULA et al., 2021; SANTOS et al., 2023; BARBOSA, 2018). Nosso estudo teve como principal estímulo encontrar novas amilases potenciais para uso em diversos setores industriais, como o alimentício, têxtil, de biocombustível, de detergentes, entre outros (PELLEGRINI et al., 2020).

Tabela 2. Nível de produção de amilase pelos fungos filamentosos isolados de abelhas sem ferrão em função no Índice Enzimático.

Fungos filamentosos	Diâmetro do halo (cm)	Diâmetro da colônia(cm)	IE (DH/DC)	Classificação do IE
MS30B	2,85 ± 0,15	1,0	2,85	Fortemente produtor
MS13B	2,35 ± 0,15	1,0	2,35	Fortemente produtor
26	2,4 ± 0,1	1,0	2,4	Fortemente produtor
21	1,8 ± 0,0	1,0	1,8	Moderadamente produtor
Fv-Sab 01	1,6 ± 0,1	1,0	1,6	Moderadamente produtor
Fv-Sab 02	0	1,0	0	Não produtor
Fv-Sab 05	1,8 ± 0,0	1,0	1,8	Moderadamente produtor
Fv-Sab 10	2,5 ± 0,0	1,0	2,5	Fortemente produtor

De acordo com o Índice Enzimático, 4 fungos filamentosos foram fortemente produtores de amilase, sendo 2 isolados de abelhas *M. scutellaris*, 1 de *F. varia* e 1 de *T. angustla*. Apenas um fungo foi não produtor, não observando-se halo de degradação do amido, e os demais foram classificados como moderadamente produtores de amilase. Nenhum fungo foi fracamente produtor da enzima. Assim foi possível observar grande potencial para produção de amilases a partir desses fungos isolados de abelhas sem ferrão, no qual o nível de produção da enzima em função do IE foi de fortemente produtor para 50% (4/8) dos fungos analisados, com valores superiores a 2,0.

Oliveira, Ferreira e da Silva Bentes (2022) analisaram, a partir de uma amostragem de 269 isolados fúngicos, o potencial enzimático de amilase a partir do IE, e concluíram que, a partir de uma seleção prévia de 10 maiores produtores da enzima, apenas dois foram considerados como fortemente produtor, com IE de 3,35 e 2,75, aproximadamente. Peraza-Jiménez e colaboradores (2021), descrevem apenas valores de até 2,5 para o fungo com maior característica produtora em termos de índice de potência de atividade enzimática, após a análise de 150 isolados fúngicos de diferentes origens. Resultados esses que, mesmo com um maior número de amostras de diferentes fungos, corroboram para os resultados obtidos neste presente trabalho, visto que o maior IE encontrado foi de 2,85 dentre oito isolados fúngicos diferentes em relação a mais de 400 estudados entre Oliveira, Ferreira e da Silva Bentes (2022) e Peraza-Jiménez e colaboradores (2021).

Santos e Silva (2020) fizeram a bioprospecção de fungos a partir de quatro superfícies, sendo elas amostras de folhas, casca de caule, xilema e raízes. Destas amostras, foram adquiridos 60 isolados fúngicos e apenas 23,3% destes apresentaram halo de hidrólise de amido, e o maior IE descrito foi de 1,8. Soares e colaboradores (2010) determinaram o IE em situações do crescimento fúngico com e sem

refrigeração, e meios com e sem glicose, a fim de analisar as diferenças do fungo *Aspergillus nidulans*. Os resultados obtidos demonstraram que sob refrigeração apenas sete dos dezesseis inóculos tiveram crescimento entre um IE de 0,2-1,32 o que, segundo os autores, pode ser devido ao estresse gerado pela baixa temperatura, fazendo com que esses fungos produzissem amilase como forma de sobrevivência. Dentre as situações sem refrigeração observou-se uma máxima de IE de 1,55 dentre 4 tipos de linhagens diferentes e as quatro situações de meio, totalizando um total de 16 cepas analisadas. É válido ressaltar que o meio que mais teve sucesso na produção qualitativa de amilase foi o meio completo (PONTECORVO et al., 1953) a 2% de amido e sem adição de glicose, validando ainda mais o grande potencial visto dentre os fungos estudados neste presente trabalho.

5.3. Avaliação da atividade enzimática pela quantificação de açúcares redutores

5.3.1. Fermentação em Estado Sólido (FES) em farelo de arroz

Pela análise qualitativa anterior, o fungo MS30B apresentou maior IE (2,85) e foi selecionado para FES e produção do extrato enzimático, utilizando o farelo de arroz como substrato indutor da produção de amilases em um tempo de fermentação de 72 horas. O cultivo dos fungos em FES apresenta vantagens quando comparada à fermentação submersa (líquida), visto que a quantidade de água livre presente no meio sólido é reduzida, aproximando-se das condições encontradas no meio ambiente, resultando em melhor desenvoltura dos micro-organismos. Além disso, é válido destacar também que a disponibilidade diminuta de água livre no meio diminui as chances de contaminação por outros micro-organismos indesejados (CASTRO et al., 2010).

Neste trabalho, a FES foi conduzida utilizando o farelo de arroz, de fácil obtenção, baixo custo, elevados teores de amido e ainda apresenta um caráter altamente vantajoso

em relação a outros substratos para o crescimento fúngico e produção enzimática de amilase quando comparado com outros substratos como farelo de trigo (PURI et al., 2013).



Figura 4. Fermentação em Estado Sólido para produção do extrato enzimático em duas situações. A) hora 0, farelo de arroz estéril inoculado com as células fúngicas; B) Após 72 horas de fermentação. Fonte: Autoria própria.

O tempo de fermentação foi previamente verificado em diferentes estudos e, por um consenso técnico, a marca de 72 horas foi a que se mostrou mais produtiva em relação as amilases. Segundo Gusmão e colaboradores (2014), dois de três isolados fúngicos obtiveram maior resultado de atividade amilolítica após três dias de fermentação, com resultados de 96,69U/g e 161,7U/g. Outro estudo que demonstrou maior atividade enzimática da amilase em 72 horas foi em De Faria et al. (2017), onde foi demonstrado um valor de 0,47U/mL, demonstrando o maior valor entre as 144 horas avaliadas.

5.3.2. Obtenção da curva padrão de glicose por método DNS (Ácido dinitrosalicílico)

Neste estudo, a curva analítica de açúcar redutor liberado pela degradação da glicose administrada em diferentes concentrações, resultante das diluições, foi obtida a partir do método de DNS, como é demonstrado na Figura 4. Com a equação da reta e o coeficiente angular de correlação da reta (R^2) adquiridos foi possível correlacionar a

concentração de substrato com a absorbância lida em espectrofotômetro e, assim, analisar o grau de associação entre as duas variáveis (MARTINS, 2014).

A determinação de açúcares redutores possibilita a quantificação da atividade das amilases totais presente no extrato bruto, filtrado a partir da fermentação, visto que a conformação da molécula dos açúcares redutores garante uma possibilidade de oxidação, já que são carboidratos com carbono carbonila livre, ou seja, não inclui em sua estrutura uma ligação glicosídica. Caracteriza-se como sendo estes açúcares monossacarídeos como glicose, galactose e frutose que, na presença do reagente DNS, em pH alcalino, são oxidados em açúcares com a presença do grupo carboxil, como o ácido D-glucônico (SANTOS et al., 2017; AHMED, 2013).

No teste utilizando o DNS como agente oxidante, a mudança de coloração no líquido da solução se dá pela reação do carbono carbonílico reduzindo-se a um composto nitroamido análogo – ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, fazendo com que a coloração amarela inicial passe a cor avermelhada escura do nitroamido. Neste sentido, ao medir com um comprimento de onda de 540nm no espectrofotômetro a absorção dos ácidos 3-amino-5-nitrosalicílico é possível determinar a quantidade de conversão de açúcar redutor na amostra analisada (AHMED, 2013; INFORSATO e PORTO, 2016), que neste trabalho se apresenta como glicose.

Sendo assim, a relevância em quantificar os monômeros de glicose é dada pela sua relação direta com a atividade enzimática das amilases fúngicas presente no extrato enzimático do fungo MS30B, visto que a relação de caráter universal utilizada para a conversão é: 1U (unidade enzimática) é equivalente a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de glicose por minuto (MANERA et al., 2008; EISENTHAL e DANSON, 2002).

5.3.3. Atividade enzimática do fungo MS30B

A quantificação da atividade amilolítica no extrato enzimático bruto é importante para avaliar a ação das amilases e a eficiência que a enzima consegue converter o amido em moléculas de glicose (PEREIRA, 2014). Quando foi analisada a atividade enzimática do extrato enzimático bruto do fungo MS30B nos pontos 0, 3; 6; 9; 12 e 15 minutos obteve-se uma distribuição como se a enzima entrasse no estado estacionário de ação em entre aproximadamente 3 e 4 minutos (figura 5).

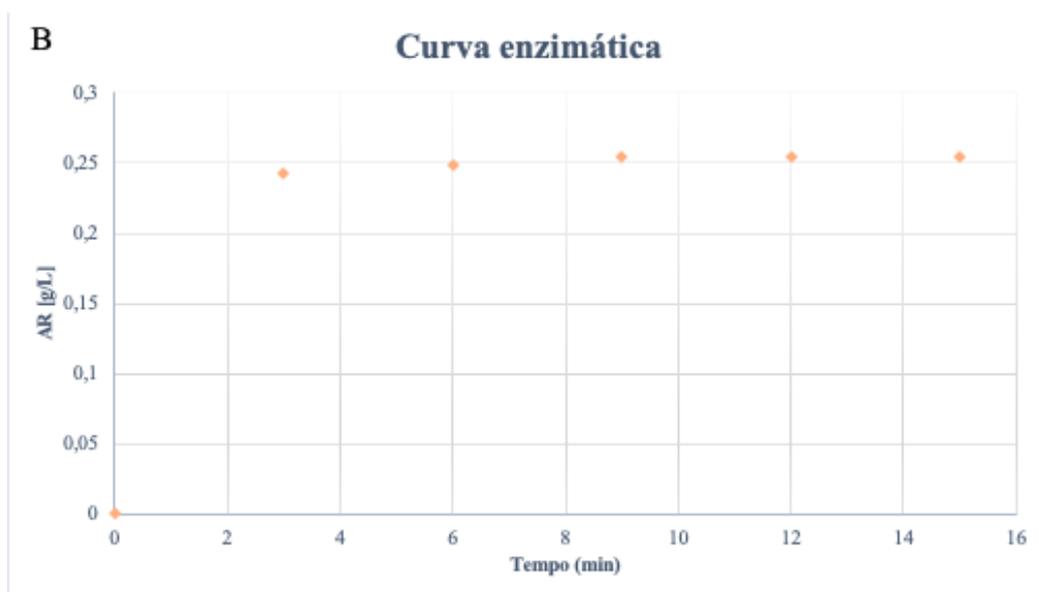


Figura 5. Atividade amilolítica do extrato enzimático bruto produzido por Fermentação em Estado Sólido a partir do fungo MS30B (Tempo versus Concentração de Açúcares Redutores).

Deste modo, os testes seguintes foram conduzidos a 3,5 minutos de reação para a amilase do isolado MS30B, o que se conclui uma velocidade muito rápida de atividade quando comparado com outros artigos (ALMEIDA, 2015; LIRA, 2022), visto que para uma produção industrial o menor tempo de reação significa maior sucesso de produção e menor gasto envolvido (IIDA e BUARQUE, 2021). Assim, utilizando a Equação 1 da curva padrão de glicose, obteve-se um valor específico de concentração de glicose, onde

considerando que cada 1U da enzima libera $1\mu\text{mol}/\text{min}$ de glicose, a unidade enzimática encontrada neste estudo foi de $15,4\mu\text{mol}/\text{mL}$ em 3,5 minutos de reação, ou seja, dividindo pelo tempo de duração, obteve-se uma atividade por minuto de $4,4\text{U}/\text{mL}$.

A atividade enzimática apresentada pela literatura é calculada e apresentada de maneiras diferentes, o que dificulta a discussão quanto aos valores obtidos. O valor de atividade encontrado por De Faria Silva e colaboradores (2017) foi de $0,47\text{U}/\text{ml}$ em um tempo de fermentação de 72h, no entanto o estudo foi conduzido por uma fermentação submersa, estática e sob agitação. É importante destacar que os autores consideraram como uma unidade enzimática a capacidade em liberar $0,1\mu\text{mol}$ de açúcar redutor por minuto, o que se fosse considerado em nosso trabalho, a atividade amilolítica apresentada seria de $44\text{U}/\text{mL}$.

Já em outro estudo, demonstrado por Rodrigues (2022), verificou-se uma maior atividade pela quantificação de açúcares redutores, também após 72h de fermentação, com valor de $10,10\text{U}/\text{mL}$ como máximo de atividade utilizando uma equação que considera os volumes de extrato bruto utilizado no experimento. Neste sentido, trazendo para a realidade deste trabalho, obteríamos uma atividade de aproximadamente $17,59\text{U}/\text{mL}$, atingindo um valor maior do que a máxima apresentada pelo autor.

Quando as variáveis foram trabalhadas de maneira semelhante a este estudo, como temperatura para atividade enzimática de 60°C e pH de 4,5, foi encontrada uma atividade média de $2,94\text{U}/\text{mL}$ (ALMEIDA, 2015). No entanto, há divergências quanto à atividade amilolítica em função da temperatura ótima, visto que há influência direta do seu produtor, no caso, os fungos filamentosos. Nesta perspectiva, há relatos onde as enzimas amilolíticas produzidas por *Fusarium* sp. demonstraram uma alta atividade enzimática numa faixa de temperatura de 40 a 70°C , com a máxima observada em 50°C (NWAGU, 2011). Já Pereira (2014) verificou que as amilases produzidas pelo fungo

estudado tiveram uma perda significativa em sua atividade a partir de 60°C. Neste estudo, não foi possível avaliar variações de condições físicas, o que ficará como perspectivas para estudos futuros, visto que a atividade enzimática poderá ser melhorada.

Por fim, observa-se uma boa atividade apresentada pelo fungo filamentososo MS30B, isolado da abelha sem ferrão *M. scutellaris*, porém são necessários estudos futuros para elucidar a otimização de sua ação, a partir de variações de temperatura, pH e tempo de reação, permitindo assim, melhor caracterização da enzima.

6. CONCLUSÃO

A partir das análises macro e microscópicas foi possível visualizar 8 fungos com características semelhantes de crescimento, bem como esporos externos (exósporos) e micélio vegetativo septado, o que indicaria gêneros principalmente pertencentes ao filo Ascomycota. O *screening* inicial a partir do nível de atividade amilolítica em função do Índice Enzimático demonstrou que a maioria dos fungos são capazes de produzir amilase, sendo que 50% deles foram fortemente produtores da enzima, demonstrando grante potencial biotecnológico desses micro-organismos. O fungo MS30B demonstrou produzir um extrato enzimático com atividade de 4,4U/mL, o que pode ser considerado uma boa atividade, no entanto, a caracterização da enzima quanto aos fatores que influenciam essa atividade poderá resultar otimização de sua produção e alcançar valores de atividade ainda maiores. Este estudo representa o início para produção de uma nova amilase, um produto biotecnológico com alto valor e aplicabilidade importante para as indústrias brasileiras.

7. REFERÊNCIAS

ABU YAZID, Noraziah et al. Solid-state fermentation as a novel paradigm for organic waste valorization: a review. **Sustainability**, v. 9, n. 2, p. 224, 2017.

AHMED, R.C.M. **Quantificação de açúcares redutores da casca de arroz após diferentes tipos de pré-tratamento seguido da hidrólise enzimática**. 2013. 41 f. TCC(Graduação) - Curso de Engenharia de Energias Renováveis e Ambiente, Agroenergia, Universidade Federal do Pampa, Bagé, 2013.

ALMEIDA, Paula Zaghetto de. **Diversidade do potencial amilolítico em fungos filamentosos: purificação e caracterização de uma glucoamilase de *Aspergillus brasiliensis***. 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ALVES, Mariana Ferreira et al. **Produção de enzimas por fungos filamentosos**. Fundamentos e atualidades em tecnologia e inspeção de alimentos, 2020.

ALVES-CAMPOS, Carla Fonseca et al. Enzimas fúngicas em dietas com alimentos alternativos para frangos de crescimento lento. **DESAFIOS-Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, v. 4, n. 2, p. 35-53, 2017.

BARBOSA, R. N. et al. Phylogenetic analysis of *Monascus* and new species from honey, pollen and nests of stingless bees. **Studies in mycology**, v. 86, n. 1, p. 29-51, 2017.

BARBOSA, Renan N. et al. New *Penicillium* and *Talaromyces* species from honey, pollen and nests of stingless bees. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 111, p. 1883-1912, 2018.

BAZZO, Vanesa et al. Bioprospecção e caracterização da atividade amilolítica de fungos filamentosos. Bioprospection and characterization of the amyolytic activity of filamentous fungi. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 5, p. 33314-33330, 2022.

BUDHIRAJA, A. et al. Bioactive metabolites from an endophytic fungus of *Aspergillus* species isolated from seeds of *Gloriosa superba* Linn. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, p. 323-329, mar. 2012.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. Bioestatística: princípios e aplicações. Porto Alegre: Artemed, 2003. 255p.

CARVALHO, R. M. A., MARTINS, C. F., ALVES, R. R. N. & ALVES, Â. G. C. (2018). **Do emotions influence the motivations and preferences of keepers of stingless bees?** Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, 14:1–11.

CASTRO, A. M. DE; PEREIRA JUNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHIMATA, Murali Krishna; CHETTY, Chellu S.; SURESH, Challa. Fermentative production and thermostability characterization of α amylase from *Aspergillus* species and its application potential evaluation in desizing of cotton cloth. **Biotechnology research international**, v. 2011, 2011.

DE FARIA SILVA, Luciana Amaral et al. Produção de amilase por fungo filamentosso endofítico em fermentação submersa/Production of amylase by endophytic filamentous fungi by submerged fermentation. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 3, supl. 1, p. 49-53, 2017.

DE OLIVEIRA AMARAL A, E FERREIRA AFTAF, DA SILVA BENTES JL. **Fungal endophytic community associated with *Hevea spp.***: diversity, enzymatic activity, and biocontrol potential. *Braz J Microbiol.* 2022 Jun;53(2):857-872. doi: 10.1007/s42770-022-00709-1. Epub 2022 Mar 5. PMID: 35247168; PMCID: PMC9151944.

DE OLIVEIRA GUSMÃO, Robert et al. Produção de enzimas por *Aspergillus spp.* sob fermentação em estado sólido em casca de café. **Scientia Plena**, v. 10, n. 11, 2014.

DE PAULA, Gabriela Toninato et al. Stingless bees and microbial interactions. **Current Opinion in Insect Science**, v. 44, p. 41-47, 2021.

DOS SANTOS, Charles Fernando et al. Diversidade de abelhas sem ferrão e seu uso como recurso natural no Brasil: permissões e restrições legais consorciadas a políticas públicas. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 9, n. 2, 2021.

DE SOUZA, Andressa Pedroso Carlotto et al. AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE MEL DE ABELHA SEM FERRÃO DA ESPÉCIE *T. angustula*, PROVENIENTES DA REGIÃO DAS MISSÕES-RS. **Salão Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão da Uergs (SIEPEX)**, v. 1, n. 10, 2021.

DE SOUZA OLIVEIRA, Ricardo Pinheiro. Purificação de enzimas e peptídeos antimicrobianos: suas aplicações. **Biotecnologia Industrial-Vol. 3: Processos fermentados e enzimáticos**, v. 3, p. 333, 2019.

EISENTHAL, Robert; DANSON, Michael J. (Ed.). **Enzyme assays: a practical approach**. Practical Approach, 2002.

FARIAS, Mariçula Vieira et al. Produção de enzimas hidrolíticas por leveduras isoladas de solos de áreas preservadas em Roraima, Brasil. 2008.

FELIPE NETO, C. A. L. **Influência da estrutura da paisagem sobre a produção e qualidade de mel da abelha jandaíra (*Melipona subnitida*, Apidae: Meliponini) na Caatinga**. 2015. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2015.

FERREIRA, P. A. et al.: Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática: Após os antibióticos, enzimas são os produtos microbianos mais explorados na indústria biotecnológica. **Rev. Processos Químicos**, ano 3 no 5, Jan-Jun, 2009.

GOIS, G. C. et al. Microbiological quality of honey bee *Melipona scutellaris*. **PubVet**, v. 4, n. 9, 2010.

IBRAHIM, Salwa Elamin et al. **Amylase production on solid state fermentation by *Bacillus* spp.** **Food Public Health**, v. 2, p. 30-35, 2012.

IIDA, Itiro; BUARQUE, L. I. A. **Ergonomia: projeto e produção**. Editora Blucher, 2021.

INFORSATO, F.J; PORTO, A.L.M. Atividade enzimática de celulasas pelo método DNS de fungos isolados de sementes em germinação. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, São Paulo, v. 5, n. 4, p. 444-465, out. 2016. <https://doi.org/10.5380/rber.v5i4.44339>

JEAN-BAPTISTE, James et al. **AMILASE E LIPASE PRODUZIDAS POR FUNGOS DE EFLUENTE TÊXTIL: LEVANTAMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO**. 2020
Trabalho de Conclusão de Curso.

JHON, JINU. **Amylases-Bioprocess and Potential Applications: A Review**. International Journal of Bioinformatics and Biological Science. January 2017.

KAN, R. S. *et al.* Developments and opportunities in fungal strain engineering for the production of novel enzymes and enzyme cocktails for plant biomass degradation. **Biotechnology Advances**, v.37, 107361, 2019.

KERR W E, CARVALHO G A, NASCIMENTO V A, **Abelha urucu**: biologia, manejo e conservação. Belo Horizonte: Fundação Acangaú, 1996.

KIRK, Ole, BORCHERT, Torben Vedel, et FUGLSANG, Claus Crone. **Industrial enzyme applications**. Current opinion in biotechnology, 2002, vol. 13, no 4, p. 345-351.

LAVINAS, F. C. *et al.* Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: promising sources of biologically active compounds. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 29,p. 389-399, 2019.

LIRA, David Nunes Oliveira. **Produção de Extrato Enzimático do Fungo Aspergillus Flavus com Atividade Amilolítica**. 2022.

MARÇAL, L. N. **Comunidades bacterianas associadas a colônias de abelhas amazônicas sem ferrão da espécie *Melipona Seminigra*: diversidade e potencial enzimático**. 2017. 134 p. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia) - Programa Multi- institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2017.

MANERA, A.P *et al.* Adsorption of Amyloglucosidase from *Aspergillus niger* NRRL 3122 Using Ion Exchange Resin. **Brazilian Archives Of Biology And Technology: An international journal**. Pirassununga, p. 1015-1024. out. 2008. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132008000500019>

MARTINS, M.E.G. Coeficiente de correlação amostral. **Revista de Ciência Elementar**, Porto, v. 2, n. 02, p. 1-4, jun. 2014. 042. <https://doi.org/10.24927/rce2014.262>

MIHAJLOVSKI, K. R. et al. Improved α -amylase production on molasses and sugar beet pulp by a novel strain *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 115–122, 2016.

MILLER, G. L. Modified DNS method for reducing sugars. **Anal Chem**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOREIRA, Filipe Mercês et al. **Identificação de fungos filamentosos em indústrias farmacêuticas: uma revisão integrativa da literatura**. 2022.

NEGRULESCU, A.; PATRULEA, V.; MINCEA, M. M.; IONASCU, C.; VLAD-OROS, B. A.; OSTAFE, V. Adapting the reducing sugars method with dinitrosalicylic acid to microtiter plates and microwave heating. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 23, n. 12, p. 2176-2182, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532013005000003>.

NETO FILHO, Manoel Aguiar. **BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS AMILOLÍTICOS PARA PRODUÇÃO DE ETANOL**. 2017.

NIGAM, POONAM SINGH.: Microbial Enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications. Rev. **Biomolecules** 2013, 3, 597-611. Biomedical Science Research Institute, University of Ulster. Irlanda, 2013.

NWAGU, T. N.; OKOLO, B. N. **Extracellular amylase production of a thermotolerant *Fusarium* sp isolated from Eastern Nigerian soil**. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 54, n. 4, pg, 649 – 658, 2011.

PEDRO, S. R. M. The Stingless Bee Fauna In Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 348-354, dez. 2014.

PELLEGRINI, V.O.A. *et al.* Enzymes for lignocellulosic biomass polysaccharides valorization and production of nanomaterials. **Sustainable Chemistry**, 8 september, 100397, 2020.

PERAZA-JIMÉNEZ K, DE LA ROSA-GARCÍA S, HUIJARA-VASCONSELOS JJ, REYES-ESTEBANEZ M, GÓMEZ-CORNELIO S. **Enzymatic Bioprospecting of Fungi Isolated from a**

Tropical Rainforest in Mexico. J Fungi (Basel). 2021 Dec 28;8(1):22. doi: 10.3390/jof8010022. PMID: 35049962; PMCID: PMC8780421.

PEREIRA, Jhonata Lima. **Produção de enzimas amilolíticas por *Aspergillus oryzae* através de fermentação no estado sólido.** 2014.

PIER, Michele Rigon.: **Produção de Enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação em estado sólido.** Curitiba, 2005.

PONTECORVO, G. et al. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v. 5, p. 141- 238, 1953.

PURI, Shruti; ARORA, M.; SARAQ, Loveleen. Production and optimization of amylase and glucoamylase using *Aspergillus oryzae* under solid state fermentation. **Int J Res Pure Appl Microbiol**, v. 3, n. 3, p. 83-8, 2013.

RABALHO, Alessandra Aparecida. **Isolamento de linhagens microbianas termofílicas amilolíticas, produção, caracterização e aplicação das amilases na hidrólise do amido de mandioca.** 2002.

RODRIGUES, Eliana Maria Gonçalves. Produção de amilase por fermentação em estado sólido utilizando o fungo *Aspergillus niger* e determinação do pH e temperatura ótimos na atividade enzimática. **Bioenergia em Revista: Diálogos (ISSN: 2236-9171)**, v. 12, n. 1, p. 08-20, 2022.

ROMÃO, Tiago Carnevalle. Fungos filamentosos associados ao trato intestinal de insetos detritívoros: uma avaliação do potencial enzimático biotecnológico. 2022.

SANDLE, T. Study of fungi isolated from pharmaceutical cleanrooms: Types and origins. **European Journal of Parenteral and Pharmaceutical Sciences**, v. 26, n. 2, 2021.

SANCHEZ, Sergio; DEMAIN, Arnold L. Useful microbial enzymes—an introduction. In: **Biotechnology of microbial enzymes.** Academic Press, 2017. p. 1-11.

SANTOS, Angela Alves dos et al. **Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca.** Brazilian Journal of Food Technology, v. 20, 2017.

SANTOS, Ana Carolina Costa. **Microbioma do alimento larval de abelhas sem ferrão**: diversidade e potencial biotecnológico. 2022. 80 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2022. DOI <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2022.439>

SANTOS, A.C.C., BORGES, L.D.F., ROCHA, N.D.C. et al. **Bacteria, yeasts, and fungi associated with larval food of Brazilian native stingless bees**. *Sci Rep* **13**, 5147 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32298-w>

SANTOS, Luís Felipe Oliva dos et al. **Triagem de fungos endofíticos de Moringa oleífera produtores de asparaginase e amilase**. 2020.

SANTOS, K. S.; SILVA, L. A. de F. Fungos endofíticos isolados do umbuzeiro (*spondias tuberosa* arruda câmara): fontes alternativas potenciais para a produção de enzimas e pigmentos naturais / Endophytic fungi isolated from umbuzeiro (*spondias tuberosa* arruda câmara): potential alternative sources for the production of enzymes and natural pigments. **Brazilian Journal of Development**, [S. l.], v. 6, n. 12, p. 103761–103774, 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n12-759.

SINGH, SURENDRA et al. Biotechnological applications of industrially important amylase enzyme. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, n. 1, p. 486-496, 2011.

SOARES, Izabel Aparecida et al. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentososo *Aspergillus nidulans*. **Food Science and Technology**, v.30, p. 700-705, 2010.

Tamanho do mercado de enzimas, relatório de análise de participação e tendências por aplicação (enzimas industriais, enzimas especiais), por produto (carbohidrase, proteases, lipases), por fonte, por região e previsões de segmento, 2020-2027. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry> Acesso em 25 de novembro de 2022.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, Gustavo Adolfo Saavedra; DE ARAGAO, F. A. S. Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3, 5-dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos. 2013.

WILMS, W.; V.L. IMPERATRIZ-FONSECA & W. ENGELS. 1996. Resource partitioning between highly eusocial bees and possible impact of the introduced Africanized honey bee on native stingless bees in the Brazilian Atlantic rainforest. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, Lisse, **31**: 137-151.

ZHANG, Xiang Yang et al. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different forms of schizophrenia treated with typical and atypical antipsychotics. **Schizophrenia research**, v. 81, n. 2-3, p. 291-300, 2006.